สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

การผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เอนไซม์ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน
ร่วมกับกระบวนการหมักด้วยเซลล์ตรึงรูปของ *Saccharomyces cerevisiae*
(Bioethanol Production from Sweet Potato Starch by
Simultaneous Enzymatic Saccharification and Fermentation
with Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae*)

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
TP
593
ด1.47
b.12607630
i.
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 131084
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ค. 2557
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ค
สารบัญ.....ง
สารบัญตาราง.....จ
สารบัญภาพ.....ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....8
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....9
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....25
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....32
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....64
เอกสารอ้างอิง.....65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการวิจัย การผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เอนไซม์ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน ร่วมกับกระบวนการหมักด้วยเซลล์ตรึงรูปของ *Saccharomyces cerevisiae*

แหล่งเงิน (ระบุแหล่งทุน) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช)

ประจำปีงบประมาณ 2555

จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 250,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2554 ถึง กันยายน 2555

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด

รศ.ดวงใจ โอชัยกุล คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

ศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลจากแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งใช้อุณหภูมิในการย่อยที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสความเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งใช้อุณหภูมิในการย่อยที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลเปรียบเทียบกันระหว่างกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมักและกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก โดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 ในรูปแบบที่เป็นเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป ในขั้นตอนการหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 ใช้ปริมาณเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้กระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมักโดยเซลล์อิสระจะให้ผลผลิตของเอทานอลสูงสุด คือ 14.64 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมดเป็น 0.38 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด

การผลิตเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยใช้เซลล์ตรึงรูปและเซลล์อิสระของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 มีการเติมแร่ธาตุและวิตามิน (แร่ธาตุ คือ $ZnSO_4$. $7H_2O$ and $MgSO_4.7H_2O$ และวิตามิน คือ Ca-pantothenate and myo-inositol) โดยเติมวิตามินและแร่ธาตุเพียงอย่างเดียวหรือผสมกัน หมักแบบกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) ด้วยเซลล์อิสระของ *S. cerevisiae* YRK 017 เมื่อเวลา 48 ชั่วโมง ในชุดที่มีการเติมแร่ธาตุให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 14.56 กรัมต่อลิตร และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) ชุดที่เติมแร่ธาตุโดยใช้เซลล์อิสระให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 12.77 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 72 กระบวนการหมักแบบการย่อยแยกจากการหมัก ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่ากระบวนการย่อยพร้อมการหมัก และการใช้เซลล์อิสระจะผลิตเอทานอลสูงกว่าการใช้เซลล์ตรึงรูป เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

คำสำคัญ : เอทานอล *Saccharomyces cerevisiae* เซลล์ตรึงรูป กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก มันเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title Bioethanol Production from Sweet Potato Starch by Simultaneous Enzymatic Saccharification and Fermentation with Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae*

Researcher Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul
Department of Biology, Faculty of Science,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

ABSTRACT

Process of ethanol production from sweet potato starch hydrolyzed by alpha-amylase concentration of 0.05% and volume of 5 ml at 90 °C for 2 h and amyloglucosidase concentration of 0.015% and volume of 20 ml at 60 °C for 4 h was carried on for the optimal conditions of the production ethanol by free cell. Followed by the fermentation process of ethanol compared with both separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017, in form of free and immobilized cells. In the process of fermentation of *S. cerevisiae* YRK 017, inoculum volumes were 10%(v/v) at 30 °C in shaking speed of 150 rpm for 72 h. To analyze the concentration of ethanol Gas Chromatography was used and total sugar concentration was utilized the phenol - sulfuric acid method. Cell dry weight was analyzed by drying at a temperature of 70 °C for 48 h. The maximum concentration of ethanol was 14.64 g/l and the yield of ethanol from total sugar was 0.38 $g.g^{-1}$ from simultaneous saccharification and fermentation process using free cell *S. cerevisiae* YRK 017

Ethanol production from sweet potato by using Immobilized cell and free cell of *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 in a batch system was studied. The effect of addition of various yeast activators (mineral salt: $ZnSO_4$. $7H_2O$ and $MgSO_4.7H_2O$ and vitamin: Ca-pantothenate and myo-inositol) separately or mixed. The cultivation of *S. cerevisiae* YRK 017 for 48 hour of activators $ZnSO_4$. $7H_2O$ 0.3g and $MgSO_4.7H_2O$ 2.0g.This process resulted 14.56 $g.l^{-1}$ of ethanol. Simultaneous enzymatic saccharification and fermentation (SSF) was add mineral salt by using free cell for 72 hour and were given 12.77 $g.l^{-1}$ of ethanol. SHF and SSF process of ethanol production was used immobilized and free cell. SHF process gave higher ethanol than SSF process and using free cell gave higher ethanol than immobilized cell. Both SHF and SSF process were studied at 30 °C and 150 rpm in shaked flasks.

Keywords : Ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, immobilized cell, SSF, Sweet potato

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของนักศึกษาระดับปริญญาตรี ชั้นปีที่ 4 สาขาเทคโนโลยีชีวภาพและสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รวมทั้งเจ้าหน้าที่สาขาชีววิทยาทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในการทำวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนคือสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2555

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารที่มีกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	15
4.1	แสดงส่วนประกอบของผงมันเทศแห้งที่เตรียมได้และปริมาณของส่วนประกอบต่าง ๆ	32
4.2	แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศ โดยกระบวนการย่อยผงมันเทศ แยกกับกระบวนการหมักเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง	34
4.3	แสดงค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด ($Y_{p/s}$) กระบวนการย่อยผงมันเทศแยกกับการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง	37
4.4	แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	39
4.5	แสดงค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด ($Y_{p/s}$) กระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปและเซลล์อิสระที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง	42
4.6	แสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกกับการหมักและกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก โดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง	43
4.7	แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแป้งมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	48
4.8	แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแป้งมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ตรึงรูป หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	52
4.9	แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแป้งมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	56
4.10	แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแป้งมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae*	13
2.2	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของเซลล์ตรึง *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 (A : 500X, B : 1000X, C : 2000X)	20
2.3	องค์ประกอบของเครื่อง Gas Chromatograph	21
4.1	แสดงการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบการย่อยแยกจากการหมักโดยใช้ (a) เซลล์อิสระและ (b) เซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ◆ แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง,▲ แทนความเข้มข้นของเอาทานอล, ■ แทนความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด	35
4.2	แสดงปริมาณเอทานอลที่เกิดจากกระบวนการหมักแบบการย่อยผงมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017	36
4.3	แสดงการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบการย่อยพร้อมการหมักโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 ในรูปแบบ (a) เซลล์อิสระ และ (b) เซลล์ตรึงรูป ใช้เวลาหมักทั้งหมด 72 ชั่วโมง ◆ แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง, ▲ แทนความเข้มข้นของเอทานอล, ■ แทนความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด	40
4.4	แสดงปริมาณเอทานอลที่เกิดจากกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017	41
4.5	แสดงปริมาณเอทานอลที่ถูกผลิตโดยกระบวนการย่อยผงมันเทศแยกกับกระบวนการหมักและกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมักที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017	44
4.6	แสดงค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด ($Y_{p/s}$) ของกระบวนการย่อยแป้งมันเทศแยกกับกระบวนการหมักและกระบวนการย่อยแป้งมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมักที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017	45
4.7	แสดงการหมักแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โดยกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) ชุดควบคุม (a), เติมแร่ธาตุ (b), เติมวิตามิน (c), เติมแร่ธาตุผสมวิตามิน (d) หมักด้วยเซลล์อิสระของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* YRK 017 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดย ◆ น้ำตาลทั้งหมด, ▲ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต, ■ ความเข้มข้นของเอทานอล	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากการพัฒนาทางด้านอุตสาหกรรมและการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากร ส่งผลให้ความต้องการใช้พลังงานมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ความต้องการใช้พลังงานเพิ่มขึ้น 17 เท่าเมื่อเทียบกับศตวรรษที่ผ่านมา (Demirbas,2007) อย่างไรก็ตามแหล่งของพลังงานดั้งเดิม เช่น พลังงานที่ได้จากฟอสซิลที่มีปริมาณจำกัด ไม่สามารถตอบสนองความต้องการใช้พลังงานที่เพิ่มมากขึ้นได้ อีกทั้งพลังงานที่ได้จากซากฟอสซิลเหล่านี้ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การปลดปล่อยก๊าซที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก (green house effect) ด้วยเหตุนี้การใช้เชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuels) เช่น ไบโอเอทานอล จึงเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจและมีประโยชน์ เช่น ลดการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ลดการนำเข้าน้ำมันในประเทศที่ไม่สามารรถผลิตน้ำมันได้ ทำให้เกิดพลังงานและเกิดการพัฒนาชุมชนในแถบชนบท แหล่งพลังงานชนิดนี้สามารถหาวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตพลังงานจากชีวมวลได้ง่ายและสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (Baras และคณะ,2002)

เอทานอลชีวภาพ (bioethanol) จัดเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuels) ที่ผลิตได้จากวัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ใหม่ได้ (renewable resources) กระบวนการหมักเอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบประเภท น้ำตาล แป้ง และลิกโนเซลลูโลส โดยวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้งเดิมนิยมนำมาใช้ผลิตอาหารสัตว์ ปัจจุบันนิยมนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลซึ่งให้ผลคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ สำหรับประเทศไทยวัตถุดิบประเภทแป้งที่สามารถหาได้ง่ายและเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอล คือ มันสำประหลัง นอกจากมันสำประหลังแล้ว มันเทศ เป็นพืชทางเลือกใหม่ในการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล โดยมีรายงานว่าในปี พ.ศ. 2550- 2552 ค่าผลได้เฉลี่ยของมันเทศในประเทศไทยมีประมาณ 101,892 ตัน ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณมันเทศมีปริมาณมากพอที่จะนำมาผลิตเอทานอลได้ นอกจากจะนำมาใช้ในการประกอบอาหาร

ในปัจจุบันนี้งานวิจัยเกี่ยวกับไบโอเอทานอลมุ่งเน้นการลดต้นทุนในการผลิตลง จนสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูง ทำให้ราคาของไบโอเอทานอลลดต่ำลง มีการพัฒนาเทคโนโลยีในด้านต่าง ๆ เช่น กระบวนการบำบัดในขั้นแรก (pretreatment) ของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิต การนำเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ มาใช้ในกระบวนการหมัก และการพัฒนารูปแบบกรรมวิธีการหมักเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดต้นทุนในการผลิตไบโอเอทานอลลง (Mielenz,2001) กระบวนการหมักโดยการนำเอนไซม์มาใช้ร่วมกับกระบวนการหมัก ที่เรียกว่ากระบวนการ simultaneous enzymatic saccharification and fermentation process (SSF) เป็นกระบวนการหนึ่งที่นำมาใช้ในการลดต้นทุนในการผลิตไบโอเอทานอล ขณะเดียวกันทำให้ได้ผลผลิตของเอทานอลที่ได้จากกระบวนการนี้สูงขึ้น กระบวนการ SSF เป็นที่นิยมนำมาใช้ ในการผลิตไบโอเอทานอลมากกว่ากระบวนการแบบดั้งเดิมซึ่งมีกระบวนการย่อยให้ได้น้ำตาลที่หมักได้ (hydrolysis)จากนั้นเข้าสู่กระบวนการหมัก(fermentation) เพื่อให้ได้เอทานอล ซึ่งเรียกกระบวนการในการผลิตไบโอเอทานอลแบบดั้งเดิมนี้ว่า separate hydrolysis and fermentation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(SHF) process กระบวนการ SSF ให้ปริมาณเอทานอลที่สูงกว่า ใช้พลังงานในการผลิตต่ำกว่า และใช้เวลาในการผลิตน้อยกว่ากระบวนการ SHF รวมทั้งไม่ก่อให้เกิด product inhibition (การยับยั้งเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์ที่ได้) อย่างไรก็ตามปัญหาของกระบวนการหมักแบบ SSF คือ อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนการย่อยสับสเตรท ไม่ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เนื่องมาจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยของเอนไซม์ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักของยีสต์ที่นำมาใช้แตกต่างกัน (Ohgren และคณะ, 2007)

เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไบโอเอทานอลได้ดี ในงานวิจัยนี้สนใจสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูง โดยนำสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ชนิดต่าง ๆ มาศึกษาและคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอทานอลได้สูงมาใช้ในการทดลอง รวมทั้งใช้เทคโนโลยีการตรึงเซลล์ เพื่อปรับปรุงกระบวนการผลิตเอทานอลให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น การนำเซลล์ตรึง (immobilized cell) ของยีสต์มาใช้ในการผลิตเอทานอล ได้มีการศึกษามานานแล้ว เนื่องจากพบว่าการใช้เซลล์ตรึงมีข้อดีกว่าการใช้เซลล์ในรูปอิสระ (free cell) การนำเซลล์ตรึงของจุลินทรีย์มาใช้ในกระบวนการหมักเพื่อป้องกันการยับยั้งที่เกิดจากผลิตภัณฑ์(Product Inhibition) หรือสับสเตรทที่มีความเข้มข้นสูง การตรึงเซลล์จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการหมักทำให้ได้ผลผลิตของเอทานอลที่ได้จากระบวนการหมักเพิ่มสูงขึ้น (William และ Munnecke,1981)

สารที่นำมาใช้ในการเป็นวัสดุตรึงเซลล์ที่มีรายงานการนำไปใช้ในปัจจุบัน เช่น แคลเซียมอัลจิเนต (Calcium Alginate), เจลคัปป้าคาราจีแนน(K- Caragenan Gel) , โพลีอครีลาไมด์ (Polyacrylamide), แกมมาอลูมินา(Gamma Alumina), (Nursevin และคณะ,2003) และเปลือกส้ม (Plessas และคณะ, 2007) ข้อดีของการใช้เซลล์ตรึง คือ เพิ่มผลผลิตของเอทานอล ช่วยให้เซลล์จุลินทรีย์มีความคงตัว และเป็นการลดค่าใช้จ่ายลงเนื่องจากสามารถนำเซลล์ตรึงของจุลินทรีย์กลับมาใช้ใหม่ในกระบวนการหมักครั้งต่อไป นอกจากนี้การใช้เซลล์ตรึงสามารถนำมาใช้ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องได้ให้ผลผลิตเชิงปริมาตรมากกว่าการใช้เซลล์อิสระเนื่องจากมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอดสูงกว่า สามารถทนต่อการยับยั้งที่เกิดจากสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ได้ รวมทั้งการใช้เซลล์ตรึงรูปสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิต และแยกเซลล์ออกจากผลิตัณฑ์ที่ได้จากการหมักได้ง่าย อย่างไรก็ตาม Prasad และ Mishra (1995) รายงานว่าการใช้เซลล์ตรึงรูปอาจมีประสิทธิภาพในการผลิตต่ำกว่าการใช้เซลล์อิสระก็ได้ เนื่องจาการใช้วัสดุหรือสภาวะในการตรึงเซลล์ที่ไม่เหมาะสม ส่งผลให้เซลล์ยีสต์อยู่ลึกเข้าไปในวัสดุห่อหุ้ม ส่งผลให้การส่งผ่านของสารอาหารเข้าไปภายในเซลล์ตรึงทำได้ยาก (Prasad และ Mishra, 1995)

ในการควบคุมกระบวนการหมักของเชื้อยีสต์ ปัจจัยที่สำคัญคือแหล่งอาหารที่ยีสต์ได้รับต้องเพียงพอเพื่อให้อัตราการหมักเกิดขึ้นได้ดี โดยเฉพาะปริมาณของแร่ธาตุและวิตามิน ซึ่งสารอาหารเหล่านี้ยีสต์ต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อย สับสเตรท หรือวัตถุดิบบางชนิดที่นำมาใช้ในการหมักเอทานอลอาจมีแร่ธาตุและวิตามินที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ ดังนั้นการเติมแร่ธาตุและวิตามินลงในอาหารหมักจะไปกระตุ้นการเจริญของยีสต์และทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น ดังการทดลองของ Nikolic และคณะ (2009) พบว่าการเติมแร่ธาตุ เช่น $ZnSO_4.7H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$ รวมทั้งวิตามินบางชนิด เช่น Ca-pantothenate, biotin, myo - inositol ลงในอาหารหมักซึ่งเป็นแป้งข้าวโพด สามารถเพิ่มผลผลิตของเอทานอลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) โดยใช้เซลล์ตรึงของ *Saccharomyces cerevisiae* ในการหมักแบบกะและศึกษาผลของการเติมแร่ธาตุและวิตามินบางชนิดลงในอาหารหมักเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลให้สูงขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) โดยใช้เซลล์ตรึงของ *Saccharomyces cerevisiae*

2. ศึกษาผลของการเติมแร่ธาตุและวิตามินบางชนิดลงในแป้งมันเทศ เพื่อเพิ่มผลผลิตเอทานอล

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลโดยกระบวนการ simultaneous saccharifcation and fermentation (SSF) โดยใช้เอนไซม์ α - amylase ย่อยแป้งในสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำแป้งที่ผ่านการย่อยมาเข้ากระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลและเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลพร้อมกัน โดยเติมเอนไซม์กลูโคอะโมเลสและเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ตรึงเซลล์ รวมทั้งศึกษาการเพิ่มผลผลิตของเอทานอลโดยการเติมแร่ธาตุและวิตามินบางชนิดลงในอาหารหมัก ศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักเอทานอล

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาการตรึงเซลล์ของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK017 วิธีการตรึงเซลล์ตามวิธีของ Nikolic และคณะ(2009)

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยแบ่งการทดลอง ดังนี้

1. กระบวนการหมักแบบ SHF โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ

โดยนำแป้งมันเทศย่อยด้วยเอนไซม์ α - amylase ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะโมเลส ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* ในสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 48 ชั่งโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somoghi – Nelson และปริมาณเอทานอลวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC รวมทั้งจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก

- กระบวนการหมักแบบ SHF โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป

ทำการทดลองและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกันกับหัวข้อ 1 แต่ใช้เซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กระบวนการหมักแบบ SSF โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ

โดยนำแป้งมันเทศย่อยด้วยเอนไซม์ α - amylase ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อทำให้เกิดกระบวนการลิเคอแฟกชัน นำแป้งที่ผ่านการย่อยมาเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พร้อมกับเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในแป้งที่ผ่านการย่อย เพื่อให้เกิดกระบวนการหมักแบบ SSF หมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกันกับหัวข้อ 1

3. กระบวนการหมักแบบ SSF โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป

ทำการทดลองและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.3 แต่ใช้เซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae*

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาผลของการเติมแร่ธาตุและวิตามินบางชนิดต่อการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป แบ่งการทดลอง ดังนี้

แร่ธาตุที่ใช้ในการทดลอง เช่น $ZnSO_4 . 7H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$

วิตามินที่ใช้ในการทดลอง เช่น biotin, Ca-pantothenate

4.1 กระบวนการหมักแบบ SHF ที่ไม่ได้เติมแร่ธาตุและวิตามิน

4.2 กระบวนการหมักแบบ SHF ที่เติมแร่ธาตุและวิตามิน

4.3 กระบวนการหมักแบบ SSF ที่ไม่ได้เติมแร่ธาตุและวิตามิน

4.4 กระบวนการหมักแบบ SSF ที่เติมแร่ธาตุและวิตามิน

วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับหัวข้อ 1

ขั้นตอนที่ 5 สรุปผลและจัดทำรายงาน

1.5 สมมุติฐานงานวิจัยและกรอบแนวคิดของโครงงานวิจัย

ในสภาวการณ์ปัจจุบันประเทศไทยต้องประสบกับความเสียเปรียบทางด้านพลังงาน เนื่องจากมีการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการขนส่งน้ำมันมีปริมาณสูงขึ้น ขณะเดียวกันราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ประเทศไทยต้องเผชิญกับความเสียเปรียบทางด้านเศรษฐกิจ การหาแหล่งพลังงานใหม่เพื่อนำมาทดแทนน้ำมันเบนซิน หรือน้ำมันดีเซล เป็นสิ่งที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพัฒนาแหล่งพลังงานทดแทนที่มาจากวัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถปลูกหรือผลิตได้เองภายในประเทศ อันจะนำไปสู่การสร้างเสถียรภาพและความมั่นคงทางด้านพลังงาน ด้านการเกษตร และด้านเศรษฐกิจของประเทศอย่างยั่งยืน

พลังงานทดแทนที่ทั่วโลกกำลังให้ความสนใจกันมากในขณะนี้ คือ น้ำมันแก๊สโซฮอล์ ซึ่งเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงที่ได้จากการผสมระหว่างน้ำมันเบนซินกับเอทานอล ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ ผลิตได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีโดยใช้เอทิลีนเป็นวัตถุดิบ และกระบวนการทางชีวเคมีโดยใช้พืชผลหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีแป้งและน้ำตาลสูงเป็นวัตถุดิบ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ได้รับความนิยม และมีวัตถุดิบที่สามารถเลือกใช้ได้หลากหลายชนิดตามความเหมาะสมของแต่ละประเทศ เช่น มันสำปะหลัง อ้อย กากน้ำตาล หญ้า ขี้เลื่อย เป็นต้น

ในปัจจุบันได้มีความพยายามในการหาวัตถุดิบชนิดใหม่ มาใช้ทดแทนวัตถุดิบที่เคยนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมและอยู่ในเขตร้อน มันเทศเป็นพืชชนิดหนึ่งที่ปลูกกันทั่วไปในประเทศไทย และมีแป้งเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง โดยองค์ประกอบภายในมันเทศมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 25 โปรตีนร้อยละ 1.70 ไขมันร้อยละ 0.30 แร่ธาตุต่างๆ แคโรทีน วิตามินบี 1 วิตามีนซี โรโบฟลาวิน ไนอาซีน เนื่องจากมันเทศหาได้ไม่ยากและมีตลอดทั้งปี การนำมันเทศมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิตลง ซึ่งการนำวัตถุดิบประเภทแป้งมาผลิตเอทานอลต้องมีการนำแป้งมาผ่านการย่อยเพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล จากนั้นเข้ากระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล (Sanchez และคณะ, 2008)

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากมันเทศโดยใช้เอนไซม์และเชื้อที่แยกได้จากลูกแป้ง เปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลที่ได้ พบว่าการใช้เอนไซม์ α - amylase ย่อยแป้งมันเทศที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส ย่อยต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำแป้งที่ผ่านการย่อยการหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่แยกได้จากลูกแป้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลที่ได้กับการหมักแป้งมันเทศโดยใช้เชื้อรา *Rhizopus oryzae, Amylomyces rouxii* และ *Aspergillus oryzae* โดยใช้เชื้อราแต่ละชนิดหมักในแป้งมันเทศ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นหมักต่อด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่แยกได้จากลูกแป้ง หมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมักพบว่าการหมักโดยใช้เอนไซม์และการหมักโดยการใช้เชื้อราให้ผลผลิตเอทานอลใกล้เคียงกัน โดยการใช้เอนไซม์ให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าการใช้เชื้อราไม่มากนัก ในงานวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนากระบวนการหมักให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น จึงใช้เทคโนโลยีการตรึงเซลล์ (immobilized cell) มาใช้ในกระบวนการผลิต และใช้กระบวนการหมักแบบ SSF (simultaneous saccharification and fermentation) เพื่อลดระยะเวลาในการหมักลงและเพิ่มผลผลิตเอทานอลให้สูงขึ้น

การตรึงเซลล์ (immobilized cell) คือ เทคนิคที่ใช้ในการตรึงเซลล์ เอนไซม์ หรือโปรตีน อาจเป็นการตรึงทางกายภาพ หรือทางเคมีไว้บนวัสดุช่วยพยุงที่เป็นของแข็ง หรือตรึงภายในเนื้อสารที่เป็นของแข็ง หรือกักไว้เป็นแผ่นเยื่อ เพื่อเพิ่มความคงตัว และทำให้สามารถนำเซลล์หรือเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้อีก

: ข้อดีของการตรึงเซลล์มีดังนี้

1. การแยกผลิตภัณฑ์ และการทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ทำได้ง่ายขึ้น ทำให้ผลผลิตที่ได้เพิ่มขึ้น
2. สามารถนำมาใช้ซ้ำ และใช้ได้อย่างต่อเนื่อง เป็นการลดต้นทุนการผลิต
3. ทำให้เซลล์มีการคงตัวมากขึ้น
4. ลดการเกิดการยับยั้งที่เกิดจากผลิตภัณฑ์สุดท้าย (product inhibition)
5. เซลล์สัตว์บางชนิด สามารถเจริญได้เมื่อยึดเกาะกับพื้นผิวเท่านั้น

อย่างไรก็ตามการตรึงเซลล์มีข้อจำกัด เช่น

1. การแพร่ผ่านของสารอาหารถูกจำกัด
2. การเจริญของเซลล์และการเกิดก๊าซในระหว่างการเจริญ อาจทำลายการตรึงได้
3. การตรึงอาจถูกทำลายจากความดัน ความเครียดที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของเซลล์
4. เหมาะสำหรับผลิตภัณฑ์ที่หลั่งออกมานอกเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของจุลินทรีย์จะมีประโยชน์มาก เนื่องจากทำให้เซลล์จุลินทรีย์มีกิจกรรมในการหมักที่คงที่ โดยมีวัสดุหลายชนิดที่นำมาใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ เช่น แคลเซียมแอลจิเนต, K-carrageenan gle, polyacrylamide และ Υ-alumina มีการศึกษาของ Oztop และคณะ (2003) ศึกษาการตรึงเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* บน acrylamide-sodium acrylate hydrogels เพื่อผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ พบว่า การใช้สารผสมของ acrylamide/sodium acrylate hydrogels ที่ประกอบด้วย N, N′-methylenebisacrylamide เป็นสารเชื่อมไขว้ (crosslinker) เหมาะสมที่สุด

Najafpour และคณะ (2004) ศึกษาการหมักเอทานอลในถังหมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า การหมักโดยการใช้เซลล์ตรึงรูปสามารถทำให้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มสูงขึ้น

การนำเซลล์จุลินทรีย์มาตรึงรูปเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล มีวัตถุประสงค์เพื่อลดหรือกำจัดการยับยั้งที่เกิดจากสารตั้งต้น หรือ ผลิตภัณฑ์ (substrate inhibition or product inhibition) รวมทั้งเป็นการเพิ่มผลผลิตเอทานอลให้สูงขึ้น เช่น Yamada และคณะ (2002) ศึกษาการนำเซลล์ *Zymomonas mobilis* ที่ผ่านการ recombination มาตรึงรูป โดยการใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 12-15 % ทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ สามารถนำเซลล์จุลินทรีย์ออกจากน้ำหมักภายหลังการหมักสิ้นสุดลงทำได้ง่ายขึ้น และมีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์จุลินทรีย์น้อยที่สุด (Najafpour, 1990) ขณะเดียวกันการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์มีข้อจำกัดในการนำมาใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องมาจากมีการใช้เซลล์ตรึงเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่มีอัตราการพา (convective flow) ภายในเม็ด bead และเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงสามารถได้รับอาหารได้เฉพาะการแพร่ (diffusion) เท่านั้น (Riley และคณะ, 1996) การตรึงเซลล์ในระบบ solid matrix เป็นสิ่งที่น่าสนใจ เซลล์จุลินทรีย์จะถูกแบ่งอยู่ภายในและอยู่บนแกนกลางของ matrix (Senthuran และคณะ,1997). แอลจิเนตเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร เภสัชกรรม ยาง และผลิตภัณฑ์กระดาษ โดยอุตสาหกรรมเหล่านี้นำแอลจิเนตมาใช้เพื่อทำให้เกิดความหนา ความคงตัว เกิดเจล และสร้างเป็นแผ่นฟิล์ม Sodium alginate เป็น polysaccharide ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง ปกติแยกได้จากวัชพืชทางทะเลสีน้ำตาลและสาหร่าย ดังนั้นชื่อ alginate จึงเป็นโคพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย uronic acid 2 โมเลกุล หรือ polyuronic acid มันประกอบด้วย primarily ของ D-mannuronic acid (M) และ L-glucuronic acid (G). Alginic acid สามารถละลายน้ำได้ หรือละลายน้ำไม่ได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของเกลือที่มีอยู่ มีการแลกเปลี่ยนประจุของ sodium ion กับ calcium ion ที่มีในสารละลายทำให้เกิดเป็นของแข็ง (solidification) ของ sodium alginate ใน calcium chloride solution สารละลายเกลือ sodium, other alkaline metals and ammonia สามารถละลายน้ำได้ ขณะที่ the polyvalent cation salts เช่น calcium จะไม่ละลายน้ำ ยกเว้น magnesium ions (Najafpour และคณะ, 2004) Nikolic และคณะ (2009) ศึกษาผลของพารามิเตอร์ต่างๆ ในกระบวนการหมักเอทานอลจากแป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยแล้วโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของ *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus* พบว่า การตรึงเซลล์ในแคลเซียมแอลจิเนตโดยใช้วิธี an electrostatic droplet generation method. การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม 2 % (v\v) และระยะเวลาการหมักที่เหมาะสม 38 ชั่วโมง ทั้งเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ การใช้เซลล์อิสระโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ 150 gll ขณะที่การใช้เซลล์ตรึงความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมอยู่ที่ 176 gll จะไม่เกิดการยับยั้งเนื่องมาจาก substrate หรือ ผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าการใช้เซลล์ตรึงของยีสต์ในแคลเซียมแอลจิเนตเป็นวิธีที่เหมาะสม และมีการยับยั้งเนื่องมาจาก substrate ต่ำกว่า และทนต่อเอทานอลสูงกว่าการใช้เซลล์ยีสต์อิสระ เซลล์ยีสต์ *S. cererisiae* ที่ถูกตรึงในแคลเซียมแอลจิเนต มีคุณสมบัติด้านสรีระวิทยาดี และมีความคงตัวทางด้านเคมี ไม่มีการยับยั้งที่เกิดจาก substrate หรือ product เกิดขึ้น

ในการพัฒนาและปรับปรุงกระบวนการหมักเอทานอลให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากจะใช้เทคโนโลยีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์แล้ว การปรับปรุงกระบวนการหมักก็เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่นำมาใช้ ในการนำวัตถุดิบประเภทแป้งมาใช้หมักเอทานอล มีการใช้เอนไซม์ย่อยแป้งให้ได้น้ำตาล จากนั้นนำน้ำตาลที่ได้มาหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์เป็นกระบวนการที่มี 2 ขั้นตอนเป็นลำดับกัน เรียก กระบวนการ separate hydrolysis and fermentation (SHF) อย่างไรก็ตามสองกระบวนการนี้สามารถทำให้เกิดขึ้นพร้อมกันในเวลาเดียวกันได้ เรียกกระบวนการนี้ว่า simultaneous saccharification and fermentation (SSF) ซึ่ง Takagi และคณะ (1977) เป็นคณะวิจัยแรกที่ศึกษากระบวนการนี้ และพบว่ากระบวนการ SSF ทำให้ผลผลิตของเอทานอลที่ได้จากการหมักสูงกว่าการใช้กระบวนการ SHF โดยในการศึกษาใช้วัตถุดิบเป็นไม้เนื้ออ่อนที่ผ่านการย่อย กระบวนการ SSF มีค่าใช้จ่ายต่ำ และผลผลิตเอทานอลที่ได้สูงกว่า และสามารถลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ด้วย (Wyman และคณะ, 1992) อย่างไรก็ตามกระบวนการ SSF ก็มีข้อจำกัด เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ที่ใช้หมัก และเอนไซม์ที่นำมาใช้ย่อยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมแตกต่างกัน ซึ่งทำให้สภาวะที่นำมาใช้ในกระบวนการ SSF ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่นำมาใช้ (Ohgren และคณะ, 2007) ดังเช่น Montesions และ Navarro (2000) ศึกษาการผลิตแอลกอฮอล์จากแป้งข้าวสาลี โดยใช้เอนไซม์ และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าการใช้เอนไซม์ amyloglucosidase (AMG) ที่ระดับ 270 AGU ต่อกิโลกรัมของแป้งเป็นการทำให้เกิดกระบวนการ saccharification หลังจากนั้นหมักต่อด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แต่เมื่อนำกระบวนการ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) จะใช้เวลาหมักเพียง 31 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ AMG เป็น 540 AGU ต่อกิโลกรัมของแป้ง ทำให้ระยะเวลาการหมักลดลงเหลือเพียง 21 ชั่วโมง โดยได้เอทานอลที่มีความเข้มข้น 67 กรัมต่อลิตร และ Ohgren และคณะ (2007) เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ simultaneous saccharification and fermentation กับกระบวนการ separate hydrolysis and fermentation โดยใช้แกนข้าวโพดที่ผ่านการ pretreated ด้วยไอน้ำ พบว่า เมื่อนำสารละลายที่ผ่านการ pretreatment มาเจือจางให้มีปริมาณของแข็ง 8 % และปรับ pH จากนั้นนำมาหมักเอทานอล พบว่ากระบวนการ SSF ให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่ากระบวนการ SHF 13 % โดยเอทานอลที่ได้จากกระบวนการ SSF มี 72.4 % ขณะที่กระบวนการ SHF มีผลผลิตเอทานอล 59.1 % ของทฤษฎี นอกจากนี้การเติมแร่ธาตุบางชนิดลงในอาหารหมัก ทำให้จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักเจริญ และหมักเอทานอลได้ดีขึ้น เช่น Nikolic และคณะ (2006) ศึกษาการเติมแมกเนเซียม (Mg^{+}) ซิงค์ (Zn^{+}) แคลเซียม (Ca^{+}) และคอปเปอร์อิออน(Cu^{+}) รวมทั้งวิตามินชนิดต่างๆ เช่น pantothenate, thiamine, pyridoxine, biotin และ inositol โดยศึกษาการเติมแยกทีละตัว และเติมเป็นสารผสมรวมกัน ทำให้ผลผลิตของเอทานอลสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะพัฒนาและปรับปรุงกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยใช้เซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้ และใช้กระบวนการหมักแบบ simultaneous enzymatic saccharification and fermentation (SSF) รวมทั้งมีการเติมแร่ธาตุ และวิตามินบางชนิดเพื่อส่งเสริมการเจริญและการหมักของเชื้อยีสต์ให้มีประสิทธิภาพในการหมัก เอทานอลที่เพิ่มขึ้น มีการศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ระหว่างกระบวนการหมักไบโอเอทานอล

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.สามารถเพิ่มผลผลิตของไบโอเอทานอลที่ได้กระบวนการหมักซึ่งได้พัฒนาและปรับปรุงกระบวนการหมักให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

2. สามารถนำวัตถุดิบคือมันเทศ ซึ่งมีในปริมาณมากในประเทศไทย มาเพิ่มมูลค่าให้สูงขึ้น โดยนำมาใช้เป็นวัตถุดิบชนิดใหม่ทดแทนมันสำปะหลัง ในการผลิตไบโอเอทานอล และเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรผู้ปลูกมันเทศ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การผลิตไบโอเอทานอล (www.water-pacific.com/index.php/2010-08-14-10-07-37 ; สืบค้นวันที่ 09 ตุลาคม 2554)

เอทานอล (Ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol) ในทางเคมีเป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์มีสูตรทางเคมีคือ C_2H_5OH ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นไฮดรอกซิลดิริเวทีฟของไฮโดรคาร์บอน เกิดจากการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมด้วย hydroxyl group (OH) มีน้ำหนักโมเลกุล 46.07 จุดเดือดประมาณ 78 องศาเซลเซียส เป็นของเหลวใสไม่มีสี ติดไฟง่าย ให้เปลวไฟสีน้ำเงินไม่มีควัน

ประเทศที่ผลิตเอทานอลมากที่สุดของโลกในลำดับต้นๆ ได้แก่ บราซิล และประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งแนวโน้มการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ของโลกยังคงเติบโตอย่างต่อเนื่อง ส่วนในประเทศแถบเอเชีย เช่น จีน อินเดีย ก็ให้ความสนใจมากในการใช้พลังงานทดแทนโดยเฉพาะเอทานอล และปัจจุบันอินเดียได้มีการส่งเสริมและพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตเอทานอลบริสุทธิ์ เพื่อใช้ภายในประเทศ อีกทั้งยังสามารถส่งออกเทคโนโลยีไปยังประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทย

น้ำมันเชื้อเพลิงจัดเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญที่สุดของมนุษย์ และนับวันก็จะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากในชีวิตประจำวันจำเป็นต้องอาศัยน้ำมันไม่ทางตรงก็ทางอ้อม และไม่ว่าราคาน้ำมันจะแพงขนาดไหนผู้คนก็ยังต้องใช้น้ำมันกันอยู่ดี แต่ปัญหาที่ทั่วโลกพากันกังวลมากกว่าเรื่องราคาก็คือน้ำมันดิบที่มีอยู่ในธรรมชาติจะมีใช้ไปได้อีกไม่เกิน 50 ปี วิธีแก้ปัญหาการขาดแคลนน้ำมันทางหนึ่งก็คือการหาแหล่งพลังงานทดแทน และต้องเป็นพลังงานที่สามารถหมุนเวียนกลับมาใช้ได้ หรือประเภทใช้ได้ไม่มีวันหมด (Renewable energy) อย่างเช่น พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังงานแก๊สชีวภาพ (biogas) เพื่อทดแทนแหล่งพลังงานสิ้นเปลืองที่ใช้แล้วหมดไป (Non – renewable energy) เช่น พวกน้ำมันดิบ ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ

ไบโอเอทานอล (bioethanol) หรือเอทานอลชีวภาพ คือเอทานอลที่ได้จากการสังเคราะห์โดยสิ่งมีชีวิต เป็นพลังงานหมุนเวียนอีกชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจในขณะนี้ เนื่องจากเป็นพลังงานที่ใช้ได้ทั้งในโรงงานอุตสาหกรรม และสำหรับรถยนต์ ประเทศไทยมีความเหมาะสมอย่างมากในการผลิตไบโอเอทานอลเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันดิบ เพราะสามารถใช้ผลผลิตจากการเกษตรไม่ว่าจะเป็นแป้ง น้ำตาล หรือของเหลือทิ้งจากภาคเกษตรกรรมที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย เปลือกไม้ ซากพืชต่าง ๆ มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตได้เป็นอย่างดี วัตถุดิบต่าง ๆ เหล่านี้มีมากมายในบ้านเรา ถ้าสามารถนำมาใช้ผลิตเชื้อเพลิงจะช่วยชาติได้ไม่น้อยเลยทีเดียว

กระบวนการผลิตเอทานอล ประกอบด้วย กระบวนการเตรียมวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล กระบวนการหมัก และการแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบนั้น ถ้าเป็นประเภทแป้งหรือเซลลูโลส เช่น มันสำปะหลัง และธัญพืช จะต้องนำไปผ่านกระบวนการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แป้งหรือเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลก่อน ด้วยการใช้กรดหรือเอนไซม์ ส่วนวัตถุดิบประเภทน้ำตาลเช่น กากน้ำตาลหรือน้ำอ้อย เมื่อปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมแล้วสามารถนำไปหมักได้

กระบวนการผลิตเอทานอลแบ่งออกเป็น 2 วิธี

วิธีที่ 1 การใช้กระบวนการทางเคมีเป็นการสังเคราะห์เอทานอล เอทานอลที่ได้เรียกว่า เอทานอลสังเคราะห์ (synthetic ethanol)

วิธีที่ 2 การใช้วิธีการทางชีวเคมีเพื่อผลิตเอทานอลเอทานอลที่ได้เรียกว่า ไบโอเอทานอล (bio-ethanol) โดยการใช้วัสดุทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบประเภท แป้ง น้ำตาล หรือเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบ

1. การผลิตเอทานอลโดยใช้กระบวนการทางเคมี

การหมักเอทานอลเป็นแนวทางหนึ่งที่ได้รับความนิยม การผลิตเอทานอลแต่เดิมอาศัยการผลิตด้วยวิธีการทางเคมี โดยอาศัยการดูดซับ (absorption) เอทิลีน (ethylene) ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น เพื่อให้ได้กรดเอทิลซัลฟูริก (ethyl sulfuric acid) ซึ่งเป็นสารตัวกลางก่อนที่จะเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลและกรดซัลฟูริกต่อไป

$$3C_2H_4 + 2H_2SO_4 \text{--------} > CH_3CH_2OSO_3H + (CH_3CH_2)_2SO_4$$

เอทิลีน

$$CH_3CH_2OSO_3H + H_2O \text{ -------} > CH_3CH_2OH + H_2SO_4$$

กรดเอทิลซัลฟูริก เอทานอล กรดซัลฟูริก

การผลิตเอทานอลโดยทางเคมีอีกวิธีหนึ่งอาศัยการเติมน้ำลงในเอทิลีนโดยตรง โดยใช้กรดฟอสฟอริกเป็นตัวเร่ง (catalyst) ที่ความดัน 68 บรรยากาศ และอุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส ดังสมการ

$$C_2H_4 + H_2O \text{ --------} > + H_3PO_4 \text{--------} > CH_3CH_2OH$$

เอทิลีน เอทานอล

แต่ในปัจจุบันการผลิตเอทานอลนิยมอาศัยการหมัก โดยเฉพาะในประเทศที่มีวัตถุดิบที่สามารถใช้หมักได้จำนวนมากและราคาถูก

2. การผลิตเอทานอลจากจุลินทรีย์

แหล่งพลังงานที่เราใช้กันอยู่ในปัจจุบันเป็นที่รู้จักกันดีว่าได้มาจากเชื้อเพลิงปิโตรเลียม คือ น้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล และยังมีแนวโน้มลดลงตามลำดับ ในทางกลับกันราคาน้ำมันในยุคนี้ยังเพิ่มขึ้น ดังนั้นหลายประเทศจึงพยายามหาพลังงานอื่นมาทดแทนในรูปแบบต่าง ๆ เช่น พลังงานลม น้ำ แสงอาทิตย์ และพลังงานชีวมวล

เอทานอล แหล่งพลังงานใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจในขณะนี้พบว่า 90 % ได้มาจากกระบวนการหมัก (Fermentations) ที่เหลือได้จากการสังเคราะห์ขึ้นมา (Synthesis) ในกระบวนการผลิตเอทานอลกระบวนการหมักเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่จุลินทรีย์จะเป็นตัวไปเปลี่ยนวัตถุดิบ (raw material) ให้กลายมาเป็น เอทานอล (ethyl alcohol, grain alcohol)

$$C_6H_{12}O_6 \text{ --------} > 2CH_3CH_2OH + 2\,CO_2$$

วัตถุดิบ (น้ำตาล) เอทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรได้หลายชนิด แบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ วัตถุดิบประเภทแป้งวัตถุดิบประเภทน้ำตาล เศษวัสดุที่เป็นเซลลูโลส โดยที่วัตถุดิบประเภทแป้งและเซลลูโลสจะถูกย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลก่อน แต่วัตถุดิบประเภทที่เป็นน้ำตาลอยู่แล้วสามารถนำไปใช้หมักได้เลย ระยะเวลาในการหมักเพื่อให้ได้เอทานอลจะประมาณ 48 ชั่วโมง จะได้เอทานอลที่มีความเข้มข้น 8-12 % โดยปริมาตร

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิดแต่ยีสต์ (Yeast) ก็ถูกนำมาใช้ผลิตเอทานอลอย่างแพร่หลายเพราะสามารถเจริญเติบโตได้เร็วและมีปริมาณมาก แต่ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์พบว่าแบคทีเรีย (Bacteria) สายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ เช่น ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่า 3-4 เท่า เมื่อใช้น้ำตาลเท่ากัน ให้ผลเอทานอลใกล้เคียงกับทฤษฎี แต่ข้อด้อยกว่ายีสต์ก็มีคือแบคทีเรียใช้น้ำตาลได้จำกัดคือใช้ได้ 3 ชนิด คือ กลูโคส ฟรักโตส ซูโครส แต่ยีสต์จะสามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลายกว่าแบคทีเรีย แต่เพื่อให้แบคทีเรียสามารถใช้ประโยชน์ได้มากขึ้นจึงมีการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นคือสามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลายทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้นแม้ว่าจะได้แบคทีเรีย (Bacteria) สายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* ที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นแต่การนำแบคทีเรียมาใช้ค่อนข้างที่จะยาก เพราะโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่คุ้นเคยกับยีสต์มากกว่า

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (www1.mod.go.th/opsd/dedweb/energy/about/meaning%20and%20type/ethanol.htm ; สืบค้นวันที่ 04 กันยายน 2554)

วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอลแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้ คือ

1. วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ธัญพืช ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น

2. วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล บีตรูต ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น

3. วัตถุดิบประเภทเส้นใย ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อยวัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น

เทคโนโลยีที่นำมาใช้ผลิตเอทานอลจะมีความแตกต่างกันไปตามประเภทของวัตถุดิบ และให้ผลผลิตเอทานอลที่แตกต่างกัน

เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบหลายชนิดโดยเฉพาะผลผลิตจากพืชไร่ ได้แก่ อ้อย ข้าวฟ่างหวาน หัวผักกาดหวาน ข้าวโพด เมล็ดข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ข้าว ข้าวบาร์เลย์ มันสำปะหลัง มันฝรั่ง และมันเทศ เป็นต้น สำหรับกระบวนการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักมักใช้กากน้ำตาล ผักกาดหวาน อ้อย หรือธัญพืชที่ให้น้ำตาลมากกว่าวัตถุดิบอย่างอื่น ซึ่งรูปแบบของน้ำตาลนั้นยีสต์สามารถใช้เมแทบอลิซึมได้โดยตรง ทำให้วัตถุดิบเหล่านี้มีต้นทุนในการเตรียมต่ำส่วนคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ได้แก่ แป้ง และเซลลูโลส ที่มีราคาถูกกว่าวัตถุดิบที่ให้น้ำตาลโดยตรงต้องผ่านการไฮโดรไลซ์ให้เป็นน้ำตาลก่อน ยีสต์จึงสามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งเป็นข้อเสียของวัตถุดิบทั้งสองชนิดนี้ ส่วนวัตถุดิบบางชนิดที่มีราคาถูกมาก ๆ ได้แก่ sulfite liquor และเวย์ (whey) ซึ่งมีแหล่งของน้ำตาลที่เหมาะกับการหมัก แต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีอยู่ในวัตถุดิบเหล่านี้ต่ำกว่าวัตถุดิบที่ได้จากการเกษตรโดยตรง โดย sulfite liquor นั้นมีความเข้มข้นของน้ำตาลเฮกโซสอยู่ประมาณ 20-30 กรัมต่อลิตร และเวย์มีความเข้มข้นของน้ำตาลแลกโทสอยู่ระหว่าง 38-50 กรัมต่อลิตร

สำหรับประเทศไทยมีโรงงานผลิตเอทานอลจากผลผลิตเกษตรอยู่หลายแห่ง วัตถุดิบส่วนใหญ่ที่ใช้คือ กากน้ำตาล โดยกากน้ำตาลมีอยู่ 2 ชนิด ชนิดแรก คือ blackstrap molasses หรือ final molasses คือกากน้ำตาลที่เป็นผลผลิตพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว มีน้ำตาลอยู่ 50-60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นซูโครส ชนิดที่สอง คือ refinery molasses เป็นกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ มีน้ำตาลอยู่ 58 เปอร์เซ็นต์ blackstrap molasses นิยมนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล ถึงแม้ว่าในกากน้ำตาลมีสารอาหารหลายอย่างสำหรับการเจริญของยีสต์ แต่มีแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซัลเฟอร์ไม่เพียงพอ โดยมีโปรตีนซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนของยีสต์อยู่ 75 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณจากไนโตรเจน) ซึ่งไม่เพียงพอสำหรับการเจริญของยีสต์ จึงจำเป็นต้องให้แอมโมเนียมไอออนในรูปอนินทรีย์ยูเรีย หรือกรดอะมิโนอิสระ รวมทั้งมีการเติมฟอสเฟตและซัลเฟต

สำหรับมันสำปะหลังที่มีมากในประเทศไทยและมีราคาถูก แต่การหมักเอทานอลจากมันสำปะหลังนั้นมีขั้นตอนยุ่งยากในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล โดยได้มีการทดลองนำเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้าของ Novozyme ชื่อ BAN และ SAN มาใช้โดย BAN เป็นชื่อการค้าของ แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* ย่อยมันเส้นบด 25 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 80 และ 60 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 5.5 แล้วหมักในถังหมัก พบว่าได้เอทานอล 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรและเมื่อทดลองย่อยชิ้นมันเส้นสุกด้วย mold bran ของรา *Aspergillus awamori* และราจากลูกแป้ง Tapai ของมาเลเซีย แล้วนำมาหมักเอทานอล สามารถหมักเอทานอลได้ 7.2 และ 9.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อย่างไรก็ตามการหมักดังกล่าวยังมีปัญหาในเรื่องความหนืดของแป้งและสิ้นเปลืองพลังงาน

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

วัตถุดิบอีกชนิดหนึ่งที่ใช้สำหรับผลิตเอทานอลในต่างประเทศ และยังไม่มีผู้ใช้ในประเทศไทยคือ น้ำอ้อย ซึ่งได้จากอ้อยที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharum officinarum* ซึ่งจัดอยู่ใน Class

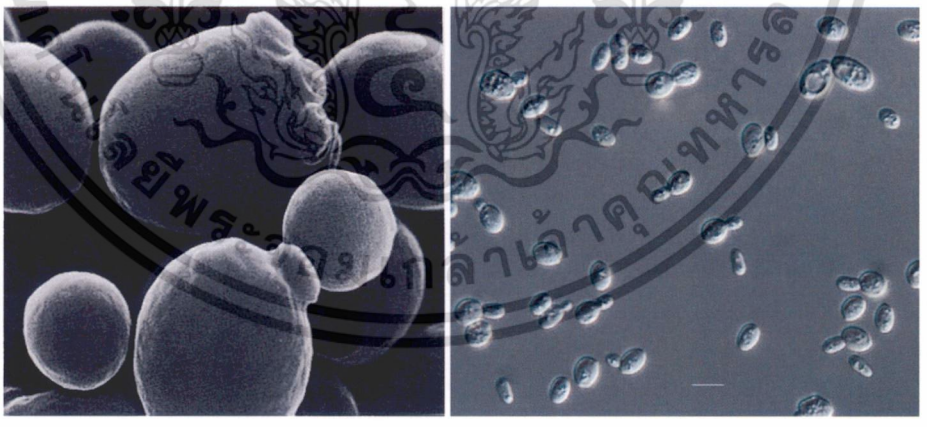
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Monocotyledones, Order Glumaceae, Family Gramineae, Group Andropogoneae, Genus *Saccharum* สำหรับประเทศไทยมีการปลูกอ้อยในหลายพื้นที่ ทั้งภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง เนื่องจากประเทศไทยใช้น้ำอ้อยสำหรับผลิตน้ำตาลทรายโดยเป็นผู้ผลิตและส่งออกน้ำตาลทรายสำคัญของโลก

ส่วนประกอบทางเคมีของอ้อย พบว่าขณะที่อ้อยยังเล็กอยู่ ยังไม่มีการยืดยาวของลำต้นจะมีซูโครสปริมาณต่ำมากจนเกือบไม่มีเลย แต่เมื่อมีการยืดยาวของลำต้นจะมีการสะสมซูโครส จนกระทั่งอ้อยโตเต็มที่จึงพบว่ามีส่วนประกอบของเส้นใย (fiber) น้ำอ้อย และเกลือแร่จำพวกซิลิกาอยู่ปริมาณเล็กน้อย ผิวด้านนอกถูกเคลือบด้วยไข (wax) ส่วนพวกเม็ดแป้งนั้นพบได้น้อยมากในส่วนของลำต้น ส่วนที่พบมากในลำต้นคือน้ำอ้อยประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอ้อยทั้งหมด ซึ่งในส่วนนี้มีซูโครสที่สามารถละลายน้ำได้เป็นส่วนใหญ่ และมีกลูโคส ฟรุกโทส เกลือแร่ และสารในกลุ่มธาตุไนโตรเจน อยู่บ้างในปริมาณน้อย

2.3 เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

ในกระบวนการหมักเอทานอลมีจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุด คือ เชื้อยีสต์ โดยเฉพาะพวก *Saccharomyces cerevisiae* มีเชื้อยีสต์หลายสกุลที่สามารถหมักเอทานอลได้ แต่ประสิทธิภาพในการหมักต่างกัน บางชนิดหมักเอทานอลได้สูงถึงร้อยละ 20 บางชนิดหมักเอทานอลได้เพียงร้อยละ 2-3 หรือบางชนิดหมักไม่ได้เลย พวกที่หมักเอทานอลได้ดีจะสังเกตได้ง่าย ๆ จากการเขย่าขวดหมักดูจะเห็นฟองเกิดขึ้นจำนวนมาก ส่วนพวกที่หมักเอทานอลได้ไม่ดีมักจะขึ้นเป็นฝ้าอยู่ที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นในขณะที่หมักเมื่อนำมาส่องดูควรจะทราบว่าเป็นเชื้อยีสต์สกุลไหน เพราะอาจจะมีเชื้อยีสต์ที่ต้องการส่วนหนึ่ง หรืออาจจะเป็นเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ (contaminant) ปะปนมาด้วย ในขั้นตอนการหมักที่เตรียมการไม่ดีอาจทำให้ยีสต์บางชนิดไปยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ที่ใช้หมักได้



รูปที่ 2.1 ลักษณะเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae*
ที่มา : www.andaluciainvestiga.com/espanol/noticias/4/9647.asp (วันที่สืบค้น 04 สิงหาคม 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลด้วยยีสต์นั้นในระดับอุตสาหกรรมมีกระบวนการผลิตแตกต่างกันไป รวมถึงยีสต์ที่ได้รับความสนใจและถูกเลือกใช้ในการหมัก ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* (*carlsbergensis*), *Shizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces* species สำหรับแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจและมีการนำมาใช้ในกระบวนการหมัก ได้แก่ *Zymomonas mobilis* ซึ่งการเลือกใช้จุลินทรีย์ชนิดใดก็ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้ สำหรับ *Z. mobilis* และ *S. cerevisiae* ต่างมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพื้นฐานของการจัดการ กรณีเลือกใช้ *Z. mobilis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงแต่มีชีวมวลต่ำ ฉะนั้นจำเป็นต้องมีความระมัดระวังในเรื่องของการกำจัดเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นเมื่อคำนึงถึงแง่เศรษฐศาสตร์โรงงานอุตสาหกรรมทั่วไปจึงให้ความสนใจ *S. cerevisiae* มากกว่า อีกทั้ง *Z. mobilis* มีความทนต่อเอทานอลต่ำกว่ายีสต์ การผลิตเอทานอลในระดับโรงงานอุตสาหกรรมนั้นจุลินทรีย์ที่เลือกมาใช้ต้องมีลักษณะเหมาะสมกับกระบวนการและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต และการออกแบบลักษณะของกระบวนการการผลิตนั้นก็ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่ถูกเลือกมาใช้ในกระบวนการหมักด้วยเช่นกัน

จุลินทรีย์ที่ดี และมีความเหมาะสมในการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงควรมีลักษณะดังนี้

1. ให้ผลผลิตสูง
2. ทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance)
3. ทนต่อแรงดันออสโมซีส (osmotolerance)
4. มีความคงตัวภายใต้สภาวะต่าง ๆ ของการหมัก
5. ทนต่อพีเอชต่ำ (acid tolerance)
6. ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)
7. มีอัตราการหมักเอทานอล (rate of ethanol fermentation) สูง
8. เพิ่มจำนวน (propagation) ได้ง่าย
9. ให้ความร้อนในระหว่างการหมักต่ำ
10. การแสดงลักษณะตกตะกอนหรือไม่ตกตะกอนขึ้นอยู่กับลักษณะของกระบวนการหมักที่ผู้ผลิตต้องการ
11. มีกิจกรรมการเป็นผู้ฆ่า (killer activity)
12. นอกเหนือจากการใช้กลูโคส มีความสามารถในการใช้ไดแซกคาไรด์ หรือโพลีแซกคาไรด์
13. มีความทนทานต่อสารพิษต่าง ๆ

2.3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์และการผลิตเอทานอล

2.3.1.1 ความเข้มข้นของน้ำตาล

แหล่งคาร์บอนที่ยีสต์ใช้ได้ดีได้แก่ น้ำตาล โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทส ยีสต์บางชนิดสามารถใช้ไดแซ็กคาไรด์พวกมอลโทส ซูโครส หรือ แลกโทสได้ ส่วนพอลีแซ็กคาไรด์ที่ยีสต์บางชนิดใช้ได้ คือ แป้ง ยีสต์ที่สามารถใช้แป้งได้ เช่น *Saccharomyces diastaticus, S. chevalieri, Endomycopsis fibuligera* มียีสต์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้น้ำตาลเพนโทสได้ดีกว่าน้ำตาลเฮกโซส เช่น *Cryptococcus* ยีสต์บางพวก เช่น ฟิล์มยีสต์สามารถใช้กรดอินทรีย์ได้ อาหารสำหรับหมักที่มีน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ การหมักเอทานอลของยีสต์จะหยุด ดังนั้นการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มาหมักในสภาวะเช่นนี้ จึงมีผลให้การหมักเป็นไปได้ช้า ๆ และเมื่อเลือกใช้ยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซีส (osmotolerant yeast) เช่น *S. rouxii* พบว่าสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง แต่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลต่ำ Panchal และ Stewart (1980); D'Amore และคณะ (1988) ได้ศึกษาผลของแรงดันออสโมซีสต่อกระบวนการหมักของ brewing yeast (*S. cerevisiae*) ในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลต่าง ๆ โดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 100, 200, 300 และ 400 กรัมต่อลิตร ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2.1 คือเมื่อกลูโคสความเข้มข้นสูงขึ้นการเจริญและการหมักของ brewing yeast ลดต่ำลง

ตารางที่ 2.1 แสดงการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารที่มีกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

กลูโคส (กรัม/ลิตร)	อัตราการเจริญ (มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง/มิลลิลิตร.ชั่วโมง)	การหมัก (โมลของเอทานอล/มิลลิลิตร.ชั่วโมง)	ผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎี (เปอร์เซ็นต์)
100	0.33	54.0	93.5
200	0.24	52.7	66.4
300	0.11	42.5	59.0
400	0.03	14.2	23.6

ที่มา: Panchal (1990)

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าอัตราการเจริญ อัตราการหมัก และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล ซึ่งดูจากค่าผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎี (theoretical ethanol yield) ลดลง เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลภายในเซลล์ได้รับความเสียหาย จึงมีผลในการยับยั้งปฏิกิริยาต่าง ๆ ภายในวิถี Embden-Meyerhof-Parnas อย่างไรก็ตามเมื่อมีการเติมลิพิดไม่อิ่มตัว (unsaturated lipids) เช่น กรดลิโนลีอิก (linoleic acid) และสารอาหารบางอย่าง เช่น เปปโตน-ยีสต์เอกเทรกซ์ (peptone-yeast extract) ลงไปในอาหารสำหรับหมัก มีผลให้การยับยั้งเนื่องจากแรงดันออสโมซีสลดน้อยลง แรงดันออสโมซีสมีผลให้เซลล์ยีสต์ขาดสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการรักษาสภาพของเซลล์ ทั้งนี้เพราะแรงดันออสโมซีสไปมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะแข็ง (rigid) จึงมีผลกระทบต่อการนำสารอาหารเข้าไปในเซลล์ การเติมลิพิดไม่อิ่มตัวเช่น กรดลิโนลีอิกจึงไปช่วยเพิ่มสภาพการเป็นของไหล (fluidity) ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สารอาหารต่าง ๆ สามารถไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีขึ้น และเอทานอลภายในเซลล์สามารถแพร่ออกนอกเซลล์ได้เร็วขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.2 อุณหภูมิ

ยีสต์แต่ละชนิดเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกมีโซไฟล์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์ยังสามารถเจริญเติบโตได้ประมาณ 35-47 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญเติบโตได้อยู่ระหว่าง 0-5 องศาเซลเซียส แต่ยีสต์บางชนิดที่เป็นพวกไซโครไฟล์สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส *Saccharomyces cerevisiae* อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส สูงสุดประมาณ 35 องศาเซลเซียส ต่ำสุด 11-12 องศาเซลเซียส

2.3.1.3 ออกซิเจน

ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกเฟคัลเททีฟ แอนแอโรบ แต่ยีสต์เติบโตในสภาพมีออกซิเจนได้ดี ส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจนเติบโตได้ช้า ในสภาพมีออกซิเจนยีสต์ใช้น้ำตาล โดยการออกซิเดชันอย่างสมบูรณ์ได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจนยีสต์ใช้น้ำตาล โดยการหมักส่วนใหญ่เป็นการให้เอทานอล ในการหมักโดยยีสต์ให้ได้เอทานอลนั้น หากมีออกซิเจนยีสต์จะใช้น้ำตาลให้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แทนการหมักให้เอทานอล หรือการหมักถูกยับยั้งโดยการหายใจเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Pasteur effect

2.3.1.4 ค่าความเป็นกรด-เบส

ยีสต์เติบโตได้ใน pH ช่วงกว้าง pH ต่ำสุดที่ยีสต์สามารถเติบโตได้คือ 1.5 ส่วน pH สูงสุด 8.0-8.5 สำหรับ pH ที่เหมาะสม สำหรับการเติบโตของยีสต์แตกต่างกัน ส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่าง 4.0-4.5 ยีสต์ส่วนใหญ่จะเติบโตไม่ดีในสภาพที่เป็นด่าง

2.3.1.5 ความเข้มข้นของเอทานอล

ยีสต์หลายสกุลมีความอ่อนแอต่อการยับยั้งโดยเอทานอล การมีเอทานอลสะสมอยู่ในถังหมักถือว่าเป็นปัญหาหลักอย่างหนึ่งที่สามารถไปยับยั้งการเจริญของยีสต์ ความเข้มข้นของเอทานอลเพียง 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ก็ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ช้าลง การเจริญของจุลินทรีย์ถูกยับยั้งด้วยเอทานอลแบบไม่แข่งขัน อย่างไรก็ตามได้ทำการศึกษาและชี้ให้เห็นว่าถ้ามีการเติมเอทานอลในช่วง log phase ทำให้อัตราการเจริญของยีสต์ลดลงยีสต์หลายสกุลมีความอ่อนแอต่อการยับยั้งด้วยเอทานอล อย่างไรก็ตาม Brown และคณะ (1981) ได้ทำการศึกษาและชี้ให้เห็นว่าผลของการยับยั้งนั้นมีความซับซ้อนมาก ยิ่งไปกว่านั้นถ้ามีการเติมเอทานอลในช่วง log phase ทำให้อัตราการเจริญของยีสต์ลดลงอย่างรวดเร็ว (อาจเป็นผลเนื่องมาจากการสังเคราะห์โปรตีน) ทำให้เซลล์ที่มีชีวิตลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ถูกทำให้เสียสภาพอย่างถาวรโดยทั่วไปพบว่าเอลยีสต์ (ale yeast) มีความทนต่อเอทานอลน้อยกว่าลาเกอร์ยีสต์ (lager yeast) และยีสต์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศหรือในสภาวะที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว พบว่ามีการตอบสนองต่อเอทานอลน้อย แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงช่วยส่งเสริมให้ความเป็นพิษของเอทานอลมีมากขึ้น การผลิตเอทานอลลดลงเมื่อยีสต์อยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ และการผลิตเอทานอลมีมากขึ้นเมื่อยีสต์อยู่ในสภาวะของอุณหภูมิต่ำสุดของการเจริญ เอทานอลมีผลต่อการยับยั้งแบบไม่แข่งขันในการขนส่งกลูโคส มอลโทส แอมโมเนีย และกรดอะมิโนต่าง ๆ ยีสต์สายพันธุ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ปริมาณมากสามารถมีชีวิตอยู่ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูง ๆ มากกว่ายีสต์สายพันธุ์ที่มีส่วนประกอบของกรดไขมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ไม่อิ่มตัวอยู่น้อย ซึ่งคล้ายกับว่าผลของเอทานอลไปส่งเสริมให้ไฮโดรเจนไอออน (hydrogen ion) ไหลผ่าน (passive flux) เยื่อหุ้มเซลล์มากขึ้น ซึ่งการไหลผ่านของไฮโดรเจนไอออนนี้ไม่ได้ผ่านทาง ATPase ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง จึงทำให้เกิดความต่างระดับของโปรตอน (proton gradient) กระจายไปทั่วเยื่อหุ้มเซลล์ จึงไปมีผลต่อการยับยั้งการขนส่งสารละลายต่าง ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าไมโทคอนเดรียมีบทบาทสำคัญต่อการทนเอทานอลของยีสต์ และยีสต์ที่มีขนาดของเซลล์เล็กสามารถทนต่อเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ที่มีขนาดของเซลล์ใหญ่

2.3.1.6 สารอาหารและโคแฟกเตอร์

สารอาหารบางอย่างอาจไม่เพียงพอสำหรับการหมัก ซึ่งรวมถึงแหล่งไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น แอมโมเนียมไอออน วิตามิน เกลือแร่ แร่ธาตุต่างๆ เช่น สังกะสี ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แคลเซียม

1. **ไนโตรเจน** โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้แอมโมเนียมไอออนได้ โดยแอมโมเนียมไอออนจัดเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ซึ่งยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถใช้ได้

2. Trace element ความต้องการแร่ธาตุของยีสต์ค่อนข้างหลากหลาย โดยเฉพาะพวกที่เป็นประจุบวก ได้แก่ สังกะสี แมงกานีส แมกนีเซียม แคลเซียม ทองแดง และเหล็ก สารเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ ที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาหรืออยู่ในสภาวะที่เสถียร

2.3.1.7 วิตามิน

ความต้องการวิตามินในการเจริญขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ ส่วนมากมีความต้องการไบโอติน โดยไบโอตินถูกย่อยด้วยเอนไซม์คาร์บอกซิเลสเพื่อใช้สังเคราะห์ลิพิดที่จำเป็น มียีสต์หลายสายพันธุ์ที่ต้องการแพนโททีนิคเป็นปัจจัยในการเจริญแม้ว่าบางครั้งผลิตได้มากและปลดปล่อยออกมาสู่อาหาร ซึ่งวิตามินดังกล่าวเป็นองค์ประกอบของโคเอนไซม์ เอ และจำเป็นต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมคาร์โบไฮเดรตและลิพิด นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ซัลเฟอร์ เพื่อเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน สำหรับอินอซิทอล (inositol) มีความต้องการเป็นบางครั้ง เพราะใช้เป็นองค์ประกอบของฟอสโฟลิพิด

กระบวนการหมักที่ใช้มี 3 แบบ (สมใจ, 2537) คือ

1. การหมักแบบแบตช์ (Batch fermentation) เป็นการหมักที่ทำในระบบปิด มีสารอาหารเริ่มต้นจำกัด เมื่อใส่จุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงในระบบแล้ว ไม่มีการเติมสารอาหารใด ๆ เพิ่มลงไปอีกจนการหมักเสร็จสิ้นลง

2. การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นวิธีการที่ในระหว่างการหมักมีการเติมอาหารใหม่ และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกัน ทำให้จุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีข้อจำกัดในเรื่องอาหาร

3. การหมักแบบเฟด-แบตช์ (Fed-batch fermentation) เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นระยะ ๆ เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่ โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าออก ซึ่งการหมักแบบนี้ส่วนใหญ่ใช้แก้ปัญหาเกี่ยวกับข้อจำกัดเรื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
131084

ความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น ซึ่งถ้าใช้มากไปอาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ หรืออาจทำให้มีปัญหาในการให้ออกซิเจนโดยการให้ในปริมาณที่เพียงพอทำได้ยาก

กระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF)

กระบวนการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการผลิตแบบ SHF (Separate hydrolysis and fermentation) โดยการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสก่อน เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลแยกกับการหมักด้วยเชื้อยีสต์ หลังจากย่อยแป้งครั้งแรกด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแล้ว จะทำการเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแยกกับเชื้อยีสต์ ซึ่งเป็นการย่อยแป้งครั้งสุดท้ายจากนั้นหมักด้วยเชื้อยีสต์

กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF)

กระบวนการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการผลิตแบบ SSF (Simultaneous saccharification and fermentation) โดยรวมขั้นตอนการย่อยครั้งสุดท้าย เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พร้อมกับการหมักด้วยเชื้อยีสต์ในขั้นตอนเดียวกัน หลังจากย่อยแป้งครั้งแรกด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแล้ว จะทำการเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสพร้อมเชื้อยีสต์ ทำให้การย่อยแป้งครั้งสุดท้ายด้วยเอนไซม์เกิดขึ้นพร้อมกับการหมักด้วยเชื้อยีสต์ในขั้นตอนเดียวกัน ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาและประหยัดพลังงานของกระบวนการผลิต เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่เป็นแป้ง

2.4 การตรึงเซลล์ (www.th.answers.yahoo.com/question/index?qid=20090529001147AAEh4aG ; สืบค้นวันที่ 04 กันยายน 2554)

การตรึงเซลล์ คือ การจำกัดขอบเขตของจุลินทรีย์ให้อยู่ที่บริเวณใดบริเวณหนึ่ง หรือทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยที่เซลล์จุลินทรีย์ไม่สูญเสียคุณสมบัติการทำงาน และยังสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง สภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงนั้นอาจจะกำลังเจริญ กำลังพักตัวหรือตายก็ได้ โดยที่ระบบเอนไซม์หรือ biocatalyst ไม่ล้มเหลว

2.4.1 วิธีการตรึงเซลล์

2.4.1.1 การตรึงเซลล์แบบยึด (attachment or adsorption to a preformed carrier) เป็นวิธีตรึงเซลล์ที่ง่ายที่สุด โดยยึดเซลล์ไว้กับตัวกลางโดยใช้การดูดซับ สารตัวกลางที่ใช้ยึดต้องไม่ละลายน้ำ เช่น EDTA cellulose ion-exchange resin การเลือกใช้สารยึดต้องคำนึงถึงความสามารถในการเกาะยึด และไม่ทำให้เซลล์สูญเสียกิจกรรม เซลล์บางส่วนอาจหลุดได้เพราะไม่มีการใช้สารอื่นช่วยอาศัยเพียงพันธะไฮโดรเจนหรือแรงวัลเดอร์วาล์ล และการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้บางครั้งใช้การยึดเกาะด้วยแรงโคเวเลนท์ ซึ่งเป็นการตรึงเซลล์โดยใช้ประจุร่วมกันระหว่างสารตัวนำ

2.4.1.2 การตรึงเซลล์แบบการเชื่อมไขว้ (cross-linked within a matrix) เป็นการใช้สารเคมีเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์เข้าไว้ด้วยกัน โดยใช้สารเคมีพวก glutaraldehyde toluene การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ใช้ปฏิกิริยาที่ต่างกัน ได้แก่ เชื่อมเซลล์กับสารตัวกลาง ดูดเกาะเซลล์ที่ผิวหน้าสารยึดเกาะ เชื่อมเซลล์กับเซลล์ หรือการกักเซลล์ไว้ในสารที่มีรูพรุน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1.3 การตรึงเซลล์แบบการห่อหุ้ม (entrapment a carrier) เป็นวิธีการตรึงเซลล์ในสารประกอบพวกเจลที่จับกันเป็นโพลิเมอร์ มีลักษณะเป็นรูพรุนขนาดเล็กกันเซลล์หลุด แต่วัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ต้องผ่านออกมาได้ วิธีนี้นิยมใช้มากแต่พบปัญหาคือเกิดปฏิกิริยาช้าเพราะมีเจลกั้น ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยใช้ glutaraldehyde เชื่อมไว้

2.4.1.4 การตรึงเซลล์โดยการรวมตัวของเซลล์ (self aggregation by flocculation) เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยอาศัยการรวมตัวของเซลล์ เซลล์จะถูกเชื่อมกับเซลล์ด้วยแรงพันธะอ่อน การตรึงเซลล์วิธีนี้มีข้อเสีย คือเซลล์บางส่วนอาจหลุดได้ เพราะไม่มีการใช้สารอื่นช่วย

2.4.2 วัสดุยึดเกาะในการตรึงเซลล์

วัตถุประสงค์หลักของการตรึงเซลล์คือ เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ในพื้นที่ของวัสดุยึดเกาะและเป็นการเพิ่มปริมาณการผลิตในกระบวนการ วัสดุยึดเกาะที่นิยมใช้คือ alginate, agar, pectin, polyacrylamide และ caragenan และได้มีการใช้วัสดุธรรมชาติบางชนิดเช่น เปลือกไม้ หินหรือฝ้าย

2.4.3 คุณสมบัติของวัสดุยึดเกาะในการตรึงเซลล์

1. มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะสูง
2. สามารถนำมาใช้ในการตรึงเซลล์ได้ง่ายและราคาถูก
3. มีความคงตัวสูงเมื่อใช้เป็นเวลานาน
4. มีความปลอดภัยในการใช้งานและมีการปนเปื้อนน้อย

2.4.4 ข้อดีของการตรึงเซลล์

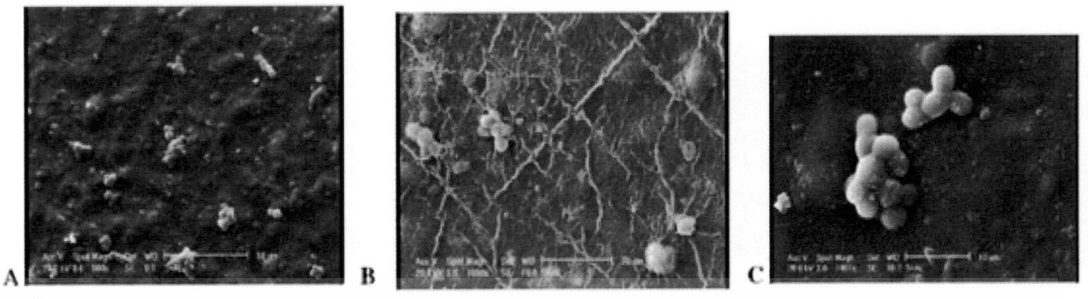
1. การตรึงเซลล์ทำให้เกิดการใช้สารอาหารดีกว่าใช้เซลล์อิสระ
2. การตรึงเซลล์ทำให้ควบคุมการผลิตได้ง่าย สามารถแยกผลิตภัณฑ์ออกไปได้ง่าย
3. เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงทนสูง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้และทนต่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ได้สูง
4. ไม่พบปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น

2.4.5 ข้อเสียของการตรึงเซลล์

เซลล์อาจสูญเสียความสามารถบางอย่างไปเนื่องจากถูกตรึงเซลล์

โซเดียมอัลจิเนตเตรียมได้โดยการละลายผงของโซเดียมอัลจิเนต 10 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 75-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และอีกส่วนหนึ่งให้ละลายแคลเซียมคลอไรด์ 120 กรัม ในน้ำกลั่น 2 ลิตร นำโซเดียมอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำโซเดียมอัลจิเนตที่ผ่านการฆ่าเชื้อและหัวเชื้อของยีสต์ที่มีการเจริญเติบโตและมีความหนาแน่นของเซลล์สูงตามต้องการมาผสมให้เข้ากัน การเตรียมเม็ดบีดสามารถทำได้โดยการหยดด้วยปิเปตหรือกระบอกฉีดยาให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของเซลล์ตรึง *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 (A : 500X, B : 1000X, C : 2000X)
ที่มา : www.scielo.br/img/revistas/bjm/v41n1/a14fig07.jpg (วันที่สืบค้น 08 สิงหาคม 2554)

อัลจิเนต (Alginate) ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล โครงสร้างเป็นเกลืออินทรีย์ของกรดอัลจินิค (alginic acid) ชนิดที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร คือ โซเดียมอัลจิเนต อัลจิเนตจะเป็นโพลิเมอร์ของสาร 2 ชนิด คือ D-mannuronic acid และ L-gulopyranosyluronic acid ซึ่งอัตราส่วนของสาร 2 ชนิด และโครงสร้างหลักจะเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติของสารละลายอัลจิเนตที่ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านความสามารถในการเกิดเจลและความแข็งของเจล อัลจิเนตไม่ทุกชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นเจล และจะเกิดเจลได้อิออนบวกที่มีประจุมากกว่าหนึ่ง เช่น แคลเซียมจะสามารถ ทำปฏิกิริยาเชื่อมข้ามได้กับอัลจิเนต เมื่อมีแคลเซียมอิออนรวมอยู่ด้วยทำให้เกิดเจลในน้ำเย็น หรือในที่อุณหภูมิต่ำเมื่อปริมาณอิออนในสารละลายเพิ่มมากขึ้นจะทำให้เกิดความข้นหนืด การเกิดเจล และการตกตะกอนได้

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

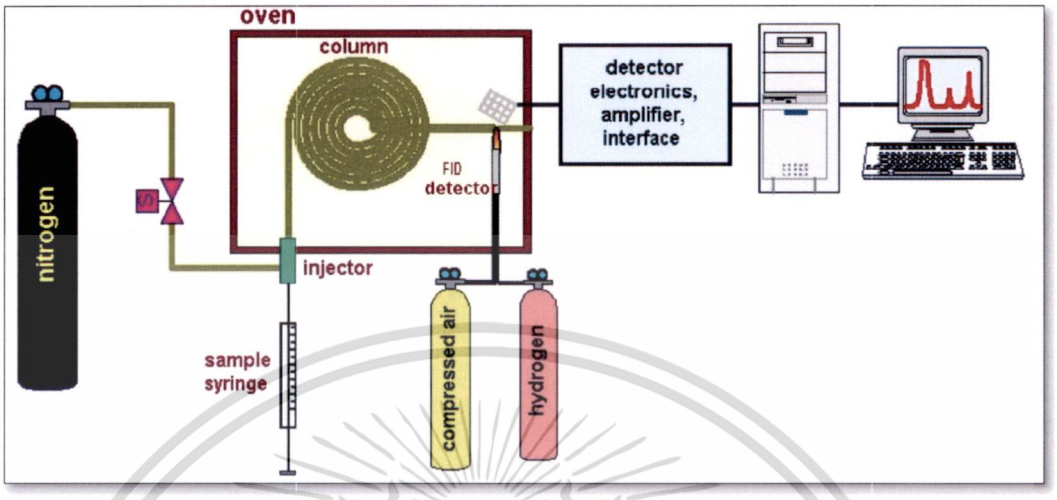
การหาปริมาณแอลกอฮอล์โดยเทคนิค Gas Chromatography

แก๊สโครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกและวิเคราะห์องค์ประกอบของสารในของผสมที่สามารถระเหยกลายเป็นไอได้ที่อุณหภูมิพอเหมาะ เทคนิคโครมาโตกราฟีทุกประเภทจะมีหลักการทำงานที่คล้ายคลึงกัน คือ ทำการแยกองค์ประกอบของสารที่กระจายอยู่ระหว่างเฟสที่ไม่ผสมกันสองเฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) และ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) องค์ประกอบของสารตัวอย่างซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่แตกต่างจากเฟสทั้งสองจะเคลื่อนที่ผ่านด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน เมื่อองค์ประกอบของสารเคลื่อนที่ผ่านออกมาจากระบบจะถูกชะแล้วผ่านไปยังเครื่องตรวจวัดซึ่งจะทำการรายงานผลออกมาในรูปแบบของโครมาโตแกรมเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป สิ่งที่ทำให้เทคนิคโครมาโตกราฟีแต่ละเทคนิคมีความแตกต่างกันคือเฟสเคลื่อนที่ สำหรับแก๊สโครมาโตกราฟีจะมีเฟสเคลื่อนที่เป็นแก๊ส

วิธีการวิเคราะห์เอทานอล

1. วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของเอทานอล
   1.1 เตรียมสารละลายเอทานอลให้มีความเข้มข้น 0 2 4 6 8 และ 10 กรัมต่อลิตร
   1.2 ปิเปตสารในข้อ 1. มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดดักแก๊ส
   1.3 ปิเปตสารละลายอะซิโตนลงไป 50 ไมโครลิตร
   1.4 นำตัวอย่างที่ได้ไปฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟีปริมาตร 1 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 องค์ประกอบของเครื่อง Gas Chromatograph
ที่มา : www.LAB_TODAY.GC.htm (วันที่สืบค้น 08 สิงหาคม 2554)

1.5 นำค่าที่ได้ไปหาอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟเอทานอลต่อพื้นที่ใต้กราฟของอะซิโตน จากนั้นนำไปเขียนกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอล และอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟเอทานอลต่อพื้นที่ใต้กราฟของอะซิโตน

2. วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายตัวอย่างได้เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดดักแก๊ส นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลเช่นเดียวกับข้อ 1. นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.6 มันเทศ (*Ipomoea batatas*) (www.oknation.net/blog/print.php?id=274925 ; สืบค้นวันที่ 09 ตุลาคม 2554)

ชื่อของมันเทศนั้น ถ้าเป็นชื่อสามัญเรียกว่า Sweet Potato แต่ถ้าเป็นชื่อทางวิทยาศาสตร์จะเรียกว่า *Ipomoea batatas* ถ้าเป็นภาคเหนือกับภาคอีสาน บางคนจะเรียกมันเทศนี้ว่า "มันแกว" ต้นกำเนิดของมันเทศนั้นมาจาก เกาะไฮติ และแถว ๆ อเมริกากลาง มันเทศเป็นพืชที่เป็นเถาเลื้อยราบไปบนพื้นดิน มีรากสะสมอาหารขยายใหญ่เรียกว่าหัว หัวมันเทศมีคุณประโยชน์มาก เพราะใช้เป็นอาหารของมนุษย์ได้เป็นอย่างดี เราใช้มันเทศปรุงอาหารได้ทั้งคาวหวาน อาหารคาวได้แก่ แกงเลียง แกงคั่ว แกงกะหรี่ และแกงมัสมั่น เป็นต้น หัวมันเทศมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูง จึงใช้รับประทานแทนข้าวได้ นอกจากเป็นอาหารของมนุษย์แล้ว มันเทศยังใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์ได้อีกด้วย เช่น เป็นอาหารหมู อาหารวัว และอาหารแพะ เป็นต้น มันเทศใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ทั้งหัว เถา และใบ ทั้งยังเป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมได้หลายอย่าง เช่น ใช้ทำแป้ง ทำแอลกอฮอล์ ทำเหล้า และทำน้ำส้ม

มันเทศเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญอันดับที่ 5 ของโลกรองจากข้าวสาลี ข้าวเจ้า ข้าวโพด และมันฝรั่ง ในประเทศไทยจะปลูกมันเทศกันทั่ว ๆ ไป มันเทศนับว่าเป็นพืชที่เหมาะกับดินฟ้าอากาศของประเทศไทยอย่างยิ่ง เพราะสามารถเจริญเติบโตได้ดี และให้ผลผลิตของหัวค่อนข้างสูง มันเทศปลูกได้ปีละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 ครั้ง คือ ในฤดูฝนตั้งแต่กลางเดือนพฤษภาคมถึงกลางเดือนมิถุนายน และอีกครั้งหนึ่งหลังฤดูฝน คือ ในราวเดือนกันยายนถึงพฤศจิกายน การปลูกมันเทศก็เริ่มจากการเตรียมดินไถและพรวน 2-3 ครั้ง เสร็จแล้วยกร่องห่างกันประมาณ 1 เมตร ความสูงของร่องประมาณ 50 เซนติเมตร ตัดเถามันเทศยาวประมาณ 50 เซนติเมตรฝังลงไปบนสันร่องห่างกันประมาณ 50 เซนติเมตร จากนั้นก็พรวนดินและกำจัดวัชพืช ถ้าไม่ได้ปลูกในฤดูฝนก็ต้องคอยรดน้ำ มันเทศจะทอดยอดงอกงาม เมื่อคอยต่อไป 90-150 วัน หัวมันเทศก็จะแก่และขุดได้

ราก มันเทศมีระบบรากแบบรากฝอย ซึ่งเกิดจากข้อของลำต้นที่ใช้ปลูก หรือเกิดจากลำต้นที่ทอดไปตามพื้นดิน รากมันเทศจะเป็นที่สะสมอาหารและใช้รับประทานได้

ใบ เป็นแบบใบเดี่ยว เกิดสลับกันบนข้อของลำต้น มีขนาดและรูปร่างต่างกัน ความแตกต่างของใบนั้นมิใช่เกิดจากพันธุ์เท่านั้น แม้แต่ในต้นเดียวกันก็อาจมีรูปร่างแตกต่างกันได้ บางใบมีขอบใบเรียบ บางใบมีใบเป็นแฉก และบางใบมีรูปร่างคล้ายหัวใจ เป็นต้น ใบมีขนเล็กน้อยและมักจะมีสีม่วงอยู่ตามเส้นใบ ก้านใบอาจจะยาวหรือสั้นทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์นั้น ๆ

ดอก มันเทศที่ปลูกในเขตอบอุ่นมักไม่ออกดอก ส่วนการปลูกในเขตร้อนจะออกดอก แต่มักไม่ติดเมล็ด ดอกเกิดตามมุมของใบ มีก้านช่อดอก (peduncle) แข็งแรง ซึ่งมักจะยาวกว่าก้านใบ ดอกมีกลีบเลี้ยง (sepal) 5 กลีบ ซึ่งโดยปกติจะแยกเป็นอิสระซึ่งกันและกัน หรืออาจเชื่อมติดกันที่โคนกลีบดอก (petal) มี 5 กลีบ กลีบดอกเหล่านั้นจะเชื่อมติดกันเป็นรูปกรวย (corolla tube) มีลักษณะคล้ายดอกผักบุ้ง กลีบดอกมีสีชมพูปนม่วง มีเกสรตัวผู้ (stamen) 5 อัน และแยกเป็นอิสระซึ่งกันและกัน ก้านชูอับเกสรตัวผู้เรียกว่า ก้านอับเกสร มีความยาวไม่เท่ากัน และเชื่อมติดอยู่กับฐานของกลีบดอก รังไข่ มี 2 ส่วน บางดอกอาจจะมี 4 ส่วน แต่ละส่วนจะมีไข่ 1 หรือ 2 ที่รับละอองเกสรตัวผู้ (stigma) มี 2 แฉกอยู่ที่ก้าน (style) เชื่อมติดกับรังไข่

ผล มีเปลือกแข็งหุ้ม มีลักษณะเป็นแคปซูล (capsule) ภายในเปลือกแข็งมีเมล็ดเล็กสีดำค่อนข้างแบน ด้านหนึ่งของเมล็ดเรียบ ส่วนอีกด้านหนึ่งเป็นเหลี่ยม ทางด้านเรียบจะเห็นรอยที่เมล็ดติดกับผนังรังไข่เรียกว่า ไฮลัม (hilum) และมีรูเล็ก ๆ เรียกว่า ไมโครไพล์ (micropyle) เปลือกของเมล็ดค่อนข้างหนาและน้ำซึมผ่านได้ยาก

หัว มันเทศลงหัวในระดับความลึกไม่เกิน 9 นิ้ว หัวมันเทศเกิดจากการขยายตัวของราก ซึ่งเนื้อเยื่อภายในรากที่เรียกว่าพาเรนไคมา (parenchyma) เป็นส่วนที่สะสมแป้ง รากที่ขยายตัวเป็นหัวขึ้นมาอาจเกิดจากรากของลำต้นที่ใช้ปลูก หรือจากรากที่เกิดจากข้อของลำต้นที่เลื้อยไปตามดินก็ได้ ดังนั้นมันเทศต้นหนึ่ง ๆ อาจมีหัวมากกว่า 50 หัว ลักษณะหัวส่วนมากมีรูปร่างทรงกระบอก ด้านหัวท้ายเรียวตรงกลางป่องออก สีผิวของหัวและสีของเนื้ออาจจะเป็นสีแดง เหลือง ขาว หรือสีนวล แตกต่างกันไปตามพันธุ์ ผิวอาจจะเรียบหรือขรุขระและมักจะมีรากแขนงเกิดในร่องของหัว หัวมันเทศนอกจากจะให้อาหารจำพวกแป้งแล้วยังอุดมสมบูรณ์ไปด้วยวิตามิน เอ (โดยเฉพาะหัวที่มีสีเหลือง) วิตามิน บี และ ซี อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Srichuwong และคณะ (2009) ศึกษากระบวนการหมักโดยระบบ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) ของมันเทศที่มีความเข้มข้นสูงเพื่อใช้ผลิตเอทานอล พบว่ามันเทศถูกบดให้เป็นผงละเอียดประมาณ 304 กรัมต่อลิตรของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ซึ่งมีความหนืดสูง การลดความหนืดทำได้โดยนำผงมันเทศมา pretreatment ด้วยเอนไซม์หลายชนิด เช่น เอนไซม์เพกติเนส เซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส เพื่อทำให้ความหนืดเหมาะสมที่จะนำมาหมักได้ แป้งที่ผ่านการ pretreatment จะถูกเปลี่ยนไปเป็น maltodextrins (liquefaction) โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส จากนั้นทำให้เกิดกระบวนการ simultaneous saccharification and fermentation ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญของยีสต์ โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส คือ 1.65 AGUต่อกรัม ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต คือ 30.2 มิลลิโมลาร์ ระยะเวลาในการหมักนาน 61.5 ชั่วโมง โดยใช้ response surface methodology (RSM) ปริมาณเอทานอลที่ได้ 16.61 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) ซึ่งมีค่าประมาณ 89.7 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตทางทฤษฎี

Jamai และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้งโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของ *Candida tropicalis* ในที่มีเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส พบว่าการเพิ่มอัตราการผลิตเอทานอลสามารถเกิดขึ้นได้โดยนำแป้งข้าวโพดมา pretreatment ก่อน โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กระบวนการลิเคอแฟกชันแป้งข้าวโพดโดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นเอทานอลได้ร้อยละ 96 จากการใช้แป้งข้าวโพดร้อยละ 9 (น้ำหนักโดยปริมาตร) และใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสามารถผลิตเอทานอลได้ 43.1 กรัมเอทานอลต่อลิตร ในเวลา 65 ชั่วโมง โดยมีประสิทธิภาพในการผลิต 0.65 กรัมต่อลิตร.ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าการผลิตไบโอเอทานอลโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของ *C. tropicalis* ไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนในการเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาล (saccharification) รวมทั้งการปรับปรุงการหมักโดยใช้การหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch) ใช้เซลล์อิสระของ *C. tropicalis* สามารถเพิ่มผลผลิตเอทานอลได้ถึง 56 กรัมเอทานอลต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่ได้ปรับปรุงพันธุ์ให้มีทั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

Najafpour (2004) ศึกษาการผลิตเอทานอลในถังหมักแบบตรึงเซลล์ (ICR) โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุเซลล์ตรึงของ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเซลล์จะถูกกักเก็บไว้ในแคลเซียมอัลจิเนตการผลิตเอทานอลจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องหลังการหมักผ่านไป 24 ชั่วโมง การหมักแบบกะทำได้โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร และเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลและผลผลิตต่อหน่วยของเอทานอลการหมักแบบกะและระบบตรึงเซลล์ ในการหมักแบบกะปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปและปริมาณของเอทานอลที่ถูกสร้างขึ้น คือ 99.6 เปอร์เซ็นต์ และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร หลังการหมัก 27 ชั่วโมง และการหมักในระบบตรึงเซลล์ ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป และปริมาณของเอทานอลที่ถูกสร้างขึ้นเท่ากับ 88.2 เปอร์เซ็นต์ และ 16.7 เปอร์เซ็นต์ ในการหมัก 6 ชั่วโมง อัตราการเจริญของเซลล์อยู่บนพื้นฐานของสมการโมนอด (Monod) ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ K_s และ μ_m ในการหมักแบบกะ คือ 2.3 กรัมต่อลิตร และ 0.35 กรัมต่อลิตร.ชั่วโมง ตามลำดับ ผลผลิตสูงสุดของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อสับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

($Y_{x/s}$) และผลผลิตสูงสุดของผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรท ($Y_{p/s}$) ในการหมักแบบกะ คือ 50.8 เปอร์เซ็นต์ และ 31.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลผลิตต่อหน่วยของระบบตรึงเซลล์ คือ 1.3, 2.3 และ 2.8 กรัมต่อลิตร. ชั่วโมง ต่อ 25, 35 และ 50 กรัมต่อลิตร ของความเข้มข้นกลูโคส ตามลำดับ ผลผลิตต่อหน่วยของเอทานอลในการหมักแบบกะของกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ประมาณ 0.29 กรัมต่อลิตร.ชั่วโมง การผลิตเอทานอลมีปริมาณมากที่สุดที่ในระบบ ICR เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบกะในถังหมักโดยสามารถเพิ่มผลผลิตได้ 10 เท่า

Nikolic และคณะ (2006) ศึกษาการพัฒนากระบวนการหมักเอทานอลจากข้าวโพดที่ผ่านการย่อยโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของยีสต์และเติมสารอาหารลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าจากการหมักเอทานอลโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของ *Saccharomyces cerevisiae var ellipsoideus* และเติมแร่ธาตุบางชนิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แมกนีเซียม ซิงค์ แคลเซียม และคอปเปอร์ รวมทั้งวิตามินชนิดต่าง ๆ เช่น pantothennate, thiamine, pyridoxine, biotin และการเติมอาจเติมโดยแยกหรือเติมเป็นสารผสมรวมกัน พบว่าการเติมแร่ธาตุทั้งหมดที่นำมาศึกษาโดยเติมแยกหรือรวมกัน ทำให้ผลการผลิตเอทานอลสูงขึ้นระหว่างการหมักแป้งข้าวโพด ซึ่งการใช้ส่วนผสมของแมกนีเซียมรวมกับซิงค์ โดยใช้ $MgSO_4$ 2 กรัมต่อลิตร และ $ZnSO_4$ 0.3 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด การเติมคอปเปอร์อิออน ($CuCl_2$ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) หรือแคลเซียมอิออน ($CaCl_2$ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทำให้ผลผลิตของเอทานอลเพิ่มขึ้น สำหรับวิตามินพบว่าการเติม Ca-pantothennate 1 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลสูง โดยเพิ่มขึ้น 8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จากผลการทดลองพบว่าการเติมวิตามินและแร่ธาตุร่วมกันทำให้ได้ผลผลิตของเอทานอลสูงสุด โดยใช้ $MgSO_4$ 2 กรัมต่อลิตร, $ZnSO_4$ 0.3 กรัมต่อลิตร, $CuCl_2$ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, Ca-pantothennate 1 กรัมต่อลิตร และ inositol 0.5 กรัมต่อลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีแป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยแล้ว การเติมสารเหล่านี้ทำให้ประสิทธิภาพในการหมักเพิ่มขึ้น 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารเหล่านี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

Saccharomyces cerevisiae YRK 017 ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้า (วิมลักษณ์, 2549)

3.2 วัตถุดิบ

มันเทศ สายพันธุ์ที่มีเนื้อสีเหลือง

3.3 สารเคมี

1. สารละลายกรดซัลฟูริก ความเข้มข้นร้อยละ 96
2. สารละลายฟีนอล ความเข้มข้นร้อยละ 5
3. สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
4. เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จาก *Aspergillus oryzae* 31.2 U/mg (Sigma, Aldrich CO. Ltd.)
5. เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส จาก *Aspergillus niger* 31.2 U/mg (Sigma, Aldrich CO. Ltd.)
6. สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0
7. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล
8. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล
9. สารละลายโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้นร้อยละ 2.5
10. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์
11. สารละลายไตรโพแทสเซียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 1 โมลาร์
12. สารละลายเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85

3.4 วัสดุอุปกรณ์

1. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร
2. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. กระบอกตวง ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร
4. กระดาษกรอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน
5. หลอดทดลอง
6. ปิเปต ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
7. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
8. ตะแกรงร่อน เบอร์ 35
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
10. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
12. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมผงมันเทศแห้ง

นำมันเทศมาล้างน้ำให้สะอาด ปอกเปลือกนำมาหั่นเป็นแผ่นบาง ๆ ขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร นำมาวางเรียงบนถาดสแตนเลสในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จนกระทั่งมันเทศแห้ง นำชิ้นมันเทศที่ผ่านการอบแห้งแล้วมาบดให้ละเอียด ด้วยเครื่องปั่น จากนั้นนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาดเบอร์ 35 จะได้ผงแป้งมันเทศที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.188 มิลลิเมตร เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลต่อไป

3.5.2 การวิเคราะห์ผงมันเทศแห้ง

นำผงมันเทศแห้งที่เตรียมได้มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นในผงมันเทศแห้ง โดยการนำไปอบที่อุณหภูมิที่ 105 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ หาปริมาณโปรตีน (crude protein) โดยใช้วิธี Macro-Kjeldahl หาปริมาณไขมัน (crude fat) โดยวิธีการสกัดโดยใช้อุปกรณ์ soxhlet หาปริมาณเถ้า (ash) โดยนำไปเผาที่อุณหภูมิ 500-600 องศาเซลเซียส และหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

3.5.3 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

3.5.3.1 การเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมอะซิเตตปริมาณ 16.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และเตรียมสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยปิเปตกรดอะซิติกเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 11.55 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์โดยนำสารละลายโซเดียมอะซิเตตที่เตรียมได้มาปริมาตร 352 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดอะซิเตตปริมาตร 148 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วปรับความเข้มข้นให้เป็น 0.05 โมลาร์ และนำไปปรับพีเอชเป็น 5.0 โดยใช้สารละลายกรดอะซิติก 0.05 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมอะซิเตต 0.05 โมลาร์

3.5.3.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ชั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.05 กรัม นำมาละลายในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร แล้วนำไปกรองด้วย Milipore filter ด้วยเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยทำในสภาวะปลอดเชื้อ เก็บสารละลายเอนไซม์ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.5.3.3 การเตรียมสารละลายเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส

ชั่งเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 0.015 กรัม นำมาละลายด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร แล้วนำไปกรองด้วย Milipore filter ด้วยเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรองขนาด 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยทำในสภาวะปลอดเชื้อ เก็บสารละลายเอนไซม์ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.5.4 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากเชื้อบริสุทธิ์ของ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 จำนวน 1 ลูป มาขีดลงบนอาหารแข็งชนิดเอียงในหลอดทดลอง (YM agar slant) นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน เพื่อเตรียมเป็นสต๊อกเชื้อใหม่ แล้วเตรียมหัวเชื้อโดยเขี่ยเชื้อจากสต๊อกเชื้อที่เตรียมไว้จำนวน 1 ลูป ลงในอาหาร YM broth ปริมาตร 75 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายยีสต์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) 0.5

3.5.5 การเตรียมเซลล์ตรึงรูป

ชั่งโซเดียมอัลจิเนต 2.5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำมาวางในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ 75-80 องศาเซลเซียส คนจนโซเดียมอัลจิเนตละลายจนหมด เทใส่ฟลาสก์ ๆ ละ 50 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี และเตรียมแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยชั่งแคลเซียมคลอไรด์ 2.7748 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นเทใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 100 มิลลิลิตร นำสารละลายโซเดียมอัลจิเนตและสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปิเปตหัวเชื้อยีสต์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.4 ลงในโซเดียมอัลจิเนต 15 มิลลิลิตร ทำให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่ได้ด้วยกระบอกฉีดยาที่ปลอดเชื้อ แล้วหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แช่เม็ดเจลที่ได้ทิ้งไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาเฉพาะเม็ดเจลส่วนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ทิ้งไป นำเม็ดเจลมาล้างด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปลอดเชื้อจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ตรึงรูปที่ได้ไปใช้ในกระบวนการหมักทันที

3.5.6 การเปรียบเทียบกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF) โดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ

3.5.6.1 การเตรียมสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

เตรียมสารละลายผงมันเทศให้มีความเข้มข้นของสารละลายผงมันเทศที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลที่ได้จากข้อ 3.5.6.1 และมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลที่ได้จากข้อ 3.5.6.2 นำสารละลายผงมันเทศที่ได้ใส่ในฟลาสก์ ๆ ละ 150 มิลลิลิตร จำนวน 22 ฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วย่อยด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะได้สารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

3.5.6.2 กระบวนการหมัก

นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นเติมหัวเชื้อยีสต์อิสระลงไปปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ และนำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปเติมลงไปจำนวน 18 ฟลาสก์ ส่วนอีกหนึ่งฟลาสก์ใช้เป็นชุดควบคุม นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.5.7 การเปรียบเทียบกระบวนการย่อยแป้งมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; SSF) โดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ

3.5.7.1 การเตรียมสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

เตรียมสารละลายผงมันเทศให้มีความเข้มข้นของสารละลายผงมันเทศที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลที่ได้จากข้อ 3.5.6.1 และมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลที่ได้จากข้อ 3.5.6.2 นำสารละลายผงมันเทศที่ได้ใส่ในฟลาสก์ ๆ ละ 150 มิลลิลิตร จำนวน 22 ฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้เป็นสารละลายน้ำตาลพวกโอลิโกแซ็กคาไรด์

3.5.7.2 กระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก

นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาเติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสปริมาตร 20 มิลลิลิตร พร้อมกับเติมหัวเชื้อยีสต์ลงไปปริมาตร 15 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ และพร้อมกับเติมเซลล์ตรึงรูปจำนวน 18 ฟลาสก์ นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.5.8 ศึกษาผลของแร่ธาตุและวิตามินบางชนิดต่อกระบวนการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* YRK 017

3.5.8.1 กระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (Separated hydrolysis and fermentation, SHF) โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ

โดยนำแป้งมันเทศ 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำมาต้มบน hot plate stirrer ที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเลา 10-15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำแป้งที่ผ่านการย่อยมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล ซัลฟูริก จากนั้นนำแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยมาเติมแร่ธาตุและวิตามิน ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แร่ธาตุ

- $ZnSO_4 .7H_2O$ 0.3 กรัมต่อลิตร
- $MgSO_4. 7H_2O$ 2.0 กรัมต่อลิตร

วิตามิน

- Ca – pantothenate 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- myo – inositol 33.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยแบ่งการทดลอง ดังนี้

ชุดที่ 1 เติมแร่ธาตุ ($ZnSO_4 .7H_2O$ 0.3 กรัมต่อลิตรและ $MgSO_4. 7H_2O$ 2.0 กรัม ต่อลิตร)

ชุดที่ 2 เติมวิตามิน (Ca – pantothenate 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และmyo – inositol 33.0 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ชุดที่ 3 เติมแร่ธาตุและวิตามินรวมกัน ($ZnSO_4.7H_2O$ 0.3 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4. 7H_2O$ 2.0 กรัมต่อลิตร, Ca – pantothenate 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และmyo – inositol 33.0 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ชุดที่ 4 ไม่เติมแร่ธาตุและวิตามิน (ชุดการทดลองควบคุม)

จากนั้นเติมหัวเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในฟลาสก์เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol – Sulfuric acid ปริมาณเอทานอลวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC และหาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักด้วยวิธี Total plate count

3.5.8.2 กระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป

ทำการทดลองและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกันกับหัวข้อ 3.5.5.1 แต่ใช้เซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* YRK 017 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร

3.5.8.3 กระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยที่เกิดขึ้นพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ

โดยนำแป้งมันเทศ10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำมาต้มบน hot plate stirrer ที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเลา 10-15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อทำให้เกิดกระบวนการลิเคอแฟกชัน นำแป้งที่ผ่านการย่อยมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล ซัลฟูริก จากนั้นนำแป้งที่ผ่านการย่อยมาเติมแร่ธาตุและวิตามินพร้อมทั้งเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* YRK 017 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร เพื่อให้เกิดการหมัก วางฟลาสก์บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หมักนาน 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.5.5.1 ในการเติมแร่ธาตุและวิตามินในแป้งที่ผ่านการย่อย แบ่งการทดลองเป็น 4 ชุดทดลอง เหมือนหัวข้อ 3.5.5.1 วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ลดลง รวมทั้งจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต

3.5.8.4 กระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยที่เกิดขึ้นพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป

ทำการทดลองและวิเคราะห์เช่นเดียวกับหัวข้อ 3.5.5.3 แต่ใช้เซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* YRK 017 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร

3.5.9 การวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยวิธี Total plate count ด้วยเทคนิคเทเพลท (pour plate)

ปิเปตสารละลายน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายที่ระดับ 10^{-1}-10^{-7} ปิเปตสารละลายระดับการเจือจางที่ 10^{-5}-10^{-7} ลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ลงไป วนจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายน้ำหมักผสมกัน ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีของเซลล์ยีสต์ กระบวนการหมักที่ใช้เซลล์ยีสต์อิสระวิเคราะห์ทุก 12 ชั่วโมง สำหรับกระบวนการหมักที่ใช้เซลล์ตรึงรูป วิเคราะห์ทุก 24 ชั่วโมง

3.5.10 การวิเคราะห์

3.5.10.1 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที (1805 ×g) เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสเก็บไว้แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง สำหรับเซลล์ตรึงให้นำเซลล์ตรึงมาย่อยด้วย 1 โมลาร์ ของสารละลายไตรโพแทสเซียมฟอสเฟตปริมาตร 30 มิลลิลิตร แช่เม็ดเจลทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที (1805 ×g) เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งไปนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.5.10.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก

3.5.10.2.1 การทำกราฟมาตรฐาน

ชั่งกลูโคสที่ผ่านการอบแห้ง 0.01 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายน้ำตาลมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ แล้วเติม 5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายฟีนอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

3.5.10.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่าง

นำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที (1805 ×g) เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการเจือจางที่เหมาะสม แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐาน นำผลที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่าง

3.5.10.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

นำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที (1805 ×g) เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น shimadzu 17A chromatograph โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา คอลัมน์ที่ใช้เป็น DB-WAX ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.53 มิลลิเมตร อุณหภูมิภายในคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ตัวตรวจวัดเป็นชนิด flame ionization detector (FID)

3.5.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design ; CRD) โดยมีจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างด้วยวิธีของ Duncan โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของผงมันเทศแห้ง

จากการนำผงมันเทศที่ผ่านการอบแห้งแล้วมาทำการวิเคราะห์เพื่อหาความชื้นของผงมันเทศแห้ง โดยการนำไปอบที่อุณหภูมิที่ 105 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีของ Macro-Kjeldahl วิเคราะห์หาปริมาณไขมันโดยวิธี soxhlet วิเคราะห์หาปริมาณเถ้าโดยนำไปเผาที่อุณหภูมิ 500-600 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด พบว่าในผงมันเทศแห้งประกอบด้วยปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.15 ปริมาณไขมันร้อยละ 2.26 ปริมาณเถ้าร้อยละ 3.49 และปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดร้อยละ 84.77 โดยมีความชื้นร้อยละ 9.33 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงส่วนประกอบของผงมันเทศแห้งที่เตรียมได้และปริมาณของส่วนประกอบต่าง ๆ

ส่วนประกอบของแป้งมันเทศ	ร้อยละ
โปรตีน	0.15
ไขมัน	2.26
เถ้า	3.49
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	84.77
ความชื้น	9.33

Shen และคณะ (2012) ศึกษาการหมักเอทานอลโดยใช้ผงมันเทศที่มีความหนืดสูงโดยมีน้ำตาลกลูโคส 210.0 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบแบทช์ โดยวิเคราะห์องค์ประกอบของผงมันเทศ พบว่ามีปริมาณแป้งทั้งหมดประมาณ 67.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้ง) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 78.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้ง) และปริมาณโปรตีนประมาณ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้ง)

Zhang และคณะ (2011) ศึกษากระบวนการทางชีวภาพในการผลิตเอทานอลจากมันเทศดิบ โดยมันเทศดิบประกอบด้วยกลูโคสทั้งหมดได้มาจากแป้ง เซลลูโลส และส่วนที่ละลายน้ำได้ประมาณ 91 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของหัวมันเทศ คือ 34.12 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร และมีแป้ง 23.91 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร น้ำตาลกลูโคส 7.76 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร น้ำตาลซูโครส 1.09 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร และน้ำตาลฟรุกโตส 0.47 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร มีพีเอชเริ่มต้น 4.8 ปริมาณความชื้นเฉลี่ย 61.5 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของโปรตีน 0.7 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ปริมาณเถ้า 1.61 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ปริมาณเส้นใย 2.2 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร และปริมาณไขมัน 0.2 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการย่อยผงมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF) โดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ

ใช้สารละลายผงมันเทศความเข้มข้นร้อยละ 8 และพีเอชเริ่มต้นของสารละลายผงมันเทศเป็น 4.5 มาศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการย่อยผงมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) โดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ ทำโดยชั่งผงมันเทศแห้งใส่บีกเกอร์ปริมาณ 264 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 3300 มิลลิลิตร นำไปต้มบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิประมาณ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายผงมันเทศมาปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล และนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 85-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และย่อยต่อด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสความเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยใช้วิธีฟีนอล-ซัลฟูริก จากนั้นนำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นนำมาเติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 ที่เป็นเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปร้อยละ 10 โดยปริมาตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น จากการทดลองพบว่าการใช้สารละลายผงมันเทศความเข้มข้นร้อยละ 8 (น้ำหนักโดยปริมาตร) และมีการปรับพีเอชเริ่มต้นของสารละลายผงมันเทศภายหลังการเจลาติไนซ์เป็น 4.5 เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์และหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 โดยกระบวนหมักแบบการย่อยผงมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ากระบวนหมักแบบการย่อยผงมันเทศแยกกับกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป ให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาในการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 72 จะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 13.67 และ 12.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงตลอดระยะเวลาในการหมัก ในชั่วโมงที่ 72 ของกระบวนหมักโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 8.41 และ 11.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเซลล์อิสระจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าเซลล์ตรึงรูป แสดงดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1

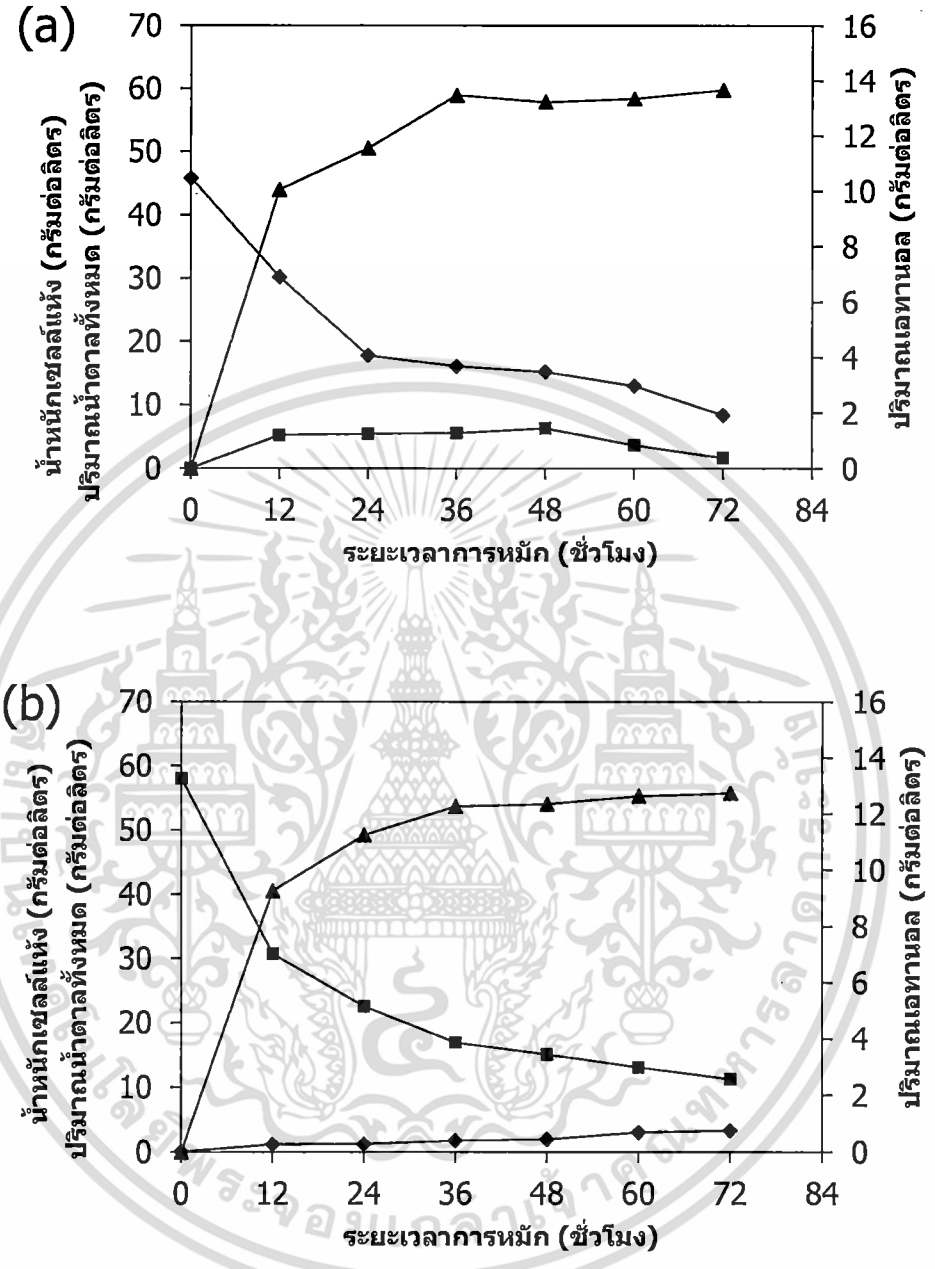
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการย่อยผงมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF) โดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก			
	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	
	เซลล์อิสระ	เซลล์ตรึงรูป	เซลล์อิสระ	เซลล์ตรึงรูป
0	0.00^{e} ±0.00	0.00^{f} ±0.00	45.13^{a} ±0.17	58.05^{a} ±0.00
12	10.06^{d} ±0.02	9.26^{e} ±0.42	30.21^{b} ±2.82	30.77^{b} ±1.77
24	11.55^{c} ±0.07	11.25^{d} ±0.19	17.80^{c} ±0.14	22.54^{c} ±1.64
36	13.23^{b} ±0.12	12.27^{c} ±0.26	16.09^{cd} ±0.23	16.97^{d} ±1.54
48	13.35^{ab} ±0.15	12.35^{bc} ±0.13	15.22^{d} ±0.65	15.09^{de} ±0.93
60	13.47^{ab} ±0.53	12.64^{ab} ±0.27	13.01^{e} ±0.44	13.12^{ef} ±0.89
72	13.67^{a} ±0.18	12.75^{a} ±0.16	8.41^{f} ±0.25	11.28^{f} ±0.83

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

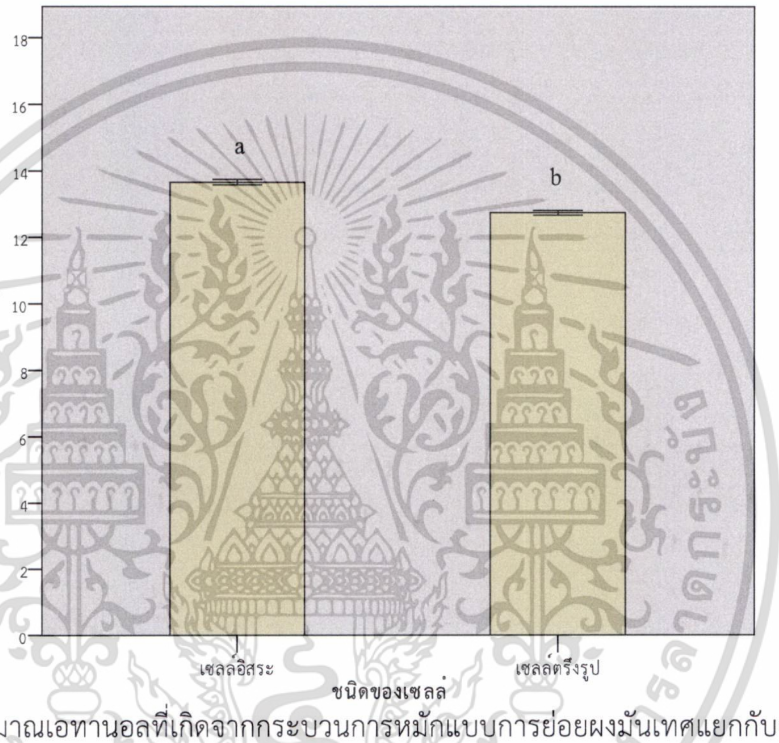
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบการย่อยแยกจากการหมัก โดยใช้ (a) เซลล์อิสระและ (b) เซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ◆ แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง, ▲ แทนความเข้มข้นของเอาทานอล, ■ แทนความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดของกระบวนหมักแบบการย่อยผงมันเทศแยกจากกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเซลล์อิสระจะให้มีปริมาณของเอทานอลสูงสุด คือ 13.67 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับเซลล์ตรึงรูป ดังแสดงในรูปที่ 4.8 โดยกำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณเอทานอลที่เกิดจากกระบวนการหมักแบบการย่อยผงมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017

เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด ($Y_{p/s}$) ของกระบวนการหมักแบบการย่อยผงมันเทศแยกกับกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป พบว่าเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปมีค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด 0.37 และ 0.27 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด และจากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมดของการใช้เซลล์อิสระมีค่ามากกว่าและมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับเซลล์ตรึงรูป แสดงดังตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด ($Y_{p/s}$) กระบวนการย่อยผงมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF) โดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง

ลักษณะเซลล์	ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง				
	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)		ค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด)
	0 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	
เซลล์อิสระ	45.13	8.41	0.00	13.67	0.37[a]
เซลล์ตรึงรูป	58.05	11.28	0.00	12.75	0.27[b]

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ดังนั้นในการทดลองกระบวนการย่อยผงมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) โดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์อิสระจะให้ผลผลิตของเอทานอลสูงกว่าเซลล์ตรึงรูป และเซลล์อิสระยังมีค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าการใช้เซลล์ตรึงรูป

Peng และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำเสียจากโรงงานกระดาษโดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) กระบวนการที่มีเซลลูเลสและเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* GIM-2 พบว่าวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับการออกแบบการทดลองเพื่อเพิ่มระดับของการ saccharification โดยการย่อยน้ำเสียจากโรงงานกระดาษด้วยเอนไซม์ โดยการออกแบบของ Plackett-Burman เวลาในการย่อย ความเข้มข้นของสารตั้งต้น และปริมาณเซลลูเลสที่ใช้ เป็นตัวแปรที่สำคัญที่สุดเกี่ยวกับระดับของการ saccharification ระดับของการ saccharification ที่เหมาะสม คือ ระยะเวลาในการย่อย 82.7 ชั่วโมง ความเข้มข้นของสารตั้งต้น 40.8 กรัมต่อลิตร และเซลลูเลสปริมาณ 18.1 กรัมต่อ FPU ต่อสับสเตรท และระดับของ saccharification เป็น 82.1 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถทำได้เมื่อทำการไฮโดรไลซ์และหมักด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* GIM-2 อัตราการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลต่อการผลิตเอทานอล คือ 34.2 เปอร์เซ็นต์ และค่าผลได้ของเอทานอล คือ 190 กรัมเอทานอลต่อกิโลกรัมน้ำเสียจากโรงงานกระดาษ ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการเปลี่ยนแปลงค่าผลได้โดยรวม 56.3 เปอร์เซ็นต์ ของคาร์โบไฮเดรตต่อสับสเตรทเริ่มต้น

Abedinifar และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวโดยกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์แยกจากกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อ *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae* และเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ทำการไฮโดรไลซ์ที่อุณหภูมิและพีเอชของเอนไซม์เซลลูเลสและเบต้ากลูโคซิเดส โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.0 ทำการปรับสภาพฟางข้าวโดยการย่อยด้วยกรดเจือจาง พบว่าได้ค่าผลได้ของน้ำตาล 0.72 กรัมฟางข้าวต่อกรัมน้ำตาล ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ของการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งสูงกว่าการปรับสภาพด้วยไอน้ำ (0.60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัมฟางข้าวต่อกรัมน้ำตาล) และฟางข้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (0.46 กรัมฟางข้าวต่อกรัมน้ำตาล) นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของกรดเจือจางในการปรับสภาพฟางข้าวจาก 20-50 และ 100 กรัมต่อลิตร พบว่าค่าผลได้ของน้ำตาลลดลง 13 เปอร์เซ็นต์ และ 16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศโดย *M. indicus* พบว่ามีผลผลิตของเอทานอลเป็น 0.36-0.43 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล มวลชีวภาพ 0.11-0.17 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และกลีเซอรอล 0.04-0.06 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งเปรียบเทียบกับค่าผลได้ของเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (เอทานอล 0.37-0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล มวลชีวภาพ 0.04-0.10 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และกลีเซอรอล 0.05-0.07 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) เชื้อราสองชนิดนี้ยังไม่มีการผลิตสารตัวกลางที่สำคัญอื่นจากฟางข้าว และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่า 25 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม *R. oryzae* ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์ผลได้หลักโดยมีค่าผลได้ 0.05-0.09 กรัมแลกติกต่อกรัมน้ำตาล โดยเชื้อรานี้จะผลิตเอทานอล ชีวมวล และกลีเซอรอลเป็น 0.33-0.41, 0.06-0.12, และ 0.03-0.04 กรัมต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ

4.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; SSF) โดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ

ใช้สารละลายผงมันเทศความเข้มข้นร้อยละ 8 และพีเอชเริ่มต้นของสารละลายผงมันเทศเป็น 4.5 มาศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) โดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ ทำโดยชั่งผงมันเทศแห้งใส่บีกเกอร์ปริมาณ 264 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 3300 มิลลิลิตร นำไปต้มบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิประมาณ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายผงมันเทศมาปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล และนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 85-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยใช้วิธีฟีนอล-ซัลฟูริก จากนั้นนำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาเติมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* YRK 017 ที่เป็นเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปร้อยละ 10 โดยปริมาตร พร้อมทั้งเติมสารละลายเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสความเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น จากการทดลองพบว่าการใช้สารละลายผงมันเทศความเข้มข้นร้อยละ 8 (น้ำหนักโดยปริมาตร) และมีการปรับพีเอชเริ่มต้นของสารละลายสารละลายผงมันเทศภายหลังการเจลาติไนซ์เป็น 4.5 เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 พร้อมกับเติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส โดยกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ากระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป ให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาในการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 72 จะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 14.64 และ 13.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก ในชั่วโมงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

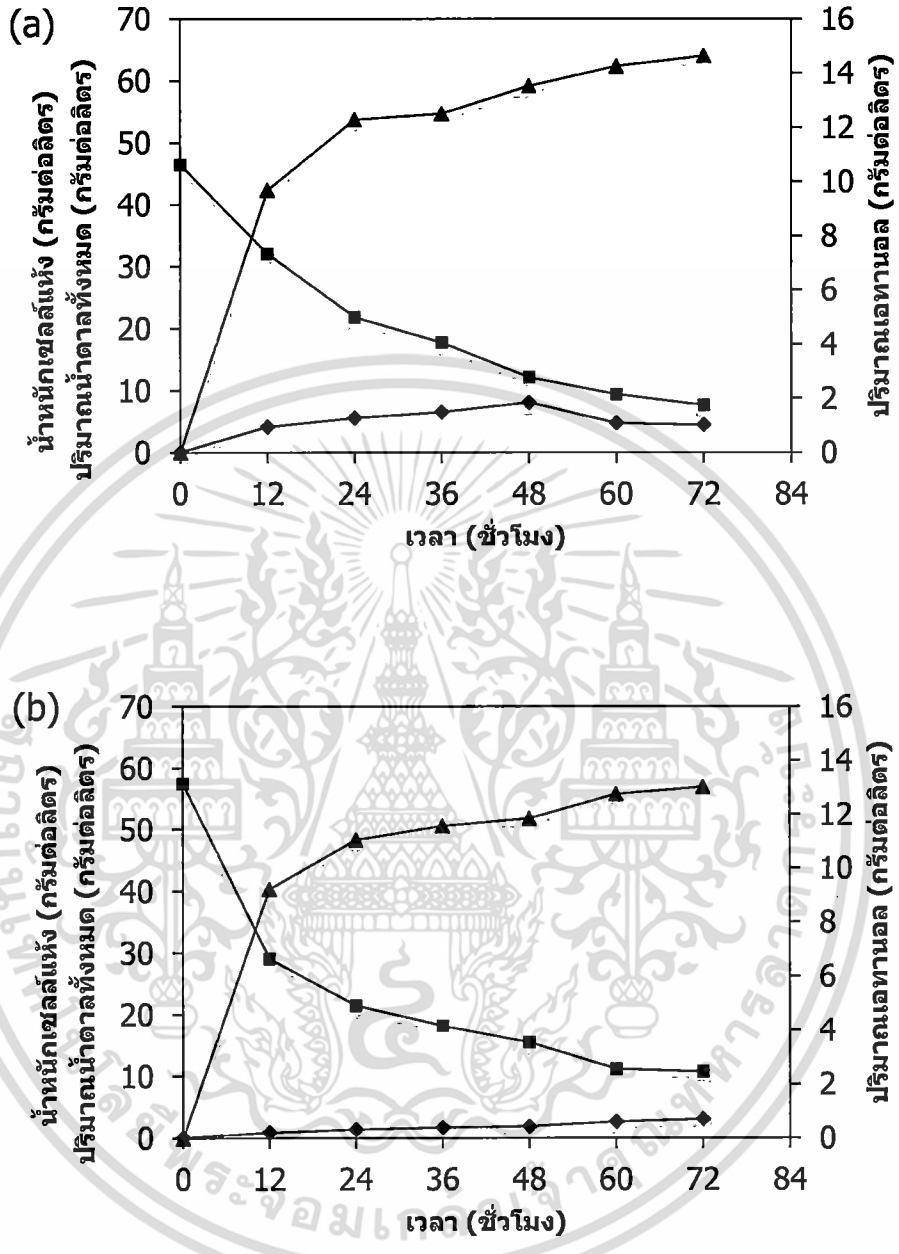
72 ของกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่ 7.65 และ 10.78 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเซลล์อิสระจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าเซลล์ตรึงรูป แสดงดังตารางที่ 4.4 และ รูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; SSF) โดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก			
	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	
	เซลล์อิสระ	เซลล์ตรึงรูป	เซลล์อิสระ	เซลล์ตรึงรูป
0	0.00^{e} ±0.00	0.00^{e} ±0.00	46.49^{a} ±1.42	57.52^{a} ±0.00
12	9.78^{d} ±0.12	9.23^{d} ±0.04	32.09^{b} ±1.73	29.12^{b} ±3.12
24	12.29^{c} ±0.08	11.05^{c} ±0.02	21.84^{c} ±3.91	21.50^{c} ±0.58
36	12.51^{c} ±0.14	11.57^{b} ±0.28	17.77^{d} ±1.30	18.24^{d} ±1.67
48	13.53^{b} ±0.31	11.85^{b} ±0.13	12.18^{e} ±1.61	15.58^{d} ±1.71
60	14.25^{a} ±0.21	12.76^{a} ±0.20	9.43^{ef} ±0.96	11.24^{e} ±0.86
72	14.64^{a} ±0.44	13.02^{a} ±0.22	7.65^{f} ±0.81	10.78^{e} ±0.94

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

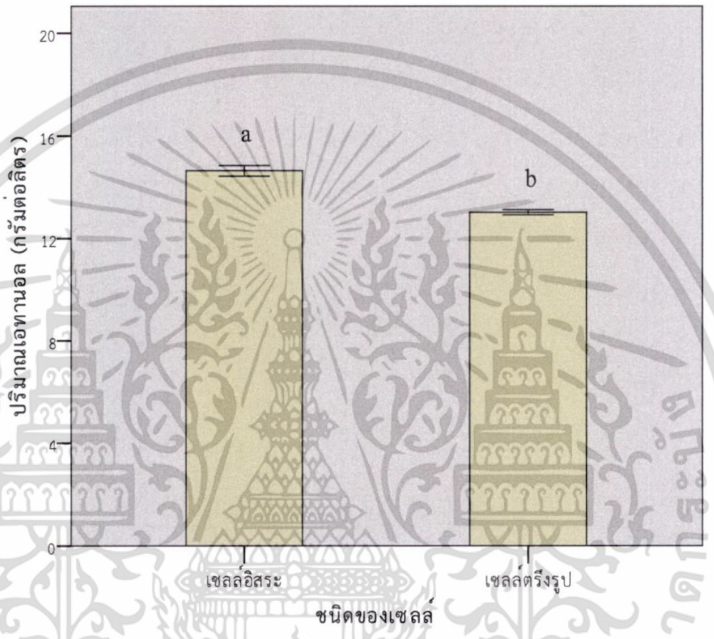
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบการย่อยพร้อมการหมักโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 ในรูปแบบ (a) เซลล์อิสระ และ (b) เซลล์ตรึงรูป ใช้เวลาหมักทั้งหมด 72 ชั่วโมง ◆ แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง, ▲ แทนความเข้มข้นของเอทานอล, ■ แทนความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดของกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเซลล์อิสระจะให้มีปริมาณของเอทานอลสูงสุด คือ 14.64 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับเซลล์ตรึงรูป ดังแสดงในรูปที่ 4.4 โดยกำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณเอทานอลที่เกิดจากกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017

เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด ($Y_{p/s}$) ของกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป พบว่าเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป มีค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด 0.38 และ 0.28 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมดของการใช้เซลล์อิสระมีค่ามากกว่าและมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับเซลล์ตรึงรูป แสดงดังตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด ($Y_{p/s}$) กระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; SSF) โดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง

ลักษณะเซลล์	ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง				
	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)		ค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด)
	0 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	
เซลล์อิสระ	46.49	7.65	0.00	14.64	0.38[a]
เซลล์ตรึงรูป	57.52	10.78	0.00	13.02	0.28[b]

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ดังนั้นในการทดลองกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) โดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์อิสระจะให้ผลผลิตของเอทานอลสูงกว่าเซลล์ตรึงรูป และเซลล์อิสระยังมีค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าเซลล์ตรึงรูป

Srichuwong และคณะ (2009) ศึกษากระบวนการหมักโดยระบบ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) ของมันเทศที่มีความเข้มข้นสูงเพื่อใช้ผลิตเอทานอล พบว่ามันเทศถูกบดให้เป็นผงละเอียดประมาณ 304 กรัมต่อลิตรของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ซึ่งมีความหนืดสูง การลดความหนืดทำได้โดยนำผงมันเทศมา pretreatment ด้วยเอนไซม์หลายชนิด เช่น เอนไซม์เพกติเนส เซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส เพื่อทำให้ความหนืดเหมาะสมที่จะนำมาหมักได้ แป้งที่ผ่านการ pretreatment จะถูกเปลี่ยนไปเป็น maltodextrins (liquefaction) โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส จากนั้นทำให้เกิดกระบวนการ simultaneous saccharification and fermentation ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญของยีสต์ โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส คือ 1.65 AGUต่อกรัม ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต คือ 30.2 มิลลิโมลาร์ ระยะเวลาในการหมักนาน 61.5 ชั่วโมง โดยใช้ response surface methodology (RSM) ปริมาณเอทานอลที่ได้ 16.61 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) ซึ่งมีค่าประมาณ 89.7 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตทางทฤษฎี

Amornpitak (2010) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อราที่แยกได้จาก Tan-Koji และ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลต 3Su มีประสิทธิภาพสูงสุด ในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ซึ่งได้น้ำตาลรีดิวซ์เป็น 25.9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง การผลิตเอทานอลโดยอาศัยการทำงานของเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลต 3Su และเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 5088 ใช้กระบวนการหมักแบบ SSF โดยเติมเชื้อยีสต์หลังการหมักด้วยเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเวลาผ่านไป 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าการหมักเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเติมเชื้อยีสต์ให้ปริมาณเอทานอล 14.36 กรัมต่อลิตร

4.4 ผลการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยผงมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระและเซลล์ตรึงรูป

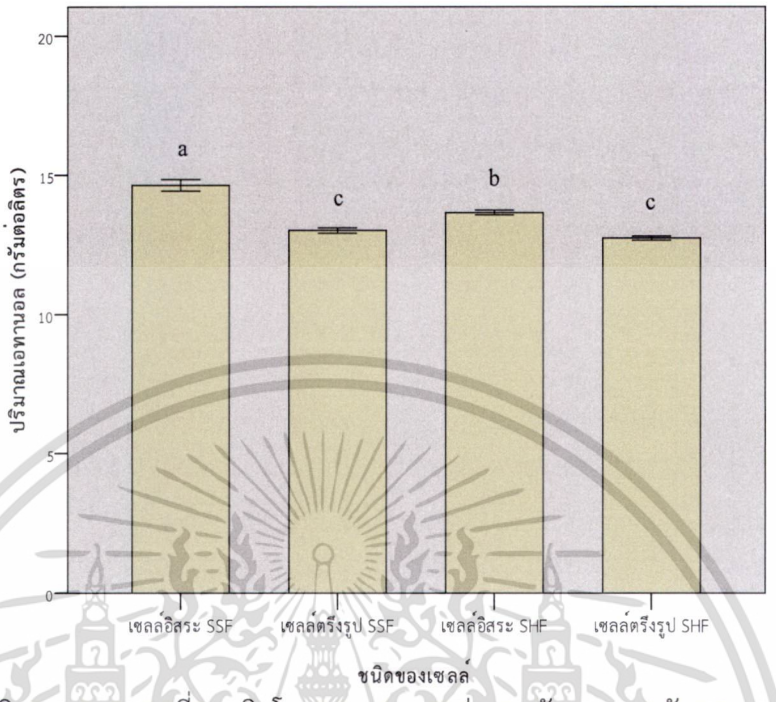
จากการนำปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดของกระบวนการหมักทั้งสองกระบวนการ คือ กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก และกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักมาเปรียบเทียบแล้ววิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าการใช้เซลล์ยีสต์อิสระในกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักจะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 14.64 กรัมต่อลิตร รองลงมาเป็นการใช้เซลล์ยีสต์อิสระในกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก คือ 13.67 กรัมต่อลิตร และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.10) สำหรับปริมาณเอทานอลที่ได้จากการใช้เซลล์ตรึงรูปในกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักจะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 13.02 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงและไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการใช้เซลล์ตรึงรูปในกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก แสดงดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.6 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยผงมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก และกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระและเซลล์ตรึงรูป ที่ 72 ชั่วโมง ของการหมัก

ชนิดของกระบวนการหมัก	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด)
การหมักแบบการย่อยแยกจากการหมัก		
- เซลล์อิสระ	13.67^{b}	0.37^{a}
- เซลล์ตรึงรูป	12.75^{c}	0.27^{b}
การหมักแบบการย่อยพร้อมการหมัก		
- เซลล์อิสระ	14.64^{a}	0.38^{a}
- เซลล์ตรึงรูป	13.02^{c}	0.28^{b}

เมื่อพิจารณาในแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลมีความแตกต่างทางสถิติที่ ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

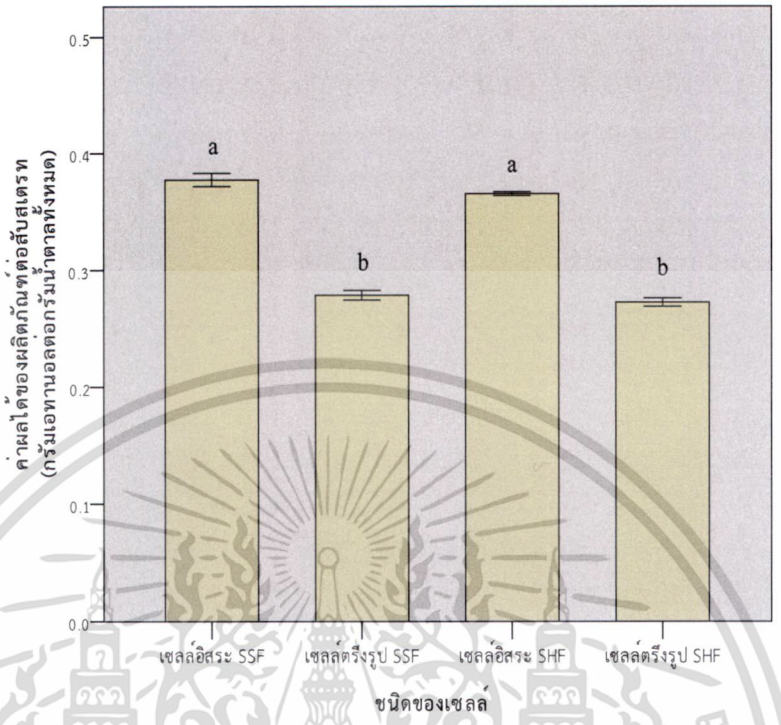
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณเอทานอลที่ถูกผลิตโดยกระบวนการย่อยผงมันเทศแยกกับกระบวนการหมักและกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมักที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017

เมื่อนำค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมดจากกระบวนการหมักทั้งสองกระบวนการโดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระและเซลล์ตรึงรูปมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีความสอดคล้องกับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ นั่นคือ การใช้เซลล์ยีสต์อิสระในกระบวนการหมักแบบการย่อยเกิดขึ้นพร้อมการหมักจะให้ค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมดสูงสุด คือ 0.38 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด รองลงมาเป็นการใช้เซลล์ยีสต์อิสระในกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก คือ 0.37 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.10) สำหรับค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการใช้เซลล์ตรึงรูปในกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักมีค่า 0.28 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงและไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการใช้เซลล์ตรึงรูปในกระบวนการย่อยแยกจากการหมัก แสดงดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด ($Y_{p/s}$) ของกระบวนการย่อยแป้งมันเทศแยกกับกระบวนการหมักและกระบวนการย่อยแป้งมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า การหมักเอทานอลจากสารละลายผงมันเทศโดยใช้กระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระและเซลล์ตรึงรูปจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่ากระบวนการย่อยผงมันเทศแยกจากกระบวนการหมัก ซึ่งมีความสอดคล้องกับค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด เมื่อพิจารณาการใช้เซลล์ยีสต์อิสระและเซลล์ตรึงรูปในการทดลองนี้ พบว่าการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยใช้กระบวนการย่อยแป้งมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระจะให้ปริมาณเอทานอลและค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมดสูงที่สุด

ในการทดลองนี้พบว่าการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่ากระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) ทั้งเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป ซึ่งได้ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Nikolic และคณะ (2009) ที่ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากแป้งข้าวโพดโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (simultaneous saccharification and fermentation : SSF) โดยใช้เซลล์ตรึงรูปของ *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus* พบว่าปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ได้ คือ ร้อยละ 9.42 น้ำหนักโดยน้ำหนัก จะได้หลังจากการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้กระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก แต่เมื่อใช้กระบวนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (separate hydrolysis and fermentation : SHF) จะได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 8.01 น้ำหนักโดยน้ำหนัก ดังนั้นเห็นได้ว่ากระบวนการ SSF มีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจมากกว่า ใช้พลังงานน้อยกว่ากระบวนการ SHF และเมื่อพิจารณาเวลาที่ใช้ในการหมักเอทานอล พบว่ากระบวนการ SSF สามารถลดระยะเวลาในการหมักลงได้ 4 ชั่วโมง (ในขั้นตอนการ saccharification) ซึ่งทำให้ประหยัดพลังงานและ SSF สามารถเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (55 องศาเซลเซียส) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของจิรศักดิ์ (2554) ที่ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) จากใบมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5048, *S. cerevisiae* KM1195, *S. cerevisiae* KM7253 และเชื้อยีสต์ผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR5048 และ *Candida tropicalis* TISTR5045 พบว่ากระบวนการ SSF ใช้ระยะเวลาในการหมักน้อยกว่ากระบวนการ SHF และมีผลผลิตของเอทานอลสูงสุดของกระบวนการ SSF และ SHF เป็น 0.36 และ 0.35 กรัมเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Ohgren และคณะ (2007) ศึกษาการเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) และกระบวนการ Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) โดยใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการแยกด้วยไอน้ำ พบว่ากระบวนการ SSF กับ SHF จะแตกต่างกันการใช้ปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายน้ำร้อยละ 8 จะทำให้การผลิตเอทานอลลดลงในการทดลองนี้มีการใช้เอนไซม์ 10 FPU ต่อกรัมของปริมาณของแข็ง และใช้ความเข้มข้นของเชื้อยีสต์ในกระบวนการ SSF 1 กรัมต่อลิตร ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* เมื่อนำสารละลายทั้งหมดจากการ pretreatment มาใช้ในการทดลองและทำการเจือจางให้ได้ร้อยละ 8 ของปริมาณของแข็ง โดยใช้น้ำ พบว่ากระบวนการ SSF จะให้ผลผลิตของเอทานอลสูงกว่ากระบวนการ SHF ร้อยละ 13 โดยกระบวนการ SSF มีผลผลิตของเอทานอลร้อยละ 72.4 ขณะที่กระบวนการ SHF มีผลผลิตของเอทานอลร้อยละ 59.1 ของทฤษฎี มีสารประกอบบางชนิดที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ pretreatment วัตถุดิบมีผลไปยับยั้งการผลิตเอทานอลในกระบวนการ SSF และ SHF ที่แตกต่างกัน

4.5 ผลการศึกษาการเติมแร่ธาตุและวิตามินในกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระด้วยกระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก (SHF)

จากการนำแป้งมันเทศปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำมาต้มบน hot plate stirrer ที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 85-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำแป้งที่ผ่านการย่อยมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธีฟีนอล ซัลฟูริก จากนั้นนำแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วมาเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ และเติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevesiae* YRK 017 ปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักแบบการย่อยแยกจากการหมัก เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้น จนถึงชั่วโมงที่ 48 ทุกชุดการทดลองจะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด โดยพบว่าชุดการทดลองที่เติมแร่ธาตุเพียงอย่างเดียวให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 14.65 กรัมต่อลิตร ชุดการทดลองที่เติมแร่ธาตุและวิตามินให้ปริมาณเอทานอลรองลงมาคือ 13.90 กรัมต่อลิตร ชุดการทดลองที่เติมวิตามินให้ปริมาณเอทานอล 13.60 กรัมต่อลิตร ขณะที่ชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินให้ปริมาณเอทานอล 13.44 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลงทุกชุดการการทดลอง ขณะที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงเรื่อย ๆ ตลอดระยะเวลาในการหมัก สำหรับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 24-48 ชั่วโมงของการหมัก หลังจากนั้นจะค่อนข้างคงที่หรือลดลงเล็กน้อย แสดงดังตารางที่ 4.7 และรูป 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

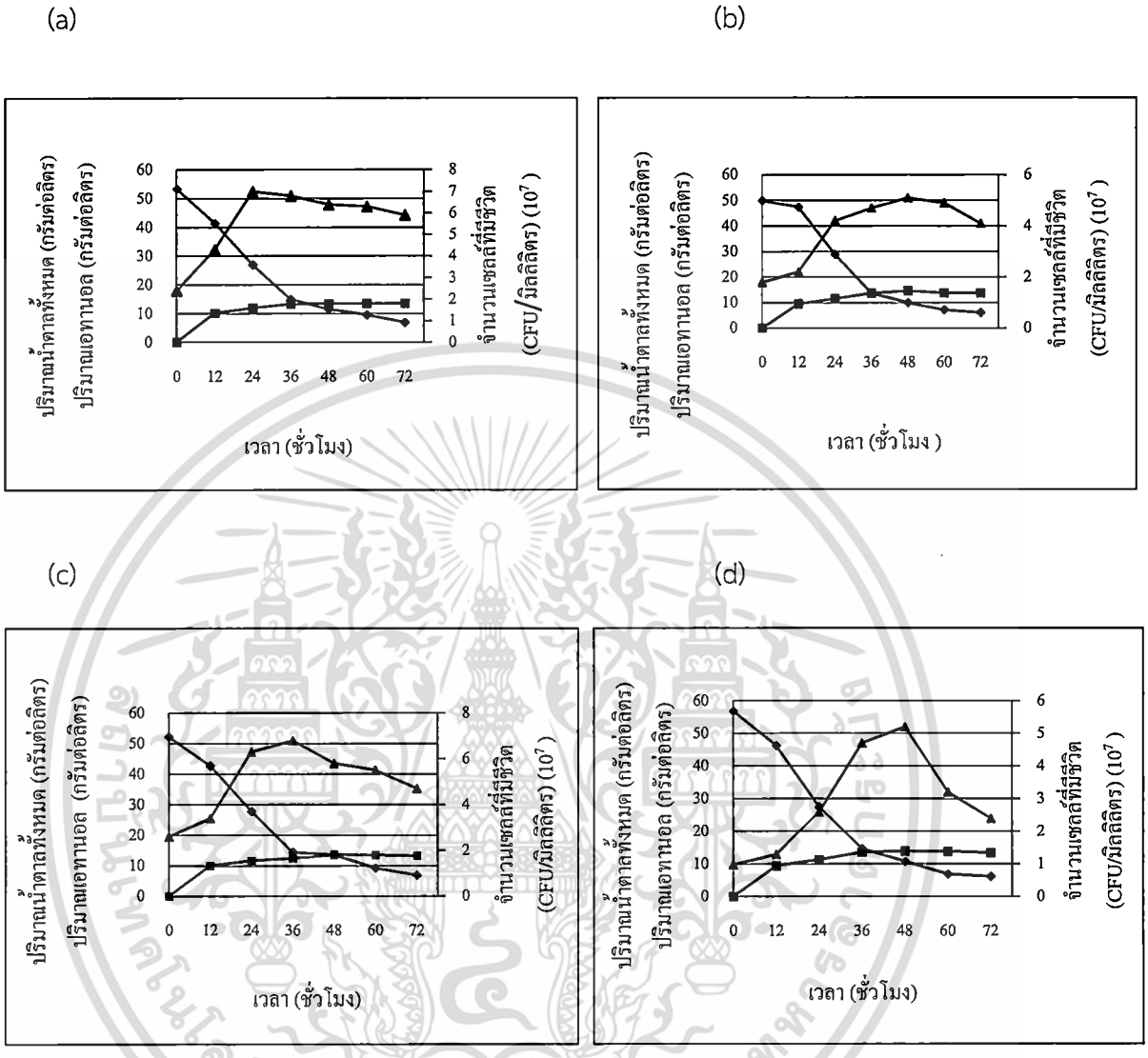
ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแป้งมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์อิสระ											
	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)				ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)				จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต (CFU/มิลลิลิตร)			
	ชุดควบคุม	เติมแร่ธาตุ	เติมวิตามิน	เติมแร่ธาตุและวิตามิน	ชุดควบคุม	เติมแร่ธาตุ	เติมวิตามิน	เติมแร่ธาตุและวิตามิน	ชุดควบคุม	เติมแร่ธาตุ	เติมวิตามิน	เติมแร่ธาตุและวิตามิน
0	0	0	0	0	53.40^{a}	49.90^{a}	52.20^{a}	56.80^{a}	2.40×10^{7}	1.80×10^{7}	2.60×10^{7}	9.80×10^{6}
12	10.18^{c}	9.55^{c}	10.03^{d}	9.47^{e}	41.40^{b}	47.40^{b}	42.70^{b}	46.20^{b}	4.30×10^{7}	2.20×10^{7}	2.20×10^{7}	1.30×10^{7}
24	11.90^{b}	11.57^{b}	11.63^{c}	11.63^{d}	27.00^{c}	28.90^{c}	27.80^{c}	27.50^{c}	7.00×10^{7}	4.20×10^{7}	6.30×10^{7}	2.60×10^{7}
36	13.32^{a}	13.68^{a}	12.93^{b}	13.63^{b}	14.90^{d}	13.80^{d}	14.40^{d}	14.70^{d}	6.80×10^{7}	4.70×10^{7}	6.80×10^{7}	4.70×10^{7}
48	13.44^{a}	14.65^{a}	13.60^{a}	13.90^{a}	11.50^{e}	10.0^{e}	13.60^{d}	10.80^{e}	6.40×10^{7}	5.10×10^{7}	5.80×10^{7}	5.20×10^{7}
60	13.52^{a}	13.82^{a}	13.51^{a}	13.85^{a}	9.50^{e}	7.20^{f}	9.20^{e}	6.90^{ef}	6.30×10^{7}	4.90×10^{7}	5.50×10^{7}	3.20×10^{7}
72	13.59^{a}	13.81^{a}	13.28^{ab}	13.42^{c}	6.90^{f}	6.10^{f}	6.90^{f}	6.20^{f}	5.90×10^{7}	4.10×10^{7}	4.70×10^{7}	2.40×10^{7}

หมายเหตุ เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้งเดียวกัน

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

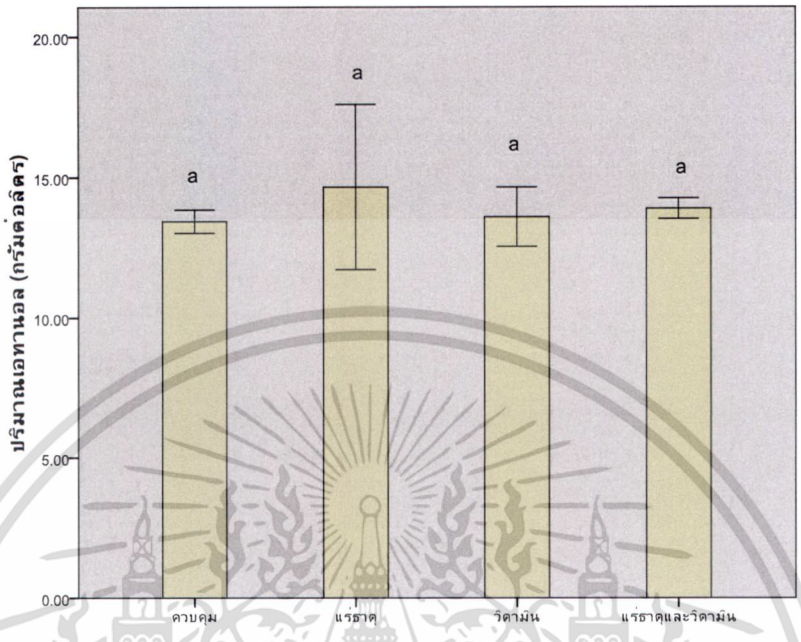
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.7 แสดงการหมักแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โดยกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) ชุดควบคุม (a), เติมแร่ธาตุ (b), เติมวิตามิน (c), เติมแร่ธาตุผสมวิตามิน (d) หมักด้วยเซลล์อิสระของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* YRK 017 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดย ◆ น้ำตาลทั้งหมด, ▲ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต, ■ ความเข้มข้นของเอทานอล

เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ชุดการทดลองที่เติมแร่ธาตุให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดแต่ไม่มีความแตกต่างสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับชุดการทดลองที่เติมวิตามินและชุดทดลองที่เติมแร่ธาตุและวิตามินรวมทั้งชุดควบคุม แสดงดังรูปที่ 4.8 ตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ปริมาณเอทานอลไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของเอทานอลที่ถูกผลิตโดยเชื้อยีสต์อิสระ *S. cerevisiae* YRK 017 ที่ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงด้วย กระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก โดยการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ

4.6 ผลการศึกษาการเติมแร่ธาตุและวิตามินในกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก (SHF)

จากการนำแป้งมันเทศปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำมาต้มบน hot plate stirrer ที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 85-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำแป้งที่ผ่านการย่อยมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธีฟีนอล ซัลฟูริก จากนั้นนำแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วมาเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ และเติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevesiae* YRK 017 ที่ผ่านการตรึงรูป ปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าปริมาณเอทานอลในกระบวนการหมักที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป ชุดการทดลองที่มีการเติมแร่ธาตุเพียงอย่างเดียวให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 13.56 กรัมต่อลิตร ชุดการทดลองที่เติมแร่ธาตุผสมวิตามินให้ปริมาณ เอทานอลรองลงมาคือ 13.54 กรัมต่อลิตร ชุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่เติมวิตามินเพียงอย่างเดียวและชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินให้ปริมาณเอทานอล 13.01 และ 13.49 กรัมต่อลิตรตามลำดับในชั่วโมงที่ 72 สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงเรื่อยๆ ตลอดระยะเวลาการหมัก และจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักของทุกชุดการทดลอง แสดงดังตารางที่ 4.8 และรูป 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

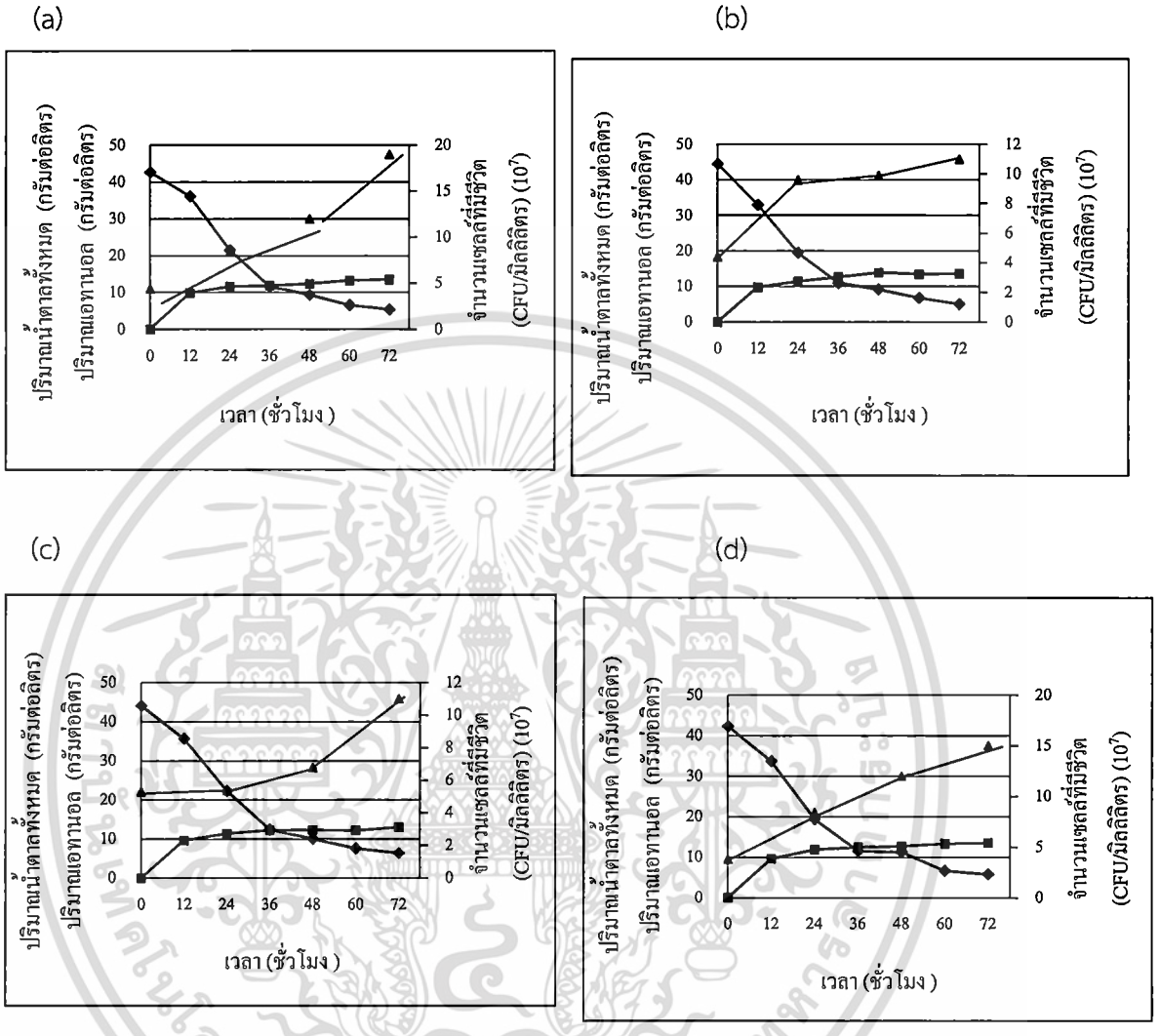
ตารางที่ 4.8 แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแป้งมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ตรึงรูป หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูป											
	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)				ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)				จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต (CFU/มิลลิลิตร)			
	ชุดควบคุม	เติมแร่ธาตุ	เติมวิตามิน	เติมแร่ธาตุและวิตามิน	ชุดควบคุม	เติมแร่ธาตุ	เติมวิตามิน	เติมแร่ธาตุและวิตามิน	ชุดควบคุม	เติมแร่ธาตุ	เติมวิตามิน	เติมแร่ธาตุและวิตามิน
0	0	0	0	0	42.70^{a}	44.50^{a}	44.10^{a}	42.30^{a}	4.40×10^{7}	4.40×10^{7}	5.30×10^{7}	3.80×10^{7}
12	9.89^{c}	9.79^{d}	9.60^{d}	9.60^{d}	36.10^{b}	33.00^{b}	35.70^{b}	33.70^{b}	-	-	-	-
24	11.60^{b}	11.40^{c}	11.37^{c}	11.86^{c}	21.50^{c}	19.50^{c}	22.30^{c}	19.40^{c}	8.40×10^{7}	9.6×10^{7}	5.40×10^{7}	8.40×10^{7}
36	11.89^{ab}	12.59^{b}	12.27^{b}	12.44^{b}	11.60^{d}	11.00^{d}	12.40^{d}	11.60^{d}	-	-	-	-
48	12.34^{ab}	13.45^{a}	12.31^{b}	12.71^{b}	9.40^{e}	9.20^{e}	10.10^{e}	11.30^{d}	1.20×10^{8}	9.90×10^{7}	6.8×10^{7}	1.20×10^{8}
60	12.24^{ab}	$13.45a^{b}$	12.21^{b}	13.38^{a}	6.60^{f}	6.80^{f}	7.60^{f}	6.70^{e}	-	-	-	-
72	13.49^{a}	13.56^{ab}	13.01^{a}	13.54^{a}	5.40^{f}	5.10^{g}	6.40^{f}	5.80^{e}	1.90×10^{8}	1.10×10^{8}	1.10×10^{8}	1.50×10^{8}

หมายเหตุ เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้งเดียวกัน

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

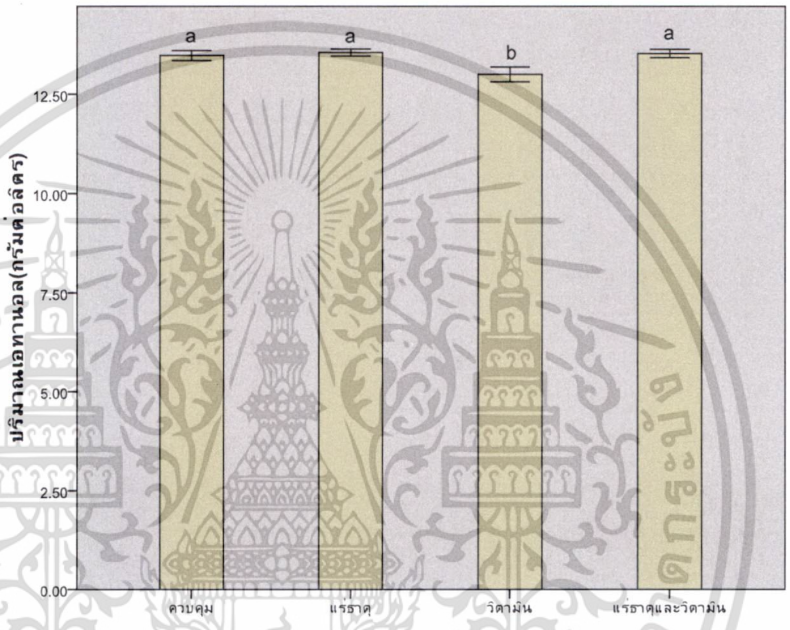
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.9 แสดงการหมักแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โดยกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) ชุดควบคุม (a),เติมแร่ธาตุ (b), เติมวิตามิน (c), เติมแร่ธาตุผสมวิตามิน (d) หมักด้วยเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* YRK 017 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดย ◆ น้ำตาลทั้งหมด, ▲ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต, ■ ความเข้มข้นของเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีปริมาณเอทานอลสูงสุด นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า เมื่อเติมแร่ธาตุให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 13.56 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับการเติมแร่ธาตุผสมวิตามินและชุดควบคุมซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 13.54 และ 13.49 กรัมต่อลิตร แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับการเติมวิตามินเพียงอย่างเดียวซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 13.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.10 เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของเอทานอลที่ถูกผลิตโดยเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* YRK 017 ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมงด้วยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก โดยเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ

จากการทดลองจะพบว่า การหมักเอทานอลโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) ชุดการทดลองที่มีการเติมแร่ธาตุ คือ $ZnSO_4$.$7H_2O$ 0.3 กรัมต่อลิตรและ $MgSO_4$. $7H_2O$ 2.0 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าชุดการทดลองที่เติมวิตามินรวมทั้งชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแร่ธาตุและวิตามิน ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Nikolic และคณะ(2009) ซึ่งได้รายงานว่า จากการหมักเอทานอลโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของ *Saccharomyces cerevesiae* var. *ellipsoideus* และเติมแร่ธาตุบางชนิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แมกนีเซียม ซิงค์ แคลเซียม และคอปเปอร์อิออน รวมทั้งวิตามินชนิดต่างๆ เช่น pantothenate, thiamine, pyridoxine, biotin และ inositol การเติมอาจจะเติมแยกหรือเติมเป็นสารผสมรวมกัน พบว่า การเติมแร่ธาตุทั้งหมดที่นำมาศึกษาโดยการเติมแยกหรือรวมกัน ทำให้ผลผลิตของเอทานอลสูงขึ้นระหว่างการหมัก ซึ่งการใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนผสมของแมกนีเซียมรวมกับสังกะสี โดยใช้ $MgSO_4$ 2 กรัมต่อลิตร และ $ZnSO_4$ 0.3 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้ผลผลิตของเอทานอลสูงสุด การเติมคอปเปอร์อิออน ($CuCl_2$ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) หรือแคลเซียมอิออน ($CaCl_2$ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทำให้ผลผลิตของเอทานอลเพิ่มขึ้น สำหรับวิตามิน พบว่าการใช้ Ca – pantothenate 1 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้ผลผลิตของเอทานอลสูงสุด โดยเพิ่มขึ้น 8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม จากผลการทดลองพบว่าการใช้วิตามินและแร่ธาตุรวมกันทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด โดยใช้ $MgSO_4$ 2 กรัมต่อลิตร $ZnSO_4$ 0.3 กรัมต่อลิตร $CuCl_2$ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร Ca – pantothenate 1 กรัมต่อลิตร และ inositol 1 กรัมต่อลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีแป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยแล้ว การเติมสารเหล่านี้ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการหมัก 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารเหล่านี้

4.7 ผลการศึกษาการเติมแร่ธาตุและวิตามินในกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระด้วยกระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

จากการนำแป้งมันเทศปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำมาต้มบน hot plate stirrer ที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 85-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำแป้งที่ผ่านการย่อยมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล ซัลฟูริก จากนั้นนำแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วมาเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ และเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรพร้อมกับเติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevesiae* YRK 017 โดยเติมเชื้อปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าปริมาณเอทานอลในกระบวนการหมักที่ได้จากกระบวนการย่อยแป้งมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก การเติมแร่ธาตุให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 12.77 กรัมต่อลิตร เติมวิตามินให้ปริมาณเอทานอล 12.40 กรัมต่อลิตร เติมแร่ธาตุผสมวิตามินให้ปริมาณเอทานอล 12.39 กรัมต่อลิตร ขณะที่ชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินให้ปริมาณเอทานอล 12.59 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 72 ขณะที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงเรื่อย ๆ ตลอดระยะเวลาในการหมัก สำหรับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 24-48 ชั่วโมงของการหมัก หลังจากนั้นจะค่อนข้างคงที่หรือลดลงเล็กน้อย แสดงดังตารางที่ 4.9 และรูป 4.11 และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ยีสต์อิสระและเซลล์ตรึงรูป พบว่าการใช้เซลล์ยีสต์อิสระให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Samule และคณะ (2010) ซึ่งพบว่า การผลิตไบโอเอทานอลจากกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อยีสต์อิสระมีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.154 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เปรียบเทียบกับกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงเชื้อยีสต์ ซึ่งมีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.145 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของไบโอเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อยีสต์อิสระมีค่าเท่ากับ 2.19 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าสูงกว่าการผลิตไบโอเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงเชื้อยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

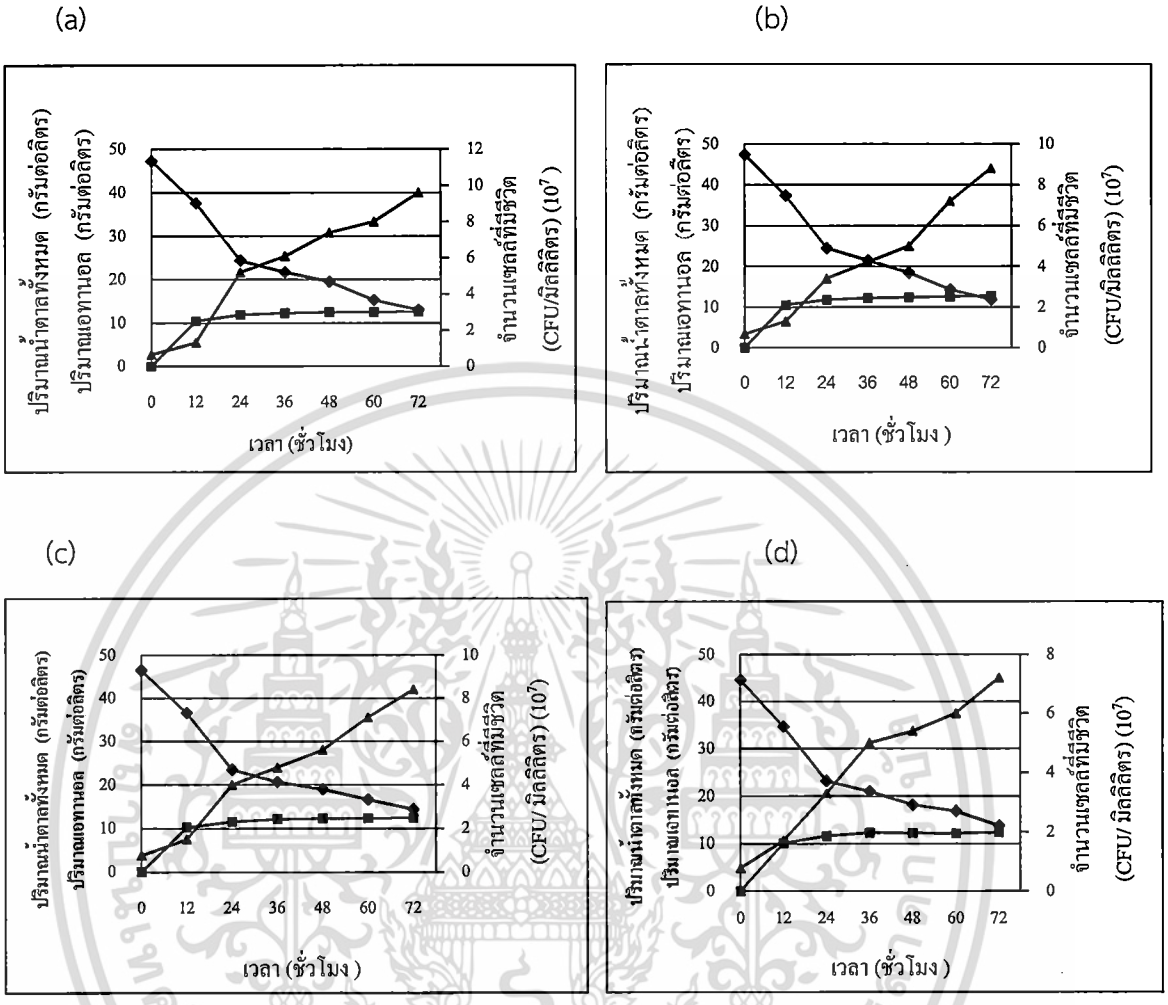
ตารางที่ 4.9 แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแป้งมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์อิสระ											
	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)				ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)				จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต (CFU/มิลลิลิตร)			
	ชุดควบคุม	เติมแร่ธาตุ	เติมวิตามิน	เติมแร่ธาตุและวิตามิน	ชุดควบคุม	เติมแร่ธาตุ	เติมวิตามิน	เติมแร่ธาตุและวิตามิน	ชุดควบคุม	เติมแร่ธาตุ	เติมวิตามิน	เติมแร่ธาตุและวิตามิน
0	0	0	0	0	47.20^{a}	47.40^{a}	46.60^{a}	44.60^{a}	6.40×10^{6}	6.80×10^{6}	7.60×10^{6}	7.80×10^{6}
12	10.40^{d}	10.52^{e}	10.28^{d}	10.10^{d}	37.60^{b}	37.40^{b}	34.70^{b}	34.70^{b}	1.30×10^{7}	1.30×10^{7}	1.50×10^{7}	1.70×10^{7}
24	11.89^{c}	11.80^{d}	11.53^{c}	11.62^{c}	24.40^{c}	24.50^{c}	23.50^{c}	23.20^{c}	5.20×10^{7}	3.40×10^{7}	4.00×10^{7}	3.30×10^{7}
36	12.31^{b}	12.23^{c}	12.14^{b}	12.29^{ab}	21.70^{d}	21.50^{d}	20.70^{cd}	21.00^{d}	6.10×10^{7}	4.20×10^{7}	4.80×10^{7}	5.00×10^{7}
48	12.47^{ab}	12.44^{bc}	12.29^{a}	12.24^{ab}	19.50^{e}	18.50^{e}	19.00^{d}	18.20^{e}	7.40×10^{7}	7.00×10^{7}	5.60×10^{7}	5.40×10^{7}
60	12.51^{ab}	12.61^{ab}	12.35^{a}	12.17^{b}	15.30^{f}	14.30^{f}	16.60^{de}	16.90^{e}	9.00×10^{7}	5.20×10^{7}	7.10×10^{7}	6.00×10^{7}
72	12.59^{a}	12.77^{a}	12.40^{a}	12.39^{a}	13.00^{g}	11.90^{g}	14.40^{e}	13.80^{f}	8.60×10^{7}	4.80×10^{7}	8.40×10^{7}	7.20×10^{7}

หมายเหตุ เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้งเดียวกัน

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

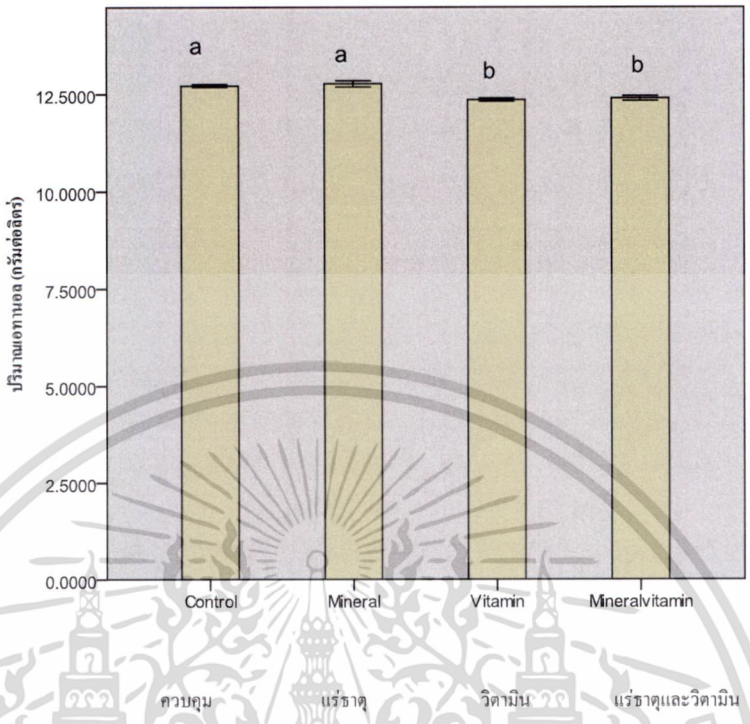
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.11 แสดงการหมักแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก ชุดควบคุม (a),เติมแร่ธาตุ (b), เติมวิตามิน (c), เติมแร่ธาตุผสมวิตามิน (d) หมักด้วยเซลล์อิสระของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* YRK 017 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดย ◆ น้ำตาลทั้งหมด, ▲ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต, ■ ความเข้มข้นของเอทานอล

เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีปริมาณเอทานอลสูงสุด นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า เมื่อเติมแร่ธาตุเพียงอย่างเดียวให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 12.77 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุมแต่มีความแตกต่างทางสถิติกับการเติมวิตามินและแร่ธาตุผสมวิตามินซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 12.40 และ 12.39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 เมื่อทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลมีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของเอทานอลที่ถูกผลิตโดยเซลล์อิสระของ *S. cerevisiae* YRK 017 ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมงของกระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก โดยการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ

4.8 ผลการศึกษาการเติมแร่ธาตุและวิตามินในกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้เซลล์ตรึงรูปด้วยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

จากการนำแป้งมันเทศปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำมาต้มบน hot plate stirrer ที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 85-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำแป้งที่ผ่านการย่อยมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล ซัลฟูริก จากนั้นนำแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วมาเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ และเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรพร้อมกับเติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevesiae* YRK 017 ที่ผ่านการตรึงรูปด้วยโซเดียมอัลจิเนตโดยเติมเชื้อปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จากการทดลอง พบว่าการเติมแร่ธาตุเพียงอย่างเดียวให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 11.86 กรัมต่อลิตร เติมวิตามินและแร่ธาตุผสมวิตามินให้ปริมาณเอทานอล 11.66 และ 11.56 กรัมต่อลิตร ชุดที่ไม่มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินให้ปริมาณเอทานอล 11.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 72 ขณะที่ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตจะเพิ่มขึ้นและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงเรื่อย ๆ ตลอดระยะเวลาในการหมัก ดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแป้งมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

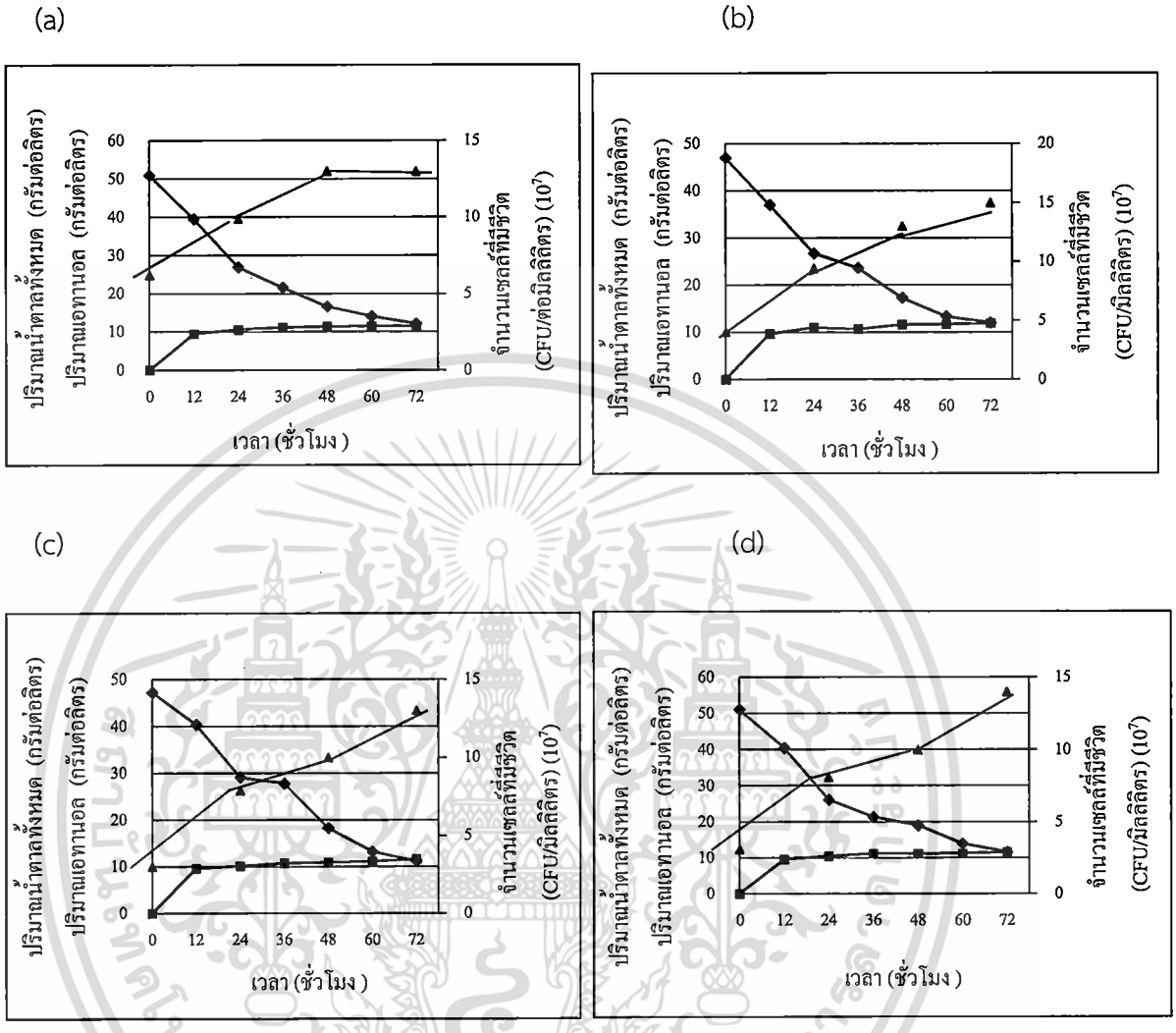
เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูป											
	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)				ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)				จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต (CFU/มิลลิลิตร)			
	ชุดควบคุม	เติมแร่ธาตุ	เติมวิตามิน	เติมแร่ธาตุและวิตามิน	ชุดควบคุม	เติมแร่ธาตุ	เติมวิตามิน	เติมแร่ธาตุและวิตามิน	ชุดควบคุม	เติมแร่ธาตุ	เติมวิตามิน	เติมแร่ธาตุและวิตามิน
0	0	0	0	0	50.90^{a}	47.00^{a}	47.20^{a}	51.10^{a}	6.2×10^{7}	4.00×10^{7}	3.00×10^{7}	3.10×10^{7}
12	9.40^{d}	9.65^{d}	9.59^{e}	9.48^{c}	9.50^{b}	37.00^{b}	40.40^{b}	40.50^{b}	-	-	-	-
24	10.55^{c}	10.93^{bc}	10.12^{d}	10.45^{b}	26.90^{c}	26.70^{c}	29.10^{c}	26.10^{c}	9.9×10^{7}	9.40×10^{7}	7.90×10^{7}	8.10×10^{7}
36	11.16^{b}	10.61^{c}	10.68^{c}	11.12^{a}	12.60^{d}	23.60^{d}	27.80^{d}	21.30^{d}	-	-	-	-
48	11.40^{a}	11.57^{ab}	10.91^{b}	11.12^{a}	16.60^{e}	17.30^{e}	18.30^{e}	19.00^{e}	1.00×10^{8}	1.30×10^{8}	1.00×10^{8}	1.00×10^{8}
60	11.46^{a}	11.66^{a}	11.20^{a}	11.15^{a}	14.00^{f}	13.30^{f}	13.20^{f}	13.90^{f}	-	-	-	-
72	11.53^{a}	11.86^{a}	11.66^{a}	11.56^{a}	12.10^{g}	12.00^{f}	11.20^{g}	11.60^{g}	1.30×10^{8}	1.50×10^{8}	1.30×10^{8}	1.40×10^{8}

หมายเหตุ เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้งเดียวกัน

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

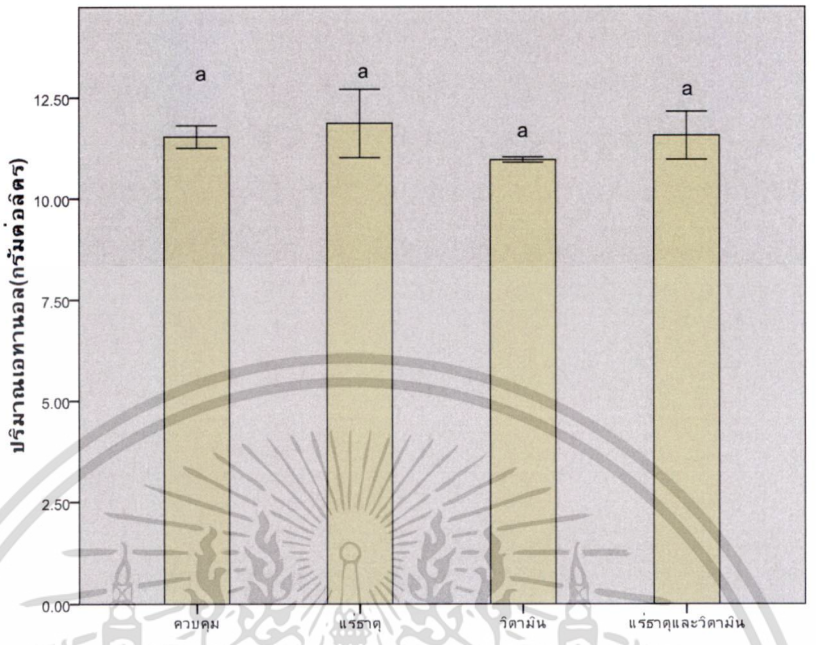
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 แสดงการหมักแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก ชุดควบคุม (a),เติมแร่ธาตุ (b), เติมวิตามิน (c), เติมแร่ธาตุผสมวิตามิน (d) หมักด้วยเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* YRK 017 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดย ◆ น้ำตาลทั้งหมด, ▲ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต, ■ ความเข้มข้นของเอทานอล

เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีปริมาณเอทานอลสูงสุด นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าชุดที่เติมแร่ธาตุเพียงอย่างเดียวให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 11.86 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุมและชุดที่เติมแร่ธาตุผสมวิตามินซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 11.53 และ 11.56 กรัมต่อลิตร รวมถึงชุดที่มีการเติมวิตามินเพียงอย่างเดียวซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 11.66 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

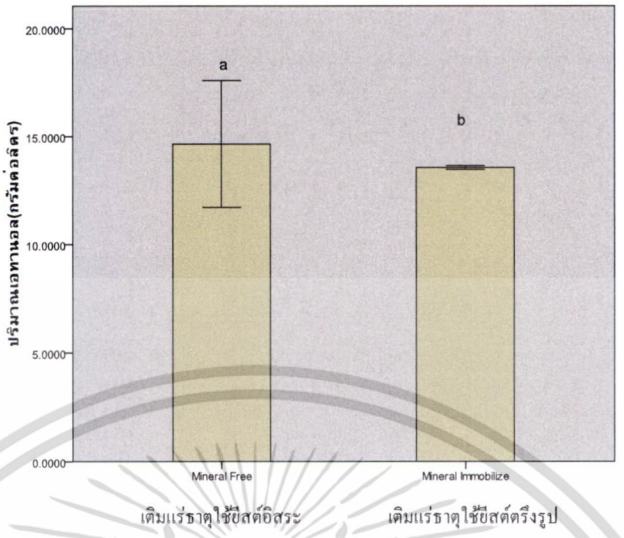


รูปที่ 4.14 เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของเอทานอลที่ถูกผลิตโดยเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* YRK 017 ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมงของกระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก โดยการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ

4.9 ผลการเปรียบเทียบกระบวนการหมักแบบการย่อยแยกจากการหมัก(SHF) โดยการใช้เซลล์ยีสต์อิสระและเซลล์ยีสต์ตรึงรูป

จากกระบวนการหมักแป้งมันเทศแบบย่อยแยกจากการหมัก เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลสูงสุดในระยะการหมัก 48-72 ชั่วโมง ชุดที่มีการเติมแร่ธาตุให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อ *Saccharomyces cerevesiae* YRK 017 เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ได้จากชุดการทดลองที่มีการเติมแร่ธาตุโดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าชุดการทดลองที่มีการเติมแร่ธาตุโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป และมีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แสดงดังรูปที่ 4.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

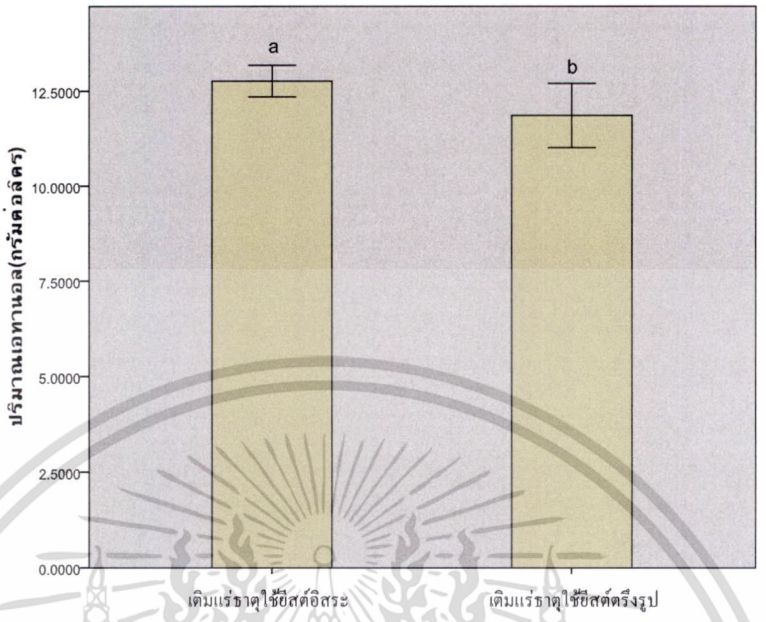


รูปที่ 4.15 เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกจากการหมักที่มีการเติมแร่ธาตุ โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* YRK 017

4.10 ผลการเปรียบเทียบกระบวนการหมักแบบการย่อยเกิดขึ้นพร้อมการหมัก(SSF)โดยการใช้เซลล์ยีสต์อิสระและเซลล์ยีสต์ตรึงรูป

จากกระบวนการหมักแป้งมันเทศแบบการย่อยเกิดขึ้นพร้อมการหมัก นำปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักจากชุดการทดลองที่เติมแร่ธาตุซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดโดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระและเซลล์ยีสต์ตรึงรูปมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปริมาณเอทานอลที่ได้จากชุดการทดลองที่มีการเติมแร่ธาตุโดยใช้เซลล์อิสระจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าชุดการทดลองที่ใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป และมีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณเอทานอลไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แสดงดังรูปที่ 4.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยเกิดขึ้นพร้อมการหมัก ที่มีการเติมแร่ธาตุโดยใช้เซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* YRK 017

จากการทดลองพบว่าการหมักเอทานอลโดยกระบวนการหมักแบบการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยเกิดขึ้นพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ชุดการทดลองที่มีการเติมแร่ธาตุ คือ $ZnSO_4$.$7H_2O$ 0.3 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$. $7H_2O$ 2.0 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าชุดการทดลองที่เติมวิตามิน รวมทั้งชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแร่ธาตุและวิตามิน ทั้งนี้เนื่องมาจาก แมกนีเซียมมีผลต่อกิจกรรมของเซลล์ยีสต์ เช่น การเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ การแบ่งเซลล์ และกิจกรรมของเอนไซม์ และยังมีความสำคัญในการป้องกันเซลล์ยีสต์จากความเป็นพิษของเอทานอล สังกะสีเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อกิจกรรมของเอนไซม์หลายๆ ชนิด เช่น alcohol dehydrogenase, aldolase, alkaline phosphatase, DNA และRNA polymerase (Nikolic, 2009) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้เซลล์ยีสต์อิสระและเซลล์ตรึงรูปจากกระบวนการหมักทั้งสองแบบ พบว่าการใช้เซลล์ยีสต์อิสระให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป อาจเนื่องมาจากในการตรึงเซลล์ยีสต์โดยใช้โซเดียมอัลจิเนต สภาวะในการตรึงเซลล์ไม่เหมาะสม ส่งผลให้เซลล์ยีสต์อยู่ลึกเข้าไปในวัสดุห่อหุ้ม ทำให้การส่งผ่านของสารอาหารภายในเซลล์ตรึงทำได้ยาก (Prasad และ Mishra, 1995) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF และ SHF โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระและเซลล์ยีสต์ตรึงรูป พบว่ากระบวนการหมักแบบ SHF ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่ากระบวนการหมักแบบ SSF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลจากผงมันเทศแห้งโดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและอะไมโลกลูโคซิเดส โดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้า ศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลโดยใช้กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 ทำการหมักเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้กระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมักโดยเซลล์อิสระจะให้ผลผลิตของเอทานอลสูงสุด คือ 14.64 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมดเป็น 0.38 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด กระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมักสามารถลดระยะเวลาในการหมักลงได้ 4 ชั่วโมง (ในขั้นตอนการ saccharification) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมักยังเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นการช่วยลดการใช้พลังงานในกระบวนการย่อยได้

จากการศึกษาผลของแร่ธาตุและวิตามินต่อการผลิตเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยแร่ธาตุที่ใช้ศึกษามีดังนี้ $ZnSO_4$.$7H_2O$ และ $MgSO_4$. $7H_2O$ วิตามินที่ใช้ศึกษามีดังนี้ Ca-pantothenate และ myo-inositol มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินแยกกันและมีการเติมผสมกัน ใช้กระบวนการหมักแบบย่อยแยกกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยเกิดขึ้นพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระและเซลล์ยีสต์ตรึงรูป จากการทดลองพบว่า การหมักเอทานอลโดยกระบวนการย่อยแยกจากการหมัก (SHF) ชุดการทดลองที่มีการเติมแร่ธาตุ (คือเติม $ZnSO_4$.$7H_2O$ 0.3 กรัมต่อลิตรและ $MgSO_4$. $7H_2O$ 2.0 กรัมต่อลิตร) และใช้เซลล์ยีสต์อิสระหมักจะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 14.65 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 หลังจากปริมาณเอทานอลลดลง สำหรับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นค่อนข้างคงที่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะค่อยๆ ลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก การหมักเอทานอลโดยกระบวนการย่อยเกิดขึ้นพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) ชุดการทดลองที่มีการเติมแร่ธาตุและใช้เซลล์ยีสต์อิสระจะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 12.77 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะค่อยๆ ลดลง ตลอดระยะเวลาการหมัก จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตจะเพิ่มขึ้นในช่วง 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเพิ่มขึ้นในอัตราที่ช้าลง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการหมักแบบ SHF และ SSF โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป พบว่ากระบวนการหมักแบบ SHF ให้ปริมาณ เอทานอลนอลสูงกว่ากระบวนการหมักแบบ SSF และการใช้เซลล์ยีสต์อิสระจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร. 2554. การศึกษาการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการย่อยสลายน้ำตาลแยกจากการหมักและการย่อยให้เป็นน้ำตาลพร้อมการหมักจากใบมันสำปะหลัง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49. หน้า 314-321.

ชลดา ชื่อสัตย์. 2546. การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ.

ปนิดา กิตติรัตน์หมาย. 2546. การปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ตกตะกอนและเทคนิครีพีทเฟดแบทช์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ.

วราวุฒิ ครูส่ง และ กรวิกา ศรีวงษ์. 2539. เทคโนโลยีชีวภาพ. ภาควิชาอุตสาหกรรมการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า 117-141.

วิมลักษณ์ รัตนปรีดากุล. 2549. การศึกษาเชื้อราและเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าเปรียบเทียบกับเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตสาโท. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพ ฯ.

Abedinifara, S., Karimia, K., Khanahmadic, M and Taherzadeh, M.J. 2009. Ethanol Production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from Rice Straw by Separate Hydrolysis and Fermentation. biomass and bioenergy. 33, 828-833.

Anuchit, R., Savitree, L., Muenduen, P. 2011. Ethanol Production by Repeated Batch and Continuous Fermentations of Blackstrap Molasses Using Immobilized Yeast Cells on Thin-shell Silk Cocoons. Faculty of Engineering.

Amonpitak, T.Y. 2010. Ethanol Production from Cassava starch by Selected Fungi from Tan-Koji and *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology. 9(1), 84-88.

AOAC. 1995. Official Method of Analysis of AOAC International 16th Edition. (ED) Patricia cunniff. AOAC International. Arlington.

Bellaver, L.H., Carvalho, N.M.B., Abrahao-Neto J and Gombert, A.K. 2004. Ethanol Formation and Enzyme Activities Around Glucose-6-Phosphate in Kluyveromyces marxianus CBS 6556 Exposed to Glucose or Lactose Excess. FEMS Yeast Research. 4, 691-698.

Brown, S.W., Oliver, S.G., Harrison, D.E.F and Righelato, R.C. 1981. Apply Microbiology Biotechnology. 11, 151.

D' Amore, T., Panchal, C.J., Russell, I and Stewart, G.G. 1988. Osmotic Pressure Effects and Intracellular Accumulation of Ethanol in Yeast during Fermentation. Industry Microbiology. 2, 365.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dubois, M., Gilles, K.A and Smith, J. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. 32, 333-337.

Farrell, E.A., Bustare, M., Gough, S., McMullan, G., Singh, P., Singh, D and McHale, A.P. 1998. Ethanol Production at 45°C by *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during Growth on Molasses Pre-treated with Amberlite and Non-living biomass. Bioprocess Engineering. 19, 217-219.

Jamai, A.J., Ettayebi, K., Yamani, J., Ettayebi, M. 2007. Production of Ethanol from Starch by Free and Immobilized *Candida tropicalis* in the Presence of α-amylase. Bioresource Technology. 98, 2765-2770.

Jekel, M. 2005. Gas Chromatography Determination of Ethanol in Wine by Head-Space Gas Chromatography. Department of Agro-Industry. Faculty of Food and Agricultural Technology. Pibulsongkram Rajabhat University.

Martin, C., Galbe, M., Wahlbom, C.F., Hahn-Hagerdal B and Jonsson, L.J. 2002. Ethanol Production from Enzymatic Hydrolysates of Sugar-cane Bagasse using Recombinant Xylose-Utilising *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology. 31, 274-282.

Najafpour, G.D. 1990. Immobilization of Microbial cells for the Production of Organic Acids. J. Sci. I. R. Iran 1, 172–176

Najafpour, G.D. 2004. Ethaol Fermentation in an Immobilized Cell Reactor Using *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology. 92, 251-260.

Nikolic, S., Mojovic, L., Rakin, M. and Pejin, D. 2009. Bioethanol Production from Corn Meal by Simultaneous Enzymatic Saccharification and Fermentation with Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae var ellipsoideus*. Fuel.

Ohgren, K., Bura, R., Lesnicki, G., Saddler, J and Zacchi, G. 2007. A Comparison between Simultaneouns Saccharification and Fermentation and Separate Hydrolysis and Fermentation Using Steam-Pretreated Corn Stover. Process Biochemistry. 42, 834-839.

Peng, L and Chen, Y. 2011. Conversion of Paper Sludge to Ethanol by Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) Using *Saccharomyces cerevisiae*. biomass and bioenergy. 35, 1600-1606.

Prasad, R and Mishra, P. 1990. An Overview of Lipids of *Candida albicans*. Progress in Lipid Research. 29, 65-85.

Ronghou, L., Jinxia, L., Fei, S. 2008. Refining Bioethanol from Stalk Juice of Sweet Sorghum by Immobilized Yeast Fermentation. Biomass Energy Engineering Research Centre. 33, 1130-1135.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Savitree, L., Chutima, S and Wichien, Y. 2006. Fuel Ethanol Production from Sugar-cane Juice by Thermotolerant Yeast. Bioresource Technology. 96(17), 3367-3374.

Shena, Y., Guob, J.S., Chenb, Y.P., Zhanga, H.D., Zhenga, X.X., Zhanga, X.M and Baic, F.W. Application of Low-Cost Algal Nitrogen Source Feeding in Fuel Ethanol Production Using High Gravity Sweet Potato Medium. Journal of Biotechnology.

Srichuwonga, S., Fujiwara, M., Wanga, X., Seyama, T., Shiroma, R., Arakanea, M., Mukojimab, N., Tokuyasua, K. 2009. Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Very High Gravity (VHG) Potato Mash for the Production of Ethanol. Biomass and Bioenergy. 33, 890-898.

Sridhar, M., Sree, N.K and Rao, L.V. 2002. Effect of UV Radiation on Thermotolerance, Ethanol Tolerance and Osmotolerance *Sacchromyces cerevisiae* VS1 and VS3 Strains. Bioresource Technology. 83, 199-202.

Svetlana, N., Ljiljana, M., Marica, R., Dusanka, P. 2009. Bioethanol Production from Corn Meal by Simultaneous Enzymatic Saccharification and Fermentation with Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Faculty of Teahnology.88, 1602-1607.

Torija, M.J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamon, J.M and Mas, A. 2003. Effect of Fermentation Temperature on the Strain Population of *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology. 80, 47-53

Yu, B., Zhagn, F., Zheng, Y and Wang, P. 1994. Alcohol Fermentation for the Mash of Dried Sweet Potato with its Dregs Using Immobilized Yeast. Process Biochemistry. 3(1), 1-6.

Williams, D. and Munnecke, DM. 1981. The Production of Ethanol by Immobilized Yeast Cells. Biotechnol Bioeng. 23, 1813-1825.

Zhang, L., Zhao, H., Gan. M., Jin, Y., Gao, X., Chen, Q., Guan, J and Wang, Z. 2011. Application of Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) from Viscosity Reducing of Raw Sweet Potato for Bioethanol Production at Laboratory, Pilot and Industrial Scales. Bioresource Technology. 102, 4573-4579.

[Online]. Available : www1.mod.go.th/opsd/dedweb/energy/about/meaning%20and%20type/ethanol.htm (04 กันยายน 2554)

[Online].Available: www.th.answers.yahoo.com/question/index?qid=20090529001147AAEh4aG (04 กันยายน 2554)

[Online].Available : www.pikul.lib.ku.ac.th/Fulltext_SUGAR/SUG021009/SUG021009c.pdf (08 สิงหาคม 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online].Available : www.neutron.rmutphysics.com/physicsboard/forum/index.php?topic=866.0 (08 สิงหาคม 2554)

[Online].Available : www. lab.excise.go.th/group3/beverage/bev_carbo.htm (08 สิงหาคม 2554)

[Online].Available : www. kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/2406/2/296500_app.pdf (08 สิงหาคม 2554)

[Online]. Available : www.water-pacific.com/index.php/2010-08-14-10-07-37 (09 ตุลาคม 2554)

[Online]. Available : www.jobpub.com/articles/showarticle.asp?id=793 (09 กันยายน 2554)

[Online].Available : www.themedicalbiochemistrypage.org/glycolysis.html# (10 กันยายน 2554)

[Online].Available : www.biosiva.50webs.org/micromet.htm (10 กันยายน 2554)

[Online].Available : www.scielo.br/img/revistas/bjm/v41n1/a14fig07.jpg (11 กันยายน 2554)

[Online].Available : www.andaluciainvestiga.com/espanol/noticias/4/9647.asp (11 กันยายน 2554)

[Online]. Available : www.sugarzone.in.th/ethanol/ethnol_mills.htm (11 กันยายน 2554)

[Online]. Available : www.en.wikipedia.org/wiki/Ethanol (11 กันยายน 2554)

[Online]. Available : www.en.wikipedia.org/wiki/Ethanol_fuel_in_Brazil (11 กันยายน 2554)

[Online]. Available : www.dede.go.th/dede/index.php?id=172 (11 กันยายน 2554)

[Online]. Available : www.bangchak.co.th/th/energyDetail.asp?id=17 (11 กันยายน 2554)

[Online]. Available : www.vcharkarn.com/varticle/16376 (11 กันยายน 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ YM Broth

ประกอบด้วย

- กลูโคส 10 กรัม
- เปปโตน 5 กรัม
- ยีสต์สกัด 3 กรัม
- มอลท์สกัด 3 กรัม

วิธีการเตรียม

1. ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
2. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 121 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ YM Agar

ประกอบด้วย

- กลูโคส 10 กรัม
- เปปโตน 5 กรัม
- ยีสต์สกัด 3 กรัม
- มอลท์สกัด 3 กรัม
- วุ้น 15 กรัม

วิธีการเตรียม

1. ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
2. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 121 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและเอทานอล

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (Dubois, 1956)

สารเคมี

1. ฟีนอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์
   1.1 ชั่งฟีนอล 5 กรัม
   1.2 ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตร
2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
   2.1 ชั่งกลูโคส 0.01 กรัม
   2.2 ละลายด้วยน้ำกลั่น
   2.3 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
3. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 96 เปอร์เซ็นต์

วิธีการวิเคราะห์

1. การทำกราฟมาตรฐาน

1.1 นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

1.3 เติม 5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายฟีนอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.4 เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.5 ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

1.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

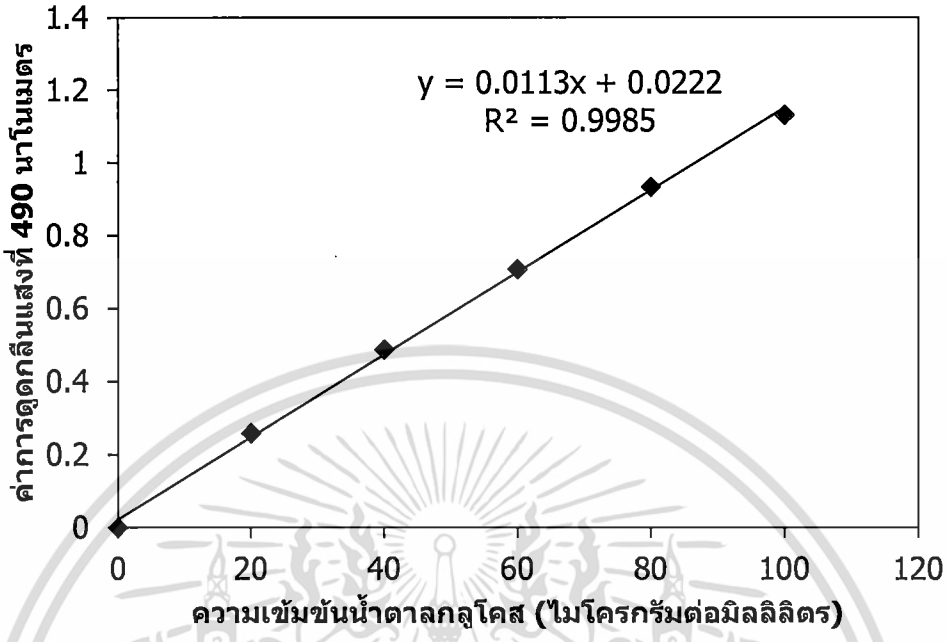
2. หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่าง

2.1 นำตัวอย่างมาทำการเจือจางที่เหมาะสม

2.2 ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐาน

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น } 490 \text{ นาโนเมตร}) \mathbf{x} (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}) \mathbf{x} 1000}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกลูโคสวัดโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

2. วิธีการวิเคราะห์เอทานอลโดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Jekel, 2005)

1. วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของเอทานอล

1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานภายในโดยใช้โพรพานอล (n-propanol) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard)

1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลให้มีความเข้มข้นร้อยละ 4 6 8 10 และ 12 โดยปริมาตร โดยมีวิธีทำดังแผนภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A : 10% v/v n-propanol, 10 ml	B1 : 8% v/v ethanol, 10 ml
	B2 : 12% v/v ethanol, 10 ml
	B3 : 16% v/v ethanol, 10 ml
	B4 : 20% v/v ethanol, 10 ml
	B5 : 24% v/v ethanol, 10 ml

+ ~ 0.5 g NaCl	+ ~ 0.5 g NaCl	+ ~ 0.5 g NaCl	+ ~ 0.5 g NaCl	+ ~ 0.5 g NaCl
+ 500 µl A	+ 500 µl A	+ 500 µl A	+ 500 µl A	+ 500 µl A
+ 500 µl B1	+ 500 µl B2	+ 500 µl B3	+ 500 µl B4	+ 500 µl B5
สารละลายมาตรฐานร้อยละ 4	สารละลายมาตรฐานร้อยละ 6	สารละลายมาตรฐานร้อยละ 8	สารละลายมาตรฐานร้อยละ 10	สารละลายมาตรฐานร้อยละ 12

รูปที่ ข-2 แผนภาพแสดงวิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล

1.3 ใส่สารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นในขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร วางเซปตัม (septum) ที่ปากขวดโดยคว่ำด้านเทฟลอน (Teflon) ลงติดปากขวด จากนั้นจึงปิดด้วยฝาอะลูมิเนียม

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลใช้เทคนิคเฮดสเปซ-แก๊สโครมาโตกราฟี (HS-GC) โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-17A Chromatograph, Shimadzu) ต่อกับเครื่อง HSS-4A (Shimadzu) ซึ่งเป็นส่วนที่ตัวอย่างจะถูกบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สารตัวอย่างในขวดแก้วจะระเหยกลายเป็นไอจนกระทั่งอยู่ในสมดุลไดนามิก จากนั้นเครื่องจะดูดไอปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเข้าสู่คอลัมน์ต่อไป

1.5 ใช้คอลัมน์ DB-WAX (Agilent J&W GC Column) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.53 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 1 ไมครอน อุณหภูมิของคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ใช้ตัวตรวจวัด (detecter) ชนิด FID โดยปรับอุณหภูมิเท่ากับ 150 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของตำแหน่งฉีดสาร (injector) เท่ากับ 150 องศาเซลเซียส ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นพาหะโดยมีความดันคอลัมน์เท่ากับ 30 kPa

1.6 สภาวะในการวิเคราะห์เริ่มจากอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 15 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 180 องศาเซลเซียส คงไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 4 นาที รวมเวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมดเท่ากับ 25 นาทีต่อตัวอย่าง โครมาโตแกรมจะแสดงเวลาที่เอทานอลและโพรพานอลถูกชะออกจากคอลัมน์

1.7 นำพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลต่อโพรพานอลในแต่ละความเข้มข้นกำหนดให้เป็นแกน y และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเอทานอลเป็นแกน x

2. วิธีการวิเคราะห์เอทานอลในตัวอย่าง

2.1 วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในตัวอย่าง โดยผสม NaCl 0.5 กรัม สารละลายโพรพานอลร้อยละ 10 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร

2.2 วิเคราะห์ดังสภาวะข้างต้นจากนั้นนำค่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลในสารตัวอย่างต่อโพรพานอล มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของเอทานอล

สูตรคำนวณปริมาณเอทานอล

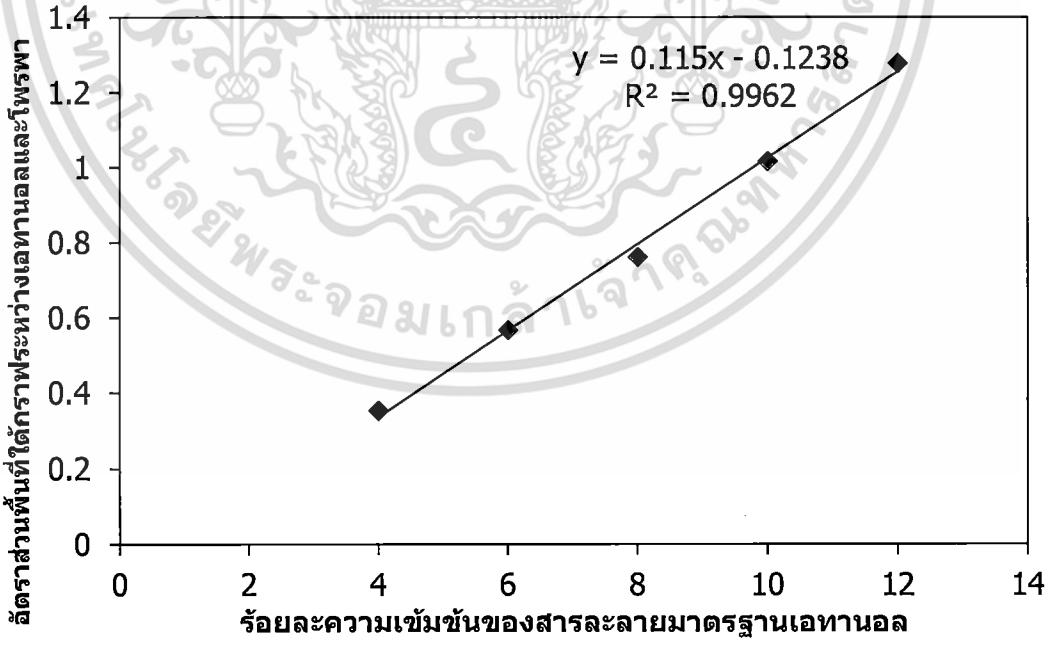
สมการ $y = 0.115x-0.1238$

ให้ y = ค่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟเอทานอลต่อโพรพานอล

x = ความเข้มข้นของเอทานอล (เปอร์เซ็นต์)

โดย ความหนาแน่นของเอทานอล = 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ปริมาณเอทานอล = (x)(0.789)(10) กรัมต่อลิตร



รูปที่ ข-3 กราฟมาตรฐานเอทานอลวัดโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ส่วนประกอบของแป้งมันเทศ

1. การวิเคราะห์ความชื้น (Moisture) (AOAC, 1995)

การวิเคราะห์หาความชื้น เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ต้องทำในห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีอื่น ๆ ค่าที่รายงานบนพื้นฐานร้อยละวัตถุแห้ง (% dry matter basis , DM) ปริมาณความชื้นที่มีอยู่ในอาหารสัตว์หรือวัตถุดิบอาหารสัตว์มีความสำคัญมากเพราะตัวอย่างที่มีความชื้นสูงก็มีโอกาสที่จะเสียหรือเป็นเชื้อราจะเกิดได้ง่าย นอกจากนั้นยังใช้ค่าความชื้นไปคำนวณปริมาณการให้อาหารสัตว์ในการประกอบสูตรอาหารสัตว์ วิธีการวิเคราะห์หาความชื้น ที่นิยมกันมากคือ การนำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง หรือ 135 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง น้ำจะระเหยกลายเป็นไอออกจากอาหารสัตว์ ส่วนที่ เหลือ เรียกว่าวัตถุแห้ง (dry matter)

1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. ถ้วยอบตัวอย่างพร้อมฝาปิด (weighing bottle) ที่ทำด้วยโลหะไม่เป็นสนิมหรือ แก้วพร้อมมีฝาปิดสนิท ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ≥ 50 มิลลิเมตร ลึก ≤ 40 มิลลิเมตร
3. ตู้อบ ชนิด Forced-air drying oven
4. โถดูดความชื้น หรือ ตู้ดูดความชื้น (desicator)

1.2 วิธีการ

1. นำถ้วยอบตัวอย่างพร้อมฝา ที่ล้างสะอาดและแห้งอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 135 ^{0}C นาน 2ชั่วโมง น้ำออกใส่ในโถดูดความชื้นและทิ้งให้เย็น ไม่เกิน 2 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่ง บันทึกน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างอาหารที่บดละเอียดขนาด 1 มิลลิเมตร ประมาณ 2 กรัม ใส่ลงในถ้วยอบ บันทึกน้ำหนัก ปิดฝาถ้วย แล้วเขย่าเล็กน้อยให้ตัวอย่างกระจายเต็มพื้นที่สม่ำเสมอ นำไปอบที่อุณหภูมิ 135 ^{0}C นาน 2 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักคงที่ โดยให้มีระยะห่าง 1 ถ้วย ต่อความจุของตู้ 1 ลิตร ขณะที่อบต้องเปิดฝาถ้วย
3. เมื่อครบกำหนดเวลา นำถ้วยอบออกใส่ในโถดูดความชื้นและปิดฝาถ้วย แล้วปล่อยให้เย็น ไม่เกิน 2 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก

1.3 การคำนวณ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(W1 - W2) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

% วัตถุแห้ง (Dry matter, DM) = 100 - (% ความชื้น)

W1 คือ น้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

W2 คือ น้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

1.4 ขอบเขต

วิธีการนี้ใช้สำหรับวิเคราะห์หาความชื้น ในพืชอาหารสัตว์ อาหารสัตว์ และวัตถุดิบอาหารสัตว์ยกเว้น ตัวอย่างที่มีสารประกอบกรดไขมันระเหยได้ (Volatile Fatty acid) ตัวอย่างที่มีน้ำตาล, Urea สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า (Ash)

เถ้า (Ash) คือ ส่วนของสารอนินทรีย์ (inorganic) ในอาหารสัตว์ ซึ่งได้แก่ แร่ธาตุต่าง ๆ เมื่อนำตัวอย่างไปเผาที่อุณหภูมิ 550-600 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ส่วนที่เป็นสารอินทรีย์จะถูกเผาไหม้หมดไป เหลืออยู่ แต่ส่วนของสารอนินทรีย์ ค่าของเถ้าที่หาได้สามารถบอกถึงคุณภาพของอาหารสัตว์ ถ้าค่าของเถ้าสูงมากกว่าปกติอาจมีการปลอมปนของทราย เป็นต้น

2.1 อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. เตาไฟฟ้า
3. เตาเผา (muffle furnace)
4. ถ้วยสำหรับเผาเถ้า (porcelain dish)
5. โถดูดความชื้น (desicator)

2.2 วิธีการ

1. นำถ้วยเปล่าอบที่อุณหภูมิ 100 ^{0}C นาน 1 ชั่วโมง เอาออกใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนัก

2. ชั่งตัวอย่างใส่ลงในถ้วยที่ทราบน้ำหนักแล้วประมาณ 2 กรัม นำไปทำการเผาบนเตาไฟฟ้า จนหมดควัน

3. นำตัวอย่างที่เผาไล่ควัน แล้วไปเผาต่อในเตาเผา (Muffer furnace) อุณหภูมิ 600 ^{0}C นาน 2 ชั่วโมง แล้วปิดสวิทช์เตาเผา เปิดฝาเตาออกรอจนอุณหภูมิภายในเตาลดเหลือประมาณ 100 ^{0}C เพื่อป้องกันมิให้ถ้วยสัมผัสอากาศเย็นกะทันหัน ซึ่งอาจทำให้ถ้วยแตกได้

4. นำถ้วยออกมาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

2.3 การคำนวณ

$$\% \text{ เถ้า} = \frac{(W2 - W1) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

W1 คือ น้ำหนักถ้วย

W2 คือ น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างหลังการเผา

ส่วนปริมาณอินทรีย์วัตถุ (Organic matter, OM) คำนวณได้จากผลต่างระหว่างน้ำหนักตัวอย่างกับน้ำหนักเถ้า ดังนี้ %OM = 100 - (% ความชื้น) - (% เถ้า)

3. การวิเคราะห์หาโปรตีน (Crude protein, CP)

โปรตีนประกอบด้วย กรดอะมิโนหลายชนิด และกรดอะมิโนนี้มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ ดังนั้น การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจึงวิเคราะห์ในรูปของปริมาณไนโตรเจน โดยวิธี Kjeldahl แล้วคำนวณกลับเป็นปริมาณโปรตีน โดยตัวอย่างอาหารจะถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4 conc.) ในสภาพที่มีความร้อน และตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) จนสารละลายใสสารอินทรียวัตถุจะสลายไป สารประกอบไนโตรเจนทั้งส่วนที่เป็นโปรตีนแท้ (True protein) และไม่ใช่โปรตีน (Non-protein nitrogen) ยกเว้นที่อยู่ในรูปไนเตรท (Nitrate, NO_3) ไนไตรท์ (Nitrite, NO_2) จะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 40% (w/v) ลงไป แล้วไนโตรเจนจะอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในรูปของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์แก๊สแอมโมเนียที่กลั่นได้โดยใช้กรดบอริกที่มีความเข้มข้น 4% (w/v) เป็นตัวดักจับ นำไปไตเตรทหาไนโตรเจนด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟุริกที่มี ความเข้มข้น 0.1 (w/v) เพื่อหาปริมาณกรดที่ใช้ทำปฏิกิริยาก็จะสามารถคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนได้ โดยทั่วไปแล้วโปรตีนมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเฉลี่ย 16% (100/16 = 6.25) ดังนั้นจึงคำนวณหาโปรตีนหยาบ (Crude protein) โดยใช้สูตร % CP =%N X 6.25 ในวัตถุดิบบางชนิดอาจมีค่าไนโตรเจนแตกต่างกันไป ดังนั้น ค่าแฟคเตอร์จะเปลี่ยนแปลงตามชนิดตัวอย่าง

3.1 อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องย่อย (Block digestor)
3. หลอดย่อย (Digestion tube)
4. Exhaust manifold และ Aspirator
5. Tube stand
6. ชุดเครื่องกลั่น (Distilling unit)
7. ชุดไตเตรท
8. ตู้ดูดควัน (Fume hood)

3.2 สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 95 – 98% (H_2SO_4 conc., AR grade)
2. สารเร่งปฏิกิริยา [สารผสมระหว่าง copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$) กับ potassium sulfate (K_2SO_4) ในอัตราส่วน 1 : 9]
3. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล
4. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล
5. Potassium hydrogen phthalate ($C_8H_5KO_4$, AR grade)
6. ฟีนอล์ฟธาลีน (Phenolphthalein)
7. สกรีนเมทธิลเรดอินดิเคเตอร์ (Screened methyl red indicator)
8. กรดบอริกความเข้มข้น 4% (w/v)
9. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 40% (w/v)

3.3 การเตรียมสารละลาย

1. ฟีนอล์ฟธาลีน (Phenolphthalein) ละลายฟีนอล์ฟธาลีน (AR grade) 5 กรัม ใน 96% ethyl alcohol 400 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร

2. สารอินดิเคเตอร์ เลือกใช้สกรีนเมทธิลเรดอินดิเคเตอร์ (Screened methyl red indicator,MR) โดยชั่งเมทธิลเรด (AR grade) 0.2 กรัม และโบรโมครีซอลกรีน (BCG) (AR grade) 0.1 กรัม ละลายใน 96% ethyl alcohol 100 มิลลิลิตร เก็บในที่เย็นไม่ถูกแสง

3. กรดบอริกความเข้มข้น 4% (w/v) ละลายกรดบอริก (AR grade) 40 กรัม ด้วยน้ำกลั่นร้อนรอจนสารละลายเย็น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สารละลายผสมอินดิเคเตอร์ ผสมสารละลายในข้อ 2. ในอัตรา 1 : 3 (MR:BCG)โดยตวง 20 มิลลิลิตร ผสมในสารละลาย 4 % กรดบอริค 1 ลิตร (ข้อ 3.)

5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 40% (w/v) ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH, commercial grade) 400 กรัม ด้วยน้ำกลั่น ปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

6. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

6.1 ต้มน้ำกลั่นให้เดือดประมาณ 20 นาที เพื่อไล่แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ทิ้งให้เย็นโดยเก็บในภาชนะที่มีฝาปิด

6.2 ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH, AR grade) ที่มีโซเดียมคาร์บอเนตน้อยกว่า 5% ละลายด้วยน้ำกลั่นในข้อ 6.1 ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยน้ำหนัก ลงในขวดเออร์เลนเมเยอร์ เขย่าให้ละลาย ปิดปากขวดไม่ให้สัมผัสอากาศ ตั้งทิ้งให้โซเดียมคาร์บอเนตตกตะกอนจนได้สารละลายใส (ประมาณ 10 วัน)

6.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้สารละลายในข้อ 6.2 ปริมาตร 5.4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในข้อ 6.1 จนได้ 1 ลิตร

6.4 ชั่ง Potassium hydrogen phthalate ที่อบแห้งแล้ว ณ อุณหภูมิ 103 ^{0}C ประมาณ 4 ชั่วโมง ปริมาณ 0.2042 กรัม ใส่ในขวดเออร์เลนเมเยอร์ ละลายด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟธาลีน 2 – 3 หยด ไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอก-ไซด์ในข้อ 6.3 จนกระทั่งได้สารละลายสีชมพู่อ่อน เช่นเดียวกับ blank ซึ่งใช้น้ำในข้อ 1. หยดฟีนอล์ฟธาลีน 2 - 3 หยด ไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ใน ข้อ 6.3 จนกระทั่งได้สารละลายสีชมพู่อ่อน

6.5 คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ในรูป นอร์มอล (Normality) ความเข้มข้นของสารละลาย

$$NaOH = \frac{\text{น้ำหนักของ } \mathbf{Potassium\ hydrogen\ phthalate\ (กรัม)\ x\ 1000}}{\text{ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน } \mathbf{NaOH} \text{ ที่ใช้ไตเตรต(มล.)}\ \mathbf{x\ 204.229}}$$

7. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล

7.1 ตวงกรดซัลฟูริกเข้มข้น 95-98% (AR grade) 5.5 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 2 ลิตร

7.2 ทำการไตเตรทหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก โดยใช้ ปิเปตดูดสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดเออร์เลนเมเยอร์ หยดฟี-นอล์ฟธาลีน 2-3 หยด นำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบค่าความเข้มข้นแล้ว จนได้สารละลายสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้

7.3 คำนวณความเข้มข้น ของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N1 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มอล)

N2 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ต้องการทราบ (นอร์มอล)

V1 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรต (มิลลิลิตร)

V2 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน กรดซัลฟูริกที่ใช้ (10 มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการย่อยตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 0.5 - 1 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อย (digestion tube) หรือในกรณีที่เป็นตัวอย่างมีความชื้นสูงจะชั่งลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากไนโตรเจน พับกระดาษใส่ลงในหลอดย่อยเพื่อทำเป็น blank

2. เติมสารเร่งปฏิกิริยาประมาณ 5 กรัม หรือ Kjeldahl catalyst tablets 2 เม็ด และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 13 – 15 มิลลิลิตร ขึ้นกับปริมาณตัวอย่างที่ใช้ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาจนไม่รุนแรง และเติม H_2O_2 36 % (v/v) 1 มิลลิลิตร กันตัวอย่างปั๊มติดข้างหลอด

3. ตั้งหลอดย่อยใน stand ปิด heat shield สวม exhaust manifold ลงบนส่วนบนของหลอดย่อย

4. ตั้ง stand หลอดย่อยและ exhaust ลงบนเครื่องย่อย ยี่ห้อ Tecator รุ่น 2020 ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 420 (500 ^{0}C) แล้ว เพื่อความปลอดภัยควรทำการย่อยภายในตู้ดูดควัน เปิดเครื่องดูดไอกรด (scruber) ช่วงเริ่มต้นจะเปิดแรงประมาณ และย่อยเป็นเวลา 5 นาที และลดวาวล์เพื่อลดอัตราการไหลไอกรดลงประมาณ 3 ทำการย่อยจนตัวอย่างใส ใช้เวลาประมาณ 30 – 45 นาที (จนได้สารละลายสีฟ้าหรือเขียว แล้วปล่อยไว้ต่ออีก 30 นาที)

5. ยก stand พร้อมหลอดย่อยตัวอย่างออกปล่อยให้เย็นเพื่อรอน้ำไปกลั่น

3.5 การกลั่น

1. เปิดเครื่องทำน้ำเย็นจนได้อุณหภูมิที่ตั้งไว้ 15 องศาเซลเซียส

2. เปิดเครื่องสำควบแรงดันไฟฟ้า (stabilizer) แล้วเปิดสวิทช์ของเครื่องกลั่น warm เครื่องกลั่น (Kjeltec รุ่น 1026) ใช้ flask และหลอดย่อยเปล่าใช้โปรแกรม Manual กดน้ำลง 50 มล. และกด steam กลั่นให้ได้ปริมาตร 100 – 150 มล. เป็นเวลา 5 -7 นาที กด steam เพื่อปิด เช็คไนโตรเจนที่ติดค้างอยู่ในระบบโดยหยดฟีนอล์ฟธาลีนจะไม่เปลี่ยนสี

3. นำหลอดและ flask ออกจากเครื่องกลั่น

4. ตั้งโปรแกรมเป็น Auto โดยกดปุ่มปรับปริมาณน้ำกลั่นปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ (50 มล.), ด่าง (25 มล.) stroke (2), ช่วงห่างของเวลา delay time (0.2 นาที) และเวลาที่ใช้ในการกลั่น (3.6 -3.7 นาที) หรือกลั่นให้ได้ปริมาตร 150 มล.

5. นำ flask ซึ่งบรรจุกรดบอริกความเข้มข้น 4% ปริมาณ 25 -30 มิลลิลิตร ตั้งไว้บน platform ของเครื่องกลั่นและยก platform ขึ้น ให้ปลายแท่งแก้วจุ่มอยู่ใต้กรดบอริก

6. ใส่หลอดตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้ว (ข้อ 4.) เข้ากับเครื่องกลั่น ปิด safety door เครื่องกลั่นจะเริ่มทำงาน

7. เมื่อกลั่นครบตามเวลาที่กำหนดเครื่องจะหยุดทำงาน นำ flask และหลอดย่อยออกจากเครื่องกลั่น

8. นำ flask กรดบอริก ที่ดักจับแก๊สแอมโมเนียที่ถูกกลั่นออก ไปไตเตรตหาไนโตรเจนด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การคำนวณ

$$\% \text{ ไนโตรเจน} = \frac{14.01 \times (V1 - V2) \times N}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเป็นกรัม} \times 10}$$

14.01 = น้ำหนักมวลโมเลกุลของไนโตรเจน

V1 = ปริมาตรของกรดที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (ml)

V2 = ปริมาตรของกรดที่ใช้ไตเตรท blank (ml)

N = ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ไตเตรท (N)

10 = ค่าคงที่ที่แปลงจากหน่วยกรัมเป็น %

$$\% \text{ Crude Protein} = \% \text{ ไนโตรเจน} \times F$$

F = ค่าคงที่ในการเปลี่ยนค่าไนโตรเจนเป็นโปรตีน

F = 6.25 สำหรับตัวอย่างอาหาร อาหารสัตว์ หรือตัวอย่างอื่น ๆ ที่ไม่ระบุเฉพาะ

F= 5.71 สำหรับกากถั่วเหลือง

4. การวิเคราะห์หาไขมัน (Crude fat หรือ Ether extract, EE)

ไขมัน เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารอินทรีย์ ดังนั้นในการวิเคราะห์หาปริมาณไขมันจึงสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ระเหยง่าย ตัวทำละลายที่นิยมใช้กันมากคือ diethyl ether, petroleum ether, dichloromethane, acetone เป็นต้น สารที่ถูกสกัดได้นอกจากไขมันแล้วยังมีสารบางชนิดที่ถูกสกัดออกมาพร้อมกับไขมันด้วย เช่น carotenoid, wax, sterine, phosphatedein lecithine และ alkaloid เป็นต้น จากการที่สารที่ถูกสกัดมีทั้งพวกที่เป็นไขมัน และไม่ใช่ไขมันจึงเรียกสารทั้งสองว่า crude fat หรือ ether extract

เอกสารอ้างอิง : ดัดแปลงวิธีการจาก AOAC 2000

สำหรับตัวอย่าง : พืชอาหารสัตว์ วัตถุดิบอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์

4.1 อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องชั่งชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องสกัดไขมัน (Extraction unit)
3. Service unit สำหรับจ่ายความร้อน
4. เครื่องทำน้ำเย็น (Cooling)
5. Cellulose thimble, Thimble adapter, Thimble support
6. ถ้วยรองรับ (Extraction cup), Cup holders
7. ตู้อบ (oven)
8. โถดูดความชื้น
9. Petroleum ether จุดเดือด 35-60 ^{0}C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดขนาด 1 มิลลิเมตร ประมาณ 1-2 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรองใส่ลงใน cellulose thimble

2. นำ thimble ที่มีตัวอย่าง นำไปอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 105 ^{0}C 3 ชั่วโมง

3. นำถ้วยเปล่าอบที่อุณหภูมิ 105 ^{0}C นาน 1 ชั่วโมง นำออกมาปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งบันทึกน้ำหนัก

4. ทำการ warm เครื่องสกัดโดยเปิดสวิทช์เครื่องจ่ายความร้อนซึ่งตั้งอุณหภูมิประมาณ 85-90 ^{0}C นานประมาณ 20 นาที หรือรอจนอุณหภูมิสูงไว้ตามที่กำหนด ในขณะเดียวกันทำการ warm เครื่องทำความเย็น ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 10 ^{0}C นำ thimble ที่มีตัวอย่างติดกับ thimble adapter วางลงใน thimble support จากนั้นนำเข้าในเครื่องสกัดไขมันพร้อมทั้งเปิดสวิทช์ปั๊มน้ำที่เครื่องทำน้ำเย็น

5. ตวง petroleum ether ประมาณ 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในถ้วยที่ทราบน้ำหนักแล้ว วางลงใน cup holders นำเข้าในเครื่องสกัด

6. กดล็อกคานของเครื่องสกัดให้แน่นเปิดวาวล์ให้สารสกัดไหลเวียน ทำการต้มตัวอย่างกับสารสกัดโดยเลื่อนคันโยกตัวอย่างไปไว้ที่ตำแหน่ง boiling นาน 30 นาที จากนั้น ทำการสกัดโดยเลื่อนคันโยกตัวอย่างไปไว้ที่ตำแหน่ง rinsing นาน 60 นาที ระยะเวลาการต้มและการสกัดขึ้นอยู่กับประเภทตัวอย่าง หากเป็นตัวอย่างที่มีไขมันสูงให้ใช้เวลานานขึ้น โดยปกติแนะนำให้ใช้เวลาต้มกับเวลาสกัดในอัตราส่วน 1 : 2

7. เมื่อครบเวลาให้ทำการปิดวาวล์เก็บสารสกัดนานประมาณ 10 นาที หรืออาจช่วยให้สารสกัดระเหยเร็วขึ้น โดยเปิดวาวล์ลดความดันที่เครื่องสกัดก่อนแล้วจึงเปิดสวิทช์ aspirator ที่เครื่องจ่ายความร้อน

8. หลังจากทำการระเหยสารสกัดออกจากถ้วยแล้ว ทำการปลดล็อกคานที่เครื่องสกัด นำ cup holders ออกจากเครื่อง นำถ้วยที่มีสารสกัดไปอบต่อในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 ^{0}C นาน 30 นาที นำออกมาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วจึงชั่งบันทึกน้ำหนัก

9. ถ้าสกัดไขมันหลายรอบต่อวัน รอบที่ 2 ควรใส่ petroleum ether ในถ้วยประมาณ 15-20 มิลลิลิตร

4.3 การคำนวณ

$$\% \text{ ไขมัน} = \frac{(W3 - W2) \times 100}{W1}$$

W1 = น้ำหนักตัวอย่าง

W2 = น้ำหนักถ้วย

W3 = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักไขมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การวิเคราะห์หาคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (Total Carbohydrate)

การวิเคราะห์หาคาร์โบไฮเดรทที่ย่อยได้ง่าย

โดยการคำนวณจาก

$$\%TC = 100 - [\%Moisture + \%Ash + \%CP + \%EE]$$

เมื่อ %Moisture = เปอร์เซ็นต์ความชื้น

%Ash = เปอร์เซ็นต์เถ้า

%CP = เปอร์เซ็นต์โปรตีนหยาบ

%EE = เปอร์เซ็นต์ไขมันหยาบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ – สกุล นางดวงใจ โอชัยกุล

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ระดับ 9 ประธานสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2529	ตรี	วท.บ (เกษตรศาสตร์)	เกษตรศาสตร์	การจัดการศัตรูพืช	ม.สงขลานครินทร์	ไทย
2532	โท	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	เทคโนโลยีชีวภาพ	-	ม.สงขลานครินทร์	ไทย

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในอาหารหมัก การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะหรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้
2549	งานวิจัยที่ออกรายการ Inside Technology ออกอากาศทาง สทท 11	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2550	โครงการประกวดผลงานสิทธิบัตรการประดิษฐ์ สาขาสิ่งแวดล้อม	กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

- ดวงใจ โอชัยกุล และ อรวรรณ ชัยลภากุล. 2540. การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 25(1) : 56-64.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงงานวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล และ วันชัย สุทธินุ่น. 2541. การศึกษาการผลิตเยลลีจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง 8(1) : 8-15
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงงานวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล. 2541. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง ปีที่ 6 ฉบับที่ 1 มีนาคม 2541. 34-40
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงงานวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล. 2541. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อที่แยกได้จากกองหมัก. วารสารเกษตรก้าวหน้า. ปีที่ 13 ฉบับที่ 2 เดือนเมษายน – มิถุนายน 2541. 59 - 69.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงงานวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล และ มาริสา จาตุพรพิพัฒน์. 2541. การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปมันฝรั่ง โดย *Candida tropicalis* TISTR 5136. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 26(3) : 181 – 185.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล. 2543. ผลของอัตราการเจือจางและพีเอชของน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปไก่ที่มีต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5136. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 8(1) : 31 – 36.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล และกุลวดี ทองภูเบศร์. 2542. การผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้. วารสารเทคโนโลยีสุรนารี. 6(3) : 175 – 180.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล, ประกายวัน สุรินทรศิริรัฐ, ปัญจพร สฤษดิชัยนันทาและรัชนีวัลย์ กลิ่นกลบ. 2545. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปไก่โดย *Candida tropicalis* TISTR 5136. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง ปีที่ 11 ฉบับที่ 1 มกราคม – มิถุนายน. 14 – 22.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล กุลวดี ทองภูเบศร์ สุปรีชา ฉัตรทอง และปริมประภา คณารักษณ์. 2545. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3089. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 10(1) : 333 – 38.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ดวงใจ โอชัยกุล กุลวดี ทองภูเบศร์ ดำรงศักดิ์ พิริยะภัทรกิจ และดาวรุ้ง ทับแสง. 2546. ผลของเมทานอลและแร่ธาตุบางชนิดต่อการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อ *Aspergillus niger.* วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร. 11(1) : 31 – 39.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล ไพศาล ประสิว รัชฎาภรณ์ บุตรสนม และสกุลรัตน์ พุกกะวรรณะ. 2547. การผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อยีสต์. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง. 12(2) : 67 – 74.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล นิสา เหมมาลา สรัญ บินมิตตอร์ และสาฑิต พิเสฏฐศลาศัย. 2547. การศึกษาเชื้อราสำหรับผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแป้งมันสำปะหลังในสภาวะไม่ปลอดเชื้อ. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 12 (1) : 30 – 36.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Duangjai Ochaikul, Nisakorn Noiprasert, Wipawade laoprasert and Sasima Pookpun. 2011. Ethanol production from jackfruits seeds by selected fungi and yeast from loog-pang. KMITL Sci. Tech. J. 12(1), 1 – 6.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Suwanposri, A., Yukphan, P., Yamada, Y and Ochaikul, D. 2013. Identification and biocellulose production of *Gluconacetobacter* strains isolated from tropical fruits in Thailand. Maejo Int. J. Sci. Techno. 7(01), 70-82.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Yamada, Y., Yukphan, P., Huong Thi Lan Vu., Muramatsu, Y., Ochaikul, D and Nakagawa, Y. 2012. Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of Komagatabacter gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α-Proteobacteria. Ann Microbiol, 62: 849-859
  สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

การเสนอผลงานวิชาการ

- Ochaikul, D., Chinawoot, P and Wiwatsripaiboon, P. 2002. Effect of Trace Element on Citric Acid Fermentation from Cocoa Pulp Extract by *Aspergillus niger* TISTR 3089. The 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "Biotechnology for Better Living in the New Economy" November 12 – 15, 2002. Hotel Sofitel Raja Orchaid, Khon Kaen, Thailand.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ochaikul, D., Kongkiattisak, P and Tadthongleung, W. 2003. Single Cell Protein from Cheese whey by *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5057. Proceeding of Biological Control and Biotechnology, Harbin, China, 64 – 70.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- ดวงใจ โอชัยกุล และพรรณวิภา แพงศรี. 2547. การผลิตโปรตีนจากน้ำทิ้งโรงงานแป้งมันสำปะหลังโดยเลี้ยงเชื้อผสม *Endomycopsis fibuligera* TISTR 5097 และ *Candida utilis* TISTR 5046. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 42 "เกษตรศาสตร์เพื่อการพัฒนาคุณภาพชีวิต" 3 – 6 กุมภาพันธ์ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- Duangjai Ochaikul, Karuna Chotirittikrai, Jiraporn Chantra and Sinith Wutigornsombatkul. 2005. Studies on Fermentation of *Monascus purpureus* TISTR 3090 on Bacterial Cellulose : *Acetobacter xylinum* TISTR 967. Proceeding of Biological Control and Biotechnology, Wuzhong, China, 122 – 129.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- Ochaikul, D., Charoenying, P and Ratanajaraya, C. 2006. Effect of the extract from *Zingiber montanum* on antimicrobial activites. 10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (GIM), Prague, Czech Republic, June 24 – 28, 2006.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- Duangjai Ochaikul, Linchong Suklampoo and Piyada Leelapiyanart. 2007. Ginger Wine Production by Various Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, November 1 – 3, 2007 at KhonKaen Univeristy, Nong Khai Campus, Nong Khai, Thailand.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- Ochaikul, D., Rukchonlatee, S., Naranong, N and Pongsakul, P. 2008. Effect of Chitosan on Paper Production from Bacterial Cellulose and its Properties. The 6th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, November 26 – 28, 2008. Central Luzon State Universiry, Science City of Munoz, Nueva Ecija, Philippines.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ดวงใจ โอชัยกุล ลินจง สุขลำภู และปิยะดา ลีลาปิยนาถ. 2552. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักไวน์ขิงโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5018. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. 241 – 250 หน้า
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- Ochaikul, D., Poungmalee, B., Yimyai, T and Keawkaew, S. 2010. Production of Ethanol from Jackfruit Seeds starch by Enzymatic hydrolyzation and *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation NZMS & BZSBMB Meeting, 30 November – 3 Decemmmber 2010, The University of Auckland, New Zealand.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- กมลวรรณ ตัณโสภณ และดวงใจ โอชัยกุล. 2554. การผลิตสารสีของเชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3090. บนลูกเดือยในสภาวะอาหารแข็ง. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 49 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์. หน้า 330 – 339.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- Duangjai Ochaikul, Linchong Suklampoo and Piyada Leelapiyanart. 2009. Ginger wine production by various starins of *Saccharomyces cerevisiae*. The 3rd International Conference on fermentation Technology for Value Added Agriculture Products. August 26th -28th, 2009. Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand, 78-80.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- Mawinee Yaemchantramart, Duangjai Ochaikul and Charoen charoenchai. 2009. The influence of isolated fungi and yeast from Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Production. August 26th -28th , 2009. Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand, 80-81.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- Jiararat Chitranuwatkul, Duangjai Ochaikul and Wanida Janrikul. 2012. Preparation and Antibacterial Properties of Mangosteen extract-cellulose composite film. Preceedings of 1 st International Symposium on Technology for Sustainability (ISTS 2011), 26-29 January 2012, KMITL, Bangkok Thailand.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Suwanposri, A., Yukphan, P., Yamada, Y and Ochaikul, D. 2012. Bio-cellulose Paper Production using Agricultural waste by *Gluconacetobacter* sp PAP1. 2012. International Conference on Sustainable Environmental Technologies (ICSET), April 26-27, 2012, Century Park Hotel, Bangkok, Thailand
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- Suwanposri, A., Yukphan, P., Yamada, Y and Ochaikul, D. 2012. Optimization of culture condition for bio-cellulose production by *Gluconactobacter nataicola* PAPs isolated from rotten tropical fruits in Thailand. Processdings of The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "Renewable Energy and Global Care" November 29-30th, 2012 at Ubon Ratchathani, THAILAND.
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- Ochaikul, D., Tanpathanagit, K., Saleng, S and Chitkaew, N. 2012. Production of Ethanol from Sweet Potato by Enzymatic hydrolyzation and *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation. The Proceedings of 10th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, December 27-30, 2012, Harbin Institute of Technology, Harbin, P.R China
  สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

ผลงานสิทธิบัตร/สิ่งประดิษฐ์/งานสร้างสรรค์ (ศิลปะหรืออื่นๆ)

- อนุสิทธิบัตร เรื่อง กรรมวิธีการผลิตกระดาษเซลลูโลสจากแบคทีเรียจากน้ำทิ้งโรงงานเต้าหู้และกระดาษเซลลูโลสจากกรรมวิธีดังกล่าว เลขที่อนุสิทธิบัตร 7972 เมื่อ 4 เมษายน 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้