

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การครึ่งเซลดร่วมของจุลินทรีย์ 2 ชนิด เพื่อผลิตเอทานอลจากแป้ง



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

มท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ร ๒๔๖๓

ปีการศึกษา 2538

เลขหมู่..... 2538.

เลขทะเบียน..... 25397

วัน, เดือน, ปี..... 9 ก.ค. 7539

สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
โดยไม่ได้รับอนุญาต หากมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Co-immobilization of Two Strains of Microorganisms
and Its Application in Ethanol Production**



A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1995

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การตรึงเซลล์ร่วมของจุลินทรีย์ 2 ชนิด เพื่อผลิตเอทานอลจากแป้ง
โดย นางสาวรักชนก โคโต
นางสาวสุนทรีพร หอมบัวใหญ่
นางสาวอรุณี แต่งไทย
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ อรไท สุขเจริญ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต



(ดร. อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการสอบโครงการพิเศษ



(รศ.ดร.คุษณี รัตนปริพัฒน์)

ประธานกรรมการ



(ดร. อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล)

กรรมการ



(อาจารย์ อรไท สุขเจริญ)

กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การตรึงเซลล์ร่วมของจุลินทรีย์ 2 ชนิด เพื่อผลิตเอทานอลจากแป้ง	
โดย	นางสาวรักชนก	โตโค
	นางสาวสุนทรพร	หอมบัวใหญ่
	นางสาวอรุณี	แต่ง ไทย
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ อรไท	สุขเจริญ
ปีการศึกษา	2538	

บทคัดย่อ

การศึกษาการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ เชื้อราและยีสต์ เพื่อการผลิตเอทานอล โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ โดยใช้เชื้อราเป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ได้แก่ *Rhizopus oryzae* Went & Pronsen Geerliges ATCC 56536 (A1) , *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn ATCC 11491 (A2) , *Aspergillus awamori* Nakazawa (A3) และเชื้อยีสต์ที่ใช้น้ำตาลเพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอล ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098 (S1) , *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 26192 (S2) ในการศึกษาการอยู่ร่วมกันในระบบเซลล์อิสระพบว่าระบบ S1A2 เป็นระบบที่ให้ผลผลิตเอทานอลได้มากที่สุด คือ 30.46 กรัมต่อลิตร และการศึกษาการอยู่ร่วมกันโดยระบบเซลล์ครึ่งรูปโดยใช้โซเดียมอัลจินเต พบว่า ระบบที่เหมาะสมที่ให้ผลผลิตเอทานอลมากที่สุด คือ ระบบ S1A2 โดยให้ผลผลิตเอทานอลมากที่สุดคือ 42.10 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกระบบ S1A2 ในการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอล จากผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากแป้งโดยระบบ S1A2 คือ การใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้น 2 % และใช้ยีสต์สกัด 1 % เป็นแหล่งไนโตรเจน

Special Project Title Co-immobilization of Two Strains of Microorganisms and Its Application in Ethanol Production

Name Miss Rakchanok Koto
Miss Soontareeporn Hombuayai
Miss Arunee Taengthai

Department Applied Biology

Special Project Adviser Miss Orathai Sukcharoen

Academic Year 1995

Abstract

Coexisting of 2 strains of microorganisms was studied in mold and yeast for direct ethanol production from raw starch. Three typical amylase-producing molds, *Rhizopus oryzae* Went & Prosen Geerliges ATCC 56536 (A1), *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn ATCC 11491 (A2), *Aspergillus awamori* Nakazawa (A3) were used to hydrolyse starch to form glucose. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098 (S1) and *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 26192 (S2) were used as typical ethanol producing yeasts, they used glucose to produce ethanol. It was found in free cell system that coexisted S1A2 produced highest ethanol yield of 30.46 g/l. And also in co-immobilized cell system by sodium alginate S1A2 was the highest ethanol production system with 42.10 g/l ethanol yield at 36 h of fermentation time. Thus co-immobilized S1A2 system was used to study the optimum condition for ethanol production. As the result it was found that using 2% starch and 1% yeast extract as nitrogen source was the optimum condition for ethanol production from raw starch by co-immobilized S1A2 system.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต และสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ อาจารย์ อรไท สุขเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษา และให้คำแนะนำในด้านต่าง ๆ ในการจัดทำโครงการพิเศษนี้ รศ.ดร.คุณณี ฐานะบริพัทธ์ และ ดร.อุ๋นเรื่อน ศิริวานิชกุล กรรมการพิจารณาโครงการพิเศษ และได้กรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษาคำย่ รวมทั้ง คุณพยอม เกียรติกำจร , คุณวิทยา เจียวเงิน, คุณประเสริฐวิทย์ แผงคำ , คุณรัชชชัย เปรมศรี เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้ยืมอุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับทำการทดลอง

สุดท้ายคณะผู้จัดทำขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่านที่ให้ยืมอุปกรณ์ต่าง ๆ รวมทั้งเพื่อน ๆ นักศึกษาที่ช่วยเหลือในการจัดทำโครงการพิเศษนี้

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2539

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน	24
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงการพิเศษ	24
3.2 อุปกรณ์และสารเคมี	24
3.2.1 อุปกรณ์	24
3.2.2 สารเคมี	25
3.3 ขั้นตอนในการดำเนินงานทดลอง	26
3.3.1 การเตรียมสปอร์เพื่อการผลิตเอทานอล	26
3.3.2 การเตรียมเซลล์ยีสต์เพื่อผลิตเอทานอล	26
3.3.3 การศึกษาลักษณะการอยู่ร่วมกันของเซลล์จุลินทรีย์	27
3.3.3.1 การอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์แบบอิสระในการผลิตเอทานอล	27
3.3.3.2 การอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์โดยใช้การตรึงเซลล์ในการผลิตเอทานอล	27
3.3.3.3 การศึกษาปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อระบบเพื่อการผลิตเอทานอล	28
3.3.3.4 การศึกษาปริมาณและชนิดของแหล่งไนโตรเจนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อระบบเพื่อการผลิตเอทานอล	28
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	30
4.1 การศึกษาการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ในระบบเซลล์อิสระในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
4.2 การศึกษาการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ในระบบตรึงเซลล์ในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง	31
4.3 การศึกษาปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นและปริมาณและชนิดของแหล่งไนโตรเจนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อระบบเพื่อการผลิตเอทานอล	33
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	39
ภาคผนวก	40
เอกสารอ้างอิง	



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 ตารางแสดงการเปรียบเทียบการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ 2 ชนิด ในระบบเซลล์อิสระที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล โดยแสดงปริมาณ ผลผลิตในแต่ละช่วงเวลาของการหมัก	30
ตารางที่ 2 ตารางแสดงการเปรียบเทียบการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ 2 ชนิด ในระบบตรึงเซลล์ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล โดยแสดงปริมาณ ผลผลิตในแต่ละช่วงเวลาของการหมัก	31
ตารางที่ 3 ตารางแสดงปริมาณผลผลิตเอทานอลที่ได้จากระบบที่ได้รับการ คัดเลือกแล้ว คือ ระบบตรึงเซลล์ร่วมของ S1A2 โดยใช้ปริมาณ แป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และแหล่ง ไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5	33
ตารางที่ 4 ตารางแสดงปริมาณผลผลิตเอทานอลที่ผลิตจากระบบตรึงเซลล์ร่วม ของ S1A2 โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 และ แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5	35
ตารางที่ 5 ตารางแสดงปริมาณผลผลิตเอทานอลที่ผลิตจากระบบตรึงเซลล์ร่วม ของ S1A2 โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และ แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0	35
ตารางที่ 6 ตารางแสดงปริมาณผลผลิตเอทานอลที่ผลิตจากระบบตรึงเซลล์ร่วม ของ S1A2 โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 และ แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0	37

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 1 รูปแสดง โมเลกุลของอะไมโลส	4
รูปที่ 2 รูปแสดง โมเลกุลของอะไมโลเพคติน	6
รูปที่ 3 รูปแสดงลักษณะของแอมูลของแป้ง	7
รูปที่ 4 รูปแสดง โครงสร้าง โมเลกุลในชั้นของแอมูลของแป้ง	7
รูปที่ 5 รูปแสดงจุดที่เอนไซม์อะไมเลส (β -amylase) เข้าทำปฏิกิริยาในการไฮโดรไลซ์อะไมโลส	9
รูปที่ 6 รูปแสดงบริเวณของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์อะไมเลสบนโมเลกุลของแป้ง	10
รูปที่ 7 แผนภาพแสดงการผลิตเอทานอล โดยทั่วไปที่ใช้ในอุตสาหกรรม	12
รูปที่ 8 แผนภาพแสดงวิถี Embden - Meyerhof Parnas Pathway	14
รูปที่ 9 รูปแสดงแผนผังการผลิตเอทานอลจากการอยู่ร่วมกันของยีสต์และรา	23
รูปที่ 10 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลโดยระบบ S1A2 ในระบบเซลล์อิสระและระบบตรึงเซลล์	32
รูปที่ 11 กราฟแสดงปริมาณผลผลิตเอทานอล โดยระบบตรึงเซลล์ร่วมของ S1A2 โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้นร้อยละ 1.0 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ร้อยละ 0.5	34
รูปที่ 12 กราฟแสดงปริมาณผลผลิตเอทานอล โดยระบบตรึงเซลล์ร่วมของ S1A2 โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้นร้อยละ 2.0 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ร้อยละ 0.5	36
รูปที่ 13 กราฟแสดงปริมาณผลผลิตเอทานอล โดยระบบตรึงเซลล์ร่วมของ S1A2 โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้นร้อยละ 1.0 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ร้อยละ 1.0	36
รูปที่ 14 กราฟแสดงปริมาณผลผลิตเอทานอล โดยระบบตรึงเซลล์ร่วมของ S1A2 โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้นร้อยละ 2.0 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ร้อยละ 1.0	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
รูปที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอล , ปริมาณแป้ง ที่ลดลง , น้ำหนักเซลล์แห้ง และ pH โดยใช้ปริมาณแป้งร้อยละ 2 และแหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัดร้อยละ 1	38
รูปที่ 16 รูปแสดงลักษณะของเชื้อรา <i>Rhizopus oryzae</i> (A1) ที่เจริญบน อาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar	40
รูปที่ 17 รูปแสดงลักษณะของเชื้อรา <i>Aspergillus oryzae</i> (A2) ที่เจริญบน อาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar	40
รูปที่ 18 รูปแสดงลักษณะของเชื้อรา <i>Aspergillus awamori</i> (A3) ที่เจริญ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	41
รูปที่ 19 รูปแสดงลักษณะของเชื้อยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (S1) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar	41
รูปที่ 20 รูปแสดงลักษณะของเชื้อยีสต์ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (S2) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar	42
รูปที่ 21 รูปแสดงลักษณะการตรึงเซลล์จุลินทรีย์	42
รูปที่ 22 รูปแสดงลักษณะของเม็ดเจลที่ตรึงได้ในแต่ละคู่	43
รูปที่ 23 รูปแสดงลักษณะของเม็ดเจลที่ทำการหมักแล้วเป็นเวลา 3 วัน	43
รูปที่ 24 รูปแสดงเครื่อง HPLC ที่ใช้วัดปริมาณเอทานอล	44
รูปที่ 25 รูปแสดงเครื่องมือ Ebulliometer ที่ใช้วัดปริมาณเอทานอล	44
รูปที่ 26 รูปแสดงลักษณะ peak ที่ได้จากเครื่อง HPLC ในการฉีดเอทานอล เข้มข้นร้อยละ 99	45
รูปที่ 27 รูปแสดงลักษณะ peak ที่ได้จากเครื่อง HPLC ในการฉีดสารตัวอย่าง ที่ได้จากน้ำหมัก	46
รูปที่ 28 รูปแสดงลักษณะของเครื่อง Ebulliometer	51
รูปที่ 29 รูปแสดงส่วนประกอบของระบบเครื่อง HPLC	56
รูปที่ 30 รูปแสดงหลักการทำงานของเครื่อง HPLC	56
รูปที่ 31 รูปแสดงการหาปริมาณเอทานอลซึ่งแยกโดยคอลัมน์ PEG 200 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส	60

บทที่ 1

บทนำ

เอทานอลเป็นสารที่มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย เป็นส่วนผสมของเครื่องดื่ม เช่น เบียร์ ไวน์ และอื่น ๆ อีกมากมาย โดยเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ส่วนใหญ่จะ ได้จากการหมักแป้งหรือน้ำตาลโดยเชื้อยีสต์ นอกจากเอทานอลจะเป็นส่วนผสมในเครื่องดื่ม แอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ แล้ว ยังมีการนำเอทานอลไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยใช้เป็นตัว ทำละลายในการทำแลคเกอร์ น้ำมันวานิช สี น้ำหอม และสารปรุงแต่งต่าง ๆ เป็นต้น และยังได้มีการนำเอทานอลไปใช้เป็นเชื้อเพลิงอีกด้วย ทั้งนี้เพื่อให้มีความเป็นไปได้ที่จะใช้ เอทานอลแทนน้ำมัน ซึ่งจากวิกฤติการณ์น้ำมันในช่วงทศวรรษ 1970 ก็ทำให้มีการสนใจใน การผลิตเชื้อเพลิงเหลวโดยวิธีการหมัก โดยเฉพาะเอทานอลเพิ่มมากขึ้น

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีเศรษฐกิจขึ้นกับการเกษตรกรรม ผลผลิตทางการเกษตร ที่สำคัญที่สามารถนำไปใช้ผลิตเอทานอลได้ ก็ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หา ได้ง่าย มีราคาถูก และหาได้ตลอดเวลา นอกจากนี้การนำแป้งมันสำปะหลังมาผลิตเอทานอล เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงยังจะช่วยเพิ่มรายได้สู่ชนบทด้วย ดังนั้นในโครงการพิเศษนี้จะได้ศึกษา ระบบของการอยู่ร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิดในรูปของเซลล์อิสระและในรูปของเซลล์ตรึง รูปของเชื้อทั้งสอง ในเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนต เพื่อหาระบบที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต เอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้การตรึงเซลล์ในเม็ดเจล แคลเซียมอัลจิเนต เหตุผลที่เลือกใช้วิธีนี้ก็เพราะว่าเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ก่อให้เกิดพิษ มีราคาถูก และเป็นวิธีที่ไม่ทำให้เสียสภาพในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ทั้งเซลล์ โดยวิธีการตรึงเซลล์นั้นจะ ผสมเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำเป็นสารละลายเข้ากับโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาหยดลง ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะทำให้เกิดเป็นเม็ดเจล เม็ดเจลที่ได้จะมีความแข็งแรง และ ด้านทานการแพร่ของสารปริมาณมาก ๆ ได้

วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบระบบของการอยู่ร่วมกัน ของเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด ในรูป ของเซลล์อิสระและในรูปของเซลล์ตรึงรูปของเชื้อทั้งสองเพื่อการผลิตเอทานอลจากแป้งมัน สำปะหลัง
2. เพื่อศึกษาปริมาณของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมกับระบบเพื่อการผลิตเอทานอล
3. เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนทั้งในรูปไนโตรเจนอินทรีย์ และไนโตรเจน อนินทรีย์ที่เหมาะสมกับระบบเพื่อการผลิตเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอบเขตของปัญหาพิเศษ

1. หาเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม ที่มีความสามารถสูงในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำตาล และเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความ สามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ 2 ชนิดเพื่อผลิตเอทานอล จากแป้ง โดยการเปรียบเทียบในระบบการตรึงเซลล์ร่วมและระบบเซลล์อิสระ
3. ศึกษาอิทธิพลของปริมาณแป้งซึ่งเป็นวัตถุดิบเริ่มต้น ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลที่ 1 % และ 2 %
4. ศึกษาอิทธิพลของปริมาณและชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ทั้งไนโตรเจน อนินทรีย์และไนโตรเจนอินทรีย์ ที่เหมาะสมกับระบบการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ 2 ชนิดที่ถูก คัดเลือกมาตรึงเซลล์ร่วมเพื่อผลิตเอทานอลจากแป้ง ดังนี้

แอมโมเนียมไนเตรด [NH_4NO_3]	(1 % และ 0.5 %)
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]	(1 % และ 0.5 %)
แอมโมเนียมซีเตรต [$(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_7$]	(1 % และ 0.5 %)
Peptone	(1 % และ 0.5 %)
Yeast extract	(1 % และ 0.5 %)
Tryptone	(1 % และ 0.5 %)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการพิเศษ

1. เนื่องจากแป้งเป็นวัตถุดิบที่หาง่าย มีราคาถูก และมีมากในท้องถิ่น มีเพียงพต่อความต้องการตลอดเวลา ดังนั้นแป้งจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลทดแทนการใช้น้ำตาลซึ่งมีราคาแพงกว่ามาก
2. สามารถเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลให้ได้ปริมาณผลผลิตสูงกว่าแบบเก่าที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน (แบบเซลล์อิสระโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์) และสามารถเป็นแนวทางในการลดต้นทุนในการผลิต
3. เซลล์ตรึงรูปสามารถนำกลับมาใช้ได้ใหม่ เพราะเซลล์ตรึงรูปจะยังคงรักษาความสามารถในการผลิตเอทานอลได้เกือบ 10 ครั้ง ของการหมัก

บทที่ 2

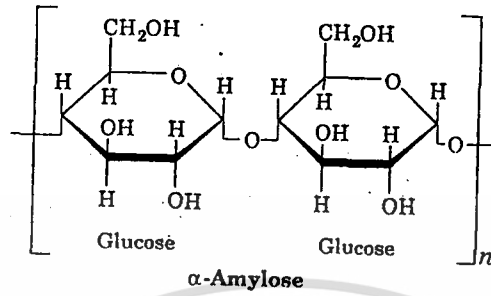
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

แป้ง (Starch)

แป้งเป็นสารที่ถูกเก็บสะสมอยู่ภายในเซลล์รากพืชและในเมล็ด ในลักษณะที่เป็นอนุภาคที่ไม่ละลายน้ำเรียกว่า แกรนูล (granule) แกรนูลของแป้งจะอยู่ในโครงสร้างเล็กๆ เรียกว่าพลาสติก ซึ่งล่องลอยอยู่ในส่วนของไซโทพลาสซึม โดยแป้งจะถูกเก็บสะสมอยู่ในลักษณะเช่นนี้อยู่เป็นเวลานาน แป้งเป็นสารจำพวบน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ เป็นพอลิเมอร์ของ α -D-glucose ซึ่งสามารถถูกนำไปใช้ได้โดยร่างกายของมนุษย์ และถือเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในยามที่มีการอดอาหาร มากกว่าครึ่งหนึ่งของผลผลิตแป้ง จะถูกนำไปผลิตน้ำเชื่อมเข้มข้น (syrup) และน้ำตาล และถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารต่าง ๆ (Mann et al., 1994)

อะไมโลส (Amylose)

ในโมเลกุลของอะไมโลส α -D-glucose โมเลกุลในไพแรนโนส (pyranose) (ซึ่งประกอบไปด้วยโมเลกุลของ α -D-glucose 6 โมเลกุล) โดยโมเลกุลของกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะที่ หมู่อัลดีไฮด์ (aldehyde group) ของคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 และหมู่ไฮดรอกซี (hydroxy group) ของคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 ซึ่งเป็นการเชื่อมต่อกันของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลาย ๆ หน่วยเข้าด้วยกัน โดยโครงสร้างและรูปร่างโมเลกุลของอะไมโลสแสดงดังรูปที่ 1 โมเลกุลของอะไมโลสจะมีขนาดไม่เท่ากันทุกโมเลกุลเพราะประกอบไปด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันนับเป็นพัน ๆ โมเลกุล ซึ่งขนาดโมเลกุลของอะไมโลสโดยปกติที่ได้มาจากพืชส่วนที่เป็นหัวและรากจะมีขนาดโมเลกุลที่ยาวกว่าและมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าโมเลกุลของอะไมโลสที่ได้มาจากเมล็ดธัญพืช ถึงแม้ว่าส่วนใหญ่โมเลกุลของอะไมโลสจะเป็นเส้นตรงแต่จะมีบางโมเลกุลที่แตกกิ่งก้านออกไปบ้าง โดยเราจะพบกิ่งก้านนี้ทุก ๆ 100 - 1000 โมเลกุลของกลูโคสที่มาเชื่อมต่อกันเป็นสายอะไมโลส กลูโคสซึ่งอยู่ในรูปสารละลายจะฟอร์มตัวในลักษณะที่เป็นโครงสร้างซึ่งมีลักษณะคล้ายสปริงยืดหยุ่นได้ ขดเป็นเกลียวลักษณะคล้ายตัวหนอน (รูปที่ 1) เมื่อโมเลกุลเหล่านี้เข้าร่วมตัวกับสารไอโอไดนหรือสารที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกัน ไอโอไดนจะเข้าไปเกาะอยู่ใจกลางของเกลียวสปริงทำให้เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะแข็งและมีรูปร่างเป็นแท่ง (Deman , 1980)



รูปที่ 1 แสดงโมเลกุลของอะไมโลส (α -amylose) ซึ่งประกอบด้วย α -D-glucose เป็นพื่น ๆ โมเลกุลมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1 \rightarrow 4) รูปร่างโมเลกุลจะเป็นลักษณะเกลียววนซ้าย (Collins , 1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะไมโลเพคติน (Amylopectin)

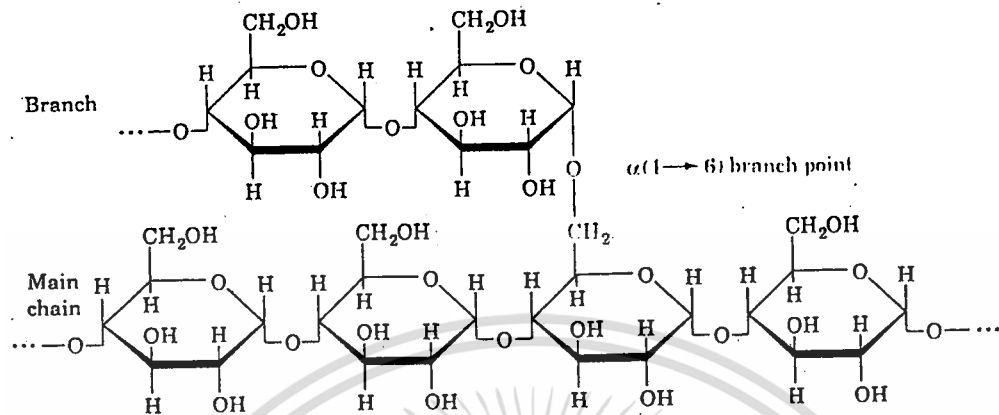
อะไมโลเพคตินจะประกอบด้วยสายสั้น ๆ ของหน่วย α -D-glucose ซึ่งมาเชื่อมต่อกันที่บริเวณ คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 และ 4 ใ้ค้อออกมาเป็นโครงสร้างโมเลกุลที่มีลักษณะเป็นสายยาวและแตกออกไปเป็นกิ่งก้านสาขามากมาย ณ จุดที่เป็นคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 และ 6 โดยกิ่งก้านเหล่านี้จะมีลักษณะการฟอร์มตัวที่ไม่เป็นระเบียบ ไม่มีลำดับ มีลักษณะคล้ายต้นไม้ โครงสร้างโมเลกุลของอะไมโลเพคตินแสดงดังรูปที่ 2 ความยาวของหน่วยย่อยนี้จะมีขนาดความยาวต่าง ๆ กัน กิ่งหลักของโมเลกุลเรียกว่า B - chain ซึ่งมีสายยาวกว่ากิ่งรองซึ่งเรียกว่า A - chain โดยจะมีหมู่รีดิวซ์ หรือหมู่อัลดีไฮด์ เพียง 1 หมู่เท่านั้นที่เป็นอิสระอยู่ในโมเลกุลของอะไมโลเพคติน หมู่อัลดีไฮด์อื่น ๆ จะถูกเชื่อมตอเข้าด้วยกันหมด โมเลกุลของอะไมโลเพคตินจะใหญ่กว่าอะไมโลส แต่รูปร่างจะระเกะระกะ และอัดตัวกันแน่นมากกว่า น้ำหนักโมเลกุลของอะไมโลเพคตินจะมีช่วงตั้งแต่ประมาณ 65 ล้าน ถึงประมาณ 500 ล้าน ซึ่งค่าน้ำหนักโมเลกุลที่มากดังกล่าวนี้ทำให้อะไมโลเพคตินจัดเป็นพอลิเมอร์ตามธรรมชาติที่มีขนาดใหญ่ที่สุดชนิดหนึ่ง (Deman, 1980)

แกรนูลของแป้ง (Starch granule)

ลักษณะทางกายภาพของแป้งจะมีลักษณะเป็นแกรนูลเช่นเดียวกับลักษณะโครงสร้างทางเคมีของแป้งซึ่งจะมีผลต่อลักษณะการใช้ประโยชน์จากแป้งในอุตสาหกรรมอาหาร แกรนูลของแป้ง สามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โมเลกุลของแป้งซึ่งมาจากพืชต่างชนิดกันจะมีลักษณะรูปร่างและขนาดต่าง ๆ กัน ลักษณะและโครงสร้างของแกรนูลของแป้งแสดงดังรูปที่ 3 และ 4

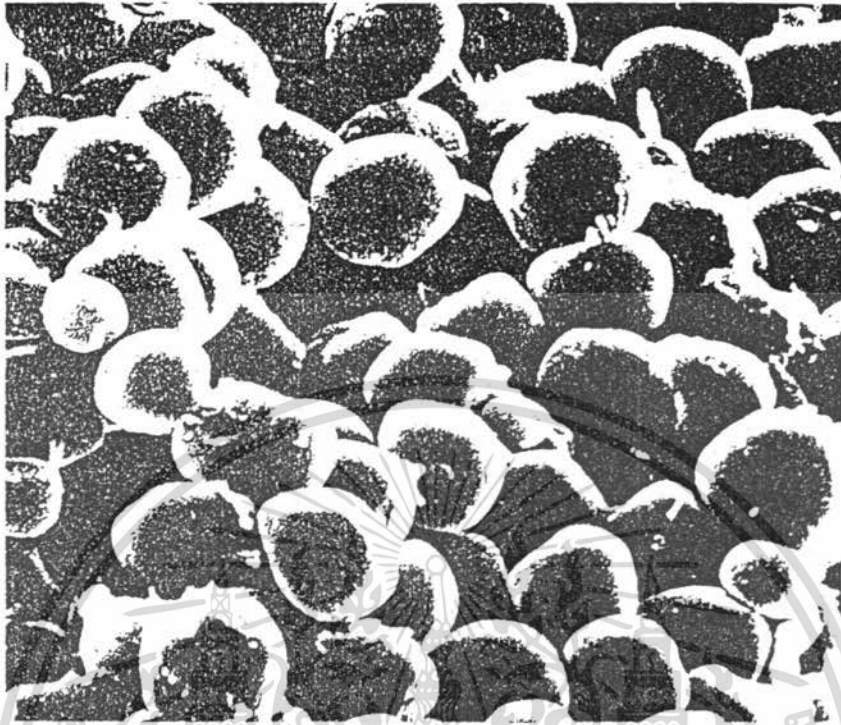
อะไมโลสและอะไมโลเพคติน ในโครงสร้างของแป้งจะอยู่ในลักษณะที่เป็นสารกึ่งผลึก (semi - crystalline material) อยู่ในแกรนูลของแป้ง ซึ่งลักษณะรูปแบบที่เป็นผลึก (crystalline pattern) ของแกรนูลของแป้งนี้จะสามารถมองเห็นได้จากเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (X-ray diffraction technique) โดยพบว่าลักษณะโมเลกุลของแป้งที่ได้จากธัญพืช จากส่วนของราก และจากพืชตระกูลถั่ว จะแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด

ทั้งอะไมโลสและอะไมโลเพคตินจะพบเป็นส่วนใหญ่ในแป้งจากพืช (plant starch) โดยเราจะพบอะไมโลสประมาณ 17 - 32 % ในแป้งทั้งหมด โดยทั่วไปแป้งมันสำปะหลังจะมีระดับอะไมโลสต่ำที่สุด (17%) แป้งจากมันฝรั่งจะมีอะไมโลส 20 - 23 % แป้งจากข้าวสาลีมีอะไมโลสประมาณ 25 - 26 % แป้งจากข้าวโพดมีอะไมโลสประมาณ 24 - 28 %



รูปที่ 2 แสดงโมเลกุลของอะไมโลเพกติน โดยที่จุดแตกกิ่งจะเป็นจุดที่เชื่อมต่อกับพันธะ α -(1 \rightarrow 6) (จุดสี่เหลี่ยม) รูปร่างโมเลกุลจะเป็นลักษณะเหมือนกิ่งไม้ ระยะห่างระหว่างจุดแตกกิ่งเฉลี่ย 24 - 30 หน่วยกลูโคส (Collins, 1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิฉะนั้นผู้ใดเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของเกรนูลของแป้ง (Bonner et al. , 1965)



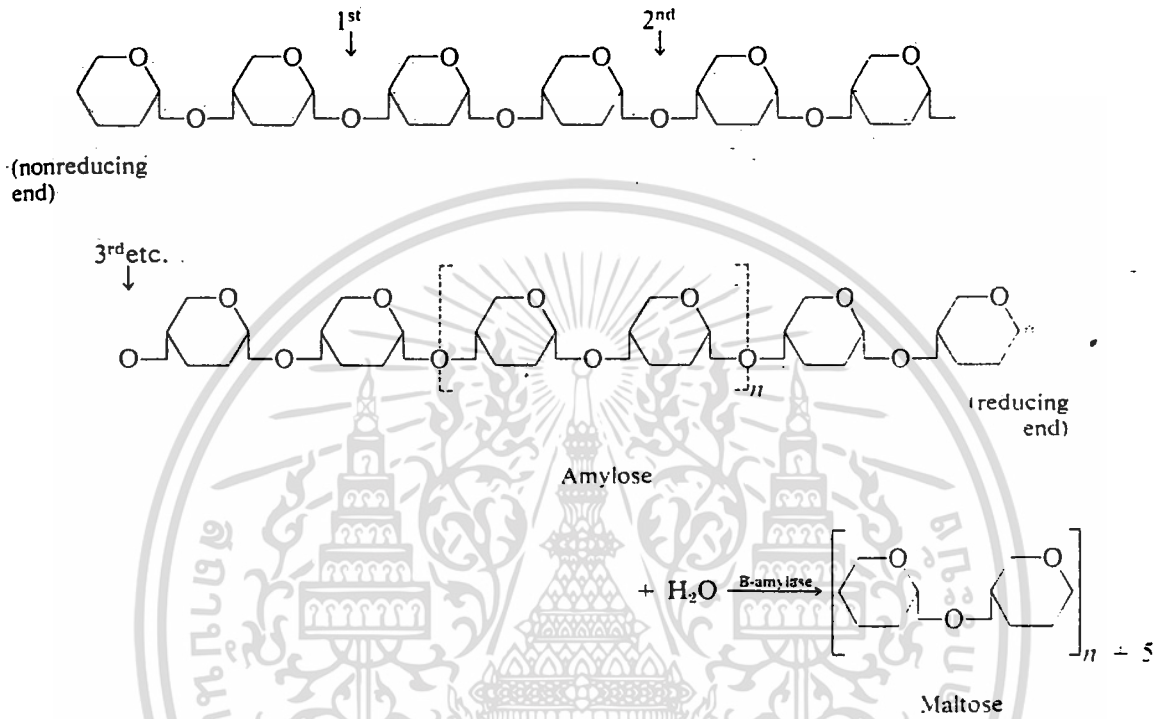
รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างโมเลกุลในชั้นของเกรนูลของแป้ง (Bonner et al. , 1965)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะไมโลเพคตินจะปรากฏในองค์ประกอบของพืชชนิดนั้น ๆ ในปริมาณเท่าไร นั้น จะขึ้นอยู่กับกิจกรรมของเอนไซม์ในการสังเคราะห์แป้งของพืช ซึ่งจะถูควบคุมโดยรหัส ทางพันธุกรรมของพืชนั้น ๆ ลักษณะที่เป็น waxy ของพืชหลาย ๆ ชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าว และ ข้าวฟ่าง จะผลิตเฉพาะอะไมโลเพคติน ทำให้แป้งซึ่งได้จากพืชเหล่านี้มีลักษณะไม่ เป็นเจล (nongelling) อันเนื่องมาจากการขาดอะไมโลส และทำให้ยังคงมีความเสถียรเมื่อนำ ไปแช่แข็งและเมื่อนำไปละลายน้ำแข็ง แป้งจากพืชเหล่านี้จึงถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางใน อุตสาหกรรมอาหาร ในพืชหลายชนิดที่ถูกปรับปรุงพันธุ์จะมีปริมาณอะไมโลสในแป้งสูงมาก ตัวอย่างเช่น ในข้าวโพดสายพันธุ์หนึ่งเรียกว่า amylo maize จะมีอะไมโลส 70% แป้งที่มี อะไมโลสสูง (high amylose starch) จะถูกนำไปใช้ในการผลิตฟิล์ม เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับ สารอื่น ๆ และถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น หมากฝรั่ง ขนมขบเคี้ยว นำไปใช้ในการ เพิ่มเนื้อสัมผัส ในซอสมะเขือเทศและในซอสแอปเปิ้ล นำไปใช้ในอุตสาหกรรมเนื้อแปรรูป (Nakanishi et al. , 1983)

การย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์

ธรรมชาติของแอมิลูของแป้งจะไม่ถูกย่อยสลาย หรือถูกตัดทอนโมเลกุลด้วย เอนไซม์ แอมิลูของแป้งจะถูกทำลายในขั้นตอนการบดแป้ง แต่อย่างไรก็ตาม แป้งสามารถถูก ทำให้แตกตัวได้โดยเอนไซม์ที่ใช้อย่างสลายแป้ง ซึ่งบทบาทของเอนไซม์ที่ใช้อย่างสลายแป้งนี้จะมี ความสำคัญอยู่ในอุตสาหกรรมขนมอบ และไซรัปจากข้าวโพด (corn syrup) เอนไซม์ หลาย ๆ ชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายโมเลกุลของอะไมเลสและอะไมโลเพคติน โดย เอนไซม์เหล่านี้ จะเข้าทำปฏิกิริยาที่บริเวณ non - reducing end ในสายตรงของโมเลกุล อะไมโลส หรือที่บริเวณกิ่งก้านของโมเลกุลอะไมโลเพคติน โดยจะย่อยสลายอะไมโลสได้ เป็น มอลโทสและกลูโคส โดยเรียกเอนไซม์เหล่านี้ว่า β - amylase , phosphorylase, glucoamylase ซึ่งเป็น exo - enzyme ซึ่งเข้าแตกสลายโมเลกุลแป้ง โดย β - amylase จะแตก โมเลกุลของแป้งได้ออกมาเป็นกลูโคสครั้งละ 2 ยูนิต (มอลโทส 1 โมเลกุล) แสดงคังรูปที่ 5 phosphorylase จะย่อยสลายแป้งออกมามีเป็นกลูโคส 1 โมเลกุล และสร้าง glucose - 1 - phosphate ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะไม่สามารถย่อยสลายจุดที่เป็นกิ่งก้านของโมเลกุล อะไมโลเพคติน โดยกิ่งก้านของอะไมโลเพคตินจะถูกย่อยสลายเป็นเด็กซ์ทริน (dextrin) glucoamylase จะแตกโมเลกุลเด็กซ์ทรินออกมามีเป็นกลูโคสทีละ 1 โมเลกุล และสามารถย่อย สลายพันธะ 1,6-linkage ณ ตำแหน่งที่เป็นจุดแยกของกิ่งก้าน ด้วยเหตุนี้เอนไซม์ชนิดนี้จึง สามารถเปลี่ยนอะไมโลเพคตินไปเป็นกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ α -amylase นั้นเป็น endo-enzyme ซึ่งสามารถเข้าทำปฏิกิริยา ที่ส่วนอื่น ๆ ของกิ่งก้านของอะไมโลเพคติน รูปที่ 6 เป็น บริเวณที่เอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลสเข้าทำปฏิกิริยาบนโมเลกุลของแป้ง



รูปที่ 5 แสดงจุดที่เอนไซม์อะไมเลส (β -amylase) เข้าทำปฏิกิริยาในการไฮโดรไลซ์อะไมโลสซึ่งแสดงโดยลูกศรชี้ (Kretchmer et al. , 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 บริเวณของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์อะไมเลสบนโมเลกุลแป้ง α = แอลฟาอะไมเลส , β = เบตาอะไมเลส , G = กลูโคอะไมเลส , D = แอลฟา - 1,6 - อะไมโลกลูโคซิเดส หรือ เด็กซ์ทรินเนส (Suckling 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำงานของ α -amylase ในการย่อยสลายแป้งนั้น จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของเด็กซทรินขึ้นอย่างรวดเร็ว นั่นคือเอนไซม์ชนิดนี้จะไปแตกโมเลกุลของแป้งออกเป็นโมเลกุลย่อยขนาดใหญ่ ขณะเดียวกันก็เป็นการสร้างน้ำตาลโมเลกุลเล็กขึ้นมาปริมาณหนึ่ง ด้วยเหตุนี้ α -amylase จะเป็นตัวการที่ทำให้เกิดการแตกโมเลกุลของเด็กซทรินไปเป็นกลูโคส และมอลโทส (Kretchmer , 1991)

คุณสมบัติของแป้ง

1. ลักษณะที่ปรากฏและความสามารถในการละลาย แป้งมีลักษณะเป็นผงสีขาว ไม่เป็นผลึก ไม่สามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิห้อง
2. ความหวาน แป้งและน้ำตาลโมเลกุลใหญ่นั้น ไม่เหมือนกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ คือแป้งไม่มีความหวาน
3. การย่อยสลาย การย่อยสลายแป้งสามารถทำได้โดยใช้กรดหรือจากปฏิกิริยาการย่อยสลายของเอนไซม์ ถ้าเราให้ความร้อนกับแป้ง แล้วเติมกรดลงไป แป้งจะถูกทอนโมเลกุลออกเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ และผลผลิตสุดท้ายจะได้กลูโคส ส่วนในปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้น โมเลกุลขนาดใหญ่ของแป้งจะถูกแตกออกเป็นสายกลูโคสสายสั้น ๆ เรียกว่าเด็กซทริน เด็กซทรินจะถูกแตกออกเป็นมอลโทส (กลูโคสต่อกัน 2 โมเลกุล) และในที่สุดมอลโทสจะถูกแตกออกไปเป็นกลูโคส (Bonner et al. , 1965)

เอทานอล

เอทานอลมีสูตรทางเคมีคือ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ซึ่งเป็น Primary alcohol มีคุณสมบัติต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

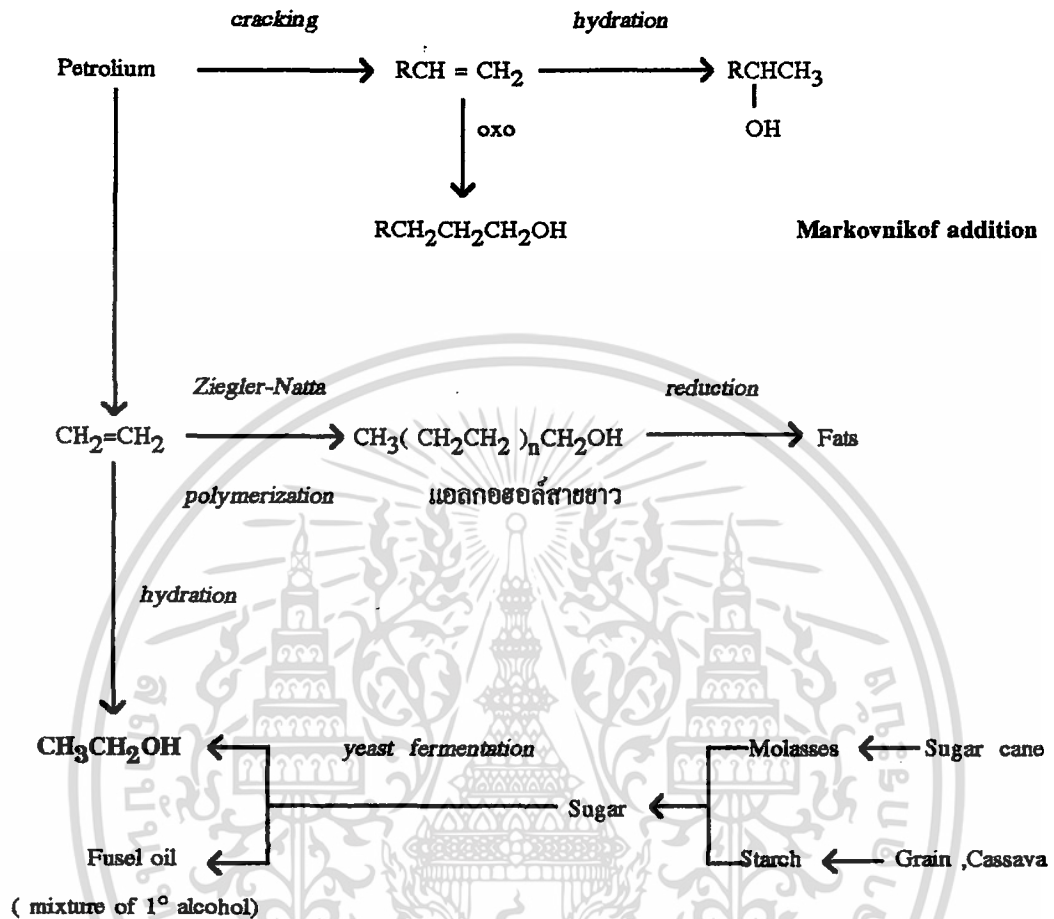
1. จุดหลอมเหลว -115 องศาเซลเซียส
2. จุดเดือด 78.3 องศาเซลเซียส
3. ความหนาแน่นสัมพัทธ์ (20 องศาเซลเซียส) = 0.789
4. ค่าการกระจาย (กรัม / 100 กรัมของน้ำ) = ∞

การผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมสามารถทำได้ 3 ทางคือ

1. การ ไฮเดรชันสารพวกอัลคีนซึ่งได้จากการเกิด cracking ของปิโตรเลียม
2. ด้วยกระบวนการออกซิเดชันจากอัลคีน คาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน
3. การหมักของคาร์โบไฮเดรต

ซึ่งแผนภาพการผลิตเอทานอลโดยทั่วไปในระดับอุตสาหกรรมแสดงดังรูปที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 แผนภาพแสดงการผลิตเอทานอลโดยทั่วไปที่ใช้ในอุตสาหกรรม (Arora และคณะ , 1991)

การใช้ประโยชน์จากเอทานอล

1. ใช้เป็นเครื่องคั้นแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ
2. ใช้เป็นตัวทำละลายต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมการทำแลคเกอร์ น้ำมันวานิช สี น้ำหอม และสารปรุงแต่งต่าง ๆ
3. ใช้เป็นตัวกลางในปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ
4. ใช้เป็นเชื้อเพลิง

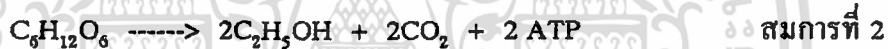
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรม

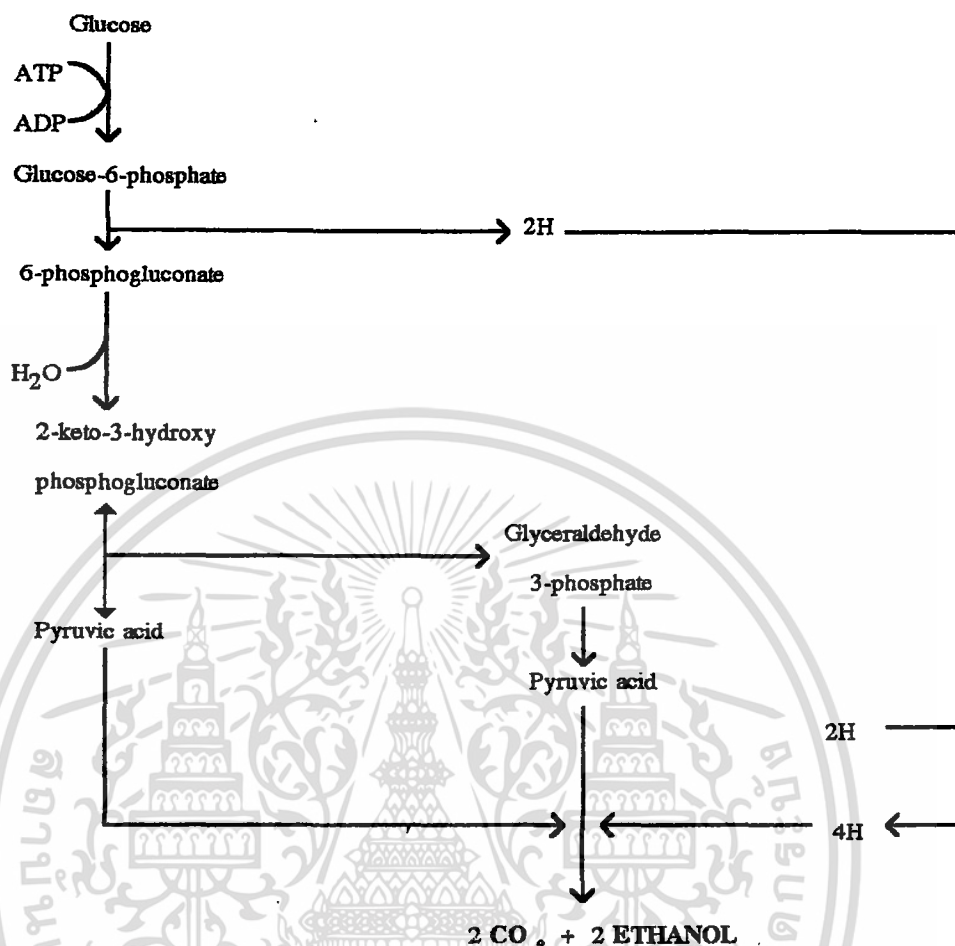
การผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่นั้นจะเป็นการใช้ยีสต์เพื่อการผลิต โดยกลไกของการผลิตเอทานอลนั้นพบว่าในสภาพที่มีออกซิเจนยีสต์จะใช้กลูโคสเพื่อสร้างพลังงาน ผลผลิตที่ได้จะเป็น น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานซึ่งอยู่ในรูป ATP เรียกกระบวนการนี้ว่า การหายใจ (Respiration) ดังสมการที่ 1



ส่วนในสภาพที่ไร้ออกซิเจนยีสต์จะเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นเอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานในรูป ATP แต่จำนวน ATP ที่ได้จะน้อยกว่าการหายใจมาก เพราะพลังงานส่วนใหญ่เก็บอยู่ในโมเลกุลของเอทานอลซึ่งยีสต์ไม่สามารถนำพลังงานในส่วนนี้ไปใช้ได้ ปรากฏการณ์นี้คือ "การหมักเอทานอล" (Ethanol fermentation) ดังแสดงในสมการที่ 2



จากสมการเคมีที่แสดงการหายใจและการหมักเอทานอลข้างต้นนี้เป็นเพียงการสรุปผลที่ได้มา จากกระบวนการทั้งสองแต่ในความเป็นจริงแล้ว ก่อนที่จะได้ผลผลิตเหล่านี้จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนอันประกอบด้วยปฏิกิริยาต่าง ๆ หลายปฏิกิริยา ซึ่งเรียกว่า วิถีของปฏิกิริยา (Pathway) วิถีของปฏิกิริยาการหมักเอทานอลในยีสต์ (Embden - Meyerhof Parnas Pathway) แสดงดังรูปที่ 8 (Rawn , 1989)



รูปที่ 8 แผนภาพแสดงวิถี Embden - Meyerhof Paros Pathway (Rawn , 1989)

จากสมการแสดงปฏิกิริยาการหมักเอทานอลนั้น กลูโคส 1 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล 2 โมเลกุล และเมื่อคิดในแง่ของน้ำหนักแล้ว กลูโคส 1 กรัม จะให้เอทานอล 0.511 กรัม ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดในทางทฤษฎี แต่ในการหมักโดยทั่วไปพบว่าจะไม่ได้ปริมาณผลผลิตสูงเท่าที่กล่าว เนื่องจากเกิดการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อื่นนอกเหนือจากเอทานอล เช่น กลีเซอรอล (glycerol) ซัคซิเนต (succinate) และ ฟิวเซลอยล์ (fusel oil) เป็นต้น นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการใช้กลูโคสในการสร้างเซลล์ใหม่และการสร้างพลังงานเพื่อการดำรงชีวิตของเซลล์อีกด้วย โดยทั่วไปยีสต์จะสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด เช่น กลูโคส (glucose) ฟรุคโตส (fructose) กาแลคโตส (galactose) และ แมนโนส (mannose) เป็นต้น ซึ่งเป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวจำพวกเฮกโซส และยังใช้น้ำ

ตาลเชิงซ้อนบางชนิดได้ เช่น ซูโครส (sucrose) และ แรฟฟิโนส (raffinose) แต่ยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนใหญ่ จะไม่ใช้น้ำตาลพวกเพนโตส (pentose) เช่น ไซโลส (xylose) ยกเว้นยีสต์เพียงไม่กี่ชนิดคือ *Candida utilis* และ *Pachysolen tanrophilus* สำหรับแป้งและเซลลูโลส นั้น ยีสต์ไม่สามารถใช้ได้โดยตรง เนื่องจากยีสต์ไม่มีเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสารประกอบโมเลกุลใหญ่เหล่านี้ได้ ดังนั้นในการหมักเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบประเภทแป้งและเซลลูโลส จะต้องมีการย่อยสารประกอบเหล่านี้ให้เป็นน้ำตาลเสียก่อน จากนั้นจึงให้ยีสต์ทำการหมักได้

การเลือกชนิดของยีสต์ที่ใช้เพื่อการผลิตเอทานอล มักขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้หมัก เช่น เอทานอลที่หมักจากแป้งและน้ำตาล นิยมใช้ *Saccharomyces cerevisiae* รองลงมาคือ *S. elipsoideus* ถ้าเป็นวัตถุดิบจำพวกหางนม (whey) ที่แยกโปรตีนออกแล้วจะใช้ *Candida pseudotropicalis* และถ้าใช้น้ำเสียจากโรงงานกระดาษ (sulfite - waste liquor) ก็มักจะใช้ *Candida utilis* ในการหมักเป็นต้น (Frazier et al. , 1988)

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล

1. ความเข้มข้นของน้ำตาล

กรณีที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกินขีดจำกัดคือประมาณร้อยละ 22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะเกิดการรบกวนของสารตั้งต้นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ทำให้การเจริญเติบโตของยีสต์เป็นไปได้ยากซึ่งการหมักจะเป็นไปอย่างเชื่องช้าและไม่สมบูรณ์ทำให้เกิดกรดแลคติก กรดน้ำส้ม และสารอินทรีย์ต่าง ๆ ขึ้นได้ซึ่งส่วนมากจะเกิดในบรรยากาศของออกซิเจน แต่บางที่สามารถเกิดในบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ได้ โดยปกติแล้วในกระบวนการหมักจะใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลร้อยละ 18 โดยปริมาตร เพื่อให้การเจริญเติบโตของยีสต์เป็นไปได้โดยปกติและให้เอทานอลในปริมาณสูงเหมาะแก่การนำไปกลั่น คือประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร

2. ความเข้มข้นของเอทานอล

เอทานอลยังมีความเข้มข้นมากก็ยังมีผลทำให้การหมักช้าลงและเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลสูงเกินขีดจำกัด หรือมีความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่าร้อยละ 15 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ซึ่งขีดจำกัดอาจสูงหรือต่ำกว่านี้ ขึ้นกับชนิดของยีสต์ แต่เท่าที่พบจะสูงไม่เกินร้อยละ 18 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ซึ่งปริมาณของเอทานอลที่สูงกว่าขีดจำกัดนี้จะขัดขวางและหยุดการทำงานของยีสต์

3. คาร์บอนไดออกไซด์และความดัน

คาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากปฏิกิริยาในการใช้น้ำตาลของยีสต์ จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ด้วย ถ้าไม่มีการระบายคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากกระบวนการหมักก็จะเกิดการเพิ่มความดันของคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งถ้าความดันสูงถึง 7.5 บรรยากาศ จะทำให้

อัตราเร็วของการหมักลดลงจนกระทั่งความดันสูงถึง 8.0 บรรยากาศ อัตราเร็วของการหมักจะช้ามากหรือเกือบจะไม่เกิดเลย

4. ออกซิเจน

ออกซิเจนจะถูกใช้ในการเจริญเติบโตและการแตกหน่อในกระบวนการหายใจ เพื่อทำให้เกิดพลังงาน ในการดำเนินชีวิตซึ่งการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของยีสต์ในที่ที่มีออกซิเจนจะไม่ให้เอทานอลออกมา แต่จะมีเพียงคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเกิดขึ้นเท่านั้น

5. กรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติก

กรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติกจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ โดยความเข้มข้นที่มีผลต่อการเจริญ คือร้อยละ 0.1 - 0.5 ถ้ากรดโพธิ์อินิกและกรดบิวทีริกเกิดขึ้นด้วย ก็จะมีผลเช่นเดียวกับกรดน้ำส้ม

6. ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน

ความเป็นกรดจะกีดขวางการเจริญของแบคทีเรียและราบางชนิด แต่ยีสต์จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีระหว่าง pH 3 - 5 ซึ่งจะมีผลทำให้อัตราการเจริญของยีสต์และอัตราการหมักเพิ่มมากขึ้น

7. สารเร่งการเจริญเติบโต

นอกจากน้ำตาลแล้วยีสต์ยังต้องการสารประกอบอื่น ๆ เพื่อการเจริญเติบโต สารเหล่านี้ ได้แก่ วิตามินบีรวม เช่น ไบโอติน ไทอามีน ไรโบฟลาวิน กรดนิโคตินิก และกรดแพนทานิก นอกจากนี้ไทอามีน ในรูปของไทอามีนฟอสเฟต ยังเป็นโคแฟกเตอร์ในการเปลี่ยนกรดไพริววิกให้กลายเป็นเอทานอลอีกด้วย

8. โลหะ

ในพวกธาตุพืชต่าง ๆ เช่น ข้าว จะมีพวกธาตุต่าง ๆ เช่น แคลเซียม ทองแดง เหล็ก แมกนีเซียม และ แมงกานีส ซึ่งเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์และในกระบวนการหมักเอทานอลจากกลูโคส ถ้าปริมาณของโลหะมากเกินไป จะกลายเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ สารประกอบพวกซัลเฟอร์ จะทำให้เซลล์ยีสต์แก่เร็ว ส่วนพวกเหล็ก อลูมิเนียม ตะกั่ว สังกะสี ไม่ค่อยมีผลมากนักต่อปฏิบัติการหมัก แต่ถ้าเป็นพวกแคลเซียม ทองแดง พรอท แพลเลเดียม ออสเมียม และ เงิน จะเป็นสารหน่วงการเจริญเติบโตของยีสต์อย่างแรง

9. อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการทำงานของยีสต์ และมีผลทางอ้อมต่อปริมาณเอทานอลและสารประกอบอะโรมาติกต่าง ๆ อุณหภูมิส่วนใหญ่ที่ใช้ในการหมักจะอยู่ประมาณ 10 - 30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วงนี้ จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ เพิ่มมาก

ขึ้นเป็น 2 เท่า ถ้าอุณหภูมิสูงมาก ๆ จะทำให้เอนไซม์ในยีสต์เกิดสภาพอ่อนไหวต่อปฏิกิริยาลดลงในระหว่างอุณหภูมิ 55 - 65 องศาเซลเซียส ยีสต์อาจตายได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ที่นำมาใช้ในการหมัก ถ้าอุณหภูมิในการหมักต่างกัน จะทำให้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นแตกต่างกันได้ เช่น ที่อุณหภูมิในการหมักต่ำ ๆ จะเกิดพวกเอสเทอร์ อะซีตัลดีไฮด์ ไอโซเอมิล และ เอคทิฟเอมิลอัลกอฮอล์ ในปริมาณที่น้อย (Kosaric et al. , 1983)

การตรึง (Immobilization)

วิธีการตรึงจุลินทรีย์ สำหรับการหมักเอทานอล อาจแบ่งเป็น 3 ลักษณะ คือ

1. วิธีให้ยึดติดกับพาหะ (Carrier - biding method) วิธีนี้เชื้อจุลินทรีย์จะถูกยึดไว้กับพาหะที่ไม่ละลายน้ำ ปัญหาหลักของวิธียึดเกาะทางกายภาพ (physical biding) และแบบไอออนิก (ionic - biding) ก็คือเซลล์แตกและฉีกขาด การยึดแบบโควาเลนต์ (covalent - biding) เป็นวิธีที่มีเสถียรภาพแต่สภาพแวดล้อมที่ใช้อย่างมากจะมีผลกระทบต่อกิจกรรมการเร่งทางชีวภาพและจะเกิดการบดของถังปฏิกรณ์ เนื่องจากข้อเสียเหล่านี้วิธียึดเกาะกับพาหะจึงเป็นวิธีที่ไม่แพร่หลาย

2. วิธีการเชื่อมโยงกันแบบไขว้ (crosslinking) วิธีนี้จุลินทรีย์จะถูกเชื่อมกันโดยสารที่มีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่หรือมากกว่า ทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีแบบต่าง ๆ เช่น การเกิด Schiff ' base (กลูตาแรลดีไฮด์) การเกิด พันธะเปปไทด์ (อนุพันธ์ของไอโซไซยานต) หรือเกิด diazo-coupling (N,N - เอทีลีนบิสมาเลอิมิด , บิส ไอเอโซเบนซิดีน) ส่วนหมู่ฟังก์ชันของจุลินทรีย์จะเข้าไปมีส่วนร่วมในปฏิกิริยาการเชื่อมโยงแบบไขว้เหล่านี้รวมทั้งหมู่ α หรือ Σ - amino (ไลซีนเป็นต้น) หมู่ฟีนิล (ไทโรซีน) sulfhydryls (ซีสตีล) และ หมู่ imidazol (ฮิสตีล) สภาพการตรึงเหล่านี้จะมีผลกระทบต่อกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพเกิดปัญหาเรื่องการเอาใจใส่ด้านความปลอดภัยของอาหาร วิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่ค่อยมีผู้สนใจ

3. วิธีกักเซลล์ (Entrapment) การกักเซลล์จะใช้สารที่เป็นโพลีแซคคาไรด์จากธรรมชาติ ได้แก่ อัลจิเนต วุ้น K-คาราจีแนน โปรตีน คอลลาเจน เจลาติน หรือ ใช้พอลิเมอร์สังเคราะห์ (สารที่มี acrylamide หรือพอลิเมอร์ของ photocrosslinkable - resin หรือพรีพอลิเมอร์ของยูรีเทน) สารประกอบเหล่านี้โดยปกติจะละลายน้ำก่อนการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชัน เพราะเป็นเรื่องสำคัญที่ว่าสารที่ใช้จะต้องไม่มีผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยทางด้านอาหารของมนุษย์ วัสดุที่มีประโยชน์ใช้ได้ก็จะจำกัดแค่โพลีแซคคาไรด์และโปรตีน ถึงแม้ว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความแข็งแรงจะดีกว่าพอลิเมอร์สังเคราะห์ก็ตาม แคลเซียมอัลจิเนตและ K - คาราจีแนน เป็นวัสดุหลักที่ใช้ในการกักเซลล์ (Robinson , 1992)

คุณสมบัติของเซลล์และเอนไซม์ที่ถูกตรึง

การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเอนไซม์หรือเซลล์ที่ถูกตรึงเป็นสิ่งสำคัญ สำหรับการประยุกต์ใช้ มีประโยชน์ในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง โครงสร้าง หน้าที่ และกลไกการทำงานของเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงที่มักเกิดขึ้น ได้แก่

1. ความจำเพาะกับสับสเตรต เมื่อเอนไซม์หรือจุลินทรีย์ถูกตรึง จะมีผล ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลง นอกจากนี้ความจำเพาะกับสับสเตรตอาจทำให้ปริมาณผลผลิตเปลี่ยนไปเช่น สารอาหารที่มีมวลโมเลกุลสูงจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้อยกว่า

2. ความคงตัว การตรึงเป็นการเพิ่มความคงตัวให้กับเอนไซม์

3. pH ที่เหมาะสม บางกรณีอาจจะเปลี่ยนไป เพราะเกิดการเปลี่ยนแปลง electronement ในเอนไซม์ โปรตีน และ ประจุไฟฟ้าที่มีอยู่รอบพาหะ

4. อุณหภูมิที่เหมาะสม การตรึงทำให้เซลล์และเอนไซม์ทนทานต่อความร้อนมากขึ้น และในบางกรณี อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงจะสูงกว่าเอนไซม์อิสระ

5. ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ การเกิดปฏิกิริยาทางไฟฟ้าระหว่างเอนไซม์กับ สารอาหารได้รับผลกระทบจากการตรึงเซลล์และค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ จะเปลี่ยนแปลงไป ในบางกรณี (Moo - Young et. al., 1980)

หลักเกณฑ์สำหรับการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงและเซลล์ที่ถูกตรึง

องค์ประกอบที่ควรเอาใจใส่ ในกระบวนการตรึงได้แก่

1. ความปลอดภัย การตรึงเซลล์บางวิธีต้องใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อความปลอดภัยของผู้เกี่ยวข้องกับการตรึง ความปลอดภัยจึงควรได้รับการพิจารณาเป็นอันดับแรก

2. ความง่าย ความง่ายของการตรึงเป็นสิ่งสำคัญมาก เมื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผู้ไม่มีความชำนาญก็สามารถนำไปปฏิบัติได้ วิธีที่ง่ายและตรงไปตรงมาจะเป็นวิธีที่เชื่อถือได้มากที่สุด

3. ประสิทธิภาพ เอนไซม์หรือเซลล์ที่ถูกตรึงจะต้องมีประสิทธิภาพอย่างน้อยที่สุดเท่ากับวิธีที่ใช้ตามปกติ

ข้อได้เปรียบของการตรึง

1. สามารถใช้เอนไซม์หรือเซลล์จุลินทรีย์นั้นติดต่อกันหลายครั้ง
2. สามารถแยกผลผลิตออกมาได้ง่ายขึ้นเพราะไม่มีเอนไซม์หรือจุลินทรีย์ออกมาด้วย
3. ช่วยลดต้นทุนการผลิต
4. เอนไซม์มีความคงตัวมากขึ้น

ระบบการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต

เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต จะต้องมีความนุ่มนวลพอที่จะรักษาความมีชีวิตของเซลล์ไว้ได้ การตรึงเซลล์ที่มีประโยชน์ในกรณีดังต่อไปนี้

1. เมื่อเอนไซม์นั้นเป็นประเภทที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme)
2. เมื่อนำไปผ่านกระบวนการตรึงหรือหลังจากการตรึงแล้ว จะพบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จากจุลินทรีย์มักมีความคงตัว
3. จะใช้การตรึงเมื่อจุลินทรีย์ที่นำมาตรึงนั้น ไม่มีเอนไซม์รบกวน (interfering enzyme) หรือมีเอนไซม์รบกวนแต่ถูกทำให้หมดสภาพหรือกำจัดไปแล้ว
4. จะใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ เมื่อสารอาหารหรือผลผลิตมีมวลโมเลกุลไม่สูงมากนัก

หลักเกณฑ์การคัดเลือกเทคนิคการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต

1. ต้องแน่ใจว่ากรรมวิธีการตรึงจะนุ่มนวลพอที่จุลินทรีย์จะยังคงรักษาความสามารถในการเพิ่มจำนวนได้
2. ต้องสามารถทำให้จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนได้หลังจาก decultivation ไปจากการใช้งานเป็นเวลานาน ๆ
3. เทคนิคการตรึงเซลล์นั้นต้องให้ผลผลิตสูงและรักษาระดับนั้น ๆ ได้เป็นเวลานาน
4. เทคนิคการตรึงเซลล์ควรจะง่ายและค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก
5. ระบบควรจะคงตัวที่ pH และอุณหภูมิที่ใช้ในการดำเนินงาน

ประโยชน์ของระบบการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต

1. การใช้ระบบการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต จะช่วยลดขั้นตอนในการสกัดเอนไซม์และการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เป็นผลให้ลดต้นทุนในการผลิตได้
2. ระบบการตรึงเซลล์มีผลให้ความเข้มข้นของเซลล์ในถังหมักเพิ่มขึ้น ดังนั้น แอคติวิตีที่ได้รับควรจะเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ความคงตัวของเซลล์จะสูงสามารถให้อัตราการเจริญเพิ่มขึ้นได้ (ความเร็วในการให้สารอาหาร) โดยไม่ต้องกังวลเรื่องเซลล์จะหลุดออกมา
 4. สามารถนำมาใช้ในงานที่ต้องอาศัยปฏิกิริยาของมัลติเอนไซม์
 5. ผลจากการที่มีความหนาแน่นของเซลล์สูง และอัตราการเจริญสูงจะช่วยลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์
 6. ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการแยกเซลล์ออกจากผลผลิต
 7. ในการหมักแบบปกคิจะได้น้ำหมักที่มีความหนืดสูง เนื่องจากมีเซลล์อยู่ปริมาณมากเป็นเหตุให้การถ่ายโอนมวล และการถ่ายโอนความร้อนน้อยลง แต่ปัญหานี้จะลดลงในถังหมักที่ใช้เซลล์ที่ถูกตรึงเพราะมีเซลล์อิสระไม่มากนักในน้ำหมัก (Hiroshi et al., 1989)
- การตรึงเซลล์โดยแคลเซียมอัลจิเนต**

การตรึงเซลล์ โดยการกักเซลล์นั้นอาศัยหลักการให้เซลล์เข้าไปอยู่ในชั้นของพอลิเมอร์ที่แข็ง ซึ่งมีลักษณะที่สำคัญดังนี้

1. การผสมสารละลายของเซลล์และสารละลายพอลิเมอร์เข้าด้วยกัน
2. เม็ดเจลต้องมีลักษณะที่อ่อน ไม่มีส่วนที่เป็นพิษและเซลล์สามารถมีชีวิตอยู่ได้
3. เม็ดเจลจะต้องมีความคงตัวที่ดี
4. ขนาดของรูพรุนจะต้องมีขนาดใหญ่พอที่จะทำให้อาหารผ่านเข้าไป และผลผลิตออกมาได้และมีขนาดเล็กพอที่จะไม่ให้เซลล์หลุดออกไป
5. ราคาในการตรึงเซลล์จะต้องต่ำ

เทคนิคในการตรึงเซลล์มีหลายชนิด เช่น การใช้ แคลเซียมอัลจิเนต คาราจีแนน โพลีเอคริลเอไมด์ เจลาติน และ อีพอกไซค์ แมทริกซ์ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้แคลเซียมอัลจิเนต เป็นสารที่ใช้ยึดเซลล์ยีสต์และราจึงขอกกล่าวเฉพาะสารอัลจิเนต (Kroll et al. , 1993)

คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของอัลจิเนต

อัลจิเนต เป็นโพลีแซคคาไรด์พวก glycuronan ที่มีโครงสร้างเป็นร่างแห ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล ประกอบด้วยส่วนของกรด D - manmuronic (M) และกรด L - guluronic (G) จะเกิดลักษณะเป็นเจลเมื่อมีแคลเซียมอิออน มีลักษณะเป็น 3 มิติ และจะไม่เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีกับเซลล์ และเซลล์สามารถอยู่ภายในเม็ดเจลได้ มีรูโหว่รอบ ๆ เม็ดเจล ขนาดและจำนวนรูโหว่ขึ้นกับชนิดของอิออนที่ใช้ในการก่อรูปเป็นเจล และลักษณะตามธรรมชาติของอัลจิเนตที่ใช้ การตรึงทำได้โดยการหยคส่วนผสมของ โขเคียมอัลจิเนตกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์ประการใดไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์แขวนลอย ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ซึ่งสารที่ใช้มีราคาถูก ทำให้สามารถใช้ในปริมาณมากได้ คุณสมบัติในการแพร่ และขนาดจำนวนรูโหว่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินेट และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ถ้าความเข้มข้นสูง สารที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 5,000 จะสามารถซึมผ่านได้ ถ้าความเข้มข้นต่ำ จะทำให้สารที่มีมวลโมเลกุลสูงผ่านได้ ซึ่งขึ้นกับชนิดของอัลจินेटที่ใช้ด้วย คุณสมบัติทางกลศาสตร์ของแคลเซียมอัลจินेट คือ สามารถยึดหยุ่นได้เนื่องจากขนาดและรูปร่างที่เป็นทรงกลมและสามารถใช้ความดันต่ำในการบรรจุใส่คอลัมน์ได้ และพบว่า แบเรียม และ สทรอนเซียมอัลจินेट มีคุณสมบัติดีกว่าแคลเซียมอัลจินेटทั้งทางกายภาพและทางเคมี จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้สามารถตรึงยีสต์และราลงในเจลได้ และสามารถใช้ในการผลิตแบบต่อเนื่องได้ และการทดลองของ Hideo Tanaka และคณะ (1984) พบว่าการตรึงโดยแคลเซียมอัลจินेटใช้ได้เฉพาะสิ่งที่มีขนาดใหญ่เท่านั้น เช่น เซลล์จุลินทรีย์ เซลล์พืช เอนไซม์ สารที่สามารถเข้าไปอยู่ในเม็ดเจลได้ต้องมีมวลโมเลกุลไม่เกิน 2×10^4 และพบว่า รูปร่างโมเลกุลของอัลจินेटจะขึ้นกับชนิด อายุของสาหร่ายทะเลที่ใช้ในการสกัดและวิธีที่ใช้ในการสกัด

อัลจินेट เป็นพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ ประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ กรด D - mannuronic และ L - guluronic เชื่อมกันด้วยพันธะ 1,4 โกลโคไซด์ กลีโคโมโนวาเลนซ์ของอัลจินेटสามารถละลายน้ำได้ ในขณะที่โพลีวาเลนซ์ แคทไอออน เช่น Ca^{2+} จะทำให้เกิดการเชื่อมไขว้เกิดเจลที่ไม่ละลายน้ำ และไม่ไวต่อการทำปฏิกิริยาชีวเคมี ภายในเจลมีลักษณะเป็นรูพรุนแต่ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า จำนวน และขนาดของรูขึ้นอยู่กับชนิดของประจุบวก (เช่น Ca^{2+} , Al^{3+} ฯลฯ) ที่ใช้ในการสร้างเจล และชนิดของอัลจินेटที่ใช้ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของประจุบวก และสารละลายอัลจินेटด้วย ในการตรึงยีสต์และราด้วยแคลเซียมอัลจินेटนี้ ยีสต์และราซึ่งมีขนาดใหญ่กว่ารูของเจลจะถูกขังไว้ในเจล แต่น้ำตาลและเอทานอลจะสามารถผ่านเข้าออกได้เนื่องจากมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่ารูภายในเจลนี้มาก (Apiluktivongsa et al. , 1981)

อัลจินेटสามารถใช้เป็น สารเติมแต่งในอาหาร ตัวอย่างเช่น ใช้เป็นตัวทำให้ฟองคงตัวในเบียร์ ครีม และเนยแข็ง การตรึงจะทำได้ง่าย นุ่มนวล และปลอดภัย (Robinson , 1992)

การกระจายและความคงตัวของแคลเซียมอัลจินेट

ข้อเสียของการใช้แคลเซียมอัลจินेटเป็นวัตถุยึดเหนี่ยวก็คือ ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์จะมีตัวจับโลหะและแคทไอออนอยู่ เช่น ฟอสเฟต EDTA แมกนีเซียม อีออน โปแทสเซียมอีออน ทำให้สารเหล่านี้กระจายอยู่ภายในเจล ยีสต์จะใช้ฟอสเฟตโดยผ่านทางกลไก แอคทีฟทรานสปอร์ต ซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้างไขมันและคาร์โบไฮเดรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์ในการนำ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รักษาคุณสมบัติของผนังเซลล์และควบคุมการซึมผ่านของอาหารเข้าสู่เซลล์ ซึ่งฟอสเฟตเป็น สิ่งจำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวน แต่ลักษณะนี้จะทำให้เกิดการบวมของเม็ดเจล ซึ่งเป็นเหตุให้ พันธะระหว่างแคลเซียมอัลจินเตอและอัลจินเตอแตกออก มีผลทำให้สูญเสียความคงตัวของเจล และได้มีการแก้ปัญหาโดยพบว่าการเคลือบเจลด้วย cationic polymer เช่น โพลี เอทีลีนเอมีน จะทำให้เจลมีความคงตัวดีขึ้นถึงแม้จะมีฟอสเฟตอยู่ก็ตาม วิธีนี้ไม่ทำให้อัตรา การผลิตเอทานอลลดลงแต่ยังป้องกันการหายใจของเซลล์ที่ถูกตรึงอยู่ในเจล และได้มีการ เปลี่ยน covalent cross linking ของแคลเซียมอัลจินเตอ โดยใช้ กลูตาแรลดีไฮด์ หรือ pre - activate สารละลายอัลจินเตอด้วย periodate หรือ carbodimide ติดตามด้วยการใช้โพลีเอทีลีน เอมีน เชื้อยีสต์ที่ตรึงในสารนี้จะมีประสิทธิภาพคล้ายกับการเตรียมด้วยวิธีมาตรฐาน และมีการ ซึมผ่านที่ดี ซึ่งจะคงตัวในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (10 มิลลิโมลาร์ ของโซเดียมฟอสเฟต) อย่าง น้อย 10 วัน โดยที่เซลล์ไม่ออกมาออกเจล สารอื่นที่ใช้ในการปรับปรุงความคงตัวของกายภาพ และทางเคมีของแคลเซียมอัลจินเตอ คือ ใช้ ไควาเลนด์แคทไอออน และพบว่าแบเรียมอัลจินเตอ สามารถรักษาโครงสร้างให้คงตัวอยู่ได้เป็นเวลานานถึงแม้ว่าจะอยู่ในสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟต ดังนั้นฟอสเฟตจึงสามารถอยู่ในสารอาหารได้ไม่ว่าจะเป็นสารอาหารที่จำเป็นหรือ เป็นบัฟเฟอร์ที่ราคาถูกโดยไม่มีผลต่อการกระจายของเจล (Robinson , 1992)

ขั้นตอนในการผลิตเอทานอลจากแป้ง

ขั้นตอนในการผลิตเอทานอลจากแป้งนั้นจะประกอบไปด้วย

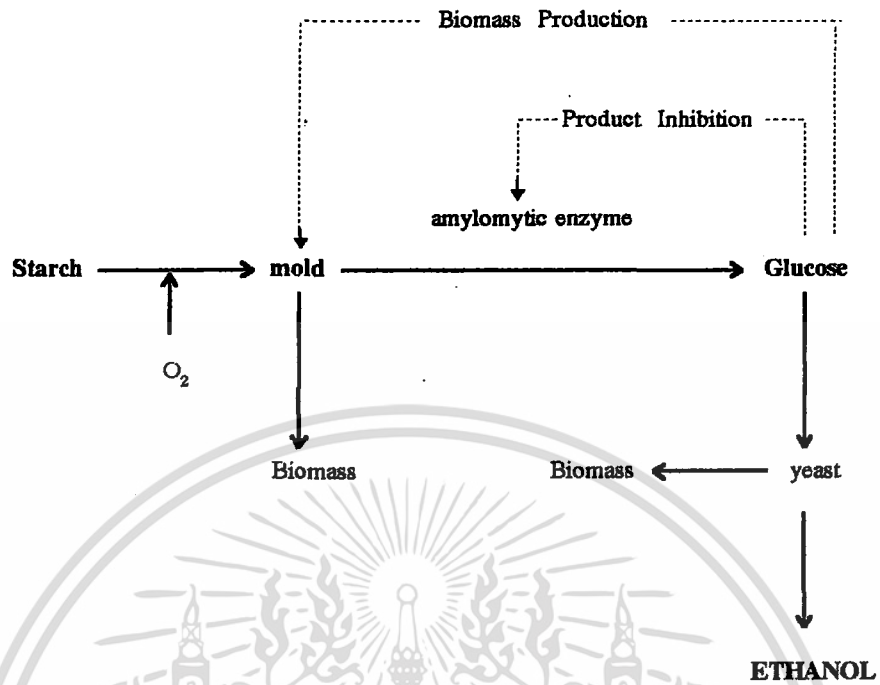
1. การย่อยสลายแป้ง เพื่อเปลี่ยนไปเป็นกลูโคส (เป็นขั้นตอนที่ใช้เอนไซม์) โดยอาศัยบทบาทของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ อะไมเลส (amylase) และ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) โดยเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเป็นแหล่งของเอนไซม์ดังกล่าวจะเป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่มี แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายแป้งได้สูง

2. การหมักกลูโคสให้ได้เป็นเอทานอล (เป็นขั้นตอนที่ไม่ใช้เอนไซม์) โดยพบว่า กลูโคส 1 โมเลกุลสามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้ 2 โมเลกุล โดยอาศัยการทำงานของยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูง

สำหรับการตรึงเซลล์ร่วมของยีสต์และราในเม็ดเจลแคลเซียมอัลจินเตอเพื่อการผลิต เอทานอลนั้น พบว่า เชื้อราจะเจริญอยู่บริเวณผิวของเม็ดเจล อันเนื่องมาจากความต้องการออกซิเจนในการเจริญ และการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาลกลูโคสนั้นต้องอาศัยสภาวะที่มีอากาศ ส่วนยีสต์จะเจริญอยู่ในส่วนด้านในของเนื้อเจล อันเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในการ เปลี่ยนกลูโคส ไปเป็นเอทานอลนั้นต้องอาศัยสภาวะที่ไม่มีอากาศ

แผนผังการผลิตเอทานอลจากการอยู่ร่วมกันของยีสต์และราแสดงดังรูปที่ 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 แสดงแผนผังการผลิตเอทานอลจากการอยู่ร่วมกันของยีสต์และรา (Arora et al.,1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงการพิเศษ

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการดำเนินงานทดลองมีทั้งหมด 5 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นเชื้อรา 3 สายพันธุ์ และยีสต์ 2 สายพันธุ์ (รูปแสดงในภาคผนวก ก)

เชื้อราแต่ละสายพันธุ์จะเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาลได้สูง ซึ่งได้แก่

1. *Rhizopus oryzae* Went & Pronsen Geerliges ATCC 56536 (A1)
2. *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn ATCC 11491 (A2)
3. *Aspergillus awamori* Nakazawa (A3)

ส่วนเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการทดลองนั้น แต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูง ซึ่งได้แก่

1. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098 (S1)
2. *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 26192 (S2)

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1. อุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. บีกเกอร์
3. ฟลาสก์
4. แท่งแก้วคนสาร
5. ปีเปตต์
6. งานเพาะเลี้ยงเชื้อ
7. กรวยแก้ว
8. ช้อนตักสาร
9. ตะเกียงแอลกอฮอล์
10. loop และ เข็มเขี่ยเชื้อ
11. ขวดเบน
12. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)
 14. เครื่องวัดแอลกอฮอล์ (Ebulliometer)
 15. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)
 16. กล้องจุลทรรศน์
 17. เครื่องเขย่า (Shaker)
 18. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
 19. เครื่องชั่ง
 20. เครื่องเพอริสตาติกปั๊ม (Peristaltic Pump)
 21. สายยางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร
 22. เครื่องกวน (Magnetic Stirrer)
 23. แท่งแม่เหล็กคนสาร (magnetic bar)
 24. โถอบแห้ง (desiccator)
 25. เครื่องอบความร้อน (hot air oven)
- 8.2.2 สารเคมี**
1. กรดซัลฟิวริก (0.005 N H_2SO_4)
 2. เอทานอล 99%
 3. เมทานอล 99%
 4. โซเดียมอัลจินेट 3%
 5. แคลเซียมคลอไรด์ (0.1 M $CaCl_2$)
 6. Copper reagent (ภาคผนวก ก)
 7. Nelson's Arsenomolybdate Colour reagent (ภาคผนวก ก)
 8. ทวิน 80 (Tween 80 0.1%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ขั้นตอนในการดำเนินงานทดลอง

3.3.1 การเตรียมสปอร์เพื่อการผลิตเอทานอล

1. ทำการเขี่ยเส้นใยของเชื้อราจาก stock culture โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA slant agar และ YM slant agar) (ภาคผนวก ข) ที่บรรจุในขวดแก้วทรงแบน

2. ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ถึง 7 วัน เชื้อจะเจริญเต็มที่พร้อมทั้งสร้างสปอร์เป็นจำนวนมาก ซึ่งจากการทดลอง พบว่า

Aspergillus oryzae เจริญและสร้างสปอร์ได้ดีในอาหาร YM

Aspergillus awamori เจริญและสร้างสปอร์ได้ดีในอาหาร PDA

Rhizopus oryzae เจริญและสร้างสปอร์ได้ดีในอาหาร YM

3. ทำการถ่ายสปอร์ โดยการกรองออกจากขวดแบน โดยใช้ 0.1% ของทวิน 80 (tween 80) จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ผ่านผ้าขาวบางที่พับซ้อนกัน 4 ชั้น โดยใช้เทคนิคที่ปลอดภัย เชื้อ

4. นำสารแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension) มาตรวจนับปริมาณสปอร์ที่มีอยู่โดยใช้ไฮมาไซโตมิเตอร์ จากนั้นทำการปรับปริมาณความเข้มข้นของสารแขวนลอยของสปอร์ให้มีจำนวนสปอร์เท่ากับ 1.25×10^9 สปอร์ ต่อ 1000 มิลลิลิตร ของเจล

แต่เนื่องจากในการตรึงเซลล์แต่ละครั้ง จะใช้เจล 80 มิลลิลิตร ต่อ สารแขวนลอยของสปอร์ 8 มิลลิลิตร ดังนั้นจากความเข้มข้นของสปอร์ที่ต้องการคือ 1.25×10^9 สปอร์ ต่อ 1000 มิลลิลิตร ของเจลนั้น ใน 8 มิลลิลิตร ของสารแขวนลอยของสปอร์ จะต้องมีปริมาณสปอร์อยู่ทั้งหมดเท่ากับ 10^8 สปอร์

3.3.2 การเตรียมเซลล์ยีสต์เพื่อผลิตเอทานอล

1. ทำการเขี่ยเชื้อยีสต์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ YM (YM Slant agar) ลงในอาหารเหลว Preculture medium (ภาคผนวก ข)

2. นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อมีการเจริญอยู่ในช่วงกลางของระยะ log phase

3. นำสารละลายของเซลล์ที่ได้ไปหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) โดยการนำตัวอย่างของน้ำหมักมา 1 มิลลิลิตร นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. นำมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน โดยเราจะใช้ยีสต์แต่สายพันธุ์ 0.5 กรัม น้ำหนักแห้ง ต่อ 1000 มิลลิลิตร ของเจล

แต่เนื่องจากการตรึงเซลล์แต่ละครั้งจะใช้เจล 80 มิลลิลิตร ต่อ สารละลาย ยีสต์ 12 มิลลิลิตร ดังนั้นจากความเข้มข้นของยีสต์ที่ต้องการคือ 0.5 กรัม น้ำหนักแห้ง ต่อ 1000 กรัมเจล ดังนั้นใน 12 มิลลิลิตร ของสารละลายยีสต์จะต้องมีปริมาณเซลล์ยีสต์อยู่ 0.04 กรัม

3.3.3 การศึกษาลักษณะการอยู่ร่วมกันของเซลล์จุลินทรีย์

จัดคู่จุลินทรีย์ 2 ชนิดที่จะนำมาศึกษาลักษณะการอยู่ร่วมกันทั้งระบบเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงรูป ดังนี้

S1A1	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	กับ	<i>Rhizopus oryzae</i>
S1A2	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	กับ	<i>Aspergillus oryzae</i>
S1A3	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	กับ	<i>Aspergillus awamori</i>
S2A1	: <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	กับ	<i>Rhizopus oryzae</i>
S2A2	: <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	กับ	<i>Aspergillus oryzae</i>
S2A3	: <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	กับ	<i>Aspergillus awamori</i>

3.3.3.1 การอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์แบบอิสระในการผลิตเอทานอล

1. เตรียมยีสต์จากข้อ 3.3.2 ให้ได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 0.04 กรัม ใน 12 มิลลิลิตร ของสารละลายยีสต์ และเตรียมเชื้อราจากข้อ 3.3.1 ให้ได้ปริมาณสปอร์เท่ากับ 10^8 สปอร์ ใน สารละลายสปอร์ 8 มิลลิลิตร

2. นำสารละลายยีสต์ และ สารละลายสปอร์ที่ได้ ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ production medium (ภาคผนวก ข) 200 มิลลิลิตร

3. ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 220 รอบ ต่อนาที

4. เก็บตัวอย่างน้ำหมักมาทำการวัดปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ และ pH ทุก ๆ 12 ชั่วโมง

3.3.3.2 การอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์โดยใช้การตรึงเซลล์ในการผลิตเอทานอล

การตรึงเซลล์เพื่อการผลิตเอทานอลโดยแคลเซียมอัลจิเนต จะทำได้โดย

1. เตรียมสารละลายสปอร์ตามข้อ 3.3.1 ปริมาณ 8 มิลลิลิตร และสารละลาย ยีสต์ตามข้อ 3.3.2 ปริมาณ 12 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เติมสารละลายยีสต์และสารละลายสปอร์ที่ได้ ลงในสารละลายโซเดียม อัลจินเนตเข้มข้นร้อยละ 3 โดยทำในสภาพปลอดเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน

3. คูดสารละลายผสมที่ได้นี้ โดยใช้เครื่องเพอร์ริสตาลคิกบีม ผ่านไปตามสาย ขางที่ปลอดเชื้อ โดยสารละลายนี้จะผ่านไปตามปลายท่อสายขางดังกล่าว ซึ่งมีขนาดเส้นผ่า ศูนย์กลางเท่ากับ 3 มิลลิเมตร ด้วยความเร็ว 125 มิลลิเมตร ต่อชั่วโมง และหยดลงในสาร ละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ปลอดเชื้อ พร้อมกับทำการกวนสารละลายดัง กล่าวตลอดเวลาคด้วยเครื่องกวน

4. หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลแข็งตัว ก็จะได้เม็ดเจลที่มี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร เก็บเม็ดเจลที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศา เซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

5. ทำการชั่งเม็ดเจลให้ได้ 35 กรัม ใส่ลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อ production medium 200 มิลลิตร

6. ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 220 รอบต่อ นาที

7. เก็บตัวอย่างน้ำหมักมาทำการวัดปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ และ pH ทุก ๆ 12 ชั่วโมง

3.3.3.3 การศึกษาปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อระบบเพื่อ การผลิตเอทานอล

จากข้อ 3.3.3.1 และ 3.3.3.2 คัดเลือกระบบที่เหมาะสมที่สุดในการอยู่ร่วมกัน ของจุลินทรีย์ 2 ชนิดในระบบเซลล์อิสระและระบบเซลล์ตรึงรูปในการผลิตเอทานอลจากแป้ง มาทำการแปรผันปริมาณแป้งเริ่มต้นที่ร้อยละ 1 และร้อยละ 2 โดยให้สภาวะอื่น ๆ คงที่

3.3.3.4 การศึกษาปริมาณและชนิดของแหล่งไนโตรเจนเริ่มต้นที่เหมาะสม ต่อระบบเพื่อการผลิตเอทานอล

ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ และแปรผันชนิดของแหล่ง ไนโตรเจน ทั้งไนโตรเจนอินทรีย์ และไนโตรเจนอนินทรีย์ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 1 และร้อยละ 0.5 ตามลำดับ

ไนโตรเจนอนินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองมี 3 แหล่งคือ

- แอมโมเนียมไนเตรต : NH_4NO_3
- แอมโมเนียมซัลเฟต : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- แอมโมเนียมซิเตรต : $(\text{NH}_4)_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในโตรเจนอนินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองมี 3 แหล่งคือ

- เปปโตน
- ยีสต์สกัด
- ทรีปโตน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ในระบบเซลล์อิสระในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง

จากการศึกษาเปรียบเทียบการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ คือ ยีสต์และรา ในระบบเซลล์อิสระในการผลิตเอทานอล แต่ละคู่จะให้ผลผลิตเอทานอลต่างกันที่ระยะเวลาการหมักต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ 2 ชนิด ในระบบเซลล์อิสระ ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล โดยแสดงปริมาณผลผลิตในแต่ละช่วงเวลาของการหมัก

ระบบ	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			
	12 ชม.	24 ชม.	36 ชม.	48 ชม.
S1A1	29.07	17.22	10.67	17.77
S1A2	25.52	30.46	21.46	16.16
S1A3	26.23	19.24	17.06	13.35
S2A1	17.35	18.17	20.94	10.35
S2A2	24.79	23.23	9.79	5.95
S2A3	26.54	14.85	10.27	9.48

หมายเหตุ S1 : *Saccharomyces cerevisiae*

S2 : *Schizosaccharomyces pombe*

A1 : *Rhizopus oryzae*

A2 : *Aspergillus oryzae*

A3 : *Aspergillus awamori*

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 พบว่า ในระบบเซลล์อิสระ ระบบ S1A2 เป็นระบบที่ให้ปริมาณเอทานอลได้สูงสุด คือ 30.46 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง จึงนำไปเปรียบเทียบกับระบบครึ่งเซลล์ร่วมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ในระบบตรึงเซลล์ในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง

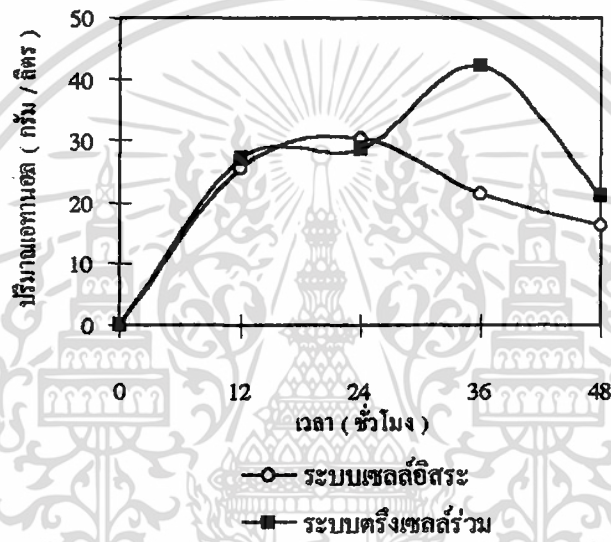
ในระบบตรึงเซลล์ร่วมของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดในแต่ละคู่ (แต่ละคู่เหมือนกับในระบบเซลล์อิสระ) จะให้ปริมาณผลผลิตเอทานอลต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ 2 ชนิด ในระบบตรึงเซลล์ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล โดยแสดงปริมาณผลผลิตในแต่ละช่วงเวลากการหมัก

ระบบ	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			
	12 ชม.	24 ชม.	36 ชม.	48 ชม.
S1A1	22.95	15.72	14.46	9.87
S1A2	27.14	28.59	42.10	21.17
S1A3	24.41	34.52	17.78	15.33
S2A1	25.80	17.93	8.53	16.12
S2A2	22.91	20.73	23.46	20.46
S2A3	24.04	27.17	19.12	11.69

จากผลการทดลองในตารางที่ 2 พบว่า ในระบบตรึงเซลล์นั้นระบบ S1A2 เป็นระบบที่ให้ปริมาณเอทานอลได้สูงสุด คือ 42.10 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาในการหมัก 36 ชั่วโมง เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับระบบ S1A2 ในระบบเซลล์อิสระพบว่า ระบบตรึงเซลล์จะดีกว่าระบบเซลล์อิสระโดยได้แสดงการเปรียบเทียบเป็นกราฟดังรูปที่ 10 ระบบตรึงเซลล์ร่วมของ S1A2 นั้นคือ เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อ *Aspergillus oryzae* จึงเป็นระบบที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งสูงกว่าระบบอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ดังนั้นจึงเลือกระบบตรึงเซลล์ร่วมของ S1A2 ไปใช้ในการศึกษาปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นและปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อระบบเพื่อการผลิตเอทานอลต่อไป



รูปที่ 10 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลโดยระบบ S1A2 ในระบบ เซลล์อิสระและระบบตรึงเซลล์

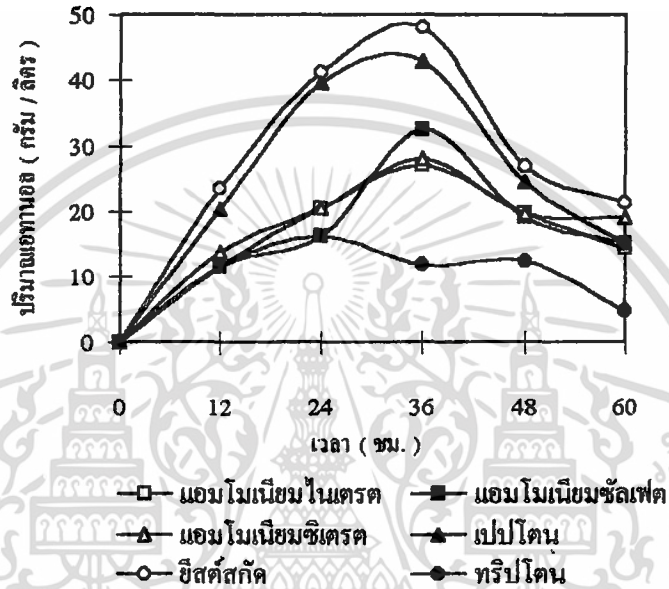
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 การศึกษาปริมาณแอมโมเนียมสำหรับหลังเริ่มต้นและปริมาณและชนิดของแหล่งไนโตรเจน เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อระบบเพื่อการผลิตเอทานอล

เนื่องจากในการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาระบบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล นั้น ปริมาณแอมโมเนียมที่ใช้เริ่มต้น คือ ร้อยละ 2 หลังจากการทดลองพบว่ายังคงมีปริมาณแอมโมเนียมอยู่ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงแปรผันปริมาณแอมโมเนียมที่ใช้เป็น ร้อยละ 1 และ ร้อยละ 2 เพื่อเปรียบเทียบการผลิตเอทานอล และได้ทำการทดลองแปรผันปริมาณและชนิดของแหล่งไนโตรเจน ทั้งไนโตรเจนอนินทรีย์และไนโตรเจนอินทรีย์ โดยปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ คือ ร้อยละ 0.5 และ ร้อยละ 1.0 โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 , 4 , 5 และ 6 และรูปที่ 11 , 12 , 13 , 14

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณผลผลิตเอทานอล ที่ได้จากระบบที่ได้รับการคัดเลือกแล้ว คือ ระบบตรึงเซลล์ร่วมของ S1A2 โดยใช้ปริมาณแอมโมเนียมสำหรับหลังเริ่มต้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.5

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)				
	12 ชม.	24 ชม.	36 ชม.	48 ชม.	60 ชม.
ไนโตรเจนอนินทรีย์					
- NH_4NO_3	11.53	20.54	27.02	19.75	14.22
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	11.53	16.195	32.39	18.96	15.01
- $(\text{NH}_4)_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$	13.65	20.54	28.045	19.75	18096
ไนโตรเจนอินทรีย์					
- เปปโติน	20.38	39.50	42.77	24.49	15.01
- ซีสต์สกัด	23.56	41.08	48.08	26.99	21.33
- ทริปโติน	11.53	16.20	11.85	12.245	4.74



รูปที่ 11 กราฟแสดงปริมาณผลผลิตเอทานอล โดยระบบเครื่องเซลล์ร่วมของ S1A2 โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้นร้อยละ 1.0 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ร้อยละ 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

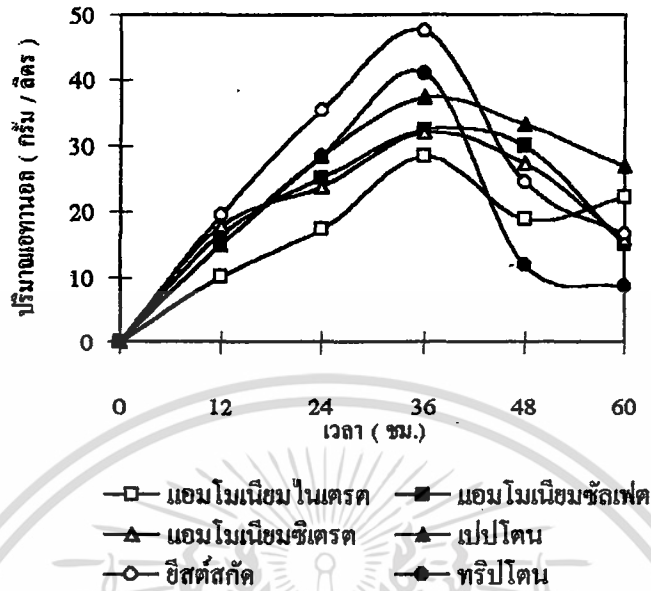
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณผลผลิตเอทานอลที่ผลิตจากระบบตรึงเซลล์ร่วมของ S1A2 โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)				
	12 ชม.	24 ชม.	36 ชม.	48 ชม.	60 ชม.
ไนโตรเจนอนินทรีย์					
- NH_4NO_3	10.06	17.38	28.44	18.96	22.12
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	16.62	25.01	32.39	30.02	15.01
- $(\text{NH}_4)_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$	17.94	23.70	32.045	27.38	15.80
ไนโตรเจนอินทรีย์					
- เปปโติน	15.00	28.44	37.53	33.18	26.86
- ยีสต์สกัด	19.60	35.55	47.53	24.49	16.59
- ทรีปโติน	14.95	28.44	41.08	11.85	8.69

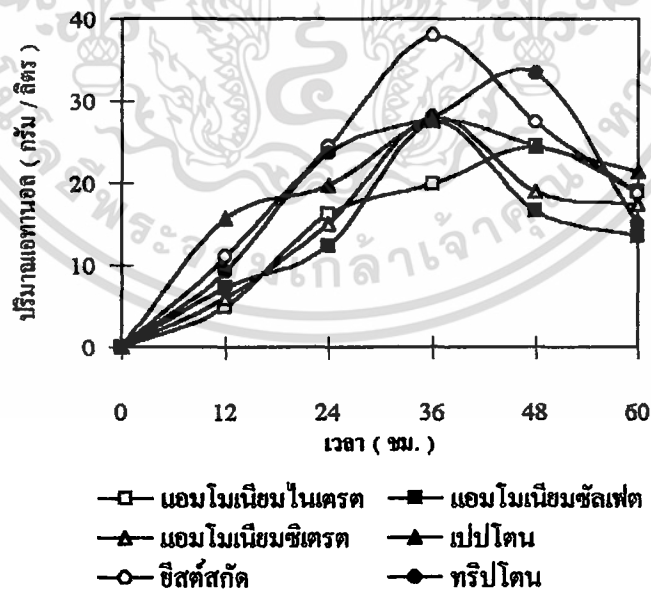
ตารางที่ 5 แสดงปริมาณผลผลิตเอทานอลที่ผลิตจากระบบตรึงเซลล์ร่วมของ S1A2 โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)				
	12 ชม.	24 ชม.	36 ชม.	48 ชม.	60 ชม.
ไนโตรเจนอนินทรีย์					
- NH_4NO_3	4.89	16.195	19.75	24.49	18.96
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7.23	12.25	27.39	16.59	13.43
- $(\text{NH}_4)_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$	5.96	15.01	28.045	18.96	17.38
ไนโตรเจนอินทรีย์					
- เปปโติน	15.62	19.63	27.53	24.45	21.33
- ยีสต์สกัด	11.05	24.49	38.12	27.38	18.69
- ทรีปโติน	9.13	23.70	28.124	33.39	15.02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 กราฟแสดงปริมาณผลผลิตเอทานอลโดยระบบตรึงเซลล์ร่วมของ S1A2 โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้นร้อยละ 2.0 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ร้อยละ 0.5

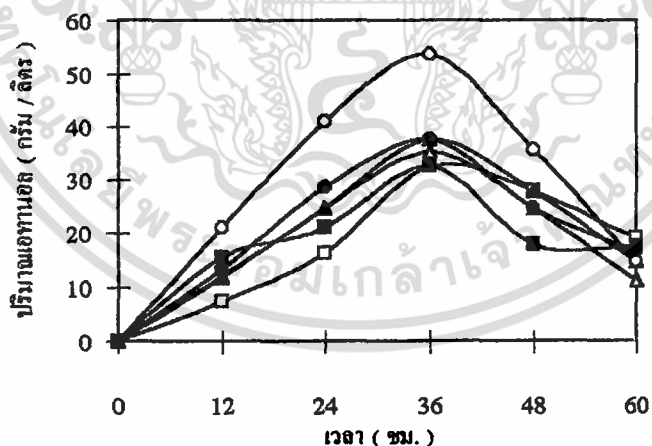


รูปที่ 13 กราฟแสดงปริมาณผลผลิตเอทานอลโดยระบบตรึงเซลล์ร่วมของ S1A2 โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้นร้อยละ 1.0 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ร้อยละ 1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณผลผลิตเอทานอลที่ผลิตจากระบบตรึงเซลล์ร่วมของ S1A2 โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 และแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)				
	12 ชม.	24 ชม.	36 ชม.	48 ชม.	60 ชม.
ไนโตรเจนอนินทรีย์					
- NH_4NO_3	7.26	16.195	32.39	27.76	18.96
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	15.51	21.06	32.39	17.78	17.38
- $(\text{NH}_4)_2\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	11.64	24.49	35.28	24.49	11.06
ไนโตรเจนอินทรีย์					
- เปปโตน	11.86	24.49	37.53	27.65	14.74
- ยีสต์สกัด	21.05	41.08	53.72	35.55	14.74
- ทรีปโตน	13.27	28.44	37.53	24.49	16.57

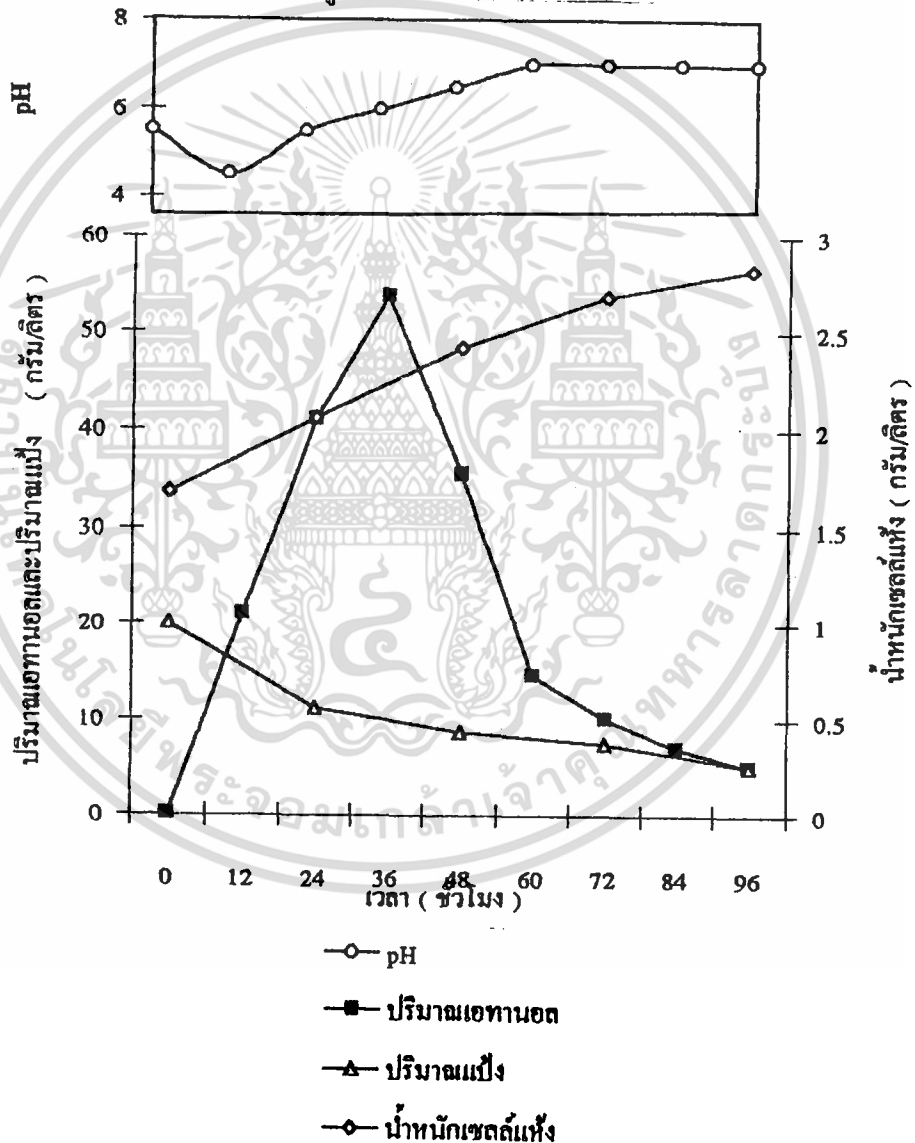


—□— แอมโมเนียมไนเตรต —■— แอมโมเนียมซัลเฟต
 —△— แอมโมเนียมซิเตรต —▲— เปปโตน
 —○— ยีสต์สกัด —●— ทรีปโตน

รูปที่ 14 กราฟแสดงปริมาณผลผลิตเอทานอลโดยระบบตรึงเซลล์ร่วมของ S1A2 โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้นร้อยละ 2.0 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ร้อยละ 1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เป็นไนโตรเจนอนินทรีย์และไนโตรเจนอินทรีย์ พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นไนโตรเจนอินทรีย์ให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นไนโตรเจนอนินทรีย์ทุกระยะของการเพาะเลี้ยง โดยที่ยีสต์สกัด เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอทานอล โดยให้ผลผลิตเอทานอลที่สูงที่สุดและแตกต่างจากแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กราฟแสดงความสัมพันธ์ต่าง ๆ ในการผลิตเอทานอลโดยใช้ปริมาณแป้งร้อยละ 2 และแหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดร้อยละ 1 แสดงดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอล ปริมาณแป้งที่ลดลง น้ำหนักเซตแห้งและ pH โดยใช้ปริมาณแป้งร้อยละ 2 และแหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัด

ร้อยละ 1 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาเพื่อคัดเลือกระบบที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลจากแป้งพบว่า ระบบตรีเซลล์ร่วมของจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ ระบบ S1A2 ซึ่งเป็นระบบการอยู่ร่วมกันของ *Aspergillus oryzae* (A2) กับ *Saccharomyces cerevisiae* (S1) ที่ถูกตรึงอยู่ในเม็ดเจล แคลเซียมอัลจิเนต เป็นระบบที่เหมาะสมที่ให้ผลผลิตเอทานอลมากที่สุด
2. ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ใช้หมักเอทานอลคือ ร้อยละ 2 และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 1
3. ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงที่สุดเท่ากับ 53.72 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมงของการหมัก ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 220 รอบต่อนาที ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 35 กรัมของเม็ดเจล และปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 200 มิลลิลิตร pH เป็นกลาง
4. ควรมีการศึกษานำเซลล์ตรึงรูปกลับมาใช้ในการหมักครั้งต่อ ๆ ไป (repeated fermentation) ทั้งนี้เพื่อศึกษาความคงตัวของความสามารถในการผลิตเอทานอลของเซลล์ตรึงรูปที่นำกลับมาใช้ใหม่
5. ควรมีการศึกษานำเซลล์ตรึงรูปไปใช้ในการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous culture) และแบบ fed-batch culture ซึ่งอาจทำได้โดยนำเซลล์ตรึงรูปไปบรรจุในคอลัมน์ หรือวัสดุที่ช่วยยึดอื่น ๆ
6. ควรมีการศึกษานำสารปฏิชีวนะ เช่น Vantocil IB มาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะจะช่วยทำให้สภาวะในการหมักสามารถกระทำได้ในสภาพที่ไม่ปลอดเชื้อ (Lee et al. , 1993)

ภาคผนวก ก

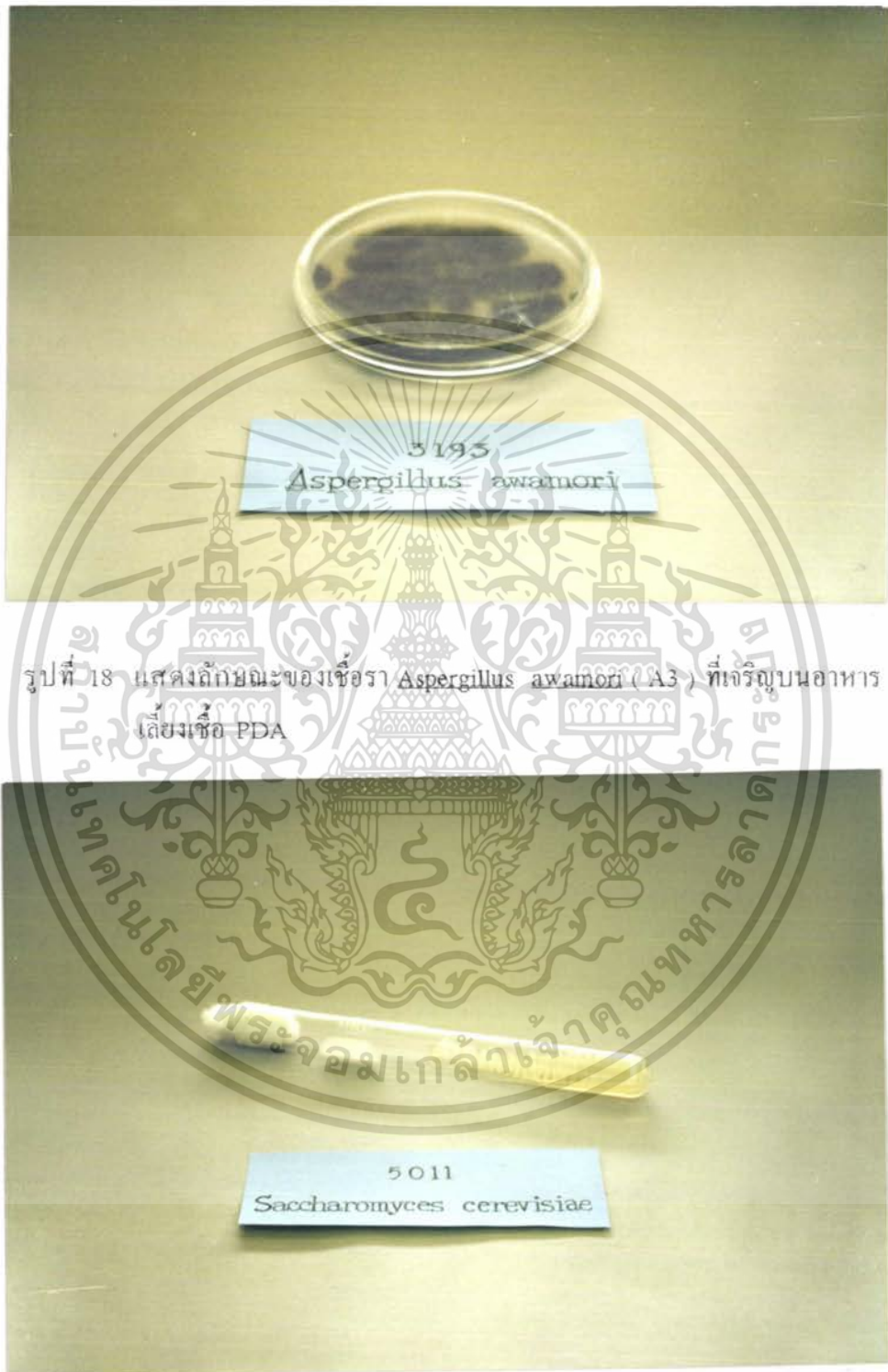


รูปที่ 16 แสดงลักษณะของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* (A1) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar



รูปที่ 17 แสดงลักษณะของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* (A2) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar

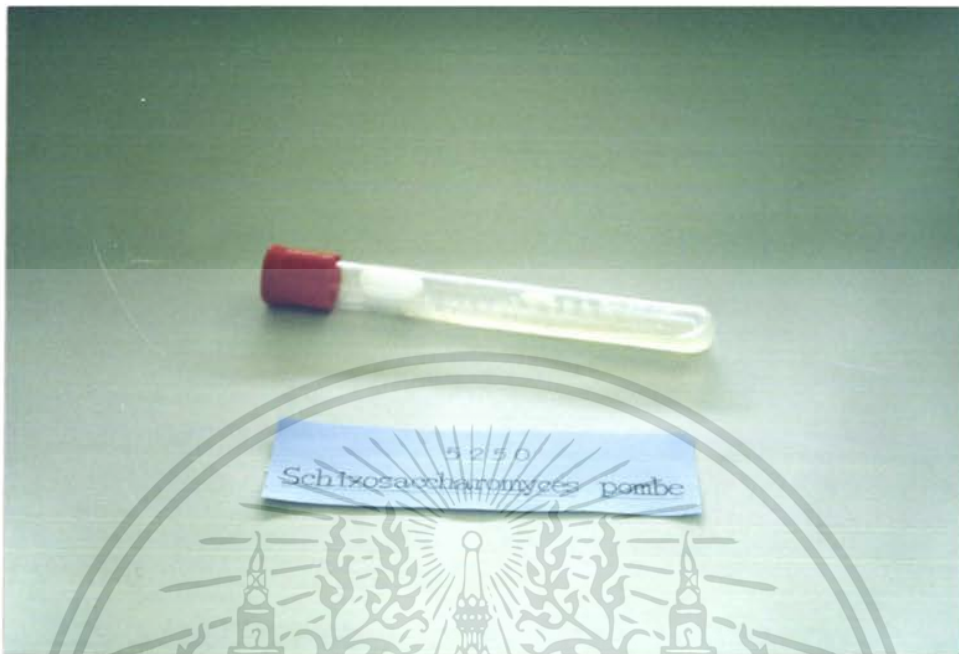
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 18 แสดงลักษณะของเชื้อรา *Aspergillus awamori* (A3) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

- รูปที่ 19 แสดงลักษณะของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (S1) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 20 แสดงลักษณะของเชื้อยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* (S2) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM-agar



รูปที่ 21 แสดงลักษณะการตรึงเซลล์ยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 22 แสดงลักษณะของเม็ดเจลที่ตรึงได้ในแต่ละคู่

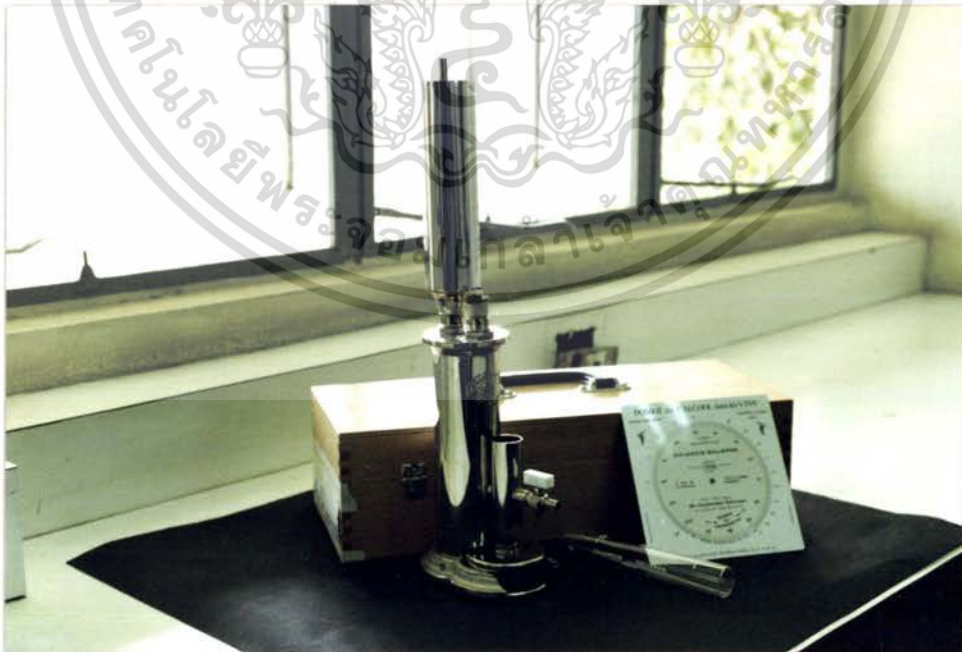


รูปที่ 23 แสดงลักษณะของเม็ดเจลที่ทำการหมักแล้ว เป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



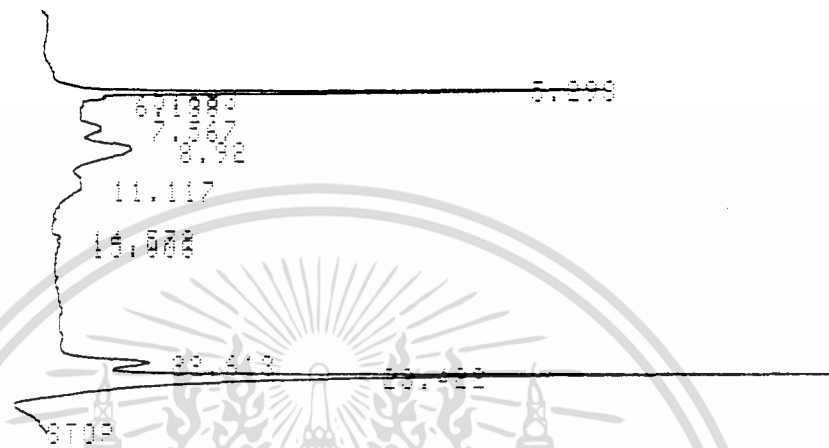
รูปที่ 24 แสดงเครื่อง HPLC ที่ใช้วัดปริมาณเอทานอล



รูปที่ 25 แสดงเครื่องมือ Ebulliometer ที่ใช้วัดปริมาณเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. SAVE
START



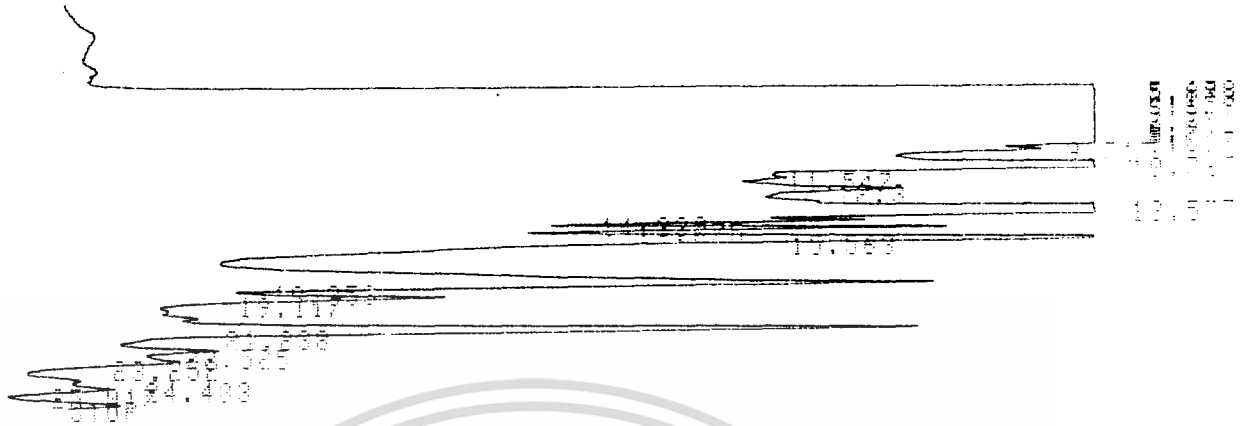
CHROMATOGRAM 1 MEMORIZED

CHROMATOPAC C-284 F101 0
 SAMPLE NO 0 METHOD 41
 REPORT NO 33

PKNO	TIME	AREA	HK	COND	COND	NAME
1	5.298	7166			19.1149	
2	6.683	590	V		1.3749	
3	6.138	148	V		0.2747	
4	7.567	942			2.5122	
5	8.92	8657	V		9.7536	
6	11.117	1081			2.8838	
7	14.572	146			0.3888	
8	15.003	83	V		0.2387	
9	22.613	3956			10.5332	
10	20.422	19723	V		52.6243	
TOTAL		27489			198	

รูปที่ 26 แสดงลักษณะ peak ที่ได้จากเครื่อง HPLC ในการฉีดเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนูญาติเห็นใบเซอร์เชียนตั้นการค่าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A,SAVE
START



CHROMATOGRAM 1 MEMORIZED

CHROMATOPAC C-360 FILE #

SAMPLE NO 9 METHOD #

REPORT NO 20

PKNO	TIME	AREA	PK	IDNO	CONC	NAME
1	5.675	40939			4.4373	
2	5.89	22610	V		3.244	
3	6.177	57534	V		6.2386	
4	6.679	146123	V		17.9339	
5	7.75	55590	V		4.8199	
6	8.31	21620	V		2.3412	
7	8.7	19561	V		2.1188	
8	9.067	43829	V		4.7463	
9	9.713	33867	V		3.6176	
10	10.727	73603	V		7.9706	
11	11.547	16283	V		1.7639	
12	12.3	45933	V		4.9748	
13	13.577	81731	V		8.8509	
14	14.332	14738	V		1.596	
15	14.775	19443	V		2.1055	
16	15.563	56562	V		6.1252	
17	18.353	47464	V		5.1339	
18	19.117	13048	V		1.413	
19	21.238	37494	V		4.8693	
20	22.525	5902	V		.437	
21	23.252	5375	V		3.5521	
22	24.483	1483			0.1606	
23	25.017	2688	V		2.3511	
TOTAL		922430			100	

รูปที่ 27 แสดงลักษณะ peak ที่ได้จากเครื่อง HPLC ในการฉีดสารตัวอย่างที่ได้จากน้ำหมัก
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA) (อาหารสำเร็จรูป)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมสปอร์ของเชื้อราเตรียมได้โดยละลายในน้ำกลั่น แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Yeast malt agar (YM)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทำเป็น stock culture ของเชื้อยีสต์และเตรียมสปอร์ของเชื้อรา มีองค์ประกอบดังนี้

กลูโคส	ร้อยละ 1.0
เปปโตน	ร้อยละ 0.5
ยีสต์สกัด	ร้อยละ 0.3
มอลท์สกัด	ร้อยละ 0.3
วุ้น	ร้อยละ 1.5

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Preculture medium

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเตรียมเซลล์ยีสต์เพื่อนำไปตรึงเซลล์ มีองค์ประกอบดังนี้

กลูโคส	ร้อยละ 2.0
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	ร้อยละ 0.8
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	ร้อยละ 0.4
แอมโมเนียมซัลเฟต	ร้อยละ 0.4
ยีสต์สกัด	ร้อยละ 0.8

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Production medium

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอทานอล มีองค์ประกอบดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพลีเอปโปโดน	ร้อยละ 0.5
ยีสต์สกัด	ร้อยละ 0.2
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	ร้อยละ 0.1
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	ร้อยละ 0.1
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	ร้อยละ 0.001
แคลเซียมกลอไรด์ไดไฮเดรต	ร้อยละ 0.2
แป้งมันสำปะหลัง	ร้อยละ 2.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วัสดุและสารละลายที่ใช้ในการทดลองวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi Nelson's Method

Copper reagent ประกอบด้วย

1. 10 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100 มิลลิลิตร (10 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)
2. สารละลาย ฟอสเฟต - คาร์เตรต เตรียมโดยละลาย Na_2HPO_4 28 กรัม (หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 70.5495 กรัม) ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโพแทสเซียมคาร์เตรต (เตะระไฮเตรต) 40 กรัม ทำให้ละลาย แล้วเติม NaOH เข้มข้น 1 นอร์มัล 100 มิลลิลิตร ตามด้วย Na_2SO_4 (anhydrous) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้วปรับให้ได้ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนทิ้งด้วยกระดาษฟิวแมน เบอร์ 4 (Whatman number 4)

ผสมสารละลายในข้อ 1 (100 มิลลิลิตร) และข้อ 2 (900 มิลลิลิตร) เข้าด้วยกัน จะเรียกสารละลายนี้ว่า Copper reagent

Nelson's Arsenomolybdate Color Reagent ประกอบด้วย

1. ละลาย แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. ละลาย ไดโซเดียมอาร์ซีเนต ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายในข้อ 1 และ 2 เข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องและควรเก็บในขวดสีน้ำตาล

วิธีการทดลอง

1. เติมสารตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติม Copper reagent 2 มิลลิลิตร และต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ควรใช้ลูกแก้ววางบนปากหลอดทดลองเพื่อลดการระเหยของน้ำ
2. ทำให้เย็นลงโดยแช่ในอ่างน้ำ เติม Arsenomolybdate reagent 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเห็นเป็นสีเขียวหรือสีน้ำเงินเขียวขึ้นกับปริมาณน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เติมน้ำ 4 มิลลิลิตร (ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 10 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน วัด OD ที่ 520 นาโนเมตร นำค่า OD ที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

อุปสรรคและแนวทางแก้ไข

บางครั้งไม่เกิดปฏิกิริยา อาจเกิดจากสาร Nelson's reagent เสีย จะสังเกตได้โดยสีของสารละลายที่เปลี่ยนไป หรือมีการตกตะกอนมาก ถ้าเป็นดังนั้นต้องเตรียมสารนี้ใหม่



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

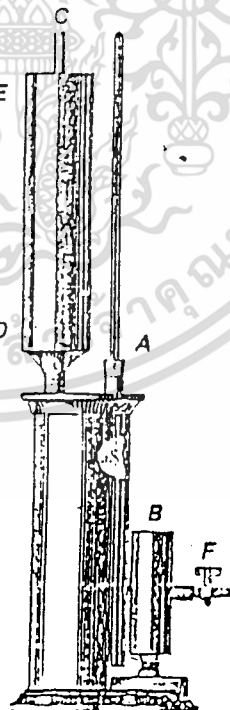
ภาคผนวก ง

การใช้ Dujardin - Salleron Ebulliometer

Ebulliometer เป็นอุปกรณ์ที่ใช้หาปริมาณแอลกอฮอล์ของสารละลาย อุปกรณ์ชนิดนี้ประกอบด้วย หม้อต้ม Ebulliometer , reflux condenser , standardized centigrade thermometer , ตะเกียงแอลกอฮอล์ , measuring cylinder และ sliding scale หรือ calculator

หลักการ

หลักการของเครื่องมือชนิดนี้ เกี่ยวข้องกับจุดเดือด โดยปกติจุดเดือดของเอทานอลประมาณ 76 - 78 องศาเซลเซียส และจุดเดือดของน้ำประมาณ 100 องศาเซลเซียส ถ้าตัวอย่างไวน์มีแอลกอฮอล์สูง จุดเดือดจะใกล้เคียงกับจุดเดือดของเอทานอล แต่ถ้าตัวอย่างไวน์มีแอลกอฮอล์ต่ำ จุดเดือดจะใกล้เคียงจุดเดือดของน้ำ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับรูปที่ 28 รูปแสดงลักษณะของเครื่อง Ebulliometer ใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์

1. ทำการหาจุดเดือดของน้ำ เนื่องจากความดันบรรยากาศมีผลต่อจุดเดือดของน้ำ จึงต้องทำการตรวจสอบจุดเดือดของน้ำวันละหลายครั้ง เมื่อได้จุดเดือดของน้ำแล้วนำไปบันทึกหรือตั้งสเกล

2. เจือจางไวน์ ถ้าหากไวน์มีปริมาตรแอลกอฮอล์มากกว่าร้อยละ 25 ในการเจือจางควรใช้ volumetric pipett และ volumetric flasks เสมอ น้ำที่ใช้เจือจางควรมีอุณหภูมิเดียวกับไวน์ และควรทำการเจือจางอย่างระมัดระวัง

3. หาจุดเดือดของไวน์ เมื่อได้จุดเดือดของไวน์นำไปอ่านค่าจากตารางหรือ sliding scale แล้วคูณด้วย dilution factor เพื่อหาปริมาณของแอลกอฮอล์ที่แท้จริงของไวน์ที่ไม่ได้เจือจาง (วิธีการหาจุดเดือดของน้ำและไวน์ทำตามวิธีการข้างล่างนี้)

การหาจุดเดือดของน้ำ

1. เติมแอลกอฮอล์ ซึ่งใช้เป็นเชื้อเพลิงลงในตะเกียง
2. กัดล่างหม้อต้มด้วยน้ำ จากนั้นเทน้ำลงไปในหม้อต้ม โดยวัดปริมาตรของน้ำด้วยหลอดแก้วให้ได้เท่าขีด EAU หรือ 15 มิลลิลิตร
3. วางเทอร์โมมิเตอร์ลงที่จุด "A"
4. จุดตะเกียงวางไว้ที่ "B" ทันทีที่ปรอทเริ่มขึ้น ไอน้ำจะออกมาบนจุดสูงสุดของ cooler
5. อ่านอุณหภูมิเมื่อปรอทคงที่ เช่น อ่านได้ 99.9 องศาเซลเซียส นำไปตั้งบนแผ่น sliding scale โดยตั้งไว้ที่ 99.9 แล้วล็อกไว้ให้ scale 99.9 ด้านในตรงกับ scale 0 ด้านนอก

การหาจุดเดือดของไวน์

1. เปิดก๊อก "F" กัดด้วยไวน์ที่จะทดสอบประมาณ 5 - 10 มิลลิลิตร แล้วเททิ้ง
2. เทไวน์ลงในหม้อต้ม (วัดปริมาตรตามขีด VIN หรือ 50 มิลลิลิตร)
3. วางเทอร์โมมิเตอร์ที่จุด "A"
4. เติมน้ำใน cooling tank "D - E"
5. ให้ความร้อน ปรอทจะขึ้นและหยุดในที่สุด คอยจนกระทั่งปรอทคงที่ (ปรอทจะขึ้นลง อ่านจุดที่สูงสุด) ตัวอย่างเช่น อ่านได้ 90.7 นำไปเทียบกับ sliding scale

เอกสารนี้เป็นอ่านค่าร้อยละของแอลกอฮอล์ ซึ่งจะอ่านได้ร้อยละ 13.5 โดยปริมาตร (ตาม scale ด้านนอก)
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบ Dry wines และ Liquids ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์สูง

เทอร์โมมิเตอร์และ alcoholemetric scale ของ Ebuliometer ไม่สามารถใช้กับตัวอย่างที่มีปริมาณแอลกอฮอล์มากกว่าร้อยละ 25 โดยปริมาตร เมื่อจะทดสอบตัวอย่างดังกล่าว ขั้นแรกจะต้องเจือจางด้วยน้ำที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และหลังจากทดสอบต้องคูณองศาที่อ่านได้จาก Ebuliometer ด้วยสัดส่วนที่ทำการเจือจาง

การทดสอบไวน์หวานและ Liquors

Ebuliometer จะไม่มีประสิทธิภาพในการวัดปริมาณแอลกอฮอล์ใน ไวน์ และ liquors ที่หวานมาก ๆ การเจือจางด้วยน้ำสามารถลดความผิดพลาด (error) จากการเติมน้ำตาล แต่จะไม่แม่นยำทีเดียวนัก การทดสอบนี้จึงเป็นเพียงทราบปริมาณแอลกอฮอล์โดยปริมาตรเท่านั้น ถ้าจะให้ได้ผลที่ถูกต้องจริง ๆ จะต้องทำการกลั่น

คำแนะนำ

- การให้ความร้อนหม้อต้มนั้น สำคัญมากควรจะสม่ำเสมอและคงที่ ใ้ตะเกียงควรมีขนาดเดียวกัน เมื่อใ้ตะเกียงเหลือน้อยควรเปลี่ยนใหม่ เพราะปริมาณแอลกอฮอล์ที่เป็นเชื้อเพลิงจะน้อยไปด้วย และควรหมั่นเติมแอลกอฮอล์ลงในตะเกียงเสมอ
- ก่อนการทดสอบแต่ละครั้ง ควรจะกลั่นหม้อต้มด้วย ไวน์ ที่จะทดสอบและระบายออกโดยหมุนก๊อก "F" หลังจากนั้นเติม condenser ด้วยน้ำเย็นในการทดสอบแต่ละครั้ง

เทอร์โมมิเตอร์

เป็นเครื่องมือที่แตกง่ายถ้าไม่ระวัง ไม่ควรวางเทอร์โมมิเตอร์ที่ยังร้อนลงบนโต๊ะที่เย็น เวลายกควรระวังเป็นพิเศษ เพราะมันแตกง่าย ถ้าคอลัมน์ของปรอทแยกกันสามารถที่จะทำให้ปรอทติดกันอีกได้ โดยจับเทอร์โมมิเตอร์ไว้ให้แน่นให้ปรอทอยู่ด้านล่าง จากนั้นแกว่งไปมาคล้ายลูกตุ้มนาฬิกา ไม่ควรเคาะบนสิ่งที่แข็ง แต่อาจเคาะบนฝ่ามือหรือผ้าพับหนา ๆ ได้ ควรหลีกเลี่ยงการแตกโดยอย่าจุ่มลงในของเหลวที่เย็นขณะที่เทอร์โมมิเตอร์ยังร้อน

การดูแลรักษาเครื่องมือ

1. หลังจากใช้ Ebuliometer วิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ไปประมาณ 50 ครั้งควรเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 2 ลงในหม้อต้มแล้วทำการต้ม และก่อนใช้ควรกลั่นออกเพื่อขจัดโซเดียมไฮดรอกไซด์ ออกให้หมด
2. ควรเติมตะเกียงด้วย denatured alcohol และระวังอย่าให้ไส้ตะเกียงสั้นเกินไป
3. ควรระมัดระวังเทอร์โมมิเตอร์เป็นพิเศษ เพราะแตกง่ายและควรแน่ใจว่าปรอทไม่แยกกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

หลักการทํางานและวิธีการใช้เครื่องมือ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) เพื่อการวิเคราะห์เอทานอล

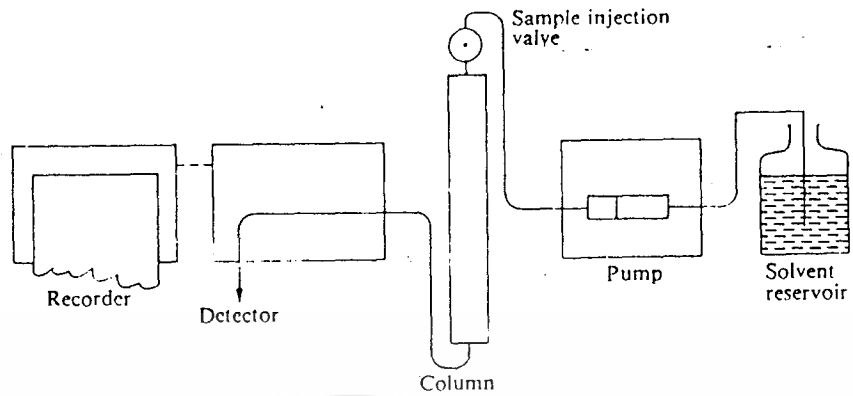
การใช้เครื่องมือซึ่งเรียกว่า High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลได้อีกวิธีหนึ่ง ซึ่งปัจจุบันเครื่อง HPLC เป็นที่นิยมแพร่หลายในอุตสาหกรรมมากขึ้น ซึ่งหลักการทํางานของเครื่อง HPLC มีดังนี้

เครื่อง HPLC เป็นเครื่องมือที่ใช้ในงานแยกสาร ใช้วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสาร ใช้หาปริมาณของสารที่มีปริมาณน้อย จึงเป็นเครื่องมือที่นำมาใช้มากในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องมือชนิดนี้ได้เข้ามามีบทบาทในการวิเคราะห์และควบคุมคุณภาพอาหาร และบทบาทนี้นับวันจะเพิ่มขึ้น ด้วยเหตุนี้ จึงต้องอาศัยความชำนาญและความละเอียดอ่อนในการใช้งาน โดยไม่เกิดความเสียหายหรือขัดข้อง และมีประสิทธิภาพสูงสุด

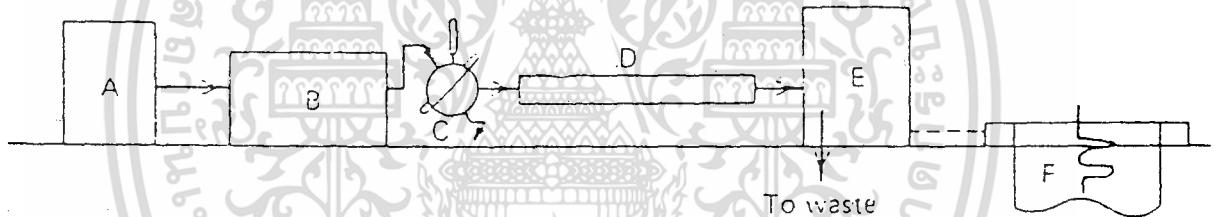
การใช้เครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลมีข้อได้เปรียบมากกว่าการใช้วิธีอื่นคือ

1. วิธีทําง่าย ไม่ซับซ้อนยุ่งยาก
2. ประหยัดเวลาในการเตรียมตัวอย่าง
3. ทําได้รวดเร็ว
4. มีความถูกต้อง แม่นยำ

ส่วนประกอบของระบบเครื่อง และ ระบบการทํางานของเครื่อง HPLC แสดงให้เห็นดังรูป



รูปที่ 29 รูปแสดงส่วนประกอบของระบบเครื่อง HPLC



รูปที่ 30 รูปแสดงหลักการทำงานของเครื่อง HPLC

โดยที่

A = Solvent Reservoir

B = Precision Flow Pump

C = Injector

D = Column

E = Detector

F = Data Recorder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้และการดูแลรักษาเครื่อง HPLC

1. การเตรียมเครื่องก่อนใช้งาน

ผู้ใช้งานควรทราบก่อนว่าขณะนี้ในเครื่อง HPLC มี solvent ชนิดใดอยู่ หากเป็นชนิดที่สามารถละลายได้ใน Solvent Mobile Phase ที่กำลังจะใช้ก็ให้ใช้ solvent ใหม่ไล่ที่ของเดิมออกได้ทันที

หากเป็น solvent ที่ไม่ละลายกัน เช่น เฮกเซน กับ เมทานอล ก็ให้ใช้ solvent ตัวกลาง เช่น คลอโรฟอร์ม ละลาย solvent เดิมออกก่อนที่จะบีบ solvent ใหม่เข้าไป หลังจากนั้นจึงให้ติดคอลัมน์เข้าไป และบีบ solvent mobile phase ผ่านไป จนสังเกตว่าตัวเลขที่หน้าปัด ซึ่งบอกค่า Absorption หรือ Energy คงที่ จึงเริ่มปรับ balance ที่เครื่อง Detector

2. การเตรียม solvent mobile phase

Mobile Phase จะประกอบด้วย สารละลายอินทรีย์ น้ำ และเกลือบัฟเฟอร์ ทั้งหมดนี้ควรมีลักษณะและการเตรียม ดังนี้

2.1 Solvent ที่ใช้ควรเป็น HPLC grade ซึ่งผลิตมาให้ใช้กับเครื่อง HPLC โดยเฉพาะ บริษัทผู้ผลิตได้ทำให้บริสุทธิ์และเติม Stabilizer โดยคำนึงถึงการใช้งานและการตรวจวัดเป็นสำคัญ แต่เนื่องจาก solvent เหล่านี้มีราคาแพง เราอาจใช้เกรดอื่นได้ เช่น AR grade ได้เฉพาะ solvent บางตัว เช่น เมทานอล สำหรับน้ำ ให้ใช้น้ำกลั่นอย่างน้อย 2 ครั้ง และเป็นน้ำกลั่นที่ใหม่

2.2 Solvent ที่ใช้เป็น mobile phase จำเป็นต้องกรองก่อนด้วยตัวกรอง เมมเบรน ขนาด 0.45 - 0.5 ไมโครเมตร โดยเฉพาะเมื่อมีบัฟเฟอร์ผสมอยู่ด้วย ทั้งนี้เพื่อกำจัดฝุ่นผงที่จะเข้าไปอุดตันในคอลัมน์ หรือไปครูดกับ Sapphire pistol ทำให้เกิดความเสียหายได้ ตัวกรองเมมเบรน มี 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูโลสอะซิเตต TPEE และ ไนลอน ให้เลือกใช้ให้เหมาะสมกับชนิดของ solvent

2.3 พีเอชที่ใช้ต้องปรับอยู่ระหว่าง 2 - 3 สำหรับใช้กับคอลัมน์ชนิด silica base ทั้งนี้เพื่อรักษาสภาพเดิมของ packing ในคอลัมน์

2.4 การไล่ก๊าซออกเมื่อผสม solvent ตามสัดส่วนที่ต้องการแล้ว หากต้องการใช้ในทันที จำเป็นต้องไล่ก๊าซออกก่อนเพื่อกำจัดฟองอากาศที่เกิดขึ้นขณะผสมให้หมดไป มิฉะนั้นฟองอากาศจะค้างในกระบอกสูบทำให้การทำงานของปั๊มผิดปกติ

3. การฉีดสารตัวอย่าง

สารตัวอย่างที่จะฉีดเข้าไปในเครื่อง HPLC จำเป็นจะต้องกรองด้วยตัวกรอง เมมเบรน ขนาดเล็กกว่า 0.5 ไมโครเมตร ก่อนทุกครั้ง และ solvent ที่ใช้ละลายสารตัวอย่าง หลังสุดควรเป็น mobile phase ทั้งนี้เพื่อประกันว่าจะไม่เกิดการตกตะกอนหลังจากฉีดเข้าไปในระบบแล้ว

ชนิดและขนาดของเข็มที่ใช้ของ Syringe จำเป็นต้องใช้ให้ถูกต้องกับตัว Injector มิฉะนั้นอาจจะเกิดความเสียหายกับส่วนของ Injector ได้

4. การล้างคอลัมน์และเครื่อง HPLC เมื่อสิ้นสุดการใช้งาน

เรามักจะล้างทั้งคอลัมน์ และเครื่อง HPLC ไปพร้อม ๆ กันหลังจากใช้งานประจำวัน โดยทั่วไปมีหลักดังนี้

4.1 กรณีที่เป็น Reverse phase ไม่มีบัฟเฟอร์ เช่น เมทานอล กับ น้ำ ให้ใช้เมทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 - 100 ล้างประมาณ 10 - 20 มิลลิลิตร แล้วจึงถอดคอลัมน์ เก็บ

4.2 กรณีที่เป็น Reverse phase มีบัฟเฟอร์อยู่ด้วย เช่น เมทานอล น้ำ KH_2PO_4 ให้ใช้สัดส่วนเดิมของ เมทานอล กับ น้ำ ล้างประมาณ 20 - 30 มิลลิลิตร แล้วปิดเครื่อง หากต้องการใช้ต่อในวันรุ่งขึ้น แต่ถ้าต้องการเก็บคอลัมน์เลย ให้ล้างต่อด้วยน้ำ 1 ครั้ง เมทานอล 1 ครั้ง ในปริมาณ 20 - 30 มิลลิลิตร จึงเก็บคอลัมน์

พึงจำไว้ว่าหากใช้ guard column ร่วมด้วย การล้างคอลัมน์ และ guard column ควรล้างแยกกัน ทั้งนี้เพื่อมิให้สารปนเปื้อนใน guard column ผ่านเข้าไปในคอลัมน์

5. ข้อควรระวังอื่น ๆ

5.1 บัฟเฟอร์ที่ไม่ควรใช้ได้แก่ สารที่มีฮาโลเจน และเกลือของฮาโลเจน

5.2 การเก็บคอลัมน์ และระบบ HPLC ไม่ควรเก็บไว้ในน้ำ หรือไฮโดรคาร์บอนที่มีฮาโลเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น คลอโรฟอร์ม

5.3 เครื่อง Detector ที่มีแหล่งกำเนิดแสง เช่น UV RI ควรปิดเครื่องทันทีเมื่อเลิกใช้ เพื่อยืดอายุของหลอดกำเนิดแสง

5.4 ควรใช้ guard column และ inline pre filter เพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ ปัม และ Injector

ขั้นตอนการวิเคราะห์โดย HPLC

ขั้นที่ 1 การพิจารณาสารที่จะวิเคราะห์และ matrix

สารที่ต้องการวิเคราะห์ ผู้ใช้เครื่อง HPLC จำเป็นต้องทราบในเบื้องต้นว่า สารที่ตนสนใจมีคุณสมบัติเช่นใด ดังนี้

- ความคงตัว
- ความสามารถในการละลาย ความเป็นกรด
- โครงสร้างทางโมเลกุล น้ำหนัก
- ความสามารถในการดูดซับรังสีอุลตราไวโอเลต

เป็นต้น

ชนิดและที่มาของสารตัวอย่าง (matrix) ข้อมูลนี้จะช่วยให้เราทราบว่าองค์ประกอบของสารตัวอย่างมีอะไรบ้าง มีปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ในความเข้มข้นขนาดไหน มีสารปนเปื้อนอะไรบ้าง เป็นต้น

การทราบข้อมูลเบื้องต้น ในขั้นที่ 1 นี้ จะช่วยให้เราสามารถตัดสินใจได้ว่า ควรจะใช้ Detector ตัวใด และปริมาณตัวแทนของสารตัวอย่างที่จะใช้ควรเป็นเท่าไร การเตรียมสารตัวอย่างควรเตรียมด้วยวิธีไหน

ขั้นที่ 2 การเลือก Mode of separation

จากขั้นตอนที่ 1 เมื่อเราทราบแน่นอนว่าสารนี้สามารถวิเคราะห์ได้ด้วย HPLC และจากคุณสมบัติของสารเอง โดยเฉพาะข้อที่ว่าด้วย ความสามารถในการละลาย จะใช้เป็นข้อกำหนดในการเลือก mode ซึ่งได้แก่

1. Adsorption (Normal phase)
2. Partition (Normal phase)
3. Ion Exchange
4. Bonded phase (Reverse phase)

และขอให้เข้าใจว่าคอลัมน์ที่ใช้ใน Mode ต่าง ๆ จะเป็นดังนี้

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1. Adsorption (Normal phase) | : Si / CN / NH ₂ |
| 2. Partition | : Si |
| 3. Ion Exchange | : Strong CX , AX |
| 4. Bonded phase (Reverse phase) | : C18 / C8 / C6 / C2 /
phenyl / CN / NH ₂ |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นที่ 3 การเลือกคอลัมน์

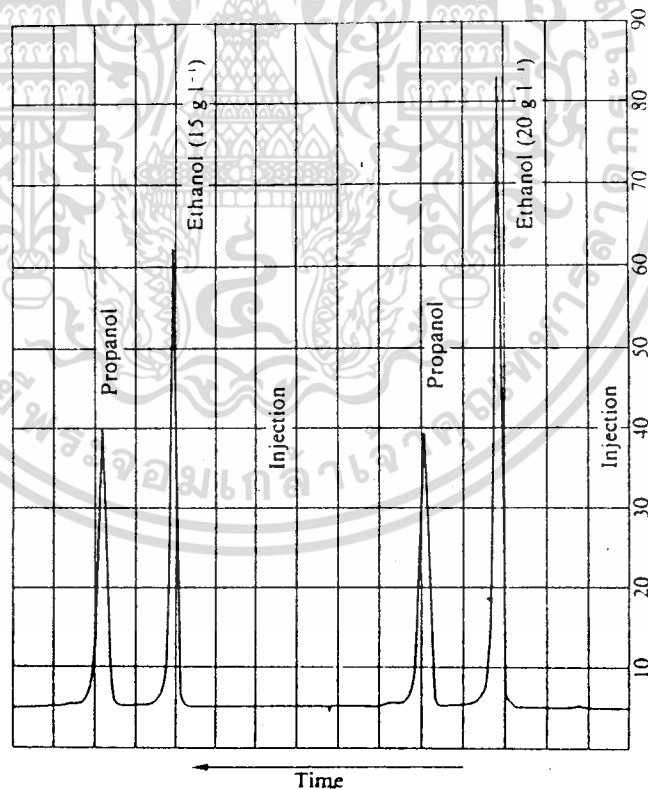
เมื่อเราสามารถเลือก mode of separation ในขั้นที่ 2 ได้แล้ว ต่อไปคือการเลือกใช้คอลัมน์ ซึ่งจำกัดอยู่เฉพาะกลุ่มที่อยู่ใน mode นั้น ๆ และโดยทั่วไปเรามักจะเลือกใช้คอลัมน์ตัวที่นิยมมากที่สุดในแต่ละ mode เช่น Adsorption (Normal phase) เป็น Si , Bonded phase (Reverse phase) เป็น C18

ขั้นที่ 4 การเลือก Condition

Condition ในที่นี้หมายถึง

- ชนิดและสัดส่วนของ Solvent Mobile Phase
- Flow rate (1 - 3 มิลลิลิตรต่อนาที ขึ้นกับความดัน)
- Detector / Sensitivity
- Injection volume (ความเข้มข้น)

Separation methods



รูปที่ 31 รูปแสดงการหาปริมาณเอทานอลซึ่งแยกโดยคอลัมน์ PEG 200 ที่อุณหภูมิ 70

องศาเซลเซียส และโครมาโตแกรมทั้งสองเป็นส่วนของการเตรียมกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับ **calibration** การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- Apiluktivongsa , P. , T. Yoshida and H. Takuchi 1981 : Conversion of Starch to Ethanol by Co-immobilized Yeast and Glucoamylase in Alginate Gel . Annual Report of ICME . **44** , 287-299 .
- Arora , Dilip K. , Mukerji , K.G. and Marth , Elmer H. 1991 . Handbook of Applied Micrology (Food and Feed) . Vol.3 , Marcel Dekker Inc .
- Bonner , James and Varner , J.E. 1965 . Plant Chemistry , Academic Press .
- Collins , P.M. 1987 . Carbohydrates , Chapman and Hall Chemistry Sourcebook Ltd .
- Deman , John M. 1980 . Principles of Food Chemistry , USA , The Avi Publishing Company Inc .
- Drago , Russel S. 1992 . Physical Method for Chemist . Saunders College Publishing.
- Ewing , Galen W. 1985 . Instrumental Method of Chemical Analysis , McGraw - Hill Book Company .
- Frazier , William C. and Westhoff , Dennis C. 1988 . Food Microbiology , McGraw - Hill Book Company .
- Hideo , T. , Noboru , N. , and Hiroshi , M. 1986 : Ethanol Production from Starch by a Co-immobilized Mixed Culture System of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis* . Biotechnol . Bioeng . **28** , 1761-1768 .
- Hideo , T. , Matsumura , M. , and Veliky , L.A. 1984 : Diffusion Characteristics of Substrates in Ca-alginate Gel Beads . Biotechnol . Bioeng . **26** , 53-58 .
- Hiroshi , K. , Noboru , N. , and Hideo , T. 1988 : L-Lactic Acid Production from Starch by Co-immobilized Mixed Culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis* . Biotechnol . Bioeng . **31** , 183-187 .
- Hiroshi , K. , Noboru , N. , and Hideo , T. 1989 : Ethanol Production from Starch by a Co-immobilized Mixed Culture system of *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces cerevisiae* . Biotechnol . Bioeng . **33** , 716-723 .
- Kosaric , N.A. Wieszorek , Gregory P. Cosentino , Robert J. Magee 1983 . Biotechnology . **3** , Edited by Dellweg Weingein , Verlag chemie .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kretchmer , Norman and Hollenbeck , Clarie B. 1991 . Sugar and Sweeteners , USA, CRC Press Inc .
- Kroll , R.G. , Gilmour , A. and Sussman , M. 1993 . New Techniques in Food and Beverage Microbiology , Black Well Scientific Publication .
- Lindsay , Sandie 1991 . High Performance Liquid Chromatography , John Wiley & Sons Inc .
- Mann , J. , Davidson , R.S. , Hobbs , J.B. , Bantrophe , D.V. and Harbone , J.B. 1994 . Natural Products , UK , Longman Scientific & Technical .
- Moo-Young , M. , Lamptey , J. , and Robinson , C.W. 1980 : Immobilization of Yeast Cells on Various Supports for Ethanol Production . Biotechnol . Lett . 2 , No. 12 , 541-548 .
- Nakanishi , Koji , Goto , Tashio , Ito Sho , Natori , Shinsako and Nazoe Shigeo 1983 . Natural Product Chemistry , Kodanska Ltd .
- Parriott , Donald 1993 . A Practical Guide to HPLC Detection , Academic Press Inc .
- Rawn , J. David 1989 . Biochemistry , USA , Neil Patterson Publishers .
- Sang-Won Lee , Tomoharu Ebata , Ying-chun Liu , and Hideo Tanaka 1993 : Co-immobilization of Three Strains of Microorganisms and Its Application in Ethanol Production from Raw Starch Under Unsterile Condition . J. Ferment . Bioeng . 75 , No.1 , 36-42 .
- Suckling , Colin J. 1990 . Enzyme Chemistry Impact and Application , Chapman and Hall .