สำนักหอสมุดกลาง _พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษากระบวนการผลิตที่มีการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ และเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆโดยใช้กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัตถุดิบ

นางสาว ปวีณา ศรีเกษม
นางสาว ปาริยา ณ นคร
นาย สุวัฒน์ คำเลิศลักษณ์

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2540

ปพ.
ป496ก
เลขหมู่ ป540
เลขทะเบียน 30621
วัน, เดือน, ปี 28 ก.ค. 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study on Bioconversion of Newspaper by Enzyme and Microorganisms

Miss Paveena Srikasem

Miss Pariya Na na korn

Mr. Suwat Kumlertluk

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor Science

Departmant of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut 's Institute of Technology Ladkrabang

1997

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษากระบวนการผลิตที่มีการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ และเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ โดยใช้กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัตถุดิบ

โดย นางสาว ปวีณา ศรีเกษม
นางสาว ปาริยา ณ นคร
นาย สุวัฒน์ คำเลิศลักษณ์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. อรไท สุขเจริญ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยศาสตร์บัณฑิต

---------- หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
(รศ. ดร. พรรณี ฐิตาพิชิต)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

---------- ประธานกรรมการ
(ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

---------- กรรมการ
(รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

---------- กรรมการ
(ผศ. อรไท สุขเจริญ)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษากระบวนการผลิตที่มีการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ และเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ โดยใช้กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัตถุดิบ

โดย นางสาว ปวีณา ศรีเกษม
นางสาว ปาริยา ณ นคร
นาย สุวัฒน์ คำเลิศลักษณ์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อรไท สุขเจริญ

ปีการศึกษา 2540

บทคัดย่อ

ศึกษาแนวทางในการใช้กระดาษหนังสือพิมพ์ซึ่งเป็นวัสดุประเภทเซลลูโลสที่เหลือใช้มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ ได้แก่ เอทานอล กรดจิบเบอเรลลิก กรดซิตริก และกรดแลคติก โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้ ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732 , ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476, ***Gibberella fujikuroi*** , ***Yarrowia lipolytica*** 5054 และ ***Lactobacillus casei*** ตามลำดับ ซึ่งจะใช้เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ร่วมด้วยกับเอนไซม์เซลลูเลส จากการศึกษาพบว่าเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถใช้กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นได้ และเมื่อมีการเติมเอนไซม์เซลลูเลส จะมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มมากขึ้นและมีผลทำให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้สูงขึ้นตามไปด้วย ยกเว้น ในกรณีการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ ***Lactobacillus casei*** และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Tittle : Study on Bioconversion of Newspaper by Enzyme and Microorganisms

Name : Miss Paveena Srikasem
Miss Pariya Na na korn
Mr. Suwat Kumlertluk

Department : Applied Biology

Special Project Advisor : Asistant Professor Oratai Sukcharaen

Academic Year : 1997

Abstract

Newspaper, a cellulosic waste, was examined for the production of ethanol, gibberellic acid, citric acid and lactic acid by ***Saccharomyces carlbergensis*** ATCC 44732, ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476, ***Gibberella fujikuroi***, ***Yarrowia lipolytica*** and ***Lactobacillus casei*** respectively. Cellulase enzyme was also used in co-operation with these microorganisms. The result showed that these microorganisms alone could utilize newspaper. When cellulase was applied, the higher production was obtained with the exception of lactic acid production by ***Lactobacillus casei*** and ethanol production by ***Saccharomyces carlbergensis*** ATCC 44732.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Study on mixed culture of ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732 and ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 for ethanol fermentation

Name Mr. Kamol Tantirak
Miss. Suprempree Suprom-in

Special project Advisor Assistant Professor Orathai Sukcharoen

Department Applied Biology

Academic Year 1997

ABSTRACT

Mixed culture of ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44723 and ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 for ethanol production was studied. The result showed that both stains can grow and produce ethanol in sucrose higher than using glucose. At the ratio of ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732 and ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 are 1:1 by volume. It was found that the 10^4 cell per millilitre can produce ethanol 13.9% in 54 hrs in the culture meidum pH6 and agitation rate at 200 rpm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตและ สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ. อรไท สุขเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้ความรู้ ข้อเสนอแนะ รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษา และให้คำแนะนำในด้านต่างๆ ในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้ ผศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง และ รศ. ดร. ดุษณี ธระบริพัฒน์ กรรมการสอบโครงงานพิเศษ และได้กรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษาด้าย รวมทั้ง คุณ พยอม เกียรติกำจร , คุณ วิทยา เขียวเขิน , คุณ ประเสริฐวิทย์ แพงคำ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้ยืมอุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ สำหรับทำการทดลอง

สุดท้าย คณะผู้จัดทำขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่านที่ให้ยืมอุปกรณ์ต่างๆ รวมทั้งเพื่อนๆ นักศึกษาที่ช่วยเหลือในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎี และหลักการเกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน	28
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ	28
3.2 สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ	28
3.3 อุปกรณ์ และสารเคมี	28
3.3.1 อุปกรณ์	28
3.3.2 สารเคมี	30
3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงานทดลอง	30
3.5 การเตรียมวัตถุดิบ	30
3.4.1 การศึกษาการผลิตเอทานอล	30
3.4.2 การศึกษาการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก	31
3.4.3 การศึกษาการผลิตกรดซิตริก	32
3.4.4 การศึกษาการผลิตกรดแลคติก	33
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	35
4.1 การศึกษาการผลิตกรดเอทานอล	35
4.2 การศึกษาการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก	41
4.3 การศึกษาการผลิตกรดซิตริก	44
4.4 การศึกษาการผลิตการแลคติก	46
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	49
ภาคผนวก	51
เอกสารอ้างอิง	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงปริมาณโลหะหนักเป็นพิษที่มีในหมึกพิมพ์	3
ตารางที่ 2	แสดงส่วนประกอบของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส	6
ตารางที่ 3	แสดงปริมาณเอทานอล (%) *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732 ที่ความเข้มข้นของกระดาษหนังสือพิมพ์ 1%, 3 % และ 5 % เมื่อใช้และไม่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วยที่เวลาต่างๆ	35
ตารางที่ 4	แสดงปริมาณเอทานอล (%) ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 2476 ที่ความเข้มข้นของกระดาษหนังสือพิมพ์ 1 %, 3 % และ 5 % เมื่อใช้และไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย	38
ตารางที่ 5	แสดงปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้จากเชื้อ *Gibberella fujikuroi* ที่ความเข้มข้นของหนังสือพิมพ์ 4 % เมื่อใช้และไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย	41
ตารางที่ 6	แสดงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากเชื้อ *Yarrowia lipolytica* ที่ความเข้มข้นของกระดาษหนังสือพิมพ์ 2 % เมื่อมีการใช้ และไม่ใช้เอนไซม์ร่วม	44
ตารางที่ 7	แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lactobacillus casei* ที่ความเข้มข้น ของกระดาษหนังสือพิมพ์ 2 % เมื่อใช้ และไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 1. การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์ " X " และเอนไซม์องค์ประกอบ ของเอนไซม์เซลลูเลสตามสมมติฐานของ Cowling	8
รูปที่ 2. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นในค่า พีเอชต่าง ๆ กัน โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสเป็น 0.0029 $KNUI^{-1}$ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของแคลเซี่ยมเป็น 0.0009 โมลาร์	9
รูปที่ 3. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นในค่า อุณหภูมิต่าง ๆ กัน โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสเป็น 0.0014 $KNUI^{-1}$ พีเอช 9.0 และความเข้มข้นของแคลเซียมเป็น 0.00009 โมลาร์	10
รูปที่ 4. การจัดเรียงตัวของหน่วยกลูโคไพราโนส ในทิศทางตรงกันข้าม ในผลึกเซลลูโลส	12
รูปที่ 5. การเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าสูง	13
รูปที่ 6. แผนภาพแสดงการผลิตเอทานอลโดยทั่วไป ที่ใช้ในอุตสาหกรรม	15
รูปที่ 7. สูตรโครงสร้างของกรดซิบเบอแรลลิก	18
รูปที่ 8. สูตรโครงสร้างของกรดซิตริก	19
รูปที่ 9. แนวทางในการสังเคราะห์กรดซิตริกของเชื้อยีสต์โดยผ่านทางวัฏจักรกรดเมทิลซิตริก	24
รูปที่10. แนวทางในการผลิตกรดซิตริกของเชื้อยีสต์ที่ใช้ n-alkanes เป็นแหล่งคาร์บอน	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
รูปที่11.	แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ , ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้น ในระหว่างการหมักของเชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732 เมื่อใช้ความเข้มข้นของกระดาษหนังสือพิมพ์ 5 % โดยมีและไม่มีเอนไซม์รวมด้วย	37
รูปที่12.	แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ , ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้น ในระหว่างการหมักของเชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 เมื่อใช้ ความเข้มข้นของกระดาษหนังสือพิมพ์ 1 % โดยมีและไม่มีเอนไซม์รวมด้วย	40
รูปที่13.	แสดงปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้จากเชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** เมื่อใช้ และไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วยที่ความเข้มข้นของหนังสือพิมพ์ 4 % ในเวลาต่าง ๆ	42
รูปที่14.	แสดงปริมาณน้ำตาลที่ได้จากเชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** เมื่อใช้และไม่ใช้เอนไซม์ และกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก	43
รูปที่15.	แสดงปริมาณกรดซิตริก และอัตราการเจริญของเชื้อ ***Yarrowia lipolytica*** 5054เมื่อใช้ และไม่ใช้ เอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วย	45
รูปที่16.	แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้และอัตราการเจริญของเชื้อ ***Lactobacillus casei*** ที่ความเข้มข้นกระดาษหนังสือพิมพ์ 2 % เมื่อใช้และไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย	47
รูปที่17.	แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ของเชื้อ ***Lactobacillus casei*** เมื่อใช้ และไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย และค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้น โดยกระบวนการหมัก	48
รูปที่18.	แสดงลักษณะการเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้อุณหภูมิห้อง ในเครื่องเขย่าที่ ความเร็วรอบต่าง ๆ	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

รูปที่19. แสดงชุดการไตเตรตหาปริมาณกรดที่ผลิตได้ 51

รูปที่20. แสดงการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Nelson 52

รูปที่21. แสดงเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC) ที่ใช้สำหรับวัดปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก 52

รูปที่22. แสดงเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) 53

รูปที่23. แสดงกล้องจุลทรรศน์ และอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวัดปริมาณเซลล์ 53

รูปที่24. แสดงหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) 54

รูปที่25. แสดงเครื่อง Laminar air flow สำหรับการถ่ายเชื้อลงในอาหารหมัก 54

รูปที่26. แสดงตู้บ่มเชื้อ (Incubator) สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการหมัก 55

รูปที่27. แสดงกราฟมาตรฐานของกรดจิบเบอเรลลิก 64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันการแสดงแนวทางการอนุรักษ์การใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างประหยัดและให้คุ้มค่าที่สุดเกิดขึ้นอย่างมากมาย เนื่องจากประชากรในโลกมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นพร้อมๆกับความต้องการปัจจัยต่างๆที่มากขึ้นด้วย ในขณะที่วัตถุดิบส่วนใหญ่มาจากทรัพยากรธรรมชาติซึ่งมีอัตราการเพิ่มที่เกิดขึ้นช้ากว่าอัตราการเพิ่มของประชากร ดังนั้นกระแสการนำวัสดุที่เหลือใช้กลับมาใช้ใหม่เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดและคุ้มค่ากับการลงทุนจึงมีมากขึ้นในทุกขณะ ทั้งนี้เพื่อเป็นการรักษาทรัพยากรธรรมชาติให้คงอยู่อันจะนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆต่อไป

กระดาษเป็นอีกวัสดุหนึ่งที่ปัจจุบันมีการนำกลับมาใช้ใหม่มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากว่าความต้องการเยื่อกระดาษในแต่ละปีมีแนวโน้มที่สูงขึ้น เช่น เยื่อกระดาษปี 2536 มีมูลค่าการนำเข้า 4,710 ล้านบาท ส่วนปี 2537 มีมูลค่าการนำเข้าถึง 5,266.8 ล้านบาท (อัตราการเปลี่ยนแปลงเป็นร้อยละ 11.8) หรือกระดาษหนังสือพิมพ์มีการนำเข้าในปี 2535 คิดเป็นมูลค่า 2,952.8 ล้านบาท ส่วนปี 2536 มีมูลค่าถึง 3,342.3 ล้านบาท (อัตราการเปลี่ยนแปลงเป็นร้อยละ 13.2) (ไพศาลและคณะ, 2535) จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่ามีแนวโน้มการใช้กระดาษที่เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ ดังนั้นการนำกระดาษกลับมาใช้ใหม่จึงมีความจำเป็นอย่างมากในเศรษฐกิจของประเทศไทย ทั้งนี้เพื่อช่วยลดค่าใช้จ่ายและมูลค่าการนำเข้าต่างๆที่ต้องสูญเสียออกไป

แนวทางการนำกระดาษกลับมาใช้ใหม่นี้มีได้หลายทางด้วยกัน เช่น ใช้ในงานก่อสร้าง การทำแผ่นกั้นผนังและแผ่นกระดาน อาหารสัตว์ โปรตีนเซลล์เดียว (Single Cell Protein) ใช้ทำอาหารและยา การผลิตผงเซลลูโลส เรียกว่า ไมโครคริสทอลลีน เซลลูโลส (Microcrystalline cellulose , MCC) ใช้ผสมกับยาแอสไพริน (ไพศาลและคณะ, 2535)

การใช้วัสดุประเภทเซลลูโลสในชีวิตประจำวันมีมากขึ้นในปัจจุบัน โดยจะอยู่ในรูปของกระดาษต่างๆไม่ว่าจะเป็นกระดาษเอกสาร กล่อง หรือกระดาษหนังสือพิมพ์ ซึ่งความต้องการใช้วัสดุประเภทนี้มีมาก ทำให้เกิดของเหลือใช้ที่มาจากวัสดุนี้มากขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นจึงมีการหาแนวทางที่จะนำของเหลือใช้เหล่านี้มาผลิตให้เป็นผลิตภัณฑ์อื่นเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆต่อไป อันแนวทางที่จะนำของเหลือใช้ประเภทเซลลูโลสนี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์นั้น ในการทดลองนี้ได้ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตแทนแหล่งคาร์บอนอื่น โดยจะเป็นการทำงานร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์และเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้จะเป็นเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อใช้ย่อยเซลลูโลสที่เป็นส่วนประกอบหลักของกระดาษที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนนี้ เพราะเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้นี้ขาดเอนไซม์เซลลูเลสที่สามารถย่อยเซลลูโลสให้เป็นกลูโคสได้ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆต่อไป ซึ่งวิธีการสลายวัสดุประเภทเซลลูโลสให้มีขนาดโมเลกุลของโครงสร้างเล็กลงเพียงพอต่อการนำใช้ประโยชน์ของเชื้อจุลินทรีย์นั้นมีอยู่ 2 วิธีด้วยกันคือ การใช้กรดและการใช้เอนไซม์ แต่นิยมใช้เอนไซม์มากกว่าเพราะประหยัดด้านพลังงานความร้อนที่ต้องใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัสดุประเภทเซลลูโลสที่มีปริมาณมากในปัจจุบัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาทางกำจัดโดยนำมาแปรเปลี่ยนเป็นสารอื่นที่มีราคาและประโยชน์ด้านอื่นต่อไป ซึ่งการศึกษานี้เป็นการหาแนวทางการใช้กระดาษหนังสือพิมพ์มาแปรเปลี่ยนให้เป็นแอลกอฮอล์(เอทานอล) , ฮอร์โมน (กรดจิบเบอแรลลิก) , กรดอินทรีย์ (กรดซิตริกและกรดแลกติก) โดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตร่วมกับการใช้และไม่ใช้เอนไซม์ เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งประเภทเซลลูโลสต่อไป ซึ่งผลิตภัณฑ์ต่างๆเหล่านี้จะนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น เอทานอล ใช้เป็นตัวทำละลายในการทำแลคเกอร์ สี น้ำหอม และสารปรุงแต่งต่างๆ , กรดจิบเบอแรลลิก ใช้เป็นฮอร์โมนกระตุ้นการเจริญเติบโต , กรดซิตริก ใช้ในอุตสาหกรรมยา หมึกและสี ส่วนกรดแลกติกใช้ในอุตสาหกรรมถนอมอาหาร (บัณฑิต,2534)

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาความสามารถในการใช้กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ เอทานอล , กรดซิตริก , กรดแลกติก และกรดจิบเบอแรลลิก โดยใช้จุลินทรีย์ต่างๆ
2. เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิต เมื่อใช้และไม่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆดังกล่าว
3. เพื่อศึกษาหาแนวทางการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งประเภทเซลลูโลส

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาหาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้กระดาษหนังสือพิมพ์ให้เป็นประโยชน์ได้
2. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่สามารถใช้กระดาษหนังสือพิมพ์ในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆได้
3. เพื่อศึกษาการทำงานร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตกับเอนไซม์เซลลูเลส
4. เพื่อศึกษาหาผลของการใช้เอนไซม์ช่วยในกระบวนการผลิต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงงานพิเศษ

1. สามารถหาเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการใช้กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์อื่นๆ
2. ทราบถึงผลของการใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการผลิต
3. ทราบถึงสภาวะที่ใช้กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม
4. สามารถหาแนวทางที่จะกำจัดวัสดุเหลือทิ้งประเภทเซลลูโลสให้สามารถใช้ประโยชน์อื่นๆได้
5. เพื่อทราบเทคนิคและวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดค่าต่างๆอันแสดงถึงความเป็นไปในปฏิกิริยาการหมักที่เกิดขึ้นในผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง
6. เพื่อเป็นลู่ทางในการนำวัสดุเหลือทิ้งประเภทเซลลูโลสผลิตสารอื่นๆนอกเหนือจากนี้ต่อไปได้
7. เป็นแนวทางในการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติที่เริ่มหมดไปให้ยังคงอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

หนังสือพิมพ์เป็นแหล่งให้ความรู้ที่นอกเหนือจากแหล่งอื่นๆ ซึ่งในปัจจุบันมีการผลิตกันออกมามากมายหลายสำนักพิมพ์ หลายประเภท เพราะเนื่องมาจากความต้องการของผู้บริโภคที่มีมากขึ้นในยุคแห่งเทคโนโลยีนี้ ดังนั้นย่อมก่อให้เกิดกระดาษหนังสือพิมพ์เหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก อันเป็นปัญหาที่สำคัญในปัจจุบันในการหาทางกำจัดกระดาษหนังสือพิมพ์เหล่านี้ นอกจากนี้ในตัวกระดาษหนังสือพิมพ์เองมีความเป็นพิษอันเนื่องมาจากโลหะหนักที่ผสมอยู่ในน้ำหมึกที่ใช้พิมพ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณโลหะหนักเป็นพิษที่มีในหมึกพิมพ์

โลหะหนัก	หมึกสีดำ	หมึกสีเขียว	หมึกสีแดง
สารหนู	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ปรอท	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
เซลีเนียม มก./กก.	0 - 8.25	ไม่พบ	ไม่พบ
โครเมี่ยม มก./กก.	ไม่พบ	9.77	ไม่พบ
ตะกั่ว มก./กก.	0.75 - 7.61	1.8 - 55.2	45.1
แคดเมี่ยม มก./กก.	0 - 0.62	1.71	0.85

ที่มา : รายงานกิจกรรมกรมวิทยาศาสตร์บริการ , 2523

ซึ่งโลหะหนักเหล่านี้มีผลต่อกระบวนการผลิต ถ้ามีมากเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยเฉพาะแคดเมี่ยมซึ่งจะมีผลมาก (Kosaric et al.,1983)

กระดาษหนังสือพิมพ์มีส่วนประกอบของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการย่อยสลายจนถึงโมเลกุลที่เล็กที่สุดจะได้กลูโคสและไซโลสซึ่งเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นของกระบวนการหมัก เพื่อให้ได้สารต่างๆ โดยผ่านเมตาบอลิสมของเชื้อจุลินทรีย์

ลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose)

เป็นวัตถุดิบมีองค์ประกอบที่มีซับซ้อนกว่าแป้งประกอบด้วยของผสมของคาร์โบไฮเดรต (เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส) และลิกนิน โดยพันธะส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการรวมตัวกันมักเป็นพันธะไฮโดรเจน แต่มีบ้างที่เป็นพันธะโควาเลนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการทางชีวภาพในการเปลี่ยนแปลงลิกโนเซลลูโลสเป็นเชื้อเพลิงเอทานอลที่ต้องการมีดังนี้

1. Delignification เป็นการสลายลิกโนเซลลูโลส โดยการใช้เอนไซม์เพื่อให้ได้เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน
2. Depolymerization เป็นการสลายคาร์โบไฮเดรตให้ได้น้ำตาลอิสระ โดยเอนไซม์
3. กระบวนการหมักเป็นการหมักน้ำตาลเฮกโซส และ เพนโตส ให้ได้เอทานอลออกมา โดยเชื้อจุลินทรีย์

จากรายงาน พบว่าลิกนินสามารถถูกย่อยสลายได้ โดยใช้เอนไซม์จากเชื้อรา เช่น lignin peroxidase , Mndependent peroxidase (MnP) และ laccase (mono - phenol oxidase) ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน โดยเอนไซม์เหล่านี้ขึ้นกับ

- สายพันธุ์ของเชื้อรา
- ความเหมาะสมของสับสเตรทต่อเอนไซม์
- สภาวะของเชื้อ
- รูปแบบของถังปฏิกิริยา (bioreactor)

กระบวนการผลิตเอทานอลโดยอาศัยเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์

ในการสลายพอลิเมอร์ของเซลลูโลสเพื่อให้ได้น้ำตาลออกมา เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล เอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น เชื้อรา , ยีสต์และแบคทีเรีย

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์เชิงประกอบ (complex enzyme) ซึ่งประกอบด้วย เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) , เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) และ เซลโลไบโอส(cellobiase) ซึ่งผลดังกล่าวทำให้สามารถย่อยเซลลูโลสได้เป็นน้ำตาลอิสระ

เซลลูโลส (cellulose)

เป็นโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์เชิงเส้น (Linear homopolysaccharide) ประกอบด้วยน้ำตาล ดี-กลูโคส (D-glucose) ที่เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า-(1→4)ไกลโคซิดิก (β-(1→4) glycosidic) ถ้าไฮโดรไลซ์ (hydrolyze)ด้วยกรดแก่ จะได้น้ำตาลดีกลูโคส แต่ถ้าย่อยไม่สมบูรณ์ จะได้ reducing disaccharide คือเซลโลไบโอส

เอนไซม์ ไกลโคซิเดส(enzyme glycosidase) ที่พบในทางเดินอาหาร (digestive tract) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไม่สามารถย่อย พันธะเบต้า-(1→4)ไกลโคซิดิก (β-(1→4) glycosidic) ได้ แต่ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง สามารถใช้ได้ เนื่องจากแบคทีเรียในรูเมน (rumen) สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส (enzyme cellulase) มาย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาลดีกลูโคสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cellulase

cellulose → D-glucose

กรด (สมบูรณ์)

cellulose → D-glucose

กรด (ไม่สมบูรณ์)

cellulose → cellobiose

เซลลูโลส มีมวลโมเลกุล ตั้งแต่ 10 - 500 KD ประกอบด้วยน้ำตาลดีกลูโคส ประมาณ 15,000 หน่วย จากการศึกษาโดยใช้การหักเหรังสีเอ็กซ์ (X - ray diffraction) โมเลกุลของเซลลูโลสอยู่ในลักษณะเป็นเส้นยาวเรียงขนานกัน แต่ละเส้นจะเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้อยู่รวมกันเป็นมัดมีลักษณะเป็นเส้นใยเล็ก เรียกว่า ไฟบริล ซึ่งไม่ละลายน้ำเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืช,ไม้ ประกอบด้วย เซลลูโลสประมาณ 50% ฝ้าย (cotton) ก็คือ เซลลูโลสบริสุทธิ์

เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

เป็นโฮโมโพลิเมอร์ (homopolymer) ของน้ำตาลดีไซโลส (D- xylose) หรือน้ำตาลดีไซแลน (D-xylan) ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบตา-(1→4)ไกลโคซิดิก (β-(1→4) glycosidic) มี side chain ของน้ำตาลอาราบิโนส (arabinose) และน้ำตาลชนิดอื่น ๆ

hemicellulose → D-xylose หรือ D-xylan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสต่าง ๆ

	เปลือกข้าวโพด	ฟางข้าวสาลี	ฟางข้าว	แกลบ	เส้นใยชานอ้อย	เศษผ้าย	กระดาษหนังสือพิมพ์	Populus tristis	Douglas fir
Carbohydrate (% of sugar equivalent)									
กลูโคส	39.0	36.6	41.0	36.1	38.1	20.0	64.4	40.0	50.0
แมนโนส	0.3	0.3	1.8	3.0	NA	2.1	16.6	8.0	12.0
กาแลคโตส	0.8	2.4	0.4	0.1	1.1	0.1	NA	NA	1.3
ไซโลส	14.3	19.2	14.8	14.0	23.3	4.6	4.6	13.0	5.4
อะราบิโนส	3.2	2.4	4.5	2.6	2.5	2.3	0.5	2.0	1.1
Non-carbohydrate (%)									
ลิกนิน	15.1	14.5	9.9	19.4	18.4	17.6	21.0	20.0	28.3
แอช	4.3	9.6	12.4	20.1	2.8	14.8	0.4	1.0	0.2
โปรตีน	4.0	3.0	NA	NA	3.0	3.0	NA	NA	NA

ที่มา : Lee,1997

ดังนั้น แกลบจะมีส่วนประกอบของกลูโคสมากที่สุดคือ 36.1 % ในขณะที่กระดาษหนังสือพิมพ์จะมี 64.4 %

การจะใช้ประโยชน์จากกระดาษหนังสือพิมพ์ได้จะต้องเปลี่ยนสารประเภทเซลลูโลสต่างๆ เป็นกลูโคสก่อน โดยจะผ่านกระบวนการย่อยสลายที่เกิดจากการใช้เอนไซม์เซลลูเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์เซลลูเลส (Enzyme Cellulase) (นฤมล , 2532)

แหล่งเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสสกัดได้จากจุลินทรีย์และเนื้อเยื่อสัตว์หลายชนิด เช่น ***Aspergillus wentii , Aspergillus niger , Trichoderma viride , Penicillium funiculosum , Fusarium solani , Helix panatia*** ไส้เดือนดิน และ ***Octopus vulgaris*** เป็นต้น เอนไซม์เซลลูเลสจากแหล่งที่แตกต่างกันจะมีสมบัติต่างกัน อันได้แก่ สัดส่วนของเอนไซม์ องค์ประกอบ อุณหภูมิ และค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน

องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส

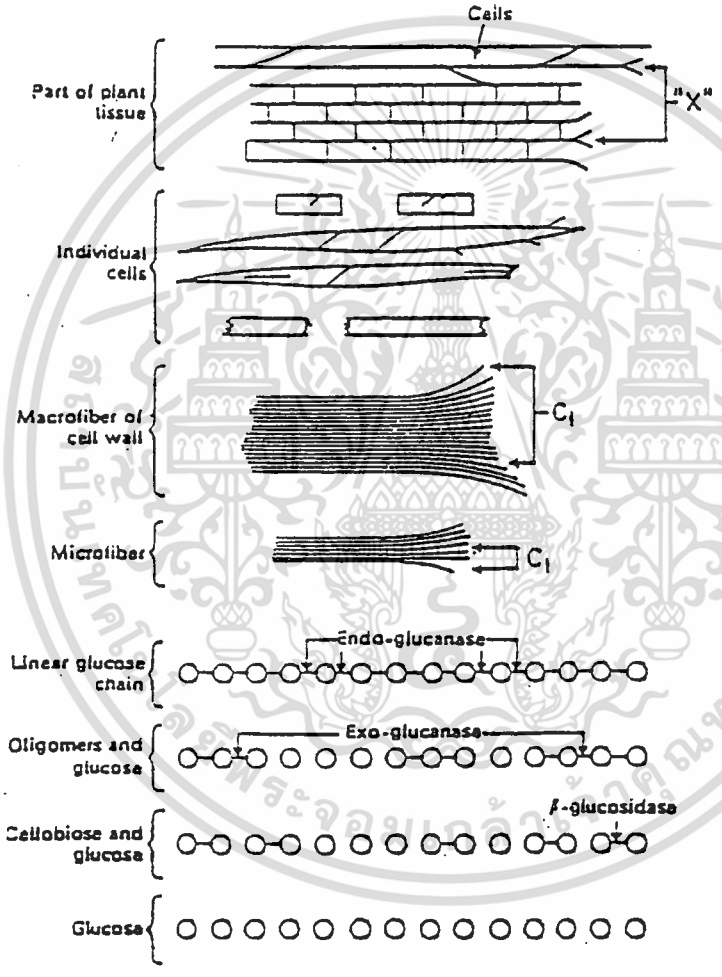
เอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ร่วมกัน เมื่อใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟฟีคและอิเล็กโตรฟอรีซีส สามารถแยกเอนไซม์เซลลูเลสที่ซับซ้อนออกเป็นองค์ประกอบย่อยๆได้ โดยพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสมีเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดเป็นองค์ประกอบหลักได้แก่

- เอนไซม์ซี 1 (C_1) ทำหน้าที่กระตุ้นหรือแยกสายของเซลลูโลสให้มีสภาพที่เหมาะสำหรับการเข้าทำงานของเอนไซม์อื่นๆต่อไป ดังนั้นเอนไซม์ซี 1 จึงจำเป็นอย่างยิ่งในกรณีที่มีการย่อยสลายสับสเตรทที่มีโครงสร้างซับซ้อน
- เอนไซม์ซีเอกซ์ (C_x) หรือเอนไซม์เบต้า-(1⟶4)กลูคาเนส (β-(1⟶4) glucanases) สามารถย่อยสลายอนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์นี้ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรทที่มีโครงสร้างซับซ้อนมากๆได้ การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์นี้มักใช้คาร์บอกซีเมธิล เซลลูโลสหรือไฮดรอกซีเอธิล เซลลูโลสเป็นสับสเตรท โดยวัดแอคติวิตีจากค่าความหนืดที่ลดลงหรือวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาการย่อยสลาย โดยปกติเอนไซม์ซีเอกซ์ มีเอนไซม์องค์ประกอบย่อยๆคือ
  - เอนไซม์เอนโด-เบตา-(1⟶4)กลูคาเนส (endo-β-(1⟶4) glucanases) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสโมเลกุลออกเป็นโอลิโกเมอร์และน้ำตาลกลูโคสบางส่วน
  - เอนไซม์ออกโซ-เบตา-(1⟶4)กลูคาเนส (exo-β-(1⟶4) glucanases) ทำหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลเซลลูโลสออกเป็นเซลโลไบโอสและน้ำตาลกลูโคส
- เอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส(β-glucosidases) หรือเอนไซม์เซลโลไบเอส ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสและเซลโลโอลิโกแซกคาไรด์ (cellooligosaccharides) สายสั้นๆ ได้น้ำตาลกลูโคส โดยสามารถย่อยเซลโลไบโอสและเซลโลทริโอสได้อย่างรวดเร็วและอัตราการย่อยสลายจะลดลงเมื่อความยาวของสายโมเลกุลเซลลูโลสเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

Cowling ได้เสนอสมมติฐานเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส โดยกล่าวว่ามีเอนไซม์ " x " ที่มักพบอยู่รวมกับเอนไซม์เซลลูเลสจะเข้าทำงานเป็นอันดับแรกที่ตำแหน่ง มิดเดิลลาเมลลา ทำให้เซลล์พืชถูกแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆมีการแตกแขนงของผนังเซลล์และเกิดการหักของเซลล์บางเซลล์ขึ้น จากนั้นเอนไซม์องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจะเข้าทำงานตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์ " x " และเอนไซม์องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส ตามสมมติฐานของ Cowling

ที่มา : นฤมล , 2532

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

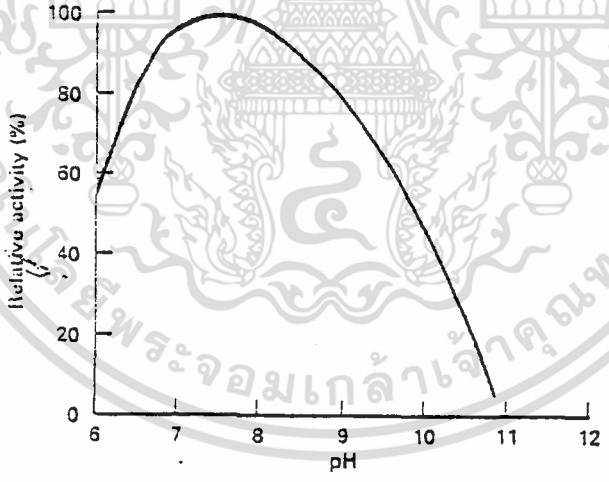
ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์ (Factors Influencing Enzyme Activity)

1. ผลของอุณหภูมิและพีเอช

เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นแอคติวิตีของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงจุดหนึ่งแล้วจะลดลงจุดอุณหภูมิที่เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุดจะเรียกว่า อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature)ซึ่งแต่ละชนิดของเอนไซม์จะมีลักษณะจำเพาะ ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 25- 40 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม จะทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีลดลง แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม จะเกิดการเสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อน (thermal denaturation) ขึ้น ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ถูกทำลาย

พีเอชมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เช่นเดียวกัน พีเอชที่ทำให้แอคติวิตีเอนไซม์สูงสุด เรียกว่า optimum pH ซึ่งอยู่ในช่วงพีเอช 6 - 7.5 ผลของพีเอชจะมีต่อการแตกตัว (ionize) ของหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่บนผิวของโปรตีน อันจะมีผลต่อบริเวณเร่งและโครงรูปของเอนไซม์ นอกจากนี้พีเอชที่ต่ำเกินไป จะทำให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ

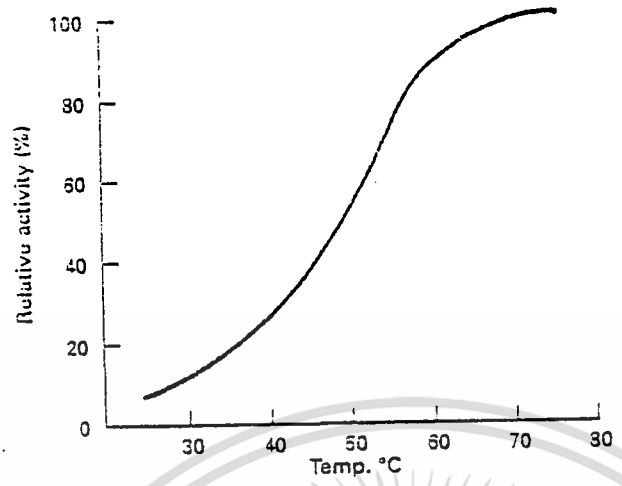
อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะที่กำหนด ดังแสดงได้ในรูปที่ 2 และรูปที่ 3



รูปที่ 2 แสดงแอคติวิตีที่เกิดขึ้นในค่าพีเอชต่างๆกัน โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสเป็น 0.0029 $KNUI^{-1}$ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของแคลเซียมเป็น 0.0009 โมลาร์

ที่มา : Godfrey และ West , 1996

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงแอคติวิตีที่เกิดขึ้นในค่าอุณหภูมิต่างๆกัน โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสเป็น 0.0014 $KNUI^{-1}$ พีเอช 9.0 และความเข้มข้นของแคลเซียมเป็น 0.00009 โมลาร์

ที่มา Godfrey และ West , 1996

2. ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์

อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ เมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทมากพอ (excess) อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น

3. ผลของความเข้มข้นของสับสเตรท

ถ้าความเข้มข้นเอนไซม์คงที่และเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรท จะพบว่าที่ความเข้มข้นของสับสเตรทน้อยๆปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเร็วมาก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสับสเตรทขึ้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆจนถึงจุดหนึ่ง อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะคงที่ ความเร็วของปฏิกิริยาที่สูงสุด เรียกว่า ความเร็วสูงสุด (V max)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสมีดังนี้

1. ความชื้นของเส้นใยเซลลูเลส

ความชื้นของเส้นใยเซลลูโลสทำให้เส้นใยเซลลูเลสเกิดการพองตัว เนื่องจากน้ำที่จับกับโมเลกุลของเซลลูโลสจะทำให้โครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสเปิดออก เอนไซม์เซลลูเลสสามารถแพร่ผ่านเข้าทำการย่อยสลายได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นสารประกอบที่ให้ธาตุอาหารที่สำคัญสำหรับเติมลงหมู่อิสระที่เกิดในกระบวนการทำลายพันธะไกลโคสิดิคอีกด้วย

2. ความสามารถในการแพร่ผ่านของเอนไซม์โมเลกุล (diffusibility)

เซลลูโลสที่ได้จากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติเหมือนเอนไซม์ทั่วไป คือเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำและมีมวลโมเลกุลสูง ทั้งขนาดและรูปร่างของเอสไซม์โมเลกุลเป็นปัจจัยกำหนดความสามารถในการแพร่ผ่านของเอนไซม์โมเลกุลเข้าสู่โครงสร้างของเซลลูโลสที่ซับซ้อน

3. ความเป็นผลึกของเซลลูโลส (crystallinity)

สายโมเลกุลเซลลูโลสที่มีการเรียงตัวกันอย่างมีระเบียบขนานกันไป และมีการเชื่อมทางด้านข้างของสายโมเลกุลเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้เกิดบริเวณที่มีลักษณะเป็นผลึก ซึ่งมีความต้านทานต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูโลสสูงกว่าบริเวณที่เป็นอสัณฐาน ซึ่งสายโมเลกุลเซลลูโลสที่การเรียงตัวเป็นระเบียบน้อยกว่าบริเวณแรก ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสสามารถแพร่ผ่านเข้าสู่โครงสร้างที่ไม่มีระเบียบได้ดีกว่า

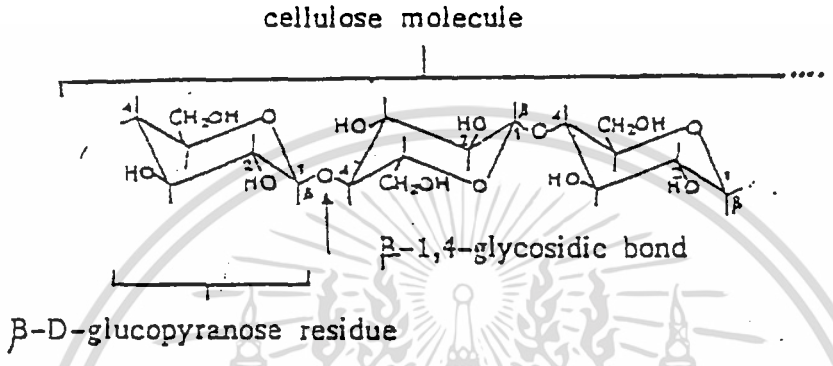
การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสมีแนวโน้มที่คล้ายคลึงกับการย่อยสลายด้วยกรด กล่าวคือ ในระหว่างการย่อยสลายนั้นขณะที่ส่วนอสัฐานซึ่งเป็นส่วนของโมเลกุลที่ไวต่อการย่อยสลายถูกย่อยสลายไป จะทำให้เซลลูโลสที่เหลือมีสัดส่วนของความเป็นผลึกเพิ่มขึ้น ความต้านทานต่อการย่อยสลายจึงเพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังนั้นการเตรียมสภาพขั้นต้นใดๆ ที่มีผลทำให้สัดส่วนความเป็นผลึกของเซลลูโลสลดลงได้ก็จะมีผลช่วยเพิ่มความไวของเซลลูโลสต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ การเตรียมสภาพที่ช่วยลดความเป็นผลึกของเซลลูโลสดังกล่าว รวมถึงการตกตะกอนจากสารละลาย และการรบกวนโดยวิธีกล เช่น การสั่นสะเทือนโดยการใช้เครื่องโม่แบบสั่นสะเทือน (vibratory ball miller) หรือการใช้รังสี

4. ลักษณะโครงรูป (conformation) ของกลูโคสในโมเลกุลเซลลูโลส

เซลลูโลสรูปผลึกมีความต้านทานต่อการย่อยสลายมากกว่าเซลลูโลสรูปอสัณฐาน เนื่องจากโครงสร้างทางกายภาพที่มีความเป็นระเบียบช่วยกีดกันการเข้าถึงของเอนไซม์เซลลูเลส นอกจากนี้ยังมีสาเหตุเนื่องจากโครงรูปและสภาพแข็งแกร่งแบบสเตอริก (steric rigidity) ของหน่วยแอนไฮโดรกลูโคส (anhydroglucose) ในบริเวณที่เป็นผลึก ซึ่งในบริเวณดังกล่าวหน่วยกลูโคสจะมีโครงรูปเป็นแบบเก้าอี้ (chair conformation) ที่มีหน่วยกลูโคสไพราโนส จัดเรียงตัวในทิศทางตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้ามกันในผลึก ดังรูปที่ 4 ทำให้เกิดความจำเพาะที่เรียกว่า สเตอริโอสเปซิฟิคซิตี (steriospecificcity) ของการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์



รูปที่ 4 การจัดเรียงตัวของหน่วยกลูโคไพราโนสในทิศทางตรงข้ามกันในผลึกเซลลูโลส
ที่มา : นฤมล , 2532

5. จำนวนหน่วยย่อยกลูโคสต่อโมเลกุลของเซลลูโลส

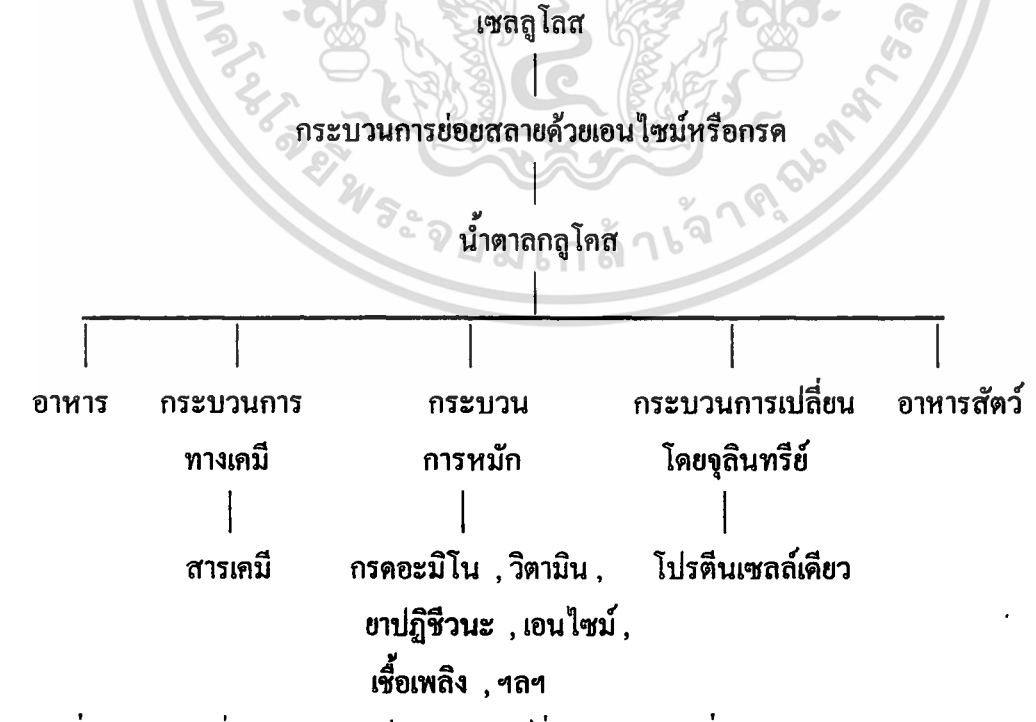
โมเลกุลของเซลลูโลสมีความยาวต่างกันตั้งแต่แกมมา-เซลลูโลสซึ่งมีหน่วยกลูโคสน้อยกว่า 15 หน่อยต่อโมเลกุล จนถึงแอลฟา-เซลลูโลส ซึ่งมี 10,000-14,000 หน่วยต่อโมเลกุล อัตราการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะต่างกัน ขึ้นกับขนาดของโมเลกุลเซลลูโลส โดยเฉพาะการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ตัดสายเซลลูโลสจากด้านปลาย (endwise mechanism)

ในระหว่างการย่อยสลายเซลลูโลสนั้นเมื่อสายเซลลูโลสถูกตัดให้สั้นลงจนกระทั่งโมเลกุลสามารถละลายได้ และไม่มีโครงสร้างซับซ้อนที่เกี่ยวข้องกับโมเลกุลอื่นมากนักจะพบว่าสายเซลลูโลสนั้นมีความไวต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้น

6. ธรรมชาติของวัตถุดิบที่เป็นแหล่งเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุดิบจากธรรมชาติที่เป็นแหล่งเซลลูโลส จะมีสารประกอบต่างๆ รวมถึงอินทรีย์สารที่ละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นกลาง (neutral solvent) เช่น อะซิโตน อีเธอร์ เมธานอล เอธานอล เบนซีน และน้ำ สารประกอบเหล่านี้มีอิทธิพลต่ออัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ เนื่องจากการสะสมของสารประกอบดังกล่าวภายในโครงสร้างที่เป็นแคปิลารี่ของผนังเซลล์มีผลกีดกันการเข้าถึงของเอนไซม์สู่เซลลูโลส นอกจากนี้สารประกอบบางชนิดยังมีผลโดยตรงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูโลสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แต่ไม่มีผลยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวในซิเตรตบัฟเฟอร์ที่พีเอชเดียวกัน และผลการยับยั้งนี้จะแตกต่างกันไปสำหรับเซลลูโลสจากแหล่งต่างกันลิกนินซึ่งรวมตัวอยู่ในโครงสร้างของเซลลูโลสและทำหน้าที่ห่อหุ้มไมโครไฟบริลให้รวมกันเป็นกลุ่มใหญ่นั้นมีผลจำกัดการเข้าทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ดังนั้นการย่อยสลายเซลลูโลสให้มีประสิทธิภาพสูงจำเป็นต้องกำจัดลิกนินออกบางส่วนเสียก่อน นอกจากนี้ชนิด ปริมาณ และการกระจายของกลุ่มแทนที่ (substituent groups) ก็มีผลต่ออัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเช่นกัน กล่าวคือ กลุ่มแทนที่ต่างๆ เช่น กลุ่มเมธิล กลุ่มเอธิล กลุ่มไฮดรอกซี่เอธิล กลุ่มคาร์บอกซีเมธิล เป็นต้น เมื่อกลุ่มเหล่านี้เข้าแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมของหมู่ไฮดรอกซิลขั้นปฐมภูมิ หรือหมู่ไฮดรอกซิลขั้นทุติยภูมิในเซลลูโลสเกิดเป็นอนุพันธ์ของ เซลลูโลส ทำให้เซลลูโลสมีความเป็นผลึกลดลงและมีการละลายเพิ่มขึ้น ทำให้อนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ได้นั้นมีความไวต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงจุดที่มีการละลายสมบูรณ์ (complete solubility) หลังจากจุดนี้แล้วอนุพันธ์ที่ได้จะมีความไวต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ลดลงเซลลูโลสเมื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลสำหรับหมักสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าสูงหลายชนิด ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 การเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าสูง **(ที่มา : นฤมล , 2532)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลสย่อยกระดาษหนังสือพิมพ์เป็นกลูโคส เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัตถุดิบร่วมกับการใช้เอนไซม์ เพื่อทำการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ซึ่งในการทดลองนี้ได้เลือกชนิดของเชื้อและผลิตภัณฑ์ที่ทดลองดังนี้

1. เชื้อ ***Saccharomyces calsbergensis*** ATCC 44732 เพื่อการผลิตเอทานอล
2. เชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 เพื่อการผลิตเอทานอล
3. เชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** เพื่อการผลิตกรดจิบเบอแรลลิก
4. เชื้อ ***Yarrowia lipolytica*** 5054 เพื่อการผลิตกรดซิตริก
5. เชื้อ ***Lactobacillus casei*** เพื่อการผลิตกรดแลกติก

การผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมสามารถทำได้ 3 ทางคือ

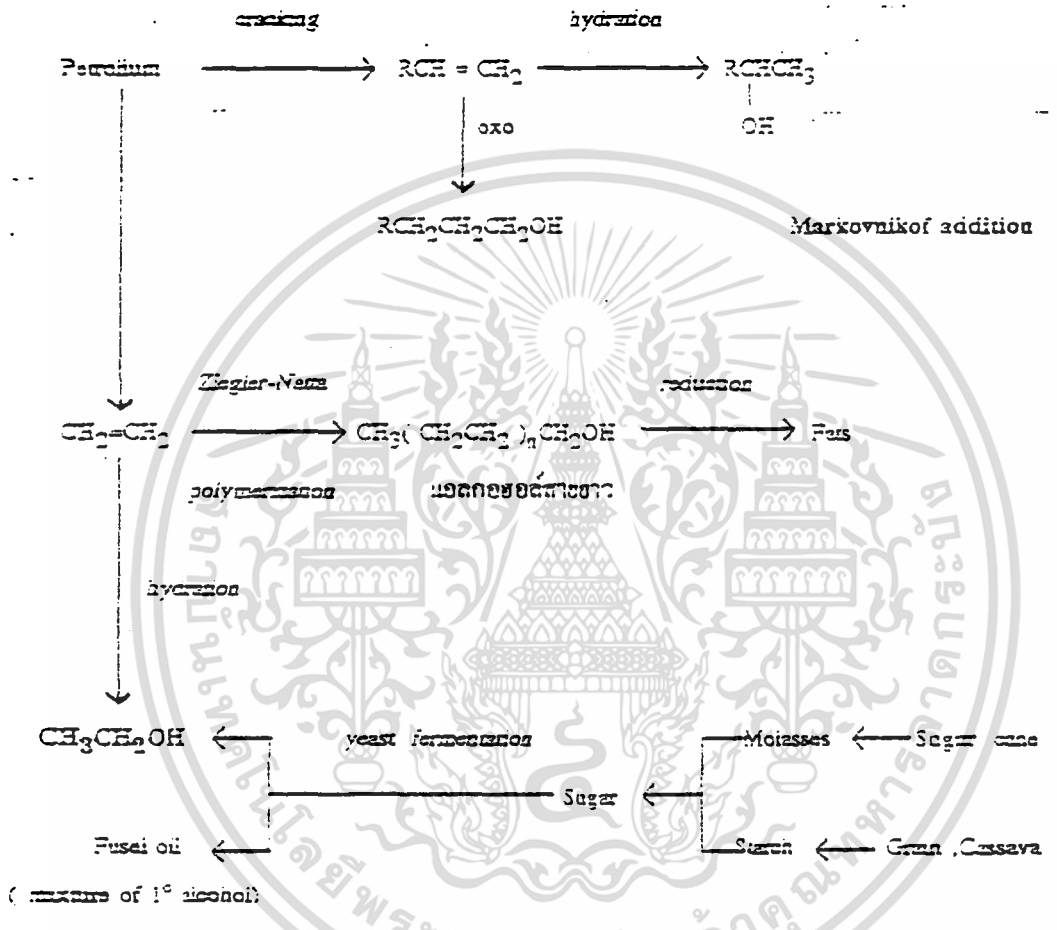
1. การไฮเดรชันสารพวกอัลคีนซึ่งได้จากการเกิดแครกกิ้ง (cracking) ของปิโตรเลียม
2. กระบวนการออกซิเดชันจากอัลคีน คาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน
3. การหมักของคาร์โบไฮเดรต

การใช้ประโยชน์จากเอทานอล

1. ใช้เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ
2. ใช้เป็นตัวทำละลายต่างๆในอุตสาหกรรมการทำแลกเกอร์ , น้ำมันวานิช , สี , น้ำหอม , และสารปรุงแต่งต่างๆ
3. ใช้เป็นตัวกลางในปฏิกิริยาต่างๆ
4. ใช้เป็นเชื้อเพลิง

ซึ่งแผนภาพการผลิตเอทานอลโดยทั่วไปในระดับอุตสาหกรรมแสดงดังรูปที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 แผนภาพแสดงการผลิตเอทานอลโดยทั่วไปที่ใช้ในอุตสาหกรรม

ที่มา : Arora และคณะ,1991

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล

1. **ความเข้มข้นของน้ำตาล** กรณีที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกินขีดจำกัดคือประมาณร้อยละ 22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะเกิดการรบกวนของสารตั้งต้นต่อการเจริญเติบโตของยีสตี ทำให้การเจริญเติบโตของยีสต์เป็นไปได้ยากซึ่งการหมักจะเป็นไปอย่างเชื่องช้าและไม่สมบูรณ์ทำให้เกิดกรดแลคติก กรดน้ำส้ม และสารอินทรีย์ต่าง ๆ ขึ้นได้ซึ่งส่วนมากจะเกิดในบรรยากาศของออกซิเจน แต่บางทีสามารถเกิดในบรรยากาศของคารบอนไดออกไซด์ได้ โดยปกติแล้วในกระบวนการหมักจะใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลร้อยละ 18 โดยปริมาตร เพื่อให้การเจริญเติบโตของยีสต์เป็นไปได้โดยปกติและให้เอทานอลในปริมาณสูงเหมาะแก่การนำไปกลั่น คือประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร

2. **ความเข้มข้นของเอทานอล** เอทานอลยิ่งมีความเข้มข้นมากก็ยิ่งมีผลทำให้การหมักช้าลงและเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลสูงเกินขีดจำกัด หรือมีความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่าร้อยละ 15โดยปริมาตรต่อปริมาตร ซึ่งขีดจำกัดอาจสูงหรือต่ำกว่านี้ ขึ้นกับชนิดของยีสต์ แต่เท่าที่พบจะสูงไม่เกินร้อยละ 18 โดยประมาตรต่อปริมาตร ซึ่งปริมาณของเอทานอลที่สูงกว่าขีดจำกัดนี้จะขัดขวางและหยุดการทำงานของยีสต์

3. **คาร์บอนไดออกไซม์และความดัน** คาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากปฏิกิริยาในการใช้น้ำตาลของยีสต์ จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ด้วย ถ้าไม่มีการระบายคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากระบบการหมักก็จะเกิดการเพิ่มความดันของคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งถ้าความดันสูงถึง 7.5 บรรยากาศ จะทำให้อัตราเร็วของการหมักลดลงจนกระทั่งความดันสูงถึง 8.0 บรรยากาศ อัตราเร็วของการหมักจะช้ามากหรือเกือบจะไม่เกิดเลย

4. **ออกซิเจน** ออกซิเจนจะถูกใช้ในการเจริญเติบโตและการแตกหน่อในกระบวนการหายใจเพื่อทำให้เกิดพลังงานในการดำเนินชีวิตซึ่งการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของยีสต์ในที่มีออกซิเจนจะไม่ให้เอทานอลออกมา แต่จะมีเพียงคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเกิดขึ้นเท่านั้น

5. **กรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติก** กรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติกจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ โดยความเข้มข้นที่มีผลต่อการเจริญ คือ ร้อยละ 0.1 - 0.5 ถ้ากรดโพรพิโอนิกและกรดบิวทีริกเกิดขึ้นด้วย ก็จะมีผลเช่นเดียวกับกรดน้ำส้ม

6. **ความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออน** ความเป็นกรดจะกีดขวางการเจริญของแบคทีเรียและราบางชนิด แต่ยีสต์จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีระหว่างพีเอช 3 - 5 ซึ่งจะมีผลทำให้อัตราการเจริญของยีสต์และอัตราการหมักเพิ่มมากขึ้น

7. **สารเร่งการเจริญเติบโต** นอกจากน้ำตาลแล้วยีสต์ยังต้องการสารประกอบอื่น ๆ เพื่อการเจริญเติบโตสารเหล่านี้ ได้แก่ วิตามินบีรวม เช่น ไบโอติน ไทอามีน ไรโบฟลาวิน กรดนิโคตินิค และกรดแพนทาโนอิก นอกจากนี้ไทอามีน ในรูปของไทอามีนฟอสเฟต ยังเป็นโคแฟคเตอร์ในการเปลี่ยนกรดไพรูวิคให้กลายเป็นเอทานอลอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

8. **โลหะ** ในพวกธัญพืชต่าง ๆ เช่น ข้าว จะมีพวกธาตุต่าง ๆ เช่น แคลเซียม ทองแดง เหล็ก แมกนีเซียม และ แมงกานีส ซึ่งเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์และในกระบวนการหมักเอทานอลจากกลูโคส ถ้าปริมาณของโลหะมากเกินไป จะกลายเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ สารประกอบพวกซัลเฟอร์ จะทำให้ยีสต์แก่เร็ว ส่วนพวกเหล็ก อลูมิเนียม ตะกั่ว สังกะสี ไม่ค่อยมีผลมากนักต่อปฏิกิริยาการหมัก แต่ถ้าเป็นพวกแคดเมียม ทองแดง ปรอท แพลเลเดียม ออสเมียม และ เงิน จะเป็นสารหน่วงการเจริญเติบโตของยีสต์อย่างแรง

9. **อุณหภูมิ** อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการทำงานของยีสต์ และมีผลทางอ้อมต่อปริมาณเอทานอลและสารประกอบอะโลมาติกต่าง ๆ อุณหภูมิส่วนใหญ่ที่ใช้ในการหมักจะอยู่ประมาณ 10 - 30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วงนี้ จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ เพิ่มมากขึ้นเป็น 2 เท่า ถ้าอุณหภูมิสูงมาก ๆ จะทำให้เอนไซม์ในยีสต์เกิดสภาพว่องไวต่อปฏิกิริยาลดลงในระหว่างอุณหภูมิ 55 - 65 องศาเซลเซียส ยีสต์อาจตายได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ที่นำมาใช้ในการหมัก ถ้าอุณหภูมิในการหมักต่างกัน จะทำให้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นแตกต่างกันได้ เช่น ที่อุณหภูมิในการหมักต่ำ ๆ จะเกิดพวกเอสเทอร์ อะซีตัลดีไฮด์ ไอโซเอมิล และ แอคทีฟเอมิลอัลกอฮอล์ ในปริมาณที่น้อย (Kosaric et al., 1983)

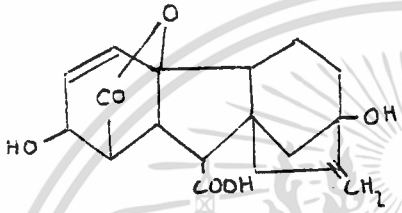
จากรายงานการวิจัย พบว่า Morris Wayman และคณะ (1992) ได้ทำการทดลองใช้กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล โดยใช้เชื้อยีสต์ ***Saccharomyces cerevisiae*** พบว่าเมื่อนำการะดาษหนังสือพิมพ์มาวิเคราะห์หาความเป็นไปได้ ในการผลิตเอทานอล โดยดูจากเปอร์เซนต์ของคาร์โบไฮเดรตจะได้ 70.9 เปอร์เซนต์ เมื่อนำมาคำนวณทางทฤษฎี โดยใช้สูตร **(Carbohydrate as sugars *0.51*10)** จะได้ปริมาณเอทานอล 457 ลิตร/ตัน แต่ไม่มีการแสดงผลเอทานอลที่ได้จากการทดลอง

และถ้าใช้กระดาษออฟฟิศ (Sherdded White Office Paper , SWOP) มาเป็นวัตถุดิบ โดยจะถูกเปลี่ยนให้เป็นเอทานอล (ตามทฤษฎี) ได้เอทานอลมากที่สุดคือ 568 ลิตรต่อตัน และให้ผลผลิตสุทธิ(yield)ของเอทานอลที่สูงกว่า 350 ลิตรต่อตันในกรณีที่เป็นการทดลอง ซึ่งเอทานอลที่ได้มีความเข้มข้นมากกว่า 6 เปอร์เซนต์โดยปริมาตร และถ้าใช้กระดาษหลายอย่างมารวมกัน (Mixed Waste Paper , MWP) จะให้เอทานอล 306 ลิตรต่อตัน ความเข้มข้นที่ได้เป็น 6.1 เปอร์เซนต์โดยปริมาตร ซึ่งคิดเป็น 87 เปอร์เซนต์ของผลผลิตสุทธิจากกระดาษออฟฟิศ ส่วนกระดาษหนังสือพิมพ์จะได้เอทานอล (ตามทฤษฎี) 457 ลิตรต่อตันและมีความชื้น 8.9 เปอร์เซนต์ เถ้า 0.3 เปอร์เซนต์ คาร์โบไฮเดรต (คิดเป็นน้ำตาล 70.9 เปอร์เซนต์ โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้คือ ***Klebsiella oxytoca*** P_2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการถ่ายยีนจาก ***Zymomonas mobilis*** กระดาษหนังสือพิมพ์ที่ใช้จะถูกย่อยก่อนโดยใช้กรดและน้ำกลั่น ซึ่งให้ผลผลิตออกมาไม่แตกต่างกัน (Wayman et al., 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
30621

การผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

ฮอร์โมนพืชที่จัดว่ามีโครงสร้างที่ซับซ้อนและพบว่าผลิตโดยเชื้อรา ***Gibberella fujikuroi*** เชื้อราชนิดนี้เป็นระยะ perfect stage ของเชื้อ ***Fusarium moniliforme*** ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เชื้อรา ***Gibberella fujikuroi*** บางสายพันธ์จะผลิตจิบเบอเรลลินที่รู้จักกันดีว่า กรดจิบเบอเรลลิก (Gibberellic acid) หรือ จิบเบอเรลลิน (Gibberellin A_3) สูตรทางเคมี $C_{19}H_{22}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 346.37 (รูปที่ 7) กรดจิบเบอเรลลิกสามารถผลิตขึ้นได้โดยกระบวนการหมัก อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จะต้องมีปริมาณไนโตรเจนต่ำและต้องมีแหล่งคาร์โบไฮเดรต ซึ่งบางครั้งมีการใส่กลีเซอรอล (grycerol)เข้าไปเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น



รูปที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของกรดจิบเบอเรลลิก
ที่มา : บัญญัติ , 2534

ประโยชน์ของกรดจิบเบอเรลลิก

1. ในทางการเกษตร เช่น เพิ่มผลผลิตของพืช เร่งการออกดอก และการเจริญของต้นกล้า นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการทำให้องุ่นไม่มีเมล็ดอีกด้วย

2. ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์หรือ การแบ่งตัวของเซลล์ หรือทั้งการยืดตัวและการแบ่งตัวของเซลล์

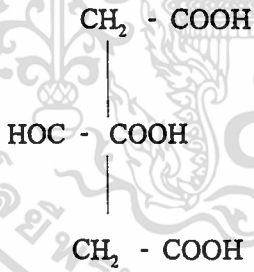
จากกระบวนการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิดกรดจิบเบอเรลลิกพบว่าในปี 1926 Kurosawa ได้พบว่าสารที่กรองได้จากการเพาะเลี้ยง ***Fusarium Moniliforme*** สามารถทำให้ข้าวยืดยาวได้ จากนั้นได้มีการประสบความสำเร็จในการแยก ผลึกของแข็งที่เรียกว่า จิบเบอเรลลินออกมาเป็น 2 รูปแบบ คือ A และ B ต่อมา Curtis & Gross , Stodela และคณะ (1955) ได้พบว่า กรดจิบเบอเรลลิกเป็นส่วนประกอบที่ได้จากการแยก ผลึกของแข็งเหล่านั้น Stodela (1958) และ Darken , Jensen , Shu (1959) ได้ทำการศึกษาการผลิกรดจิบเบอเรลลิกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี น้ำสกัดจากข้าวโพด, แอมโมเนียมซัลเฟต ($NH_4)_2SO_4$, โพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ในสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่ำ , กลีเซอรอลและมีการเติมแลคโตสในระหว่างการเพาะเลี้ยง จากการทดลองดังกล่าวสามารถผลิตจิบเบอเรลลิกได้ปริมาณสูงสุดในวันที่ 7-8 ของการหมัก เป็น 805-880 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมาในปี 1963 ได้มีการศึกษาการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ในอาหารที่มีกลูโคสโดยใช้กระบวนการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบชีวภาพโดย A. sanchez -Marroquin (Sanchez-Marroquin ,A., 1963) ได้ศึกษาการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกจากสารตั้งต้น (substrate) ต่างๆกัน โดยใช้เชื้อ ***Fusarium*** 43 สายพันธุ์ ซึ่งจากการทดลองทำให้ได้เชื้อ ***Fusarium moniliforme*** สายพันธุ์ ICC -3326 ซึ่งมีศักยภาพสูงสุด โดยใช้สารตั้งต้นในปริมาณที่ทำให้ได้ผลิตผลสูงสุด เมื่อได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัม , corn streep liquor 25 กรัม, แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) 2.6 กรัม, โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.5 กรัม, โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 0.2 กรัม และน้ำ 1000 มิลลิลิตร สามารถผลิตจิบเบอเรลลินได้สูงสุด 1,196 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระดับ ฟลาสก์รูปชมพู่ และ 997 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระดับ ถังหมักขนาดเล็ก นอกจากนี้ ในปี 1976 Moddose I.S. และ Richert S.H. ได้ศึกษาการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยใจกากของเสียจากอุตสาหกรรมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ จุลินทรีย์ (Moddose I.S. & Richert S.H.,1976) โดยากากของเสียที่ใช้คือหางนมที่ได้จากกระบวนการกรองเอาเคซีนออกไป โดยเชื้อ ***Fusarium moniliforme*** (ACC 917) ซึ่งสามารถผลิตกรดจิบเบอเรลลิกได้สูงสุด 750 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากระยะเวลาการหมัก 12 วัน

การผลิตกรดซิตริก

กรดซิตริกหรือกรดมะนาว มีชื่อทางเคมีว่า 2- ไฮดรอกซี-1,2,3-โพรเพนไตรคาร์บอกซีลิกแอซิด (2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid , $HOC(CH_2CO_2H)_2CO_2H$) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังนี้



รูปที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของกรดซิตริก
ที่มา : Casida (1964)

กรดมะนาว แบ่งเป็น

1. กรดมะนาวผงไร้น้ำ (Anhydrous , $C_6H_8O_7$) มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 153 องศาเซลเซียส
2. กรดมะนาวผงที่มีน้ำหนึ่งโมเลกุล (Monohydrous , $C_6H_8O_7 . H_2O$) มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติของกรดซิตริก (ดุษณี , 2537)

1. มีความสามารถในการละลายสูง
2. มีความเป็นพิษต่ำ
3. มีรสเปรี้ยวที่ยอมรับได้
4. มีกลิ่นหอม
5. ย่อยสลายได้ง่าย
6. ราคาถูก
7. หาได้ง่าย

ประโยชน์ของกรดซิตริก

1. **อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม** โดยใช้เป็นส่วนผสมในการทำลูกกวาด , ผลไม้เชื่อม , ลูกอม , แยม , เยลลี , ผักผลไม้ดอง , น้ำหวาน , น้ำเชื่อม , น้ำอัดลม , น้ำผลไม้ , ไวน์ , อาหารแข็ง , อาหารกระป๋อง , เนยแข็ง , ไอศครีม และอื่นๆ ซึ่งกรดซิตริกมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มกลิ่นรส ควบคุมความเป็นกรด ลดความฝาด ป้องกันการเปลี่ยนสีและกลิ่นของเครื่องดื่มและอาหารแข็ง ป้องกันการขุ่นของไวน์ เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในผลิตภัณฑ์นมต่างๆ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการเก็บถนอมอาหารอีกด้วย

2. **อุตสาหกรรมยา** ใช้เป็นส่วนผสมในการทำยาบางชนิด เป็นสารทำให้เกิดฟองฟู่เมื่อผสมกับคาร์บอเนตหรือไบคาร์บอเนต โดยใช้ในการเตรียมยาลดกรด หรือแอสไพรินที่ละลายน้ำได้ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสแตบบิไลซ์เซอร์ (stabilizer) ในวิตามินซีอีกด้วย การใช้ผสมกับยาจะใช้ในรูปของเกลือหรือเอสเตอร์ของกรดซิตริก

3. **อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง** ใช้เป็นส่วนผสมของครีมนวดผมและโลชั่น โดยจะควบคุมระดับพีเอชของผลิตภัณฑ์ และช่วยเพิ่มความแวววาวและความอ่อนนุ่มของผลิตภัณฑ์ด้วย นอกจากนี้ยังเป็นวัตถุกันเสียอีกด้วย

4. **อุตสาหกรรมอื่นๆ** เช่น ใช้ทำความสะอาดโลหะ ล้างสนิม เนื่องจากกรดซิตริกสามารถรวมตัวกับโลหะหนักพวกเหล็กและทองแดงเป็นอย่างดี ใช้ผสมกับผงซักฟอกในรูปของไตรโซเดียมซิเตรตแทนการใช้พอลิฟอสเฟตเพื่อช่วยในการทำความสะอาดให้ดีขึ้น ใช้เป็น plasticizer ในแผ่นฟิล์มพลาสติกที่ใช้ห่อหุ้มอาหารในรูปของไตรเอทิล , ไตรบิวทิล และอะซิติลไตรบิวทิลเอสเตอร์ เนื่องจากไม่มีความเป็นพิษ ใช้เป็นส่วนผสมของหมึกพิมพ์ น้ำและสี ใช้เป็น softner ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรรมวิธีการผลิตกรดซิตริก แบ่งเป็น

1. การผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา (citric acid production by fungi)

ปัจจัยในการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรามีดังนี้

ก. สายพันธุ์ของเชื้อรา (Fungal strains)

เชื้อราที่สามารถสะสมกรดซิตริกในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ ***Aspergillus niger*** , ***Aspergillus awamori*** , ***Aspergillus luchensis*** , ***Aspergillus flavus*** , ***Penicillium janthinellum*** , ***Penicillium restrictum*** , ***Trichoderma viride*** , ***Mucor piriformis*** , ***Ustulina vulgaris*** และเชื้อราสายพันธุ์ **Botrytis** , **Ascochyta** , **Absidia** , **Talaromyces** , **Acremonium** และ **Eupernicillium**ซึ่ง ***Aspergillus niger*** เป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม

ข้อได้เปรียบของการผลิตกรดซิตริกโดยาชื้อรา

1. การปฏิบัติงานสามารถทำได้ง่าย
2. วัตถุดิบที่เชื้อราสามารถใช้เพื่อผลิตกรดซิตริกมีราคาถูก
3. ผลิตผลที่ได้มีปริมาณสูง

ข. ชนิดของกระบวนการหมัก (types of fermentation process)

มี 2 กระบวนการดังนี้

1. กระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว นิยมใช้ในการผลิตกรดซิตริกเป็นอันมาก โดยแบ่งได้หลายกระบวนการได้แก่

1.1 กระบวนการหมักที่ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ (surface culture fermentation process)

1.2 กระบวนการหมักในถังหมักทรงลึก (deep fermentation process)

1.3 กระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลวแบบ 2 ขั้นตอน (2 - stage submerged fermentation process)

2. กระบวนการหมักในสภาพอาหารแข็ง

ค. สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา (culture condition)

ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆดังนี้

1. **ธาตุอาหาร**
2. **การแปรสภาพวัตถุดิบ**
3. **พีเอช**
4. **หัวเชื้อ**
5. **การควบคุมสภาพการหมัก**
6. **สารกระตุ้น**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.การผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อยีสต์ (citric acid production by yeast)

เชื้อยีสต์ที่พบว่ามีการสะสมกรดซิตริก ในระหว่างการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ ***Candida , Hansenula , Pichia , Debaryomyces , Torulopsis , Kloeckera , Trichosporon , Torula , Rhodotorula , Sporobolomyces , Endomyces , Nocardia , Saccharomyces*** และ ***Zygasaccharomyces*** เป็นต้น ซึ่งเชื้อ ***Candida*** เป็นเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกอย่างกว้างขวางและมีหลายสปีชีส์ (species) เช่น ***Candida lipolytica , Candida tropicalis , Candidazeylanoides , Candida fibrae , Candida intermedia , Candida parapsilosis , Candida petrophilum , Candida subtropicallis , Candida oleophila , Candida hitachinica , Candida citrica , Candida guilliermondii*** และ ***Candida sucrosa***

ในการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อยีสต์นี้มีวัตถุดิบที่ใช้หลายชนิดด้วยกัน เช่น กลูโคส , อะซิเตท , ไฮโดรคาร์บอน , กากน้ำตาล , แอลกอฮอล์ , กรดไขมัน และน้ำมันธรรมชาติ ทั้งนี้จะกล่าวถึงการหมักกรดซิตริกจากวัตถุดิบแต่ละชนิด ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

1. การผลิตกรดซิตริกจากน้ำตาลกลูโคส

น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นเท่ากัน 10 - 18 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้สารอาหารอื่น ๆ ที่ใช้ประกอบด้วย NH_4Cl ,H_2PO_4, $MgSO_4$. $7H_2O$ และ $CaCO_3$ (ซึ่งเป็นสารที่ใช้สะเทินหรือ neutralizing agent) อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของสารอาหารต่างๆ ที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อกับสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์เป็นหลัก หลักจากถ่ายเชื้อยีสต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วทำการหมักที่อุณหภูมิระหว่าง 22 - 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-6 วัน และในระหว่าการหมักจะต้องมีการให้อากาศอย่างเต็มที่ โดยอาจใช้การปั๊มอากาศบริสุทธิ์เข้าไปโดยตรง หรืออาศัยการกวนในอัตราที่ค่อนข้างสูง ทั้งนี้เพราะเชื้อยีสต์นำออกซิเจนที่ได้สำหรับการเจริญเติบโตและกระบวนการแมตาบอลิสมของมัน

2. การผลิตกรดซิตริกจากกากน้ำตาล

เชื้อยีสต์ที่ใช้อยู่ในสายพันธุ์ (***Candida*** เช่น ***Candida guilliermondii*** และ ***Candida lipolytica*** สำหรับส่วนประกอบของอาหารเชื้อที่เหมาะสมประกอบด้วยน้ำตาล (50-250 กรัมต่อลิตร) แหล่งไนโตรเจน(ในรูปของ $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl หรือ NH_4NO_3) แร่ธาตุและวิตามินบีรวม ปรับพีเอช 5.5-6.5 รวมทั้งให้อากาศแก่น้ำหมักในอัตรา 0.3-1.5 vvm ผลของการหมักจะได้ กรดซิตริกในรูป citrate monohydrate เท่ากับ 1,119 กิโลกรัม เมื่อเทียบกับน้ำตาลในวัตถุดิบ 3,145 กิโลกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การผลิตกรดซิตริกจากแอลกอฮอล์

แอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมีหลายชนิดทั้งเมทานอล เอทานอล บิวทานอล รวมถึงแอลกอฮอล์ที่มี 12-16 คาร์บอน ซึ่งเชื้อยีสต์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนในรูปที่ได้แก่ ***Candida fibrae***, ***Candida subtropiclis***, ***Pichia farinosa***, ***Candida lipolytica***, และ ***Torulopsis xylinus*** เป็นต้น ทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลกอฮอล์ประมาณ 1-2 เปอร์เซนต์ กรัมต่อลิตร ภายใน 7 วัน

4. การผลิตกรดซิตริกจากกรดไขมัน น้ำมันธรรมชาติและไขมัน

ยีสต์สายพันธุ์ ***Candida, Hansenula*** และ ***Pichia*** สามารถใช้กรดไขมัน (fatty acid) น้ำมันธรรมดิ (natural oils) และไขมัน (Fats) เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดซิตริกได้ ผลผลิตกรดซิตริกที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้แต่ละอย่าง

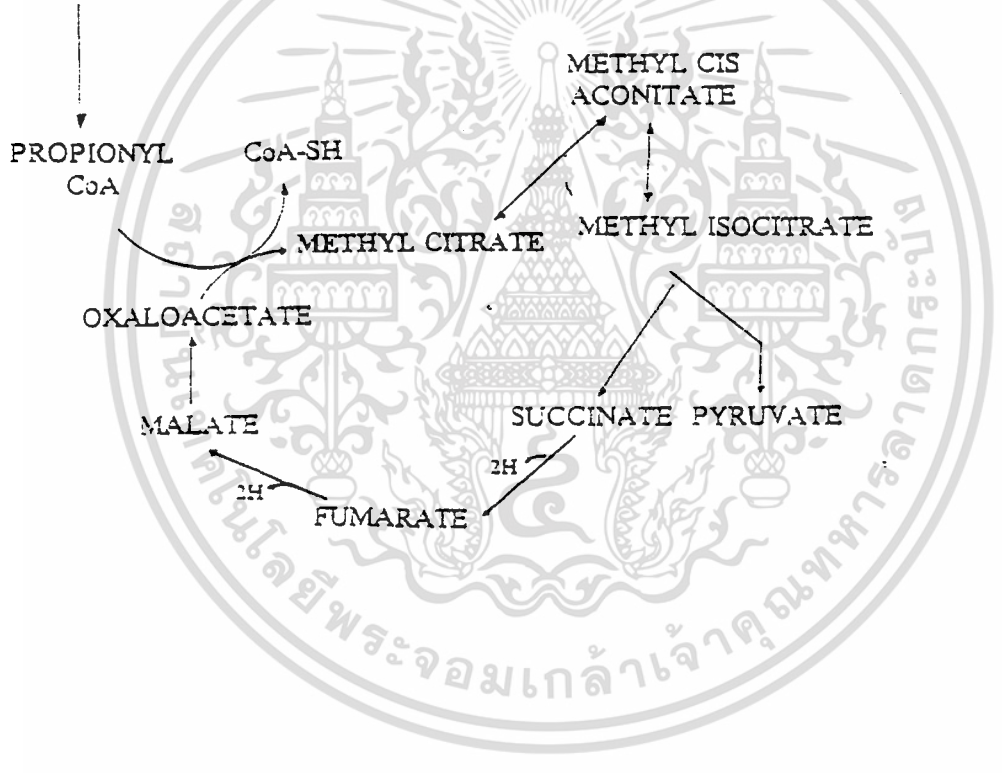
ในการใช้เชื้อยีสต์เพื่อผลิตกรดซิตริก มักจะมีปัญหาการสะสมกรดไอโซซิตริก (isocitric acid) ควบคู่กันด้วย จึงทำให้ผลผลิตของกรดซิตริกลดลงเพราะส่วนหนึ่งของกรดซิตริกถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไอโซซิตริก เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ Aconitase สูง อย่างไรก็ตาม เราสามารถที่จะควบคุมการหมักให้มีการสะสมการกรดไอโซซิตริกลดลง โดยอาศัยการควบคุม ปริมาณ เฟอริคไอออน (Ferric ion) ให้อยู่ในระดับต่ำ แต่ปัญหาอยู่ที่การควบคุมปริมาณเฟอริคไอออนให้อยู่ในระดับที่ต้องการดังกล่าวสามารถทำได้ยาก ดังนั้นจึงได้มีการประยุกต์ใช้ การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมและให้กรดซิตริกสูง ในขณะที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ Aconitase ต่ำ จึงทำให้ปริมาณกรดไอโซซิตริกลดลงไปด้วย ดังนั้น เชื้อ ***Candida lipolytica*** สายพันธุ์ที่ไวต่อสารฟลูออโรอะซิเตท (fluoroacetate-sensitive strains) เป็นต้น

การเปรียบเทียบการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อยีสต์ และเชื้อรากลุ่ม ***Aspergilli*** พบว่าการหมักด้วยเชื้อยีสต์ให้ข้อได้เปรียบในด้านการพัฒนากระบวนการหมักให้เป็นกระบวนการหมักอย่างต่อเนื่องเพราะการควบคุมให้เชื้อยีสต์เจริญและทำการหมักอย่างต่อเนื่องทำให้สามารถทำได้ง่ายกว่าเชื้อรานั่นเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวเคมีของการหมักกรดซิตริก (biochemistry of citric acid fermentation)

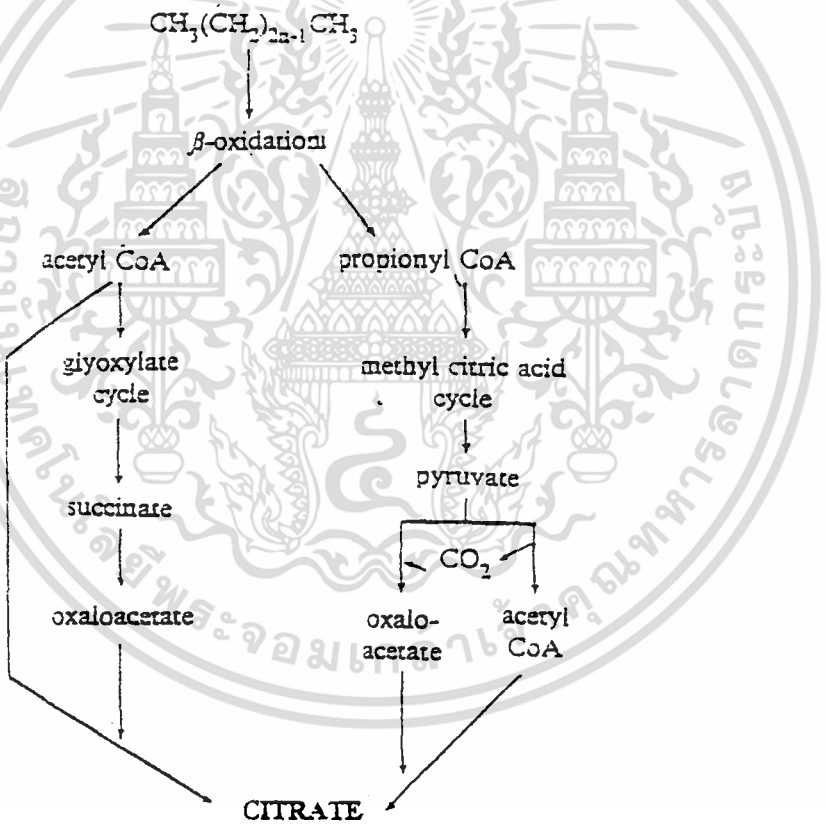
สำหรับแนวทางการสังเคราะห์กรดซิตริกจากเชื้อยีสต์ จะผ่านทาง TCA cycle เป็นส่วนใหญ่ โดยที่ระหว่างการสังเคราะห์กรดซิตริกจะเกิดการสะสมกรดไอโวซิตริกควบคู่ไปด้วยเสมอ นอกจากนี้ยีสต์สามารถใช้ไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนในการสังเคราะห์กรดซิตริก โดยผ่านทางเมทิลซิตริกแอซิด (Methyl citric acid cycle) ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 แนวทางในการสังเคราะห์กรดซิตริกของเชื้อยีสต์ โดยผ่านทาง Methyl citric acid cycle
ที่มา : Tabuchi et al., 1974

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยอาศัยปฏิกิริยา Partial oxidation ของ propionyl CoA (ซึ่งถูกสร้างขึ้นมาในระหว่างกระบวนการ beta - oxidation ของอัลเคนส์) เกิดเป็นไพรูเวต ทั้งนี้โดยมีกรดประเภท C_7-tricarboxylic acids เป็นสารตัวกลาง ซึ่งทำให้เกิดการสะสมกรดซิตริค ในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ดังกล่าว สำหรับปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงมีดังนี้ หลังจากที่ propionyl CoA รวมตัวกับ oxaloacetate เกิดเป็น methyl citric acid ขึ้นแล้วจะถูกเปลี่ยนเป็น methyl-isocitric อีกต่อหนึ่ง หลังจากนั้นจึงถูกแยกออกเป็น puruvate และ succinate แล้ว succinate ถูกออกซิไดส์ต่อไป โดยผ่านทาง TCA cycle เกิดเป็น oxaloacetate ซึ่งจะนำกลับเข้ามาทำปฏิกิริยาผ่านทาง Methyl citric acid cycle อีกครั้งหนึ่ง นอกจากนี้แล้ว การสังเคราะห์กรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์ที่สามารถใช้ไขมันเป็นแหล่งคาร์บอน ยังอาศัย glyoxylate pathway ได้อีกแนวทางหนึ่ง ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 แนวทางในการผลิตกรดซิตริกของเชื้อยีสต์ที่ใช้ n- alkanes เป็นแหล่งคาร์บอน

ที่มา : Tabuchi and Serizawa , 1975

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.การผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อแบคทีเรีย (citric acid production by bacteria)

การหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อแบคทีเรีย ได้มีการศึกษาน้อยมากในช่วงเวลา 10 ปี ที่ผ่านมา อย่างไรก็ตาม พบว่าแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ ***Bacillus licaheniformis, Bacillus subtilis*** และ ***Brevibacterium flavum*** สามารถผลิตกรดซิตริได้โดยใช้วัตถุดิบพวกน้ำตาลกลูโคส หรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและต้องเติมส่วนประกอบอื่น ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออีก เช่น แหล่งไนโตรเจนในรูปของยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต หรือกลูตาเมท (กรดอะมิโนชนิดหนึ่ง) พร้อมทั้งแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นต้น

ถึงแม้การศึกษาในการใช้แบคทีเรียเพื่อผลิตกรดซิตริค มีน้อยก็ตาม แต่วิธีการที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริคด้วยเชื้อแบคทีเรีย ได้ถูกจัดทำสิทธิบัตรถือเป็นกรรมสิทธิ์ ตามกฎหมายแล้วหลายวิธีการด้วย อาทิเช่น Sardinas (1972)ได้จดสิทธิบัตรวิธีการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อ ***Bacillus licheniformis*** ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ในณะที่ Fukuda และ คณะ (1970) จดสิทธิบัตรวิธีการผลิตใช้เชื้อใช้เชื้อ ***Corynebacterim*** ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ พาราฟินเป็นวัตถุดิบ เป็นต้น

นอกจากเชื้อแบคทีเรียที่กล่าวมาแล้ว ยังมีรายงานการทดลองระบุว่า เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มของ ***Klebsiella, Arthrobacter, Pseudomonas , Micrococcus , Bacillus , Brevibacterium , Corynebacterium*** และ ***Arthrobacter*** เป็นต้น สามารถทำการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อแบคทีเรียจะมีแนวโน้มที่เป็นไปได้สูง ซึ่งพอจะกล่าวได้ว่าเป็นแนวทางใหม่อีกแนวทางหนึ่งในการผลิตกรดซิตริกในอนาคต

การผลิตกรดแลคติก

เป็นผลิตผลขั้นสุดท้ายของกระบวนการไกลโคไลซีส โดยใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นวัตถุดิบ (ดุษณี, 2537) ผลิตโดยรา ***Rhizopus oryzae*** ใช้เวลาในการหมัก นาน 30 -35 ชั่วโมง ได้กรดประมาณ 70-75 เปอร์เซนต์ ส่วนแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตได้แก่สกุล ***Lactobacillus*** ซึ่งแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปตาม วัตถุดิบที่ใช้ เช่น ***Lactobacillus delbruckii*** ใช้น้ำตาลเดกซ์โตสจากแป้งข้าวโพด ***Lactobacillus bulgaricus*** ใช้น้ำตาลแลคโตส หางนม (whey) ส่วน ***Lactobacillus plantarum*** ใช้น้ำตาลเพนโตส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอมในของเสียจากอุตสาหกรรมกระดาษ และ ***Lactobacillus delbrueckii*** B445 สามารถใช้กระดาษเป็นวัตถุดิบในการผลิตได้ (Schmidt, 1997) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับปฏิกิริยาทางชีวเคมีการผลิตกรดแลกติกจะเป็นดังสมการ (บัญญัติ, 2534)

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow 2C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{system}} 2\,CH_3\,CHO\,HCOOH$$

lactose glucose + galactose lactic acid

ในปัจจุบันกรดแลกติคใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เป็นสารให้รสเปรี้ยวและวัตถุกันเสีย ในอุตสาหกรรมเคมี ใช้สำหรับพิมพ์โลหะ และใช้สำหรับการทำเครื่องสำอางและเกี่ยวกับสิ่งทอ อย่างไรก็ตามประโยชน์ที่ใช้สำคัญของกรดแลคติกคือ ใช้เป็นวัตถุดิบของการผลิตสารโพลีแลคไทด์ (polylactide products) ซึ่งเป็นวัสดุสำหรับบรรจุสินค้า , เส้นใยในการศัลยกรรม และควบคุมการดูดซึมยาในคน

การผลิตโดยส่วนใหญ่จะเกิดจากการใช้กลูโคส โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้สูงกว่า 90 เปอร์เซนต์ (ตามทฤษฎี) แต่มีการทดลองค้นคว้าการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุจากของเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมต่าง ๆเช่น เส้นใยข้าวโพด, ซังข้าวโพด และกระดาษเหลือใช้ ซึ่งวัสดุเหล่านี้จะอุดมไปด้วยสารโพลีแซคคาไรด์ (เซลลูโลสและ / หรือ เฮมิเซลลูโลส) สามารถหมักให้เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ด้านเชื้อเพลิงและสารเคมีต่างๆโดยผ่านการไฮโดรไลซ์และกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ซึ่งกรดแลคติกที่ผลิตได้คิดเป็น 65 เปอร์เซนต์ ตามทฤษฎี โดยวัสดุเหล่านี้ต้องผ่านการย่อยสลายด้วยกรดก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป (Sdchmidt 1997)ดังนั้นการทดลองนี้จึงเป็นการศึกษาความเป็นไปได้ของกระบวนการดังกล่าวมาแล้วในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยใช้กระดาษผสมเป็นวัตถุดิบ ร่วมกับการใช้เอนไซม์อันจะเป็นแนวทาง ในการใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

ขั้นตอนการดำเนินงาน

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการดำเนินงานทดลองมีทั้งหมด 5 สายพันธุ์ สำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ดังนี้

ก. การผลิตเอทานอล ใช้เชื้อยีสต์ดังนี้

1. ***Saccharomyces carlbergensis*** ATCC 44732 (A)
2. ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 (B)

ข. การผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ใช้เชื้อรา

Gibberella fujikuroi (GA)

ค. การผลิตกรดซิตริก ใช้เชื้อยีสต์

Yarrowia lipolytica 5054 (CA)

ง. การผลิตกรดแลกติก ใช้เชื้อแบคทีเรีย

Lactobacillus casei (LA)

สารละลายเอนไซม์เซลลูเลส

ละลายผงเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากเชื้อรา ***Trichoderma sp.*** 0.105 กรัม ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลาย ทำการสเตอริไลซ์ด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองโซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate filter paper) ขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อให้ได้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสที่ปราศจากเชื้อ

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์ ได้แก่

1. ฟลาสก์ ขนาด 150 มิลลิลิตร
2. หลอดทดลอง
3. ขวดดูแลน
4. ขวดไวออล (vial)
5. บีกเกอร์
6. บิวเรต
7. ไมโครปิเปต (micropipette)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. ลูปเขี่ยเชื้อ (loop) , ตะเกียงแอลกอฮอล์ และ เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)

9. ช้อนตักสาร

10. กรวยแก้ว

11. ขวดแก้วทรงแบน

12. หลอดหยด

13. หม้อสแตนเลส

14. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

15. กล้องจุลทรรศน์

16. haemacytometer

17. spectrophotometer DR/4000 Procedures Manual (Hach)

18. centrifuge (Hettich Universal) D-7200 Tuttingen

19. pH meter (TOA) (ORION)

20. incubator TYPE B60 (MEMERT 854 SCHWABACH)

21. hot air oven type UL 50 (MEMERT 854 SCHWABACH)

22. hot air ovn 1350 FD (SHEL - LAB)

23. incubator shader VSL (VINDON SCIENTIFIC Ltd)

24. ultrasonic cleaner Model . 2800 HT (TRU - SWEEP)

25. autoclave Model. HA- 3D (HIRAYAMA MFG. CORR.)

26. larminar air flow FASTER BIO 48

27. incubator Typ. 15053300002020 WTB binder

28. orbital Incubator SI 50 (STUARY SCIENTIFIC)

29. เครื่อง gas chromatography

30. เครื่องคัดแยกขนาด

31. เครื่องปั่น (blender)

32. เครื่องชั่ง (balancer)

33. ชุดกรอง enzyme

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมี ได้แก่

1. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (ภาคผนวก ข.) มีดังนี้

ก. YM agar

สำหรับ ***Saccharomyces carlbergensis*** ATCC 44732

Schizosaccharomyces pombe ATCC 2476

Yarrowia lipolytica 5054

ข. MRS medium

สำหรับ ***Lactobacillus casei***

ค. PDA medium

สำหรับ ***Gibberella fujikuroi***

2. Fermentative media สำหรับการผลิต ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ (ภาคผนวก ข.)

3. สารละลาย DNS (ภาคผนวก ข.)

4. อะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 (ภาคผนวก ข.)

5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ และ 0.101 นอมอล (ภาคผนวก ข.)

6. สารละลายมาตรฐาน KHP 0.1 (ภาคผนวก ข.)

7. สารละลายอินดิเคเตอร์ฟีนอลฟทาลีน

8. ทวีน - 80 (Tween-80) 0.1 %

ขั้นตอนในการดำเนินงานทดลอง

การย่อยวัตถุดิบให้มีขนาดเล็ก

1. นำกระดาษหนังสือพิมพ์มาตัดให้มีขนาดที่เหมาะสมในการนำไปปั่นต่อไป

2. นำมาปั่นในเครื่องปั่น (Blender) ให้มีขนาดเล็ก ลักษณะเป็นขุยละเอียด

การศึกษาการผลิตเอทานอล

1. เตรียมสารละลายเชื้อ ***Saccharomyces carlbergensis*** ATCC 44732 (เชื้อ A) โดยนำเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ YM Agar (ภาคผนวก ข.) ที่บ่มไว้ 37 องศาเซลเซียส เติม fermentative medium สำหรับการผลิตเอทานอล (ภาคผนวก ก.) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 6 มิลลิลิตร ต่อ หลอดเลี้ยงเชื้อ 1 หลอด ใช้ลูปเขี่ยเชื้อขูดเฉพาะผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเทใส่ขวดดูแรนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 1×10^{7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เตรียมสารละลายเชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 (เชื้อ B) โดยทำเช่นเดียวกับเชื้อ A ในข้อ 1

3. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักเอทานอล (fermentative medium for ethanol) ตามภาคผนวก ข. โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้คือ กระดาษหนังสือพิมพ์ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (P_1) , 3 เปอร์เซ็นต์ (P_2) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (P_3) จำนวน 70 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์

4. นำอาหารในข้อ 3 ไปเข้าเครื่องโซนิเคเตอร์ (Sonicator) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

5. จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. ดูดสารละลายเชื้อ 2 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ฟลาสก์ และเติมสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสที่เตรียมไว้แล้ว ลงในชุดที่มีการศึกษาการทำงานร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์และเอนไซม์ (E) ลงในฟลาสก์ ฟลาสก์ละ 2 มิลลิลิตร

7. ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

8. เก็บตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ที่เวลา 0 , 3 , 19 , 25 , 45 , 50 , 92 ชั่วโมงเพื่อตรวจวัดปริมาณเอทานอล เซลล์ กิจกรรมของเอนไซม์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ พีเอช

การศึกษาการผลิตกรดจิบเบอแรลลิก

ก. การเตรียมสปอร์และการเลี้ยงเชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** (เชื้อ GA) เพื่อการผลิตกรดจิบเบอแรลลิก

1. เขี่ยสายใยของเชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากลงบนอาหาร PDA medium (ภาคผนวก ก.) ในขวดแก้วทรงแบน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

2. ถ่ายสปอร์โดยใช้สารละลายที่มีทวีน-80 0.1 % ผ่านผ้าขาวบางที่ซ้อนทับกันหนา 4 ชั้น นำสปอร์แขวนลอยที่ปรับให้มีปริมาณ 2×10^7 สปอร์

3. นำสปอร์แขวนลอยจากข้อ 2 ถ่ายลงในอาหารที่ใช้สำหรับผลิตกรดจิบเบอแรลลิก (fermentative medium for gibberellic acid) ตามภาคผนวก ข. ปริมาณ 4 มิลลิลิตรต่ออาหาร 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร ต่อฟลาสก์ และเติมสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสลงในชุดที่ต้องการ (GAE) 2 มิลลิลิตร ต่อฟลาสก์

4. นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

5. เก็บตัวอย่างที่ 3 , 5 , 8 , 10 , 11 , 13 วัน นำไปทำการวิเคราะห์ต่อไป

ข. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอแรลลิกโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatography)

1. นำตัวอย่างมาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต ปริมาณ 25 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. นำชั้นของเอทิลอะซีเตตมา 2 มิลลิลิตร มาระเหิดแห้งภายใต้สุญญากาศ

3. แล้วนำมาละลายด้วยเมทานอล 0.5 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟีที่มีคอลัมภ์เป็น C_8 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ยาว 250 มิลลิเมตร) สารละลายตัวพาที่มีสัดส่วนระหว่างเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกพีเอช 3 เป็น 35 ต่อ 65 โดยมีอัตราการไหลของสารละลายตัวพาเป็น 1 มิลลิลิตร ต่อ นาที ตรวจวัดชนิดและปริมาณของจิบเบอแรลลิน ภายหลังที่แยกผ่านคอลัมภ์ด้วยเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 208 นาโนเมตร

4. นำตัวอย่างมาตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ กิจกรรมเอนไซม์ และ พีเอช

การศึกษาการผลิตกรดซิตริก

ก. การเตรียมเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ ***Yarrowia lipolytica*** 5054 (เชื้อ CA) เพื่อผลิตกรดซิตริก

1. เขี่ยเชื้อ ***Yarrowia lipolytica*** ลงบนอาหาร YM agar และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

2. แล้วนำมาทำสารละลายเซลล์แขวนลอย โดยใช้อาหารสำหรับผลิตกรดซิตริก (fermentative medium for citric acid) ตามภาคผนวก ข. ปรับให้ได้จำนวนเซลล์ 1×10^7 เซลล์ แล้วเติมสารละลายเซลล์แขวนลอยนี้ 1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร ต่อ ฟลาสก์ 125 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เติมสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสที่เตรียมไว้ 2 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ ในชุดที่ใช้เอนไซม์ร่วมในการผลิต (CAE)

4. นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

ข. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดซิตริก

1. นำตัวอย่างมาทำการไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.101 นอมอล และใช้ฟีนอลฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

2. นำตัวอย่างที่เหลือจากการวัดข้อ 1 ทำการวัดปริมาณเซลล์ , น้ำตาลรีดิวซิ่ง , กิจกรรมของเอนไซม์ และพีเอช ตามวิธีในภาคผนวก ค.

การศึกษาการผลิตกรดแลคติก

ก. การเตรียมเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ ***Lactobacillus casei*** (เชื้อ LA) เพื่อผลิตกรดแลคติก

1. เขี่ยเชื้อ ***Lactobacillus casei*** ลงบนอาหาร MRS medium และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

2. นำเชื้อข้อ 1. มาทำสารละลายเซลล์แขวนลอยโดยใช้อาหารสำหรับผลิตกรดแลคติก (fermentative medium for lactic acid) ตามภาคผนวก ข. ปรับให้ได้จำนวนเซลล์ 1×10^7 เซลล์ แล้วเติมสารละลายเซลล์แขวนลอยนี้ 2 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร ต่อฟลาสก์ 125 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้เตรียมไว้แล้วลงในชุดการทดลองที่มีการศึกษาการทำงานร่วมของเอนไซม์ (LAE) 2 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์

4. นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง

5. เก็บตัวอย่างที่ 20 , 25 , 45 , 51 , 93 , 142 ชั่วโมง เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก

1. นำตัวอย่างมาทำการไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.101 นอมอล และใช้ฟีนอลฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

2. นำตัวอย่างที่เหลือจากการวัดในข้อ 1 ทำการวัดปริมาณเซลล์ น้ำตาลรีดิวซ์ กิจกรรมของเอนไซม์และพีเอช ตามวิธีในภาคผนวก ค.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่4

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลอง

1. การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากกระดาษหนังสือพิมพ์ของเชื้อยีสต์ 2 สายพันธุ์ ร่วมกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาเปรียบเทียบ การผลิตเอทานอลจากเชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732 ในการใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วย พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ได้เป็นดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณเอทานอล(ร้อยละ)ที่ผลิตได้ของเชื้อ ***Saccharomyces carlsberensis*** ATCC 44732 ที่ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 1 , 3 และ 5 เมื่อใช้และไม่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วย ที่ เวลาต่างๆ กัน

	ปริมาณเอทานอล (ร้อยละ) ที่ชั่วโมง ต่าง ๆ					
การทดลอง	**3**	**19**	**29**	**45**	**50**	**92**
AP1	0.10	0.30	0.60	0.90	0.80	0.60
AP2	0.10	0.28	0.71	1.10	0.90	0.70
AP3	0.20	0.32	0.75	1.30	1.40	1.10
AP1E	-	0.10	0.52	0.88	0.89	0.81
AP2E	0.10	0.21	0.67	0.30	0.80	0.80
AP3E	0.30	0.30	0.80	1.20	0.98	0.92

หมายเหตุ AP1 : เชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732 ที่ปริมาณกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 1

AP2 : เชื้อ **Saccharomyces *carlsbergensis*** ATCC 44732 ที่ปริมาณกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 3

AP3 : เชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732 ที่ปริมาณกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 5

AP1E : เชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732 ที่ปริมาณกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 1 ร่วมกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลส

AP2E : เชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732 ที่ปริมาณกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 3 ร่วมกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลส

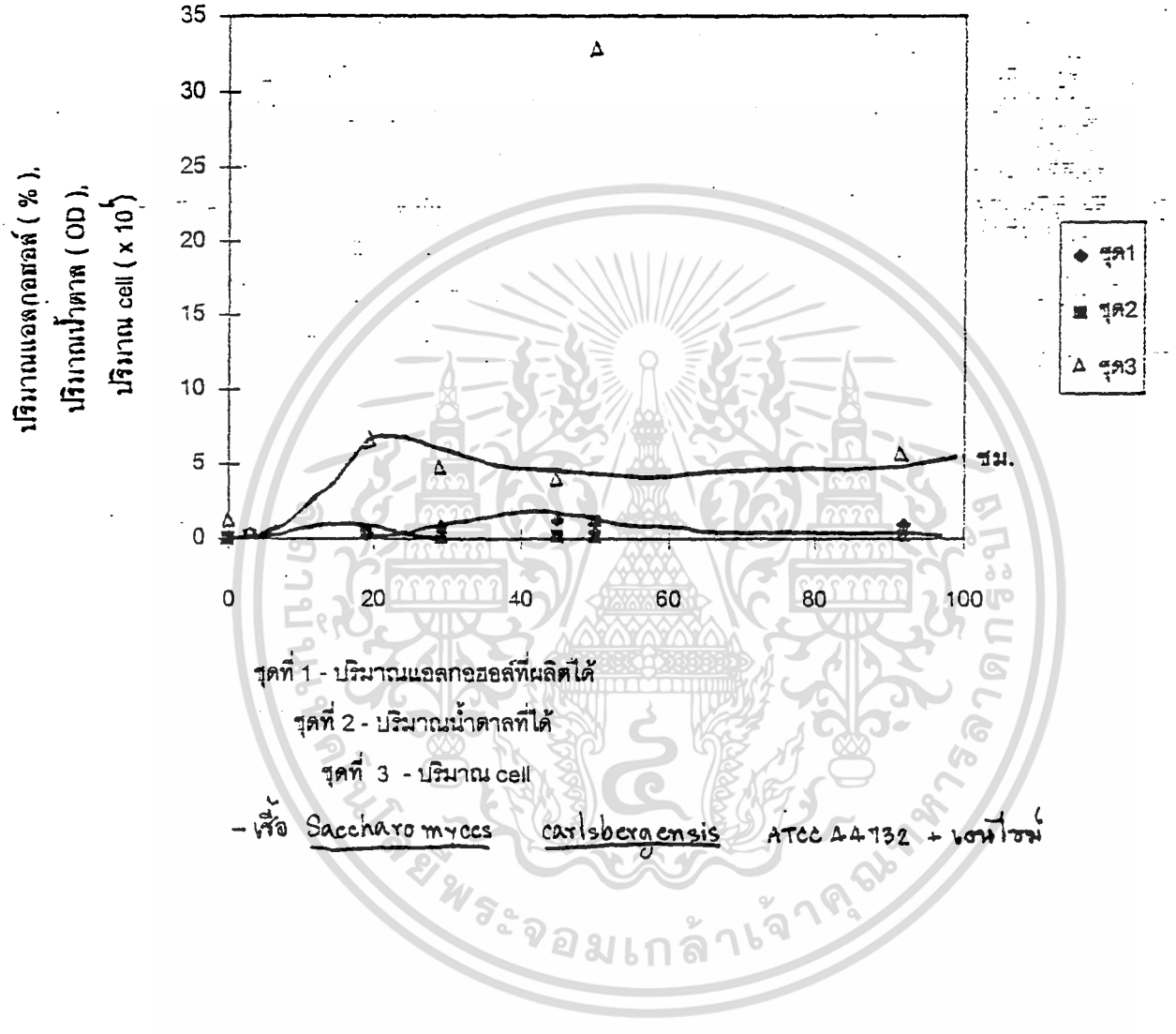
AP3E : เชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732 ที่ปริมาณกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 3 ที่ปริมาณกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 5 ให้ปริมาณเอทานอลมากที่สุด ทั้งในสภาวะที่มีการใช้และไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย โดยชั่วโมงที่ 50 จะให้ปริมาณเอทานอลได้ สูงสุดเป็นร้อยละ 1.40 หรือ 14 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย ในกรณีที่มีการใช้เอนไซม์ร่วมด้วย จะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเป็นร้อยละ 1.20 หรือ 12 มิลลิกรัมต่อลิตรที่เวลา 45 ชั่วโมง โดยแนวโน้มของการผลิตเอทานอลที่ได้ ของทั้ง 2 สภาวะ จะเกิดในช่วงที่เชื้อมีการเจริญสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 11

ในรูปที่ 11 จะเห็นได้ว่าเชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** มีความสามารถในการใช้กระดาษหนังสือพิมพ์ เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล โดยไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมในกระบวนการผลิต เนื่องจากเชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายกระดาษหนังสือพิมพ์ให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล โดย ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้ และไม่ใช้เอนไซม์เข้าร่วม พบว่า สภาวะที่มีการเติมเอนไซม์เซลลูเลสสามารถช่วยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีมากขึ้น มีผลทำให้อัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 20 ส่วนในสภาวะที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ จะพบว่าเซลล์จะเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 50 แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นจากการใช้เอนไซม์ ไม่มีผลต่อการเพิ่มการผลิตเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 11 แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักของเชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732 เมื่อใช้ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ ร้อยละ 5 โดยมีและไม่มีเอนไซม์ร่วมด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนผลการผลิตเอทานอลของเชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 นั้น จะมีลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** เนื่องจากว่า ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ผลิตได้ จะอยู่ในช่วงที่น้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ปริมาณสูงสุดขณะทำการหมัก ทั้งในสภาวะที่ใช้และไม่ใช้เอนไซม์ร่วม ทั้งนี้เป็นเพราะว่าเชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** มีความสามารถในการย่อยสลายกระดาษหนังสือพิมพ์ให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีกว่าเชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** โดยการผลิตเอทานอลสูงสุดจะอยู่ในช่วงระยะที่เชื้อมีการปรับตัว (lag phase) และเมื่อเข้าสู่ช่วงที่เชื้อมีอัตราการเจริญคงที่ (stationary phase) เชื้อจะหยุดการผลิตเอทานอล

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณเอทานอล (ร้อยละ) ที่ผลิตได้ของเชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 ที่ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 1 , 3 และ 5 เมื่อใช้และไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย ที่เวลาต่าง ๆ

	ปริมาณเอทานอล (ร้อยละ) ที่ชั่วโมง ต่าง ๆ					
การทดลอง	**3**	**19**	**29**	**45**	**50**	**92**
BP1	-	-	-	0.10	0.11	-
BP2	-	-	-	-	-	-
BP3	-	-	-	-	-	-
BP1E	-	-	-	0.11	0.10	-
BP2E	-	-	-	-	-	-
BP3E	-	-	-	-	-	-

<u>หมายเหตุ</u> BP1 : เชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 ที่ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 1

BP2 : เชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 ที่ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 3

BP3 : เชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 ที่ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 5

BP1E : เชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 ที่ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 1 ร่วมกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลส

BP2E : เชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 ที่ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 3 ร่วมกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลส

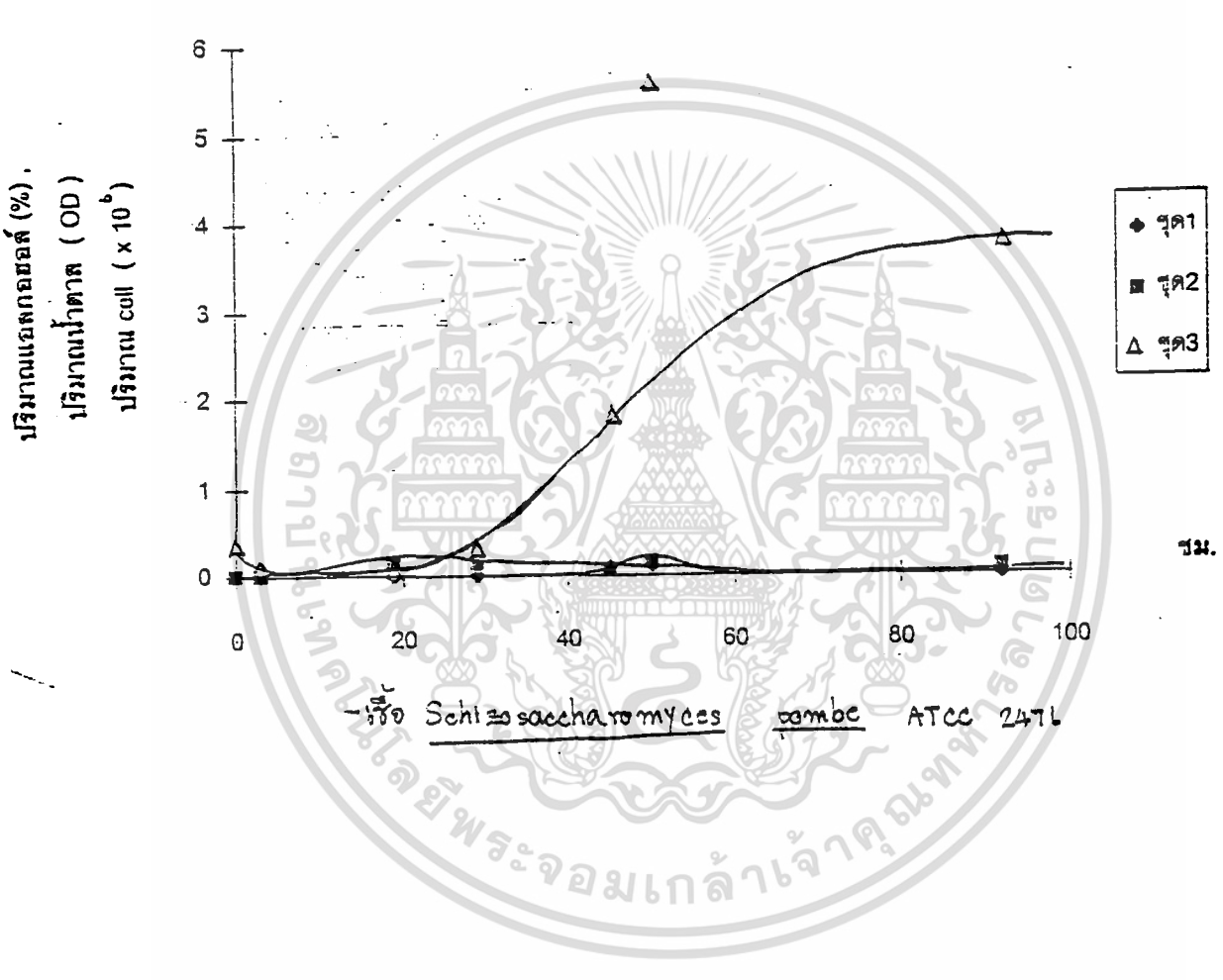
BP3E : เชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 ที่ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เวลา 50 ชั่วโมง เชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** จะผลิตเอทานอลสูงสุดเป็น ร้อยละ 0.11หรือ 11 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อไม่ใช้เอนไซม์ และที่เวลา 45 ชั่วโมงเชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** ที่มีเอนไซม์ร่วมด้วยจะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเป็น ร้อยละ0.11 หรือ 11 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากัน และจากรูปที่ 12 พบว่าเชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** เมื่อมีเอนไซม์ร่วมด้วย จะมีอัตราการเจริญต่ำกว่าไม่มีเอนไซม์ร่วมด้วย ซึ่งกล่าวได้ว่าปริมาณน้ำตาลมีผลต่อการเจริญของเชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** โดยมีผลให้การเจริญของเชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** ต่ำ และหากเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ของเชื้อ***Saccharomyces carlsbergensis*** และ ***Schizosaccharomyces pombe*** พบว่า เชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** จะให้ปริมาณเอทานอลที่สูงกว่าเชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** ในเวลาที่เท่ากันและสภาวะเดียวกัน (ใช้และไม่ใช้เอนไซม์) ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูง จะทำให้เชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** สามารถผลิตเอทานอลได้มาก แต่ในกรณีเชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** ปริมาณน้ำตาลที่มากเกินไปจะมีผลต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอลได้ ทั้งนี้โดยที่ค่า กิจกรรมของเอนไซม์ของเซลลูเลสของเชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** จะมีค่าต่ำกว่าของเชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** แสดงว่าเชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** มีความสามารถในการใช้กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัตถุดิบเพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีกว่าเชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** แต่ความสามารถในการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพื่อผลิตเอทานอลจะต่ำกว่าเชื้อ***Saccharomyces carlsbergensis*** ดังจะเห็นได้จากผลของปริมาณเอทานอลของเชื้อทั้ง 2 ชนิด

โดยปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ที่เพิ่มขึ้น มีผลต่อการเจริญของเชื้อ ทั้ง 2 ชนิด เช่นกัน เชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** เมื่อเพิ่มปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ จะให้ปริมาณ เอทานอลที่สูงขึ้น ต่างจากเชื้อ ***Schizosaccharomyces pombe*** โดยปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ที่สูงขึ้น จะไปยับยั้งการเจริญและการผลิตเอทานอล นอกจากนี้ อิออนของโลหะที่มีอยู่ในน้ำหมึกของกระดาษหนังสือพิมพ์ จะไปยับยั้งการทำงานของเชื้อ ทำให้เอทานอลที่ผลิตได้มีปริมาณที่ต่ำกว่าการใช้วัตถุดิบประเภทอื่นๆ ดังนั้นปริมาณกระดาษหนังสือพิมพ์ที่ใช้ตลอดจนอิออนของโลหะที่มีในกระดาษหนังสือพิมพ์ต่างมีผลต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อ***Saccharomyces carlsbergensis*** และ ***Schizosaccharomyces pombe*** ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่12 แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ , ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเซลล์ที่เกิด . ขึ้นในระหว่างการหมัก เมื่อใช้ความเข้มข้นของกระดาษหนังสือพิมพ์ 1เปอร์เซ็นต์ โดยมีและไม่มีเอนไซม์ร่วมด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิต กรดจิบเบอเรลลิก จากกระดาษหนังสือพิมพ์ ของเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ร่วมกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาความสามารถของเชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** ในการใช้กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิต กรดจิบเบอเรลลิก ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ที่ผลิตได้จากเชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** ที่ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 4 เมื่อใช้และไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย ที่เวลาต่างๆ

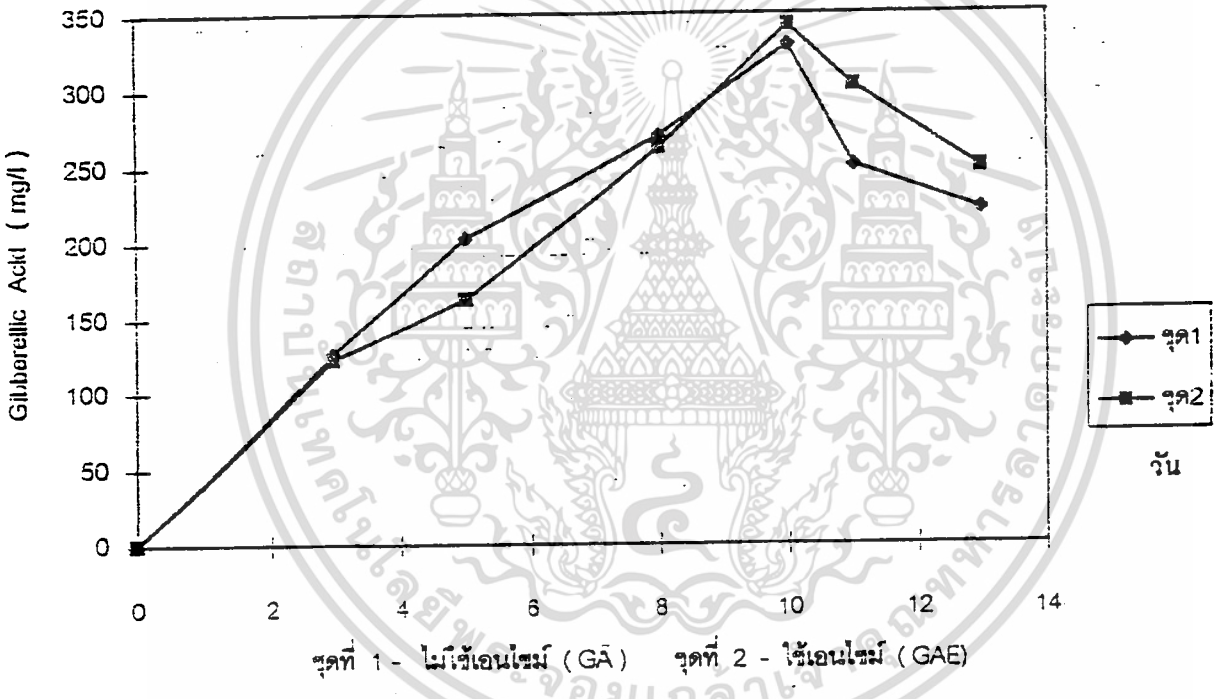
วัน	ตัวอย่าง	น้ำตาลรีดิวซ์ (ร้อยละ)	Fpase activity	ความเป็นกรด - ด่าง	ปริมาณกรด มิลลิกรัม/ลิตร
	GA1	0.200	-	7.0	126.55
3	GA1E	0.217	0.011	7.0	122.55
	GA2	0.184	-	7.0	203.27
5	GA2E	0.174	0.008	6.5	162.55
	GA3	0.182	-	7.0	270.18
8	GA3E	0.202	0.007	7.0	262.18
	GA4	0.245	-	7.0	329.46
10	GA4E	0.215	0.001	7.0	342.55
	GA5	0.187	-	7.0	250.55
11	GA5E	0.175	0.009	6.5	302.55
	GA6	0.194	-	7.0	221.46
13	GA6E	0.264	0.001	7.0	248.78

หมายเหตุ GA1, GA2,GA3,GA4,GA5,GA6 : เชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** ที่ปริมาณกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 4

GAE1,GAE2,GAE3,GAE4,GAE5,GAE6 : เชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** ที่ปริมาณกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 4 ร่วมกบเอนไซม์เซลลูเลส

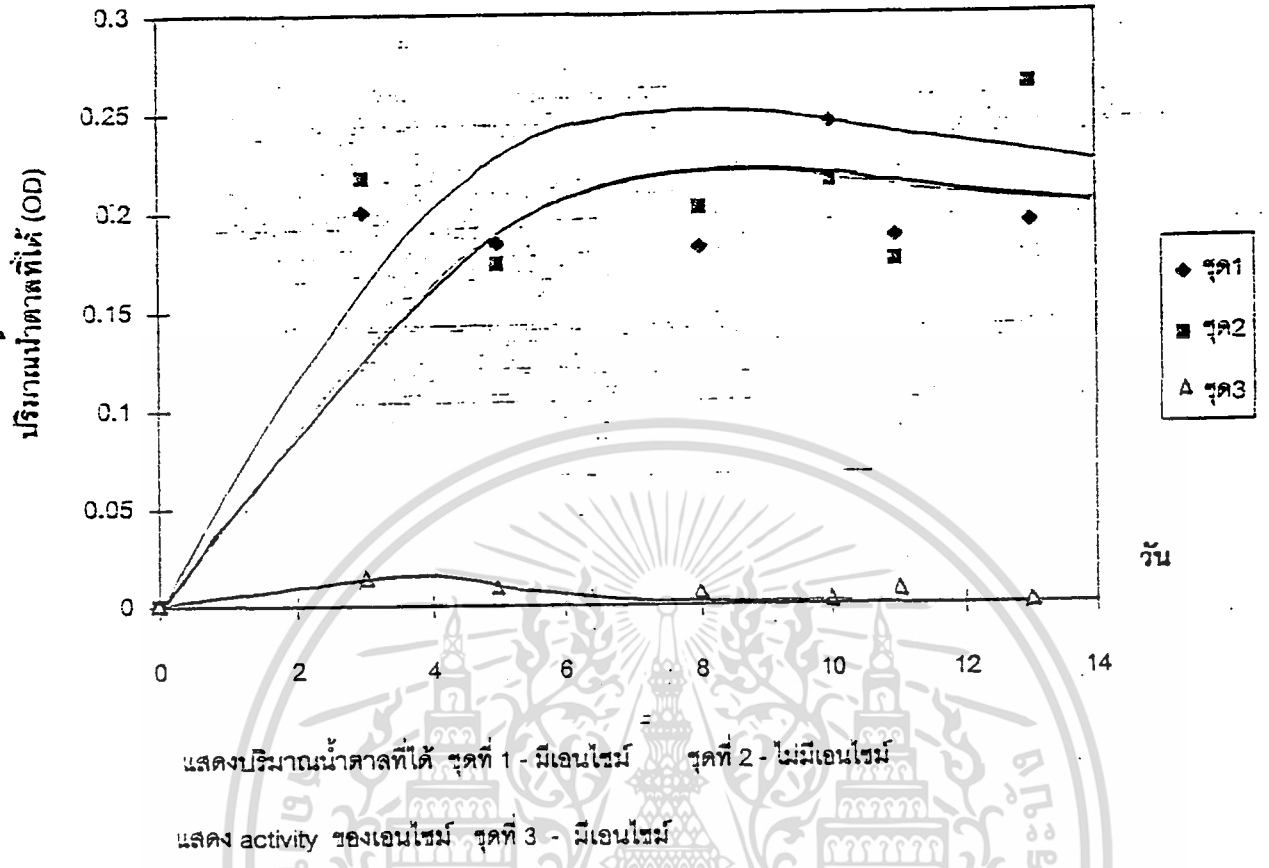
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 5 พบว่าการใช้เอนไซม์ร่วมด้วยจะให้ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่สูงกว่าการไม่ใช้เอนไซม์ร่วมที่เวลาเดียวกันแล้ว ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 342.55 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 10 วัน ในสภาวะที่มีการใช้เอนไซม์ร่วมด้วย โดยสภาวะที่มีการใช้เอนไซม์ร่วมด้วยนั้น สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกได้ เมื่อพิจารณาลักษณะของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก จะพบว่าในช่วงแรกกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้มีค่าต่ำ และเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเชื้อมีการเจริญเข้าสู่ช่วงอัตราการเจริญคงที่ (Stationary phase) เนื่องจาก กรดจิบเบอเรลลิกเป็นสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งสังเกตได้จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่คงเหลืออยู่นั้น มีค่าคงที่ในช่วงการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกสูงสุด



รูปที่ 13 แสดงปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้จาก เชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** เมื่อใช้และไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วยที่ปริมาณกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ4 ที่เวลาต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 14 แสดงปริมาณน้ำตาลที่ได้จากเชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** เมื่อใช้และไม่ใช้เอนไซม์ และ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) เซลลูเลสที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก

ในการวัดปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatography) พบว่า มีความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้ พีค (A) และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก(X) แสดงได้ดังสมการถดถอย $A = 1.15 \times 10^5 + (3.785 \times 10^5) X$ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียรสัน (r) เป็น 1.056 แสดงว่าเมื่อปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกมาก พื้นที่ใต้พีคที่วัดได้จากเครื่อง ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี จะมีค่ามากตามกันในเชิงเส้นตรง ดังในรูปที่ 23 ในภาคผนวก ง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดซิตริก จากกระดาษหนังสือพิมพ์ของเชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* 5054 ร่วมกับการใช้และไม่ใช้เอนไซม์

การศึกษาความสามารถของเชื้อ ***Yarrowia lipolytica*** 5054 ในการใช้กระดาษหนังสือพิมพ์เพื่อการผลิตกรดซิตริก จากผลการทดลองพบว่าปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในเวลา 5 วันของการเพาะเลี้ยง ในสภาวะที่มีการใช้และไม่ใช้เอนไซม์ร่วมนั้น มีความเข้มข้น 5.16 และ 3.75นอร์มัล (N) ตามลำดับ

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ของเชื้อ ***Yarrowia lipolytica*** 5054ที่ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 2 เมื่อมีการใช้และไม่ใช้เอนไซม์ร่วม

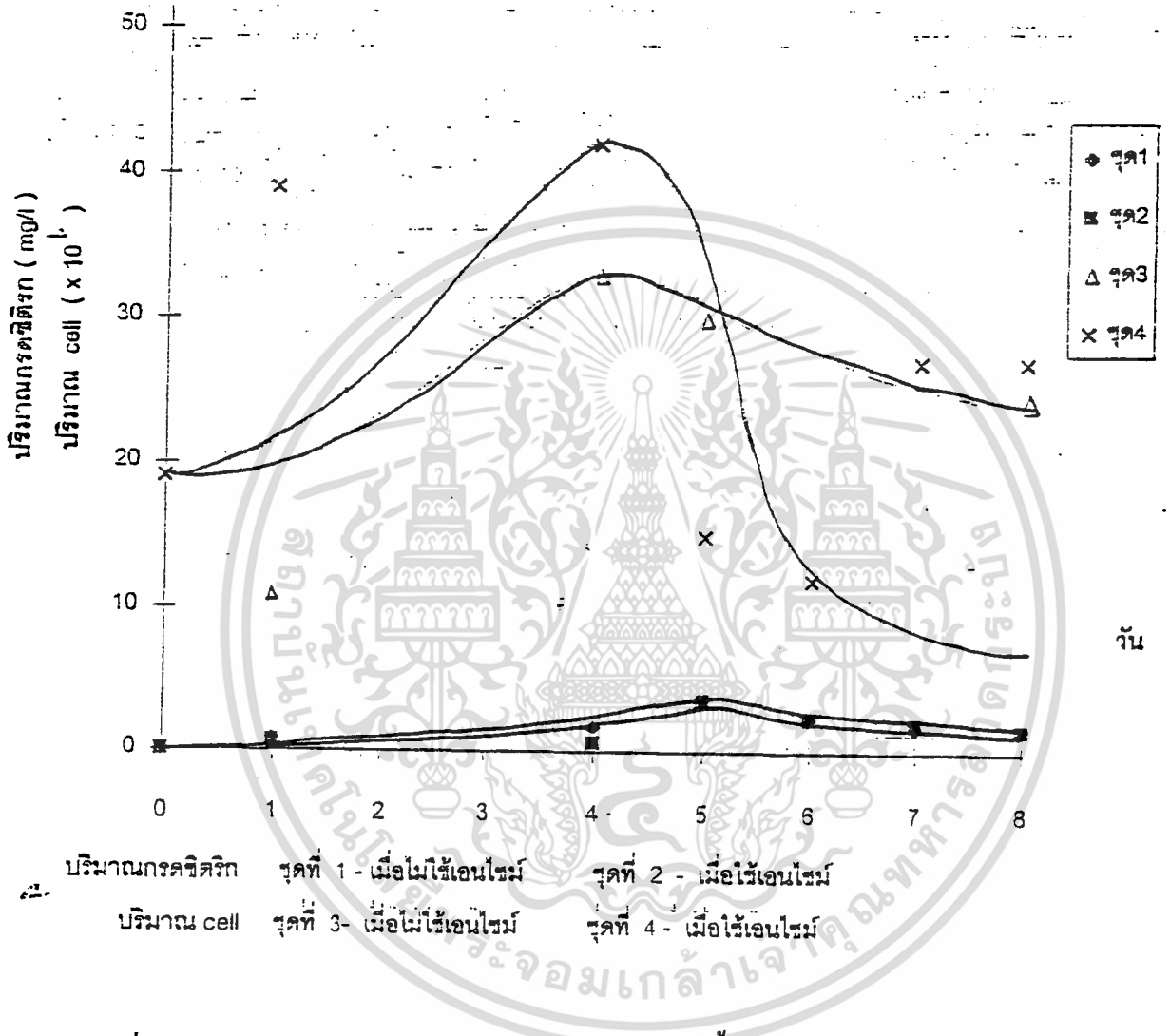
วัน	ตัวอย่าง	น้ำตาลรีดิวซ์ (%)	Fpase activity	ปริมาณเซลล์ ($*10^5$)	ความเป็นกรด-ด่าง	กรดซิตริก (N)
1	CA1	0.172	-	10.9	8.5	0.79
	CA1E	0.336	0.001	39	8.5	0.67
4	CA2	0.170	-	33	9.0	1.72
	CA2E	0.329	0.016	42	9.0	0.62
5	CA3	0.172	-	30	9.0	3.57
	CA3E	0.330	0.010	15	9.0	5.16
6	CA4	0.169	-	57	9.0	2.32
	CA4E	0.243	0.011	12	9.0	2.32
7	CA5	0.181	-	66	9.0	1.72
	CA5E	0.316	0.005	27	9.0	2.02
8	CA6	0.177	-	24	9.0	1.60
	CA6E	0.324	0.024	27	9.0	1.55

หมายเหตุ CA1,CA2,CA3,CA4,CA5,CA6 : เชื้อ ***Yarrowia lipolytica*** 5054 ที่ปริมาณกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 2

CAE1,CAE2,CAE3,CAE4,CAE5,CAE6 : เชื้อ ***Yarrowia lipolytica*** 5054 ที่ปริมาณกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 2 ร่วมกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6 จะพบว่าเชื้อ ***Yarrowia lipolytica*** 5054 สามารถย่อยสลายน้ำตาลได้ ในขณะที่การใช้เอนไซม์ร่วมด้วยจะเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายให้ได้น้ำตาล ซึ่งมีผลต่อปริมาณกรดซิตริกที่ได้ด้วย โดยการใส่เอนไซม์ร่วมด้วยสามารถเพิ่มปริมาณกรดซิตริกได้เป็นร้อยละ 44.5



รูปที่ 15 แสดงปริมาณกรดซิตริก และอัตราการเจริญของเชื้อ ***Yarrowia lipolytica*** 5054เมื่อใช้และไม่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วย

ส่วนค่าความเป็น กรด-ด่างที่เกิดขึ้น พบว่ามีความเป็นด่างค่อนข้างสูง ทั้งนี้เกิดจากกรดที่ผลิตได้มีปริมาณไม่มากพอที่จะทำให้ความเป็นด่างที่เกิดจากสารจากหนังสือพิมพ์ เช่น น้ำหมึก ลดลงได้ ซึ่งส่วนนี้อาจมีผลต่อเชื้อในการผลิตกรดซิตริกได้ เพราะกรดที่ผลิตได้จะสูงสุดและลดต่ำลงทันที

กรดซิตริกที่ผลิตได้นี้เป็นไปตามการเจริญของเชื้อทั้งการใช้และไม่ใช้เอนไซม์ แสดงว่ากรดซิตริก เป็นสารปฐมภูมิ (Primary metabolite) ที่จะสร้างไปพร้อม ๆ กับเชื้อที่เจริญขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิต กรดแลคติก ของเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* จากกระดาษหนังสือพิมพ์ เมื่อใช้และไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย

จากการทดลองพบว่ากรดแลคติกที่ผลิตได้ในสภาวะที่มีใช้และไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย มีรูปแบบการผลิตที่ได้แตกต่างกัน กล่าวคือ เมื่อมีการใช้เอนไซม์ร่วมด้วย ทำให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้จะมีค่าสูงกว่าเมื่อไม่ใช้เอนไซม์ร่วม ดังแสดงในรูปที่ 18. ส่วนปริมาณกรดแลคติกที่ได้จากสภาวะทั้งสองนี้ จะสูงสุดในช่วงระยะที่เชื้อมีการปรับตัว (lag phase) โดยปริมาณกรดที่ผลิตได้ในสภาวะเติมเอนไซม์จะมีปริมาณเท่ากับ 0.127 นอร์มัล{mg/l}ในชั่วโมงที่ 28 และปริมาณกรดแลคติกที่ได้จะคงที่ตลอดการทดลอง ส่วนสภาวะที่ไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วยจะทำให้มีปริมาณน้ำตาลที่เพียงพอ และเหมาะสมกับการเจริญ และการผลิตกรดแลคติก โดยปริมาณกรดแลคติกที่ได้จะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นและสูงสุดในชั่วโมงที่ 20 โดยปริมาณกรดที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.195 นอร์มัล*** และจะคงที่ตลอดการทดลอง

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ จากเชื้อ ***Lactobacillus casei*** ที่ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 2 เมื่อใช้และะไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย

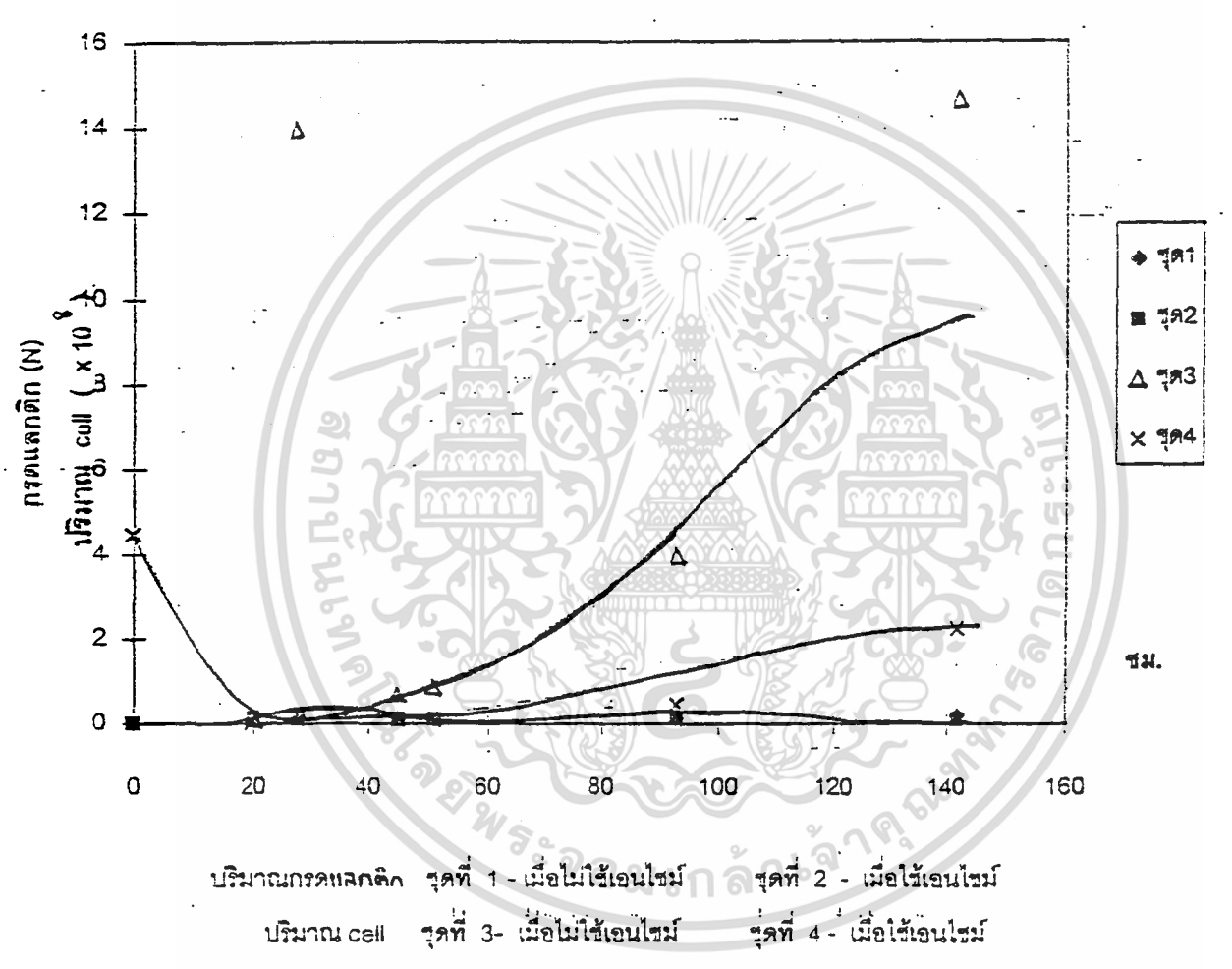
เวลา (ชั่วโมง)	ตัวอย่าง	น้ำตาล รีดิวซ์(%)	Fpase activity	ความเป็น กรด-ด่าง	ปริมาณ เซลล์(*10^5)	กรดแลคติก (N)
	LA1	0.484	-	7.0	0.1365	0.130
20	LA1E	0.568	0.057	7.0	0.0420	0.127
	LA2	0.301	-	6.5	13.8640	0.127
28	LA2E	0.348	0.004	6.5	0.1470	0.102
	LA3	0.503	-	5.5	0.6825	0.117
45	LA3E	0.700	0.012	5.5	0.0735	0.101
	LA4	0.474	-	5.5	0.9135	0.102
51	LA4E	0.676	0.103	7.0	0.0735	0.101
	LA5	0.580	-	5.5	3.8850	0.134
93	LA5E	0.636	0.091	9.0	0.4620	0.096
	LA6	0.576	-	5.5	14.6475	0.195
142	LA6E	0.666	0.072	9.0	2.2470	0.101

หมายเหตุ LA1,LA2,LA3,LA4,LA5,LA6 : เชื้อ ***Lactobacillus casei*** ที่ปริมาณกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 2

LAE1,LAE2,LAE3,LAE4,LAE5,LAE6 : เชื้อ ***Lactobacillus casei*** ที่ปริมาณกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 2 ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส

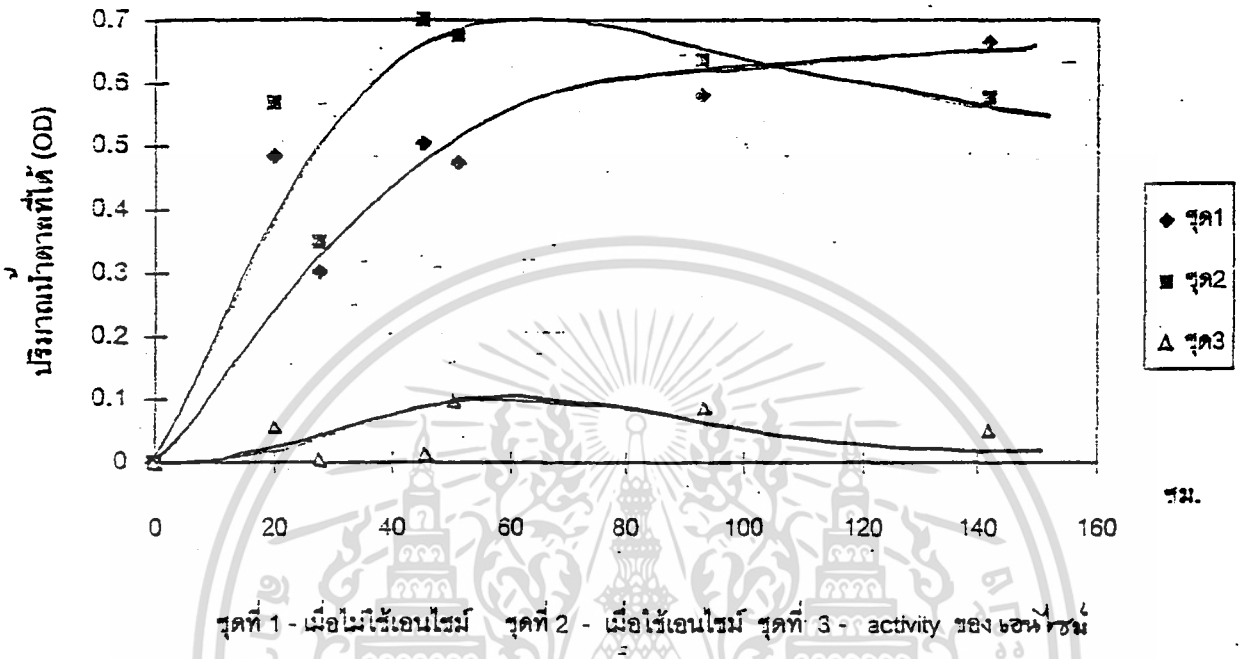
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 7 พบว่า ความเป็นกรด-ด่างที่ได้ เป็นไปตามการผลิตกรดที่เกิดขึ้นในสภาวะ ที่ไม่ใช้เอนไซม์ กรดจะผลิตได้มากและคงสูงขึ้นเรื่อยๆ ส่งผลให้เกิดความเป็นกรดในน้ำหมักเพิ่มขึ้น ส่วนสภาวะที่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย ความเป็นกรด-ด่าง จะเริ่มจากกรดกลายเป็นด่าง ทั้งนี้เพราะปริมาณกรดที่ผลิตได้ค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับการไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย



รูปที่ 16 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้และอัตราการเจริญของเชื้อ ***Lactobacillus casei*** ที่ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 2 เมื่อใช้และไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ ของเชื้อ ***Lactobacillus casei*** เมื่อใช้และไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วย และค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ที่เกิดขึ้นโดยกระบวนการหมัก

จากรูปที่ 16 และ 17 จะเห็นได้ว่าเชื้อมีความสามารถในการใช้กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัตถุดิบ ในการผลิตเป็นน้ำตาลเพื่อนำไปใช้ในการผลิตกรดแลคติก ทั้งในสภาวะที่ใช้และไม่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วย จึงกล่าวได้ว่าเชื้อมีเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อใช้ในการย่อยสลายกระดาษหนังสือพิมพ์ได้ แต่ปริมาณน้ำตาลที่สูงเกินไป จะมีผลไปยับยั้งการผลิตกรดแลคติกได้ดังแสดงให้เห็นในรูปของสภาวะที่มีเอนไซม์ร่วมด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิต เอทานอล , กรดซิตริก และ กรดแลคติก ซึ่งเป็นสารปฐมภูมิและ กรดจิบเบอเรลลิก ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ จากกระดาษหนังสือพิมพ์ที่ใช้แล้วนั้น พบว่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษาทุกตัว สามารถใช้กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัตถุดิบในการผลิตได้

2. เชื้อที่ใช้ทำการศึกษาทุกตัวมีเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายกระดาษหนังสือพิมพ์ให้เป็นน้ำตาล เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ต้องการได้

3. การใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมในการผลิตนั้น ช่วยในการเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ให้ได้ผลผลิตที่มากขึ้น ยกเว้นในการผลิตกรดแลคติกในการทดลองนี้ ที่ปริมาณน้ำตาลที่สูงเกินไปจะทำให้ผลผลิตที่ได้ต่ำลง

4. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์แต่ละอย่างของเชื้อแต่ละชนิดที่ให้ผลผลิตสูงสุดเป็นดังนี้

ก. การผลิตเอทานอล

เชื้อ ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732 ผลิตได้ดีกว่า***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 ในสภาวะที่ใช้ ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 5 มีเอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วย 2.86 เปอร์เซนต์ ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดคิดเป็น 1.4 เปอร์เซนต์ ที่ 50 ชั่วโมงหลังการหมัก

ข. การผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

เชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** สภาวะที่ใช้ ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 4 มีเอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วย 7.27 เปอร์เซนต์ ให้กรดจิบเบอเรลลิกสูงสุดคิดเป็น 342.55 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 10 วัน หลังการหมัก

ค. การผลิตกรดซิตริก

เชื้อ ***Yarrowia lipolytica*** 5054 สภาวะที่ใช้ ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 2 มีเอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วย 4 เปอร์เซนต์ ให้กรดซิตริกสูงสุดคิดเป็น 939.12 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 5 วัน หลังการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง. การผลิตกรดแลคติก

เชื้อ ***Lactobacillus casei*** สภาวะที่ใช้ ปริมาณของกระดาษหนังสือพิมพ์ร้อยละ 2 ให้กรดแลคติกสูงสุดคิดเป็น 0.195 N หรือคิดเป็น 17.55 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 20 หลังการหมัก

ข้อเสนอแนะ

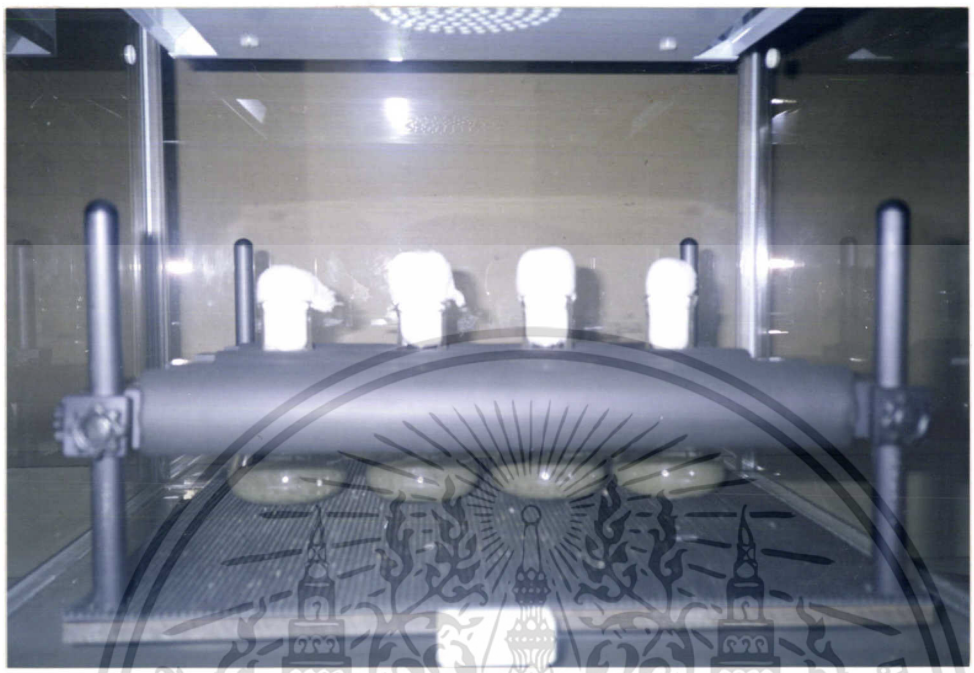
1.ควรมีการศึกษาของผลของน้ำหมึกที่มีในกระดาษหนังสือพิมพ์ว่ามีผลต่อเชื้อและการเกิดผลิตภัณฑ์ต่างๆ อย่างไร

2. ควรมีการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต ผลิตภัณฑ์เหล่านี้เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงที่สุด ทั้งสภาวะที่ใช้และไม่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการผลิต

3. ควรมีการศึกษาถึงวิธีการเก็บเกี่ยวผลผลิตที่ได้ ความบริสุทธิ์ และรูปแบบในการนำผลผลิตเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

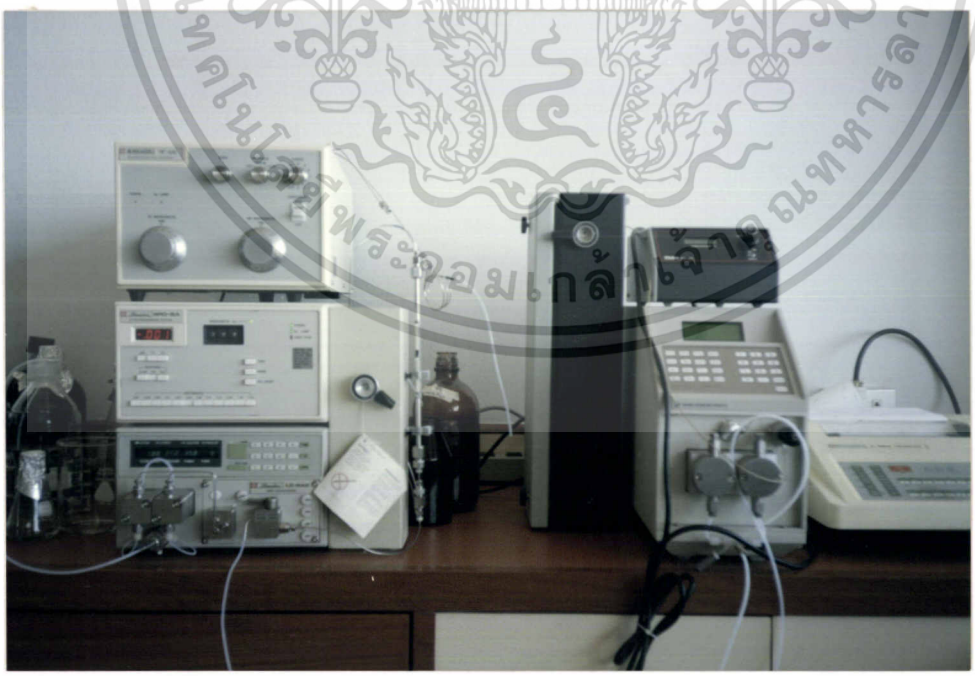


รูปที่ 18 แสดงลักษณะการเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้อุณหภูมิห้อง ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบต่าง ๆ

รูปที่ 19 แสดงชุดการไตเตรตหาปริมาณกรดที่ผลิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 20 แสดงการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Nelson



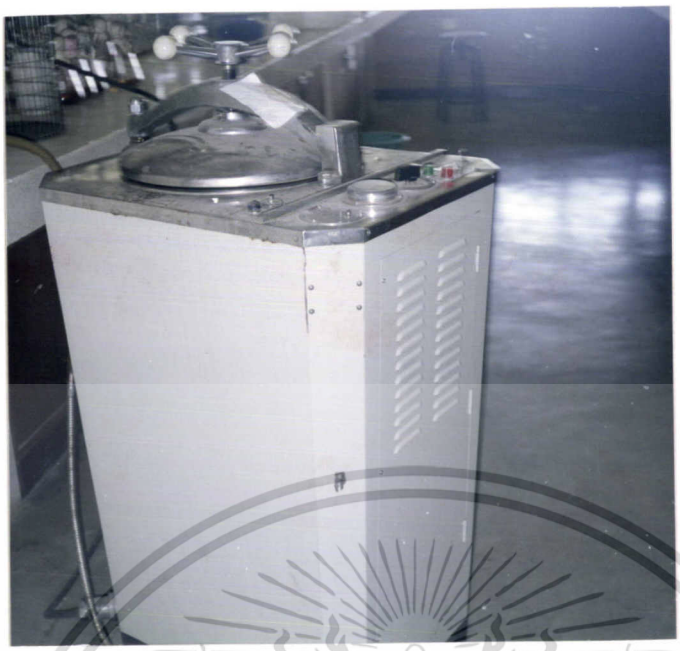
รูปที่ 21 แสดงเครื่อง ไฮเพอฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC) ที่ใช้สำหรับวัดปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 22 แสดงเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

รูปที่ 23 แสดงกล้องจุลทรรศน์ และอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวัดปริมาณเซลล์

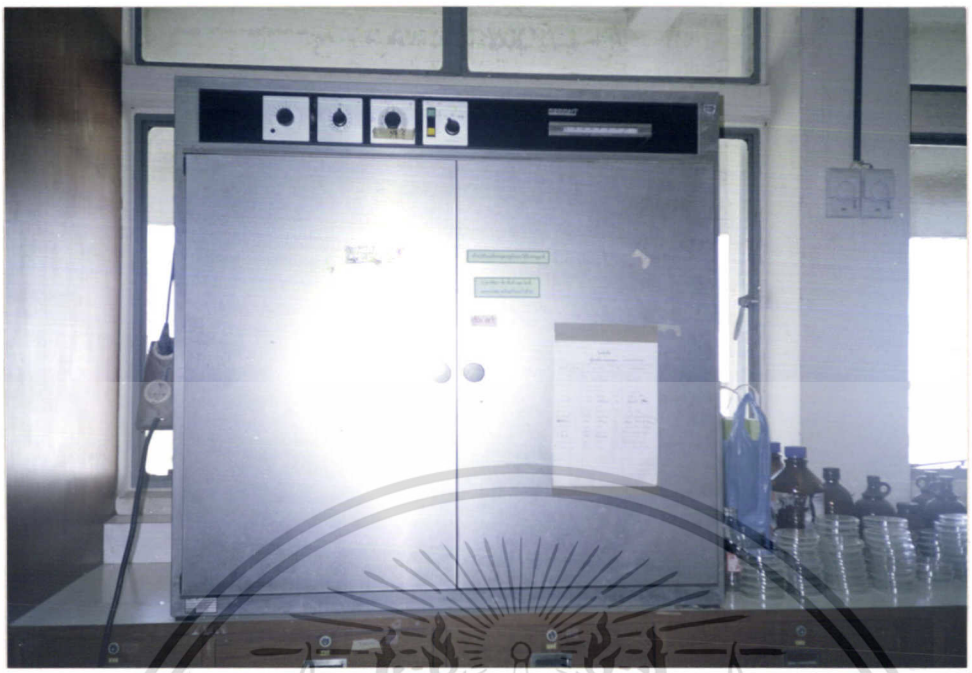
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 24 แสดงหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

รูปที่ 25 แสดงเครื่อง Laminar air flow สำหรับการถ่ายเชื้อลงในอาหารหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 26 แสดงตู้บ่มเชื้อ (Incubator) สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ ที่ใช้ในการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM (Yeast Malt agar , YM agar)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทำเป็น stock culture ของเชื้อยีสต์มีองค์ประกอบดังนี้

ยีสต์สกัด	3.0	กรัม / ลิตร
มอลท์สกัด	3.0	กรัม / ลิตร
เปปโตน	5.0	กรัม / ลิตร
กลูโคส	10.0	กรัม / ลิตร
วุ้น	20.0	กรัม / ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาเขี่ยเชื้อใส่ในหลอดทดลอง (sub culture) แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732 และ ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 ส่วน ***Yarrowia lipolytica*** บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA (Potato dextose agar , PDA)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมสปอร์ของเชื้อรา เตรียมได้โดยละลายในน้ำกลั่น และเติม stock solution ซึ่งประกอบไปด้วย Al_2O_3 0.5 กรัม , $ZnCl_2$ 0.5 กรัม และ $CuSO_4 * 5H_2O$ 0.01 กรัม ละลายในน้ำกกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยเติม stock solution 1 มิลลิลิตร ในอาหาร PDA 1 ลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายเชื้อแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ ***Gibberella fujikuroi***

3. Man , Ragosa & Sharpe medium (MRS medium)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้โดยละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมวุ้นอาหาร 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายเชื้อแล้วบ่มที่ 48 ชม. สำหรับ ***Lactobacillus casei***

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต (Fermentative medium) ของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มีดังนี้

ก. สำหรับการผลิตเอทานอล (ดัดแปลงมาจาก C. Abate) และกรดซิตริก (Fermentation medium ethanol and citric acid) โดยมีองค์ประกอบดังนี้

ยีสต์สกัด	20.0	กรัม / ลิตร
เปปโตน	5.0	กรัม / ลิตร
NH_2PO_4	1.0	กรัม / ลิตร
$(NH_4)_2 SO_4$	2.0	กรัม / ลิตร
$MgSO_4 * 7H_2O$	1.0	กรัม / ลิตร

ปรับพีเอชเป็น 4.5 - 5.0

สำหรับ ***Yarrowia lipolytica*** 5054 ที่ใช้ผลิตกรดซิตริก เติมเมทานอล 2 มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งหนังสือพิมพ์ โดยอาหารหมักสำหรับการผลิตกรดซิตริกใช้ 2 % นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 60 นาที

ข. สำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (ดัดแปลงมาจาก T. Holme และ B. Zaenarias)

เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ และทำการหมักเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้

กลูโคส	120	กรัมต่อลิตร (สำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อ)
กระดาษหนังสือพิมพ์	40	กรัมต่อลิตร (สำหรับทำการหมัก)
แอมโมเนียมไนเตรต	4.8	กรัมต่อลิตร (สำหรับทำการหมัก)
KH_2PO_4	5	กรัมต่อลิตร (สำหรับทำการหมัก)
$MgSO_4 7H_2O$	2	กรัมต่อลิตร (สำหรับทำการหมัก)
Trace element	2	มิลลิลิตรต่อลิตรซึ่งประกอบไปด้วย

- $SO_4 7H_2O$	0.1	กรัม
- $CuSO_4 5H_2O$	0.015	กรัม
- $ZnSO_4 7H_2O$	0.161	กรัม
- $MnSO_4 4H_2O$	0.01	กรัม
- $(NH_4)_6 Mo_7O_{24} 7H_2O$	0.01	กรัม โดยละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 60 นาที นำมาถ่ายสารละลายแขวนลอยสปอร์ลงไปในอาหาร inocculum เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำมาถ่ายในอาหารสำหรับหมักต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค. สำหรับการผลิตกรดแลคติก (ดัดแปลงมาจาก S. Schmidt)

เป็นอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.6	กรัมต่อลิตร
กรดซัคซินิก	11.3	กรัมต่อลิตร
NaOH	7.25	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	30	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	1	กรัมต่อลิตร
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.03	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.03	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1	กรัมต่อลิตร

แหล่งคาร์บอนคือ ปริมาณหนังสือพิมพ์ร้อยละ 2

ปรับพีเอช 5-6

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 60 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
วิธีการวิเคราะห์

1.วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยใช้วิธีเนลสัน (Nelson)

สารเคมีที่ใช้

1. 2 N ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10.0 มิลลิลิตร

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10.0 มิลลิลิตร

2. สารละลาย DNS 50.0 มิลลิลิตร

ชั่ง 3. 5 Dinitrosalicyclic acid 0.5 กรัม ละลายใน 10.0 มิลลิลิตร ของ 2 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นเติม 15.0 กรัมของ sodium potassium tartrate แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 50.0 มิลลิลิตร นำไปกรองเอาตะกอนสีเหลืองออก ได้สารละลายใสสีเหลือง เก็บในขวดสีฟ้า

วิธีวัด

1. ดูดสารตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแล้วเติมสารละลาย DNS 1.0 มิลลิลิตร
2. ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที โดยปิดปากหลอดด้วยลูกแก้ว
3. ทำให้เย็นทันที
4. เติมน้ำกลั่น 10.0 มิลลิลิตร แล้วเขย่า
5. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm
6. ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง

2. การตรวจวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

สารเคมีที่ใช้

1. Acetate buffer 0.1 M pH 5.0

-เตรียม 0.2 M ของสารละลาย acetic acid โดยตวง acetic acid 11.55 มิลลิลิตร ใส่น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ให้เป็นสารละลาย A

-เตรียม 0.2 M ของสารละลาย sodium acetate โดยชั่ง 16.4 กรัมของ $C_2H_3O_2Na$ ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ให้เป็นสารละลาย B

-เตรียม acetate buffer pH 5.0 โดยใช้ สารละลาย A 14.8 มิลลิลิตร กับ สารละลาย B 35.2 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2. 1 M ของโซเดียมไฮดรอกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สารละลาย DNS

วิธีวัด

1. ดูดสารตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร (ตัวอย่างละ 2 หลอด) เติมบัฟเฟอร์ 1.5 มิลลิลิตร

2. ใส่กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ที่ตัดเป็นขนาด 1 x 4 เซนติเมตร ลงในหลอด 1 หลอดต่อ 1 ตัวอย่าง (หลอดที่ไม่ได้ใส่กระดาษให้เป็นแบลงค์)

3. บ่มเขย่าที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. จากนั้นใส่ 1 M ของ NaOH ทุกหลอด (โดยเริ่มหลอดที่มีกระดาษก่อน)

5. ดูดสารละลายจากข้อ 4 มา 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร ต่อหลอด

6. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ปิดปากหลอดด้วยลูกแก้ว

7. ทำให้เย็นทันที แล้วใส่น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร/หลอด

8. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

โดยทุกครั้งที่วัดต้องวัดแบลงค์แต่ละหลอดคู่กันเสมอ

3. วิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยใช้ วิธีเฮมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)

4. วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยใช้วิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี (gas chromatography)

นำสารตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที และนำส่วนใสไปวิเคราะห์เอทานอลโดยใช้วิธี แก๊สโครมาโทรกราฟฟี่ ซึ่งประกอบด้วยคอลัมน์สแตนเลส ขนาด 3.3 มิลลิลิตร x 2 เมตร ที่บรรจุด้วย Porapak Q โดยมีการควบคุมอุณหภูมิของเครื่องตรวจวัด (detecter temperature) และอุณหภูมิของตำแหน่งที่ฉีดสารตัวอย่าง (injection temperture) เป็น 240 องศาเซลเซียส และใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นแก๊สตัวพา ด้วยอัตราการไหล 45 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องตรวจวัดแบบแฟลมไอออนไนเซชั่น โดยวิธีนี้เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของเอทานอลประมาณ 2.413 นาที

5. การวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริกโดยวิธีการไตเตรต

สารเคมีที่ใช้

1.สารละลายมาตรฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (potassium hydrogen phthalate, $HKC_8H_4O_4$) เตรียมได้โดยนำโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลตชนิดรีเอเจนต์เกรด ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ แล้วนำมาชั่งให้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหนักของสารที่แน่นอนและมีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 2.0 - 2.4 กรัม นำมาละลายในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร และคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายอันนี้

2. สารละลายสต๊อกโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 50 (สารละลายนี้ทางห้องปฏิบัติการจะเตรียมไว้ให้) ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เป็นของแข็งหนัก 250 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือดและตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องจำนวน 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร เวลาจะละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะมีความร้อนเกิดขึ้น ดังนั้นควรแช่บีกเกอร์ลงในน้ำเพื่อถ่ายเทความร้อน

3.สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้นประมาณ 0.10 F เตรียมได้โดยต้มน้ำกลั่น 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ให้เดือดประมาณ 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง ใช้กระจกนาฬิกาปิดปากบีกเกอร์ไว้ นำสารละลายสต๊อกโซเดียมไฮดรอกไซด์ จาก ข้อ 2 มา 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมลงไป แล้วใช้แท่งแก้วค่อย ๆ คนพยายามอย่าให้ฟองอากาศขณะที่คน ถ่ายสารละลายที่ได้ ทั้งหมดลงในขวดที่มีจุกปิดให้แน่น ถ้าเป็นขวดพอลิเอทิลลีนที่มีจุกเกลียวปิดจะดีมาก

4. สารละลายฟีนอลฟทาลีน (phenolphtalein) เข้มข้นร้อยละ 0.5 ละลายฟีนอฟทาลีน 2.5 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 60 ปริมาณ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร ถ้าสารละลายไปหมดนำไปกรองเอาสารละลายที่ใส่ไปใช้

การไทเทรดหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมโฮดรอกไซด์

สารละลายโซเดียมโฮดรอกไซด์ที่เตรียมได้ในข้อ 3. ข้างบนจะต้องนำความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยการเทสารไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิในข้อ 1. โดยดำเนินการดังนี้

1. บรรจุสารละลายโซเดียมโฮดริกไซด์ลงในบิวเรต บันทึกระดับของสารละลาย บนสเกลก่อนการไทเทรต

2. ใช้ปิเปตขนาด 10.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ดูดสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลตใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 150-250 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเติม 2-3 หยดสารละลายฟีนอลฟทาฟีนลงไป ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พร้อมทั้งเขย่าสารละลายจะได้สีชมพูอ่อนเกิดขึ้น บันทึกระดับของสารละลายบนสเกลของบิวเรตอีกครั้ง และหาปริมาณของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้

3. ทำการไทเทรตซ้ำอีกครั้ง หาปริมาณของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้จะต้องไม่แตกต่างกันเกินกว่า 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ถ้าเกินต้องทำการไทเทรตซ้ำอีก แล้วนำปริมาณของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใกล์กันอย่างน้อยสองค่ามาหาค่าเฉลี่ยแล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมโฮดรอกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาปริมาณกรดซิตริกและแลคติกที่ผลิตได้ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

เริ่มดำเนินการไทเทรตแบบข้างบน แต่ใช้น้ำหมักที่ผลิตได้แทนสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิของโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต บันทึกปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เพื่อคำนวนหาปริมาณกรดต่อไป

การหาความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานปฐมภูมิ (potassium hydrogen phthalate, KHP) มีน้ำหนักโมเลกุลของ KHP 204.23 น้ำหนัก KHP 2.2048 กรัม ละลายในขวดปริมาตรทำปริมาตรเป็น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

$$\text{ความเข้มข้นของกรด} = \frac{2.2048 \times 1000}{204.23 \times 100} \text{ N}$$

$$= 0.107 \text{ N}$$

การหาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ปริมาณ 0.107 N สารละลายมาตรฐานปฐมภูมิ KHP ที่ใช้ครั้งละ 10.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร (โดยไปเปต) อินดิเคเตอร์ ฟีนอฟทาลีน 2 หยด จากไม่มีสีเป็นสีชมพูอ่อน

ปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ 10.7 ลูกบาศก์เซนติเมตร

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์} = \frac{10 \times 0.107}{10.7}$$

$$= 0.10 \text{ N}$$

การหาความเข้มข้นของกรดที่ผลิตได้

$$\text{ความเข้มข้นของกรดที่ผลิตได้ (N)} = \frac{\text{ปริมาตรน้ำหมักที่ใช้} \times \text{ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์}}{\text{ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิกคิดโครมาโตกราฟฟี

สารเคมีที่ใช้

1. สารละลายเอทิลอะซิเตต ใช้ปริมาณเท่ากับปริมาตรของน้ำหมักที่ต้องการสกัดในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ใช้สำหรับสกัดกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักออกมา

2. สารละลายตัวพา ใช้สารละลายเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกพีเอช 3.0 ในอัตรา 35 ต่อ 65

วิธีการวัด

- นำตัวอย่างมาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต ปริมาณ 25 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- นำชั้นของเอทิลอะซีเตตมา 2 มิลลิลิตร มาระเหิดแห้งภายใต้สุญญากาศ

- แล้วนำมาละลายด้วยเมทานอล 0.5 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟีที่มีคอลัมภ์เป็น C_8 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ยาว 250 มิลลิเมตร) สารละลายตัวพาที่มีสัดส่วนระหว่างเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกพีเอช 3 เป็น 35 ต่อ 65 โดยมีอัตราการไหลของสารละลายตัวพาเป็น 1 มิลลิลิตร ต่อ นาที ตรวจวัดชนิดและปริมาณของจิบเบอแรลลิน ภายหลังที่แยกผ่านคอลัมภ์ด้วยเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 208 นาโนเมตร

- นำตัวอย่างมาตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่ง , กิจกรรมเอนไซม์ และ พีเอช

7. การวิเคราะห์ค่าพีเอช

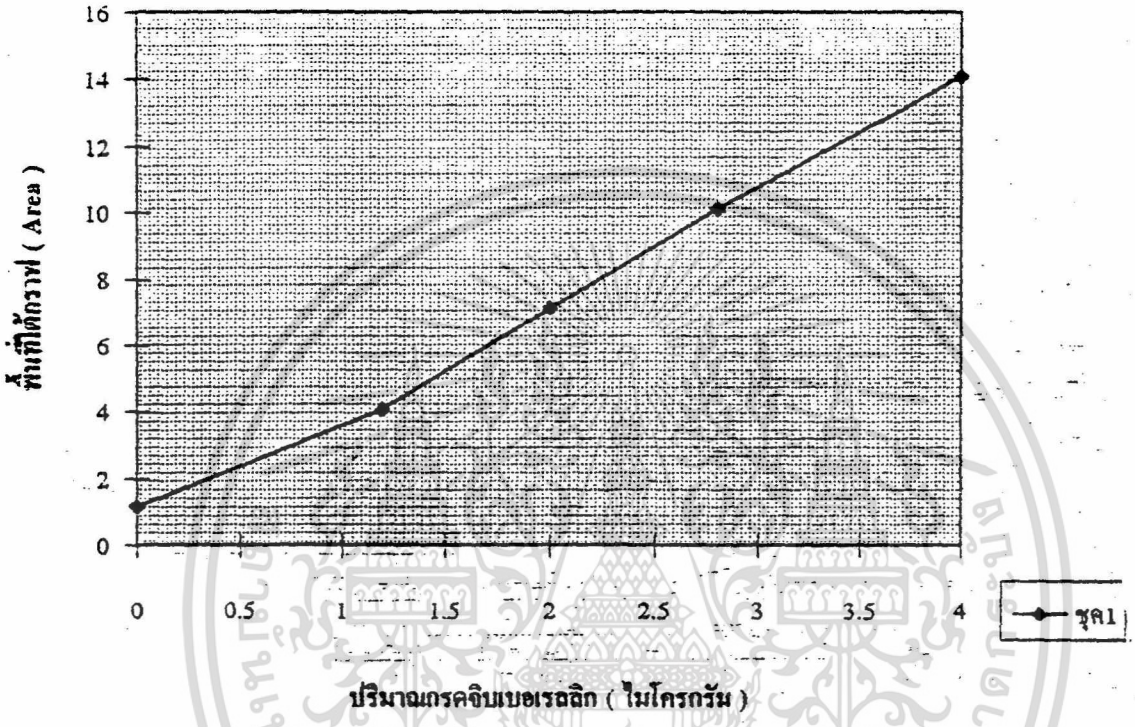
ใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter (TOA) (ORION))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

1. กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดจิบเบอเรลลิก

ใช้ความเข้มข้นที่ 1.2 มิลลิกรัมต่อ 3 มิลลิลิตร



รูปที่ 27 แสดงกราฟมาตรฐานของกรดจิบเบอเรลลิก

โดยมีความสัมพันธ์ $Y = 1.15 \times 10^{5} + 3.785 \times 10^{5} X$

โดยที่ Y = พื้นที่ใต้กราฟ

X = ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (ไมโครกรัม)

ซึ่ง ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (r) เป็น

$r = 1.056$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์บริการ , " หมึกพิมพ์บนถุงบรรจุอาหารที่ทำด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์", 2523,**รายงานกิจกรรมกรมวิทย์ฯบริการ** , หน้า 220 - 221.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์ , รศ.ดร. , " จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม" , 2537 , **สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง** , หน้า (11 - 1) - (11 - 14).

บัญญัติ สุขศรีงาม , รศ. , " จุลชีววิทยาทั่วไป" , 2534 , **สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์** , พิมพ์ครั้งที่ 3 , หน้า 485 - 486.

สมศักดิ์ ดำรงเลิศ และคณะ , " การผลิตแอลกอฮอล์จากผลิตผลทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน" , 2523 , **วารสารนิวเคลียร์สาร** , หน้า 25 - 39.

Abate , C. ; et al . ; " Ethanol Production by A Mixed Culture of Flocculant Strain of ***Zymomonas mpbilis*** and ***Saccharomyces sp.***" . (1996) . **Appl . Microbial . 45** : 580 - 583.

Brook , T.A. : Ingram , L.O. ; " Conversion of Mixed Waste Office Paper to Ethanol by Genetically Engineered ***Klebsiella oxytoca*** Strain P2 " . (1995) . **Biotechnol . Prog . 11** : 619 - 623.

Davison , Brian H . ; Scott , Charles D. ; " A Proposed Biparticle Fluidized - Bed for Lactic Acid Fermentation and Simultaneous Adsorption" . (1991) . **Biot . Bioen . Vol 39** : 365 - 368.

Detroy , R.W. ; et al ; " Bioconversion of Wheat Straw Cellulose / Hemicellulose to Ethanol by ***Saccharomyces uvarum*** and ***Pachysolen tannophilus***" . (1982) . **Biotech . and Bioen . , Vol . XXIV** , Pp . 1105 - 1113.

Holme , Tord ; Zacharias , Bengt ; " Gibberellic Acid Formation in Continuous Culture" . (1965) . **Biot . and Bioen . Vol . VII** : 405 - 415.

Jeusen , Einar ; et al ; " Analysis of Gibberellins and Gibberellin Conjugates by Ion - suppression Reversed - Phase Hhigh - Performance Liquid Chromatography" . (1986) . **J . of Chromatrography , 367** : 377 - 384.

Maddox , I.S. ; Richert , S.H. ; " Production of Gibberellic Acid Using a Diary Waste as the Basal Medium" . (1977) . **Appied and Env . Micro . Vol . 33 . No . 1** : 201 - 202.

Morris , Shu ; and Kim . ; " Bioconversion of Waste Paper to Ethanol" . (1992) . **Process Biochem . Vol . 27 , Pp . 239 - 245.**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Punnapayak , H . ; and Emert , G.H. , " Use of ***Pachysolen tannophilus*** in Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulosic" . (1986) . **Biotechnol . Lett . , Vol . 8 . No . 1** , Pp . 63 - 66.

Sanchez - Marroquin , A . ; " Microbiological Production of Gibberellic Acid in Glucose Media" . (1963) . **Appl . Microbiol . Vol . 11** : 523 - 528.

Sarangbin , S . ; et al. ; " Formation of Autodiploid Strains in ***Aspergillus niger*** and Their Application to Citric Acid Production from Strach" . (1994) . **J . of Ferment . and Bioen . Vol . 77 No . 5 .** : 474- 478.

Schmidt , S . ; Padukono , N . ; " production of Lactic Acid from Wastepaper as a Cellulosic Feedstock" . (1997) . **J . of Ind . Micro . and Biot . 18** : 10 - 14.

Stodola , Frank H . ; et al . ; " The Microbiological Production of Gibberellin A and X" . (1955) . **Archives of Biochem . and Biophysics . Vol . 54** : 240 - 245.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้