สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเอทานอลจากมันเทศโดยใช้เอนไซม์และเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

Ethanol Production from Sweet Potato by Enzymes and *Saccharomyces cerevisiae*

T117179

กรวิกา ตั้นพัฒนกิจ
ซารีนา สาเล็ง
นัฏกาญจน์ จิตรแก้ว

เลขหมู่
เลขทะเบียน 117179
วัน,เดือน,ปี 19 ก.ค. 2554
b
i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ETHANOL PRODUCTION FROM SWEET POTATO BY ENZYMES AND *Saccharomyces cerevisiae*

KORNWIGA TANPATTHANAGIT

SARINA SALENG

NATTAKARN CHITKAEW

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตเอทานอลจากมันเทศโดยใช้เอนไซม์ และเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Production from Sweet Potato by Enzymes and *Saccharomyces cerevisiae*		
ชื่อนักศึกษา	กรวิกา	ตั้นพัฒนกิจ	รหัส 50050791
	ซารีนา	สาเล็ง	รหัส 50050807
	นัฏกาญจน์	จิตรแก้ว	รหัส 50050827
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต		
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. ดวงใจ โอชัยกุล		

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์	
กรรมการ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตเอทานอลจากมันเทศโดยใช้เอนไซม์ และเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

Ethanol Production from Sweet Potato by Enzymes and *Saccharomyces cerevisiae*

ชื่อนักศึกษา กรวิกา ตั้นพัฒนกิจ รหัส 50050791

ซารีนา สาเล็ง รหัส 50050807

นัฏกาญจน์ จิตรแก้ว รหัส 50050827

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดวงใจ โอชัยกุล

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการนำมันเทศซึ่งเป็นพืชจำพวกแป้งชนิดหนึ่งทางการเกษตรมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตเอทานอลและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการย่อยมันเทศเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันเทศของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในกระบวนการลิเคอ-แฟกชัน คือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และใช้ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 16.43 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันเทศของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน คือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.015 และใช้ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 41.78 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดในสภาวะที่เหมาะสมข้างต้นหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 ที่แยกได้จากลูกแป้ง กระบวนการหมักเอทานอลโดยการย่อยแป้งมันเทศเป็นน้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก (Separate Hydrolysis and Fermentation , SHF) ให้ปริมาณเอทานอล 14.55 กรัมต่อลิตร ในเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับกระบวนการย่อยแป้งมันเทศเป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous Saccharification and Fermentation , SSF) ได้ปริมาณเอทานอล 12.62 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ : มันเทศ *Saccharomyces cerevisiae* เอทานอล การย่อยแป้งเป็นน้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก การย่อยแป้งเป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Ethanol Production from Sweet Potato by Enzymes and *Saccharomyces cerevisiae*		
Students	KORNWIGA	TANPATTHANAGIT	ID 50050791
	SARINA	SALENG	ID 50050807
	NATTAKARN	CHITKAEW	ID 50050827
Degree	Bachelor of Science		
Major Program	Industrial Microbiology		
Advisor	Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul		

ABSTRACT

The aim of this work was to utilize sweet potato (starchy tubers) for the production of bio-ethanol. The study of optimal conditions for α-amylase and glucoamylase was carried on. These enzymes hydrolyzed sweet potato starch and the maximum reducing sugars were resulted. The optimum α-amylase concentration and volume were 0.05% (w/v) and 5 ml , respectively at 90 °C for 2 h and provided the concentration of reducing sugar of 16.43 g/l. Followed by the optimum glucoamylase concentration and volume (0.015 (w/v) and 20 ml) at 60 °C for 4 h. The concentration of reducing sugar was 41.78 g/l. After hydrolyzation of sweet potato starch with these two enzymes at optimal conditions and fermented by *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 isolated from Look-pang. The ethanol concentration was 14.55g/l in the case of separate hydrolysis and fermentation process (SHF) in 72 h. For simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) , the maximum concentration of ethanol was 12.62 g/l.

Keywords : Sweet potato , *Saccharomyces cerevisiae* , Ethanol , SHF , SSF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเทศโดยใช้เอนไซม์และเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* จะสำเร็จลุล่วงมิได้หากขาดความร่วมมือ ความช่วยเหลือ ตลอดจนคำแนะนำที่ดีต่างๆ ซึ่งล้วนแต่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในโอกาสนี้คณะผู้จัดทำจึงขอกล่าวขอบคุณบุคคลดังต่อไปนี้ ที่ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับโครงงานพิเศษฉบับนี้ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษเป็นอย่างสูง ที่ได้สละเวลาอันมีค่า มาให้ความรู้และให้คำปรึกษา ตลอดการดำเนินงานโครงงานพิเศษนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณประธานกรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง และกรรมการ ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ที่สละเวลาชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหาโครงงานพิเศษ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของเล่มรายงานจนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกและให้ความอนุเคราะห์ในการยืม-คืนอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการสาขาชีววิทยา ที่ช่วยเป็นธุระประสานงานอย่างดีทุกครั้งเมื่อมาติดต่อ

ขอขอบคุณพี่ๆ นักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอกทุกท่าน รวมทั้งคุณมาวิณี แย้มจันทรามาศ ที่ให้คำปรึกษา และสอนการใช้เครื่องมือเฉพาะทางบางชนิด ตลอดจนเพื่อนนักศึกษาสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมรุ่น 6 ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจ

และที่สำคัญที่สุด ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ผู้ให้กำเนิด เลี้ยงดู สั่งสอน รวมทั้งทุกๆ คนในครอบครัว ซึ่งเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งสำหรับการทำโครงงานพิเศษนี้

สำหรับคุณค่าและประโยชน์ที่ก่อเกิดจากโครงงานพิเศษฉบับนี้ คณะผู้จัดทำขอมอบไว้แด่บิดามารดา และครูบาอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดี และประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้จนเติบโตอย่างสมภาคภูมิมาถึงทุกวันนี้

กรวิกา ตั้นพัฒนกิจ
ซารีนา สาเล็ง
นัฏกาญจน์ จิตรแก้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูปภาพ	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ขั้นตอนในการดำเนินงาน	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 เอทานอล	4
2.2 การผลิตเอทานอล	5
2.2.1 ขั้นตอนเบื้องต้นในการผลิตเอทานอล	5
2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอล	6
2.4 เชื้อยีสต์ในการผลิตเอทานอล	8
2.4.1 ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล	8
2.4.2 วงจรชีวิตของยีสต์	8
2.4.3 ยีสต์ที่ผลิตเอทานอล	8
2.4.4 ยีสต์ที่พบในลูกแป้ง	11
2.5 แป้ง	12
2.5.1 องค์ประกอบภายในแป้ง	12
2.5.2 กลไกการย่อยแป้ง	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6 มันเทศ	14
2.6.1 ประวัติความเป็นมาของมันเทศ	15
2.6.2 การจำแนกมันเทศทางพฤกษศาสตร์	16
2.6.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	16
2.6.4 ประโยชน์	18
2.7 เอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส	19
2.7.1 ชนิดของเอนไซม์อะไมเลสโดยแบ่งตามตำแหน่งการย่อยแป้ง	19
2.7.2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	20
2.7.3 การนำเอาเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส มาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม	20
2.7.4 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส	20
2.8 กระบวนการผลิตเอทานอล	21
2.8.1 กระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลแยกจากกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF)	21
2.8.2 กระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation; SSF)	22
2.9 ปัจจัยที่สำคัญต่อการหมักเอทานอล	22
2.9.1 ความเข้มข้นของน้ำตาล	22
2.9.2 ความเข้มข้นของเอทานอล	23
2.9.3 คาร์บอนไดออกไซด์และความดัน	23
2.9.4 ออกซิเจน	23
2.9.5 กรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติก	23
2.9.6 ความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออน	24
2.9.7 สารเร่งการเจริญเติบโต	24
2.9.8 โลหะ	24
2.9.9 อุณหภูมิ	24
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 27

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ 27

3.2 วัตถุดิบ 27

3.3 สารเคมี 27

3.4 อุปกรณ์ 27

3.5 วิธีการทดลอง 28

3.5.1 การเตรียมแป้งมันเทศ 28

3.5.2 การเตรียมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 29

3.5.3 การเตรียมเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 29

3.5.4 ศึกษากระบวนการลิเคอแฟกชัน (Liquefaction) ของมันเทศ โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 29

3.5.5 ศึกษากระบวนการแซคคาริฟิเคชัน (Saccharification) ของมันเทศ โดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส 30

3.5.6 กระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF) 31

3.5.7 กระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; SSF) 32

3.5.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ 32

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 33

4.1 ผลการศึกษากระบวนการลิเคอแฟกชัน (Liquefaction) ของมันเทศ โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 33

4.1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่เหมาะสมต่อกระบวนการลิเคอแฟกชัน 35

4.1.2 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสม ต่อกระบวนการลิเคอแฟกชัน 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 ผลการศึกษากระบวนการแซคคาริฟิเคชัน (Saccharification) ของมันเทศ โดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส 36

4.2.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่เหมาะสมต่อกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน 36

4.2.2 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เหมาะสมต่อ กระบวนการแซคคาริฟิเคชัน 38

4.3 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยเป็น น้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF) 40

4.4 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาล พร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; SSF) 40

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 44

เอกสารอ้างอิง 45

ภาคผนวก 49

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ 49

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางเคมีและเครื่องมือวิเคราะห์ 50

ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบ 62

ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ทางสถิติ 71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล	7
2.2 แสดงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ผลิตเอทานอลของยีสต์จีนัส *Saccharomyces*	9
2.3 แสดงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ผลิตเอทานอลของยีสต์จีนัส *Schizosaccharomyces*	10
2.4 แสดงส่วนประกอบในหัวมันเทศ	18
4.1 แสดงผลของความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการลิเคอแฟกชันของแป้งมันเทศที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	34
4.2 แสดงผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการลิเคอแฟกชันของแป้งมันเทศที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	35
4.3 แสดงผลความเข้มข้นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการแซคคาริฟิเคชันของแป้งมันเทศที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	37
4.4 แสดงผลปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการแซคคาริฟิเคชันของแป้งมันเทศที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	39
4.5 แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการหมักแป้งมันเทศโดยกระบวนการ SHF และ SSF เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	41
ค – 1 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	62
ค – 2 ผลของปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	63
ค – 3 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	64
ค – 4 ผลของปริมาณของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	65
ค – 5 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF) และกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; SSF)	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างเคมีของเอทานอล	4
2.2 เซลล์ *Saccharomyces cerevisiae*	9
2.3 วงจรในการแตกหน่อของยีสต์	10
2.4 เซลล์ *Schizosaccharomyces pombe*	11
2.5 ลักษณะของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*	12
2.6 โครงสร้างทางเคมีของอะไมโลส	13
2.7 โครงสร้างทางเคมีของอะไมโลเพคติน	13
2.8 แสดงลักษณะของมันเทศ	14
2.9 การย่อยอะไมโลสด้วยเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส	19
4.1 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ในกระบวนการลิเคอแฟกชันของแป้งมันเทศ	34
4.2 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยแปรผันปริมาณของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ในกระบวนการลิเคอแฟกชันของแป้งมันเทศ	36
4.3 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชันของแป้งมันเทศ	38
4.4 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยแปรผันปริมาณของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชันของแป้งมันเทศ	39
ข-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสวัดด้วยวิธี Somogyi-Nelson ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร	51
ข-2 แผนภาพวิธีเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล	54
ข-3 กราฟเอทานอลมาตรฐานวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี	55
ข-4 (a-j) แสดงพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอล และพื้นที่ใต้กราฟของโพรพานอล (เอทานอลมาตรฐาน) จากโครมาโตแกรมของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ค-1 (a-c) แสดงพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอล และพื้นที่ใต้กราฟของโพรพานอล (วิธี SHF) จากโครมาโตแกรมของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี 68

ค-2 (a-c) แสดงพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอล และพื้นที่ใต้กราฟของโพรพานอล (วิธี SSF) จากโครมาโตแกรมของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี 70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

ในสภาวะปัจจุบันประเทศไทยต้องประสบกับความเสียเปรียบทางด้านพลังงาน เนื่องจากมีการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อการขนส่งในปริมาณที่สูงมาก และเมื่อราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกมีราคาสูง และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดเวลา ส่งผลให้ประเทศไทยต้องเผชิญกับความเสียเปรียบทางด้านเศรษฐกิจอีกด้วย การพิจารณาหาแหล่งพลังงานใหม่เพื่อใช้ทดแทนน้ำมันจึงเป็นนโยบายที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพัฒนาแหล่งพลังงานทดแทนที่มาจากวัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถผลิตได้เองภายในประเทศ อันจะนำไปสู่การสร้างเสถียรภาพและความมั่นคงทางด้านพลังงาน ด้านการเกษตร และด้านเศรษฐกิจของประเทศอย่างยั่งยืน

พลังงานทดแทนที่ทั่วโลกกำลังให้ความสนใจกันมากในขณะนี้ คือ น้ำมันแก๊สโซฮอล์ ซึ่งเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงที่ได้จากการผสมระหว่างน้ำมันเบนซินกับเอทานอล ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ผลิตได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีโดยใช้เอทิลีนเป็นวัตถุดิบ และกระบวนการทางชีวเคมีโดยใช้ พืชผลหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีแป้งและน้ำตาลสูงเป็นวัตถุดิบ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ได้รับความนิยม และมีวัตถุดิบที่สามารถเลือกใช้ได้หลากหลายชนิดตามความเหมาะสมของแต่ละประเทศ เช่น มันเทศ มันสำปะหลัง อ้อย กากน้ำตาล ฟางข้าว หญ้า ขี้เลื่อย เป็นต้น (www.pttplc.com)

ในปัจจุบันได้มีความพยายามในการหาวัตถุดิบชนิดใหม่ มาใช้ทดแทนวัตถุดิบที่เคยนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมและอยู่ในเขตร้อนชื้น มันเทศเป็นพืชชนิดหนึ่งที่ปลูกกันทั่วไปในประเทศไทย และมีแป้งเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง โดยองค์ประกอบภายในมันเทศมี คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 25 โปรตีนร้อยละ 1.70 ไขมันร้อยละ 0.30 แร่ธาตุต่างๆ แคโรทีน วิตามินบี 1 วิตามินซี โรโบฟลาวิน ไนอาซีน (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่มที่ 5) เนื่องจากมันเทศหาได้ไม่ยากและมีตลอดทั้งปี การนำมันเทศมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิตลง การนำวัตถุดิบประเภทแป้งมาผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอทานอลต้องมีการนำแป้งมาย่อยเพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล จากนั้นเข้ากระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล (Sanchez และคณะ,2008)

ในโครงงานพิเศษนี้ จึงได้สนใจนำมันเทศมาใช้ในการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน โดยนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อย จากนั้นนำมาหมักด้วยเชื้อยีสต์ ซึ่งนอกจากจะได้เอทานอลเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานแล้ว ยังสามารถลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่งด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาการนำมันเทศซึ่งเป็นพืชจำพวกแป้งชนิดหนึ่งทางการเกษตร มาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตเอทานอล

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการนำเอนไซม์มาย่อยมันเทศ เพื่อให้ได้น้ำตาลที่ยีสต์สามารถนำไปใช้หมักเป็นเอทานอลได้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

โครงงานพิเศษนี้มุ่งศึกษาการนำมันเทศมาใช้ในการผลิตเอทานอล เพื่อนำเอาเอทานอลที่ได้มาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทน โดยมีการนำเอนไซม์มาใช้ในขั้นตอนการย่อยเพื่อให้ได้น้ำตาลที่สามารถหมักเป็นเอทานอลได้ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการนำเอนไซม์มาใช้ในการย่อยเพื่อให้ได้น้ำตาลที่สามารถหมักได้ในปริมาณมากที่สุด จากนั้นนำแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยแล้วมาหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้า และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถนำมันเทศซึ่งเป็นพืชจำพวกแป้งชนิดหนึ่งทางการเกษตร มาแปรรูปเพื่อทำให้มีมูลค่าสูงขึ้น โดยนำมาผลิตเอทานอล เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทน

1.4.2 เพื่อที่จะได้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการนำเอนไซม์มาย่อยมันเทศ ให้ได้ปริมาณน้ำตาลที่สามารถนำมาใช้ในการหมักเพื่อที่จะให้ได้เอทานอลปริมาณสูงสุด

1.4.3 ได้เทคนิคที่เหมาะสมสำหรับใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลจากมันเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

การดำเนินงานวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 เตรียมแป้งมันเทศ

นำมันเทศมาปอกเปลือก และหั่นเป็นแผ่นบางๆ จากนั้นนำมันเทศไปอบแห้งเป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำไปบดให้ละเอียด จากนั้นนำไปร่อนผ่านตะแกรง

ขั้นที่ 2 ศึกษากระบวนการลิเคอแฟกชัน (Liquefaction)

โดยทำการศึกษาถึงความเข้มข้นและปริมาณของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) ที่เหมาะสมในการย่อยแป้ง จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้

ขั้นที่ 3 ศึกษากระบวนการแซคคาริฟิเคชัน (Saccharification)

โดยทำการศึกษาถึงความเข้มข้นและปริมาณของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ที่เหมาะสมในการย่อยแป้ง จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้

ขั้นที่ 4 ศึกษาการหมักเอทานอล

โดยนำแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในขั้นต้น นำมาหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้า โดยหมักในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือและปริมาณเอทานอลที่ได้

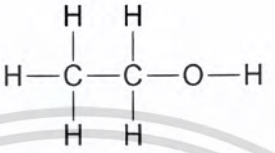
ขั้นที่ 5 รวบรวมข้อมูลและจัดทำรายงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล



รูปที่ 2.1 โครงสร้างเคมีของเอทานอล

ที่มา : Wikipedia® (2008)

เอทานอลเป็นวัสดุใสไม่มีสี ติดไฟได้ เป็นสารเคมีอินทรีย์ที่หมักได้จากพืชในกลุ่มแป้งหรือน้ำตาล เอทานอลเป็นที่รู้จักกันในชื่อทั่วไปว่า "เอทิลแอลกอฮอล์" มีผสมอยู่ในสุราหรือเครื่องดื่มที่ผสมแอลกอฮอล์ทุกชนิดที่ใช้บริโภค เอทานอลมีลักษณะและโครงสร้างเคมีคล้ายกับสารเคมีอินทรีย์อีกชนิดหนึ่งคือ เมทานอล หรือเมทิลแอลกอฮอล์ แต่เมทานอลสกัดจากขบวนการกลั่นวัสดุปิโตรเคมีและเป็นวัสดุที่มีพิษเมื่อนำมาบริโภค ส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมที่ผลิตภัณฑ์ไม่นำมาบริโภคหรือมาใช้โดยตรงกับมนุษย์หรือสัตว์ เอทานอลในทางเคมีเป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์มีสูตรทางเคมีคือ C_2H_5OH ซึ่งมีสูตรโครงสร้างตามรูปที่ 2.1 ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และอ๊อกซิเจน เป็นไฮดรอกซิลดิริเวทีฟของไฮโดรคาร์บอน เกิดจากการแทนที่ ไฮโดรเจนอะตอมด้วย hydroxyl group (OH) เอทานอลบริสุทธิ์ (anhydrous) มีจุดเดือดที่ 78.5 องศาเซลเซียส คุณสมบัติของเอทานอลใช้เป็นสารเพิ่มอ๊อกเทนในน้ำมันแก๊สโซลีนได้ทำให้มีการใช้ผสมแก๊สโซลีนอย่างแพร่หลายแทนสารผสมที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันคือสาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) ซึ่งมีการค้นพบว่าเป็นสารที่มีอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อมีการรั่วไหลออกสู่แหล่งน้ำสาธารณะและเคยมีกรณีปนเปื้อนในน้ำดื่มในสหรัฐอเมริกาและหากมีการห้ามใช้ สาร MTBE ผสมในเชื้อเพลิงจะทำให้มีความต้องการใช้เอทานอลเพิ่มขึ้น (วิโรจ์,2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอทานอล ถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น ใช้เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เหล้า ไวน์ และเบียร์ ใช้ในอุตสาหกรรมยา ใช้เป็นตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม เช่น สีแล็กเกอร์ ยาเคลือบน้ำมัน และขี้ผึ้ง (ครีมขัดรองเท้า) เป็นเรซิน ใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์สารเคมีและชีวเคมี ใช้เป็นสารเพิ่มค่าอ๊อกเทนในน้ำมันเบนซินที่เรียกว่าแก๊ซโซฮอล์ ใช้เป็นอาหาร เช่น น้ำส้มสายชู เจลาติน ใช้ทางด้านการแพทย์ เช่น ใช้เช็ดแผล ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ใช้เป็นตัวรีเอเจนต์ในห้องปฏิบัติการและอื่นๆ เป็นต้น (หนังสือพลังงานทดแทนเอทานอล และไบโอดีเซล)

2.2 การผลิตเอทานอล

แหล่งพลังงานที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันได้มาจากเชื้อเพลิงปิโตรเลียม คือ น้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล และยังมีแนวโน้มลดลงตามลำดับ ในทางกลับกันค่าราคาน้ำมันในยุคนี้ยังเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นหลายประเทศจึงพยายามหาพลังงานอื่นมาทดแทนในรูปแบบต่างๆ เช่น พลังงานลม น้ำ แสงอาทิตย์และพลังงานชีวมวล

เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจในขณะนี้ พบว่าร้อยละ 90 ได้มาจากกระบวนการหมัก ที่เหลือได้จากการสังเคราะห์ขึ้นมา ในกระบวนการผลิตเอทานอลกระบวนการหมักเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่จุลินทรีย์จะเป็นตัวไปเปลี่ยนวัตถุดิบให้กลายมาเป็นเอทานอล (www.nrel.gov)

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

วัตถุดิบ(น้ำตาล) เอทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์

กระบวนการหมักเอทานอล สามารถทำได้ทั้งในระบบต่อเนื่อง (Continuous) และแบบกะ (Batch) แต่กระบวนการหมักส่วนใหญ่ยังคงนิยมใช้แบบกะ เนื่องจากต้นทุนไม่สูงมากและง่ายต่อการควบคุมดูแลรักษา อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักประมาณ 30 – 35 องศาเซลเซียส การที่ใช้อุณหภูมิสูงเนื่องจากต้องการเฉพาะเอทานอล จึงไม่จำเป็นต้องคำนึงถึงสารที่ให้กลิ่นรส ซึ่งจะเกิดได้น้อยและระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นลง อีกทั้งยังช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้อีกด้วย (Hacking และคณะ, 1984)

2.2.1 ขั้นตอนเบื้องต้นในการผลิตเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบ่งออกได้เป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. การเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมัก
2. การเตรียมหัวเชื้อ และการหมัก
3. การคัดแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์
4. การใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์รองและของเสีย

(ที่มา :http://www.science.cmu.ac.th/department/ic/document/pic/dc8.pdf)

ในขั้นเตรียมวัตถุดิบก่อนกระบวนการหมัก ถ้าใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบก็จะนำมาทำการเจือจางด้วยน้ำ เพื่อปรับความเข้มข้นของน้ำตาลให้เหมาะสม จึงสามารถนำเข้าสู่กระบวนการหมักได้ แต่ถ้าใช้วัตถุดิบประเภทแป้ง ก็จะต้องย่อยให้กลายเป็นน้ำตาลก่อน โดยการใช้กรดหรือเอนไซม์ โดยทั่วไปแล้วนิยมใช้เอนไซม์ เนื่องจากสะดวก ปฏิกิริยาที่เกิดต่อวัตถุดิบไม่รุนแรง และผลิตภัณฑ์เอทานอลที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงกว่า

ขั้นตอนต่อไปเป็นการเตรียมหัวเชื้อยีสต์ และเริ่มทำการหมัก โดยสภาวะที่ใช้ในการหมักจะเกิดได้ภายใต้สภาวะที่ไร้ออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเล็กน้อย และใช้เวลาในการหมักประมาณ 2-3 วัน จนได้น้ำหมักที่มีเอทานอลผสมอยู่ ในทางปฏิบัติแล้ว ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลเพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ประมาณร้อยละ 95 ส่วนน้ำตาลที่เหลือ ยีสต์ใช้สำหรับการเจริญของเซลล์ หรือเปลี่ยนไปเป็นผลพลอยได้ชนิดอื่นๆ เช่น ฟูเซลออยล์ (Fusel oil) กรดแลกติก กลีเซอรีนและอะซิทัลดีไฮด์ เป็นต้น

น้ำหมักที่ได้จะนำมาผ่านการกลั่นลำดับส่วน ซึ่งจะได้เอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 95.6 แต่โดยปกติจะเรียกเอทานอลร้อยละ 95 ซึ่งยังไม่สามารถใช้ผสมลงในน้ำมันเบนซินได้เพราะจะเกิดการแยกชั้นของน้ำกับน้ำมัน จึงต้องมีการใช้เทคโนโลยีเพื่อแยกน้ำออกจากเอทานอล เรียกว่า เอทานอลไร้น้ำ (Anhydrous ethanol หรือ Absolute ethanol) ซึ่งมีความบริสุทธิ์ถึงร้อยละ 99.5 เมื่อเอทานอลที่ได้ มีความบริสุทธิ์ถึงร้อยละ 99.5 แล้ว สามารถนำมาผสมกับน้ำมันเบนซิน เป็นน้ำมันแก๊สโซฮอล์ได้ โดยมีขั้นตอนคือ นำเอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร อัตราส่วนร้อยละ10 ใส่ลงในถังผสมแล้วเติมสารป้องกันการกัดกร่อน (Corrosion inhibitor) ลงไป จากนั้นเติมน้ำมันเบนซิน 91 หรือ น้ำมันเบนซิน 95 ลงไปอัตราส่วนร้อยละ 90 เดินเครื่องสูบหมุนเวียน เพื่อให้น้ำมันและส่วนผสมเข้ากัน ใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที จะได้แก๊สโซฮอล์ (ทนงศักดิ์, 2548)

2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอล

วัตถุดิบหลักที่ใช้ในการหมักเอทานอล สามารถแบ่งออกได้เป็น

2.3.1 น้ำตาล จากวัตถุดิบพวกอ้อย หัวบีท กากน้ำตาลและของเสียจากโรงอาหารบางประเภท

2.3.2 แป้ง วัตถุดิบจากพวกข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลังและอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 เซลลูโลส จากวัตถุดิบพวกเศษไม้และของเหลือทิ้งจากการเกษตร เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว ซังข้าวโพด เป็นต้น

2.3.4 ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น น้ำหางนม น้ำแช่เยื่อกระดาษ น้ำแช่ข้าวโพดและน้ำทิ้งจากโรงงานผลไม้ เป็นต้น

ในบรรดาวัตถุดิบทั้งหลาย น้ำตาลเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมที่สุดโดยเฉพาะกากน้ำตาล เป็นวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม ส่วนวัตถุดิบประเภทแป้ง เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของแป้งประกอบด้วย อะไมโลส และ อะไมโลเพคติน โดยมีส่วนประกอบหลักเป็นกลูโคส ดังนั้นจึงต้องใช้เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส ย่อยแป้งให้ได้เป็นน้ำตาล แล้วจึงนำไปใช้หมักแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังใช้กรดในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลก็ได้แต่เป็นขั้นตอนที่ไม่เหมาะสมหลายประการ เช่น การกัดกร่อนภาชนะด้วยกรด เป็นต้น

วัตถุดิบประเภทเซลลูโลสจะต้องผ่านขั้นตอนแปรสภาพ โดยอาจใช้การย่อยด้วยเอนไซม์ เช่น เซลลูเลส หรือด้วยกรด อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนทั้งสองก็มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน

ตารางที่ 2.1 แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล

ชนิดของ คาร์โบไฮเดรต	วัตถุดิบที่ใช้	ส่วนประกอบที่ได้จากการย่อยสลาย
ซูโครส	อ้อย บีท กากน้ำตาล	กลูโคสและฟรุคโตส
แป้ง	ข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง มันฝรั่ง เผือก	กลูโคส มอลโตส มอลโตไตรโอส และเดกซ์ตริน
เซลลูโลส	ไม้ เศษไม้ ของเหลือจาก การเกษตร(ชานอ้อย, ฟางข้าว)	กลูโคส แมนโนส กาแลคโตส อราบิโนส และไซโลส
แลคโตส	น้ำหางนม	กลูโคสและกาแลคโตส

ที่มา : กมล และ สุเปรมปรีดิ์ (2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 เชื้อยีสต์ในการผลิตเอทานอล

2.4.1 ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

2.4.1.1 ให้ความเข้มข้นของเอทานอลและมีอัตราการหมักได้เอทานอลสูง

2.4.1.2 ทนต่อเอทานอลที่เกิดขึ้น เนื่องจากถ้าเชื้อจุลินทรีย์มีความไวต่อเอทานอล จะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายปริมาณต่ำ

2.4.1.3 ทนทานต่อสภาวะกรดหรือพีเอชต่ำ

2.4.1.4 มีความสามารถในการตกตะกอน เพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักได้ง่าย

2.4.1.5 มีความคงตัวทางพันธุกรรม ไม่เปลี่ยนแปลงง่าย

2.4.1.6 สามารถทนต่อแรงดันออสโมซิสที่เปลี่ยนแปลงไปได้

(ที่มา : www.agro.cmu.ac.th/e_books/.../%BA%B7%B7%D5%E84.ppt)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญ ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการหมักที่ใช้ยีสต์ในการผลิต จัดเป็นอุตสาหกรรมหมักที่ใหญ่ที่สุด มีดังนี้

1. เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (Alcoholic beverages) ได้แก่เบียร์ และสุราชนิดต่างๆ
2. ยีสต์ในการทำขนมปัง (Bakers' yeast)
3. ยีสต์อาหารคนและอาหารสัตว์ (Food and fodder yeast)
4. แอลกอฮอล์เชื้อเพลิง (Fuel alcohol)

2.4.2 วงจรชีวิตของยีสต์

ยีสต์จีนัส *Saccharomyces* มีรูปร่างเป็นเซลล์เดียว (unicellular) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 ไมครอน เจริญได้ดีในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding)

2.4.3 ยีสต์ที่ผลิตเอทานอล

2.4.3.1 จีนัส *Saccharomyces*

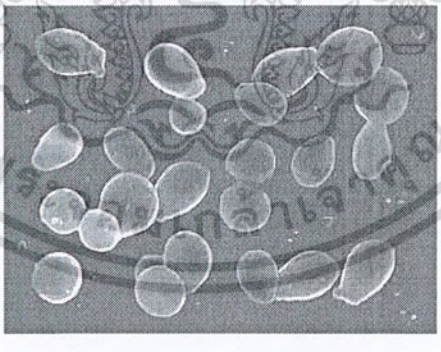
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces uvarum, Saccharomyces bataiae, Saccharomyces carlsbergensis, Saccharomyces globosus* โดยเชื้อยีสต์เหล่านี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกัน (http://www.vcharkarn.com/vcafe/125301)

ตารางที่ 2.2 แสดงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ผลิตเอทานอลของยีสต์จีนัส *Saccharomyces*

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์ของยีสต์
กลูโคส	ผลิตได้ทุกสายพันธุ์
กาแลคโตส	ผลิตได้บางสายพันธุ์
ซูโครส	ผลิตได้บางสายพันธุ์
มอลโตส	ผลิตได้บางสายพันธุ์
แลคโตส	ไม่มีสายพันธุ์ที่ผลิตได้

ที่มา : กมล และ สุปรมปรีดิ์ (2540)

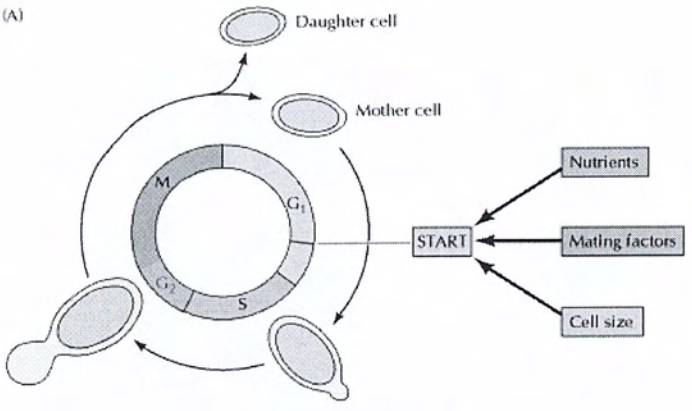


รูปที่ 2.2 เซลล์ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา : http://www.diwinetaste.com/html/dwt20071/

Images/SaccharomycesCerevisiae.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 วงจรในการแตกหน่อของยีสต์

ที่มา : www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi

2.4.3.2 จีนัส *Schizosaccharomyces*

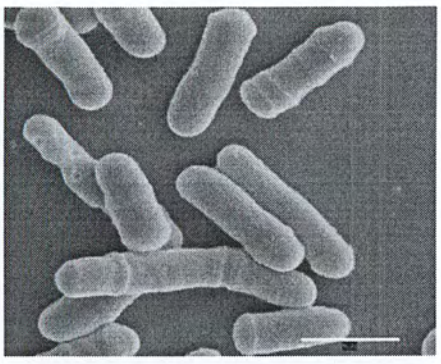
ได้แก่ *Schizosaccharomyces pombe, Schizosaccharomyces mellacei, Schizosaccharomyces formosensis, Schizosaccharomyces vordermani* ซึ่งยีสต์เหล่านี้ใช้แหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกัน

ตารางที่ 2.3 แสดงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ผลิตเอทานอลของยีสต์จีนัส *Schizosaccharomyces*

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์ของยีสต์
กลูโคส	ผลิตได้ทุกสายพันธุ์
กาแลคโตส	ไม่มีสายพันธุ์ที่ผลิตได้
ซูโครส	ผลิตได้ทุกสายพันธุ์
มอลโตส	ผลิตได้ทุกสายพันธุ์
แลคโตส	ไม่มีสายพันธุ์ที่ผลิตได้

ที่มา : กมล และ สุเปรมปรีดิ์ (2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 เซลล์ *Schizosaccharomyces pombe*

ที่มา : http ://www.bscb.org/newsletter/summer2006/pombe1.jpg

2.4.4 ยีสต์ที่พบในลูกแป้ง

ยีสต์

Ascomycetous yeast

Class Ascomycetes

Subclass Hemiascomycetidae

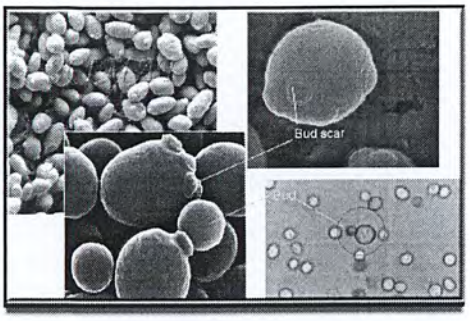
Order Endomycetales

Family Saccharomycetaceae

Genus Saccharomyces sp.

Family *Saccharomycetaceae* ยีสต์จะทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทิลแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ ยีสต์มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการหมักจะมีการสร้าง Ascospores แบบอาศัยเพศอยู่ใน Asci ได้แก่ ยีสต์สกุล *Saccharomyces sp.* และ *Candida sp.* เนื่องจากยีสต์มีคุณสมบัติในการหมักน้ำตาลได้ดี ดังนั้นในกระบวนการหมักผักและผลไม้หรือปลาสดร่วมกับกากน้ำตาล (อาจใช้น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลอ้อย) ยีสต์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หลังจากการหมักวัสดุอินทรีย์ด้วยน้ำตาล (1-2 วัน จะได้กลิ่นแอลกอฮอล์) ยีสต์ในธรรมชาติจะเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ เนื่องจากได้แหล่งอาหารจากน้ำตาล โดยจะปรากฏอยู่ที่บริเวณผิวหน้าของวัสดุหมักเป็นฟองที่ลอกเป็นฝ้าอยู่ที่ผิวของน้ำหมัก อาจจะเรียกว่า Top Yeasts เมื่อการหมักลดลงจะตกตะกอนลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 ลักษณะของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา : http://158.108.88.131/courseware/charoen/unit4/

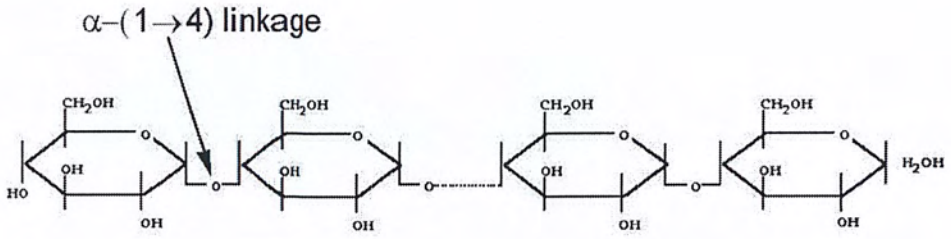
Montesinos และ Navarro (1999)ได้ทำการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการ SSF จากแป้งข้าวสาลีโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส พบว่า จากการย่อยแป้งเบื้องต้น 6 ชั่วโมง ด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 270 AGUต่อกิโลกรัมของแป้ง ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักประมาณ 60 ชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสเป็น 540 AGUต่อกิโลกรัมของแป้ง ระยะเวลาการหมักลดลงเหลือ 21 ชั่วโมง และให้ความเข้มข้นของเอทานอล เท่ากับ 67 กรัมต่อลิตร องค์ประกอบของน้ำตาลในน้ำหมักหลังจากผ่านการย่อยแล้วอาจจะมีปริมาณแตกต่างกันระหว่างการหมักในสองกระบวนการนี้ มอลโทสซึ่งเป็นน้ำตาลที่หมักได้ถูกผลิตในความเข้มข้นที่สูงขึ้นระหว่างกระบวนการย่อย ทำให้กระบวนการหมักใช้เวลาสั้นลง

2.5 แป้ง (พักตร์ประไพ, 2546)

2.5.1 องค์ประกอบภายในแป้ง

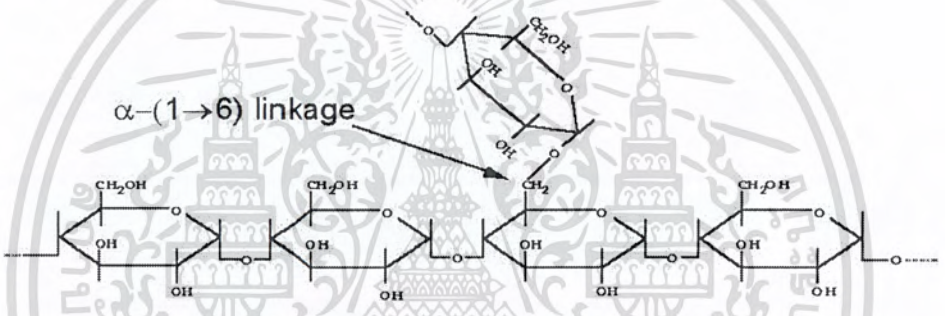
แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สะสมอยู่ในพืชซึ่งพบทั้งในใบ ลำต้น ราก ผล และเมล็ด แป้งมีมวลโมเลกุลตั้งแต่ 10,000 ถึง 1,000,000 มีสูตรทั่วไปเป็น $(C_6H_{10}O_5)_n$ นอกจากนั้น ยังพบว่าแป้งประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ 2 ชนิด และทั้งสองชนิดเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส (แป้งเป็นพอลิเมอร์กลูโคสเป็นมอนอเมอร์) แต่มีมวลโมเลกุลและโครงสร้างต่างกัน พอลิแซ็กคาไรด์ทั้งสองชนิดในแป้ง ได้แก่ อะไมโลส(Amylose) และอะไมโลเปคติน(Amylopectin) โดยปกติในแป้งมีอะไมโลสประมาณร้อยละ 20-28 นอกนั้นเป็นอะไมโลเปคติน อะไมโลส ประกอบด้วยกลูโคส 250-300 โมเลกุล ซึ่งต่อกันเป็นโซ่ยาวแบบไม่มีกิ่งแต่โซ่ของอะไมโลสขดเป็นเกลียวแบบเฮลิกซ์ (Helix) ส่วนอะไมโลเปคตินบางครั้ง พบว่ามีกลูโคสถึง 1000 โมเลกุล มีโครงสร้างต่างจากอะไมโลส คือ นอกจากกลูโคสต่อเป็นโซ่ยาวแล้วยังต่อแบบเป็นกิ่งด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของอะไมโลส

ที่มา : www.cheng.cam.ac.uk



รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของอะไมโลเพคติน

ที่มา : www.cheng.cam.ac.uk

2.5.2 กลไกการย่อยแป้ง

การย่อยแป้งโดยทั่วไปประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การเจลาติไนเซชัน (gelatinization)

ซึ่งเป็นขั้นตอนการทำให้เม็ดแป้งพองตัว โดยเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำขณะที่ได้รับความร้อน ทำให้เม็ดแป้งพองตัว เรียกอุณหภูมิช่วงนี้ว่า อุณหภูมิการเกิดเจล (gelatinization temperature)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

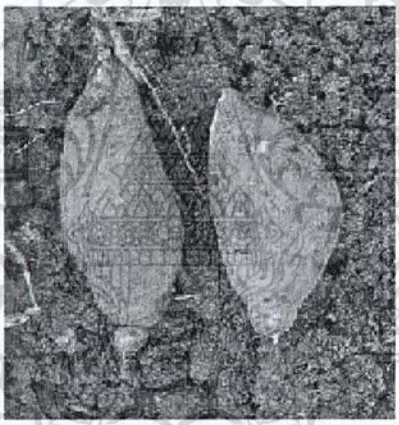
2. การเกิดลิเคอแฟคชัน (Liquefaction)

เป็นขั้นตอนการลดความหนืดของแป้งที่เกิดเจล โดยการย่อยโมเลกุลของแป้งแบบสุ่มของลูกโซ่กลูโคส ทำให้แยกเป็นสายสั้นๆ มีขนาดโมเลกุลเล็กลง และมีความหนืดลดลง กว่า30 ปีที่ผ่านมามีการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแทนการใช้กรดย่อยที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า

3. การเกิดแซคคาริฟิเคชัน (Saccharification)

เป็นขั้นตอนการย่อยแป้งให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาลภายหลังการย่อยจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ หรือน้ำตาลที่มีโมเลกุลสูงกว่า ผลผลิตที่ได้คือ กลูโคส มอลโทส หรือมอลโทไตรโอส

2.6 มันเทศ (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่มที่ 5)



รูปที่ 2.8 แสดงลักษณะของมันเทศ

มันเทศเป็นพืชที่เป็นเถาเลื้อยราบไปบนพื้นดิน มีรากสะสมอาหารขยายใหญ่เรียกว่าหัว หัวมันเทศมีคุณประโยชน์มาก เพราะใช้เป็นอาหารของมนุษย์ได้เป็นอย่างดี ใช้มันเทศปรุงอาหารได้ทั้งคาวหวาน อาหารคาว ได้แก่ แกงเลียง แกงคั่วแกงกะหรี่ และแกงมัสมั่น เป็นต้น อาหารหวาน ได้แก่ มันเทศต้มน้ำตาล มันเทศแกงบวด มันเทศทอด มันเทศเชื่อม มันเทศกวน มันเทศฉาบ มันเทศรังนก และมันเทศเผา เป็นต้น หัวมันเทศมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูง จึงใช้รับประทานแทนข้าวได้ นอกจากเป็นอาหารของมนุษย์แล้ว มันเทศยังใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์ได้อีกด้วย เช่น เป็นอาหารหมู อาหารวัว และอาหารแพะ เป็นต้น มันเทศใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ทั้งหัว เถา และใบ ทั้งยังเป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมได้หลายอย่าง เช่น ใช้ผลิตแป้ง ทำแอลกอฮอล์ และน้ำส้มสายชู มันเทศเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญอันดับที่ 5 ของโลกรองจากข้าวสาลี ข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจ้า ข้าวโพดและมันฝรั่ง ในประเทศไทยจะปลูกมันเทศกันทั่วๆ ไป แต่ไม่ได้ปลูกในปริมาณมาก เพราะมีข้าวเจ้าเป็นอาหารหลักอยู่แล้ว

มันเทศนับว่าเป็นพืชที่เหมาะกับดินฟ้าอากาศของประเทศไทยอย่างยิ่ง เพราะสามารถเจริญเติบโตได้ดี และให้ผลผลิตของหัวค่อนข้างสูง มันเทศปลูกได้ปีละ 2 ครั้ง คือ ในฤดูฝนตั้งแต่กลางเดือนพฤษภาคมถึงกลางเดือนมิถุนายน และอีกครั้งหนึ่งหลังฤดูฝน คือ ในราวเดือนกันยายนถึงพฤศจิกายน การปลูกมันเทศเริ่มจากการเตรียมดินไถและพรวน 2-3 ครั้ง เสร็จแล้วยกร่องห่างกันประมาณ 1 เมตรความสูงของร่องประมาณ 50 เซนติเมตร แล้วตัดเถามันเทศยาวประมาณ 50 เซนติเมตรฝังลงไปบนสันร่องห่างกันประมาณ 50 เซนติเมตร จากนั้นก็พรวนดินและกำจัดวัชพืช ถ้าไม่ได้ปลูกในฤดูฝนก็ต้องคอยรดน้ำ มันเทศจะทอดยอดงอกงาม เมื่อคอยต่อไป 90-150 วัน หัวมันเทศก็จะแก่และขุดได้

ในปี พ.ศ. 2516 ประเทศต่างๆ ทั่วโลกผลิตมันเทศได้รวมกัน 133 ล้านตัน ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนผลิตได้มากที่สุด คือ ผลิตได้ 111 ล้านตัน บราซิล 2.3 ล้านตัน อินโดนีเซีย 2.1 ล้านตัน ญี่ปุ่น 2 ล้านตัน สาธารณรัฐเกาหลี 1.6 ล้านตัน สำหรับประเทศไทยในปีเดียวกันผลิตมันเทศเพียงสองแสนแปดหมื่นตันเท่านั้น

ประเทศไทย มันเทศสามารถขึ้นงอกงามได้ทั่วทุกภาค ภาคกลางผลิตมันเทศได้มากที่สุด ภาคเหนือได้น้อยที่สุด ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ประมาณ 1 ตันเศษ จังหวัดนครศรีธรรมราชเป็นจังหวัดที่มีเนื้อที่ปลูกและผลผลิตสูงสุดในประเทศ

2.6.1 ประวัติความเป็นมาของมันเทศ

มันเทศมีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่บริเวณเขตร้อนของทวีปอเมริกา แต่มันเทศที่ปลูกกันอยู่ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ไม่มีหลักฐานแน่นอนว่ามีวิวัฒนาการมาจากพืชป่าชนิดใด อย่างไรก็ดีมนุษย์ก็รู้จักปลูกมันเทศมานานนับพันปีแล้ว ในสมัยโบราณนั้นมันเทศเป็นอาหารหลักของมนุษย์สองเขต คือ พวกอินเดียนในอเมริกากลาง และบริเวณเทือกเขาแอนดีส ประเทศเปรู พวกอินเดียนทั้งสองแหล่งนี้ปลูกข้าวโพดเพื่อใช้เป็นอาหารหลัก และในขณะเดียวกันก็ปลูกมันเทศด้วย อีกเขตหนึ่ง คือ ชนเผ่าโพลิเนเชียนที่อาศัยอยู่บนหมู่เกาะต่างๆ ในมหาสมุทรแปซิฟิก และตอนเหนือของเกาะนิวซีแลนด์ เชื่อกันว่ามันเทศที่ชาวโพลิเนเชียนปลูกกันในสมัยก่อนนั้น นำมาจากทวีปอเมริกาในคริสต์ศตวรรษที่ 16 หลังจากชาวยุโรปค้นพบทวีปอเมริกา นักสำรวจชาวสเปนได้นำมันเทศไปสู่ประเทศสเปน จากประเทศสเปนก็แพร่ต่อไปยังประเทศอื่นๆ ในยุโรป

ทางด้านเอเชีย ต้นมันเทศก็ถูกนำมายังอินเดีย ฟิลิปินส์ จีน และญี่ปุ่น โดยนักสำรวจสเปนและโปรตุเกส สำหรับประเทศไทยไม่มีหลักฐานบันทึกว่าได้มีการนำมันเทศเข้ามาปลูกในสมัยใดแต่เข้าใจกันว่ามีผู้นำมันเทศมาแพร่หลายในราวสมัยกรุงศรีอยุธยาเป็นราชธานีเพราะมีเรือสำเภาไปมาค้าขายระหว่างประเทศจีน พวกจีนคงจะได้นำติดมือมา ตามนิสัยที่ไปอยู่ที่ไหนก็หา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์พืชไปปลูกบริโภค ในปัจจุบันมันเทศปลูกกันทั่วไปในประเทศไทย แต่ส่วนใหญ่แหล่งปลูกเป็นจังหวัดในทางภาคกลาง

2.6.2 การจำแนกมันเทศทางพฤกษศาสตร์

มันเทศถูกลำดับทางพฤกษศาสตร์ ดังนี้

วงศ์ (Family) Convolvulaceae

สกุล (Genus) Ipomoea

ชนิด (Species) batatas

2.6.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มันเทศมีชื่อภาษาจีนว่า "ฮวงกั้ว" ชาวพื้นเมืองในอเมริกาใต้ เรียกมันเทศว่า บาตาตาส์ ชาว ยุโรปได้เอาสำเนียงชาวพื้นเมืองไปใช้ และเพี้ยนไปเป็น โพเตโต (potato) เนื่องจากมันมี 2 ชนิดด้วยกัน คือ ชนิดหวานและไม่หวาน ชนิดหวาน เรียกว่า สวีทโพเตโต (sweet potato) คือ มันเทศนั่นเอง ส่วนชนิดไม่หวานเรียกว่า ไอริชโพเตโต (Irish potato) เราเรียกว่ามันฝรั่ง มันเทศมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า อิโพเมีย บาตาตาส (*Ipomoea batatas*) และอยู่ในวงศ์คอนโวลวูลาเซีย (Convolvulaceae) พืชที่อยู่วงศ์นี้ จะพบมากในแถบเส้นศูนย์สูตร และภายใต้แถบศูนย์สูตร มีลำต้นเป็นเถาหรือเป็นพุ่มตั้งตรง และมีจำนวนน้อยที่เป็นประเภทไม้ยืนต้น พืชพวกนี้อาจเจริญในที่แห้งแล้ง ในน้ำ และอาจเป็นพวกตัวเบียน (parasite) โดยทั่วไปแล้วเมื่อใบหรือลำต้นเป็นแผลพืชในวงศ์นี้จะให้น้ำยางสีขาว

สกุลที่สำคัญที่สุดของวงศ์คอนโวลวูลาเซียคืออิโพเมีย ซึ่งมีอยู่ประมาณ 400 ชนิด แต่มีมันเทศเป็นพืชปลูกเพียงชนิดเดียวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยทั่วไปแล้ว สกุลอิโพเมีย เป็นพืชที่มีเถาพันคดเคี้ยวไปมา หรือเลื้อยราบไปบนพื้นดิน และมีจำนวนน้อยที่เป็นพุ่มตั้งตรง

2.6.3.1 ราก

มันเทศมีระบบรากแบบรากฝอย ซึ่งเกิดจากข้อของลำต้นที่ใช้ปลูก หรือเกิดจากลำต้นที่ทอดไปตามพื้นดิน รากมันเทศจะเป็นที่สะสมอาหารและใช้รับประทานได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3.2 ใบ

เป็นแบบใบเดี่ยว เกิดสลับกันบนข้อของลำต้น มีขนาดและรูปร่างต่างกัน ความแตกต่างของใบนั้นมิใช่เกิดจากพันธุ์เท่านั้น แม้แต่ในต้นเดียวกันก็อาจมีรูปร่างแตกต่างกันได้ บางใบมีขอบใบเรียบ บางใบมีใบเป็นแฉก และบางใบมีรูปร่างคล้ายหัวใจ เป็นต้น ใบมีขนเล็กน้อยและมักจะมีสีม่วงอยู่ตามเส้นใบ ก้านใบอาจจะยาวหรือสั้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์นั้นๆ

2.6.3.3 ดอก

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

2.6.3.4 ผล

มีเปลือกแข็งหุ้ม มีลักษณะเป็นแคปซูล(capsule) ภายในเปลือกแข็งมีเมล็ดเล็กสีดำค่อนข้างแบน ด้านหนึ่งของเมล็ดเรียบ ส่วนอีกด้านหนึ่งเป็นเหลี่ยม ทางด้านเรียบจะเห็นรอยที่เมล็ดติดกับผนังรังไข่เรียกว่า ไฮลัม (hilum) และมีรูเล็กๆ เรียกว่า ไมโครไพล์ (micropyle) เปลือกของเมล็ดค่อนข้างหนา และน้ำซึมผ่านได้ยาก

2.6.3.5 หัว

มันเทศลงหัวในระดับความลึกไม่เกิน 9 นิ้ว หัวมันเทศเกิดจากการขยายตัวของราก ซึ่งเนื้อเยื่อภายในรากที่เรียกว่าพาเรนไคมา (parenchyma) เป็นส่วนที่สะสมแป้ง รากที่ขยายตัวเป็นหัวขึ้นมาอาจเกิดจากรากของลำต้นที่ใช้ปลูก หรือจากรากที่เกิดจากข้อของลำต้นที่เลื้อยไปตามดินก็ได้ ดังนั้นมันเทศต้นหนึ่งๆ อาจมีหัวมากกว่า 50 หัว ลักษณะหัวส่วนมากมีรูปร่างทรงกระบอก ด้านหัวท้ายเรียวตรงกลางป่องออก สีผิวของหัวและสีของเนื้ออาจจะเป็นสีแดง เหลือง ขาว หรือสีนวล แตกต่างกันไปตามพันธุ์ ผิวอาจจะเรียบหรือขรุขระและมักจะมีรากแขนงเกิดในร่องของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
117179

หัว หัวมันเทศนอกจากจะให้อาหารจำพวกแป้งแล้ว ยังอุดมสมบูรณ์ไปด้วยวิตามิน เอ (โดยเฉพาะหัวที่มีสีเหลือง) วิตามิน บี และ ซี อีกด้วย

2.6.3.6 พันธุ์มันเทศ

2.6.4 ประโยชน์

หัวมันเทศมีแป้ง โปรตีน ไขมัน และ วิตามินต่างๆ ค่อนข้างมาก ดังนั้นจึงใช้เป็นอาหารมนุษย์และสัตว์ได้เป็นอย่างดี คุณค่าอาหารของหัวมันเทศ เมื่อมีน้ำหนัก 100 กรัม จะมีคุณค่าดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2.4 แสดงส่วนประกอบในหัวมันเทศน้ำหนัก 100 กรัม

ส่วนประกอบ	หัว
น้ำ	70 กรัม
แคลอรี	100
แป้ง	25 กรัม
โปรตีน	1.70 กรัม
ไขมัน	0.30 กรัม
เถ้า	1.00 กรัม
แคโรทีน	2000 – 5000 หน่วย
	ในเนื้อหัวสีเหลือง
วิตามินบี ๑	0.10 มิลลิกรัม
ไรโบฟลาวิน	0.05 มิลลิกรัม
ไนอาซีน	0.70 มิลลิกรัม
วิตามินซี	25 มิลลิกรัม

ที่มา : http://guru.sanook.com/search/knowledge_search.php?qID=&wi=&hnl=&ob=&asc=&q=การจำแนกมันเทศทางพฤกษศาสตร์&select=1&id=1487#ประวัติความเป็นมาของมันเทศ

ประโยชน์ที่ได้จากหัวมันเทศ อาจจำแนกได้ดังนี้

1. ใช้ทำเป็นของคาว เช่น แกงเลียง แกงคั่ว แกงกะหรี่ และแกงมัสมั่น เป็นต้น

2. ใช้ทำเป็นของหวาน เช่น แกงบวด มันทอด รังนก ฉาบ เชื่อม กวน ต้มน้ำตาลและมันปิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ใช้ในอุตสาหกรรมการกลั่นสุรา

4. ใช้เลี้ยงสัตว์โดยเฉพาะสุกร ให้มันเทศอย่างเดียวหรือผสมกับอาหารอื่นก็ได้

2.7 เอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส (พักตร์ประไพ, 2546)

เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์เป็นเอนไซม์ที่ขับออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) คือ เอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ สามารถย่อยแป้งได้

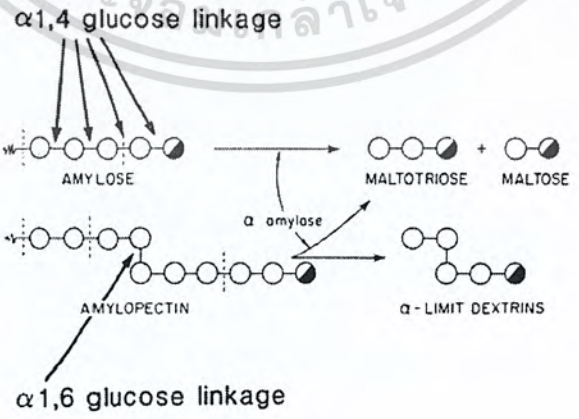
2.7.1 ชนิดของเอนไซม์อะไมเลสโดยแบ่งตามตำแหน่งการย่อยแป้ง (วารสารศูนย์บริการวิชาการ, 2546)

2.7.1.1 เอ็นโดอะไมเลส (endoamylase)

เป็นอะไมเลสประเภทที่ย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่งพันธะแอลฟ่า-1,4 กลูโคซิดิก ของอะไมโลส หรืออะไมโลเพคตินแต่ไม่ย่อยพันธะ 1,6-กลูโคซิดิกของอะไมโลเพคติน ถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้มอลโตสและกลูโคส เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) หรืออะไมโล (1-4) เด็กซ์ทรินส (amylo(1-4) dextrinase)

2.7.1.2 เอ็กโซอะไมเลส (exoamylase)

ย่อยแป้งจากปลายสายด้านที่ไม่เกิดการรีดิวส์ เข้าไป เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ เบต้า-อะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส สำหรับเบต้า-อะไมเลส หรือ อะไมโล (1-4) มอลโตซิเดสจะย่อยแป้งที่ตำแหน่งพันธะแอลฟา 1,4 กลูโคซิดิกเข้าไปทีละ 2 หน่วยกลูโคสแต่ไม่สามารถย่อยสลายพันธะที่ต่อแบบพันธะแอลฟา-ดี (1-6) ได้ ผลที่ได้จากการย่อยจึงเป็นน้ำตาลมอลโตส และ ลิมิตเด็กซ์ทริน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงปนอยู่ด้วย



รูปที่ 2.9 การย่อยอะไมโลสด้วยเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส

ที่มา : http://gastroresource.com/GITextbook/en/images/imgchp7/fig9.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

2.7.2.1 จากแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus licheniformis*

2.7.2.2 จากเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger, A. oryzae*

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์ คุณสมบัติของเอนไซม์จะแตกต่างกัน เช่น เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียจะทนอุณหภูมิได้สูงกว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา

2.7.3 การนำเอาเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส มาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม (ดุษณี, 2537)

2.7.3.1 อุตสาหกรรมทอผ้า

ใช้เอนไซม์ในการย่อยแป้งที่ตกค้างในผ้า ที่ผ่านการทอแล้ว

2.7.3.2 อุตสาหกรรมขนมปัง

ในการเตรียมแป้งที่ใช้ทำขนมปังจะเติมเอนไซม์อะไมเลสลงไปเพื่อช่วยย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ซึ่งยีสต์จะใช้น้ำตาลที่ทำให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นในแป้งหมักทำให้ขนมปังฟู

2.7.3.3 อุตสาหกรรมเครื่องดื่มน้ำผลไม้

น้ำผลไม้ที่ได้จะมีความขุ่นจากแป้งจึงเติมเอนไซม์เพื่อทำให้ใสขึ้น

2.7.3.4 อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์

2.7.3.5 อุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสไซรับเพื่อใช้เป็นสารให้ความหวานในอุตสาหกรรม

2.7.4 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Uhlig, 1998)

เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะที่จับกันของน้ำตาลกลูโคส ทั้งพันธะแอลฟา-1,4และพันธะกิ่งแอลฟา-1,6 โดยที่การตัดพันธะกิ่งช้ากว่าการตัดพันธะแอลฟา-1,4 ในการย่อยแป้งให้ได้กลูโคสจะต้องใช้กลูโคอะไมเลสร่วมกับแอลฟาอะไมเลส เอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50-110 กิโลดาลตัน มีความเสถียรที่พีเอช 3.5-5 และที่อุณหภูมิ ±55 องศาเซลเซียส เอนไซม์กลูโคอะไมเลสพบในจุลินทรีย์ เช่น *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae* และ *Rhizopus* spp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆคือ

2.7.4.1 ชนิดที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ หรือ GA-1 (raw starch digestive)

2.7.4.2 ชนิดที่ไม่สามารถย่อยแป้งดิบได้ หรือ GA-11 (raw starch indigestive)

GA-1 เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล เอนไซม์นี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็น GA-1' และ GA-11' ได้เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส และแอลฟาแมนโนลิเดสซึ่งทำให้ไม่สามารถย่อยแป้งได้

2.8 กระบวนการผลิตเอทานอล (Ethanol Production)

(http://www.vcharkarn.com/varticle/38199)

2.8.1 กระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลแยกจากกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF)

เป็นกระบวนการผลิตเอทานอลแบบธรรมดามีทั้งหมด 3 ขั้นตอนดังนี้

2.8.1.1 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ (Preparation of Feedstock)

ซึ่งถ้าเป็นประเภทแป้งหรือเซลลูโลสนั้น จะต้องนำไปผ่านกระบวนการย่อยแป้งหรือ เซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลก่อน ด้วยการใช้กรดหรือเอนไซม์เมื่อปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมแล้วสามารถนำไปหมักได้

2.8.1.2 ขั้นตอนการหมัก (Fermentation)

เป็นกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส (Glucose) ไปเป็นเอทานอลโดยอาศัยเอนไซม์ที่มีอยู่ในเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทานอลจะใช้เชื้อจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่ใช้ยีสต์สำหรับผลิตเอทานอลซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Saccharomyces* มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทานอลในสภาวะที่ pH มีค่าระหว่าง 3.0 ถึง 5.0 อุณหภูมิระหว่าง 26-32 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของน้ำตาลระหว่าง 16 – 22 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ทั้งนี้ระยะเวลาในการผลิตเอทานอล จะขึ้นอยู่กับปริมาณของยีสต์ที่ใช้

2.8.1.3 ขั้นตอนการกลั่น (Distillation)

เป็นกระบวนการให้ความร้อนในการแยกเอทานอลออกจากของผสมโดยใช้กระบวนการกลั่นตามลำดับ ซึ่งสามารถแยกเอทานอลให้ได้ความบริสุทธิ์ประมาณร้อยละ 95 โดยปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2 กระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน(Simultaneous saccharification and fermentation; SSF)

กระบวนการหมักเอทานอลโดยระบบ SSF โดยรวมขั้นตอนการย่อยครั้งสุดท้าย เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พร้อมกับการหมักด้วยเชื้อยีสต์ในขั้นตอนเดียวกัน หลังจากย่อยแป้งครั้งแรกด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแล้ว จะทำการเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสพร้อมเชื้อยีสต์ ทำให้การย่อยแป้งครั้งสุดท้ายด้วยเอนไซม์เกิดขึ้นพร้อมกับการหมักด้วยเชื้อยีสต์ในขั้นตอนเดียวกัน ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาและประหยัดพลังงานของกระบวนการผลิต เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่เป็นแป้ง กระบวนการผลิตแบบ SSF น้ำแป้งที่ได้จากการย่อยครั้งแรกจะนำมาใช้ในกระบวนการหมักเลย โดยเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและเชื้อยีสต์เพิ่มลงไปพร้อมกัน ดังนั้น ตัวอย่างน้ำหมักก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักเอทานอลจึงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าสมมูลย์เด็กโทรสต่ำกว่าตัวอย่างที่ได้ เมื่อสิ้นสุดการย่อยครั้งสุดท้ายของกระบวนการผลิต การหมักแบบ SSF จะ ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก โดยที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นก่อนหมักจะมีค่าต่ำ และจะมีค่าต่ำตลอดการหมัก ทั้งนี้ เนื่องจากการหมักแบบ SSF จะทำการย่อยให้น้ำตาลกลูโคสออกมาตลอดเวลา น้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจะถูกยีสต์ใช้ไปในทันทีเพื่อหมักเป็นแอลกอฮอล์ทันที ดังนั้น การหมักแบบ SSF จึงไม่มีการสะสมของน้ำตาลกลูโคส ช่วยให้ประสิทธิภาพการหมักของเชื้อยีสต์ดีขึ้นด้วย

2.9 ปัจจัยที่สำคัญต่อการหมักเอทานอล

(www1.mod.go.th/.../etanol%20home%20page%20&%20proposal.doc)

2.9.1 ความเข้มข้นของน้ำตาล

กรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกินขีดจำกัด คือ ประมาณร้อยละ 22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะเกิดการรบกวนของสารตั้งต้นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ทำให้การเจริญเติบโตของยีสต์เป็นได้ยาก การหมักจะเป็นไปอย่างช้าและไม่สมบูรณ์ทำให้เกิดกรดแลกติก กรดน้ำส้ม และสารอินทรีย์ต่างๆ ขึ้นได้ ซึ่งส่วนมากจะเกิดในบรรยากาศของออกซิเจน แต่บางทีสามารถเกิดในบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ได้ โดยปกติแล้วในกระบวนการหมักจะใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลร้อยละ 18 โดยปริมาตร เพื่อให้การเจริญเติบโตของยีสต์เป็นไปได้โดยปกติ และให้เอทานอลในปริมาณสูงเหมาะแก่การนำไปกลั่น คือประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร

จากการทดลองการหมักแบบต่อเนื่องของน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส โดยเชื้อ *Zymomonas mobilis* CP4 โดย Buzato และคณะ ในปี ค.ศ. 1994 สามารถผลิตเอทานอลได้ มากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง ที่ 0.3 ต่อชั่วโมง 1.8 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง ที่ 0.21 ต่อชั่วโมง และ 2.53 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง ที่ 0.32 ต่อชั่วโมง เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ตามลำดับ

2.9.2 ความเข้มข้นของเอทานอล

ในขณะที่มีเอทานอลในปริมาณมากจะมีผลทำให้การหมักช้าลง และเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้นเกินขีดจำกัด หรือมีความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่าร้อยละ 15 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ซึ่งขีดจำกัดอาจจะสูงหรือต่ำกว่านี้ ขึ้นกับชนิดของยีสต์ แต่เท่าที่พบจะสูงไม่เกินร้อยละ 18 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ถ้าเกินกว่านี้สามารถขัดขวางและหยุดการทำงานของยีสต์ได้

2.9.3 คาร์บอนไดออกไซด์และความดัน

คาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากปฏิกิริยาในการใช้น้ำตาลของยีสต์ จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ด้วย ถ้าไม่มีการระบายคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากระบบหมัก ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มความดันของคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งถ้าความดันสูงถึง 7.5 บรรยากาศ จะทำให้อัตราเร็วของการหมักลดลง จนกระทั่งความดันสูงถึง 8.0 บรรยากาศ อัตราความเร็วของการหมักจะช้ามากหรือเกือบจะไม่เกิดเลย

2.9.4 ออกซิเจน

ออกซิเจนจะถูกใช้ในการเจริญเติบโตและการแตกหน่อในกระบวนการหายใจ เพื่อทำให้เกิดพลังงานในการดำเนินชีวิต ซึ่งการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของยีสต์ในที่มีออกซิเจน จะไม่ให้เอทานอลออกมา แต่จะมีเพียงคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเกิดขึ้นเท่านั้น

2.9.5 กรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติก

กรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติกจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ โดยความเข้มข้นของกรดที่มากกว่าร้อยละ 0.1 จะมีผลต่อการเจริญเติบโต ถ้ามีกรดโพรพิโอนิกและกรดบิวทาริกเกิดขึ้นด้วย ก็จะมีผลเช่นเดียวกับกรดน้ำส้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.6 ความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออน

ยีสต์จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีระหว่าง พีเอช 3-5 จึงมีผลทำให้อัตราการเจริญของยีสต์และอัตราการหมักเพิ่มมากขึ้น ความเป็นกรดจะกีดขวางการเจริญของแบคทีเรียและราบางชนิด ซึ่งความเป็นกรดในช่วงดังกล่าว จะสามารถป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย และราบางชนิดได้

2.9.7 สารเร่งการเจริญเติบโต

นอกจากน้ำตาลแล้ว ยีสต์ยังต้องการสารประกอบอื่นๆ เพื่อการเจริญเติบโต สารเหล่านี้ได้แก่ วิตามินบีรวม เช่น ไบโอติน ไทอามีน ไรโบฟลาวิน กรดนิโคตินิก และกรดแพนโธทินิก นอกจากนี้ไทอามีนฟอสเฟต ยังเป็นโคแฟคเตอร์ที่ใช้ในการเปลี่ยนกรดไพรูวิก ให้กลายเป็นเอทานอลอีกด้วย

2.9.8 โลหะ

ในพวกธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าวจะมีพวกธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียม ทองแดง เหล็ก แมกนีเซียม และแมงกานีส ซึ่งเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ และในกระบวนการหมักเอทานอลจากกลูโคส ถ้าปริมาณของโลหะมากเกินไป จะกลายเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ สารประกอบพวกซัลเฟอร์จะทำให้ยีสต์แก่เร็ว ส่วนพวกเหล็ก อลูมิเนียม สังกะสี ไม่ค่อยมีผลมากนักต่อปฏิกิริยาการหมัก แต่ถ้าเป็นพวกแคดเมียม ทองแดง ปรอท ออสเมียม และเงิน จะเป็นสารที่ทำให้การเจริญเติบโตของยีสต์เป็นไปอย่างช้าๆ

2.9.9 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการทำงานของยีสต์ และมีผลทางอ้อมต่อปริมาณเอทานอลและสารประกอบอะโรมาติกต่างๆ อุณหภูมิส่วนใหญ่ที่ใช้ในการหมักจะอยู่ประมาณ 10-30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วงนี้ จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์เพิ่มมากขึ้นเป็นสองเท่า ถ้าอุณหภูมิสูงมากๆ จะทำให้เอนไซม์ในยีสต์เกิดสภาพว่องไวต่อปฏิกิริยาลดลง ในช่วงระหว่างอุณหภูมิ 55-56 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้ยีสต์ตายได้ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของยีสต์ที่นำมาใช้ในการหมัก ถ้าอุณหภูมิในการหมักต่างกัน จะทำให้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นแตกต่างกันได้ เช่น ที่อุณหภูมิการหมักต่ำๆ จะเกิดสารพวกเอสเทอร์ อะซีตอล

(ที่มา : http://as.doa.go.th/fieldcrops/cas/eth/e002.pdf)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Diez และ Yokoya (1996) ศึกษาผลของอุณหภูมิ และค่า pH ต่อการผลิตเอทานอล ในระหว่างการหมักซูโครส โดยเชื้อ *Zymomonas mobilis* พบว่าอุณหภูมิในช่วงที่ศึกษาที่อุณหภูมิระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส และ pH 5.7 พบว่าที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุด 0.483 กรัม ต่อน้ำตาล 1 กรัม

นอกจากนั้น Abate และคณะ (1995) ศึกษาการผลิตเอทานอล โดยการเลี้ยงเชื้อร่วมกันของเชื้อ *Zymomonas mobilis* และ *Saccharomyces* sp. ผลิตเอทานอล โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ปริมาณเอทานอล 0.5 กรัมต่อน้ำตาล 1 กรัม และปริมาณเอทานอลที่วัดได้เท่ากับ 1.5 กรัมต่อชั่วโมง

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Srishuwong และคณะ (2009) ศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลจากมันฝรั่งโดยกระบวนการ SSF พบว่าการนำมันฝรั่งมาเตรียมวัตถุดิบ (pretreatment) ด้วยเอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์เพกติเนส (pectinase) เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) ซึ่งสามารถลดความหนืดของมันฝรั่งได้ จากนั้นนำแป้งที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมันฝรั่งที่ผ่านการย่อยมาเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) 1.65 AGUต่อกรัม เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 30.2 มิลลิโมลาร์ โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 61.5 ชั่วโมง ซึ่งเป็นกระบวนการ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) ในการผลิตเอทานอล ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 16.61 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

Ebrahimi และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากเศษขนมปัง พบว่าการนำเศษขนมปังมาใช้เป็นอาหารหมักเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล โดยผ่านการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลใน 2 ขั้นตอน โดยใช้ amylolytic enzyme (การศึกษาครั้งนี้ใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส) การย่อยแป้งข้าวสาลีนำมาใช้ในการเปรียบเทียบผลในการทดลองนี้ ในขั้นตอนแรก คือ กระบวนการลิเคอแฟกชัน(liquefaction) โดยศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 50-85 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของสารตั้งต้นร้อยละ 20 และร้อยละ 35 จากการทดลองพบว่า การนำสารละลายขนมปังร้อยละ 20 มาเข้ากระบวนการลิเคอแฟกชัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้ได้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ร้อยละ 70 โดยไม่คำนึงถึงอุณหภูมิ การนำสารละลายขนมปังร้อยละ 35 มาเข้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการลิเคอแฟกชันโดยใช้วิธี fed-batch ได้สารละลายที่มีลักษณะคล้ายแป้งเปียก พบว่าร้อยละ 65 ไม่ละลายที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส จากนั้นเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลที่เรียกว่าแซคคาริฟิเคชัน(saccharification) ทำให้ได้ค่าสมมูลเด็กซ์โทรส(dextrose equivalent ,DE) มากกว่าร้อยละ 95 และเกือบร้อยละ 80 เป็นปริมาณของแข็งที่ไม่ละลาย การหมักเอทานอลจากเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ทำให้ได้ปริมาณเอทานอล 350 กรัมต่อขนมปังแห้ง 1 กิโลกรัม การใช้ขนมปังที่เก็บไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ไม่มีผลต่อกระบวนการลิเคอแฟกชัน แซคคาริฟิเคชัน และผลผลิตของเอทานอลที่ได้

Ohgren และคณะ (2007) ศึกษาการเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation และกระบวนการ Separate Hydrolysis and Fermentation โดยใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการ separate ด้วยไอน้ำ พบว่ากระบวนการ SSF และ SHF จะแตกต่างกัน การใช้ปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายน้ำร้อยละ 8 จะทำให้การผลิตเอทานอลลดลง ในการทดลองนี้มีการใช้เอนไซม์ 10 FPUต่อกรัมของปริมาณของแข็ง และใช้ความเข้มข้นของยีสต์ในระบบการหมักแบบ SSF 1 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ของ เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* เมื่อนำสารละลายทั้งหมดจากการ pretrearment มาใช้ในการทดลองและทำการเจือจางให้ได้ร้อยละ 8 ของปริมาณของแข็งโดยใช้น้ำและปรับพีเอช พบว่ากระบวนการหมัก SSF จะให้ผลของการผลิตเอทานอลสูงกว่ากระบวนการ SHF ร้อยละ13 โดยกระบวนการ SSF มีผลผลิตเอทานอลร้อยละ72.4 ขณะที่กระบวนการ SHF มีผลผลิตเอทานอลร้อยละ 59.1 ของทฤษฎี มีสารประกอบบางชนิดที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ pretreatment วัตถุดิบมีผลไปยับยั้งการผลิตเอทานอลในกระบวนการ SSF และ SHF ที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าในประเทศไทย (วิมลักษณ์ , 2547)

3.2 วัตถุดิบ

3.2.1 มันเทศ สายพันธุ์สีขาว ซื้อมาจากตลาดหัวตะเข้ ลาดกระบัง

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารละลายเนลสัน (Nelson's Arsenomolybdate color reagent)

3.3.2 สารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent)

3.3.3 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

3.3.4 กรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 99.9

3.3.5 สารละลายฟีนอล ความเข้มข้นร้อยละ 5

3.3.6 เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จาก *Aspergillus oryzae* 37.2 U/mg, (Sigma, Aldrich Co.Ltd)

3.3.7 เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส จาก *Aspergillus niger* 25.9 U/mg solid, (Sigma, Aldrich Co.Ltd)

3.3.8 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์

3.4 อุปกรณ์

3.4.1 บีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร

3.4.2 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.4.3 กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร

3.4.4 แท่งแก้วคน

3.4.5 เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.6 กระดาษกรองเบอร์ 1

3.4.7 ช้อนตักสาร

3.4.8 กระดาษกรองขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร

3.4.9 ปิเปต ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร

3.4.10 หลอดทดลอง

3.4.11 หลอดทดลองฝาเกลียว

3.4.12 ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร

3.4.13 ตะแกรงร่อนขนาดรูตะแกรงเบอร์ 35

3.4.14 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.4.15 คิวเวตพลาสติก

3.4.16 หลอดปั่นเหวี่ยง

3.4.17 ขวดสีชา ขนาด 150 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร

3.4.18 เครื่องปั่น (blender)

3.4.19 Hot Plate Stirrer

3.4.20 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

3.4.21 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

3.4.22 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมแป้งมันเทศ

นำมันเทศมาล้างดินออกให้สะอาด หั่นเป็นแผ่นบางๆ ประมาณชิ้นละ 1 มิลลิเมตร นำไปเรียงบนถาดแสตนเลส แล้วนำเข้าอบที่ตู้อบ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จนกระทั่งชิ้นมันเทศแห้ง นำชิ้นมันเทศที่ได้มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น จากนั้นนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาดรูตะแกรงเบอร์ 35 จะได้ผงแป้งมันเทศมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.188 มิลลิเมตร เพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 การเตรียมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase)

3.5.2.1 การเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์

3.5.2.1.1 เตรียมโซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมอะซิเตต ปริมาณ 16.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3.5.2.1.2 ปิเปตกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 11.55 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

เมื่อต้องการเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ให้นำโซเดียมอะซิเตตที่เตรียมได้ ปริมาตร 35.2 มิลลิลิตร ผสมกับกรดอะซิติกที่เตรียมได้ ปริมาตร 14.8 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 โดยใช้ NaOH 1 โมลาร์ เป็นตัวปรับพีเอชของสารละลาย

3.5.2.2 เตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ชั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาณ 0.05 , 0.1 , 0.15 และ 0.20 กรัม นำมาละลายด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้หลอดฉีดยาพร้อมชุดกรอง Swinex ซึ่งการกรองเอนไซม์จะกระทำในตู้ปลอดเชื้อ

3.5.3 การเตรียมเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017

เขี่ยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 จำนวน 1 ลูป ใส่ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ปริมาตร 75 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่ว โมง เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสง(optical density ,OD) 0.5

3.5.4 ศึกษากระบวนการลิเคอแฟกชัน (Liquefaction) ของมันเทศ โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

3.5.4.1 ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการลิเคอแฟกชัน

นำแป้งมันเทศที่ผ่านการอบแห้งแล้วปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำไปต้มบน Hot plate stirrer ที่อุณหภูมิประมาณ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที หรือจนกระทั่งแป้งเริ่มมีความหนืดและละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ในระหว่างการต้มต้องมีการคนแป้งมันเทศตลอดเวลาเพื่อป้องกันการไหม้ เมื่อครบเวลา นำลงจาก Hot plate stirrer และทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยแปรผันความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 , 0.10 , 0.15 และ 0.20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเติมสารละลายเอนไซม์ฟลาสก์ละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Srichuwong, 2009) เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson (ภาคผนวก ก.)

จากการทดลองคัดเลือกความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด มาใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.4.2 ศึกษาปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการลิเคอแฟกชัน

นำแป้งมันเทศที่ผ่านการอบแห้งแล้วปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำไปต้มบน Hot plate stirrer ที่อุณหภูมิประมาณ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที หรือจนกระทั่งแป้งเริ่มมีความหนืดและละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ในระหว่างการต้มต้องมีการคนแป้งมันเทศตลอดเวลาเพื่อป้องกันการไหม้ เมื่อครบเวลา นำลงจาก Hot plate stirrer และทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 3.5.4.1 โดยแปรผันปริมาณของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ดังนี้ 5,10,15 และ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson (ภาคผนวก ก.)

3.5.5 ศึกษากระบวนการแซคคาริฟิเคชัน (Saccharification) ของมันเทศโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

3.5.5.1 การเตรียมสารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เตรียมความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ดังนี้ ร้อยละ 0.005,0.010,0.015 และ 0.020 น้ำหนักโดยปริมาตร โดยการชั่งเอนไซม์กลูโคอะไมเลสปริมาณ 0.005,0.010,0.015 และ 0.020 กรัม นำมาละลายด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้หลอดฉีดยาพร้อมชุดกรอง Swinex ซึ่งการกรองเอนไซม์จะกระทำในตู้ปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5.2 ศึกษาความเข้มข้นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน

นำแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในสภาวะที่เหมาะสม มาย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) ความเข้มข้นร้อยละ 0.005,0.010,0.015 และ 0.020 โดยเติมสารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลสปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Srichuwong, 2009) เมื่อครบกำหนดเวลานำสารละลายแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson

3.5.5.3 ศึกษาปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน

นำแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแล้ว มาย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.5.5.2 โดยเติมสารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลสปริมาตร 5,10,15 และ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson (ภาคผนวก ข.)

3.5.6 กระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF)

นำแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดดังกล่าวข้างต้น นำมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่แยกได้จากลูกแป้ง โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อยีสต์ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีในขั้นต้น และปริมาณเอทานอลที่ได้โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี (Gas Chromatrography ; GC)

การทดลองนี้ใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี Shimadzu 17A Chromatograph โดยมีแก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา คอลัมน์ที่ใช้ DB-WAX ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.53 มิลลิลิตร อุณหภูมิภายในคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ส่วนตัวตรวจวัดองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง (Detector) คือ ชนิด Flame Ionization Detector (FID)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.7 กระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; SSF)

นำแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษามาแล้วขั้นต้น นำมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้นและปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการศึกษาในขั้นต้น และเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่แยกได้จากลูกแป้ง โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อยีสต์ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะไร้อากาศ หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในขั้นต้น และปริมาณเอทานอลที่ได้โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี เปรียบเทียบผลการทดลองกับการหมักในหัวข้อ 3.5.6

3.5.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) โดยมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน(Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างด้วยวิธี Duncan โดยใช้โปรแกรม SPSS 11.0 for Windows Evaluation version ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษากระบวนการลิเคอแฟกชัน (Liquefaction) ของมันเทศ โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

4.1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการลิเคอแฟกชัน

จากการนำแป้งมันเทศที่ผ่านการอบแห้งแล้วปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำไปต้มบน Hot plate stirrer ที่อุณหภูมิประมาณ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยแปรผันความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเติมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสลงไปฟลาสก์ละ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วมาทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าสูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสร้อยละ 0.20 น้ำหนักต่อปริมาตร คือ 19.60 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า การใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P>0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.1 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้สารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Duangjai และคณะ (2010) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้งเมล็ดขนุนโดยใช้เอนไซม์และเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* จากการศึกษาพบว่าการใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสร้อยละ 0.20 น้ำหนักโดยปริมาตร ย่อยแป้งเมล็ดขนุนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 0.10 และ 0.15 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นต่างๆ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ไม่แตกต่างทางสถิติ ในการทดลองต่อไปจึงใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสร้อยละ 0.05 เช่นเดียวกับการทดลองนี้

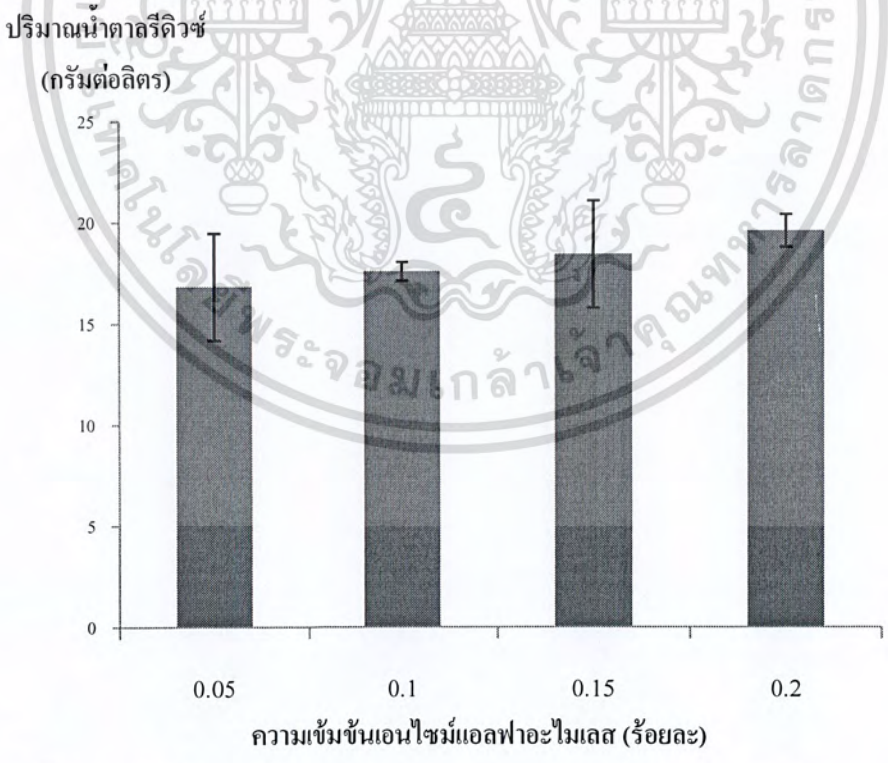
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงผลของความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการลิเคอแฟกชันของแป้งมันเทศที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (ร้อยละ)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0.05	16.85 ± 2.64^{a}
0.10	17.62 ± 0.46^{a}
0.15	18.46 ± 2.64^{a}
0.20	19.60 ± 0.80^{a}

กำหนดให้ เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณน้ำตาลไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในกระบวนการลิเคอแฟกชันของแป้งมันเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการลิเคอแฟกชัน

จากการนำแป้งมันเทศที่ผ่านการอบแห้งแล้วปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำไปต้มบน Hot plate stirrer ที่อุณหภูมิประมาณ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยแปรผันปริมาณของสารละลายเอนไซม์ 5 10 15 และ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วมาทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson พบว่าเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าสูงสุดเมื่อใช้ปริมาณของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 20 มิลลิลิตร คือ 16.47 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้สารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในปริมาณ 5 10 15 และ 20 มิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P>0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.2 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้สารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Duangjai และคณะ (2010) ซึ่งพบว่าการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ย่อยแป้งเมล็ดขนุนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาณ 5 10 และ 15 มิลลิลิตร แต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการใช้เอนไซม์ปริมาณ 5 10 และ 20 มิลลิลิตร ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่แตกต่างกัน ในการทดลองต่อไปจึงได้ใช้ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 5 มิลลิลิตร เพื่อเป็นการประหยัดปริมาณเอนไซม์ที่ใช้

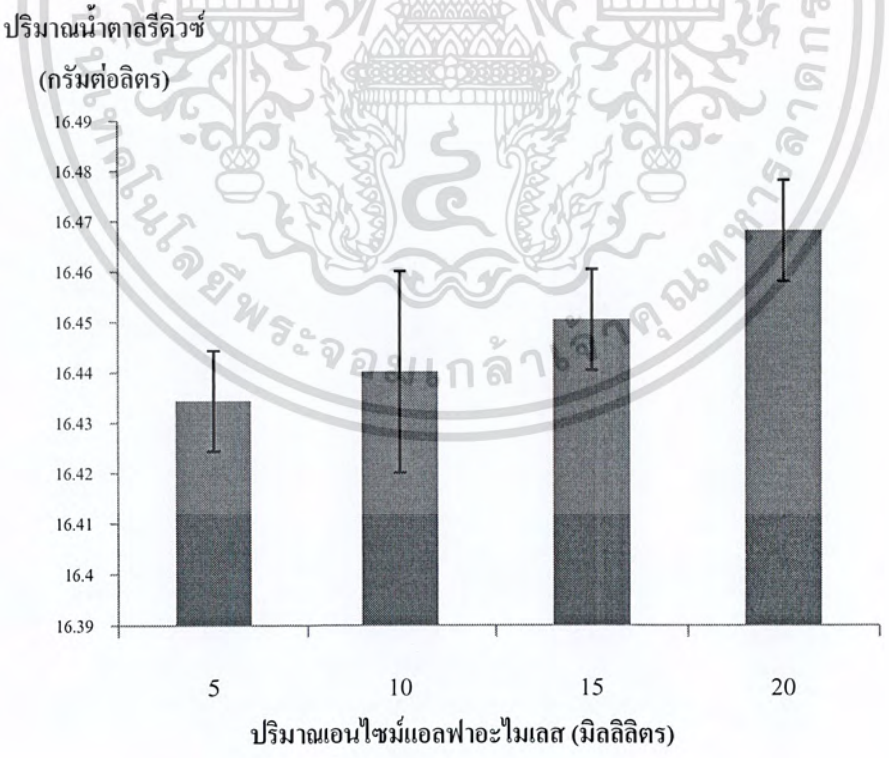
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการลิเคอแฟกชันของแป้งมันเทศที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
5	16.43 ± 0.01^{a}
10	16.44 ± 0.02^{a}
15	16.45 ± 0.01^{a}
20	16.47 ± 0.01^{a}

กำหนดให้ เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณน้ำตาลไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยแปรผันปริมาณของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในกระบวนการลิเคอแฟกชันของแป้งมันเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษากระบวนการแซคคาริฟิเคชัน (Saccharification) ของแป้งมันเทศ โดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

4.2.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน

จากการนำแป้งมันเทศมาย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยแปรผันความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.005 0.010 0.015 และ 0.020 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเติมสารละลายเอนไซม์ฟลาสก์ละ 10 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วมาทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าสูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร้อยละ 0.020 คือ 38.37 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า การใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.020 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P>0.05$) กับการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.015 และมีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.005 และ 0.010 แสดงดังตารางที่ 4.3 ดังนั้นจึงเลือกใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.015 ในการศึกษาขั้นต่อไป

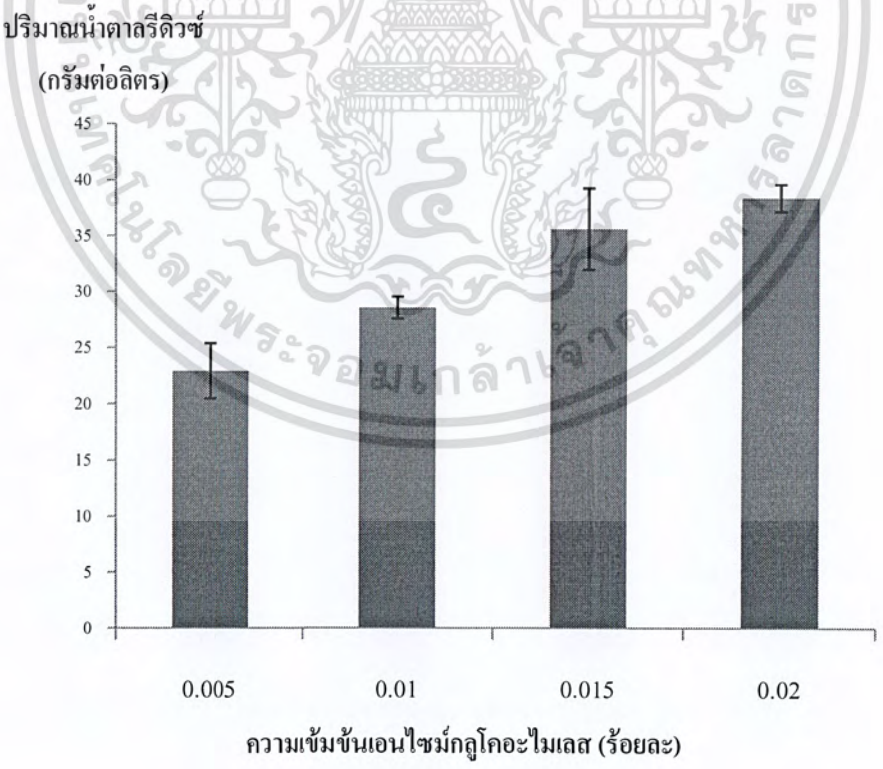
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงผลความเข้มข้นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการแซคคาริฟิเคชันของแป้งมันเทศที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ความเข้มข้นเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ร้อยละ)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0.005	22.91 ± 2.45^{c}
0.010	28.59 ± 0.98^{b}
0.015	35.61 ± 3.65^{a}
0.020	38.37 ± 1.21^{a}

กำหนดให้ เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณน้ำตาลไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในกระบวนการแซคคาริฟิเคชันของแป้งมันเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน

จากการนำแป้งมันเทศมาย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.015 โดยเติมสารละลายเอนไซม์ฟลาสก์ละ 5 10 15 และ 20 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วมาทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson พบว่าเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าสูงสุดเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 20 มิลลิลิตร คือ 41.78 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้สารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในปริมาณ 5 10 15 และ 20 มิลลิลิตร มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.4 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงเลือกใช้สารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร

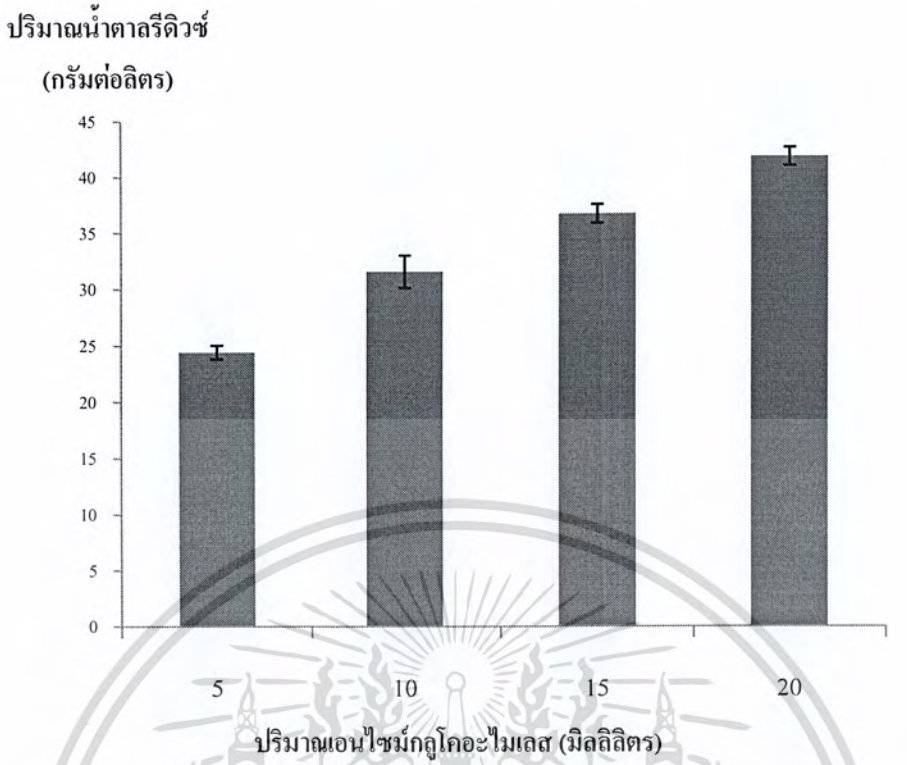
ตารางที่ 4.4 แสดงผลปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการแซคคาริฟิเคชันของแป้งมันเทศที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ปริมาณของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
5	24.43 ± 0.60^{d}
10	31.56 ± 1.45^{c}
15	36.71 ± 0.83^{b}
20	41.78 ± 0.80^{a}

กำหนดให้ เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณน้ำตาลไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยแปรผันปริมาณของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชันของแป้งมันเทศ

Jamai และคณะ (2007) ศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลจากแป้งโดยใช้เชื้อ *Candida tropicalis* แบบอิสระและตรึงเซลล์ โดยสังเกตจากการแสดงออกของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) และในการผลิตเอทานอลจากแป้งทำการเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *Candida tropicalis* YMEC14 , *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomyces occidentalis* โดยพบว่าแป้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและทำการหมักแป้งด้วยเชื้อ *S. occidentalis* หรือ *C. tropicalis* จะทำให้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นร้อยละ 100 และพบว่าแป้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแล้วทำการหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* จะทำให้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 400 เมื่อเปรียบเทียบกับแป้งที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสมาก่อนแล้วทำการหมักด้วยเชื้อ *S. occidentalis* และในการศึกษาครั้งนี้พบว่าในการหมักแป้งด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* จำเป็นต้องใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ในการย่อยแป้งก่อนการหมักควบคู่กัน เพื่อทำให้เกิดการหมักแป้งที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Eksteen (2003) และ Shigechi (2004) ด้วยเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF)

จากการนำแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยโดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะที่เหมาะสมแล้วนำมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อยีสต์ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าจากกระบวนการหมัก ได้ปริมาณเอทานอล 14.55 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 0.83 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.5

4.4 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; SSF)

จากการนำแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในสภาวะที่เหมาะสมมาย่อยต่อโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีความเข้มข้นและปริมาณที่เหมาะสมพร้อมกับการหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าจากกระบวนการนี้ได้ปริมาณเอทานอล 12.62 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 0.56 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการหมักแป้งมันเทศโดยกระบวนการ SHF และ SSF เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

กระบวนการหมัก	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
	ก่อนหมัก	หลังหมัก	
SHF เวลาที่ใช้ทั้งหมด 78 ชั่วโมง	41.78 ± 0.65	0.83 ± 0.06	14.55 ± 0.21
SSF เวลาที่ใช้ทั้งหมด 74 ชั่วโมง	16.43 ± 0.01	0.56 ± 0.03	12.62 ± 0.17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่ากระบวนการหมักโดยการย่อยเป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกระบวนการหมักโดยการทำให้เป็นน้ำตาลแยกจากการหมัก หรือเรียกว่า Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) กระบวนการนี้เป็นการทำให้การย่อยของเอนไซม์เกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงกว่ากระบวนการหมัก ซึ่งเป็นข้อดีเนื่องมาจากการใช้อุณหภูมิที่สูงในการย่อยของเอนไซม์จะทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักซึ่งต้องใช้อุณหภูมิในการหมักไม่สูงมากนัก (Sderstrm et al, 2005)

จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร และคณะ (2554) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกทุเรียนโดยใช้เชื้อยีสต์เดี่ยวและเชื้อยีสต์ผสม เปลือกทุเรียนเป็นผลพลอยได้จากผลิตผลทางการเกษตรจึงมีต้นทุนต่ำ การผลิตไบโอเอทานอลจากเปลือกทุเรียนได้นำมาใช้ในการศึกษาโดยกระบวนการทำให้เป็นน้ำตาลแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการทำให้เป็นน้ำตาลพร้อมการหมัก (SSF) ได้ศึกษาการปรับสภาพเปลือกทุเรียนโดยการใช้น้ำกลั่น กรดซัลฟุริกเจือจางและโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางที่อุณหภูมิ 121 และ135 องศาเซลเซียส การหมักทำโดยการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง ใช้เปลือกทุเรียน 1.5% สับสเทรตที่ปรับสภาพมาผสมกับเอนไซม์อะไมเลส อะไมโลกลูโคซิเดส ไซแลนเนส เซลลูเลส และเพกติเนส จากการศึกษาพบว่าการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5221 ในกระบวนการ SHF ได้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด 6.19 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้มากกว่าในกระบวนการ SSF ที่ให้ผลผลิตเอทานอล 5.88 กรัมต่อลิตร การผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อ *Candida tropicalis* TISTR5045 ในกระบวนการ SHF ได้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด 5.58 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้มากกว่าในกระบวนการ SSF โดยให้ผลผลิตเอทานอล 5.44 กรัมต่อลิตร และการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5221 และ *Candida tropicalis* TISTR5045 ร่วมกัน ในกระบวนการ SHF ได้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด 9.39 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้มากกว่าในกระบวนการ SSF โดยให้ผลผลิตเอทานอล 8.83 กรัมต่อลิตร

มีงานวิจัยหลายงานวิจัยที่ได้ศึกษาการหมักเอทานอลโดยกระบวนการหมักแบบ SSF และ SHF ส่วนใหญ่พบว่ากระบวนการหมักแบบ SSF ให้ผลผลิตเอทานอลที่สูงกว่ากระบวนการแบบ SHF ดังเช่นงานวิจัยของ จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร (2554) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากใบมันสำปะหลังโดยการหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5048 *S. cerevisiae* KM1195 *S. cerevisiae* KM72553 และเชื้อยีสต์ผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR5048 และ *Candida tropicalis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TISTR5045 จากการศึกษาพบว่าการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *S. cerevisiae* KM1195 ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดจากกระบวนการ SSF โดยให้ผลผลิตเอทานอล 3.57 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR5048 และ *Candida tropicalis* TISTR5045 พบว่าจากการหมักในกระบวนการ SHF ให้ผลผลิตเอทานอล 3.35 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการใช้กระบวนการหมักแบบ SSF ซึ่งให้ผลผลิตเอทานอล 3.22 กรัมต่อลิตร

Nikolic et al (2009) ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากแป้งข้าวโพดโดยกระบวนการ simultaneous enzymatic saccharification and fermentation (SSF) โดยใช้เซลล์ตรึงรูปของ *Saccharomyces cereviae* var *ellipsoideus* พบว่าปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ได้คือ ร้อยละ 9.42 น้ำหนักต่อน้ำหนัก จะได้หลังจากการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยใช้กระบวน SSF ขณะที่เมื่อการใช้กระบวนการหมักแบบ SHF จะได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 8.01 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากระบวนการ SSF จะมีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจมากกว่า ใช้พลังงานน้อยกว่ากระบวนการ SHF และเมื่อพิจารณาเวลาที่ใช้ในการหมักเอทานอลพบว่ากระบวนการ SSF สามารถลดเวลาในการหมักลงได้ 4 ชั่วโมง (ในขั้นตอน saccharification) ซึ่งทำให้ประหยัดพลังงานและกระบวนการ SSF สามารถเกิดขึ้นได้ที่ 30 ◦*c* ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (55 ◦*c*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเทศโดยใช้เอนไซม์และเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้า พบว่าความเข้มข้นและปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อกระบวนการลิเคอแฟกชันของแป้งมันเทศ คือ การใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสร้อยละ 0.05 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 16.43 กรัมต่อลิตร สำหรับความเข้มข้นและปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน คือ การใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร้อยละ 0.015 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 41.78 กรัมต่อลิตร

ผลการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากมันเทศ พบว่าจากกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF) โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะที่เหมาะสมย่อยแป้งมันเทศให้เป็นน้ำตาลและทำการหมักเอทานอลโดยใช้ปริมาณหัวเชื้อยีสต์ร้อยละ 10 หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้ปริมาณเอทานอล 14.55 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้ปริมาณเอทานอลมากกว่าในกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; SSF) ซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 12.62 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กมล ตันติรักษ์ และสุเปรมปรีดิ์ สุพรหมอินทร์. 2540. การศึกษาการอยู่ร่วมกันของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732 และ *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 2476 ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ.

จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร. 2554. การศึกษาการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการย่อยสลายน้ำตาลแยกจากการหมักและการทำให้เป็นน้ำตาลพร้อมการหมักจากใบมันสำปะหลัง. การประชุมวิชาการครั้งที่ 45 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, วันที่ 1-4 กุมภาพันธ์. สาขาวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 314-320

จิรศักดิ์ คงเกียรติขจรและณัตติยา จันทวงษา. 2554. การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกทุเรียนโดยใช้เชื้อยีสต์เดี่ยวและเชื้อยีสต์ผสม. การประชุมวิชาการครั้งที่ 45 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, วันที่ 1-4 กุมภาพันธ์. สาขาวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 242-249

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2537. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเหล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ

ดวงพร คันธโชติ. 2530. ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์ กรุงเทพฯ

ทนงศักดิ์ วงษ์ลา. 2548. น้ำมันแก๊สโซฮอล์ พลังงานเพื่ออนาคต. วารสารนโยบายพลังงาน ฉบับที่ 69,32-37

ธีรภัทร ศรีนรคุตร เลิศลักษณ์ แก้ววิมล และ ละเอียด แซ่โง้ว. 2549. การย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลในประเทศไทย. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 77-84

พักตร์ประไพ ประจำเมือง. 2546. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง. วารสารศูนย์บริการวิชาการ ฉบับที่ 4, 28-31

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

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่มที่ 5. 2523. พืชหัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abate, C., Callieri, D., Rodriguez, E. and Garro, O. 1995. Ethanol Production by a Mixed Culture of Flocculent Strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp. Applied Microbiology and Biotechnology. 45:580-583

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

Baks, T., Janssen, A. and Boom, R. 2006. The Effect of Carbohydrate on Alpha-amylase Activity Measurements. Enzyme and Microbial Technology. 39:114-119

Diez, J.C. and Yokota, F. 1996. Effect of Temperature and pH on Ethanol and Levan Production during Sucrose Fermentation by *Zymomonas mobilis*. Arquivos-de-Biologia-e-Technologia. 36 : 1, 129-137

Dubois, M., Gilles K.A. and Smith, J. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. Anal. Chem. 28, 350-365

Ebrahimia, F., Khanahmadib, M., Roodpeymaa, S., Mohammad, J. 2008. Ethanol Production from Bread Residues. Biomass and Bioenergy. 32 : 333 – 337

Hacking, A.J., Taylor, I.W.F. and Hanas, C.M. 1984. Selection of Yeast Able to Produce Ethanol from Glucose at 40°c. Applied Microbiology and Biotechnology. 19 : 361-363.

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

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

Nelson, N. 1944. A Photometric Adaptation of Somogyi Method for The Determination of Glucose. J. Biol. Chem. 153: 375-380

Marques, S., Alves, L., Roseiro, J.C. and Girio, F.M. 2008. Conversion of Recycled Paper Sludge to Ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*, Department of Biotechnology, INETI, Portugal

Rattanachomsri, U., Tanapongpipat, S., Eurwilaichitr, L. and Champreda, V. 2010. Simultaneous Non-Thermal Saccharification of Cassava Pulp by Multi-Enzyme Activity and Ethanol Fermentation by *Candida tropicalis*, Enzyme Technology Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Srichuwonga, S., Fujiwara, M., Wanga, X., Seyama, T., Shiroma, R., Arakanea, M., Mukojimab, N., Tokuyasua K. 2 0 0 9. Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Very High Gravity (VHG) Potato Mash for The Production of Ethanol. Biomass and Bioenergy. 33: 890-898

Uhlig, H. 1998. Industrial Enzymes and Their Application. New York : John Wiley and Sons, Inc.

Zhao, J. and Xia, L. 2010. Ethanol Production from Corn Stover Hemicellulosic Hydrolysate Using Immobilized Recombinant Yeast Cells, Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, China

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

Ochaikul, D., Poungmalee, B., Yimyai, T and Keawkaew, S. 2010. Production of Ethanol from Jackfruit Seeds Starch by Enzymatic Hydrolyzation and *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation. Proceeding of NZMS α NZSBMB Joint Meeting, 30 November-3 December, The University of Auckland, New Zeland.

[Online].Available : *http*://www.agro.cmu.ac.th/e_books/.../%BA%B7%B7%D5%E84.ppt

[Online].Available : http://www.pttplc.com

[Online].Available : http://www.science.cmu.ac.th/department/ic/document/pic/dc8.pdf

[Online].Available : http ://www.bscb.org/newsletter/summer2006/pombe1.jpg

[Online].Available : http ://www. cheng.cam.ac.uk

[Online].Available : http://as.doa.go.th/fieldcrops/cas/eth/e002.pdf

[Online].Available : http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2549/biol0649sl_app.pdf

[Online].Available : http://www.chemtrack.org/Board-Detail.asp?TID=0&ID=357

[Online].Available : http://www.dede.go.th/dede/index.php?id=518

[Online].Available : http://www.diwinetaste.com/html/dwt200701/images/Saccharomyces Cerevisiae.jpg

[Online].Available : http://gastroresource.com/GITextbook/en/images/imgchp7/fig9.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online].Available : http://las.perkinelmer.com/local/Thailand/AS_GC.htm

[Online].Available : www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi

[Online].Available : www.psmc2006.com/%E0%CD%B8%D2%B9%CD%C5-III.pdf

[Online].Available : http://www.research.sci.ubu.ac.th/SystemResearch/Detail/detail
_Proj.php?index=2551A11702020

[Online].Available : http://guru.sanook.com/search/knowledge_search.php?qID=&wi=&hnl=
&ob=&asc=&q=การจำแนกมันเทศทางพฤกษศาสตร์&select=1&id=1487#ประวัติความเป็นมาของ
มันเทศ

[Online].Available :http://water-pacific.com/index.php/2010-08-14-10-07-37

[Online].Available :www.nrel.gov

[Online].Available :http://www.science.cmu.ac.th/department/ic/document/pic/dc8.pdf

[Online].Available : http://www.vcharkarn.com/vcafe/125301

[Online].Available : http://158.108.88.131/courseware/charoen/unit4/

[Online].Available : http://home.kku.ac.th/uac/journal/year%20_11_4_2546/07_11_4_2546.pdf

[Online].Available : http://1.mod.go.th/.../etanol%20home%20page%20&%20proposal.doc

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ YM Broth

ประกอบด้วย

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

วิธีการเตรียม

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

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ YM Agar

ประกอบด้วย

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

วิธีการเตรียม

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางเคมีและเครื่องมือวิเคราะห์

1. วิธีวัดน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi – Nelson (Nelson, 1944)

<u>สารเคมี</u>

1. สารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent)
2. สารละลายเนลสัน (Nelson's Arsenomolybdate color reagent)

<u>วิธีเตรียมสารเคมี</u>

สารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent)

1. ชั่ง $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ ปริมาณ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายคอปเปอร์ เก็บในขวดสีชา
2. จากนั้นละลาย $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ ปริมาณ 71 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร
3. เติม $NaKC_4H_4O_6 \cdot 4\ H_2O$ ปริมาณ 40 กรัม
4. เติม NaOH 1N ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
5. เติม Na_2SO_4 ปริมาณ 120 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชาเป็นเวลา 2 วัน
6. เมื่อครบกำหนดเวลานำมากรองตะกอนออก
7. จากนั้นนำมาผสมกับสารละลายคอปเปอร์ และเก็บในขวดสีชา

สารละลายเนลสัน (Nelson's Arsenomolybdate color reagent)

1. เติม $Na_2HASO_4 \cdot 7\ H_2O$ ปริมาณ 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร
2. จากนั้นเติม $((NH_4)_6\ Mo7O_{24}) \cdot 4\ H_2O$ ปริมาณ 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร
3. เติมกรดซัลฟูริกปริมาตร 21 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บสารละลายในขวดสีชา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีวิเคราะห์

1. ทำการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน โดยชั่งน้ำตาลกลูโคสปริมาณ 0.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น นำมาทำการเจือจางให้ได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 0 50 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรและสารละลายคอปเปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3. จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปทำให้เย็น

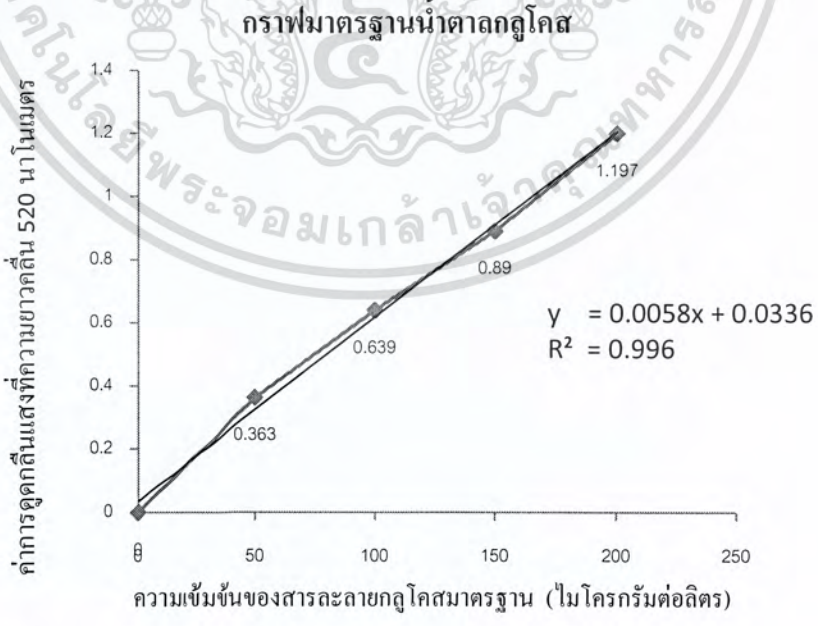
4. เติมสารละลายเนลสันปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที แต่ไม่ควรเกิน 40 นาที

6. จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ ข-1) เพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่างหรือคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น } 520 \text{ นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}) \times 1000}$$



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสวัดด้วยวิธี Somogyi-Nelson ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC)

เป็นเทคนิคใช้สำหรับแยกสารผสมที่มีคุณสมบัติที่สามารถเป็นแก๊สได้ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นแก๊สเช่นกัน แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารผสม เช่น ฮีเลียม จะทำหน้าที่เป็นตัวพา (Carrier) สารผสม ส่วนเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) อาจจะเป็นของแข็งหรือของเหลวที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ เมื่อทั้งตัวพาและสารผสมเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์นี้ เฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์จะดึงดูดด้วยแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิตตามความเป็นขั้วของสารกับโมเลกุลในสารผสมทำให้องค์ประกอบในสารผสมถูกพาไปด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน สารผสมก็จะแยกออกจากกัน เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแก๊สนี้มักใช้ในการวิเคราะห์ทั้งคุณภาพและปริมาณในหลายด้าน อาทิเช่น ทางด้านอาหาร ยา ยาฆ่าแมลง น้ำมันหอมระเหย ทางการแพทย์ ปิโตรเลียม และทางสิ่งแวดล้อม เป็นต้น

องค์ประกอบหลักที่สำคัญของเครื่อง GC สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือ

1.1 Injector

คือ ส่วนที่สารผสมตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าสู่เครื่องมือ และระเหยกลายเป็นไอก่อนที่จะเข้าสู่ column อุณหภูมิที่เหมาะสมของ injector ควรเป็นอุณหภูมิที่สูงพอที่จะทำให้ตัวอย่างระเหยได้แต่ต้องไม่ทำให้สารสลายตัว เช่น Split, Splitless injector, On column injector เป็นต้น

1.2 Oven

คือ ส่วนที่ใช้สำหรับบรรจุ column และเป็นส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิของ column ให้เปลี่ยนไปตามความเหมาะสมกับวิธีการที่ต้องการวิเคราะห์สารผสม การควบคุมอุณหภูมิของ oven นั้นมี 2 แบบ คือ Isothermal จะใช้อุณหภูมิเดียวตลอดการวิเคราะห์ และแบบ temperature program จะสามารถเปลี่ยนอุณหภูมิได้ในระหว่างการวิเคราะห์ มักจะนิยมใช้กับสารผสมที่มีช่วงของจุดเดือดกว้าง ทำให้ chromatogram ที่ได้มี peak shape ไม่ broad และยังช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์

1.3 Detector

คือ ส่วนที่ใช้สำหรับตรวจวัดองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่างและดูว่าสารตัวอย่างที่สนใจมีปริมาณอยู่เท่าใด มีหลายชนิดตามความเหมาะสมดังนี้

1.3.1 Flame Ionization Detector (FID) เหมาะสำหรับตรวจวัดสารที่มี C-H bonds ในโมเลกุลหรือที่เรียกว่าเป็นสารอินทรีย์ (Organic compounds)

1.3.2 Thermal Conductivity Detector (TCD) มี filament ที่มีการให้กระแสไฟฟ้าคงที่ และจะเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟของ filament ใน reference cell และsample cell การเปลี่ยนแปลงนี้จะมีความสัมพันธ์กับค่าสัมประสิทธิ์การนำความร้อนของสารที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการวิเคราะห์กับค่าสัมประสิทธิ์นำความร้อนของ carrier gas ทำให้ detector ชนิดนี้สามารถตรวจสอบสารได้ทุกชนิดยกเว้นตัวแก๊ส ที่ใช้เป็น carrier gas

1.3.3 Nitrogen Phosphorous Detector (NPD) เป็นเครื่องตรวจวัดที่ใช้ตรวจวัดเฉพาะสารอินทรีย์ที่มี nitrogen หรือ phosphorous เป็นองค์ประกอบ โดยสารตัวอย่างจะถูกเผาใน plasma ที่เกิดจาก rubidium bead ที่ถูกกระตุ้นด้วย hydrogen และ air ทำให้สารที่มี nitrogen หรือ phosphorous กลายเป็นไอออน

1.3.4 Flame Photometric Detector (FPD) สารที่มี sulfur หรือ phosphorous ในองค์ประกอบเมื่อถูกเผาใน hydrogen/air flame จะให้แสงในช่วงคลื่นเฉพาะ แสงนี้จะผ่าน monochromatic filter ไปยัง photomultiplier tube เพื่อทำการตรวจวัด

1.3.5 Electron Capture Detector (ECD) เป็น detector เฉพาะที่ใช้วัด electrophilic compounds อย่างเช่น halogens, nitrates และ conjugated carbonyls หลักของ detector นี้คือ 63Ni จะเป็นให้ อิเล็คตรอน เมื่อมีกระแสไฟฟ้า เมื่อสารที่เป็น electrophilic compounds เข้าไปจับกับอิเล็คตรอน ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกระแสในการวัด
(ที่มา : http://las.perkinelmer.com/local/Thailand/AS_GC.htm)

สำหรับการทดลองนี้ ใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี Shimadzu 17A Chromatograph โดยมีแก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา คอลัมน์ที่ใช้ DB-WAX ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.53 มิลลิเมตร อุณหภูมิภายในคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส และส่วนตรวจวัดองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง (Detector) คือชนิด Flame Ionization Detector (FID)

<u>วิธีวิเคราะห์</u> (Jekel, 2005)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานภายในโดยใช้ โพรพานอล (n-propanol) ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตรเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard)

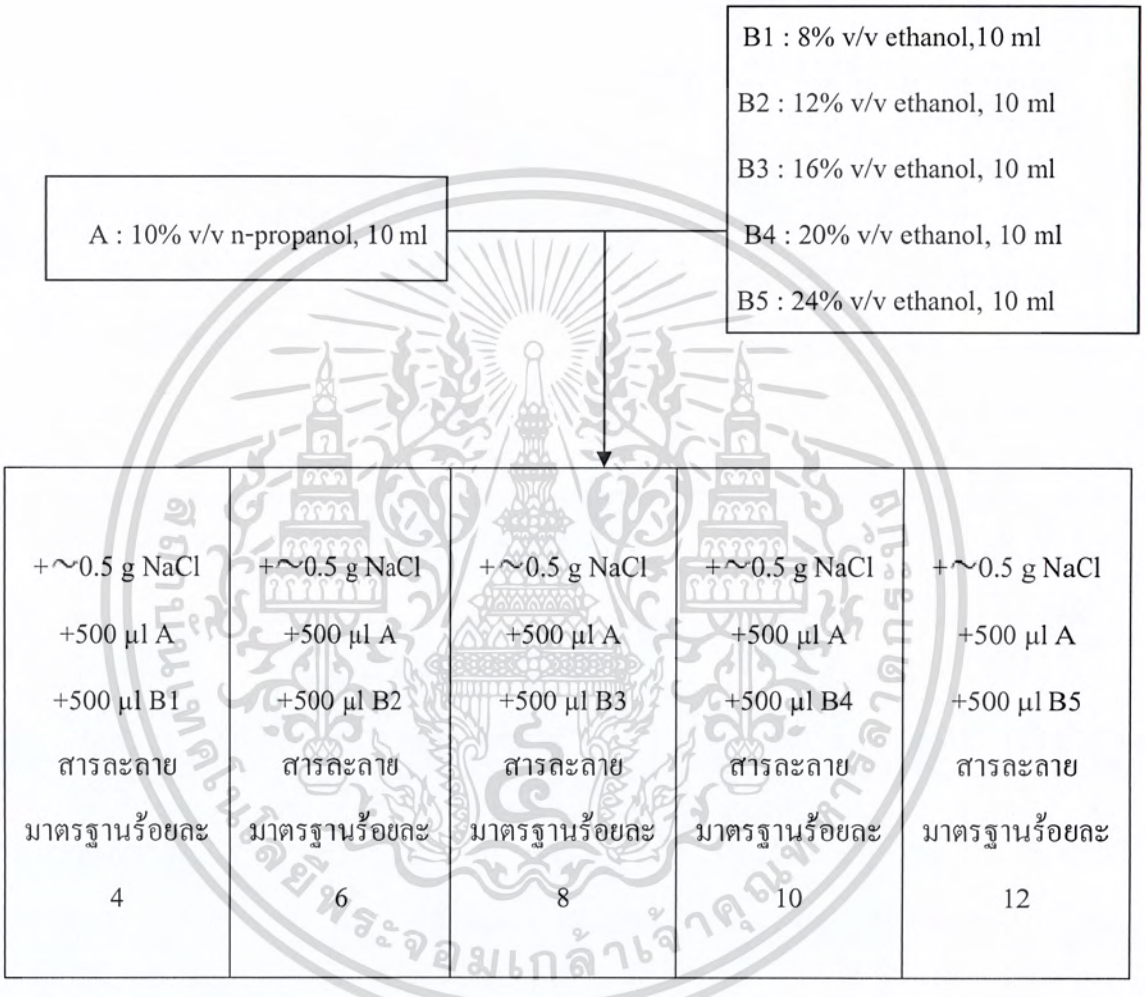
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลให้มีความเข้มข้นร้อยละ 4, 6, 8, 10 และ12 โดยปริมาตร โดยมีวิธีทำดังแผนภาพรูปที่ ข-2

3. ใส่สารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นในขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร วางเซปตัม (septum) ที่ปากขวดโดยคว่ำด้านเทฟลอน (Teflon) ลงติดปากขวด จากนั้นจึงปิดด้วยฝาอะลูมิเนียม

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

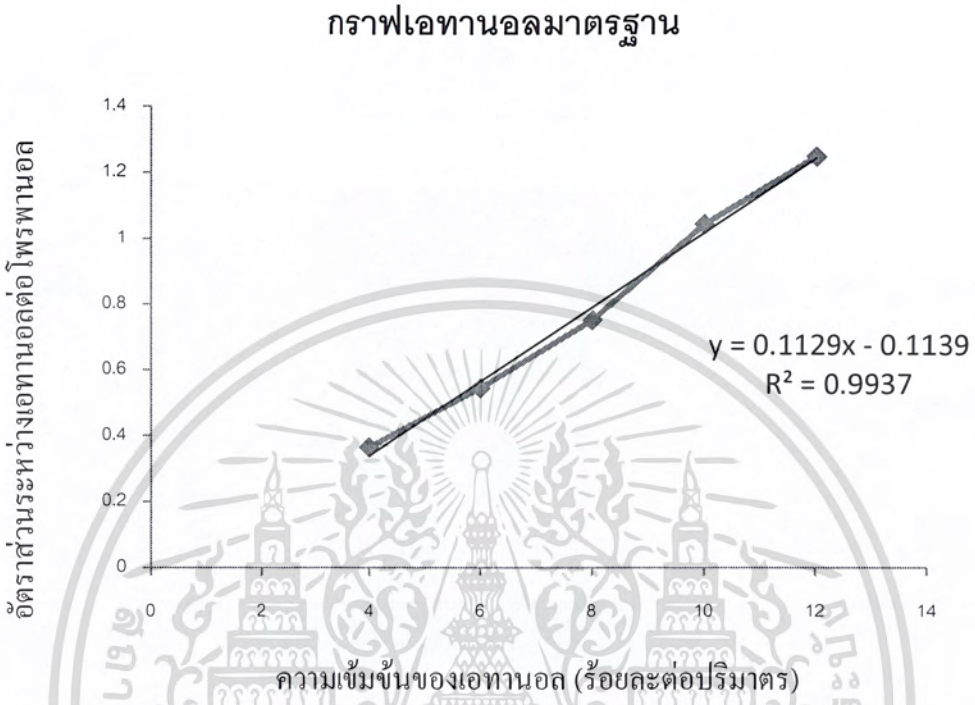
5. ใช้คอลัมน์ DB-WAX (Agilent J&W GC Column) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.53 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 1 ไมครอน อุณหภูมิของคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ใช้ตัววัด (detector) ชนิด FID โดยปรับอุณหภูมิเท่ากับ 150 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของตำแหน่งฉีดสาร (injector) เท่ากับ 150 องศาเซลเซียส ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นพาหะโดยมีความดันคอลัมน์เท่ากับ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



รูปที่ ข-2 แผนภาพวิธีเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำสารละลายมาตรฐานเอทานอลมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีจะได้กราฟมาตรฐานเอทานอลดังแสดงในรูปที่ ข-3



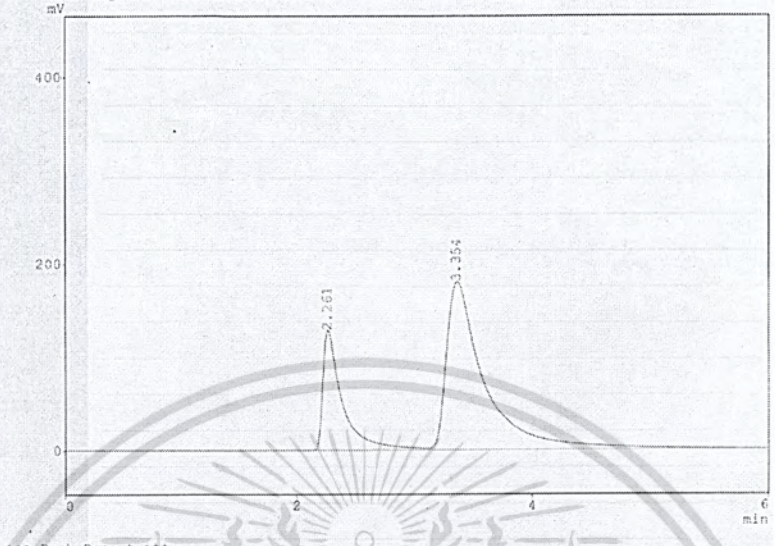
รูปที่ ข-3 กราฟเอทานอลมาตรฐานวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

a

```
CLASS-GC10 Ver.=1.61  SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=15 DATA=VI.D16 10/02/11 13:56:16
Sample          : 4-3
ID              :
Dilution Factor: 1
Type            : Unknown
Detector        : FID
Operator        : JANG

*** Chromatogram ***  Filename:VI.C16
```

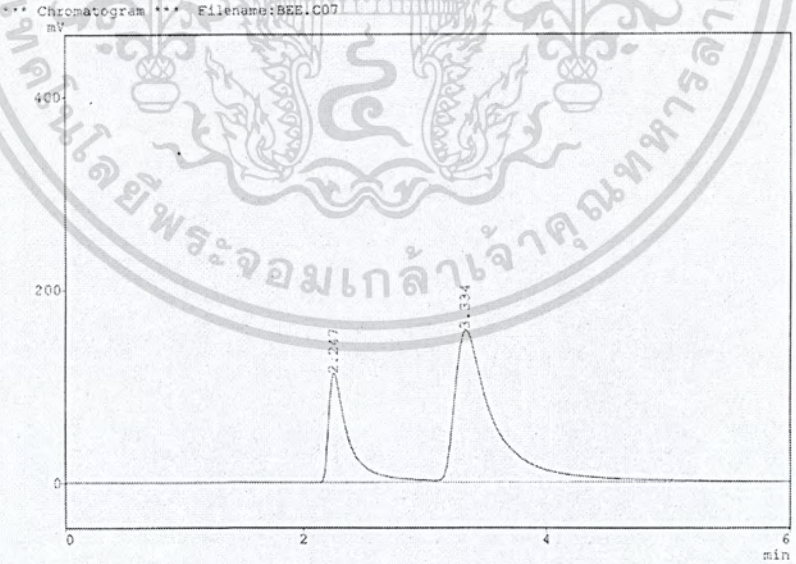



```
*** Peak Report ***
PKNO   TIME       AREA       HEIGHT   MK  IDNO      CONC          NAME
   1   2.261      1478742     126575                  26.6633
   2   3.354      4067249     179580   V              73.3367
-------------------------------------------------------------------------
                  5545991     306156                 100.0000
```

b

```
CLASS-GC10 Ver.=1.61  SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=22 DATA=BEE.D07 11/02/10 16:58:46
Sample          : STD4
ID              :
Dilution Factor: 1
Type            : Unknown
Detector        : FID
Operator        : BEE

*** Chromatogram ***  Filename:BEE.C07
```



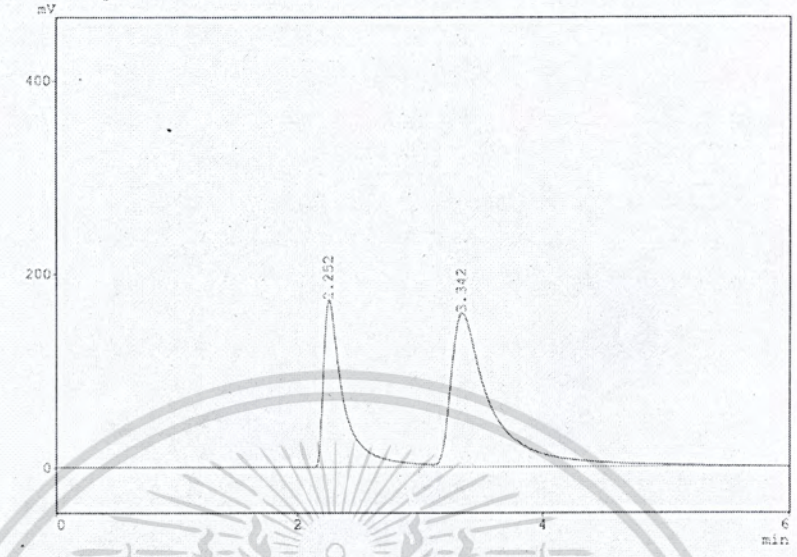

```
*** Peak Report ***
PKNO   TIME       AREA       HEIGHT   MK  IDNO      CONC          NAME
   1   2.247      1315519     113473                  26.7787
   2   3.334      3597040     158413   V              73.2213
-------------------------------------------------------------------------
                  4912559     271886                 100.0000
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

c

```
CLASS-GC10 Ver.=1.61  SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=8  DATA=POR.D03 11/02/10 13:09:30
Sample          : 6-1
ID              :
Dilution Factor: 1
Type            : Unknown
Detector        : FID
Operator        : JANG

*** Chromatogram ***  Filename:POR.C03
```



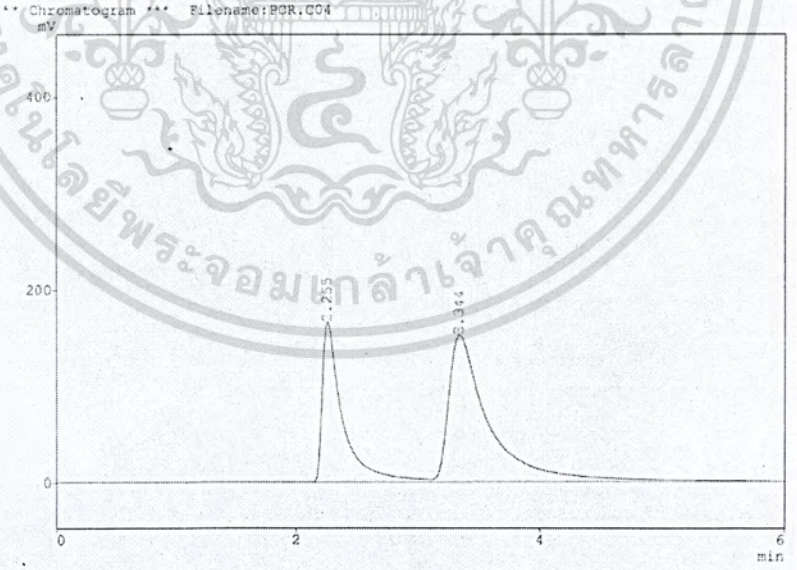
*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.252	1993587	172501			35.2121	
2	3.342	3668068	159131	V		64.7879	
		5661654	331632			100.0000	

d

```
CLASS-GC10 Ver.=1.61  SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=9  DATA=POR.D04 11/02/10 13:25:38
Sample          : 6-2
ID              :
Dilution Factor: 1
Type            : Unknown
Detector        : FID
Operator        : JANG

*** Chromatogram ***  Filename:POR.C04
```



*** Peak Report ***

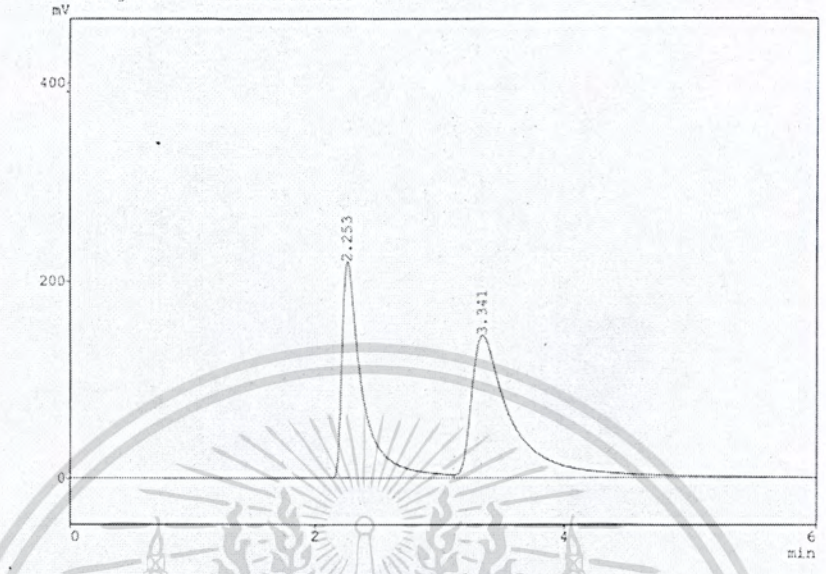
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.255	1921433	166183			35.3324	
2	3.344	3516735	152634	V		64.6676	
		5438168	318816			100.0000	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

e

```
CLASS-GC10 Ver.=1.61  SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=10 DATA=POR.D05 11/02/10 13:42:34
Sample          : 8-1
ID              :
Dilution Factor: 1
Type            : Unknown
Detector        : FID
Operator        : JANG

*** Chromatogram ***   Filename:POR.C05
```

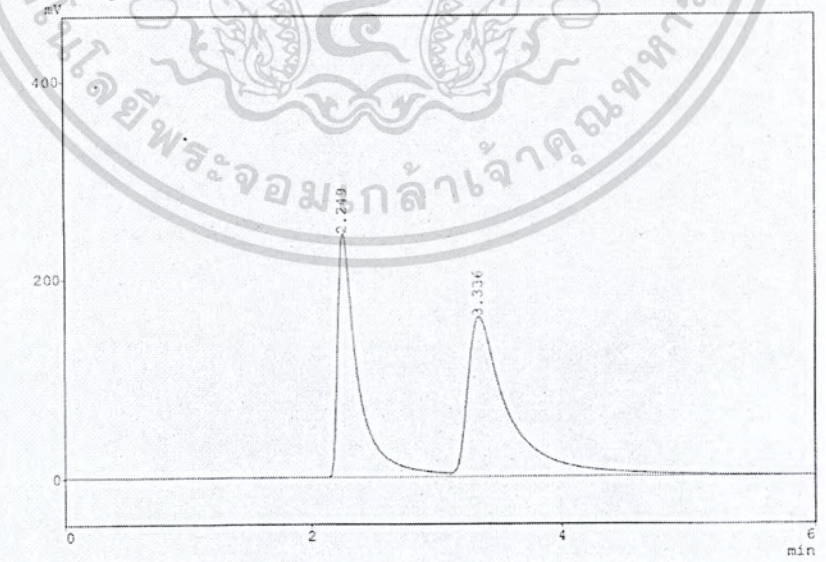



```
*** Peak Report ***
PKNO   TIME      AREA      HEIGHT   MK  IDNO      CONC          NAME
   1   2.253     2509849    219294                 42.8183
   2   3.341     3351771    144800   V             57.1816
-------------------------------------------------------------------------------
                 5861620    364094                100.0000
```

f

```
CLASS-GC10 Ver.=1.61  SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=11 DATA=POR.D06 11/02/10 13:59:32
Sample          : 8-2
ID              :
Dilution Factor: 1
Type            : Unknown
Detector        : FID
Operator        : JANG

*** Chromatogram ***   Filename:POR.C06
```



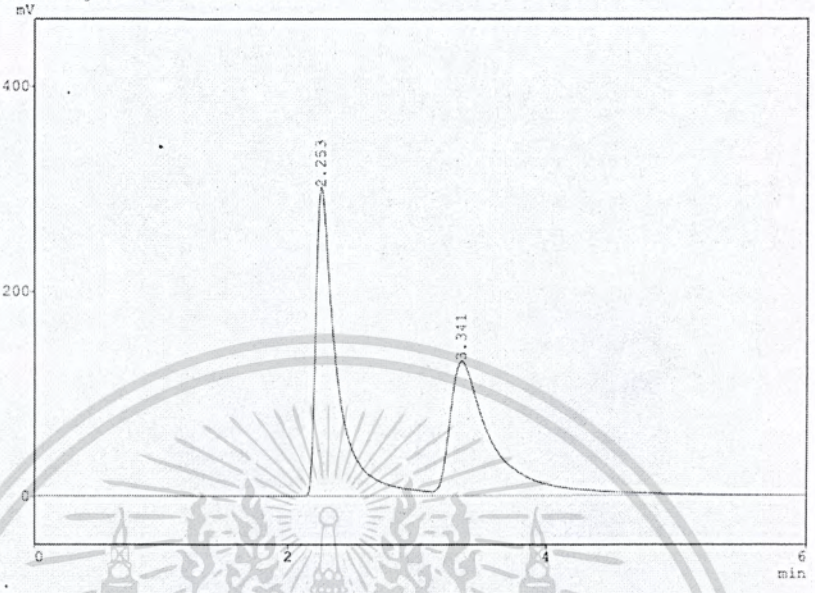

```
*** Peak Report ***
PKNO   TIME      AREA      HEIGHT   MK  IDNO      CONC          NAME
   1   2.249     2785928    244777                 42.9538
   2   3.336     3699934    160130   V             57.0461
-------------------------------------------------------------------------------
                 6485862    404907                100.0000
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

g

```
CLASS-GC10 Ver.=1.61  SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=12 DATA=POR.D07 11/02/10 14:14:38
Sample          : 10-1
ID              :
Dilution Factor: 1
Type            : Unknown
Detector        : FID
Operator        : JANG

*** Chromatogram ***   Filename:POR.C07
```

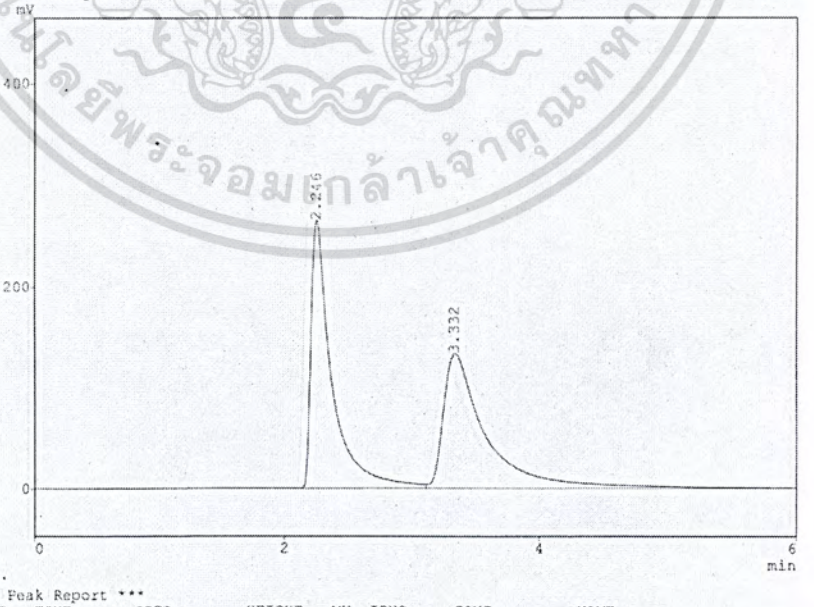



```
*** Peak Report ***
PKNO   TIME       AREA       HEIGHT   MK  IDNO      CONC          NAME
   1   2.253       3409819     301195                52.7142
   2   3.341       3058687     131071   V            47.2858
-------------------------------------------------------------------------
                   6468505     432266               100.0000
```

h

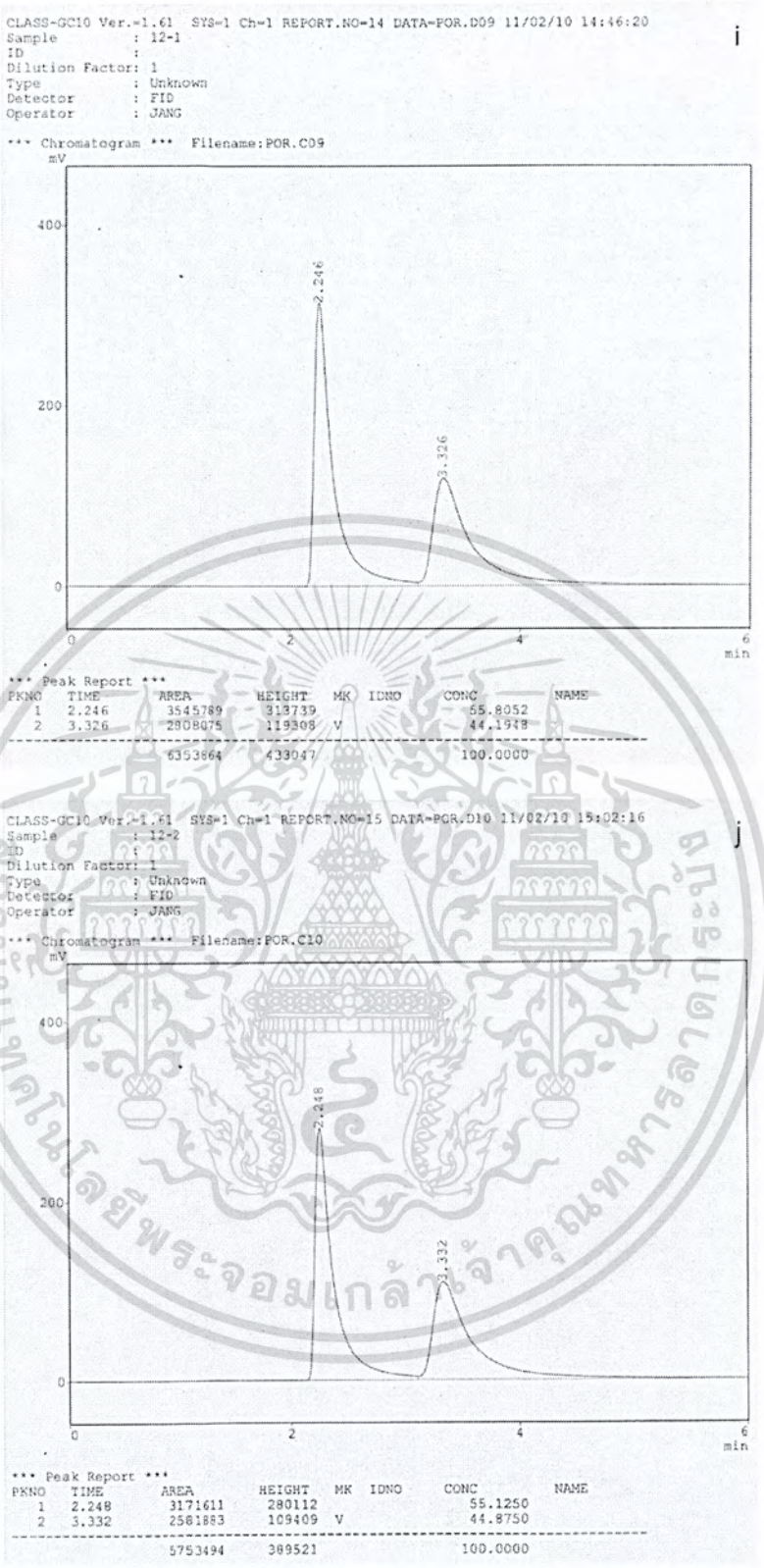
```
CLASS-GC10 Ver.=1.61  SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=13 DATA=POR.D08 11/02/10 14:30:46
Sample          : 10-2
ID              :
Dilution Factor: 1
Type            : Unknown
Detector        : FID
Operator        : JANG

*** Chromatogram ***   Filename:POR.C08
```




```
*** Peak Report ***
PKNO   TIME       AREA       HEIGHT   MK  IDNO      CONC          NAME
   1   2.246       3013306     265210                49.1853
   2   3.332       3113124     133604   V            50.8146
-------------------------------------------------------------------------
                   6126430     398814               100.0000
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-4 (a-j) แสดงพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอล และพื้นที่ใต้กราฟของโพรพานอล (เอทานอลมาตรฐาน) จากโครมาโตแกรมของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

a,b : ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 4

c,d : ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 6

e,f : ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 8

g,h : ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 10

i,j : ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ค – 1 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ความเข้มข้นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (ร้อยละ)	ซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสง (ความยาวคลื่น520 nm)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
0.05	1	0.489	16.8621	16.8506
	2	0.565	19.4828	
	3	0.412	14.2069	
0.10	1	0.496	17.1034	17.6207
	2	0.521	17.9655	
	3	0.517	17.8276	
0.15	1	0.450	15.5172	18.4598
	2	0.558	19.2414	
	3	0.598	20.6207	
0.20	1	0.553	19.0690	19.5977
	2	0.557	19.2069	
	3	0.595	20.5172	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค – 2 ผลของปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (มิลลิลิตร)	ซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสง (ความยาวคลื่น520 nm)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
5	1	0.4763	16.4234	16.4344
	2	0.4770	16.4495	
	3	0.4765	16.4304	
10	1	0.4775	16.4653	16.4402
	2	0.4767	16.4372	
	3	0.4761	16.4181	
15	1	0.4769	16.4435	16.4505
	2	0.4771	16.4507	
	3	0.4773	16.4574	
20	1	0.4774	16.4635	16.4681
	2	0.4771	16.4507	
	3	0.4776	16.4674	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค – 3 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ความเข้มข้นเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ร้อยละ)	ซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสง (ความยาวคลื่น520 nm)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
0.005	1	0.405	20.9483	22.9138
	2	0.496	25.6552	
	3	0.428	22.1379	
0.010	1	0.552	28.5517	28.5862
	2	0.534	27.6207	
	3	0.572	29.5862	
0.015	1	0.472	32.5517	35.6092
	2	0.502	34.6207	
	3	0.575	39.6552	
0.020	1	0.537	37.0345	38.3678
	2	0.561	38.6897	
	3	0.571	39.3793	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค – 4 ผลของปริมาณของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (มิลลิลิตร)	ซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสง (ความยาวคลื่น520 nm)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
5	1	0.459	23.7414	24.4310
	2	0.478	24.7241	
	3	0.480	24.8276	
10	1	0.478	32.9655	31.5632
	2	0.459	31.6552	
	3	0.436	30.0690	
15	1	0.520	35.8621	36.7126
	2	0.533	36.7586	
	3	0.544	37.5172	
20	1	0.477	41.1207	41.7816
	2	0.482	41.5517	
	3	0.495	42.6724	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค – 5 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF) และกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; SSF)

กระบวนการ	ซ้ำที่	ค่าอัตราส่วนระหว่างเอทานอลต่อโพรพานอล	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอลเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
SHF	1	0.0973	14.76	14.55
	2	0.0940	14.53	
	3	0.0915	14.35	
SSF	1	0.0640	12.43	12.62
	2	0.0673	12.66	
	3	0.0688	12.77	

<u>สูตรการคำนวณปริมาณเอทานอล</u>

สมการ $y = 0.1129x - 0.1139$

ให้ y = ค่าอัตราส่วนระหว่างเอทานอลต่อโพรพานอล

ความหนาแน่นของเอทานอล = 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น

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

<u>ตัวอย่างการคำนวณปริมาณเอทานอลในกระบวนการ SHF ซ้ำที่ 1</u>

จาก $y = 0.1129x - 0.1139$

$0.0973 = 0.1129x - 0.1139$

$x = 1.8707$ % (v/v)

ความหนาแน่นของเอทานอล = 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ปริมาณเอทานอล = 1.8707(0.789)(10)

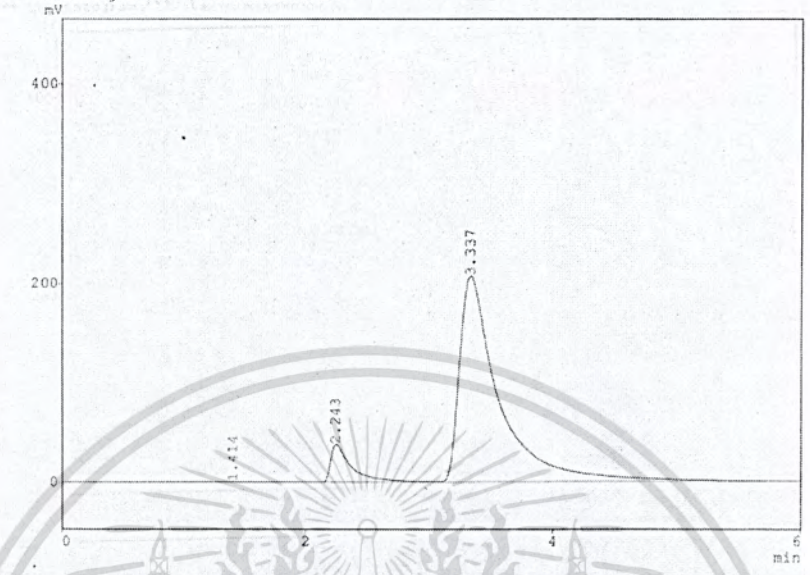
= 14.76 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

a

```
CLASS-GC10 Ver.=1.61  SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=19 DATA=BEE.D04 11/02/10 16:10:14
Sample          : SHF1
ID              :
Dilution Factor: 1
Type            : Unknown
Detector        : FID
Cperator        : BEE

*** Chromatogram ***  Filename:BEE.C04
```



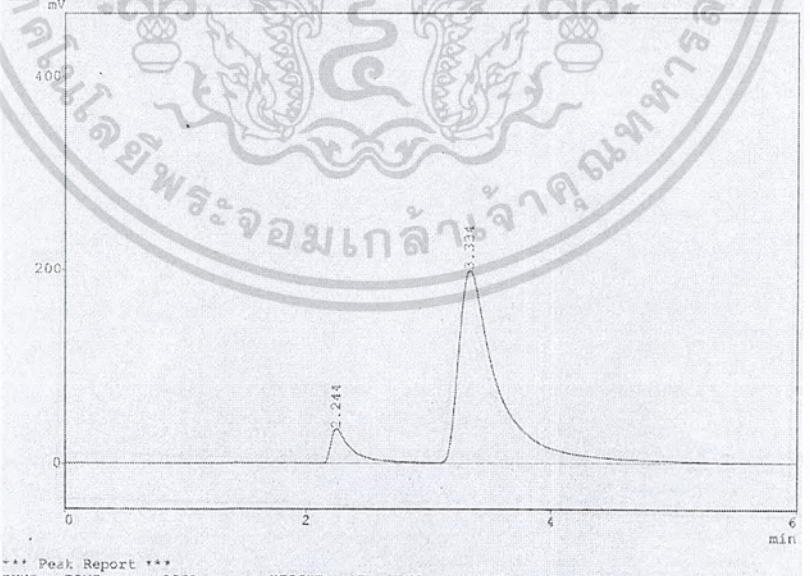
*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.414	1047	491			0.0205	
2	2.243	453170	37860			8.8695	
3	3.337	4655095	207259	V		91.1100	
		5109312	245609			100.0000	

b

```
CLASS-GC10 Ver.=1.61  SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=20 DATA=BEE.D05 11/02/10 16:26:40
Sample          : SHF2
ID              :
Dilution Factor: 1
Type            : Unknown
Detector        : FID
Operator        : BEE

*** Chromatogram ***  Filename:BEE.C05
```



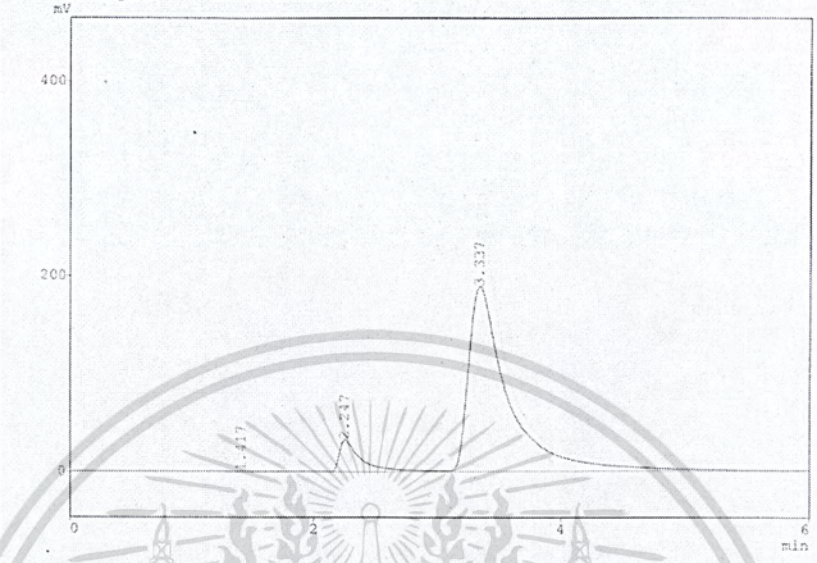
*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.244	420139	35138			8.5908	
2	3.334	4470443	198662	V		91.4092	
		4890581	233800			100.0000	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
CLASS-GC10 Ver.=1.61  SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=21 DATA=BEE.D06 11/02/10 16:42:32
Sample          : SHF3                                                    c
ID              :
Dilution Factor: 1
Type            : Unknown
Detector        : FID
Operator        : BEE

*** Chromatogram ***  Filename:BEE.C06
```



*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.417	1103	523			0.0237	
2	2.247	389178	32547			8.3797	
3	3.337	4254035	188708	V		91.5966	
		4644316	221777			100.0000	

รูปที่ ค-1 (a-c) แสดงพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอล และพื้นที่ใต้กราฟของโพรพานอล (วิธี SHF) จากโครมาโตแกรมของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

a : SHF ซ้ำที่ 1

b : SHF ซ้ำที่ 2

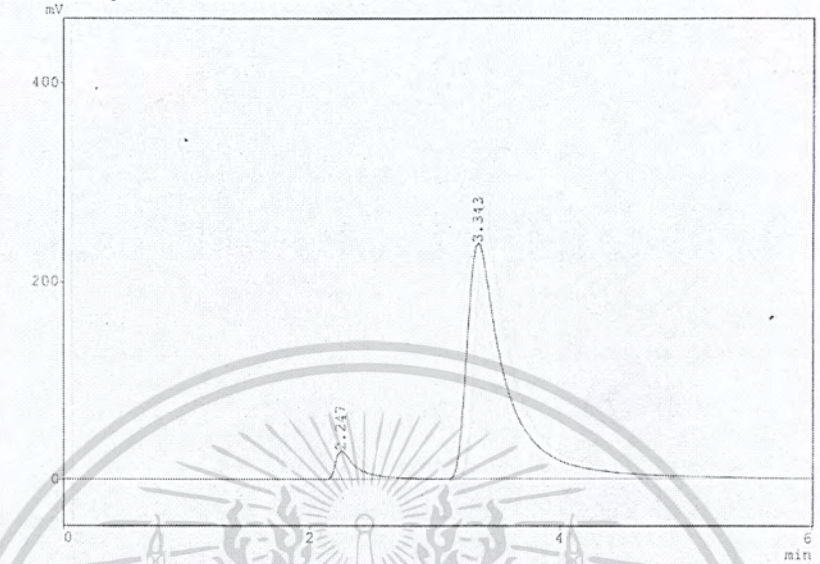
c : SHF ซ้ำที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

a

```
CLASS-GC10 Ver.=1.61  SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=16 DATA=BEE.D01 11/02/10 15:21:24
Sample          : SSF1
ID              :
Dilution Factor: 1
Type            : Unknown
Detector        : FID
Operator        : BEE

*** Chromatogram ***   Filename:BEE.C01
```

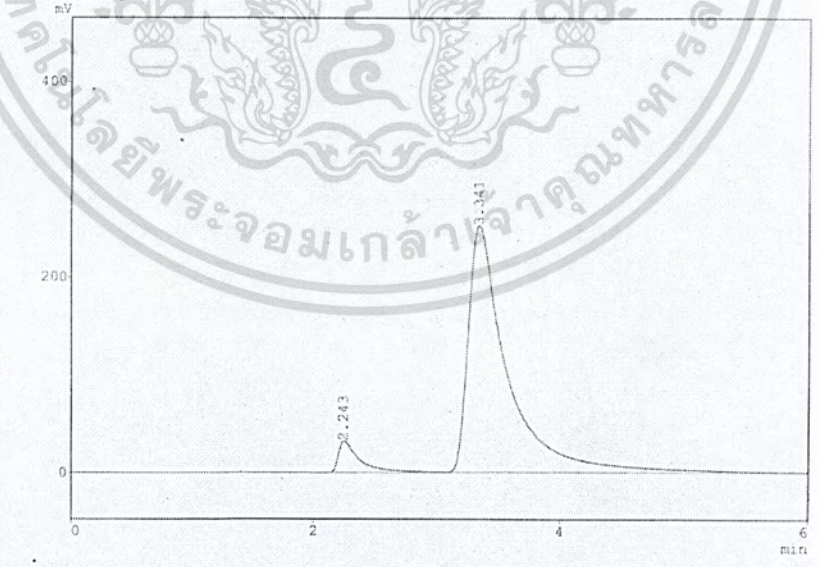



```
*** Peak Report ***
PKNO   TIME       AREA       HEIGHT   MK  IDNO      CONC          NAME
   1   2.247       341231      28419                  6.0118
   2   3.343      5334779     238182  V               93.9882
-------------------------------------------------------------------------------
                  5676010     266601                100.0000
```

b

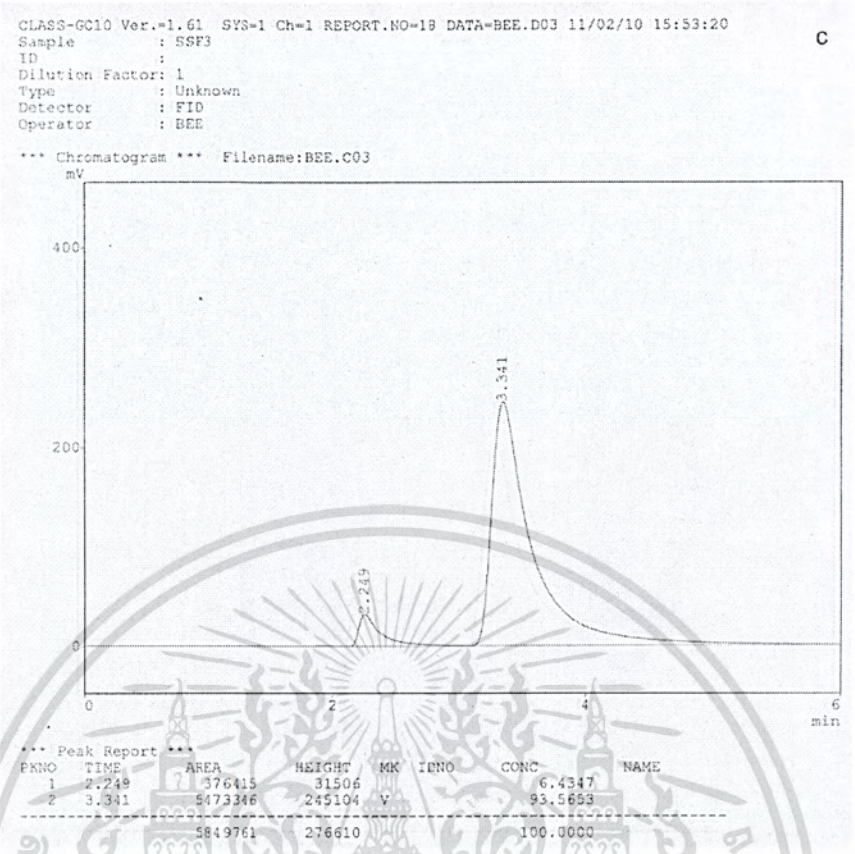
```
CLASS-GC10 Ver.=1.61  SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=17 DATA=BEE.D02 11/02/10 15:37:34
Sample          : SSF2
ID              :
Dilution Factor: 1
Type            : Unknown
Detector        : FID
Operator        : BEE

*** Chromatogram ***   Filename:BEE.C02
```




```
*** Peak Report ***
PKNO   TIME       AREA       HEIGHT   MK  IDNO      CONC          NAME
   1   2.243       379365      31773                  6.3060
   2   3.341      5636599     252334  V               93.6940
-------------------------------------------------------------------------------
                  6015964     284107                100.0000
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-2 (a-c) แสดงพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอล และพื้นที่ใต้กราฟของโพรพานอล (วิธี SSF) จากโครมาโตแกรมของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

a : SSF ซ้ำที่ 1

b : SSF ซ้ำที่ 2

c : SSF ซ้ำที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) โดยมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน(Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างด้วยวิธี Duncan โดยใช้โปรแกรม SPSS 11.0 for Windows Evaluation version ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12.442	3	4.147	1.122	.396
Within Groups	29.564	8	3.695		
Total	42.006	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.174	3	8	.169

Duncan

CONC.ENZ	N	Subset for alpha = .05
		1
0.05	3	16.850600
0.10	3	17.632167
0.15	3	18.459767
0.20	3	19.597700
Sig.		.139

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณแอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	3	.000	1.833	.219
Within Groups	.002	8	.000		
Total	.003	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.674	3	8	.249

Duncan

QUANTITY	N	Subset for alpha = 0.05
		1
5	3	16.434400
10	3	16.440200
15	3	16.450533
20	3	16.460533
Sig.		.076

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	438.592	3	146.197	26.878	.000
Within Groups	43.514	8	5.439		
Total	482.106	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.619	3	8	.123

Duncan

CONC.ENZ	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
0.005	3	22.913800		
0.010	3		28.586200	
0.015	3			35.609200
0.020	3			38.367833
Sig.		1.000	1.000	.185

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	494.530	3	164.843	173.924	.000
Within Groups	7.582	8	.948		
Total	502.113	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.681	3	8	.588

Duncan

QUANTITY	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
5	3	24.431033			
10	3		31.563233		
15	3			36.712633	
20	3				41.781600
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้