การหมักเบียร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน

FERMENTATION OF BEER BY YEAST IMMOBILIZED WITH CHITOSAN

อัจฉรีย์ เอี่ยมผ่อง
ATCHAREE IAMPHONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2543
ISBN 974-622-983-4

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การหมักเบียร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน

FERMENTATION OF BEER BY YEAST IMMOBILIZED WITH CHITOSAN

อัจฉรีย์ เอี่ยมผ่อง

ATCHAREE IAMPHONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2543

ISBN 974-622-983-4

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 38534
วัน, เดือน, ปี 5 ส.ค. 2544

FERMENTATION OF BEER BY YEAST IMMOBILIZED WITH CHITOSAN

ATCHAREE IAMPHONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE PROGRAM IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2000

ISBN 974-622-983-4

COPYRIGHT 2000
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหมักเบียร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน
นักศึกษา	นางสาวอัจฉรีย์ เอี่ยมผ่อง
รหัสประจำตัว	38064210
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2543
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. บุญเทียม พันธุ์เพ็ง

บทคัดย่อ

การทดลองนี้เป็นการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732 ด้วยไคโตแซน และทำการเปรียบเทียบกับสภาวะการตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในการหมักเบียร์โดยศึกษาทั้งระดับฟลาสก์และถังหมัก ในการศึกษาสภาวะการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนระดับฟลาสก์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการตรึงรูปเซลล์ยีสต์เมื่อนำมาหมักเบียร์ คือ สภาวะที่ทำการขึ้นรูปสารละลายผสมระหว่างสารละลายไคโตแซน 5 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วน 4 : 1 ในสารละลายผสมระหว่างสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 0.75 เปอร์เซ็นต์ และเด็กซ์แทรน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาถึงปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักซึ่งสามารถยอมรับได้คือ 4.82 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก และลักษณะของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปเมื่อมองด้วยตาเปล่าไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากทำการหมัก และเมื่อทำการตรวจวัดด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส ค่าที่ได้มีค่าสูงกว่าสภาวะอื่น คือ ก่อนทำการหมักมีค่า 760 กรัมต่อวินาที และหลังทำการหมักมีค่า 500 กรัมต่อวินาที แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการศึกษาลักษณะพื้นผิวของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) พบว่าผิวด้านนอกบางส่วนของเม็ดมีการหลุดออกไป

เมื่อนำเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนในสภาวะที่เหมาะสมมาทำการหมักในระดับถังหมักในสภาวะควบคุมการหมักเดียวกันกับระดับฟลาสก์ คือที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักมีค่า 4.57 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก

Thesis Title	Fermentation of Beer by Yeast Immobilized Chitosan
Student	Miss Atcharee Iamphong
Student ID.	38064210
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2000
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Nuanphan Naranong
Thesis Co-Advisor	Dr. Boonteam Punpeag

ABSTRACT

These experiments were conducted to study an optimized condition for immobilizing yeast cells of *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732 by chitosan and to compare with immobilizing by calcium alginate in both flask and fermentor. The optimized condition for immobilizing yeast cells were the addition of yeast cells in mixture of 0.5 % chitosan : 0.5M calcium chloride (4 : 1) , followed by dropping into a mixture of 0.75 % sodium alginate and 0.1 % dextran in order to form chitosan immobilized cell beads. Using the conditions described above, the maximum yield of ethanol, 4.82 %, was obtained at the forty-eighth hour of the fermentation. The character of immobilized cell beads showed no changes, but the studies of the morphology and surface character of immobilized cell beads by Scanning Electron Microscope (SEM), showed that some part of outer surface of immobilized cell beads were lost. From texture analysis data, the values before and after the fermentation were 760 and 500 g/sec which were higher than other conditions.

The immobilized yeast cell by chitosan was used for fermenting beer in the fermentor using the same condition as in the flask and incubated at 20 ^{0}C for 120 hours. The maximum yield of ethanol, 4.57 %, was obtained at the seventy-second hour of the fermentation.

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเพราะได้รับคำแนะนำและการตรวจแก้ไขจาก ผศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง และ ดร. บุญเทียม พันธ์เพ็ง ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาซึ่งได้ให้คำปรึกษาและแนะนำผู้วิจัยตลอดมา ผู้วิจัยรู้สึกทราบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม และ ผศ. สุวลี จันทร์กระจ่าง ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางรวมทั้งให้ความคิดเห็นและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณ ธานี วิสุทธ์ และบริษัทเบียร์ไทย 1991จำกัด ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์น้ำวอร์ตเพื่อใช้ในงานวิจัยตลอดการทดลอง พร้อมทั้งความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับเบียร์ ขอขอบคุณ คุณ สุณี พรรคประพันธ์ และสถาบันเครื่องมือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการวัดค่าเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนในการทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ บัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ช่วยจัดการและอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ สารเคมี และเอกสารต่างๆที่ใช้ในงานวิจัย ขอขอบคุณ คุณ สุทธิพงษ์ พงษ์วร และคุณ พรทวี งามพาณิชยกิจ ที่ช่วยเหลือในด้านการถ่ายภาพและจัดพิมพ์รายงานวิทยานิพนธ์ รวมทั้งเพื่อนๆที่มิอาจกล่าวนามได้ครบถ้วน ณ ที่นี้ที่ได้ช่วยเหลือเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าในการปฏิบัติงานวิจัยเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติผู้ใหญ่ และขอบใจน้องสาว น้องชาย ที่ได้สนับสนุนและให้กำลังใจตลอดมา

อัจฉรีย์ เอี่ยมผ่อง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VII

สารบัญภาพ VIII

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ที่มาของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 1

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 ประวัติความเป็นมาของเบียร์ 3

2.2 ยีสต์ในอุตสาหกรรมเบียร์ 6

2.3 การตรึงเซลล์ 7

2.4 การหมักเบียร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป 12

2.5 ไคโตแซน 13

2.6 อัลจิเนต 18

บทที่3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 20

3.1 เชื้อยีสต์ 20

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี 20

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง 22

3.3.1 การเตรียมเซลล์ยีสต์ 22

3.3.2 ศึกษาการขึ้นรูปไคโตแซน 22

3.3.3 ศึกษาการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซน 24

3.3.4 ศึกษาการหมักเบียร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนในระดับฟลาสก์

สารบัญ

หน้า

และเปรียบเทียบหารูปแบบที่เหมาะสมต่อการหมัก.....25

3.3.5 ศึกษาเปรียบเทียบการหมักเบียร์ด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่เหมาะสมกับเซลล์ยีสต์ที่ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต.....26

3.3.6 ศึกษาการหมักเบียร์ด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปในระดับถังหมัก.....26

3.3.7 ศึกษาสัณฐานและลักษณะพื้นผิวของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปก่อนและหลังการหมัก.....27

3.3.8 ศึกษาการทดสอบความชอบในผลิตภัณฑ์.....27

3.3.9 การวิเคราะห์.....28

บทที่4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....29

4.1 ผลการศึกษาการขึ้นรูปไคโตแซน.....29

4.2 ผลการศึกษาการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซน.....36

4.3 ผลการศึกษาการหมักเบียร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนในระดับฟลาสก์และเปรียบเทียบหารูปแบบที่เหมาะสมต่อการหมัก.....38

4.4 ผลการศึกษาเปรียบเทียบการหมักเบียร์ด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่เหมาะสมกับเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต.....51

4.5 ผลการศึกษาการหมักเบียร์ด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปในระดับถังหมัก.....57

4.6 ผลการศึกษาลักษณะพื้นผิวของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปก่อนและหลังการหมักโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....63

4.7 ผลการศึกษาการทดสอบความชอบในผลิตภัณฑ์.....68

บทที่5 สรุปผลการทดลอง.....71

บรรณานุกรม.....73

ภาคผนวก.....78

ก. ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำวอร์ต.....79

ข. วิธีการเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์.....80

สารบัญ

หน้า

ค. วิธีการขึ้นรูปและตรึงรูปเซลล์ยีสต์โดยใช้แคลเซียมอัลจิเนต.....81
ง. กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด 82
จ. การวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล.....84
ฉ. รูปภาพน้ำหมักและเม็ดเซลล์ยีสต์ในการทดลอง.....85
ช. รูปภาพถังหมักขนาด 20 ลิตร ที่ใช้ในการทดลอง.....88

ประวัติผู้เขียน.....89

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 แสดงส่วนประกอบของเบียร์ 4
2.2 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของข้าวบาร์เลย์และมอลต์ 5
2.3 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของฮอป 6
2.4 แสดงรูปแบบไคโตแซนในธรรมชาติ 16
4.1 แสดงผลการขึ้นรูปไคโตแซนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในสารละลายโซเดียม ไพโรฟอสเฟต 29
4.2 แสดงผลการขึ้นรูปเม็ดไคโตแซนในสารละลายผสมโซเดียมไพโรฟอสเฟต และโซเดียมอัลจิเนต 31
4.3 แสดงผลการขึ้นรูปเม็ดไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต 32
4.4 แสดงผลการขึ้นรูปเม็ดไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายผสม โซเดียมอัลจิเนตและกลูโคส 33
4.5 แสดงผลการขึ้นรูปเม็ดไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายผสม โซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน 34
4.6 แสดงค่าการวัดเนื้อสัมผัสของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน 50
4.7 แสดงผลของการวัดค่าคะแนนความชอบ 68
4.8 แสดงผลการทดลองโดยวิธี T – test ในการทดสอบความชอบในสี 69
4.9 แสดงผลการทดลองโดยวิธี T – test ในการทดสอบความชอบในกลิ่น 69
4.10 แสดงผลการทดลองโดยวิธี T – test ในการทดสอบความชอบในความขุ่น 70

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 แสดงวิธีการตรึงเซลล์....9
2.2 แสดงลักษณะของวัตถุที่สามารถทำการตรึงเซลล์ได้....10
2.3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไคติน....14
2.4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไคโตแซน....14
2.5 แสดงโครงสร้างของอัลจิเนตโดยพันธะ divalent ions....19
4.1 แสดงวิธีการขึ้นรูปสารละลายไคโตแซน....35
4.2 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต....40
4.3 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตผสมโซเดียมอัลจิเนต....41
4.4 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต....42
4.5 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมกลูโคส....43
4.6 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมเด็กซ์แทรน....44
4.7 แสดงความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการหมักเบียร์ของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนชนิดต่างๆ....45
4.8 แสดงพีเอชที่ได้จากการหมักเบียร์ของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนชนิดต่างๆ....46
4.9 แสดงความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการหมักของแผ่นเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน....48
4.10 แสดงค่าการวัดเนื้อสัมผัสของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนชนิดต่างๆ....50
4.11 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน ที่ทำการหมักเปรียบเทียบกับเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในฟลาสก์....52
4.12 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตที่ทำการหมักเปรียบเทียบกับเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนในฟลาสก์....53

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

4.13 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตที่เคลือบด้วยไคโตแซนที่ทำการหมักเปรียบเทียบกับเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนในฟลาสก์.....54
4.14 แสดงความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการเปรียบเทียบการหมักเบียร์ระหว่างเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนและเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในฟลาสก์.....55
4.15 แสดงพีเอชที่ได้จากการเปรียบเทียบการหมักเบียร์ระหว่างเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนและเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในฟลาสก์.....56
4.16 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรนในถังหมัก.....58
4.17 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตที่ทำการหมักในถังหมัก.....59
4.18 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตที่เคลือบด้วยไคโตแซนในถังหมัก.....60
4.19 แสดงความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการเปรียบเทียบการหมักเบียร์ระหว่างเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนและเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในถังหมัก.....61
4.20 แสดงพีเอชที่ได้จากการเปรียบเทียบการหมักเบียร์ระหว่างเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนและเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในถังหมัก.....62
4.21 แสดงเม็ดของเซลล์ยีสต์รูปที่ทำการศึกษาลักษณะพื้นผิวโดยวิธี SEM.....64
4.22แสดงลักษณะพื้นผิวของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนก่อนการหมัก 65
4.23แสดงลักษณะพื้นผิวของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนหลังการหมัก 65
4.24แสดงลักษณะพื้นผิวของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตก่อนการหมัก.....66
4.25แสดงลักษณะพื้นผิวของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตหลังการหมัก.....66
4.26แสดงลักษณะพื้นผิวของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซนก่อนการหมัก 67
4.27แสดงลักษณะพื้นผิวของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซนหลังการหมัก 67
ฉ-1 แสดงน้ำหมักที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนชนิดต่างๆและแคลเซียมอัลจิเนต.....85

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ฉ-2 แสดงลักษณะเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนวิธีการต่างๆและแคลเซียมอัลจิเนตในการทดลองก่อนการหมัก.....86

ฉ-2 แสดงลักษณะเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนวิธีการต่างๆและแคลเซียมอัลจิเนตในการทดลองหลังการหมัก.....87

ช แสดงถังหมัก 20 ลิตร ที่ใช้ในการทดลอง.....88

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันนี้อุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ในประเทศไทยมีแนวโน้มเติบโตขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากมีผู้นิยมดื่มเบียร์มากขึ้นตามอัตราการเพิ่มของประชากรและภาวะเศรษฐกิจของประเทศ (จันทนี จงนิตยกาล และชัชวาลย์ จันเลิศ , 2529) อีกทั้งยังเป็นเครื่องดื่มที่สากลนิยมอีกด้วย ดังนั้นจึงมีการวิจัยค้นคว้าเกี่ยว กับเทคโนโลยีในการจัดการกระบวนการผลิตเบียร์ เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพดีและมีปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว เทคโนโลยีการตรึงเซลล์ยีสต์ก็เป็นกรรมวิธีหนึ่งและนำมาประยุกต์ใช้ ซึ่งพบว่าสามารถลดระยะเวลาในกระบวนการหมักได้ สามารถนำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปนำกลับมาใช้ใหม่ และทำการแยกน้ำเบียร์ออกจากกระบวนการหมักง่ายกว่าการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ (Masschelein *et al.* , 1994 ; Yamauchi *et al.* , 1994 ; Pajunen , 1996)

งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งทำการศึกษา การตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732 ด้วยไคโตแซนในสภาวะการตรึงแบบต่างๆ และคัดเลือกหาสภาวะที่เหมาะสมนำมาใช้ในการหมักเบียร์ ซึ่งไคโตแซนเป็นสารอนุพันธ์ของไคตินที่เกิดจากการกำจัดหมู่อะซิติลออกจากโครงสร้าง (N-deactylated derivative of chitin) ซึ่งส่วนมากสามารถผลิตได้จากวัตถุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมทางทะเล เช่น เปลือกและหัวของกุ้ง (Hirano , 1996) ในการวิจัยคัดเลือกใช้ไคโตแซนเป็นสารในการตรึงรูป เพื่อเป็นแนวทางในการนำวัตถุเหลือใช้จากอุตสาหกรรม มาเป็นส่วนหนึ่งในการพัฒนากรรมวิธีการผลิตเบียร์ โดยในงานวิจัยนี้ใช้การตรึงเซลล์ยีสต์ในระดับฟลาสก์และถังหมัก

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาหาวิธีการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนเพื่อใช้ในการหมักเบียร์

1.2.2 เพื่อศึกษารูปแบบของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่แตกต่างในกระบวนการหมักเบียร์

1.2.3 เพื่อศึกษากระบวนการหมักเบียร์ระยะแรกโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนในระดับถังหมัก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยนี้จะศึกษาวิธีการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732 โดยใช้ไคโตแซน เพื่อทราบถึงสภาวะการตรึงรูปที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการหมักเบียร์ และนำมาเปรียบเทียบกับการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ทั้งในระดับฟลาสก์และถังหมัก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถหาวิธีตรึงเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้ในการหมักเบียร์ระยะแรกได้

1.4. 2 สามารถหารูปแบบของวัตถุตรึงเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้ในการหมักเบียร์ระยะแรกได้

1.4.3 เพื่อเป็นแนวทางในการพิจารณากรรมวิธีการผลิตเบียร์แบบใช้การตรึงเซลล์ยีสต์ในการหมักที่ได้จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ และทำการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซน

บทที่ 2
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติความเป็นมาของเบียร์

ได้มีการค้นพบว่าเบียร์ (Beer) เป็นเครื่องดื่มที่มีมาตั้งแต่ยุคสมัยบาบิโลน ซึ่งได้จากการหมักสารสกัดจากมอลต์ หรือ ข้าวบาร์เลย์ โดยมีการปรุงแต่งกลิ่นรสโดยสมุนไพร คือ ฮอป (Hop) (Brown *et al.* , 1987) และยังค้นพบว่าเป็นเครื่องดื่ม ที่นิยมในแต่ละชาติ โดยมีกรรมวิธีการผลิต และชื่อเรียกตามท้องถิ่นที่แตกต่างกัน เช่น อียิปต์ กรีกและโรมัน แอฟริกา เรียกว่า Kaffir beer จีน เรียกว่า kiu อินเดีย เรียกว่า sura เม็กซิโก เรียกว่า Sendecho (Hardwick, 1983)

ชนิดของเบียร์มีหลายชนิด เช่น lager beer pilsner beer munchner beer bock beer ale beer stock ale stout หรือ porter และ kraeusen beer ซึ่งแตกต่างกันที่สีและรสชาติ สาเหตุเพราะความแตกต่างของสภาวะการผลิต และปริมาณของวัตถุดิบ ซึ่งพื้นฐาน คือ ข้าวบาร์เลย์ น้ำ ฮอป ยีสต์ และส่วนประกอบเสริมซึ่งเรียกว่า แอ็ดจังท์ (adjunct) เพื่อปรุงแต่งกลิ่น รส (Tenny, 1954)

กระบวนการผลิตเบียร์เริ่มจากนำมอลต์ที่บดละเอียดไปต้มกับน้ำบริสุทธิ์ในถังสเตนเลสขนาดใหญ่ ณ อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อกระตุ้นให้เอนไซม์เปลี่ยนแป้งในมอลต์ให้เป็นน้ำตาล จากนั้นกรองกากมอลต์ออกพร้อมเติมน้ำให้ใสขึ้น ของเหลวรสหวานที่ได้จากมอลต์นี้เรียกว่า น้ำวอร์ต (wort) นำน้ำวอร์ตต้มพร้อมเติมฮอป (hop) ซึ่งช่วยทำให้เบียร์มีรสขม กรองเอาฮอปออก แล้วนำสู่กระบวนการหมัก ขั้นตอนการหมักเริ่มด้วยการนำน้ำวอร์ตใส่ในถังสเตนเลส และเติมยีสต์ลงไปเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลมอลต์เป็นแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทั่วไปการหมักในขั้นนี้จะใช้เวลาประมาณ 7 วัน หลังจากนั้นจะนำไปหมักขั้นที่สอง หรือเรียกว่าการบ่ม โดยการกรองน้ำเบียร์อ่อน (young beer หรือ green beer) นำไปบ่มในถังเพื่อให้เกิดกลิ่น และรสของเบียร์ (Hough and Button,1972 ; Brown *et al.* , 1987)

ส่วนประกอบของเบียร์ประกอบด้วย น้ำ แอลกอฮอล์ คาร์โบไฮเดรต สารประกอบไนโตรเจน สารประกอบอนินทรีย์ กรดอนินทรีย์ คาร์บอนไดออกไซด์ และสารประกอบอื่น ๆ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงส่วนประกอบของเบียร์

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนของ สารประกอบเคมี	แหล่งที่มา
Water	90	1	
Alcohol	4	1	Yeast , Malt
Carbohydrate	4	16	Malt , Adjunct
Inorganic salts	0.8	10	Wort , Malt
Nitrogen compounds	0.3	35	Malt
Organic acids	0.2	13	Yeast , Malt
CO_2	0.5	1	Yeast
Other compounds	0.2	$\pm$750	Malt , Yeast , Hop

ที่มา : Hardwick, 1983

ปริมาณแอลกอฮอล์ของเบียร์มีความแตกต่างกันแล้วแต่ความนิยมของผู้บริโภคแต่ละท้องถิ่น เช่น ในแถบยุโรป โดยส่วนมากนิยมเบียร์ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ประมาณ 3 – 5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับในประเทศไทย บริษัทเบียร์ไทย 1991 จำกัด ได้ผลิตเบียร์ออกมาวางจำหน่ายในท้องตลาด 2 ยี่ห้อ คือ เบียร์คาร์ลสเบริกและเบียร์ช้าง โดยมีปริมาณแอลกอฮอล์ 5.4 และ 6.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งในรูปแบบของเบียร์สดและเบียร์ธรรมดา (ธานี วิสุทธ์ , 2543)

ส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญที่มีผลต่อกลิ่นรสของเบียร์ในข้าวบาร์เลย์ มอลต์ และ ฮอป แสดงดังตารางที่ 2.2 และ 2.3

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของข้าวบาร์เลย์และมอลต์

ส่วนประกอบ	อัตราส่วน (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)	
	ข้าวบาร์เลย์	มอลต์
Starch	63 - 65	58 - 60
Sucrose	1 - 2	3 – 5
Reducing sugars	0.1 - 0.2	3 – 4
Other sugars	1	2
Soluble gums	1 - 1.5	2 – 4
Hemicelluloses	8 - 10	6 – 8
Cellulose	4 - 5	5
Lipids	2 - 3	2 – 3
Crude 'protein' (N x 6.25)	8 - 11	8 - 11
Albumin	0.5	2
Hordein - ' protein'	3 - 4	2
Glutelin - 'protein'	3 - 4	3 - 4
Amino-acid and peptides	0.5	1 - 2
Nucleic acids	0.2 - 0.3	0.2 - 0.3
Minerals	2.0	2.2
Other substances	5 - 6	6 - 7

ที่มา : Hough and Button ,1972

ตารางที่ 2.3 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของฮอป

สารประกอบ	ส่วนประกอบ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)
α-Acids	2-12
β-Acids	2-10
Essential oils	0.5-1
Polyphenols	2-4
Oil and fatty acids	Traces to 25%
Wax and steroids	Trace
Protein	15
Cellulose	40-50
Water	8-12
Chlorophyll	Trace
Pectins	2
Ash	10

ที่มา : Stewart and Russell, 1985

2.2 ยีสต์ในอุตสาหกรรมเบียร์

หน้าที่หลักในการหมักเบียร์ของยีสต์ คือเปลี่ยนน้ำตาลในน้ำวอร์ตให้เป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ยังให้สารที่เป็นกลิ่นและรสชาติของเบียร์ ซึ่งกลไกในการเกิดสารประกอบเหล่านี้ยังไม่ชัดเจนนัก (Hammond, 1993)

ยีสต์ในอุตสาหกรรมเบียร์ทั้งหมดจัดอยู่ในจีนัส *Saccharomyces* สามารถแบ่งชัดเจนได้ 2 ลักษณะคือ สายพันธุ์ top-fermenting ซึ่งใช้สำหรับการผลิตเบียร์แบบ ale beer และสายพันธุ์ bottom-fermenting ซึ่งใช้สำหรับการผลิตเบียร์แบบ lager beer โดยที่คุณสมบัติสำคัญที่สามารถแบ่งแยกได้ คือยีสต์สายพันธุ์ bottom-fermenting สามารถหมักน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์มอลโทไทรโอส (disaccharide maltotriose) แต่ยีสต์สายพันธุ์ top-fermenting ไม่สามารถกระทำได้ ซึ่งยีสต์สายพันธุ์นี้ที่จำแนกได้คือ *Saccharomyces cerevisiae* และยีสต์สายพันธุ์ top-fermenting คือ *Saccharomyces carlsbergensis* ซึ่งภายหลังเปลี่ยนให้

อยู่สายพันธุ์ *Saccharomyces uvarum* (Stewart and Russell, 1985 ; Hammond, 1993 ; Barney, 1995)

คุณสมบัติสำคัญของยีสต์ที่ต้องการในกระบวนการหมักและคุณภาพของเบียร์มีอยู่หลายประการ เช่น ความสามารถในการตกตะกอน การให้สีกลิ่นรสของเบียร์ และการหมักน้ำตาลมอลโทรไทรโอส เป็นต้น ในอดีตสายพันธุ์ยีสต์ที่นำมาทำการหมักใช้จากธรรมชาติ โดยที่ใช้เชื้อยีสต์ที่ติดมากับข้าวมอลต์ หรือใช้จากเชื้อที่ทำการหมักไปแล้วในแต่ละการหมักที่มีความพอใจแล้วทำการเก็บเชื้อไว้ อีกทั้งยังมีปริมาณยีสต์ที่เก็บไว้น้อย ต่อมามีการใช้เทคนิคทางพันธุ์ศาสตร์ในการศึกษายีสต์ และคัดเลือกเก็บไว้ใช้ เช่น การผสมพันธุ์เซลล์ยีสต์ใหม่ (hybridization breeding) และในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ เทคโนโลยีที่สำคัญ คือการผลิตสายพันธุ์ยีสต์ที่ให้คุณภาพของเบียร์ที่ตรงต่อความต้องการได้ (Beech *et.al.*, 1985)

2.3 การตรึงเซลล์ (Immobilized cell)

เซลล์ของสิ่งมีชีวิตเป็นแหล่งที่รวมของเอนไซม์ต่างๆที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมที่เป็นประโยชน์มากมาย ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการแปรรูปวัตถุดิบ เพื่อเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยการใช้เซลล์ของสิ่งมีชีวิตนั้น เทคโนโลยีการตรึงเซลล์ได้พัฒนามาจากเทคโนโลยีการตรึงเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์มีราคาแพงและมีปริมาณน้อย เมื่อทำการตรึงแล้วจะสามารถทำให้เอนไซม์มีปริมาณความเข้มข้นมากขึ้น ซึ่งสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่เร็วขึ้นอีกทั้งสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Kierstan and Bucke, 1977 ; อรไท สุขเจริญ, 2538) มีรายงานศึกษาวิจัยค้นคว้าเรื่องการตรึงเซลล์มากมาย ซึ่งแตกต่างกันตามจุดประสงค์ของผู้ทำการวิจัย ดังนี้

ในปี ค.ศ. 1981 Williams และ Munnecke ได้ทำการศึกษาการตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลโดยใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนต 1.5 เปอร์เซ็นต์ หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05 โมล พบว่าอัตราการผลิตเอทานอลขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำตาล

ในปี ค.ศ. 1982 McGhee และคณะ ได้ทำการศึกษาการตรึงเซลล์แต่ละสายพันธุ์ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2034, *Sacchromyces uvarum* NRRL Y-1347, *Zymomonas mobilis* NRRL B-806 ในแคลเซียมอัลจิเนต เพื่อทำการผลิตเอทานอลจากสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1, 3, 5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์ยีสต์ สามารถใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เปลี่ยนเป็นเอทานอลได้หมด แต่เซลล์ทั้งสองชนิดจะเกิดการต่อต้านที่ความเข้มข้นของกลูโคส 20 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์แบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้เพียง 90 เปอร์เซ็นต์

ในปี ค.ศ. 1986 Abdel-Halim และคณะ ได้ทำการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ *Penicillium chrysogenum* สายพันธุ์ ATCC 12690 และ S1 ที่ทำการตรึงเซลล์ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต และนำไปใช้ในการหมักเพนนิซิลลิน พบว่าลักษณะของเส้นใยที่เจริญภายในและบนพื้นผิวเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ ชนิดของอาหารที่ทำการเลี้ยง และระยะเวลาในการหมัก ซึ่งสายพันธุ์ ATCC 12690 จะเจริญได้ดีภายในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต แต่สายพันธุ์ S1 จะเจริญได้ดีบนพื้นผิวเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต

ในปี ค.ศ. 1986 Gosmann และ Rehm ได้ทำการศึกษาการใช้ออกซิเจนในการตรึงเซลล์ *Pseudomonas putida, Saccharomyces cerevisiae* และ *Aspergillus niger* เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนในเซลล์ตรึงรูปเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และอัลจิเนต

ในปี ค.ศ. 1988 Klein และ Vorlop ได้ทำการศึกษาเซลล์ตรึงรูป และทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้กับเซลล์อิสระ พบว่า ประโยชน์ของเซลล์ตรึงรูปนั้น สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ มีความสะดวกต่อการแยกออกมาจากผลิตภัณฑ์ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้อย่างต่อเนื่อง อีกทั้งภายในเซลล์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดจึงทำให้เกิดประโยชน์ในการนำมาใช้อย่างมาก ในการพัฒนาการของการผลิตเซลล์ตรึงรูปสามารถใช้ได้ในรูปของเซลล์มีชีวิต เซลล์จุลินทรีย์ เซลล์ของพืชและเซลล์ของสัตว์ ซึ่งพวกเขาได้สรุปวิธีการตรึงเซลล์ไว้ดังนี้ (แสดงดังรูปที่ 2.1)

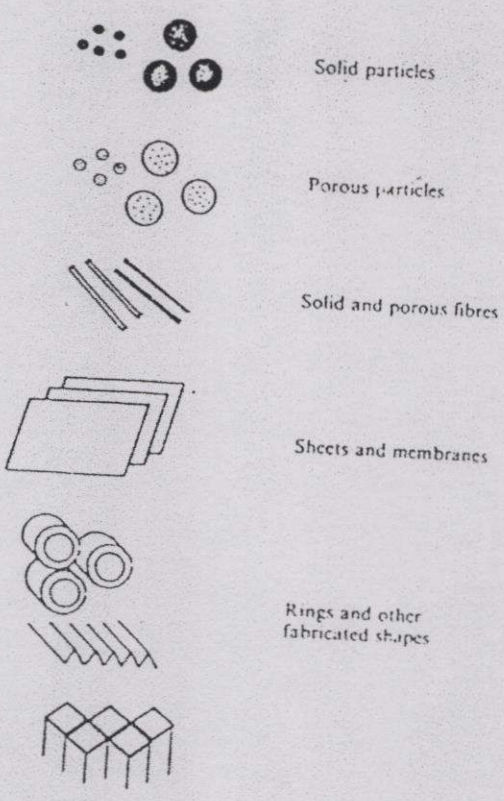
1. การดูดซับที่ผิวของสารรองรับ โดยวิธีการทางกายภาพ (adsorption on a surface) การดูดซับนี้เป็นวิธีที่ง่าย โดยเซลล์ถูกตรึงบนวัตถุตรึงของแข็ง เช่น ถ่านหิน (active charcoal) ลูกแก้วมีรูพรุน (porous bead) ซึ่งลักษณะของวัตถุตรึงมีหลายชนิด (แสดงดังรูปที่ 2.2) แรงที่ตรึงเป็นแรงที่อ่อน ทำให้เกิดการหลุดได้ง่าย

2. การยึดเซลล์ด้วยแรงโควาเลนท์ (covalent binding to a carrier) เป็นการเชื่อมระหว่างเซลล์กับวัตถุตรึงด้วยพันธะโควาเลนท์

3. การไขว้ประสาน (cross-linking of cell) เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยใช้วัตถุตรึงที่มี multifunctional reagents เกิดการจับต่อตัวเซลล์แบบไขว้ประสาน

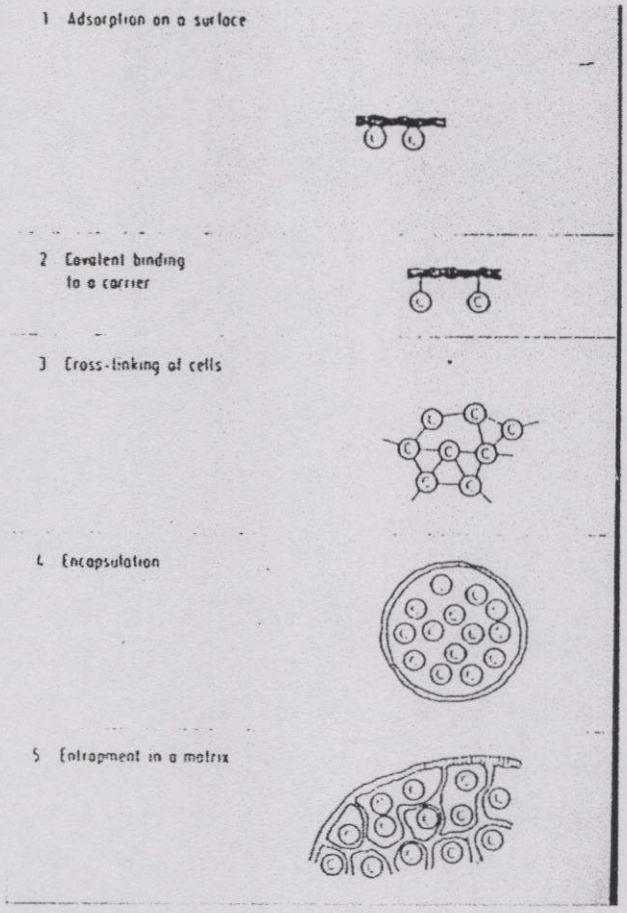
4. การเกิดแคปซูลในการตรึงเซลล์ (encapsulation) วัตถุตรึงที่ใช้ จะสามารถตรึงเซลล์จุลินทรีย์ไว้ภายใน เหมือนกับการเกิดแคปซูล

5. การดักจับเซลล์ในวัตถุตรึง (entrapment in a matrix) วัตถุตรึงที่ใช้จะสามารถดักจับและตรึงเซลล์จุลินทรีย์ไว้ภายในได้



ที่มา : Klein and Vorlop , 1988

ภาพที่ 2.1 แสดงวิธีการตรึงเซลล์ (Methods of cell immobilization)



ที่มา : Tampion and Tampion , 1987

ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะของวัตถุ ที่สามารถทำการตรึงเซลล์ได้

ในปี ค.ศ. 1989 Kurosawa และคณะ ได้ทำการพัฒนาการตรึงเซลล์ โดยทำการตรึงเซลล์ร่วมระหว่างเชื้อ *Aspergillus awamori* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตเพื่อทำการผลิตเอทานอล พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะเจริญแข่งขันกันบริเวณ oxygen-rich surface และมีเซลล์จำนวนหนึ่งหลุดออกมา ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยมาก แต่เมื่อทำการเติมสารประกอบ biocidal (vantocil IB) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เซลล์ทั้ง 2 ชนิด แบ่งแยกบริเวณการเจริญ โดย *Aspergillus awamori* จะเจริญบริเวณ oxygen-rich surface

และ *Saccharomyces cerevisiae* จะเจริญหนาแน่นบริเวณส่วนในเข้าไป ปริมาณเซลล์ที่หลุดออกมาลดลง สามารถผลิตเอทานอลได้ 4.5 และ 12.3 กรัมต่อลิตร จากแป้ง 16 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 1991 Sroka และ Rzedowski ได้ทำการตรวจสอบอัตราส่วนของสารที่ได้จากการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องและแบบแบช (อะซิทาลดีไฮด์ เอทิลเอซิเทต เมทานอล โพรพานอล และ ไอโซบิลทานอล) ด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูป สายพันธุ์ 0 - 11 โดยการดูดซับบนวัตถุต่างๆ (โฟมโพลีสไทรีน กระดูก ชิ้นไม้ และ เม็ดแก้วมีรูพรุน) พบว่ามีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการตรึงโดยใช้แคลเซียมอัลจิเนตและแคลเซียมแพคทีเนตเจล

ในปี ค.ศ. 1992 Demuyakor และ Ohta ได้ทำการตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* KPY 32 บนเม็ดเซรามิคที่มีรูพรุน เพื่อผลิตเอทานอล พบว่าอัตราปฏิกิริยาการเกิดมีความสัมพันธ์กับปริมาณของ ค่าพีเอช กลีเซอรอล และเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส

ในปี ค.ศ. 1994 Veliky และ Mclean ได้ให้การรับรองในการใช้การตรึงเซลล์ที่มีชีวิตในขบวนการหมักในอุตสาหกรรมอาหารเป็นอย่างดี ทดแทนการผลิตไวน์หรือเครื่องดื่มแอลกอฮอลล์แบบเก่าที่ได้จากการตรึงแบคทีเรียแบบง่ายๆบนชิ้นไม้ เช่น การผลิตฟรักโทสไซรับ (fructose syrup) เอทานอล และสารละลายอื่น ๆ

ในปี ค.ศ. 1996 Yoo และคณะ ได้ทำการศึกษาการตรึงเซลล์ *Lactobacillus casei* โดยอัลจิเนต 2 รูปแบบ คือ แบบแผ่น และ แบบแคปซูล สำหรับการผลิตกรดแลคติค พบว่าการตรึงโดยใช้อัลจิเนตแบบแคปซูลสามารถให้จำนวนความเข้มข้นของเซลล์มากกว่า 1.5 เท่า แต่อย่างไรก็ตามแบเลียมอัลจิเนตมีความคงทนมากกว่าแคลเซียมอัลจิเนตในสารละลายฟอสเฟตและเลคเทต และพยายามเพิ่มความคงทนของแคปซูลแบเลียมอัลจิเนตโดยการเคลือบด้วยไคโตแซน ซึ่งสามารถทำให้เกิดการหลุดของเซลล์น้อยลง ให้อัตราการผลิตกรดแลคติคมากกว่า 2.7 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ในปี ค.ศ. 1996 Yu และคณะ ได้ทำการศึกษาการเกิดแอลกอฮอล์ จากการหมักแป้งมันฝรั่งในถังหมักแบบ packed-bed ที่มีการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักระหว่างรูปแบบของแคลเซียมอัลจิเนต 2 แบบ คือแบบเม็ด (bead) และแบบชิ้นบาง (thin gel slices) พบว่าอัตราการเกิดแอลกอฮอล์จากการหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตรูปแบบชิ้นบางเกิดได้ดีกว่า และมีความคงทนมากกว่า 3 เดือน

2.4 การหมักเบียร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป

Norton และ D'Amor ในปี ค.ศ. 1994 ได้กล่าวอ้างว่ามีรายงานวิจัยที่เผยแพร่เกี่ยวกับการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปในระดับการทดลองและระดับกึ่งอุตสาหกรรมในครั้งแรกเริ่มตั้งแต่ช่วงกลางปี ค.ศ. 1970 -1979 และระดับอุตสาหกรรมในประเทศจีน ปี ค.ศ. 1988 ซึ่งในขณะนั้นยังไม่เป็นที่น่าสนใจเนื่องจากทำความเข้าใจยาก แต่ก็ได้มีการศึกษาพัฒนาเทคนิคต่อเรื่อยมา และเขาได้ศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางกายภาพของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ พบว่ามีการใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นตัวตรึงทั้งในระดับการทดลอง กึ่งอุตสาหกรรม และอุตสาหกรรมมากที่สุดตั้งแต่ปี ค.ศ. 1975 ถึง 1988 และหลังจากนั้นเริ่มมีงานวิจัยเกี่ยวกับตัวตรึงชนิดอื่นมากยิ่งขึ้น เช่น คาร์ราจีแนน ดีอีเออี-เซลลูโลส และไคโตแซน เป็นต้น

มีรายงานเกี่ยวกับการใช้เทคโนโลยีเซลล์ยีสต์ตรึงรูปในการผลิตเบียร์โดย Masschelein และคณะ ในปี 1994 ซึ่งพบว่าสามารถทำให้เกิดการหมักที่รวดเร็ว และสามารถนำมาใช้ในช่วงระยะเวลาการบ่มเบียร์ได้ ประโยชน์ของการใช้เซลล์ตรึงรูปยีสต์นั้นเป็นเทคนิคที่ให้ความเข้มข้นของเซลล์ในระบบที่ควบคุมสูง สามารถใช้ได้อย่างต่อเนื่อง มีระยะเวลาในการใช้งานนานเป็นสัปดาห์ หรือเป็นเดือน และลดอัตราการเกิดการ wash-out แต่อย่างไรก็ตามการใช้การตรึงเซลล์ก็มีข้อเสียเนื่องจากการอัดตัวของเซลล์ยีสต์ สิ่งแวดล้อมภายในเซลล์ตรึงรูปยีสต์ รวมถึงค่าพีเอช และ ออกซิเจน ซึ่งจะมีผลต่อความเข้มข้นของสารตั้งต้น และ ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกมา พวกเขาจึงเสนอวิธีการแก้ปัญหาในการแพร่ผ่านของเซลล์ยีสต์ตรึงรูป โดยทำให้วัตถุตรึงมีรูพรุนมากขึ้น และเล็กลง ซึ่งระบบในการตรึงเซลล์จะต้องพิจารณาถึง

1. วัตถุตรึงต้องสามารถหาได้ง่าย
2. ระบบในการตรึงควรมีประสิทธิภาพ ง่าย และ ให้ผลในการใช้ที่ดี
3. วัตถุไม่ควรมีพิษทำให้เซลล์ยีสต์สามารถอยู่ได้ยาวนาน
4. วัตถุตรึงสามารถตรึงเซลล์ได้ในปริมาณมาก (น้ำหนักเซลล์ ต่อน้ำหนักวัตถุตรึง)
5. วัตถุตรึงควรมีลักษณะทางจลนพลศาสตร์ที่เข้าใจง่าย มีการแพร่กระจายที่ดี ไม่เกิดการต่อต้าน และเป็นอุปสรรคต่อการหมัก
6. วัตถุตรึงควรมีการเปลี่ยนแปลงของกรรมวิธีที่ชัดเจน และสามารถอธิบายได้

ในปี ค.ศ. 1994 Yamauchi และคณะ ได้ทำการศึกษาการหมักเบียร์ด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปโดยใช้ลูกแก้วมีรูพรุน (porous glass beads) ในระบบของถังหมักชนิด Packed bed แบบ a three - stage bioreactor ซึ่งมีข้อดี คือสามารถลดระยะในการหมักเบียร์ได้ และสามารถใช้งานเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปได้นาน เพราะลักษณะทางกายภาพที่แข็งแรงและง่ายต่อการใช้งาน และนำมาเปรียบเทียบกับเม็ดของแคลเซียมอัลจิเนต (calcium-alginate beads) ในวิธีการทำการ

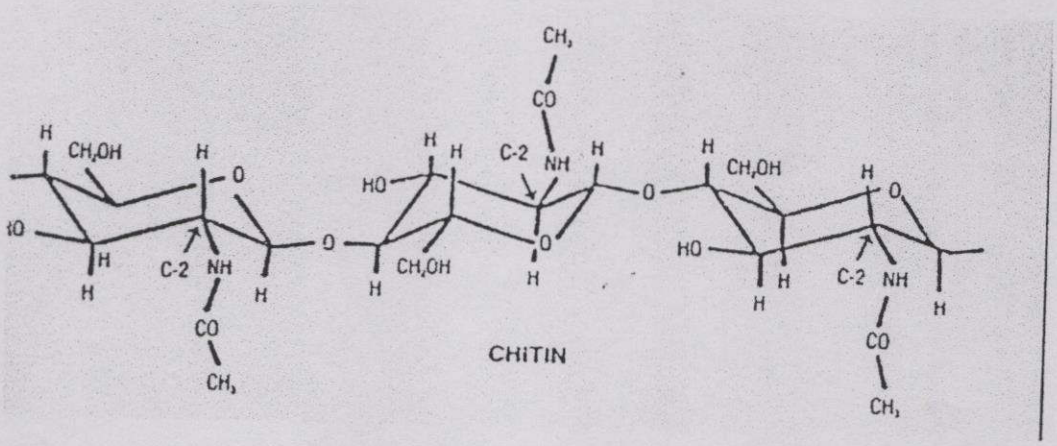
ตรึงเซลล์นั้นกระทำโดยการควบคุมขนาดรูพรุนของลูกแก้ว แล้วนำไปบรรจุในถังหมัก พบว่า อัตราการผลิตแอลกอฮอล์โดยเซลล์ตรึงรูปจากแคลเซียมอัลจิเนตสูงกว่าการใช้จากลูกแก้วมีรูพรุน แต่ความคงทนในการใช้งานให้ผลที่ตรงกันข้ามกัน

Pajunen ในปี 1996 ได้ทำการศึกษาการทำงานของยีสต์และวัตถุตรึงที่เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้งานในการหมักเบียร์ ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการผลิต เพิ่มอัตราการหมักได้รวดเร็วขึ้น สามารถปรับปรุงกระบวนการแยกผลผลิต และการออกแบบกระบวนการได้ง่ายขึ้น คุณภาพของผลิตภัณฑ์คงที่ ลดการเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้

2.5 ไคโตแซน (Chitosan)

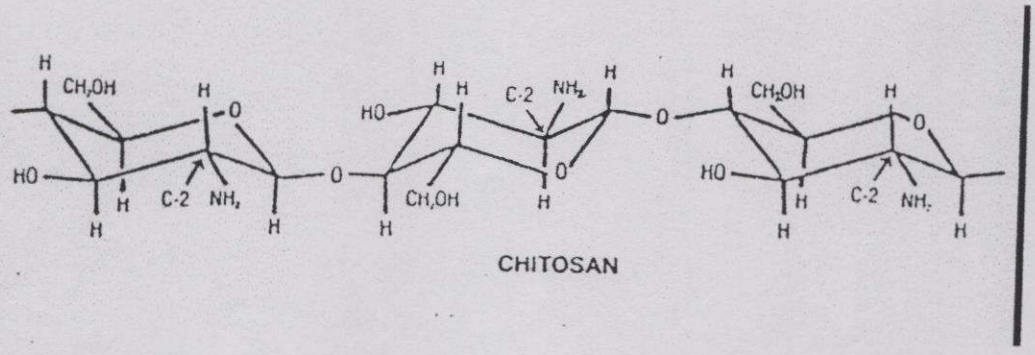
ไคโตแซนเป็นสารพอลิเมอร์จากธรรมชาติ เป็นสารอนุพันธ์ของไคติน ที่เกิดจากการแยกหมู่อะซิติลออกมาจากไคติน มีราคาไม่แพง ไม่เป็นสารพิษ และย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ได้ยาก จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมอาหารและยา เช่น ห่อหุ้มอาหาร เคลือบผักผลไม้ เป็นส่วนผสมในอาหารและเครื่องสำอาง ใช้ทำไหมเย็บแผล ผ้าพันแผล คอนแทคเลนส์ ยาลดคลอเลสเตอรอล (cholesterol)ในร่างกาย ด้านการเกษตร เช่น ใช้เป็นปุ๋ย ผสมในอาหารสัตว์ ผสมในอาหารอัดเม็ดสำหรับเลี้ยงปลาและกุ้ง ผสมในดินเพื่อปรับคุณภาพของดินเหนียว ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียบางชนิดในดิน ด้านอุตสาหกรรมทางเคมีวิเคราะห์และเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น ใช้เป็นตัวพยุงเพื่อช่วยตรึงเอนไซม์และในการผสมสารชีวภาพต่าง ๆ ใช้เป็นตัวช่วยตกตะกอนหรือแยกสารในระบบที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ เช่น ตกตะกอนโปรตีนในน้ำเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารเพื่อจะได้นำโปรตีนกลับมาใช้ใหม่ หรือทำเป็นตัวกรองเพื่อทำน้ำบริสุทธิ์สำหรับดื่มได้ (ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง, 2529 ; ไพโรจน์ โสภโณดร และคณะ, 2536 ; Martino *et al.* , 1996) ไคโตแซนสามารถผลิตได้จากกระบวนการทางเคมีในการกำจัดหมู่อะซิติลออกจากโครงสร้างของไคติน (deacetylation) ซึ่งก็คือ พอลิเมอร์ของ (1-4)-2amino-2deoxy-β-D-glucan หรือเรียกง่ายๆ ว่าพอลิเมอร์ของกลูโคซามีน (glucosamine) การเกิดไคโตแซนนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติล ซึ่งวัดได้จากค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติล การทำปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติล คิดเป็นหน่วยร้อยละ (percentage of degree of deacetylation, %DD) %DD เกินกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปแล้ว สามารถใช้พอลิเมอร์นั้นทำให้เกิดอนุพันธ์ที่ละลายในกรดอินทรีย์ได้ หรืออาจกล่าวได้ว่าการลดลงของหมู่อะซิติลในไคติน (chitin regenerated) ผลที่ได้คือ การเพิ่มหมู่อะมิโน ซึ่งเป็นการเพิ่มสมบัติการเป็นสารที่มีประจุบวก (polycationic activity) บนพอลิเมอร์ทำให้เกิดสภาพของการเป็นไคโตแซน

เพิ่มขึ้น (chitosan generation) เพราะฉะนั้นโครงสร้างของไคโตแซนต่างจากไคตินตรงหน่วยที่เป็นกลูโคซามีนในสายพอลิเมอร์เพิ่มมากเกินกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปนั่นเอง



ที่มา : สุวลี จันทร์กระจ่าง , 2542

ภาพที่ 2.3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไคติน



ที่มา : สุวลี จันทร์กระจ่าง , 2542

ภาพที่ 2.4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไคโตแซน

ซึ่งไคตินสามารถผลิตได้จากวัตถุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมทางทะเล เช่น เปลือกและหัวของกุ้ง แกนตัวปลาหมึก (Hirano, 1996 ; สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2542) นอกจากนี้ไคตินยังพบในสัตว์ตระกูล Crustacean อื่นๆ อีกเช่น ปู หอย แมลง หรือแม้กระทั่งในเห็ดรา ยีสต์ และจุลินทรีย์อีกมากมายหลายชนิด (อุดมชัย จินะดิษฐ์, 2535)

ในอุตสาหกรรมปัจจุบันการผลิตสารไคตินและไคโตแซนจากเปลือกกุ้ง ทำโดยใช้สารเคมี ได้แก่ ด่าง และกรด ดังต่อไปนี้ (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2542)

ของเหลือจากกุ้ง

↓

บดคัดขนาด

↓

แยกโปรตีนออก (โดยต้มกับด่าง 4 - 8 เปอร์เซ็นต์)

↓

ล้างน้ำให้หมดด่าง

↓

แยกเกลือแร่ออก (โดยต้มกับกรด 4 - 8 เปอร์เซ็นต์)

↓

ล้างน้ำแล้วทำให้แห้ง

↓

ไคติน

↓

ทำปฏิกิริยาลดหมู่อะซิติล (โดยใช้ด่างเข้มข้น 40 - 50 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้อุณหภูมิสูง)

↓

ล้างน้ำแล้วทำให้แห้ง

↓

ไคโตแซน

คุณสมบัติที่หลากหลายของไคโตแซนสิ่งที่น่าสนใจคือมีความสามารถในการขึ้นรูปได้หลายแบบ เช่น เป็นเจล เม็ด เส้นใย คอลลอยด์ Skjak - braek และ คณะ ใน ปี 1989 ได้ทำการสรุปรูปแบบและคุณสมบัติของไคโตแซนในธรรมชาติ ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานอุตสาหกรรม ได้ดังตารางที่ 2.4 ดังนี้คือ

ตารางที่ 2.4 แสดงรูปแบบไคโตแซนในธรรมชาติ

รูปแบบ	ลักษณะ / คุณสมบัติ
แป้ง	หยาบ
	ใช้ในการห่อหุ้ม
	ละลายได้รวดเร็ว
	มีความบริสุทธิ์สูง
ฟิล์ม	เหนียว ใส อ่อนนุ่ม มีรูพรุน
	มีการซึมผ่านของออกซิเจนและแก๊สอื่นๆได้
	ดำรงอย่างอิสระบนผิวที่มีประจุลบ
เส้นใย	เหนียว แข็งแรง
	อ่อนนุ่ม ใช้ถักทอได้
	ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ
รูปร่างวัตถุ	เหมาะสมสำหรับศัลยกรรมกระดูก
	การกัดกร่อนทางชีวภาพ
	ก่อเป็นรูปร่างขึ้นจากแม่พิมพ์ได้อย่างรวดเร็ว
เจล	มีความแข็งแรงของเจลสูง
	ฟอร์มตัวได้ง่ายกับพอลิเอมีน
เม็ด	ขึ้นรูปได้ง่าย
	ใช้เป็นวัสดุห่อหุ้ม
	สามารถเลือกขนาดได้
	สามารถทำให้มีรูพรุนขนาดต่างๆ ได้
	ง่ายต่อการเชื่อมต่อกับเอนไซม์
แป้งเปียก / โลชั่น	รู้สึกดี
	คงความชุ่มชื้น
	ตั้งเป็นสูตรได้ง่าย
สารละลาย	มีความหนืดต่ำถึงสูง
	ฟอร์มตัวอยู่ในรูปเกลือได้มากมาย
	มีลักษณะใส และโปร่งแสง

ที่มา : Skjak – braek *et al*., 1989

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

มีรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการนำไคโตแซนมาตรึงรูปเซลล์และเอนไซม์เพื่อประโยชน์ที่แตกต่างกันตามจุดประสงค์ ยกตัวอย่างดังต่อไปนี้

ในปี ค.ศ. 1989 Ohtakara และคณะ ได้ทำการศึกษาการใช้ไคโตแซนในการตรึงเอนไซม์ alpha - galactosidase และ glucoamylases เพื่อใช้ในการย่อยแป้งเป็นเวลา 25 - 30 วัน ซึ่งใช้เม็ดไคโตแซนที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 มิลลิเมตร 3 แบบ และมีการทดสอบเปรียบเทียบกับเม็ดไคโตแซนที่เพิ่มการแช่ในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ หลังจากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในเม็ดไคโตแซนแต่ละชนิด พบว่าการเพิ่มสารกลูตารัลดีไฮด์ทำให้เอนไซม์ทำงานได้เสถียรมากยิ่งขึ้น

ในปี ค.ศ.1994 Freeman และ Dror ได้ทำการศึกษาการตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้ไคโตแซนเจลที่มีความเข้มข้น 2 – 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเตรียมโดยการทำละลายด้วยกรดแอซีติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นทำให้เกิดเป็นเม็ดเจลโดยหยดสารละลายไคโตแซนลงในสารละลายที่ประกอบด้วยไกลโอซอล (glyoxal) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์เททราโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าพีเอช 8.0 เพื่อทำการศึกษาอัตราการผลิตเอทานอล

ในปี ค.ศ. 1996 Shinonaga และคณะ ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ฟอสฟอไลเปส (phospholipase D) แบบต่อเนื่อง โดยใช้เซลล์ *Streptomyces lydicus* D-121 ตรึงรูปด้วยไคโตแซนในถังหมักแบบ air-lift พบว่าอัตราการผลิตที่ได้มีอัตราที่ดีกว่าการใช้เซลล์อิสระ 3 เท่า

ในปี ค.ศ. 1996 Riso และคณะ ได้ทำการศึกษาอัตราการผลิตเอนไซม์โรดาเนส โดยใช้เซลล์ thermophilic eubacteria และ *Bacillus acidocaldariu* ชนิดละ 2 สายพันธุ์ ตรึงในเจลของแคลเซียมอัลจิเนต, เค-คาร์ราจีแนน และไคโตแซน พบว่าการตรึงโดยเซลล์ของ *Bacillus acidocaldarius* มีอัตราการผลิตดีที่สุด

ในปี ค.ศ. 1996 Sun และ Payne ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบของไคโตแซนตรึงเอนไซม์ไทโรไซเนส (tyrosinase) 3 รูปแบบ คือ แบบเม็ด (bead) แบบเกล็ด (flake) และแบบแผ่น (crushed) ในการกำจัดสารฟีนอล พบว่าไคโตแซนตรึงรูปแบบแผ่นสามารถให้ประสิทธิภาพในการดูดซับฟีนอลได้ดีที่สุดคือ 0.93 mole phenol / mole amine และรูปแบบเกล็ดให้ประสิทธิภาพน้อยที่สุดคือ 0.014 mole phenol / mole amine

ในปี ค.ศ. 1996 Martino และคณะ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของวัตถุตรึงรูปเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (β-glucosidase) 4 ชนิด คือ เซลลูโลส อัลฟาอะลูมินา แกรมมาอะลูมินา และไคโตแซน เพื่อหาความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ในกระบวนการผลิตไวน์และน้ำผลไม้ พบว่าไคโตแซนให้ผลดีที่สุดในการตรึงเอนไซม์ (500 ยูนิตต่อกรัม) แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อเสียที่มีระยะเวลาในการเก็บรักษาสั้น ซึ่งยังไม่เป็นผลดีต่อกระบวนการทางอุตสาหกรรม

38534

ในปี ค.ศ. 1996 Huguet และคณะ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารโพลีแคทไอออนิก พอลิเมอร์ (polycationic polymer) ระหว่างไคโตแซนและเด็กซ์แทรน (DEAE-dextran) ในการเคลือบเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตตรึงฮีโมโกลบิน (haemoglobin) และบูลเด็กซ์แทรน (blue dextran) พบว่าการใช้ไคโตแซนในการเคลือบให้ผลดีกว่าในการคงรูปอยู่ได้ในน้ำหรือ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 5 เดือนหรืออย่างน้อย 2 เดือน

ในปี ค.ศ. 1996 Huguet และ Dellacherie ได้ทำการศึกษาผลของสารที่ทำการตรึงรูปในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตที่เคลือบด้วยไคโตแซนได้แก่ โบวีนซีรั่มอัลบูมิน (bovine serum albumin) ฮีโมโกลบิน (human haemoglobin) และเด็กซ์แทรน (dextran) เพื่อตรวจสอบหาปัจจัยที่มีผลต่อการตรึง พบว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบในสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันระหว่างอัลบูมินและฮีโมโกลบินค่าพีเอชระหว่างการขึ้นรูปและการเก็บรักษามีผลต่อการตรึง สำหรับเด็กซ์แทรนพบว่าน้ำหนักโมเลกุลทำให้มีผลต่อการตรึงรูป

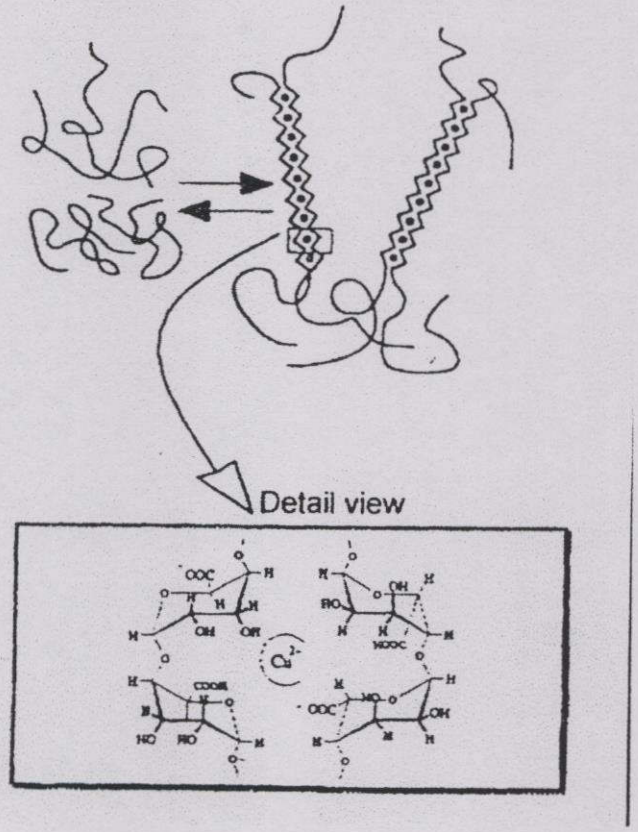
ในปี ค.ศ. 1996 Li พบว่าสามารถพัฒนากรรมวิธีในการเพิ่มความคงตัวของเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตที่ตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อการผลิตเอทานอลได้ โดยการเคลือบด้วยสารไคโตแซน เมื่อทำการเปรียบเทียบกับเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตที่มิได้ทำการเคลือบด้วยไคโตแซน พบว่าหลังจากทำการหมักเพื่อผลิตเอทานอลแล้วเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตที่ทำการเคลือบด้วยไคโตแซนให้ค่าความคงตัวของเนื้อสัมผัสสูงมากกว่า และประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลไม่เปลี่ยนแปลง

นอกจากนี้ทางอุตสาหกรรมด้านสิ่งแวดล้อมก็ยังมีการศึกษาในการประยุกต์ใช้ไคโตแซนมากมาย ซึ่งพบว่าสามารถนำไคโตแซนมาใช้ในการกำจัดโลหะหนัก เช่น Pb^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} จากการตรึงเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (Cuero , 1996) หรือการนำไคโตแซนมาทำการตรึงเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus bicellularis* บนแผ่นกรองเพื่อใช้สำหรับกระบวนการบำบัดน้ำเสียขั้นที่ 3 (Kaya and Picard , 1996)

2.6 อัลจิเนต (Alginate)

อัลจิเนตคือสารพวก glycuronan ประกอบด้วยส่วน D – mannuronic acid (M) และ L – guluronicacid (G) จะเกิดลักษณะเป็นเจลเมื่อมีแคลเซียมอิออน มีลักษณะเป็น 3 มิติ และจะไม่เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีกับเซลล์ และเซลล์สามารถอยู่ภายในเม็ดเจลได้ มีช่องรอบๆเม็ดเจลขนาดและจำนวนช่องขึ้นอยู่กับชนิดของอิออนที่ใช้ในการก่อรูปเป็นเจลและลักษณะทางธรรมชาติของอัลจิเนตที่ใช้ อัลจิเนตเป็นพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ โดยส่วนมากมาจากสาหร่ายสีน้ำตาล (Brown seaweeds เช่น สายพันธ์ *Fucus vesiculosus* หรือ *Ascophyllum*

nodosum) หรือสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น *Pseudomonas aeruginosa* ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ D – mannuranic และ L – guluronic acid เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 1,4 glycosidic เกลือโมโนวาเลนท์ของอัลจิเนตสามารถละลายน้ำได้ ในขณะที่ polyvalent cation เช่น Ca^{2+} จะทำให้เกิดการเชื่อมไขว้ เกิดเจลที่ไม่ละลายน้ำ และไม่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยาชีวเคมี ภายในเจลเป็นรูพรุนแต่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จำนวนและขนาดของรูขึ้นอยู่กับชนิดของประจุบวก (เช่น Al^{3+} หรือ Ca^{2+} ฯลฯ) ที่ใช้ในการสร้างเจลและชนิดของอัลจิเนตที่ใช้ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของประจุบวกและสารละลายอัลจิเนตด้วย ในการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตนี้ ยีสต์ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่ารูของเจล จะถูกขังไว้ภายในเจล แต่น้ำหมักและเอทานอลจะสามารถผ่านเข้าออกได้เนื่องจากมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่ารูภายในเจลนี้มาก (ไชยา ศุภเสถียร และคณะ , 2534 และ Nestle and Kimmich , 1995)



ที่มา : Nestle and Kimmich , 1995

ภาพที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของอัลจิเนตโดยพันธะ divalent ions

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อยีสต์

ยีสต์ที่ใช้ในการทดลองคือ ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Yeast Malt Extract (YM)
- Yeast Malt Extract Broth (YMB)
- น้ำวอร์ต (Wort)

(ส่วนประกอบแสดงดังภาคผนวก ก.)

3.2.2 สารเคมี

- ไคโตแซน (Chitosan) จากเปลือกกุ้ง ของ Biorugs Co.Ltd.
- กรดแอซีติก (Acetic acid) ของ Merck
- โซเดียมอัลจิเนต (Sodium-alginate) ของ The Uchin Co.Ltd.
- แคลเซียมคลอไรด์ (Calciumchloride anhydrous) ของ Merck
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide pellets) ของ Merck
- โซเดียมไพโรฟอสเฟต (Sodium Pyrophosphate pellets) ของ Merck
- โซเดียมฟอสเฟต (Sodium Phosphate pellets) ของ Merck
- กลูโคส (Glucose anhydrous:Dextrose) ของ Fluka
- เพบโทน (Bacto Peptone) ของ Difco
- ยีสต์สกัด (Yeast Extract) ของ Difco
- มอลต์สกัด (Malt Extract) ของ Difco
- เบนโทไนต์ (Bentonite) ของ Fluka
- สารละลายบัฟเฟอร์ ของ Merck
- สารละลายเอทานอล ของ Merck
- สารละลายกลูทารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) ของ Merck

- สารละลายออสเมียมทีโทรไซด์ (Osmium tetroxide) ของ Merck
- โพแทสเซียมโซเดียมทาร์ทาเรท (Potassium sodium tartarate) ของ Fluka
- กรดไดไนโทรซาลิไซลิค (3,5-Dinitrosalicylic acid) ของ Fluka

3.2.3 อุปกรณ์

- เครื่องแก้วต่างๆ ของ PYREX ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ หลอดทดลอง บีกเกอร์ ปิเปตต์ ขวดวัดปริมาตร
- เครื่องชั่งละเอียด (Sartoriu รุ่น 2842)
- เครื่องชั่งหยาบ (Sartorius รุ่น B-3100S)
- หม้อนึ่งอัดไอ (HIRAYAMA MANUFACTURING CORPORATION รุ่น HA-3D)
- ตู้ปลอดเชื้อ (FASTER รุ่น Bio48)
- กล้องจุลทรรศน์ (Nikon รุ่น YS2-H)
- ตู้อบ (WTB binder รุ่น FD53)
- ลวดเขี่ยเชื้อ และตะเกียงแอลกอฮอล์
- ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)
- เครื่องเขย่า (Gallenkamp รุ่น SGM 300)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (CHERMLE รุ่น ZK 380)
- เครื่องวัดพีเอช (TOA Electronics LTD. รุ่น HM-7E)
- เครื่อง Incubator shaker (New Brunswick Scientific รุ่น Psycro Therm TM)
- ตู้บ่ม 20 องศาเซลเซียส (SHEL-LAB รุ่น 2020)
- ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส (Schwabach W- Germany รุ่น Menmert 854)
- หลอดเข็มฉีดยาพลาสติกขนาด 20 มิลลิลิตร
- เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Shimadzu รุ่น GC-7AG)
- เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (HACH Company รุ่น DR/4000)
- บิวเรตต์ และอุปกรณ์ประกอบ
- เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analysis) (Stable mycrosystem รุ่น 5S)
- ถังหมัก (New Brunswick Scientific รุ่น Bio Flo IV)

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การเตรียมเซลล์ยีสต์

นำเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง YM อายุ 2 วัน ปรับความเข้มข้นของเซลล์อยู่ระหว่าง 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการตรวจนับจำนวนด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ แล้วนำเซลล์ที่ปรับความเข้มข้นใส่ลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศา เซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยทำการปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำวอร์ต 2 ครั้ง เซลล์ยีสต์เปียก (wet yeast cells) ที่ได้จะนำไปใช้ในการตรึงเซลล์ในการศึกษาต่อไป

3.3.2 ศึกษาการขึ้นรูปไคโตแซน

3.3.2.1 <u>ศึกษาหาความเข้มข้นไคโตแซนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการขึ้นรูป</u>

เตรียมสารละลายไคโตแซนที่มีความเข้มข้น 1.5 2 3 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยทำการละลายสารไคโตแซนด้วยสารละลายกรดแอซีติก ที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเตรียมในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ทำการละลายโดยการเขย่าทิ้งไว้บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกระทั่งสารไคโตแซนละลายหมด นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นนี้ไปทำการขึ้นรูป โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Kaya และ Picard (1996) ซึ่งทำการขึ้นรูปโดยการบรรจุสารละลายไคโตแซนในกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นค่อยๆหยดสารละลายไคโตแซน ลงในภาชนะที่มีสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการกวนอย่างสม่ำเสมอ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เม็ดไคโตแซนที่ได้คงรูป จากนั้นนำเม็ดไคโตแซนมาล้างด้วยสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีพีเอช 7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ข.) 3 ครั้ง สังเกตลักษณะเม็ดไคโตแซนที่ได้จากการขึ้นรูปในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายไคโตแซน เพื่อเลือกหาความเข้มข้นของสารละลายไคโตแซนที่เหมาะสมใช้ในการขึ้นรูปต่อไป

3.3.2.2<u>ศึกษาการขึ้นรูปไคโตแซนในสารละลายผสมระหว่างโซเดียมไพโรฟอสเฟตและโซเดียมอัลจิเนต</u>

เตรียมสารละลายไคโตแซนที่มีความเข้มข้นเหมาะสมมาทำการขึ้นรูปตามวิธีในข้อ 3.3.2.1 โดยค่อยๆหยดสารละลายไคโตแซนในสารละลายผสมระหว่างโซเดียมไพโรฟอสเฟตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการผสมในอัตราส่วนต่างๆกัน คือ 5 : 95, 10 : 90, 20 : 80 และ 50 : 50 สังเกตลักษณะเม็ดไคโตแซนที่ได้จากการขึ้นรูปในสารละลายผสม

3.3.2.3 <u>ศึกษาการขึ้นรูปไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต</u>

เตรียมสารละลายไคโตแซนที่มีความเข้มข้นเหมาะสมตามวิธีในข้อ 3.3.2.1 นำสารละลายไคโตแซนผสมกับเบนโทไนต์ โดยทำการผสมในอัตราส่วนต่างๆกัน คือ 95 : 5, 90 : 10, 80 : 20 และ 50 : 50 โดยดัดแปลงวิธีการมาจาก Zeng และ Ruckenstein (1996) จากนั้นทำการขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 3.3.2.1 เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการขึ้นรูปไคโตแซน

3.3.2.4 <u>ศึกษาการขึ้นรูปไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายผสมระหว่างโซเดียมอัลเนตและกลูโคส</u>

นำสารละลายไคโตแซนที่มีความเข้มข้นเหมาะสมจากข้อ 3.3.2.1 มาผสมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยทำการผสมสารทั้งสองในอัตราส่วนต่างๆกัน คือ 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1 และ 4 : 1 จากนั้นนำมาทำการขึ้นรูปในสารละลายผสมระหว่างโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 2.25 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 3.3.2.1 โดยดัดแปลงวิธีการมาจาก Knorr และคณะ (1989) เพื่อเปรียบเทียบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการขึ้นรูปไคโตแซนต่อไป

3.3.2.5 <u>ศึกษาการขึ้นรูปไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายผสมระหว่างโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน</u>

นำสารละลายไคโตแซนที่มีความเข้มข้นเหมาะสมจากข้อ 3.3.2.1 มาผสมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยทำการผสมสารทั้งสองในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.2.4 มาทำการขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ที่ผสมเด็กซ์แทรน 2 1 0.5 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยดัดแปลงวิธีการมาจาก Knorr และคณะ (1989) เพื่อหาปริมาณเด็กซ์แทรนที่เหมาะสมในการขึ้นรูปไคโตแซนต่อไป

3.3.3 ศึกษาการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซน

3.3.3.1 ศึกษาการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนที่ทำการขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (Ch)

นำสารละลายไคโตแซนที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2.1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการผสมกับเซลล์ยีสต์เปียก 12 กรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่ทำการทดสอบแล้วว่าเหมาะสมในสภาวะปลอดเชื้อ กวนอย่างช้าๆ จนเซลล์ยีสต์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ หลังจากนั้นนำไปบรรจุในกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นค่อยๆ หยดสารละลายผสมไคโตแซนและเซลล์ยีสต์ ลงในภาชนะที่มีสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ที่มีการกวนอย่างสม่ำเสมอ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนมาทำการล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีพีเอช 7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 3 ครั้ง เพื่อใช้ในการหมักเบียร์ต่อไป

3.3.3.2 ศึกษาการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนที่ทำการขึ้นรูปในสารละลายผสมระหว่างโซเดียมไพโรฟอสเฟตและโซเดียมอัลจิเนต (ChS)

นำสารละลายไคโตแซนที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมผสมกับเซลล์ยีสต์เปียกในอัตราส่วนเหมือนข้อ 3.3.3.1 และทำการขึ้นรูปเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน โดยใช้สารละลายผสมระหว่างโซเดียมไพโรฟอสเฟตความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ได้จะนำไปใช้ในการหมักเบียร์ในขั้นต่อไป

3.3.3.3 ศึกษาการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ที่ทำการขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (ChB)

นำสารละลายไคโตแซนที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมผสมกับเบนโทไนต์ในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.2.3 หลังจากทำการผสมสารละลายไคโตแซนและเบนโทไนต์เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำมาทำการผสมเซลล์ยีสต์เปียกในอัตราส่วนเหมือนข้อ 3.3.3.1 และทำการขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการขึ้นรูปเหมือนดังข้อ 3.3.3.1 เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ได้จะนำไปใช้ในการหมักเบียร์ในขั้นต่อไป

3.3.3.4 ศึกษาการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ทำการขึ้นรูปในสารละลายผสมระหว่างสารละลายโซเดียมอัลจิเนตและกลูโคส (ChG)

นำสารละลายไคโตแซนที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมผสมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.2.4 หลังจากทำการผสมสารละลายทั้งสองจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำมาทำการผสมเซลล์ยีสต์เปียกในอัตราส่วนเหมือนข้อ 3.3.3.1 และทำการขึ้นรูปในสารละลายผสมระหว่างสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความ

เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ที่มีกลูโคส 2.25 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการขึ้นรูปเหมือนดังข้อ 3.3.3.1 เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ได้จะนำไปใช้ในการหมักเบียร์ในขั้นต่อไป

3.3.3.5 ศึกษาการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ทำการขึ้นรูปในสารละลายผสมระหว่างสารละลายโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD)

นำสารละลายไคโตแซนที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมผสมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.2.4 หลังจากทำการผสมสารละลายทั้งสองจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำมาทำการผสมเซลล์ยีสต์เปียกในอัตราส่วนเหมือนข้อ 3.3.3.1 และทำการขึ้นรูปในสารละลายผสมระหว่างสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมเด็กซ์แทรนในเปอร์เซ็นต์ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.2.5 โดยทำการขึ้นรูปเหมือนดังข้อ 3.3.3.1 เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ได้จะนำไปใช้ในการหมักเบียร์ในขั้นต่อไป

3.3.3.6 ศึกษาการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนแบบแผ่น

ทำการขึ้นรูปเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนโดยใช้สารละลายที่ทำการขึ้นรูปและสารละลายที่ใช้ในการขึ้นรูปเหมือนข้อ 3.3.3.1 3.3.3.2 3.3.3.3 3.3.3.4 และ 3.3.3.5 ซึ่งมีวิธีการทำการขึ้นรูปโดยเทสารละลายผสมเซลล์ที่ต้องการจะขึ้นรูปในถาดรูปสี่เหลี่ยมขนาด 14 X 14 X 5 เซนติเมตร และนำไปจุ่มในสารละลายที่ทำให้ขึ้นรูป เมื่อได้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่เป็นแผ่นแล้ว นำมาตัดให้มีขนาด 3.5 X 3.5 เซนติเมตร และทำการล้างแผ่นเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 3 ครั้ง

3.3.4 ศึกษาการหมักเบียร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนในระดับฟลาสก์และเปรียบเทียบหารูปแบบที่เหมาะสมต่อการหมัก

3.3.4.1 ศึกษาการหมักเบียร์โดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูป

นำเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.3.1 3.3.3.2 3.3.3.3 3.3.3.4 และ 3.3.3.5 มาทำการหมักเบียร์ โดยใช้ปริมาตรของสารละลายไคโตแซนที่ตรึงรูปแล้ว 25 มิลลิลิตร (ประมาณ 170 เม็ด) ต่อน้ำวอร์ต 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอช ทำการศึกษาความแตกต่างของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนก่อนและหลังการหมัก ทำการวัดเนื้อสัมผัส (Texture) ของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปทั้งก่อนและหลังการหมัก ด้วยเครื่อง Texture analysis (TA-XT 2I) โดยกำหนดแรงกดมีค่า 70 เปอร์เซ็นต์ ของความสูงของตัวอย่าง และสังเกตลักษณะของน้ำเบียร์ที่ได้จากการหมักของแต่ละชนิดของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน

3.3.4.2 ศึกษาการหมักเบียร์โดยใช้แผ่นเซลล์ยีสต์ตรึงรูป

นำแผ่นเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่ได้จากข้อ 3.3.3.6 มาทำการหมักเบียร์และวิเคราะห์ผลเหมือนดังข้อ 3.3.4.1

3.3.5 ศึกษาเปรียบเทียบการหมักเบียร์ด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่เหมาะสมกับเซลล์ยีสต์ที่ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA, CCh)

นำเซลล์ยีสต์ที่ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ให้ผลผลิตของเบียร์ดี และยังคงสภาพเดิม ที่เหมาะสมแล้วจากข้อ 3.3.4 มาเปรียบเทียบการหมักเบียร์กับเซลล์ยีสต์ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ตามวิธีที่ได้ดัดแปลงมาจาก Yamauchi และคณะ ในปี 1994 (CA) และวิธีของ Huguet และ Dellacherie ในปี 1996 (CCh) โดยทำการหมักเบียร์ตามวิธีการดังข้อ 3.3.4 (วิธีการเตรียมเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต แสดงดังภาคผนวก ค.)

3.3.6 ศึกษาการหมักเบียร์ด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปในระดับถังหมัก

3.3.6.1 ขั้นตอนการเตรียมถังหมัก

3.3.6.1.1 ทำการตรวจสอบความพร้อมของถังหมัก เพื่อที่จะใช้ในการทำการหมัก โดยตรวจสอบระบบ น้ำ ลม ไฟ

3.3.6.1.2 ทำการฆ่าเชื้อถังหมักที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1 พาสคาล เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นทิ้งให้ถังหมักอยู่ในสภาวะ Growth Phase (ถังหมักมีอุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส)

3.3.6.1.3 ตั้งระบบถังหมักให้อยู่ในสภาพพร้อมต่อการหมักคือใส่น้ำวอร์ตปริมาตร 5 ลิตร (ถังหมักมี working volume 15 ลิตร) ในสภาพปลอดเชื้อ ควบคุมสภาพภายในถังหมักให้มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีระบบการพัดของใบพัด 50 รอบต่อนาที โดยไม่ได้เติมอากาศ

3.3.6.2 เปรียบเทียบการหมักระหว่างเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่เหมาะสมกับเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

ทำการหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่เหมาะสม และเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA และ CCh) โดยใช้ปริมาตรของสารละลายไคโตแซนที่ตรึงรูปแล้ว 25 มิลลิลิตร (ประมาณ 170 เม็ด) ต่อน้ำวอร์ต 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

3.3.7 ศึกษาสัณฐานและลักษณะพื้นผิว (SEM) ของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปก่อนและหลังการหมัก

นำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่เหมาะสมต่อการหมักเบียร์จากข้อ 3.3.4 และเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA และ CCh) ทั้งก่อนและหลังการหมักมาทำการ pre-fix ด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมล์ ค่าพีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะ 1 คืน หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมล์ ค่าพีเอช 7.4 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทำการ post-fix ด้วย สารละลายออสเมียมทีโทรไซด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมล์ ค่าพีเอช 7.4 นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทำการ dehydrate ด้วยสารละลายเอทานอลในน้ำ ซึ่งมีความเข้มข้น 30 50 70 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (2 ครั้ง) ตามลำดับ ขั้นตอนละ 15 นาที หลังจากนั้นทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤต ด้วยเครื่อง Critical Point Dryer นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ตรึงรูปติดลงไปบนแผ่น stub โดยใช้เทปสองหน้า หรือ ยาทาเล็บ และนำไปฉาบทองด้วยเครื่องฉาบทอง หลังจากนั้นทำการนำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ตรึงรูปไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope , SEM) รายละเอียดแสดงดังภาคผนวก ง.

3.3.8 ศึกษาการทดสอบความชอบในผลิตภัณฑ์ (Sensory Test)

ทำการทดสอบการให้คะแนนความชอบในผลิตภัณฑ์ ตามคุณลักษณะของน้ำเบียร์ที่ได้จากการหมักในการทดลอง โดยทำการเปรียบเทียบความชอบเบียร์ที่ได้จากการหมักโดยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4 และ เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA) โดยในขั้นแรกทำการคัดเลือกผู้ที่ทำการทดสอบผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสม ในที่นี้คือผู้ที่ทำการดื่มและนิยมในการดื่มเบียร์เป็นประจำ จำนวน 15 ท่าน (นักศึกษาภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) และเชิญมาทำการทดสอบความชอบน้ำเบียร์ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งทำการทดสอบในห้องที่เหมาะสมต่อการทดสอบ คือ ไม่มีเสียงรบกวนสมาธิ มีสภาพที่เหมาะสมทำให้ผู้ที่ทำการทดสอบมีความสบาย ซึ่งจะทำให้การให้คะแนนเป็นไปอย่างถูกต้อง หลังจากได้ผู้ที่ทำการทดสอบที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมแล้ว ให้ผู้ทำการทดสอบให้คะแนนความชอบตามคุณลักษณะของน้ำเบียร์ คือให้คะแนนความชอบระหว่างตัวอย่างที่ทำการควบคุม (เบียร์ที่ทำการหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต, CA) และ ตัวอย่างที่ทำการทดสอบ (เบียร์ที่ทำการหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4) โดยให้คะแนนของสี กลิ่น และความขุ่น นำคะแนนที่ได้วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SAS แปรผลการทดสอบด้วยวิธี T – test

3.3.9 การวิเคราะห์

3.3.9.1 การวิเคราะห์ค่า พีเอช โดยใช้ pH - meter

3.3.9.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลที่ได้จากหมัก ซึ่งดัดแปลงมาจาก AOAC (1990) ดังภาคผนวก จ.

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาการขึ้นรูปไคโตแซน

4.1.1 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นไคโตแซนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการขึ้นรูป

จากการศึกษาเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของสารละลายไคโตแซนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการขึ้นรูป โดยทำการขึ้นรูปไคโตแซนที่ความเข้มข้น 1.5 2 3 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการขึ้นรูปไคโตแซนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต

ความเข้มข้นสารละลายไคโตแซน (เปอร์เซ็นต์)	การขึ้นรูปและลักษณะของเม็ดไคโตแซนที่ขึ้นรูปได้
1.5	มีการขึ้นรูปดี เม็ดไคโตแซนที่ได้กลม สีขาวขุ่น มีความเหนียวน้อย เมื่อสัมผัสด้วยมือ (ทำการบีบ)
2	มีการขึ้นรูปดี เม็ดไคโตแซนที่ได้กลม สีขาวขุ่น มีความเหนียวมากกว่าเม็ดไคโตแซนที่มีความเข้นข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์
3	มีการขึ้นรูปดี เม็ดไคโตแซนที่ได้กลม สีขาวขุ่น มีความเหนียวมากกว่าเม็ดไคโตแซนที่มีความเข้นข้น 2 เปอร์เซ็นต์
5	มีการขึ้นรูปดีมาก เม็ดไคโตแซนที่ได้กลม สีขาวขุ่น มีความเหนียวมากกว่าเม็ดไคโตแซนที่มีความเข้นข้น3 เปอร์เซ็นต์
6	มีการขึ้นรูปดีมาก เม็ดไคโตแซนที่ได้กลม สีขาวขุ่น มีความเหนียวใกล้เคียงกับเม็ดไคโตแซนที่มีความเข้นข้น 5 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองในตารางจะเห็นได้ว่าการขึ้นรูปของสารละลายไคโตแซนในแต่ละความเข้มข้นในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์มีการขึ้นรูปที่ดี ซึ่งสอดคล้องกับวิธีการของ Kaya และ Picard ในปี 1996 ซึ่งได้ทำการดัดแปลงวิธีการทดลองมา โดยที่เขาได้ทำ

การตรึงรูปเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus bicellularis* ด้วยไคโตแซนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ บนแผ่นกรองเพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียขั้นที่ 3 โดยที่เม็ดไคโตแซนที่ได้ทุกความเข้มข้นมีลักษณะ กลม สีขาวขุ่น เมื่อทำการบีบเม็ดไคโตแซนสามารถแตกได้และมีของเหลวไหลออกมา แต่เมื่อสัมผัสด้วยมือเปล่าจะรู้สึกได้ถึงความเหนียวในเนื้อของไคโตแซนที่ทำการขึ้นรูปได้ โดยที่พบว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของไคโตแซนจาก 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็น 2 3 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ก็มีความเหนียวมากยิ่งขึ้น และยิ่งไปกว่านั้นเมื่อขึ้นรูปไคโตแซนที่ความเข้มข้น 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์พบว่ามีการขึ้นรูปที่ดีมากยิ่งขึ้น คือ เม็ดไคโตแซนสามารถขึ้นรูปได้ในทันทีที่สัมผัสกับสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต และเมื่อทำการบีบเม็ดไคโตแซนทั้ง 2 ความเข้มข้น เมื่อสัมผัสด้วยมือเปล่าพบว่ามีความเหนียวใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงคัดเลือกใช้ความเข้มข้นไคโตแซนที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป ทั้งนี้เพื่อความประหยัดและผลระยะยาวในการใช้สารไคโตแซน

อย่างไรก็ตาม ในผลการทดลองนี้มีความแตกต่างกันในการใช้ความเข้มข้นของไคโตแซนกับวิธีการของ Kaya และ Picard ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากค่า percentage of degree of deacetylation (% DD) ของไคโตแซนที่ใช้แตกต่างกัน

4.1.2 ผลการศึกษาการขึ้นรูปไคโตแซนในสารละลายผสมระหว่างสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตและสารละลายโซเดียมอัลจิเนต

นำสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มาทำการศึกษาการขึ้นรูปในสารละลายผสมระหว่างสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันคือ 5 : 95 10 : 90 20 : 80 และ 50 : 50 ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการขึ้นรูปเม็ดไคโตแซนในสารละลายผสมโซเดียมไพโรฟอสเฟตและโซเดียมอัลจิเนต

อัตราส่วนของสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต ต่อสารละลายโซเดียมอัลจิเนต	**การขึ้นรูปและลักษณะของเม็ดไคโตแซน**	**ค่าพีเอชสารละลายผสมที่ทำการขึ้นรูป**
5 : 95	ขึ้นรูปได้ไม่ดี เม็ดคงรูปไม่ดี เม็ดที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวผสมเหลืองเล็กน้อยขุ่น เมื่อทำการบีบเม็ดจะแตกมีของเหลวออกมา	8.4
10 : 90	ขึ้นรูปได้ดีอย่างรวดเร็ว เม็ดคงรูปดี เม็ดที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวผสมเหลืองเล็กน้อยขุ่น เมื่อทำการบีบเม็ดจะแตกมีของเหลวออกมา	8.3
20 : 80	ขึ้นรูปดีมาก เม็ดคงรูปดี เม็ดที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวผสมเหลืองขุ่น เมื่อทำการบีบเม็ดจะแตกมีของเหลวออกมา	8.0
50 : 50	ขึ้นรูปได้ดี เม็ดคงรูปดี เม็ดที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวผสมเหลืองขุ่น เมื่อทำการบีบเม็ดจะแตกมีของเหลวออกมา	6.8

พบว่าการขึ้นรูปเป็นเม็ดของไคโตแซนในสารละลายผสมโซเดียมไพโรฟอสเฟตและโซเดียมอัลจิเนตในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ให้ผลการขึ้นรูปของเม็ดไคโตแซนและค่าพีเอชของสารละลายผสมที่ทำการขึ้นรูปแตกต่างกันดังตาราง โดยที่การขึ้นรูปของไคโตแซนในสารละลายผสมที่มีอัตราส่วน เป็น 20 : 80 ให้ผลการขึ้นรูปเม็ดไคโตแซนที่ดีมากกว่าการขึ้นรูปของไคโตแซนในสารละลายผสมที่มีอัตราส่วน 50 : 50 แต่เมื่อทำการวัดค่าพีเอชของสารละลายที่ทำการขึ้นรูปพบว่าค่าพีเอชมีค่าสูงถึง 8.0 ดังนั้น จึงคัดเลือกใช้การขึ้นรูปไคโตแซนในสารละลายผสมโซเดียมไพโรฟอสเฟตและโซเดียมอัลจิเนต ในอัตราส่วน 50 : 50 ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากมีการขึ้นรูปของเม็ดไคโตแซนดี ลักษณะของเม็ดไคโตแซนที่ได้คงรูปดี และค่าพีเอชที่วัดได้มีค่าใกล้เคียง 7.0 คือ 6.8 ซึ่งจะส่งผลดีต่อเชื้อยีสต์ เมื่อทำการตรึงเซลล์

4.1.3 ผลการศึกษาการขึ้นรูปไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต

จากการศึกษาการนำสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับเบนโทไนต์ในอัตราส่วน 95 : 5, 90 : 10, 80 : 20 และ 50 : 50 มาทำการขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อที่จะเพิ่มรูพรุนและความคงตัวของเม็ดไคโตแซน โดยดัดแปลงมาจาก Zeng และ Ruckenstein (1996) ซึ่งเขาใช้เม็ดซิลิกาเจลผสมลงในสารละลายไคโตแซนและนำไปขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าสารละลายไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ที่อัตราส่วน 95 : 5 สามารถทำการขึ้นรูปได้ดีที่สุด เนื่องจากพิจารณาเม็ดไคโตแซนที่ได้มีลักษณะเป็นเม็ดกลม คงรูปดี และให้ค่าพีเอชของสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตน้อยที่สุดคือ 8.6 (แสดงดังตารางที่ 4.3) ดังนั้นจึงนำมาทำการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการขึ้นรูปเม็ดไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต

อัตราส่วน ไคโตแซน ต่อ เบนโทไนต์	การขึ้นรูปและลักษณะของเม็ดไคโตแซน	ค่าพีเอช สาร ละลาย
95 : 5	ขึ้นรูปได้ดีอย่างรวดเร็ว เม็ดคงรูปดี เม็ดที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวผสมเทาขุ่น เมื่อทำการบีบจะแตก มีของเหลวไหลออกมา	8.6
90 : 10	ขึ้นรูปได้ดีอย่างรวดเร็ว เม็ดคงรูปดี เม็ดที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวผสมเทาขุ่น เมื่อทำการบีบจะแตก มีของเหลวไหลออกมา	9.1
80 : 20	ขึ้นรูปได้ดีอย่างรวดเร็ว แต่เม็ดมีหางเนื่องจากการตกอย่างรวดเร็ว เม็ดมีสีขาวผสมเทาขุ่น เมื่อทำการบีบจะแตก มีของเหลวไหลออกมา	9.4
50 : 50	ขึ้นรูปได้ดีอย่างรวดเร็ว ไม่ค่อยเป็นเม็ด สำหรับเม็ดที่ได้มีหางเนื่องจากการตกอย่างรวดเร็ว มีสีขาวผสมเทาขุ่น เมื่อทำการบีบจะแตก มีของเหลวไหลออกมา	9.7

4.1.4 ผลการศึกษาการขึ้นรูปไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมกลูโคส

จากการศึกษาการนำสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1 : 1 1 : 2 2 : 1 และ 4 : 1 มาขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ และ กลูโคส 2.25 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการทดลองดัดแปลงจากวิธีการของ Knorr และคณะ (1989) ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการขึ้นรูปเม็ดไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและกลูโคส

อัตราส่วนไคโตแซนต่อแคลเซียมคลอไรด์	การขึ้นรูปและลักษณะของเม็ดไคโตแซน
1 : 1	มีการขึ้นรูปได้ดี เม็ดที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวใส เม็ดมีความแข็ง เมื่อบีบ จะแตก มีของเหลวไหลออกมา
1 : 2	มีการขึ้นรูปได้ดี เม็ดที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวใส เม็ดมีความแข็ง เมื่อบีบ จะแตก มีของเหลวไหลออกมา
2 : 1	มีการขึ้นรูปได้ดี เม็ดที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวใส เม็ดมีความแข็ง เมื่อบีบ จะแตก มีของเหลวไหลออกมา
4 : 1	มีการขึ้นรูปได้ดีมาก เม็ดที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวใส เม็ดมีความแข็งเมื่อบีบ จะแตก มีของเหลวไหลออกมา

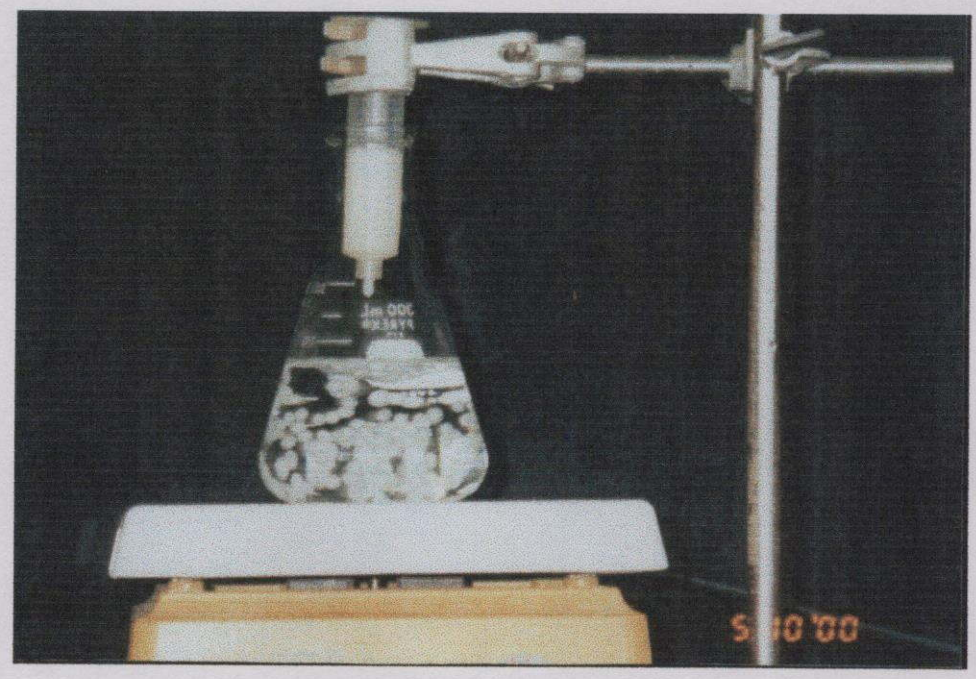
พบว่าสารละลายผสมไคโตแซนและแคลเซียมคลอไรด์ในอัตราส่วน 4 : 1 สามารถทำการขึ้นรูปได้ดีที่สุด คือ เม็ดไคโตแซนที่ขึ้นรูปมีความคงตัวดีมาก มีการขึ้นรูปที่เร็ว และมีลักษณะกลมสวยงาม ดังนั้นจึงนำมาทำการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ในขั้นต่อไป และผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับ Knorr และคณะ ที่ได้ทำการศึกษาพบว่าการตรึงรูปเซลล์พืชโดยใช้ไคโตแซนผสมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 450 มิลลิโมล ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนต 0.75 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 2.25 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการขึ้นรูปดีมากกว่าการใช้สารไคโตแซนเพียงอย่างเดียว

4.1.5 ผลการศึกษาการขึ้นรูปไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน

จากการศึกษาการนำสารละลายผสมไคโตแซนความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วน 4:1 มาขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนต 0.75 % และเด็กซ์แทรนในอัตราส่วน 2 1 0.5 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ทำการทดลองดัดแปลงมาจากวิธีการทดลองของ Knorr และคณะ (1989) โดยใช้เด็กซ์แทรนแทนกลูโคส ซึ่งมีแนวความคิดว่าเด็กซ์แทรนมีพันธะโมเลกุลแข็งแรงมากกว่ากลูโคส ดังนั้นในการขึ้นรูปไคโตแซนในสารละลายผสมระหว่างโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรนจะมีประสิทธิภาพการขึ้นรูปดีกว่า และในการทดลองพบว่าอัตราส่วนของสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีที่สุด (แสดงดังตารางที่ 4.5) ดังนั้นจึงนำมาทำการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการขึ้นรูปเม็ดไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน

ความเข้มข้นเด็กซ์แทรน (เปอร์เซ็นต์)	การขึ้นรูปของสารละลายผสมไคโตแซนและแคลเซียมคลอไรด์
2	ไม่สามารถขึ้นรูปเป็นเม็ดได้ แต่สามารถเกิดเป็นแผ่นได้เมื่อทำการทิ้งไว้
1	ไม่สามารถขึ้นรูปเป็นเม็ดได้ แต่สามารถเกิดเป็นแผ่นได้เมื่อทำการทิ้งไว้
0.5	สามารถขึ้นรูปได้ แต่การเกิดเป็นเม็ดไม่ดี ให้ขนาดของเม็ดใหญ่มาก เม็ดที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวใส เม็ดมีความแข็ง เมื่อทำการบีบแล้วแตกมีของเหลวไหลออกมา
0.1	สามารถขึ้นรูปได้ดี ขนาดของเม็ดดี เม็ดที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวใส เม็ดมีความแข็ง เมื่อบีบจะแตก มีของเหลวไหลออกมา
0.01	สามารถขึ้นรูปได้ดี ขนาดของเม็ดดี แต่บีบแตกง่าย เม็ดมีลักษณะกลม สีขาวใส เมื่อบีบจะแตกมีของเหลวไหลออกมา



ภาพที่ 4.1 แสดงวิธีการขึ้นรูปสารละลายไคโตแซน

4.2 ผลการศึกษาการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซน

4.2.1 ผลการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนที่ทำการขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (Ch)

จากการนำสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มาทำการผสมกับเซลล์ยีสต์เปียกในอัตราส่วนเซลล์ยีสต์ 3 6 9 12 และ 15 กรัม ต่อสารละลายไคโตแซน 100 มิลลิลิตร โดยขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาทำการหมักในน้ำวอรต์เป็นเวลา 5 วัน โดยทำการเก็บผลไปวัดปริมาณเอทานอลในแต่ละวัน พบว่าการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่มีปริมาณเซลล์ยีสต์ 15 กรัม ให้ปริมาณเอทานอลในการหมักสูงสุด คือ 8.98 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 2 ของการหมัก และการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่มีปริมาณเซลล์ยีสต์ 12 กรัม ให้ปริมาณเอทานอลรองลงมา คือ 8.65 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 2 ของการหมักเช่นเดียวกัน ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ที่ใกล้เคียงกัน และปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ใช้น้อยกว่า จึงใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์เปียกในการทดลองในอัตราส่วน เซลล์ยีสต์เปียก 12 กรัม ต่อสารละลายที่จะใช้ในการขึ้นรูป เมื่อทำการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนที่ทำการขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตจึงนำสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับเซลล์ยีสต์เปียก 12 กรัม ต่อสารละลายไคโตแซน 100 กรัม ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเม็ดไคโตแซนตรึงรูปเซลล์ยีสต์ที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวขุ่น เมื่อทำการบีบพบว่าเม็ดตรึงรูปนิ่ม แตกได้ มีของเหลวผสมเซลล์ยีสต์ออกมา

4.2.2 ผลการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนที่ทำการขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตผสมโซเดียมอัลจิเนต (ChS)

จากการนำสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มาทำการผสมกับเซลล์ยีสต์เปียกในอัตราส่วนเซลล์ยีสต์ 12 กรัม ในสารละลายไคโตแซน 100 กรัม โดยขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมไพโรฟอสเฟตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 50 : 50 พบว่าเม็ดไคโตแซนตรึงรูปเซลล์ยีสต์ที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวผสมเหลืองขุ่น เมื่อทำการบีบพบว่าเม็ดตรึงรูปนิ่ม แตกได้ มีของเหลวผสมเซลล์ยีสต์ออกมา

4.2.3 ผลการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ที่ทำการขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (ChB)

จากการนำสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มาทำการผสมเบนโทไนต์ ในอัตราส่วน 95 : 5 หลังจากทำการผสมเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ทำการผสมกับเซลล์ยีสต์เปียกในอัตราส่วน เซลล์ยีสต์ 12 กรัม ในสารละลายผสมไคโตแซน 100 กรัม โดยขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเม็ดไคโตแซนตรึงรูปเซลล์ยีสต์ที่ได้มีลักษณะกลม สี

ขาวผสมเทาขุ่น เมื่อทำการบีบพบว่าเม็ดตรึงรูปนิ่ม มีความสากเล็กน้อยจากเบนโทไนต์และเม็ดแตกได้ มีของเหลวผสมเซลล์ยีสต์ออกมา

4.2.4 ผลการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ทำการขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมกลูโคส (ChG)

จากการนำสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มาทำการผสมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วน 4 : 1 หลังจากทำการผสมเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ทำการผสมกับเซลล์ยีสต์เปียกในอัตราส่วนเซลล์ยีสต์ 12 กรัม ในสารละลายผสมไคโตแซน 100 กรัม โดยขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคสเข้มข้น 2.25 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเม็ดไคโตแซนตรึงรูปเซลล์ยีสต์ที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวใส มีสีขาวขุ่นตรงกลางเม็ด เมื่อทำการบีบพบว่าเม็ดมีความแข็ง และเม็ดแตกได้ มีของเหลวผสมเซลล์ยีสต์ออกมา

4.2.5 ผลการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ทำการขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมเด็กซ์แทรน (ChD)

จากการนำสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มาทำการผสมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วน 4 : 1 หลังจากทำการผสมเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ทำการผสมกับเซลล์ยีสต์เปียกในอัตราส่วนเซลล์ยีสต์ 12 กรัม ในสารละลายผสมไคโตแซน 100 กรัม โดยขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ และเด็กซ์แทรนเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเม็ดไคโตแซนตรึงรูปเซลล์ยีสต์ที่ได้มีลักษณะกลม สีขาวใส มีสีขาวขุ่นตรงกลางเม็ด เมื่อทำการบีบพบว่าเม็ดมีความแข็ง และเม็ดสามารถแตกได้ มีของเหลวผสมเซลล์ยีสต์ออกมา

4.2.6 ผลการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนแบบแผ่น

จากการการศึกษาการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนทั้ง 5 วิธี คือ เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (Ch) เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมไพโรฟอสเฟตและโซเดียมอัลจิเนต (ChS) เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (ChB) เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและกลูโคส (ChG) และ เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) จึงนำมาทดลองทำการตรึงรูปและทำการขึ้นรูปในถาดสี่เหลี่ยม โดยใช้สภาวะในการใช้เชื้อยีสต์เดียวกันกับแบบการขึ้นรูปแบบเม็ด พบว่า การขึ้นรูปโดย

ใช้สารละลายผสมไคโตแซนและเบนโทไนต์ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (ChB) และสารละลายผสมไคโตแซนและแคลเซียมคลอไรด์ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและกลูโคส (ChG) สามารถทำการขึ้นรูปเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมได้ สำหรับเซลล์ยีสต์ตรึงรูปอีก 2 ชนิด การขึ้นรูปโดยใช้ไคโตแซนในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (Ch) และการขึ้นรูปโดยใช้ไคโตแซนในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตและโซเดียมอัลจิเนต (ChS) ไม่สามารถทำการตรึงเซลล์ยีสต์และขึ้นรูปเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมได้ โดยสังเกตจากสารละลายที่ใช้ในการขึ้นรูปมีปริมาณเซลล์ยีสต์หลงเหลือมาก สำหรับเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่ขึ้นรูปโดยใช้ไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน พบว่าแผ่นไคโตแซนสามารถขึ้นรูปได้แต่ไม่สามารถทำการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ได้หมดโดยสังเกตจากมีปริมาณเซลล์ยีสต์หลงเหลืออยู่มากในสารละลายที่ทำการขึ้นรูป

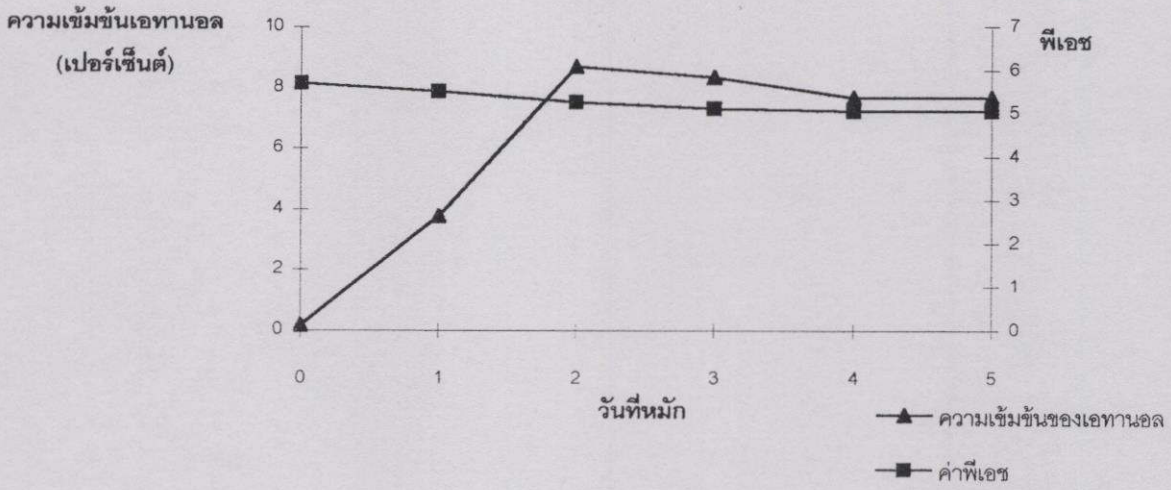
4.3 ผลการศึกษาการหมักเบียร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนในระดับฟลาสก์และเปรียบเทียบหารูปแบบที่เหมาะสมต่อการหมัก

4.3.1 ผลการศึกษาการหมักเบียร์โดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูป

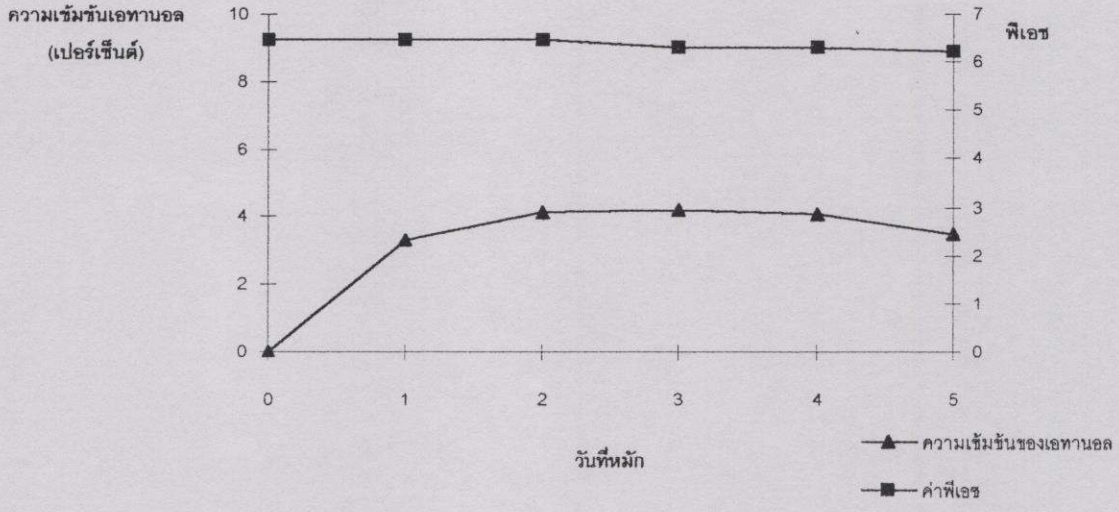
จากการนำเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนจากข้อ 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4 และ 4.2.5 มาทำการหมักเบียร์ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ได้ผลดังในภาพที่ 4.2 – 4.8 จากภาพที่ 4.7 พบว่า การหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (Ch) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดคือ 8.69 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 2 ของการหมัก ลักษณะน้ำเบียร์ที่ได้มีความขุ่น สังเกตได้ว่ามีเซลล์หลุดออกมา สีของน้ำเบียร์ไม่เปลี่ยนแปลงจากเดิม มีกลิ่นแอลกอฮอล์ปรากฏ เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมคือเม็ดมีลักษณะลีบลง เม็ดมีสีเข้มขึ้น และรองลงมาคือการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) ให้ปริมาณเอทานอล 4.71 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 2 ของการหมักเช่นเดียวกัน ลักษณะของน้ำเบียร์ที่ได้ไม่มีความขุ่น สีของน้ำเบียร์ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม มีกลิ่นแอลกอฮอล์ปรากฏ ลักษณะของเม็ดไม่เปลี่ยนแปลงจากเดิม เม็ดมีสีเข้มขึ้น สำหรับการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปอีก 3 ชนิด คือ เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมไพโรฟอสเฟตและโซเดียมอัลจิเนต (ChS) เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (ChB) และ เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและกลูโคส (ChG) ให้ค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้อยกว่าและใช้ระยะเวลาในการหมักนานกว่าเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปทั้ง 2 ชนิดที่กล่าวมา คือ เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสาร

ละลายผสมโซเดียมไพโรฟอสเฟตและโซเดียมอัลจิเนต (ChS) ให้ปริมาณเอทานอล 4.21 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 ของการหมัก ลักษณะของน้ำเบียร์ที่ได้มีความขุ่น สีของน้ำเบียร์ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม มีกลิ่นแอลกอฮอล์ปรากฏ ลักษณะของเม็ดเปลี่ยนแปลงจากเดิมคือเม็ดมีลักษณะลีบลง เม็ดมีสีเข้มขึ้น เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต(ChB) ให้ปริมาณเอทานอล 3.63 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 4 ของการหมัก ลักษณะของน้ำเบียร์ที่ได้มีความขุ่น สีของน้ำเบียร์จากลง ไม่มีกลิ่นแอลกอฮอล์ ลักษณะของเม็ดเปลี่ยนแปลงจากเดิมคือเม็ดมีลักษณะลีบลง เม็ดมีสีเข้มขึ้น และเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและกลูโคส (ChG) ให้ปริมาณเอทานอล 3.29 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 5 ของการหมัก ลักษณะของน้ำเบียร์ที่ได้ไม่มีความขุ่น สีของน้ำเบียร์ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม มีกลิ่นแอลกอฮอล์ ลักษณะของเม็ดไม่เปลี่ยนแปลงจากเดิม เม็ดมีสีเข้มขึ้น และมีการเกาะตัวกันเป็นกลุ่ม

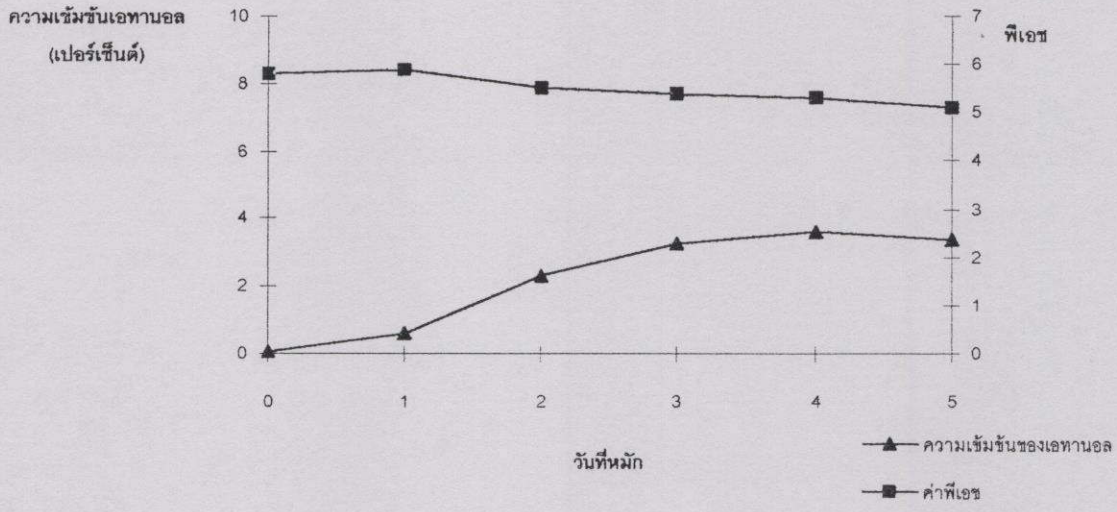
ในด้านค่าพีเอชที่ได้จากการหมักจากภาพที่ 4.2 พบว่าค่าที่ได้จากการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (Ch) มีค่า 5.7 5.5 5.25 5.1 5.05 และ 5.05 ตามลำดับวันที่ทำการหมัก และการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) ในภาพที่ 4.6 มีค่า 4.0 3.95 3.95 4.05 4.0 และ 4.0 ตามลำดับวันที่ทำการหมัก



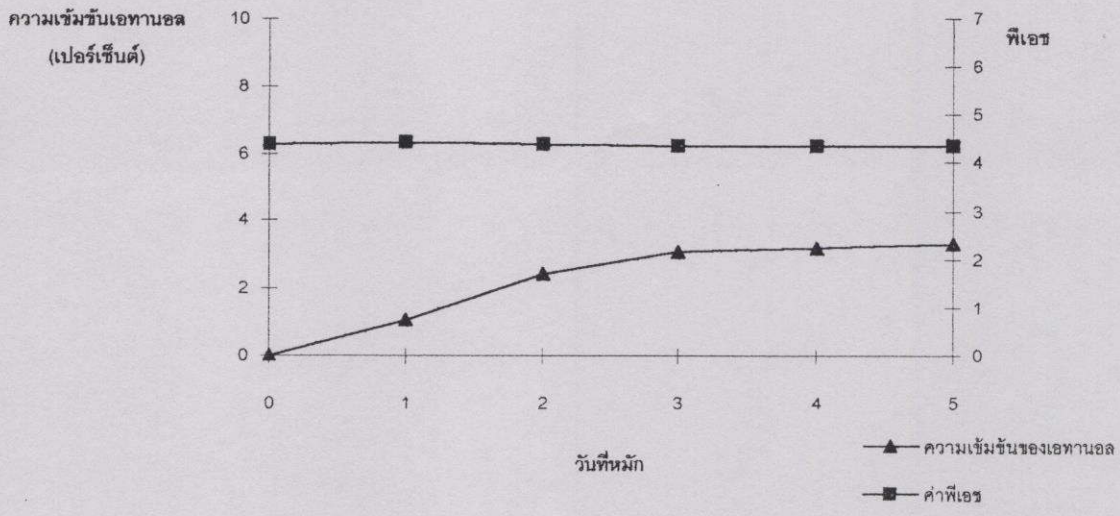
ภาพที่ 4.2 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (Ch)



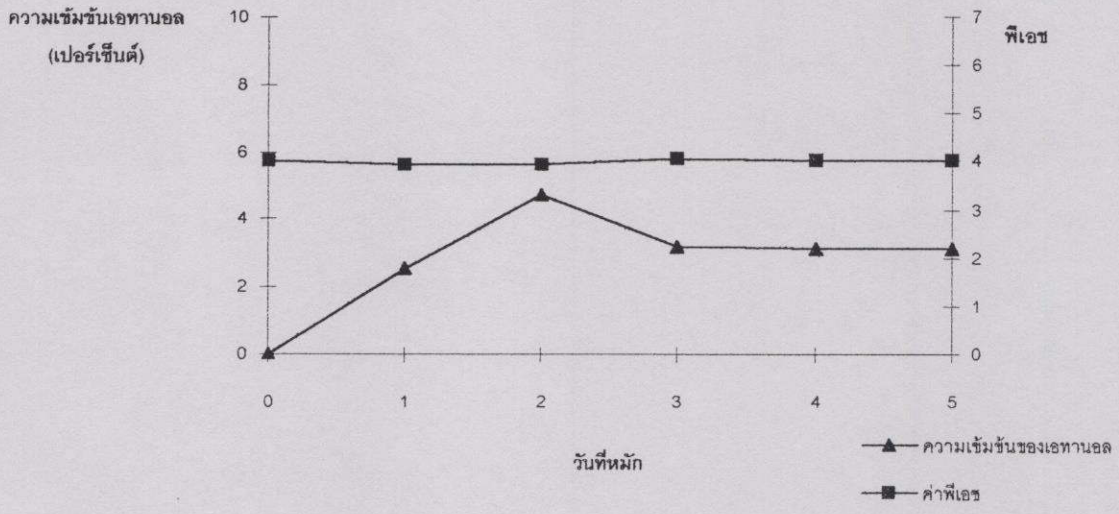
ภาพที่ 4.3 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตผสมโซเดียมอัลจิเนต (ChS)



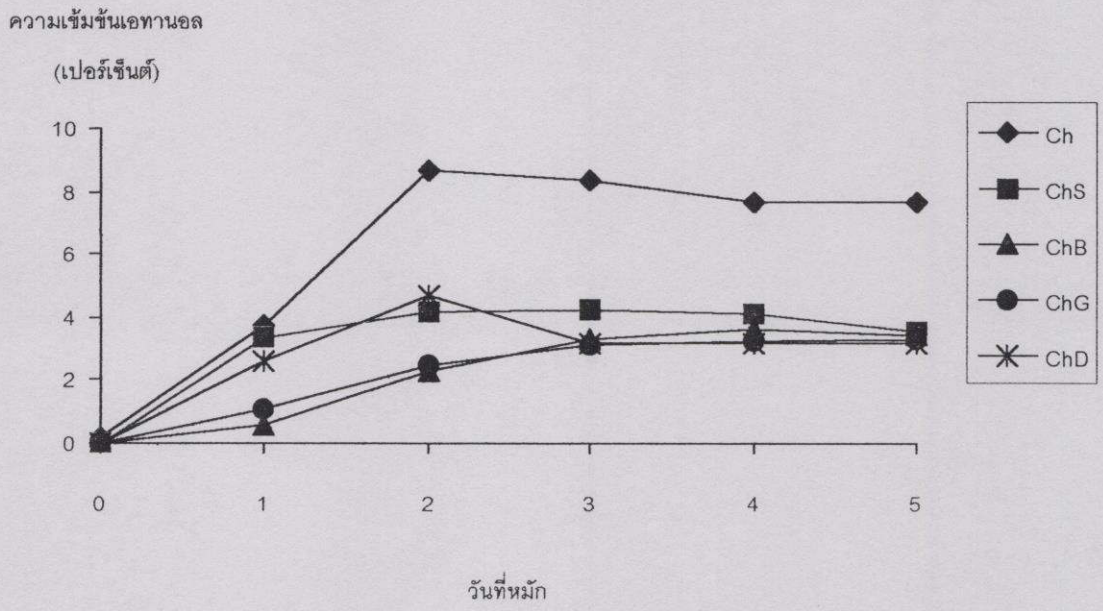
ภาพที่ 4.4 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (ChB)



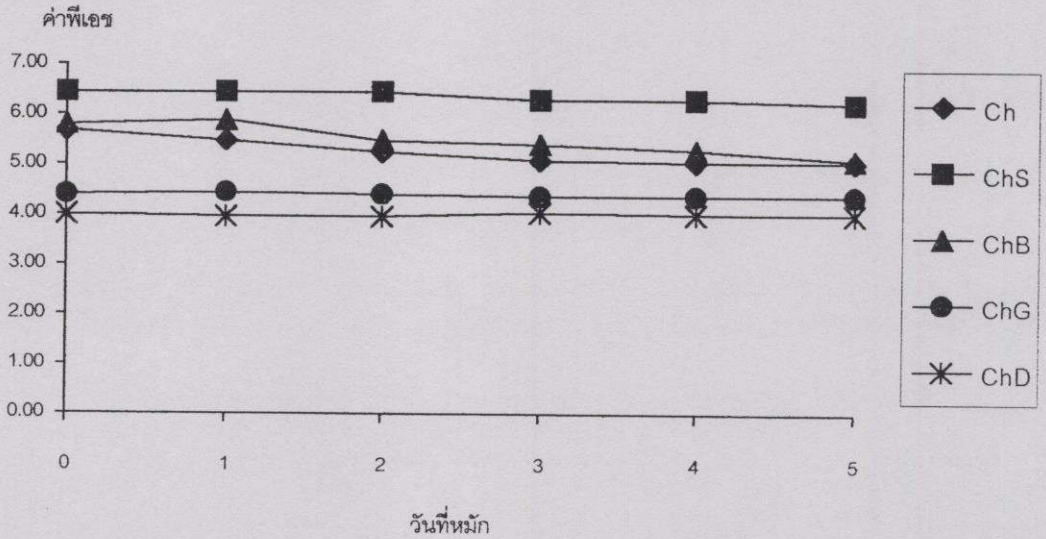
ภาพที่ 4.5 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมกลูโคส (ChG)



ภาพที่ 4.6 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมเด็กซ์แทรน (ChD)



ภาพที่ 4.7 แสดงความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการหมักเบียร์ของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนชนิดต่างๆ

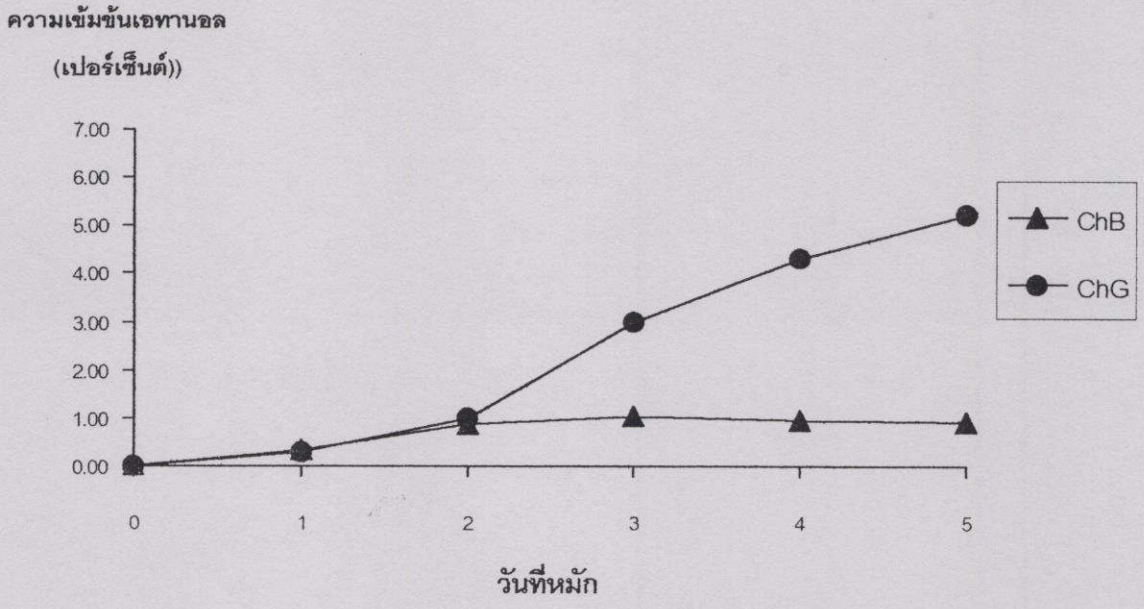


ภาพที่ 4.8 แสดงพีเอชที่ได้จากการหมักเบียร์ของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนชนิดต่างๆ

4.3.2 ผลการศึกษาการหมักเบียร์โดยใช้แผ่นเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน

จากการการศึกษาการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยไคโตแซนทั้ง 5 วิธี คือ เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (Ch) เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมไพโรฟอสเฟตและโซเดียมอัลจิเนต (ChS) เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (ChB) เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและกลูโคส (ChG) และ เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) จึงนำมาทดลองทำการตรึงรูปและทำการขึ้นรูปในถาดสี่เหลี่ยม โดยใช้สภาวะในการใช้เชื้อยีสต์เดียวกันกับแบบการขึ้นรูปแบบเม็ด พบว่า การขึ้นรูปโดยใช้สารละลายผสมไคโตแซนและเบนโทไนต์ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (ChB) และ

ใช้สารละลายผสมไคโตแซนและเบนโทไนต์ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (ChB) และสารละลายผสมไคโตแซนและแคลเซียมคลอไรด์ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและกลูโคส (ChG) สามารถทำการขึ้นรูปเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมได้ สำหรับเซลล์ยีสต์ตรึงรูปอีก 2 ชนิด การขึ้นรูปโดยใช้ไคโตแซนในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (Ch) และการขึ้นรูปโดยใช้ไคโตแซนในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตและโซเดียมอัลจิเนต (ChS) ไม่สามารถทำการตรึงเซลล์ยีสต์และขึ้นรูปเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมได้ โดยสังเกตจากสารละลายที่ใช้ในการขึ้นรูปมีปริมาณเซลล์ยีสต์หลงเหลือมาก สำหรับเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่ขึ้นรูปโดยใช้ไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน พบว่าแผ่นไคโตแซนสามารถขึ้นรูปได้แต่ไม่สามารถทำการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ได้หมดโดยสังเกตจากมีปริมาณเซลล์ยีสต์หลงเหลืออยู่มากในสารละลายที่ทำการขึ้นรูป หลังจากนั้นนำแผ่นเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่ได้มาทำการหมักเบียร์ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยใช้สภาวะเดียวกันกับการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน ซึ่งได้ทำการตัดในสภาพปลอดเชื้อให้มีขนาด กว้าง 3.5 และยาว 3.5 เซนติเมตร (ความหนาไม่แน่นอนแล้วแต่การขึ้นรูปได้ของไคโตแซน) ซึ่งได้ผลค่าปริมาณเอทานอลดังภาพที่ 4.9 แต่พบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้หลังจากการหมักมีปริมาณน้อยกว่าการหมักด้วยเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) และระยะเวลาที่ใช้ในการหมักยาวนานกว่า อาจเนื่องมาจากในการตรึงรูปแบบแผ่นไม่สามารถทำการตรึงรูปเซลล์ได้หมด เพราะสังเกตได้จากหลังการขึ้นรูปแล้วยังมีปริมาณของเซลล์ยีสต์เหลืออยู่ในสารละลายที่ทำการขึ้นรูป และสำหรับแผ่นเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนและแคลเซียมคลอไรด์ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและกลูโคส (ChG) มีการหลุดของตัวเซลล์มาก ดังนั้นจะเห็นได้ว่าระหว่างการหมักมีปริมาณเอทานอลเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งเป็นการหมักจากเซลล์ยีสต์อิสระ มิใช่แผ่นเซลล์ยีสต์ตรึงรูป



ภาพที่ 4.9 แสดงความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการหมักโดยใช้แผ่นเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน

4.3.3 ผลการหาค่าการวัดเนื้อสัมผัส (Texture analysis) ของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปก่อนและหลังการหมัก

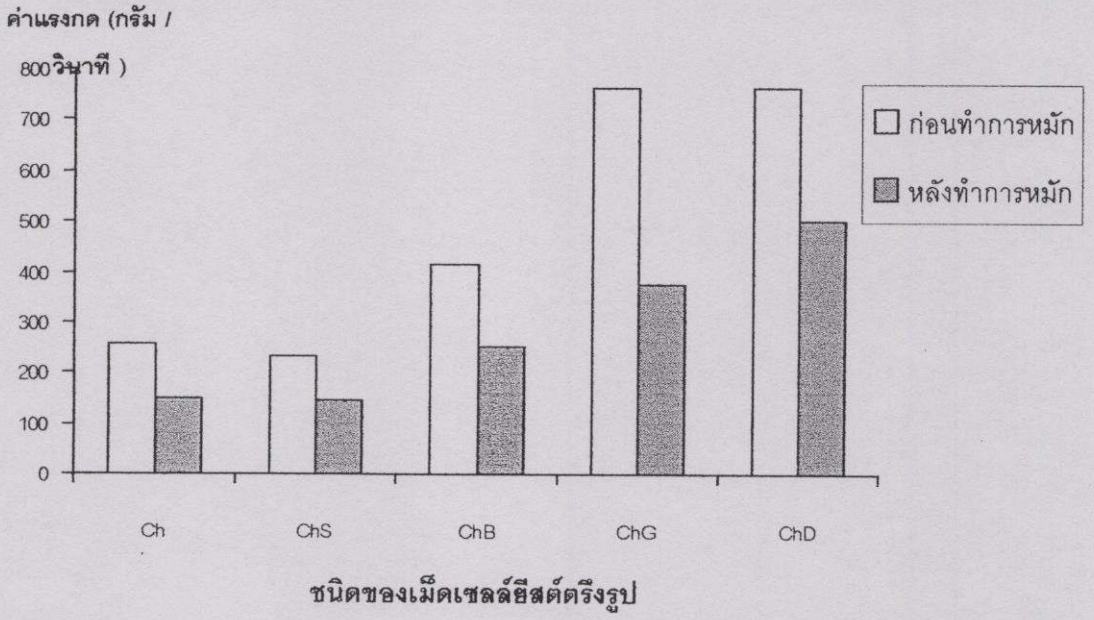
จากการศึกษาการวัดเนื้อสัมผัสของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนก่อนและหลังการหมักทั้งแบบเม็ดและแบบแผ่น พบว่าไม่สามารถทำการตรวจวัดเนื้อสัมผัสของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปแบบแผ่นได้เนื่องจากมีแผ่นตรึงรูปที่ได้มีความหนาไม่สม่ำเสมอ และมีความบางมากอาจทำให้หัววัดของเครื่องวัดเนื้อสัมผัสเสียได้ และจากการหมักก็พบว่าการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปแบบเม็ดดีกว่าแบบแผ่น ดังนั้นจึงทำการตรวจวัดเนื้อสัมผัสในเซลล์ยีสต์ตรึงรูปแบบเม็ดแต่เพียงอย่างเดียว เพื่อพิจารณาเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่สามารถคงตัวได้ดีที่สุดหลังจากการหมัก และผลของการวัดค่าการ

วัดเนื้อสัมผัส แสดงค่าดังตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.10 ซึ่งพบว่าเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) ทั้งก่อนและหลังการหมักมีค่าของแรงกดมากสุด คือ ก่อนการหมัก มีค่า760 กรัม / วินาที และ หลังการหมักมีค่า 500 กรัม / วินาที อีกทั้งจากการหมักเมื่อทำการสังเกตด้วยตาเปล่าแล้วก็จะเห็นได้ว่าเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปเปลี่ยนแปลงน้อยมากหลังการหมัก ซึ่งในการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Knorr และคณะ (1989) ที่เขาได้ค้นพบว่าการใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ผสมไคโตแซนที่ทำการขึ้นรูปในสารละลายผสมระหว่างสารละลายโซเดียมอัลจิเนตและกลูโคส จะทำให้เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการขึ้นรูปโดยใช้สารละลายไคโตแซนเพียงอย่างเดียว อีกทั้งในการทดลองนี้ทดลองใช้เด็กซ์แทรนแทนกลูโคสในการขึ้นรูป โดยมีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการขึ้นรูปไคโตแซนมากยิ่งขึ้น เนื่องจากเด็กซ์แทรนมีลักษณะทางโครงสร้างที่แข็งแรงกว่ากลูโคส ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองการตรวจวัดเนื้อสัมผัสระหว่าง เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน และเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและกลูโคส ซึ่งมีค่าการวัดเนื้อสัมผัสมากกว่าหลังจากการหมัก

ดังนั้นจึงคัดเลือกใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปโดยใช้วิธีทำการขึ้นรูปไคโตแซนในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรนเป็นวิธีการที่ดีที่สุดที่ใช้ในการหมักเบียร์ โดยพิจารณาถึงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก ลักษณะของน้ำเบียร์และเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปหลังจากการหมัก ซึ่งผลการทดลองพบว่าค่าของปริมาณเอทานอลสอดคล้องใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Freeman และคณะ (1994) ซึ่งพบว่าสามารถตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยไคโตแซน ในการผลิตเอทานอลจาก glucose medium ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 4.8 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 7 ของการหมัก โดยที่ระยะเวลาในการหมักน้อยกว่าอาจเป็นไปได้ว่าในการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงมีการใช้ปริมาณตัวเซลล์ยีสต์มากกว่าการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ลดระยะเวลาในการหมักลงเหลือ 2 วัน

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าการวัดเนื้อสัมผัสของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน

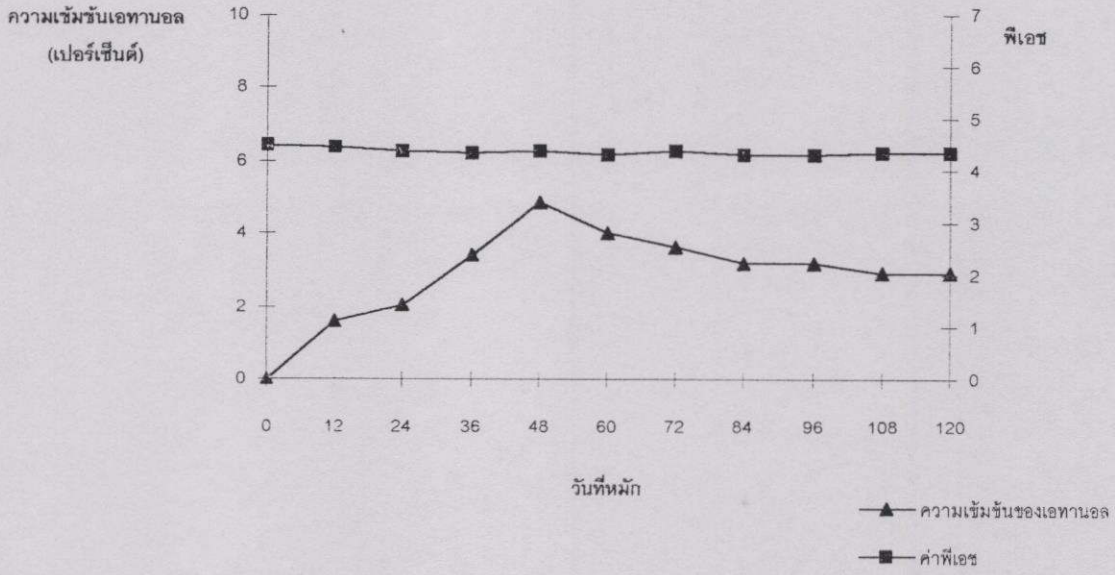
ค่าของแรงกด (กรัม / วินาที)	Ch	ChS	ChB	ChG	ChD
ก่อนทำการหมัก	258	232	413	760	760
หลังทำการหมัก	150	144	252	375	500



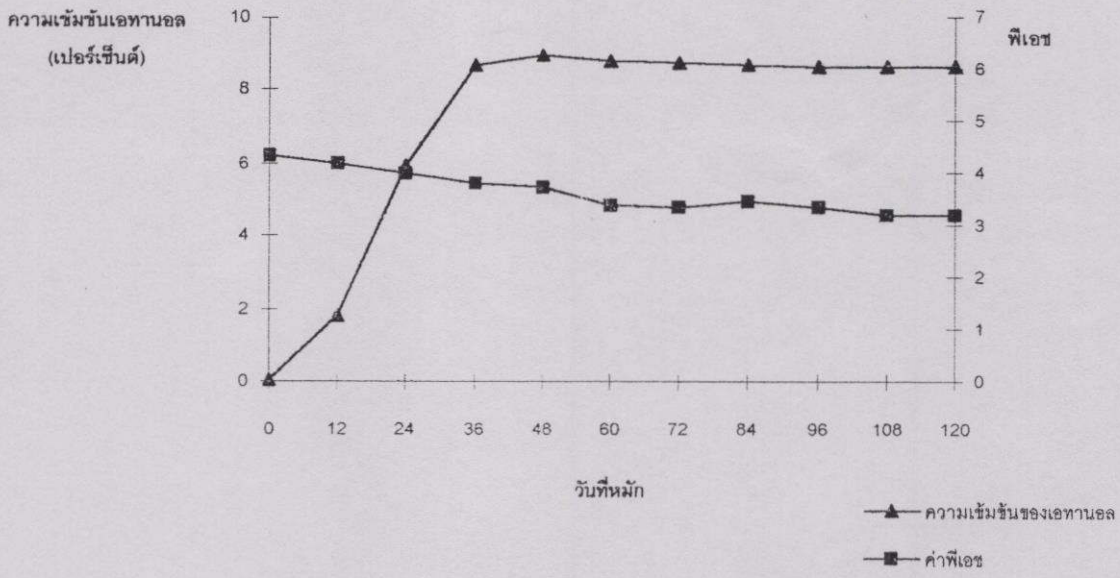
ภาพที่ 4.10 แสดงค่าการวัดเนื้อสัมผัสของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนชนิดต่างๆ

4.4 ผลการศึกษาเปรียบเทียบการหมักเบียร์ด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่เหมาะสม กับเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA, CCh)

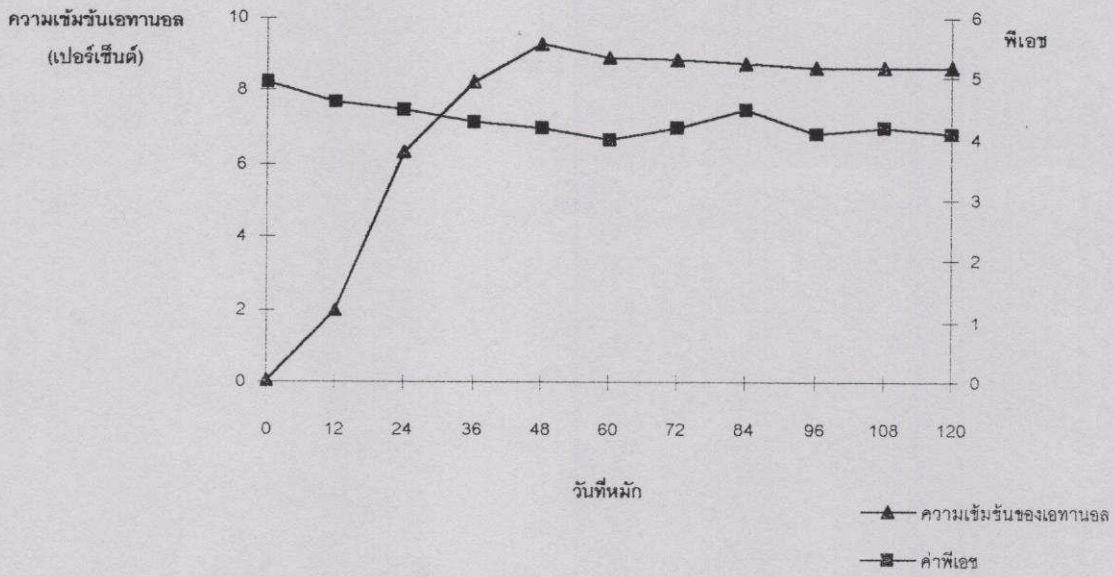
เมื่อนำเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) มาทำการหมักเปรียบเทียบกับเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA และ CCh) โดยทำการหมักเบียร์ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ได้ผลดังในภาพที่ 4.11 – 4.15 จากภาพที่ 4.14 พบว่าเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA) และเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซน (CCh) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดคือ 8.98 เปอร์เซ็นต์ และ 9.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในเวลา 48 ชั่วโมงของการหมัก (วันที่ 2) สำหรับเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดคือ 4.82 เปอร์เซ็นต์ ในเวลาเดียวกัน และหลังการหมักเซลล์ยีสต์ตรึงรูปทั้ง 3 ชนิด (ChD, CA, และ CCh) สามารถคงรูปอยู่ได้ดีไม่เปลี่ยนสภาพไปจากเดิม ทำให้น้ำเบียร์ของทั้งสามไม่ขุ่น ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม และน้ำเบียร์ที่ได้จากการหมักด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซนปรากฏกลิ่นแอลกอฮอล์แรง ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยโดยส่วนมากซึ่งนิยมใช้การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตที่ให้ผลดีต่อการขึ้นรูปและนำมาใช้ในการหมักต่างๆ



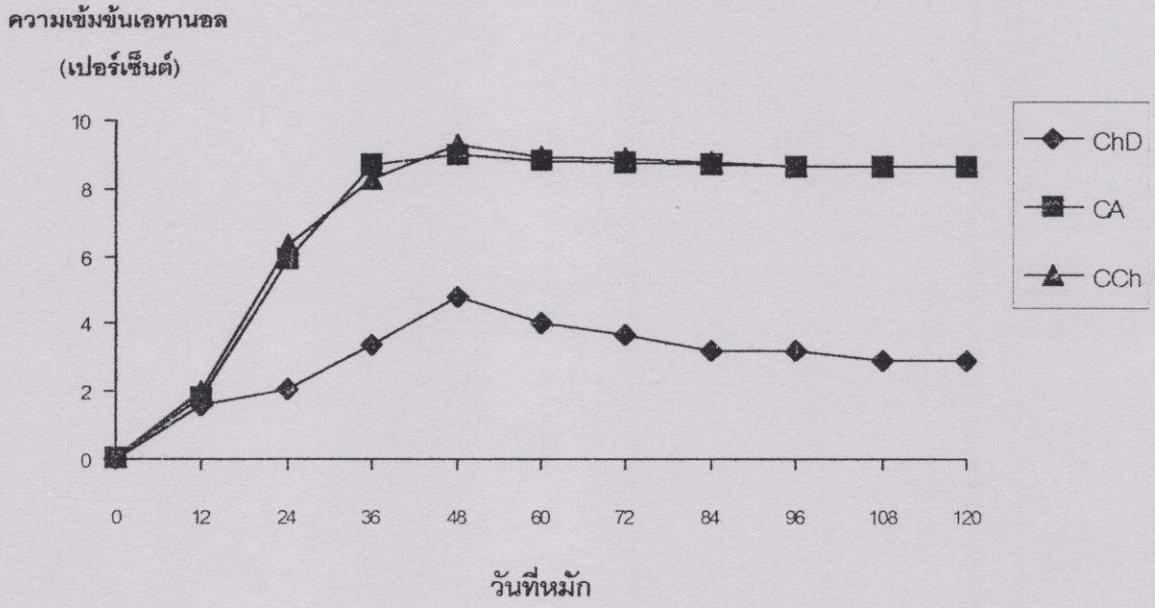
ภาพที่ 4.11 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมเด็กซ์แทรน (ChD) ที่ทำการหมักเปรียบเทียบกับเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในฟลาสก์



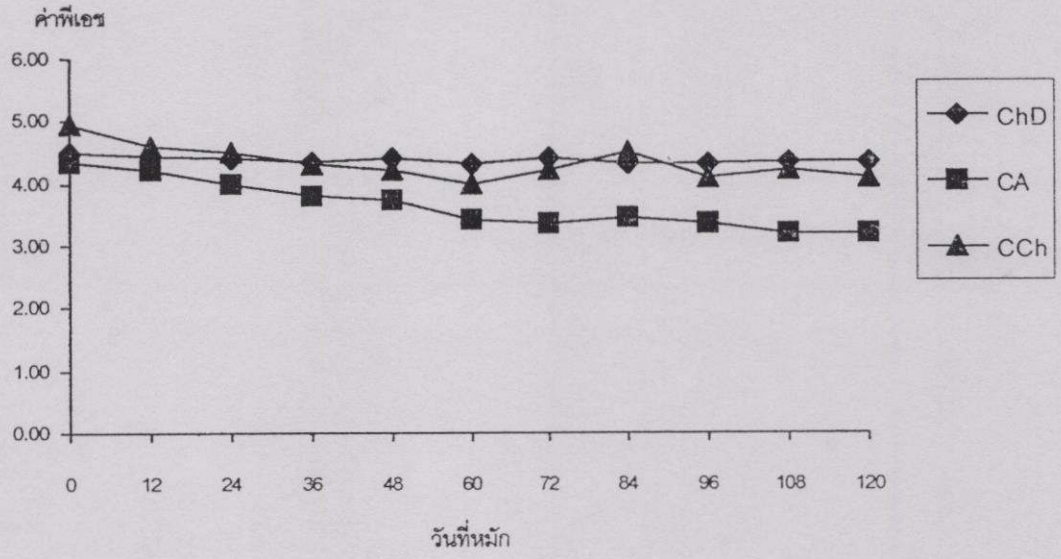
ภาพที่ 4.12 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA) ที่ทำการหมักเปรียบเทียบกับเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนในฟลาสก์



ภาพที่ 4.13 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซน (CCh) ที่ทำการหมักเปรียบเทียบกับเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยโตแซนในฟลาสก์



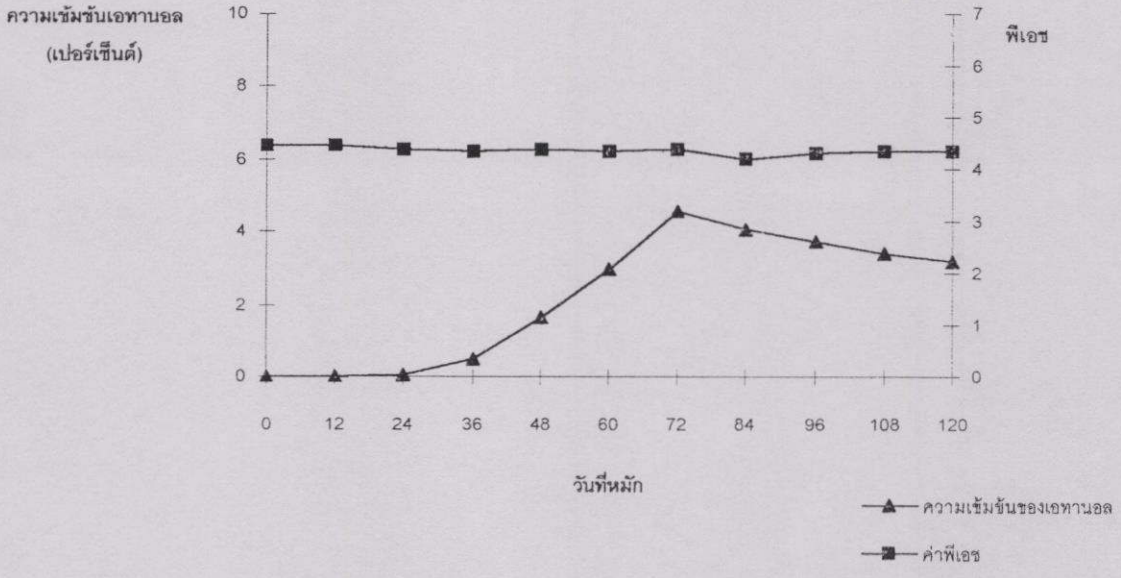
ภาพที่ 4.14 แสดงความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการเปรียบเทียบการหมักเบียร์ระหว่างเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนและเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในฟลาสก์



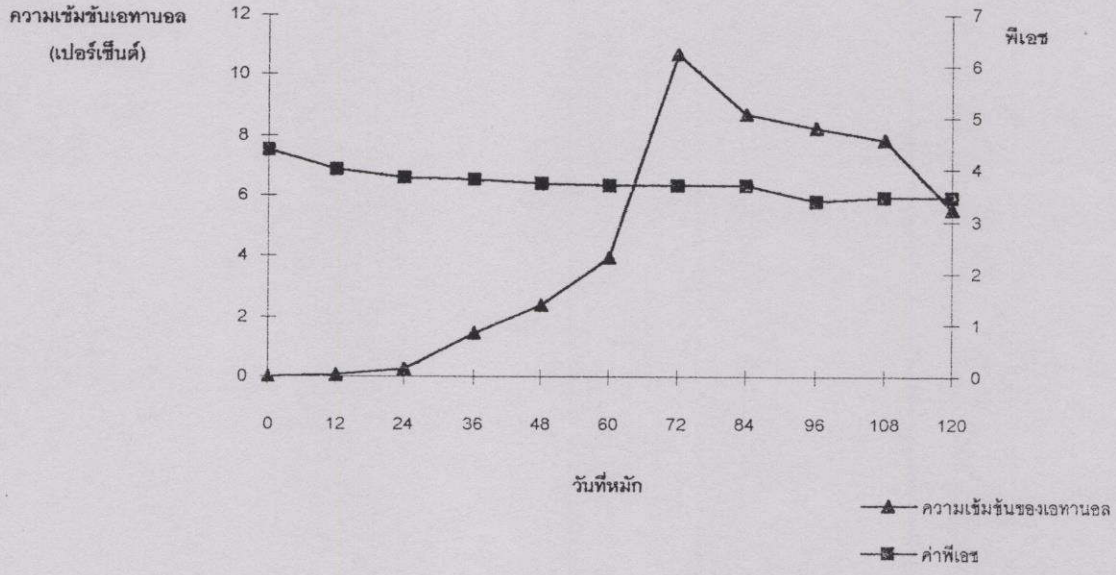
ภาพที่ 4.15 แสดงพีเอชที่ได้จากการเปรียบเทียบการหมักเบียร์ระหว่างเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนและเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในฟลาสก์

4.5 ผลการศึกษาการหมักเบียร์ด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปในระดับถังหมัก

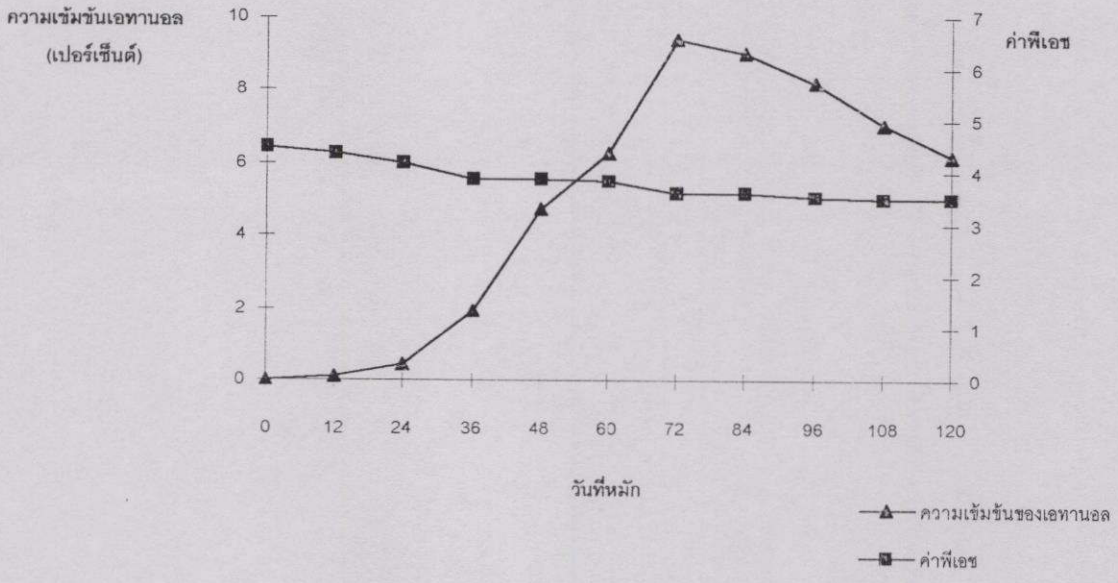
จากการศึกษาการหมักเบียร์ในระดับถังหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) และเซลล์ยีสต์ตรึงรูปแคลเซียมอัลจิเนต (CA และ CCh) ในถังหมักให้ผลดังในภาพที่ 4.16 – 4.20 จากภาพที่ 4.19 พบว่า การหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 4.57 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 72 หรือวันที่ 3 ของการหมัก และการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ10.67 เปอร์เซ็นต์ ในเวลาเดียวกัน สำหรับการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซน (CCh) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 9.42 เปอร์เซ็นต์ ในเวลาเดียวกันเช่นเดียวกัน และน้ำเบียร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตมีกลิ่นแอลกอฮอล์ที่เด่นชัดกว่าน้ำเบียร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซน และเม็ดเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน



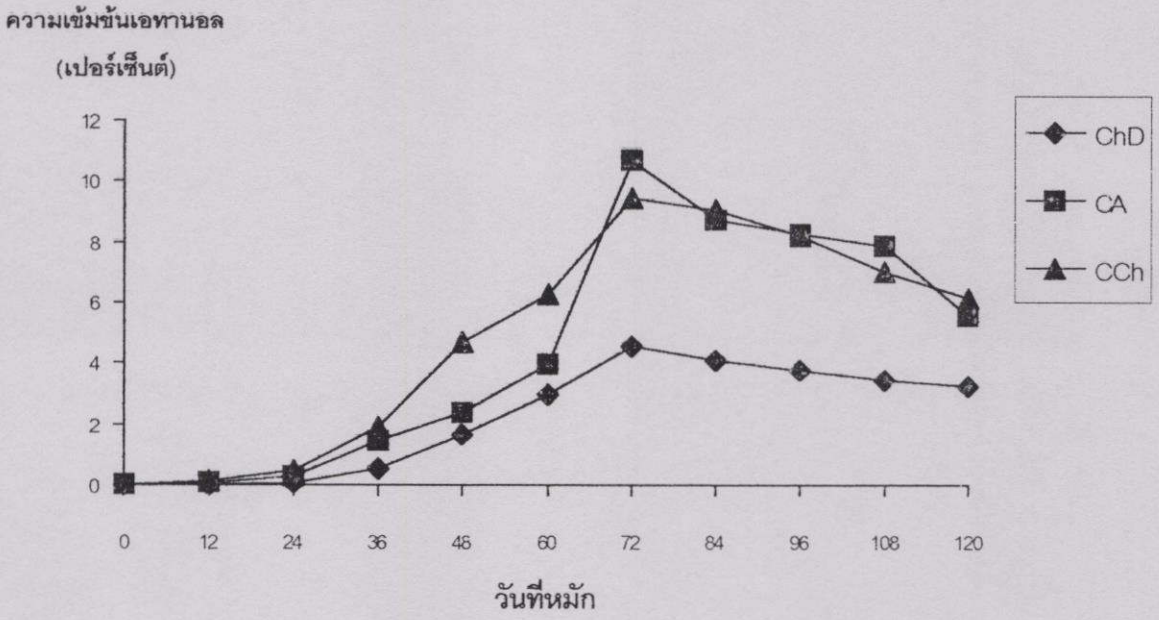
ภาพที่ 4.16 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมเด็กซ์แทรน (ChD) ในถังหมัก



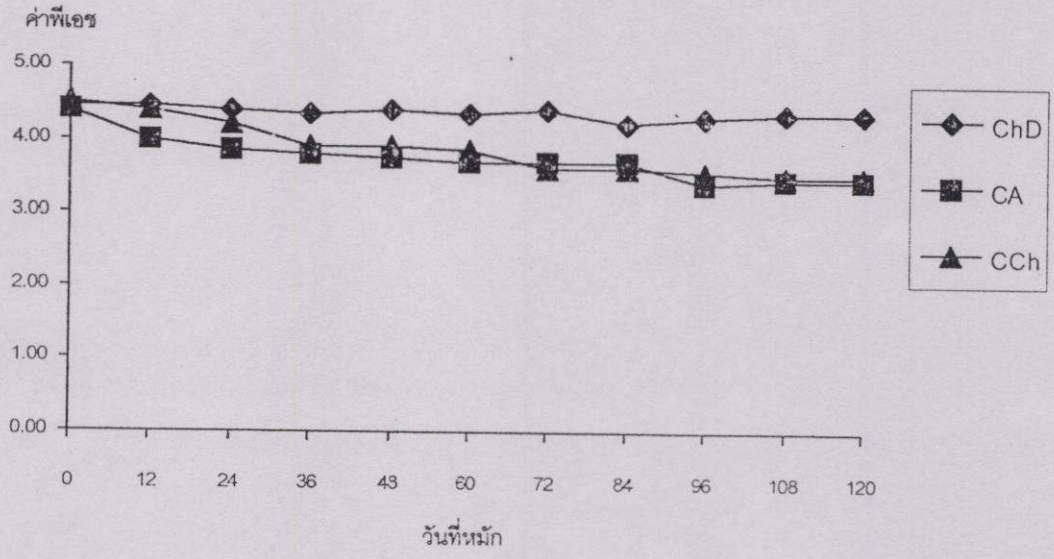
ภาพที่ 4.17 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA) ในถังหมัก



ภาพที่ 4.18 แสดงความเข้มข้นเอทานอลและพีเอชของการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซน (CCh) ในถังหมัก



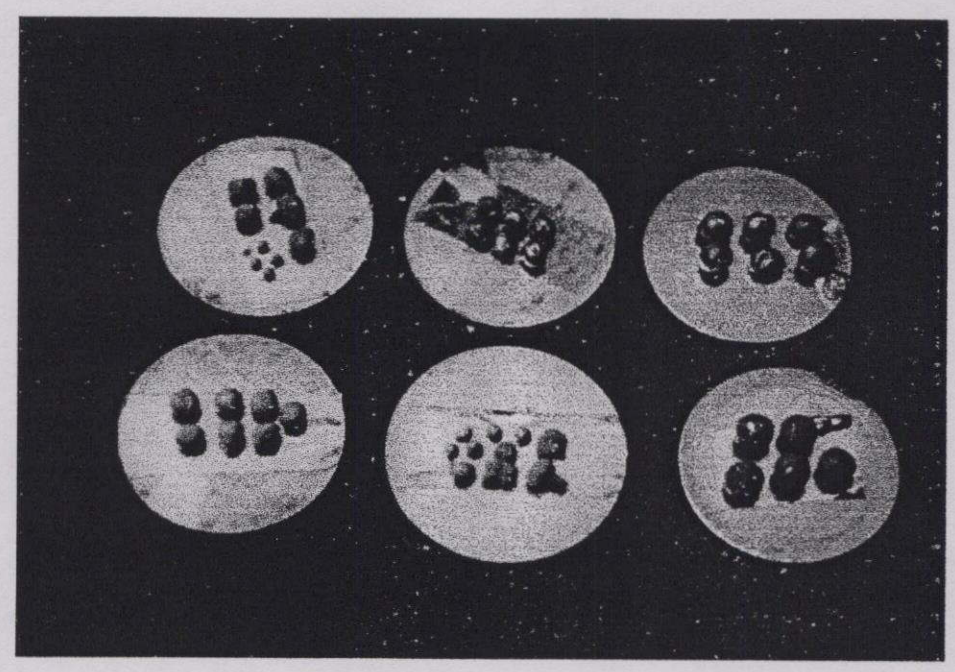
ภาพที่ 4.19 แสดงความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนและเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในถังหมัก



ภาพที่ 4.20 แสดงพีเอชที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนและเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในถังหมัก

4.6 ผลการศึกษาลักษณะพื้นผิวของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปก่อนและหลังการหมักโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

จากการศึกษาลักษณะพื้นผิวของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน (ChD) และเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA และ CCh) ทั้งก่อนและหลังการหมัก โดยเมื่อทำการมองด้วยตาเปล่า พบว่า เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปทั้ง 3 ชนิดหลังการหมักมีสีเข้มขึ้นแต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของรูปทรง และเมื่อทำการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope , SEM) แสดงดังภาพที่ 4.21 – 4.27 พบว่า ลักษณะพื้นผิวของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA) มีลักษณะเป็นรูพรุนทั้งก่อนและหลังการหมัก ซึ่งแตกต่างจากลักษณะพื้นผิวของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซน (CCh) ก่อนการหมัก พบว่าไม่สามารถเห็นเซลล์ยีสต์ได้อย่างชัดเจนเหมือนในเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตแต่ปรากฏรูพรุนขนาดเล็กจำนวนมาก แสดงว่าสารละลายไคโตแซนได้เคลือบเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปอยู่ แต่ภายหลังการหมัก พบว่าสามารถเห็นรูพรุนของเม็ดยีสต์ตรึงรูปได้อย่างชัดเจน สำหรับเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) ก่อนการหมักพบว่าไม่สามารถเห็นเซลล์ยีสต์ได้เช่นเดียวกันกับเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซน และลักษณะของพื้นผิวเป็นผิวเรียบมากกว่า และมีรูพรุนน้อยกว่า หลังการหมักพบว่าผิวด้านนอกบางส่วนของเม็ดหลุดไป จึงมองเห็นเซลล์ยีสต์บริเวณผิวได้ชัดขึ้น ซึ่งการตรึงรูปวิธีนี้ทำให้โอกาสของการสัมผัสน้ำหมักของเซลล์ยีสต์มีน้อยกว่า ดังนั้นจากผลการทดลองของค่าเอทานอลที่ได้จากการหมักจึงมีค่าแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากเซลล์ยีสต์ที่ทำการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตสามารถสัมผัสน้ำหมักได้มากกว่าเซลล์ยีสต์ที่ทำการตรึงด้วยไคโตแซน

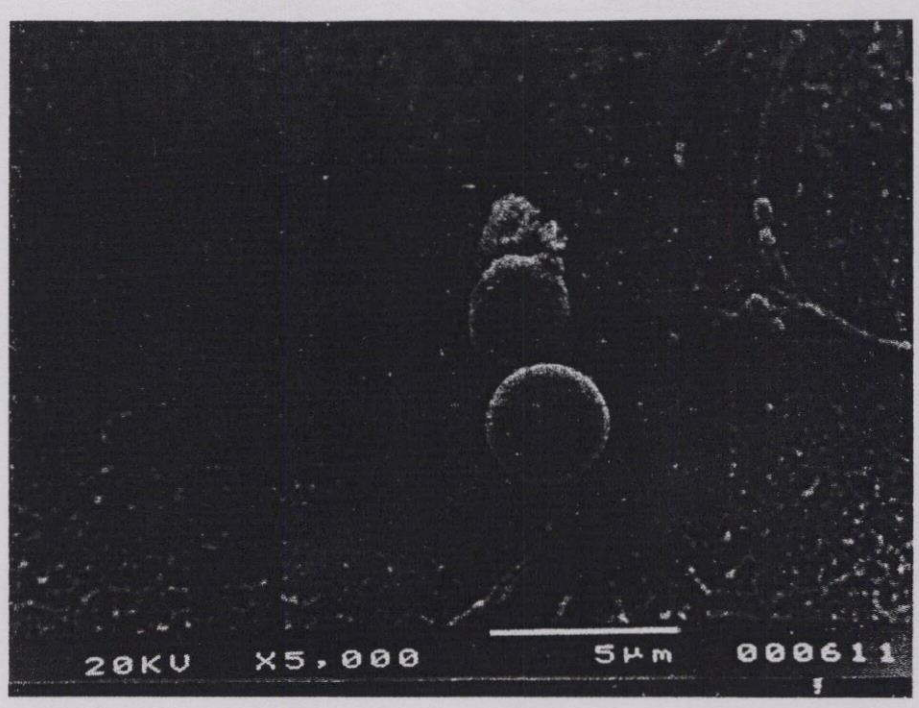


จากรูป 1: CA 2 : CCh 3 : ChD
4: CA 5 : CCh 6 : ChD

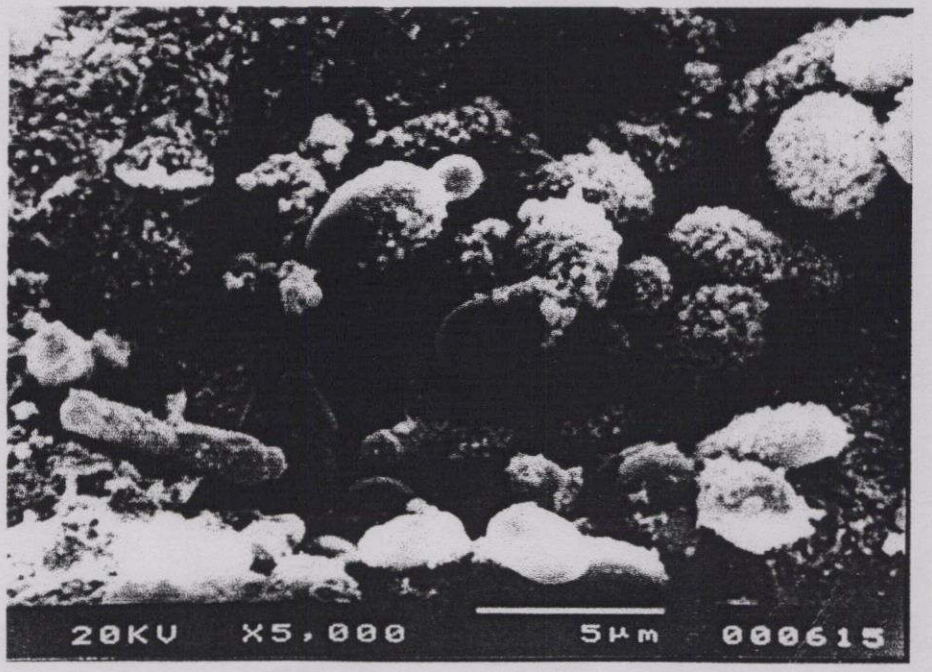
ภาพที่ 4.21 แสดงเม็ดของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่ทำการศึกษาลักษณะพื้นผิวโดยวิธี SEM

แถวบน (ก่อนการหมัก) : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA) ; 1, เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซน (CCh) ; 2 และเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) ; 3

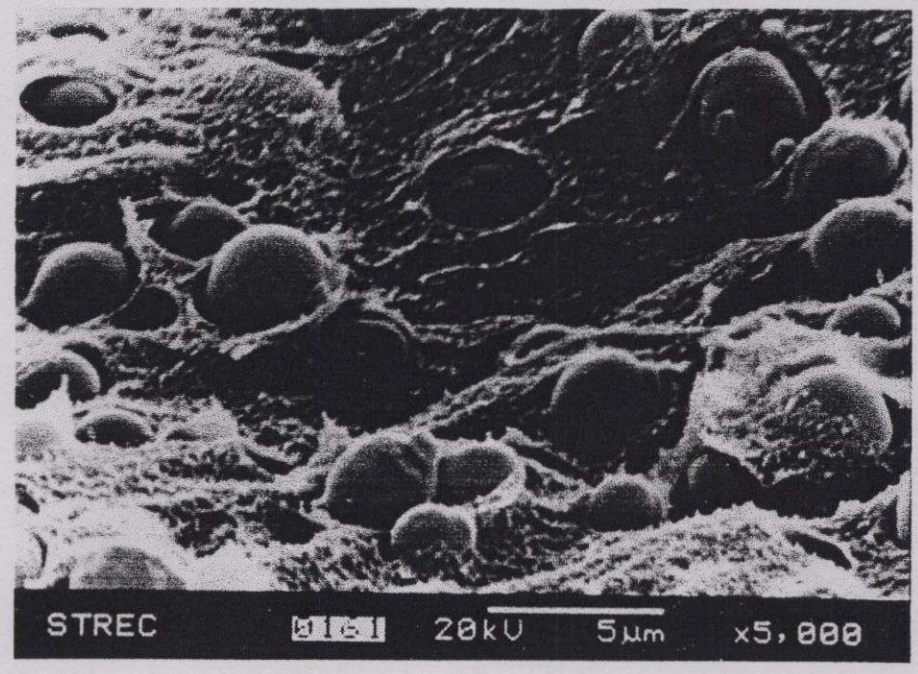
แถวล่าง (หลังการหมัก) : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA) ; 4, เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซน (CCh) ; 5 และเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) ; 6



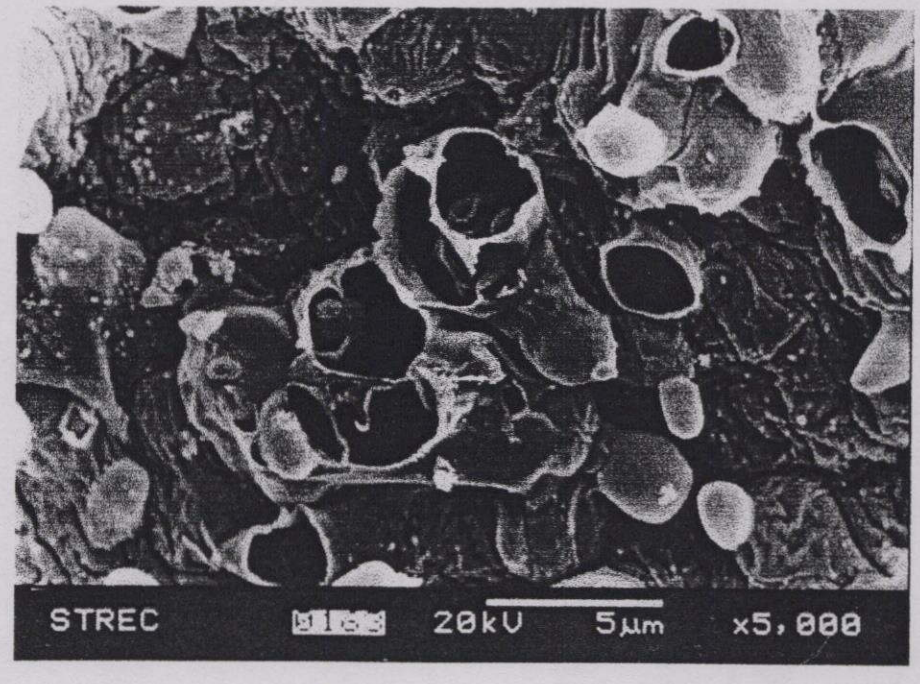
ภาพที่ 4.22 แสดงลักษณะพื้นผิวของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน (ChD) ก่อนการหมัก



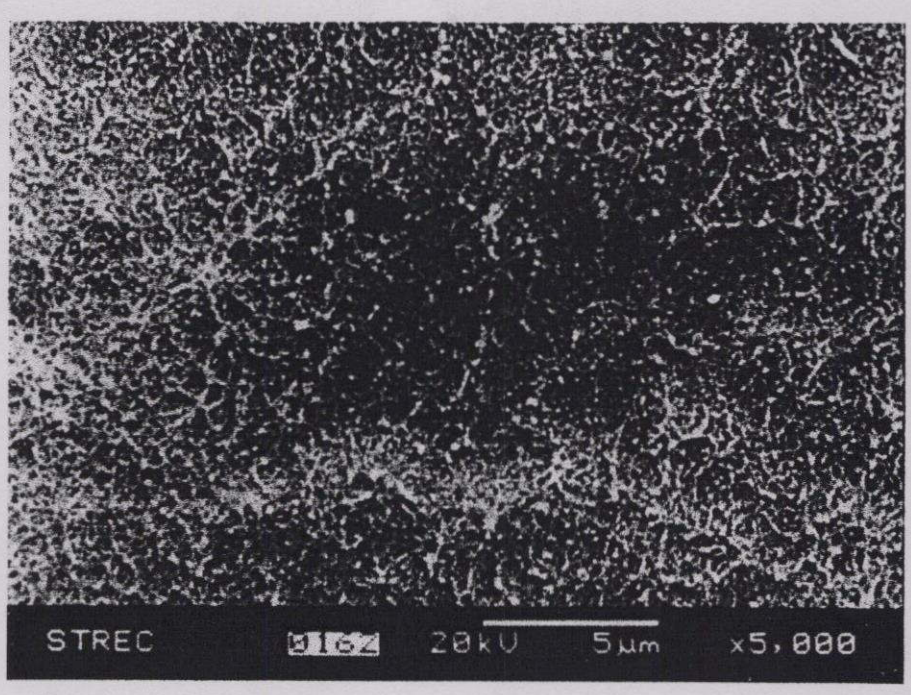
ภาพที่ 4.23 แสดงลักษณะพื้นผิวของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน (ChD) หลังการหมัก



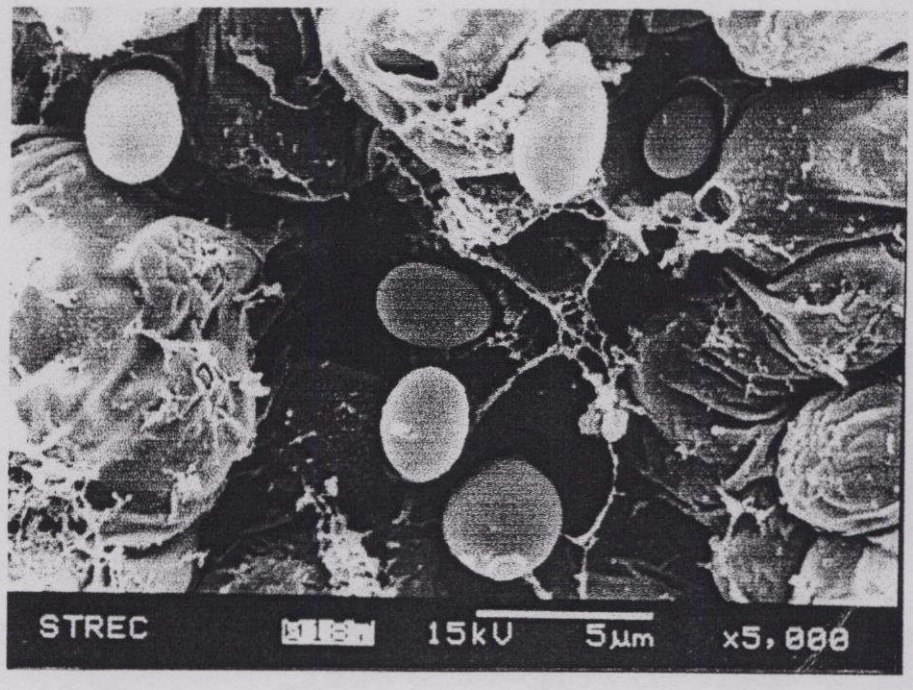
ภาพที่ 4.24 แสดงลักษณะพื้นผิวของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA) ก่อนการหมัก



ภาพที่ 4.25 แสดงลักษณะพื้นผิวของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA) หลังการหมัก



ภาพที่ 4.26 แสดงลักษณะพื้นผิวของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เคลือบด้วยไคโตแซน (CCh) ก่อนการหมัก



ภาพที่ 4.27 แสดงลักษณะพื้นผิวของเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เคลือบด้วยไคโตแซน (CCh) หลังการหมัก

4.7 ผลการศึกษาการทดสอบความชอบในผลิตภัณฑ์ (Sensory Test)

จากการศึกษาการทดสอบความชอบในผลิตภัณฑ์ ซึ่งทำการทดสอบแบบ Scoring Test คือให้คะแนนความชอบ โดยเปรียบเทียบความชอบน้ำเบียร์ที่ได้จากการหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปตัวอย่างที่ทำการควบคุม คือน้ำเบียร์ที่ได้จากการหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA) และ น้ำเบียร์ที่ได้จากการหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปตัวอย่างที่ทำการทดสอบ คือน้ำเบียร์ที่ได้จากการหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) โดยให้คะแนนตามความชอบในสี กลิ่น และความข่น เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SAS และแปรผลการทดสอบด้วยวิธี T – Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % พบว่ามีความแตกต่างกันในความชอบของผลิตภัณฑ์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลของการวัดค่าคะแนนความชอบ และการวิเคราะห์โดยวิธี T – Test แสดงดังในตารางที่ 4.7 – 4.10 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 แสดงผลของการวัดค่าคะแนนความชอบ

คะแนน / คนที่	CA			ChD		
	สี	กลิ่น	ความข่น	สี	กลิ่น	ความข่น
1	3	4	3	2	2	2
2	4	4	4	3	3	3
3	4	4	5	3	2	4
4	4	5	2	3	3	3
5	4	5	4	2	4	3
6	4	2	4	2	4	4
7	3	2	3	3	2	2
8	3	4	2	2	2	1
9	4	4	4	3	2	2
10	5	4	4	2	2	2
11	3	5	5	4	3	3
12	4	4	4	3	2	3
13	4	4	5	3	1	3
14	3	4	3	2	2	1
15	4	4	4	3	5	3

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการทดลองโดยวิธี T-test ในการทดสอบความชอบในสี

TRT	N	Mean	Std. Dev.	Std Error
1	15	3.73333333	0.59361684	0.15327121
2	15	2.66666667	0.61721340	0.15936381

Variances	T	DF	Prob > I T I
Unequal	4.8242	28.0	0.0001
Equal	4.8242	28.0	0.0000

For HO : Variances are equal, F' = 1.08 DF = (14,14)

Prob > F' = 0.8861

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการทดลองโดยวิธี T-test ในการทดสอบความชอบในกลิ่น

TRT	N	Mean	Std. Dev.	Std Error
1	15	3.93333333	0.88371510	0.22817426
2	15	2.60000000	1.05559733	0.27255406

Variances	T	DF	Prob > I T I
Unequal	3.7510	27.2	0.0008
Equal	3.7510	28.0	0.0008

For HO : Variances are equal, F' = 1.43 DF = (14,14)

Prob > F' = 0.5147

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการทดลองโดยวิธี T-test ในการทดสอบความชอบในความชุ่น

TRT	N	Mean	Std. Dev.	Std Error
1	15	3.73333333	0.96115010	0.24816789
2	15	2.60000000	0.91025899	0.23502786

Variances	T	DF	Prob > I T I
Unequal	3.3158	27.9	0.0025
Equal	3.3158	28.0	0.0025

For HO : Variances are equal, F' = 1.11 DF = (14,14)

Prob > F' = 0.8416

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

เมื่อศึกษาการหมักเบียร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนในระดับฟลาสก์ ได้แก่การหมักด้วยเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (Ch) เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนในสารละลายผสมโซเดียมไพโรฟอสเฟตและโซเดียมอัลจิเนต (ChS) เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (ChB) เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและกลูโคส (ChG) เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนและแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) แผ่นเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (ChB) และแผ่นเซลล์ยีสต์ตรึงรูปไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและกลูโคส (ChG) หลังจากทำการหมักพิจารณาปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก ค่าการวัดเนื้อสัมผัสของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปก่อนและหลังการหมัก และลักษณะของน้ำเบียร์ที่ได้หลังการหมัก พบว่าการหมักโดยใช้เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนและแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) สามารถทำการหมักได้ดีที่สุด โดยให้ปริมาณเอทานอลในการหมักเบียร์ คือ 4.82 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 48 หรือวันที่ 2 ของการหมัก ซึ่งค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักให้ค่าเป็นที่น่าพอใจ สามารถยอมรับได้สำหรับมาตราฐานปริมาณเอทานอลของเบียร์ คืออยู่ในช่วง 3 – 5 % เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปคงตัวไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อมองด้วยตาเปล่า ค่าการวัดเนื้อสัมผัสเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปก่อนและหลังการหมักมีค่าสูงกว่าสภาวะอื่นโดยมีค่า 760 และ 500 กรัมต่อวินาที ตามลำดับ และลักษณะของน้ำเบียร์ใสไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อนำมาเปรียบเทียบการหมักด้วยเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA) และเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซน (CCh) พบว่าน้ำเบียร์ที่ได้มีปริมาณเอทานอลสูงกว่าในเวลาเดียวกัน คือ 8.98 และ 9.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อนำมาทำการหมักเบียร์ในระดับถังหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนและแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายผสมโซเดียมอัลจิเนตและเด็กซ์แทรน (ChD) เปรียบเทียบกับการหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (CA) และเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซน (CCh) พบว่าทั้ง 3 สภาวะให้ปริมาณเอทานอลได้สูงสุดคือ 4.57 10.67 และ 9.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระยะเวลาการหมักเดียวกัน คือ 72 ชั่วโมง หรือวันที่ 3 ของการหมัก

อย่างไรก็ตามปัจจุบันนี้ก็ยังมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับการหมักเบียร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป และคาดว่าในปัจจุบันมีการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์เซลล์ยีสต์เพื่อใช้ในการหมักเบียร์ต่อไป

บรรณานุกรม

จันทนี จงนิตยกาล และ ชัชวาลย์ จันเลิศ. 2529. "รายงานภาวะอุตสาหกรรมเบียร์". ใน **การประชุมฝ่ายนโยบาย 4 กองเศรษฐกิจอุตสาหกรรม**. กรุงเทพฯ: สำนักปลัดกระทรวงอุตสาหกรรม.

ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง. 2529. "การใช้ประโยชน์จากไคติน.". **อาหาร** . ฉบับที่ 1-4 : 219-221 .

ไชยา ศุภเสถียร และคณะ . 2534. " การตรึงเซลล์ยีสต์เพื่อผลิตเอทานอล ." วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรบัณฑิต สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ , สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นวลอนงค์ นาคคง. 2534. "กล้องจุลทรรศ์อิเลคตรอน(Electron Microscopic, EM)" **ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง บางเขน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์** .

ไพโรจน์ โสภโณดร และคณะ . 2536. "การใช้ไคโตแซนเป็นสารเคลือบผิวเพื่อยืดอายุการเก็บรักษามะนาว". **วารสารสงขลานครินทร์** . ฉบับที่ 3 : 259-265.

สุวลี จันทร์กระจ่าง. 2542. "ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติและการประยุกต์ใช้ประโยชน์สารไคตินและไคโตแซน." ใน **การสัมมนาทางวิชาการเรื่องความร่วมมือของภาครัฐและเอกชนในการพัฒนาการผลิตและการใช้สารไคติน-ไคโตแซนแบบครบวงจร**. กรุงเทพฯ : MTEC

อรไท สุขเจริญ. 2537. **วิศวกรรมชีวเคมี** . กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ , สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง .

อุดมชัย จินะดิษฐ์. 2535. "ผลิตภัณฑ์จากเปลือกกุ้งกับการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ" . ใน **ส่งเสริมการท่องเที่ยว** ฉบับเทคโนโลยี สิงหาคม-กันยายน ปีที่ 19 ฉบับที่ 104 : 50-54.

Abdel-Halim, et. al. "Morphology of *Penicillium chrysogenum* Strains Immobilized in Calcium Alginate Beads and Used in Penicillin Fermentation" **Applied Microbial Biotechnology** 24(1986) : 89-94.

A.O.A.C. , **Official Methods of Analysis** , 16 th ed. , Washington D.C. , The Association of Official Analytical Chemist , 1990

Beech, G.A., et. al. 1985, "Food Drink and Biotechnology", in **Biotechnology** Principles and Applications, pp. 73 –110 . Edited by I.J. Higgins, D.J. Best and J.Jones.Blackwell Scientific Publications,Oxford.

Bernfeld, P. et. al. in **Method in Enzymology**. vol. 1, pp. 149, Academic Press, New York, 1955.

Brown, C.M. et. al. in **Growth and Fermentation Systems**, Introduction to Biotechnology, 66, Blachwell Scientific Publications, 1987.

Cuero, R.G. "Enhanced Heavy Metal Immobilization by A Bacterial-Chitosan Complex in Soil" **Biotechnology Letters** 18(5). 1996 : 511-514.

Demuyakor, B. et. al. " Promotive Action of Ceramics on Yeast Ethanol Production, and its Relationship to pH, Glycerol and Alcohol Dehydrogenase Activity" **Applied Microbial Biotechnology** 36(1992) : 717-721.

Freeman, A. and Dror, Y. "Immobilization of "Disguised" Yeast Chemically Crosslinked Chitosan Beads" **Biotechnology and Bioengineering** 44(1994) : 1083-1088.

Gosmann, B. and Rehm, H.J. "Oxygen Uptake Microorganisms entrapped in Ca-alginate" **Applied Microbial Biotechnology** 23(1986) : 163-167.

Hammond, R.M. "Brewer's Yeasts" in **The Yeasts**, volume 5 : Yeast Technology, 2nd ed., Academic Press , London, 1993.

Hardwick, W. **Beer** in Biotechnology volume 5. Food and Feed Production with Microorganisms, chapter 3 : 165-229, Verlag Chemie, Missouri, 1983.

Hough, J.S. and Button, A.H. **Continuous Brewing** in Progress in Industrial Microbiology, volume 11, chapter 11 : 89-132, Livingstone Edinburgh and London, London, 1972.

Huguet, M.L. et. al." Calcium-Alginate Beads Coated with Polycationic Polymers : Comparison of Chitosan and DEAE-dextran" **Process Biochemistry** 31(4). 1996 : 347-353.

Huguet, M.L. and Dellacherie E. " Calcium Alginate Beads Coated by Chitosan: Effect of Structure of Encapsulated Materials on Their Release" **Process Biochemistry** 31 (8).1996 : 745-751.

Kaya , V.M. and Picard , G. "Stability of Chitosan gels as entrapment matrix of viable *Scennedesmus bicellularis* Cells Immobilized on Screens for tertiary treatment of wastewater" **Bioresource Technology** 56(1996) : 147-155

Klein, J. and Vorlop, K.D. **Immobilization of Whole Cells** in Biotechnology Focus 1 : 325-

336, Hanser Publishers, New York, 1988.

Kierstan, M. and Bucke, C. "The Immobilization of Microbial Cells, Subcellular Organelles, and Enzymes in Calcium Alginate Gels" **Biotechnology and Bioengineering** 19(1977) : 387-397.

Knorr, D., et. al. " Potential of Acid Soluble and water solubleChitosans in Biotechnology." In **Chitin and Citosan** : 101-118, Elsevier Applied Science, London and New York, 1989.

Kurosawa, H. et. al."Ethanol Production from Starch by a Coimmobilized Mixed Culture System of *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces cerevisiae*" **Biotechnology and Bioengineering** 33(1989) : 716-723.

Li, X. "The Use of Chitosan to Increase the Stability of Calcium Alginate Beads with Entrapped Yeast Cells" **Biotechnology Applied Biochemistry** 23(1996) : 269-271.

Martino, A. et. al."Immobilization of β- Glucosidase from a Commercial Preparation. Part 1. A Comparative Study of Natural Supports" **Process Biochemistry** 31(3). 1996 : 281-285.

Masschelein, C.A. et. al."Immobilized Cell Technology in Beer Production" **Critical Reviews in Biotechnology** 14(2). 1994 : 155-177.

McGhee, J.E. et. al."Ethanol Production by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces uvarum,* and *Zymomonas mobilis*" **Biotechnology and Bioengineering** 24(1982) : 1155-1163.

Nestle N. and Kimmich R. " NMR Microscopy of Heavy Metal Absorption in Calcium Alginate Beads " **Applied Biochemistry and Biotechnology** 56(1995): 9-17.

Norton, S. and D'Amore, T. "Physiological Effects of Yeast Cell Immobilization: Applications for Brewing" **Enzyme Microbial Technology** 16(1994) : 365-375.

Pajunen, E. "Immobilized Systems in the Brewing Industry" **Proceedings: twenty-forth convention** 1996 : 38-43.

Riso, L.D. et. al."Immobilization of *Bacillus acidocaldarius* Whole-cell Rhodanese in Polysaccharide and Insolubilized Gelatin Gels" **Biotechnology Applied Biochemistry** 23(1996) : 127-131.

Shinonaga, M. et. al."Continuous Production of Phospholipase D by *Streptomyces lydicus* D-121 Immobilized with Cross-Linked Chitosan Beads" **Journal of**

Fermentation and Bioengineering 81(4). 1996 : 310-314.

Skjak – braek. et al. **Chitin and Chitosan** . London and New York : Elsevier Applied Science. , 1989

Sroka, W. and Rzedowski, W. "The Effect of Yeast Cell Immobilization on the Proportion of Selected By-Products of Ethanol Fermentation" **Biotechnology Letters** 13(12). 1991 : 879-882.

Stewart, G.G. and Russell, I. " Modern Brewing Biotechnology ", pp 352 in **Comprehensive Biotechnology**, Volume 3 , edited by Murray Moo-Yonung , Pergamon Press, Oxford , 1985.

Sun, W. and Payne, G.F. "Tyrosinase-Containing Chitosan-Gel: A Combined Catalyst and Sorbent for Selective Phenol Removal" **Biotechnology and Bioengineering** 51 (1996) : 79-86.

Tampion, J. and Tampion, M.D. in **Immobilized Cells : Principle and Application**, Cambridge University Press, London, 1987.

Tenney, R. " The Brewing Industry " in **Industrial Fermentation** volume 1 pp. 172-195. Edited by Lel and A.Underkofler and Richard J. Wickcy .Chemical Publisher, USA, 1954.

Veliky, I.A. **Introduction** in Immobilized Biosystems Theory and Practical Application (Veliky, I.A. and Mc Clean, R.J.C., ed.) : XV-XVI, An Imprint of Chapman & Hall, USA, 1994.

Williams, D. and Munnecke, D.M. "The Production of Ethanol by Immobilized Yeast Cells." **Biotechnology and Bioengineering** 23(1981) : 1813-1825.

Yamauchi, Y. et. al. "Beer Brewing Using an Immobilized Yeast Bioreactor Design of an Immobilized Yeast Bioreactor for Rapid Beer Brewing System" **Journal of Fermentation and Bioengineering** 78(6). 1994 : 443-449.

Yoo, I.K. et. al. "Encapsulation of *Lactobacillus casei* Cells in Liquid-Core Alginate Capsules for Lactic Acid Production" **Enzyme and Microbial Technology** 19 (1996) : 428-433.

Yu, B. et. al."Alcohol Fermentation from the Mash of Dried Sweet Potato with its Dregs Using Immobilized Yeast" **Process Biochemistry** 31(1). 1996 : 1-6.

Zeng, X.and Ruckenstein, E. "Control of Pore Sizes in Macroporous Chitosan and Chitin Membranes" **Industral Engineering Chemistry Reserved** 35(1996) : 4169-4175.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำวอร์ต

1. อาหารสูตร Yeast Malt Extract (YM) ต่อปริมาตร 1 ลิตร

ยีสต์สกัด (yeast extract)	3 กรัม
มอลท์สกัด (malt extract)	3 กรัม
เพบโทน (peptone)	5 กรัม
กลูโคส (glucose)	10 กรัม
วุ้น (agar)	20 กรัม

2. อาหารสูตร Yeast Malt Extract Broth (YMB) ต่อปริมาตร 1 ลิตร

ยีสต์สกัด (yeast extract)	3 กรัม
มอลท์สกัด (malt extract)	3 กรัม
เพบโทน (peptone)	5 กรัม
กลูโคส (glucose)	10 กรัม

3. น้ำวอร์ต (Wort) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเบียร์คาร์ลสเบริก

carbohydrates (91% of extract)	100 กรัมต่อลิตร
total nitrogen	5 กรัมต่อลิตร
polyphenols	140 มิลลิกรัมต่อลิตร
hops	30 มิลลิกรัมต่อลิตร
lactic acid	65 มิลลิกรัมต่อลิตร
salts	7 มิลลิกรัมต่อลิตร
oxygen	8 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาคผนวก ข.

วิธีการเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลาย NaH_2PO_4 ให้มีความเข้มข้น 0.2 โมล(สาร 27.8 กรัม ในน้ำ 1000 มิลลิลิตร) และสารละลาย $Na_2HPO_4.7H_2O$ หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ให้มีความเข้มข้น 0.2 โมล (สาร 53.65 กรัม ในน้ำ 1000 หรือ สาร 71.7 กรัม ในน้ำ 1000 ตามลำดับ)

นำสารละลายแรกปริมาตร 390 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายที่สอง 610 มิลลิลิตร และเติมน้ำ 1000 มิลลิลิตร ก็จะได้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล

ภาคผนวก ค.

วิธีการขึ้นรูปและตรึงรูปเซลล์ยีสต์โดยใช้แคลเซียมอัลจิเนต

เซลล์ยีสต์ที่ทำการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเจล (CA) ซึ่งดัดแปลงมาจาก Yamauchi และคณะ (1994)

เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ซึ่งเตรียมในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ)นำมาผสมเซลล์ยีสต์เปียกในอัตราส่วน เซลล์ยีสต์เปียก 12 กรัม ต่อสารละลายแคลเซียมอัลจิเนต 100 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นค่อยๆหยดส่วนผสมผ่านเข็มฉีดยาพลาสติกขนาด 20 มิลลิลิตร ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 0.2 โมล ที่มีการกวนอย่างสม่ำเสมอ ทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 7 ความเข้มข้น 0.1 โมล 3 ครั้ง เพื่อทำให้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปมีค่าพีเอชเป็นกลาง

เซลล์ยีสต์ที่ทำการตรึงด้วย แคลเซียมอัลจิเนตที่เคลือบด้วยไคโตแซน (CCh) ซึ่งดัดแปลงมาจาก Huguet และ Dellacherie (1996)

เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ซึ่งเตรียมในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ)นำมาผสมเซลล์ยีสต์เปียกในอัตราส่วน เซลล์ยีสต์เปียก 12 กรัม ต่อสารละลายแคลเซียมอัลจิเนต 100 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นค่อยๆหยดส่วนผสมผ่านเข็มฉีดยาพลาสติคขนาด 20 มิลลิลิตร ลงในสารละลายผสมแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 โมล และสารละลายไคโตแซน ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ซึ่งเตรียมโดยการละลายด้วยกรดแอซีติก ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์) ในอัตราส่วนความเข้มข้นไคโตแซน 7 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการกวนอย่างสม่ำเสมอ ทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 7 ความเข้มข้น 0.1 โมล 3 ครั้ง เพื่อทำให้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปมีค่าพีเอชเป็นกลาง

ภาคผนวก ง.
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

(Scannig Electron Microscope, SEM), นวลอนงค์ นาคคง, 2534

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เป็นเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้สำหรับขยายภาพของวัตถุขนาดเล็กมากๆ ให้มีขนาดใหญ่ขึ้นจนสามารถสังเกตเห็นรายละเอียดต่างๆได้ชัดเจนยิ่งขึ้น สามารถใช้ในการศึกษาสัณฐานและลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง ภาพที่ได้จะเห็นเป็นภาพ 3 มิติ ตัวกล้องประกอบด้วยคอลัมน์และช่อง (chamber) ต่างๆ ซึ่งถูกควบคุมการทำงานด้วยระบบต่างๆ ได้แก่

1. **ระบบแสง (illuminating system)** หมายถึง แหล่งกำเนิดอิเล็กตรอน (electron gun, cathode) และส่วนรวบรวมแสงอิเล็กตรอนให้ตกบนตัวอย่าง (condenser lens)

electron gun ประกอบด้วย

1. filament เป็นโลหะต้นกำเนิดของแสงอิเล็กตรอน และสารประกอบโบรไมด์ของแลนทาลั่ม โดยเมื่อได้รับกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์สูงมากพอ filament จะปลดปล่อยกระแสอิเล็กตรอนออกมา
2. grid cap (wehnelt) เป็นฝาคลอบ filament ทำหน้าที่บังคับกระแสอิเล็กตรอนให้วิ่งผ่านรูของฝาคลอบไปยังขั้วอะโนดโดยอาศัยความต่างศักย์
3. anode เป็นขั้วบวกที่ทำหน้าที่ดึงดูดให้กระแสอิเล็กตรอนวิ่งผ่านเข้าไปในคอลัมน์ด้วยความเร็วสม่ำเสมอ condenser lens อยู่เหนือแท่นวางตัวอย่าง ทำหน้าที่รวบรวมและปรับแสงอิเล็กตรอนให้มีความเข้มข้นจนเป็นลำแสงสว่าง

2. **ระบบเกิดภาพ (imaging system)** เป็นการส่งสัญญาณคลื่น ซึ่งจะถูกนำไปขยายและแปรผลเป็นภาพบนจอโทรทัศน์ โดยที่แสงอิเล็กตรอนจะถูกโฟกัสลงบนผิวของตัวอย่างและถูกควบคุมให้เคลื่อนที่ไปตามบริเวณที่ต้องการศึกษาด้วยระบบสแกนจาก scanning coil แสงอิเล็กตรอนจาก filament (primary electron) ที่ไปกระทบตัวอย่างจะทำให้อิเล็กตรอนของตัวอย่างหลุดออกมาเป็น secondary electron (SE) ตัวกล้องจะมี detector จับสัญญาณ SE แล้วเปลี่ยนเป็นสัญญาณไฟฟ้าผ่านท่อนำแสงไปยังภาคขยายแสง แล้วส่งผลไปยัง cathode ray tube ของจอโทรทัศน์ การบันทึกภาพสามารถบันทึกจากจอโทรทัศน์ได้เลย ส่วนใน SEM รุ่นใหม่ๆ สัญญาณไฟฟ้าจะถูกอ่านเป็นระบบดิจิตอล ซึ่งสามารถแปรสัญญาณภาพบนจอมอนิเตอร์ของเครื่องคอมพิวเตอร์และสามารถบันทึกภาพได้ทางพรินเตอร์

3. **ระบบสูญญากาศ (vacuum system)** ภายในคอลัมน์และช่องต่างๆของกล้องเป็นสูญญากาศ เนื่องจากความจำเป็นในการควบคุมแสงอิเล็กตรอนให้คงที่ตลอด หากมีโมเลกุลของ

ก๊าซอื่นๆจะทำปฏิกิริยากับอิเล็กตรอน ทำให้การกระจายตัวของอิเล็กตรอนไม่เป็นระเบียบมีผล ทำให้ความคมชัดของภาพลดลง หรือทำให้เกิด electric discharge โดยใช้ปั๊มอย่างน้อย 2 ตัว ได้แก่ rotary pump และ oil diffusion pump

นอกจากนี้ ยังมีระบบจ่ายกำลังไฟฟ้า (power supply system) และระบบระบายความร้อน (cooling system) ซึ่งช่วยให้ระบบอื่นๆทำงานได้คงที่

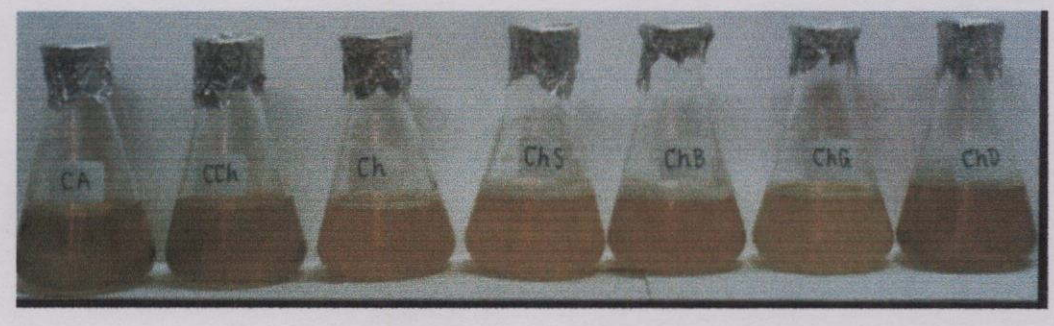
ภาคผนวก จ.
การวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล

เนื่องจากปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลอง มีคุณสมบัติในการกลายเป็นไอได้ง่าย จึงสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟีได้ ในการทดลองนี้ใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟีชนิด Gas Liquid Chromatography ซึ่งมีส่วนตรวจวัดสารแบบ Flame ionization รุ่น GC-7AG ของ Shimadzu คอลัมน์ Porapak Q ที่มีความยาว 2 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลของเบียร์ จาก AOAC (1990)

วิธีการวิเคราะห์

ทำการเตรียมเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี โดยใช้แก๊สไนโตรเจนเป็น carrier gas เพื่อจะทำการพาไอของสารตัวอย่างผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ ที่มีอัตราการไหลที่ 50 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมให้อุณหภูมิของการไหลเข้า (injection) ที่ 220 องศาเซลเซียส อุณหภูมิคอลัมน์ที่ 180 องศาเซลเซียส อุณหภูมิส่วนตรวจวัดสารที่ 220 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการฉีดน้ำเบียร์ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง นำค่าปริมาณพื้นที่ใต้กราฟ หาค่าปริมาณเอทานอลโดยคำนวนจากกราฟมาตราฐาน

ภาคผนวก ฉ.
รูปภาพน้ำหมักและเม็ดเซลล์ยีสต์ในการทดลอง



ภาพที่ ฉ – 1 แสดงน้ำหมักที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนชนิดต่างๆ และแคลเซียมอัลจิเนต

CA : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

CCh : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซน

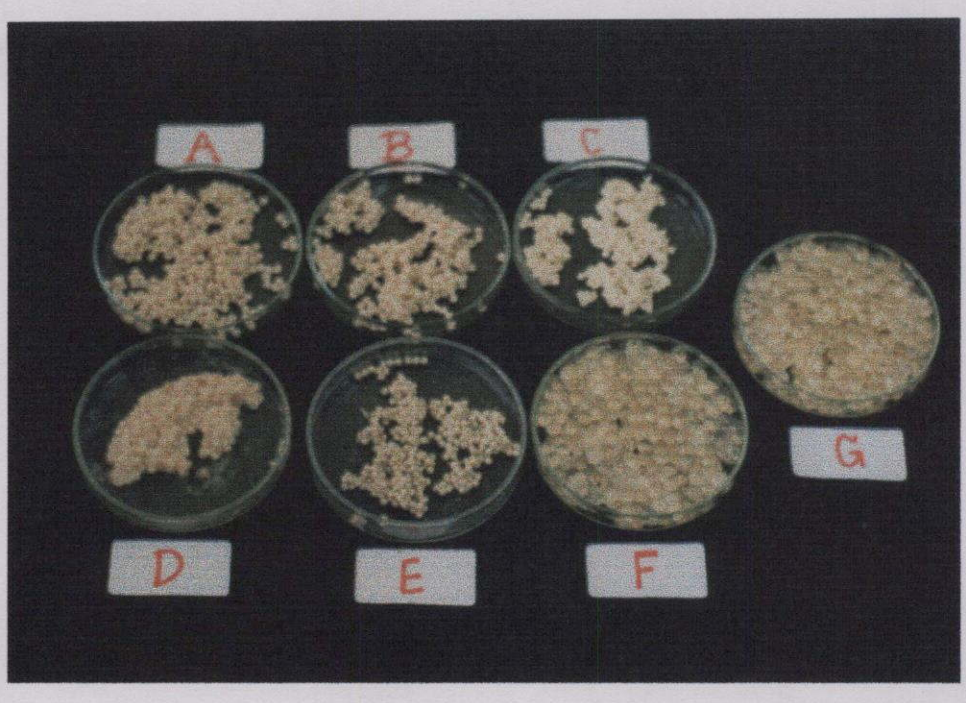
Ch : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต

ChS : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตผสมโซเดียมอัลจิเนต

ChB : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต

ChG : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมกลูโคส

ChD : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมเด็กซ์แทรน



ภาพที่ ฉ – 2 แสดงลักษณะเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนวิธีการต่างๆและแคลเซียมอัลจิเนตในการทดลองก่อนการหมัก

A : CA B : CCH C : Ch

G : ChD

D : ChS E : ChB F : ChG

CA : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

CCh : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซน

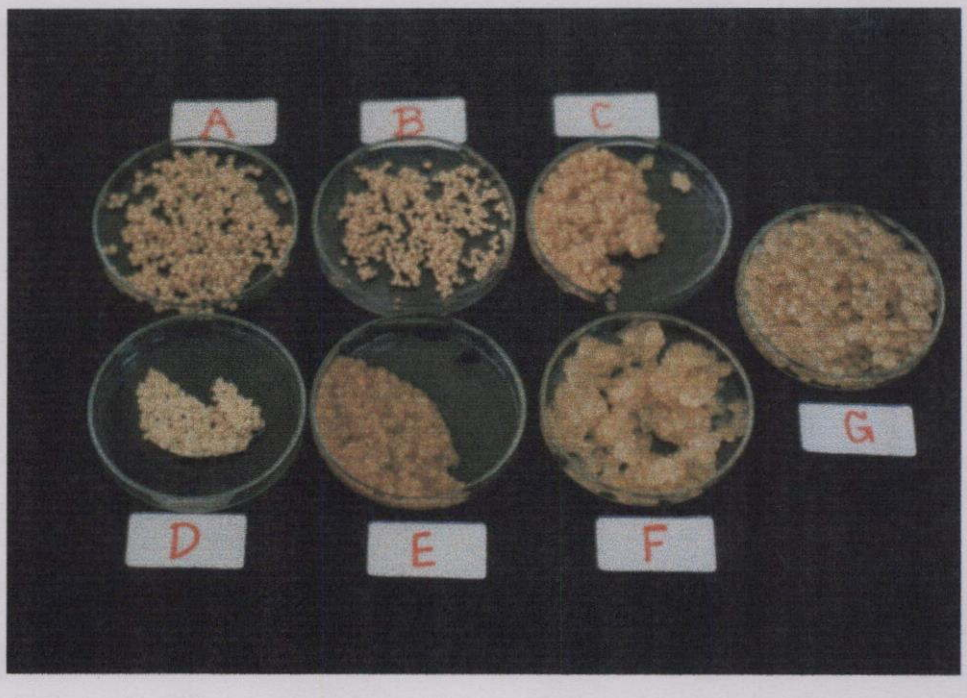
Ch : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต

ChS : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตผสมโซเดียมอัลจิเนต

ChB : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต

ChG : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมกลูโคส

ChD : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมเด็กซ์แทรน



ภาพที่ ฉ – 3 แสดงลักษณะเม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนวิธีการต่างๆและแคลเซียมอัลจิเนตในการทดลองหลังการหมัก

A : CA B : CCH C : Ch

G : ChD

D : ChS E : ChB F : ChG

CA : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

CCh : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตแซน

Ch : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต

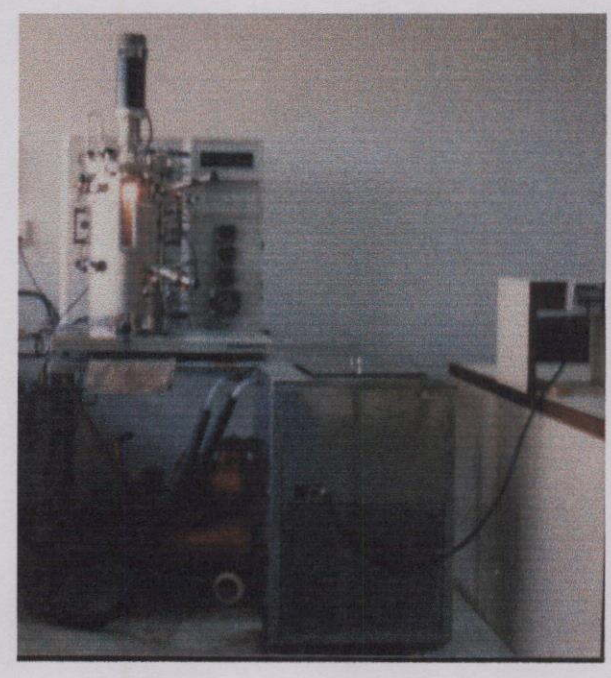
ChS : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตผสมโซเดียมอัลจิเนต

ChB : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมเบนโทไนต์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต

ChG : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมกลูโคส

ChD : เม็ดเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซนผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ขึ้นรูปในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมเด็กซ์แทรน

ภาคผนวก ช.
รูปภาพถังหมัก 20 ลิตร ที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ ช. แสดงรูปภาพถังหมักขนาด 20 ลิตร รุ่น Bio Flo IV

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอัจฉรีย์ เอี่ยมผ่อง เกิดเมื่อวันที่ 30 มีนาคม 2515 ที่จังหวัดพิษณุโลก สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีจาก สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2537 และเข้าทำการศึกษาต่อในระดับปริญญาโทในปีการศึกษา 2538 ในภาควิชาเดิม ระหว่างทำการศึกษาได้มีประสบการณ์ในการเป็นผู้ช่วยสอนอาจารย์ในเรื่อง ถังหมัก เซลล์และเอนไซม์ตรึงรูปแก่นักศึกษาระดับปริญญาตรีในบางครั้ง และได้รับเกียรติจากอาจารย์ให้ไปเป็นผู้ช่วยสอนนักศึกษาเทคโนโลยีราชมงคลเทคนิคกรุงเทพในเรื่อง เครื่องดื่มแอกลกอฮอล์

มีผลงานวิจัยเผยแพร่ในงานวิชาการงานเกษตรแฟร์ในหัวข้อเรื่อง " การหมักเบียร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยไคโตแซน" ในปี พ.ศ. 2542 และระหว่างรอสอบจบการศึกษาระดับปริญญาโทได้มีโอกาสทำงานในตำแหน่ง Business Development Co-ordinator ที่บริษัทเฮอริเทจเมอร์เกอร์บอนจำกัด จังหวัดนครปฐม