

การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Amylomyces
rouxii* TISTR 3182 และเซลล์ตรึงรูปของเชื้อ *Saccharomyces
cerevisiae* TISTR 5088

BIOETHANOL PRODUCTION FROM CASSAVA USING *Amylomyces
rouxii* TISTR 3182 AND IMMOBILIZED CELLS OF *Saccharomyces
cerevisiae* TISTR 5088

วชิรญาณม์ จันทโชติ

WACHIRAYA JANTHACHOT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2563

KMITL-2020-SC-M-020-034

การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Amylomyces
rouxii* TISTR 3182 และเซลล์ตรึงรูปของเชื้อ *Saccharomyces
cerevisiae* TISTR 5088

BIOETHANOL PRODUCTION FROM CASSAVA USING *Amylomyces
rouxii* TISTR 3182 AND IMMOBILIZED CELLS OF *Saccharomyces
cerevisiae* TISTR 5088

วชิรญาณ จันทโชติ

WACHIRAYA JANTHACHOT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2563

KMITL-2020-SC-M-020-034

BIOETHANOL PRODUCTION FROM CASSAVA USING *Amylomyces
rouxii* TISTR 3182 AND IMMOBILIZED CELLS OF *Saccharomyces
cerevisiae* TISTR 5088

WACHIRAYA JANTHACHOT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2020

KMITL-2020-SC-M-020-034

COPYRIGHT 2020

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ <i>Amylomyces rouxii</i> TISTR 3182 และเซลล์ตรึงรูปของเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5088
นักศึกษา	นางสาวชिरุญาณ์ จันทโชติ
รหัสประจำตัว	59605058
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2563
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดวงใจ โอชัยกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

บทคัดย่อ

ไบโอเอทานอลจัดเป็นพลังงานชีวภาพที่กำลังได้รับความสนใจ เนื่องจากเป็นพลังงานทดแทนที่มีประสิทธิภาพ ต้นทุนการผลิตต่ำ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังด้วยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation; SHF) เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการย่อยมันสำปะหลัง (Saccharification) ด้วยเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 พบว่า การใช้ความเข้มข้นมันสำปะหลังร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ไม่มีการปรับพีเอช และความเข้มข้นสปอร์เชื้อราเริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด คิดเป็น 3.09 ± 0.59 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คิดเป็น 84.17 ± 1.89 กรัมต่อลิตร ตามด้วยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลโดยใช้เซลล์ตรึงของ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 พบว่าการใช้เซลล์ตรึงที่ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจินเตตร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเม็ดเจลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3.35 มิลลิเมตร ในวันที่ 1 จะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด ค่าผลได้เอทานอล และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 35.14 ± 13.99 กรัมต่อลิตร 0.36 ± 0.18 กรัมต่อกรัม และ 0.24 ± 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลร้อยละ 65.44 ± 31.25 เมื่อเทียบกับทฤษฎี ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้เซลล์อิสระ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการนำเซลล์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ พบว่าเซลล์ตรึงรูปเสียหายตั้งแต่วันแรกของกระบวนการหมัก เมื่อดูพื้นผิวเม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูปก่อนและหลังการหมักด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเม็ดเจลหลังการหมักมีการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายบนพื้นผิว โดยมีรูพรุนกว้างขึ้น

คำสำคัญ : การตรึงเซลล์ ไบโอเอทานอล มันสำปะหลัง *Saccharomyces cerevisiae*

Amylomyces rouxii

Thesis Title	Bioethanol production from cassava using <i>Amylomyces rouxii</i> TISTR 3182 and immobilized cells of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5088
Student Name	Wachiraya Janthachot
Student ID	59605058
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2020
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul
Thesis Co-advisor	Asst. Prof. Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj

Abstract

Bioethanol is categorized as an interesting biofuel due to its efficiency of renewable energy source, low production costs and environmentally friendly. The objective of this research is to produce ethanol from cassava using a separate hydrolysis and fermentation (SHF) process. Optimization on saccharification by *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 was studied. The result showed that 20 % (w/v) cassava concentration without pH adjusted and 10^7 spore/mL of *A. rouxii* TISTR 3182 were optimum conditions in 4th date showed glucoamylase activity and reducing sugars representing 3.09 ± 0.59 unit/mL and 84.17 ± 1.89 g/L, respectively. Followed by optimization on ethanol fermentation using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088, the result revealed that 2% (w/v) calcium alginate with diameter larger more than 3.35 mm at 1st date showed the highest ethanol concentration, yield of ethanol and productivity representing 35.14 ± 13.99 g/L, 0.36 ± 0.18 g/g and 0.24 ± 0.11 g/L/h, respectively, whereas the fermentation efficiency was 65.44% of the theoretical value, which was statistically insignificant difference to that of the free cell. Moreover, the immobilized cell was damaged in 1st date. Scanning electron microscope (SEM) study confirmed that immobilized *S. cerevisiae* TISTR 5088 grew on bead surface leading to widen gel porous.

Keywords : Immobilization, Bioethanol, Cassava, *Saccharomyces cerevisiae*

Amylomyces rouxii

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากผู้จัดทำวิทยานิพนธ์ได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณดังต่อไปนี้ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ที่ให้คำแนะนำ ความรู้ และแนวทางในการค้นคว้าการทำวิจัย พร้อมทั้งตรวจทานและแก้ไขความผิดพลาดของการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อรไท สุขเจริญ ประธานกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้ที่ให้คำแนะนำ ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีทางวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งเจ้าหน้าที่ธุรการที่ได้อำนวยความสะดวกในการประสานงาน และสุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจต่อผู้จัดทำ จนกระทั่งการทำวิทยานิพนธ์สำเร็จไปตามที่คาดหวัง ตลอดจนขอขอบคุณเพื่อนๆ ที่คอยอยู่เคียงข้างและให้ความช่วยเหลือ พร้อมทั้งเป็นกำลังใจให้กันเสมอมา

หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ มีความผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

นางสาววชิรญาณ์ จันทโชติ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญรูป.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 เอทานอล.....	4
2.1.1 กระบวนการผลิตไบโอเอทานอล	4
2.1.2 ขั้นตอนการผลิตไบโอเอทานอล	5
2.1.3 ประโยชน์ของไบโอเอทานอล	6
2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล.....	6
2.2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล.....	6
2.3 มันสำปะหลัง.....	7
2.3.1 การจัดลำดับอนุกรมวิธาน.....	7
2.3.2 พฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง.....	7
2.3.3 องค์ประกอบและคุณค่าทางโภชนาการของมันสำปะหลัง.....	8
2.4 เอนไซม์.....	9
2.4.1 เอนไซม์อะไมเลส.....	10
2.4.2 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ในทางอุตสาหกรรม.....	12
2.5 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลจากมันสำปะหลัง.....	12
2.5.1 คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล.....	12
2.5.2 เชื้อรา <i>Amylomyces rouxii</i>	13
2.5.3 เชื้อยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6 กระบวนการตรึงหรืออิมโมบิไลเซชัน.....	16
2.6.1 สารพยุงที่ใช้ในกระบวนการตรึง.....	16
2.6.2 วิธีการตรึง.....	17
2.6.3 การกักเก็บ.....	17
2.6.4 ประโยชน์ของการตรึงเซลล์.....	19
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	20
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	24
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	24
3.2 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการทดลอง.....	24
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	24
3.4 อุปกรณ์.....	25
3.5 วิธีการทดลอง.....	26
3.5.1 การเตรียมผงมันสำปะหลัง.....	26
3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น.....	26
3.5.3 การเตรียมอาหารหมัก.....	26
3.5.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล (Saccharification) จากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อรา <i>A. rouxii</i> TISTR 3182.....	27
3.5.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อย แป้งของเชื้อรา <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 โดยใช้เซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088.....	28
3.5.6 ศึกษาการผลิตเอทานอลในสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088.....	29
3.5.7 ศึกษาประสิทธิภาพเซลล์ตรึงรูปของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088 ด้วย กระบวนการหมักซ้ำ (Repeat batch process).....	29
3.5.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	29
3.5.9 ศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักเอทานอล.....	30
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	31
4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล (Saccharification) จากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อรา <i>A. rouxii</i> TISTR 3182.....	31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นของเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182...	31
4.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้น.....	34
4.1.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของค่าพีเอชเริ่มต้น.....	39
4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการ ย่อยแป้งของเชื้อรา <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 โดยใช้เซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088.....	45
4.2.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตของเซลล์ตรึงรูปของเชื้อ ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088 ในกระบวนการหมักเอทานอลจากมัน สำปะหลังที่ผ่านการย่อย.....	45
4.2.2 ผลการศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลเซียมอัลจิเนตของเซลล์ตรึงรูป <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088 ในกระบวนการหมักเอทานอลจากมัน สำปะหลังที่ผ่านการย่อย.....	50
4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพเซลล์ตรึงรูปของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักซ้ำ (Repeat batch process).....	55
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	61
เอกสารอ้างอิง.....	64
ภาคผนวก.....	76
ภาคผนวก ก.....	77
ภาคผนวก ข.....	79
ภาคผนวก ค.....	89
ประวัติผู้เขียน.....	121

สารบัญรูปร่าง

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) (ขั้นตอนที่ 1-2-3) และ กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) (ขั้นตอนที่ 1-(2+3)).....	5
2.2 แสดงลักษณะของหัวมันสำปะหลัง.....	8
2.3 การทำงานของเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนสับสเตรตเป็นผลิตภัณฑ์.....	10
2.4 กลไกการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....	10
2.5 กลไกการทำงานของเอนไซม์บีต้า-อะไมเลส.....	11
2.6 กลไกการทำงานของเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส.....	11
2.7 แสดงลักษณะ Sporangiospore ของ <i>Amylomyces rouxii</i>	14
2.8 แสดงวัฏจักรการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทานอลโดยเชื้อ <i>S. cerevisiae</i>	15
2.9 การกักเก็บเซลล์ภายในช่องของพอลิเมอร์ที่มีรูพรุนหรือเยื่อเมมเบรน.....	18
2.10 สมการการแลกเปลี่ยนไอออนในการเกิดเจล.....	19
4.1 กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในการย่อยมัน สำปะหลังที่มีความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกันในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน	32
4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีความ เข้มข้นสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกันของเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในสภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	33
4.3 กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในการย่อยมัน สำปะหลังที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบ ต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	36
4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีความ เข้มข้นเริ่มต้นที่แตกต่างกันด้วยเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในสภาวะเขย่าความเร็ว รอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	38
4.5 กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในการย่อยมัน สำปะหลังที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกันในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อ นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	41

สารบัญรูปร่างภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีค่าพีเอชที่แตกต่างกันด้วยเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	43
4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไปและปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยใช้ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจินเตที่แตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	49
4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไปและปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยใช้ขนาดเม็ดแคลเซียมอัลจินเตที่แตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088 ในสภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	54
4.9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังในสภาวะที่เหมาะสมและกระบวนการหมักซ้ำ (Repeat batch) ด้วยเซลล์ตรึงรูปที่ผ่านการหมักแล้ว (Reused immobilized cell).....	58
4.10 พื้นผิวเม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูป <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088.....	60
ข-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส.....	80
ข-2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส.....	83
ข-3 กราฟมาตรฐานแป้งมันสำปะหลัง.....	84
ข-4 กราฟสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่วัดด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	86
ข-5 กราฟสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโตสที่วัดด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	86
ข-6 กราฟมาตรฐานเอทานอลวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี.....	88

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของมันสำปะหลัง.....	9
2.2 จุลินทรีย์บางชนิดที่เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์อะไมเลส.....	12
4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกันของเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในสภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	33
4.2 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และปริมาณมันสำปะหลังที่เชื้อใช้ไปในกระบวนการหมักที่มีความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกันของเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก.....	34
4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่แตกต่างกันด้วยเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	37
4.4 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส และแป้งที่ใช้ไปในกระบวนการหมักที่มีความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นที่แตกต่างกันด้วยเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 เป็นระยะเวลา 3 วัน.....	39
4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีค่าพีเอชที่แตกต่างกันด้วยเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	43
4.6 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส และมันสำปะหลังที่ใช้ไปในกระบวนการหมักที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกันด้วยเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในวันที่ 4 ของกระบวนการหมัก.....	44
4.7 ค่าพีเอชระหว่างกระบวนการย่อยมันสำปะหลังด้วยเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน.....	45
4.8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอลและค่าพีเอชที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังโดยใช้ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจินเตที่แตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	48
4.9 ขนาดและลักษณะเม็ดแคลเซียมอัลจินเตที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088 ก่อนกระบวนการหมักและหลังกระบวนการหมักเอทานอล.....	50

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังโดยใช้ขนาดเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตที่แตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088 ในสภาวะเขย่า ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	53
4.11 ขนาดและลักษณะเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางแตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088 ก่อนกระบวนการหมักและหลังกระบวนการหมัก.....	55
4.12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังในสภาวะที่เหมาะสมและการหมักซ้ำ (Repeat batch) ด้วยเซลล์ตรึงรูปที่ผ่านการหมักแล้ว (Reused immobilized cell).....	58
4.13 ค่าจลนพลศาสตร์ที่ได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088.....	59
ค-1 กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในการย่อยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกัน ในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	89
ค-2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกันของเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	92
ค-3 กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในการย่อยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นแป้งเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	94
ค-4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่แตกต่างกันด้วยเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	97
ค-5 กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในการย่อยมันสำปะหลังที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกันในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	100
ค-6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีค่าพีเอชที่แตกต่างกันด้วยเชื้อ <i>A. rouxii</i> TISTR 3182 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	101

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ค-7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ใช้ไปในกระบวนการหมักมันสำปะหลังโดยใช้ความเข้มข้น แคลเซียมอัลจิเนตที่แตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088 ใน สภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น ระยะเวลา 5 วัน.....	103
ค-8 ปริมาณเอทานอล ที่ใช้ไปในกระบวนการหมักมันสำปะหลังโดยใช้ความเข้มข้น แคลเซียมอัลจิเนตที่แตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088 ใน สภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น ระยะเวลา 5 วัน.....	106
ค-9 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังโดยใช้ขนาดเม็ดแคลเซียม อัลจิเนตที่แตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088 ในสภาวะ เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	109
ค-10 เอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังโดยใช้ขนาดเม็ดแคลเซียม อัลจิเนตที่แตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5088 ในสภาวะ เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน.....	112
ค-11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไปกระบวนการหมักมันสำปะหลังในสภาวะที่เหมาะสมและ การหมักซ้ำ (Repeat batch) ด้วยเซลล์ตรึงรูปที่ผ่านการหมักแล้ว (Reused immobilized cell).....	115
ค-12 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังในสภาวะที่เหมาะสม และการหมักซ้ำ (Repeat batch) ด้วยเซลล์ตรึงรูปที่ผ่านการหมักแล้ว (Reused immobilized cell).....	118

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ตั้งแต่เริ่มมีการพัฒนาทางด้านอุตสาหกรรม และการเพิ่มขึ้นของประชากรในแต่ละพื้นที่ ส่งผลให้ความต้องการพลังงานเชื้อเพลิงจำพวกน้ำมันดิบมีแนวโน้มสูงขึ้น จากรายงานทางสถิติของบริษัท British Petroleum พบว่าความต้องการน้ำมันดิบในปี ค.ศ. 2015 เท่ากับ 4,341 ล้านตัน และเพิ่มขึ้นเท่ากับ 4,418 ล้านตันในปี ค.ศ. 2016 (BP Statistical Review of World Energy, 2017) พลังงานเชื้อเพลิงส่วนใหญ่ได้มาจากซากฟอสซิล ซึ่งมีอยู่อย่างจำกัด จึงทำให้ไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้พลังงานเชื้อเพลิงของประชากรโลก นอกจากนี้กระบวนการเผาไหม้พลังงานเชื้อเพลิงจากซากฟอสซิลยังก่อให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม เช่น การปลดปล่อยก๊าซที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก (Greenhouse effect) การก่อให้เกิดภาวะโลกร้อน (Perera, 2017; Baras *et al.*, 2002) จึงมีการพัฒนาแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ที่สามารถนำมาทดแทนพลังงานจากซากฟอสซิล โดยแหล่งพลังงานทดแทนต้องมีคุณสมบัติที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพ มีต้นทุนการผลิตต่ำ รวมทั้งเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Chum and Overend, 2001) มีการศึกษาหาแหล่งพลังงานทดแทนจำพวกพลังงานชีวภาพ (Biofuels) เช่น ไบโอดีเซล ไบโอดีเซล ไบโอดีแก๊ส เป็นต้น (Balat *et al.*, 2008) เนื่องจากพลังงานเหล่านี้จะสามารถช่วยลดการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ลดการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศ และสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ หลายประเทศจึงหันมาให้ความสนใจในการผลิตไบโอดีเซล เช่น ในปี ค.ศ. 2017 ประเทศสหรัฐอเมริกา มีปริมาณไบโอดีเซลที่ผลิตได้ภายในประเทศสูงถึง 15.25 ล้านแกลลอนต่อปี (Renewable Fuel Association (RFA), 2017)

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากการหมักด้วยจุลินทรีย์ได้รับความสนใจและมีการศึกษามาเป็นระยะเวลานาน เนื่องจากจุลินทรีย์จำพวกยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* สามารถใช้กลูโคสจากวัตถุดิบแล้วเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล ไบโอดีเซลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล แป้ง และลิกโนเซลลูโลส งานวิจัยไบโอดีเซลในปัจจุบันจะมุ่งเน้นการผลิตเอทานอลให้ได้ปริมาณสูงแต่มีต้นทุนการผลิตต่ำ จึงมีการศึกษาปัจจัยด้านวัตถุดิบและการพัฒนาทางเทคโนโลยีในหลายพื้นที่ทั้งทางยุโรป อเมริกา หรือทวีปเอเชีย มีการนำพืชเศรษฐกิจที่เหลือทิ้งมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมัก เช่น ข้าวโพด ฟางข้าว กากน้ำตาล หรือมันสำปะหลัง เป็นต้น มีการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากแป้งข้าวโพดโดยใช้เซลล์ตรึงของ *S. cerevisiae* พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Nikolic *et al.*, 2010) และการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากฟางข้าวโดยใช้เซลล์ตรึงของ *Candida shehatae* พบว่ามีปริมาณกลูโคสในฟางข้าวที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ (Yuvadetakun *et al.*, 2018) ในประเทศไทยมันสำปะหลังจัดว่าเป็นพืชหลักทาง

เศรษฐกิจ มีผลผลิตสูงถึง 31 ล้านตัน ในปี พ.ศ 2559 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2016) โดยมันสำปะหลังมีส่วนประกอบหลักเป็นแป้งสูงถึง 63 เปอร์เซ็นต์ (Ray *et al.*, 2004) มันสำปะหลังสด 1 ตัน สามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 180 ลิตร โดยปริมาณผลผลิตมันสำปะหลังส่วนเกินของตลาดมีมากกว่า 4 ล้านตันต่อปี ซึ่งมากเพียงพอที่จะนำมาผลิต เอทานอลได้ (สำนักงานพัฒนาพลังงาน, 2003) จึงได้รับความนิยมนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบจำพวกอ้อยหรือกากน้ำตาล สามารถนำมาหมักกับจุลินทรีย์ได้โดยตรง แต่ถ้าเป็นวัตถุดิบจำพวกแป้งต้องทำการการย่อย (Saccharification) เพื่อเปลี่ยนโมเลกุลของแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อน โดยขั้นตอนในการย่อยนิยมใช้เอนไซม์ทางการค้า เช่น เอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์กลูโคสอะไมเลส ซึ่งมีราคาสูง เพื่อเป็นการลดต้นทุนในเรื่องของการใช้เอนไซม์ทางการค้า จึงมีการศึกษาการนำเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส (Amylolytic mold) เพื่อย่อยโมเลกุลของแป้งให้กลายเป็นโมเลกุลของน้ำตาลแทนการใช้เอนไซม์ทางการค้า เช่น *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.* และ *Amylomyces sp.* เป็นต้น มีการศึกษาการใช้รา *Aspergillus awamori* และ *Rhizopus japonicus* ในการย่อยแป้งมันฝรั่งพบว่าเชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.8 มิลลิกรัมต่อนาที (Yu *et al.*, 2016) และเชื้อรา *Amylomyces rouxii* สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคสอะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยโมเลกุลแป้งได้ (Wang *et al.*, 1984) ดังนั้นกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากวัตถุดิบจำพวกแป้งจะต้องมีสภาวะการย่อยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา จึงนิยมใช้กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation : SHF) เนื่องจากเป็นกระบวนการที่สามารถทำการหมักในสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นตอนได้อย่างเต็มที่ ส่งผลให้ได้ผลผลิตสูง (Axelsson, 2011) มีการศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลโดยใช้กระบวนการย่อยแยกจากการหมักเปรียบเทียบกับกระบวนการย่อยพร้อมการหมัก ด้วยการใช้เอนไซม์กลูโคสอะไมเลสและเชื้อ *Zymomonas mobilis* ผลที่ได้พบว่ากระบวนการย่อยแยกจากการหมักให้ผลผลิตเอทานอลสูง (Chrisnasari *et al.*, 2013)

ในกระบวนการหมักเอทานอลมีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น ความเข้มข้นของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ ซึ่งถ้ามีความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม อาจส่งผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่นำมาผลิตเอทานอลได้ การตรึงเซลล์จึงเป็นอีกวิธีที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพให้เชื้อสามารถทนต่อสภาวะการยับยั้ง ทำให้เพิ่มอัตราการผลิตเอทานอล และเชื้อที่ถูกตรึงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ในกระบวนการหมักครั้งต่อไป มีการศึกษาการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสและซูโครสโดยใช้เซลล์ตรึงเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์อิสระของ *S. cerevisiae* พบว่าเซลล์ตรึงสามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่า และนำกลับมาใช้หมักซ้ำได้ 10 รอบของการหมัก (Duarte *et al.*, 2013) สารที่นิยมนำมาใช้ในการตรึงเซลล์คือแคลเซียมอัลจิเนต (Calcium alginate) เนื่องจากปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดสารพิษ มีขั้นตอนที่รวดเร็วมีค่าใช้จ่ายต่ำ และช่วยทำให้จุลินทรีย์มีความคงตัว (Sitton *et al.*, 1980) มีหลายงานวิจัยทำการศึกษการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าเชื้อที่ถูกตรึงรูปมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ (Nikolic *et al.*, 2010; Swain *et al.*, 2007)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถย่อยแป้งเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลได้สูง และยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลในการผลิตเอทานอลได้สูง โดยใช้กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการย่อยแป้งด้วยเชื้อราให้กลายเป็นน้ำตาล และสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอลด้วยเซลล์ตรึงรูปของยีสต์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลให้สูงขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการย่อยเพื่อเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาลของเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 ในการผลิตน้ำตาลจากมันสำปะหลัง ได้แก่ ปริมาณสปอร์ราเริ่มต้น ความเข้มข้น มันสำปะหลังเริ่มต้น และพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมัก

1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ได้แก่ ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนต และขนาดเม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูป

1.2.3 ศึกษาประสิทธิภาพในกระบวนการหมักแบบหมักซ้ำ (Repeated batch) ของเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการย่อยมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลของเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 ได้แก่ ปริมาณสปอร์ราเริ่มต้น ความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้น และพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมัก จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ได้แก่ ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนต และขนาดเม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูป รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพในกระบวนการหมักซ้ำของเซลล์ตรึง โดยวิเคราะห์อัตราการผลิตเอทานอลในแต่ละรอบของกระบวนการหมัก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

พัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ลดต้นทุนในเรื่องของการใช้เอนไซม์ทางการค้า ซึ่งมีราคาแพง เปลี่ยนมาใช้เชื้อราในการผลิตเอนไซม์มาย่อยแป้ง นอกจากนี้ยังช่วยลดความยุ่งยากและระยะเวลาในการเตรียมหัวเชื้อในการหมักเอทานอล เนื่องจากเซลล์ตรึงรูปสามารถนำกลับมาใช้หมักใหม่ได้ และการเพิ่มมูลค่าให้แก่มันสำปะหลัง ซึ่งเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกเป็นจำนวนมากในประเทศไทย โดยนำมาผลิตเป็นพลังงานที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล (Ethanol) (คณะกรรมการการพลังงาน, 2545)

เอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจำพวกแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง เอทานอลเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน มีสูตรโมเลกุล C_2H_5OH สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและสารละลายอินทรีย์อื่นๆ เป็นแอลกอฮอล์ที่สามารถนำมาบริโภค และนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในรูปของเอทานอลไร้น้ำ (Anhydrous ethanol) ที่มีความบริสุทธิ์สูง (ความเข้มข้นร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร) หรืออาจใช้เป็นเอทานอลที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ (Hydrous ethanol)

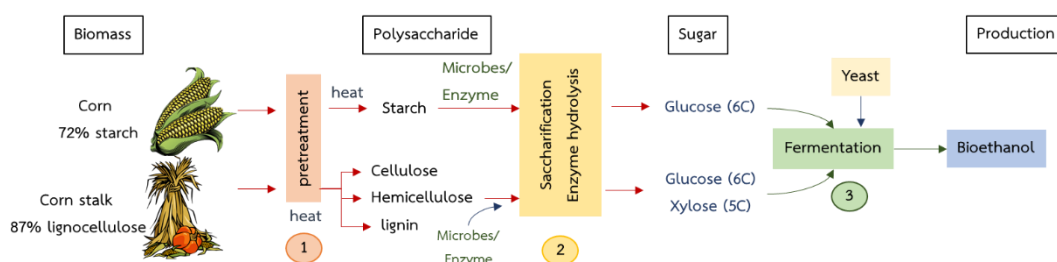
กระบวนการผลิตเอทานอลทำได้หลายวิธีได้แก่ วิธีการทางเคมีโดยอาศัยปฏิกิริยาไฮเดรชัน (Hydration) ซึ่งเป็นการเติมน้ำให้กับเอทิลีน (Ethylene) ที่ได้มาจากปิโตรเลียม และวิธีการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ หรือที่เรียกว่าไบโอเอทานอล ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบแล้วพบว่าวิธีการหมักจะมีข้อดีมากกว่า เช่น การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นวัตถุดิบทดแทน เป็นการลดต้นทุนในการผลิตเอทานอล และยังสามารถลดมลพิษที่เกิดจากการสะสมหรือกำจัดวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านั้น (สาวิตรี, 2549)

การหมักแอลกอฮอล์สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ กระบวนการหมักแบบครั้งคราว (Batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์โดยอาศัยการเติมวัตถุดิบ สารอาหาร และหัวเชื้อลงไปในถังหมักเพียงครั้งเดียวตลอดกระบวนการหมัก ส่วนกระบวนการหมักแบบเฟดแบทช์ (Fed-batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารลงไปในถังหมักมากกว่า 1 ครั้งขึ้นไป เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้วัตถุดิบและสารอาหารได้ในปริมาณที่สูงขึ้น และกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารเข้าไปในถังหมักพร้อมทั้งแยกผลิตภัณฑ์ออกมาตลอดเวลา ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สูงสุดในระยะเวลาเท่ากันเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการหมักวิธีอื่น

2.1.1 กระบวนการผลิตไบโอเอทานอล (Choudhary *et al.*, 2016)

2.1.1.1 กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation : SHF) เป็นกระบวนการที่ต้องนำวัตถุดิบจำพวกแป้งหรือลิกโนเซลลูโลสไปผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ กรด-ต่าง หรือเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อย่อยวัตถุดิบให้กลายเป็นน้ำตาลก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก แสดงดังรูปที่ 2.1 ซึ่งกระบวนการนี้จะทำให้ทั้งกระบวนการย่อยและกระบวนการหมักมีประสิทธิภาพ เนื่องมาจากการใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละกระบวนการต่างกัน แต่มีข้อเสียในเรื่องของการใช้ระยะเวลาในการหมักนาน เสียค่าใช้จ่ายสูงและอาจเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูงต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก

2.1.1.2 กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation : SSF) เป็นกระบวนการที่ทำการย่อยขั้นตอนที่สองพร้อมกับกระบวนการหมัก แสดงดังรูปที่ 2.1 ซึ่งกระบวนการนี้จะช่วยลดระยะเวลาในการหมักพร้อมทั้งประหยัดพลังงานและค่าใช้จ่ายของกระบวนการผลิต นอกจากนี้ยังลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนและลดสถานะการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากความเข้มข้นของสารตั้งต้น แต่กระบวนการนี้จะลดประสิทธิภาพในกระบวนการย่อยเนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยไม่เหมาะสม



รูปที่ 2.1 แสดงกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) (ขั้นตอนที่ 1-2-3) และ กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) (ขั้นตอนที่ 1-(2+3))

ที่มา : Yuan Wang, (2015)

2.1.2 ขั้นตอนการผลิตไบโอเอทานอล

2.1.2.1 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ

การเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมักจะขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ ถ้าเป็นวัตถุดิบที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้ได้ง่าย เช่น กากน้ำตาล สามารถนำกากน้ำตาลมาเจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในระดับที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ จะสามารถนำมาหมักได้ทันที แต่ในทางกลับกันถ้าเป็นวัตถุดิบที่เชื้อจุลินทรีย์ใช้ได้ยาก เช่น หัวมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวัตถุดิบประเภทแป้ง หรือชานอ้อย ซึ่งเป็นวัตถุดิบประเภทเส้นใยเซลลูโลส จะต้องนำวัตถุดิบไปผ่านกระบวนการลดขนาดเชิงกลด้วยการหั่นหรือบด และใช้ความร้อนร่วมด้วยเพื่อเปลี่ยนสภาพวัตถุดิบให้เหมาะสมต่อการนำไปย่อยให้เป็นน้ำตาลด้วยการใช้กรด-ด่างหรือเอนไซม์ทางการค้า หรือเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์

2.1.2.2 การเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum)

ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีความแข็งแรงและมีปริมาณมากเพียงพอสำหรับการหมัก รวมทั้งต้องปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ เมื่อเตรียมหัวเชื้อเรียบร้อยแล้วจึงถ่ายลงถึงหมักผสมกับวัตถุดิบ อย่างไรก็ตามหากนำยีสต์แห้ง (Dried yeast หรือ Powder yeast) มาใช้ในการหมัก ก็ไม่จำเป็นต้องเตรียมหัวเชื้อเพราะยีสต์แห้งสามารถนำมาหมักผสมกับวัตถุดิบได้ทันที

2.1.2.3 กระบวนการหมัก (Fermentation)

กระบวนการหมักเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ซึ่งตามทฤษฎีเชื้อยีสต์จะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทานอลได้ร้อยละ 51.1 (โดยน้ำหนัก) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 48.9 (โดยน้ำหนัก) แต่ในทางปฏิบัตินอกจากจะได้เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์แล้วยังได้ผลพลอยได้อื่นอีก เช่น อะซิทัลดีไฮด์ร้อยละ 0-0.03 (โดยน้ำหนัก) กรดน้ำส้มร้อยละ 0.05-0.25 (โดยน้ำหนัก) เป็นต้น

2.1.2.4 การแยกผลิตภัณฑ์และการทำให้บริสุทธิ์

กระบวนการแยกเอทานอลออกจากน้ำหมักมีหลายกระบวนการ เช่น กระบวนการกลั่นลำดับส่วน แต่กระบวนการนี้สามารถแยกเอทานอลได้ความบริสุทธิ์สูงสุดเพียงร้อยละ 95.6 (โดยปริมาตร) ถ้าต้องการให้เอทานอลมีความเข้มข้นสูงขึ้นในระดับที่ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 99.5 (โดยปริมาตร) หรือที่เรียกว่า เอทานอลไร้น้ำ (Absolute ethanol) มีหลากหลายวิธี เช่น การแยกด้วยวิธีเมมเบรน การแยกด้วยวิธีโมเลกุลซีฟ เป็นต้น

2.1.3 ประโยชน์ของไบโอเอทานอล

- 1) สามารถผลิตได้จากพืชที่หลากหลายชนิด เช่น อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวโพด เป็นต้น
- 2) คาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากไบโอเอทานอลเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ชนิดเดียวกับที่พืชสามารถดูดซับไปเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสง
- 3) ลดการผลิตก๊าซที่ทำลายชั้นโอโซนหรือก๊าซที่ก่อให้เกิดสภาวะเรือนกระจก
- 4) ได้มาจากแหล่งพลังงานหมุนเวียนจึงลดการใช้พลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัด เช่น เชื้อเพลิงจากซากฟอสซิล
- 5) เป็นเชื้อเพลิงที่สามารถย่อยสลายได้และก่อให้เกิดสารพิษน้อยเมื่อเทียบกับเชื้อเพลิงที่ได้มาจากซากฟอสซิล

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

2.2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งตามพืชผลทางการเกษตรออกเป็น 3 ประเภท (คณะกรรมการการพลังงาน, 2545) ดังนี้

2.2.1.1 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น กากน้ำตาล อ้อย เชื้อจุลินทรีย์จำพวกยีสต์สามารถนำสารตั้งต้นเหล่านี้ไปใช้ในกระบวนการหมักได้เลย เพราะโครงสร้างภายในของวัตถุดิบเหล่านี้มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบ

2.2.1.2 วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด ชานอ้อย เป็นต้น วัตถุดิบประเภทนี้จะประกอบด้วยส่วนประกอบสำคัญ 3 ส่วนคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาว ส่วนเฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตสหลายชนิด และลิกนินเป็นพอลิเมอร์ของฟีนอลโพรเพน ซึ่งทนต่อการย่อยสลายอย่าง

มาก กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทนี้จึงประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ ขั้นตอนการปรับสภาพ ขั้นตอนการย่อย และขั้นตอนการหมัก

2.2.1.3 วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ธัญพืช และมันฝรั่ง เป็นต้น โดยแป้งจะเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาว เมื่อนำมาผ่านการย่อยจะได้น้ำตาลกลูโคสที่สามารถเข้าสู่กระบวนการหมัก โดยในกระบวนการย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสจะประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนการทำให้แป้งเหลวขึ้น (Liquefaction) โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 100-105 องศาเซลเซียส ซึ่งความร้อนจะทำให้เม็ดแป้งแตกตัวกลายเป็นเจลาตินแล้วนำเอนไซม์ในกลุ่มแอลฟา อะไมเลส (Alpha-amylase) เข้ามาย่อย ได้เป็นโมเลกุลของมอลโตเด็กซ์ทริน (Maltodextrin) และขั้นตอนการย่อยครั้งสุดท้าย (Saccharification) จะใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ได้มาจากราเป็นส่วนใหญ่ เช่น *Aspergillus niger*, *Amylomyces rouxii* เข้าไปย่อยให้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเอาไปใช้ในกระบวนการหมัก

2.3 มันสำปะหลัง (Cassava) (กรมวิชาการเกษตร, 2537)

มันสำปะหลังเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนของทวีปอเมริกา โดยเฉพาะอเมริกาใต้แถบประเทศเปรู เม็กซิโก กัวเตมาลา เป็นต้น และเข้าสู่ประเทศไทยเมื่อราวปีพุทธศักราช 2329 เป็นพืชที่จัดว่าเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญที่สุด มันสำปะหลังเป็นพืชอาหารที่สำคัญเป็นอันดับ 5 ของโลกรองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว มันฝรั่ง ผลผลิตมันสำปะหลังที่ได้ในแต่ละปี จะนำไปใช้ในการบริโภคของมนุษย์ร้อยละ 60 ใช้ทำเป็นอาหารสัตว์ร้อยละ 25.6 และที่เหลือนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่น (Bottema *et al.*, 1990) และมันสำปะหลังที่ปลูกกันเป็นการค้าในปัจจุบัน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta* Crantz. ชื่อสามัญมีหลายชื่อเรียกกันตามภาษาต่างๆ เช่น Cassava, Yuca, Mandioca และ Tapioca เป็นต้น

2.3.1 การจัดลำดับอนุกรมวิธาน

Kingdom	:	Plantae
Class	:	Dicotyledoneae
Order	:	Malpighiales
Family	:	Euphorbiaceae
Genus	:	<i>Manihot</i>
Species	:	<i>M. esculenta</i>

2.3.2 พฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังในแต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่แตกต่างกันออกไป ทำให้สามารถจำแนกพันธุ์มันสำปะหลังออกเป็นพันธุ์ต่างๆได้ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ได้แก่ ลำต้น การ

แตกกิ่งของใบ ดอก ผลกับเมล็ด และส่วนของรากกับหัว เป็นต้น โดยส่วนที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ประโยชน์คือ ส่วนหัว เนื่องจากเป็นส่วนที่มีการสะสมแป้ง เกิดมาจากส่วนรากที่มีการสะสมแป้งไว้ใน Parenchyma cell รากสะสมแป้งนี้จะเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้นตามอายุ โดยทั่วไปในต้นมันสำปะหลังต้นหนึ่ง จะมีรากสะสมอยู่ประมาณ 5-20 หัวต่อต้น และจำนวนจะคงที่ไม่เพิ่มขึ้นอีกตลอดชั่วอายุการเก็บเกี่ยว ดังแสดงในรูปที่ 2.2 บริเวณหัวมันสำปะหลังเป็นเพียงที่สะสมแป้งเท่านั้น ไม่มีตาและไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ หัวจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-15 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับอายุและสภาพแวดล้อม สีเปลือกของหัวมีตั้งแต่สีขาว น้ำตาล และน้ำตาลอ่อน เช่น พันธุ์พื้นเมืองระยอง 1 จะมีเปลือกสีขาว ส่วนพันธุ์ระยอง 90 จะมีเปลือกสีน้ำตาล โดยหัวมันสำปะหลังจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนของเปลือกชั้นนอก (Periderm) เป็นเนื้อเยื่อบางที่มีทั้งลักษณะเรียบและขรุขระ ต่อมาเป็นส่วนของเปลือกชั้นใน (Cortical region) อยู่ถัดเข้ามาจะมีความหนาประมาณ 1-3 มิลลิเมตร ประกอบด้วยชั้นของเซลล์ชนิดต่างๆ และส่วนของเนื้อหัว (Starchy flesh) เป็นส่วนที่มีการสะสมแป้งและประกอบด้วยเซลล์ชนิดต่างๆ เช่น Cambium Xylem Vessel เป็นต้น มีแป้งสะสมประมาณร้อยละ 20-40 ที่เหลือจะเป็นน้ำร้อยละ 60-80



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะของหัวมันสำปะหลัง

ที่มา : Kenneth (2011); <https://www.gardeningknowhow.com> (สืบค้นวันที่ 1 มิถุนายน 2563)

2.3.3 องค์ประกอบและคุณค่าทางโภชนาการของมันสำปะหลัง

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของมันสำปะหลัง (Ray, 2004) พบว่ามีองค์ประกอบดังนี้ ความชื้น 11.2 กรัม แป้ง 63.0 กรัม ไฟเบอร์ 10.8 กรัม โปรตีน 0.88 กรัม น้ำตาลรีดิซ 1.45 กรัม กรดไฮโดรไซยานิก 0.008 กรัม และเถ้า 1.2 กรัม (กรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักแห้งมันสำปะหลัง) โดยองค์ประกอบจำพวกแป้งและกรดไฮโดรไซยานิกจะแตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์ เช่น พันธุ์ระยอง 1 มีปริมาณแป้งเท่ากับร้อยละ 18.3 แต่ในพันธุ์ระยอง 3 มีปริมาณแป้งอยู่ร้อยละ 23 - 28 เป็นต้น นอกจากนี้บางสายพันธุ์ยังมีคุณค่าทางโภชนาการและส่วนประกอบอื่นๆ เช่น วิตามินเอ แคลเซียม และพวกแคโรทีนอีกด้วย ดังตารางที่ 2.1

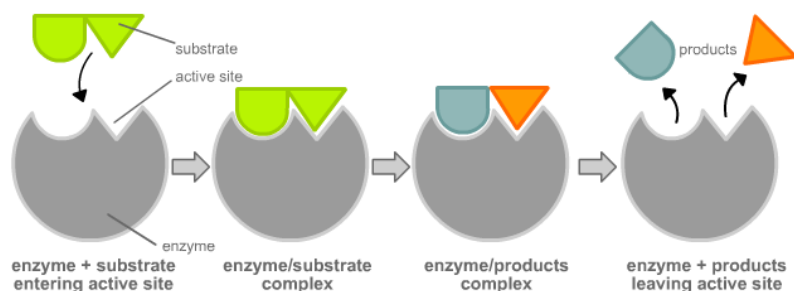
ตารางที่ 2.1 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของน้ำมันรำปะหลัง

คุณค่าทาง โภชนาการ	ปริมาณ (ต่อ100กรัมของน้ำมันรำปะหลัง)	คุณค่าทาง โภชนาการ	ปริมาณ (ต่อ100กรัมของน้ำมันรำปะหลัง)
พลังงาน	160 กิโลแคลอรี	วิตามินบี9	27 ไมโครกรัม
คาร์โบไฮเดรต	38.06 กรัม	วิตามินซี	20.6 มิลลิกรัม
น้ำตาล	1.7 กรัม	วิตามินอี	0.19 มิลลิกรัม
ใยอาหาร	1.8 กรัม	วิตามินเค	1.9 ไมโครกรัม
ไขมัน	0.28 กรัม	แคลเซียม	16 มิลลิกรัม
โปรตีน	1.36 กรัม	ธาตุเหล็ก	0.27 มิลลิกรัม
น้ำ	59.68 กรัม	แมกนีเซียม	21 มิลลิกรัม
วิตามินเอ	13 หน่วยสากล	ฟอสฟอรัส	27 มิลลิกรัม
วิตามินบี1	0.087 มิลลิกรัม	โพแทสเซียม	271 มิลลิกรัม
วิตามินบี2	0.048 มิลลิกรัม	โซเดียม	14 มิลลิกรัม
วิตามินบี3	0.854 มิลลิกรัม	สังกะสี	0.34 มิลลิกรัม
วิตามินบี6	0.088 มิลลิกรัม		

ที่มา : USDA Nutrient database (2019)

2.4 เอนไซม์ (Enzyme)

เอนไซม์ เป็นกลุ่มของโปรตีนที่ผลิตขึ้นจากเชื้อจุลินทรีย์ เซลล์พืช และเซลล์สัตว์ เอนไซม์มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาชีวเคมีต่างๆ หรือกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ เช่น กระบวนการย่อยสลาย (Catabolism) เป็นการย่อยโมเลกุลขนาดใหญ่ให้มีโมเลกุลเล็กลงเพื่อให้ได้พลังงาน เป็นต้น (Bedford and Partridge, 2010) โดยเอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับสับสเตรตที่จำเพาะเจาะจงแล้วเกิดเป็นสารเชิงซ้อนซึ่งจับกันด้วยพันธะไอออนิก พันธะไฮโดรเจน หรือพันธะโควาเลนต์ ที่เรียกว่า เอนไซม์ซับสเตรตเชิงซ้อน (Enzyme substrate complex) ซึ่งจะทำการปฏิกิริยากับสับสเตรตเฉพาะในตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจง ซึ่งเรียกว่าบริเวณเร่ง (Active site) แต่ถ้าตำแหน่งบริเวณเร่งเปลี่ยนไปจะส่งผลให้ไม่เกิดการแยกกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรต จะทำให้เกิดผลของปฏิกิริยา (Product) และเอนไซม์อิสระ เปรียบเหมือนทฤษฎีแม่กุญแจกับลูกกุญแจ (Lock and key model) (Robinson, 2015) แสดงดังรูปที่ 2.3



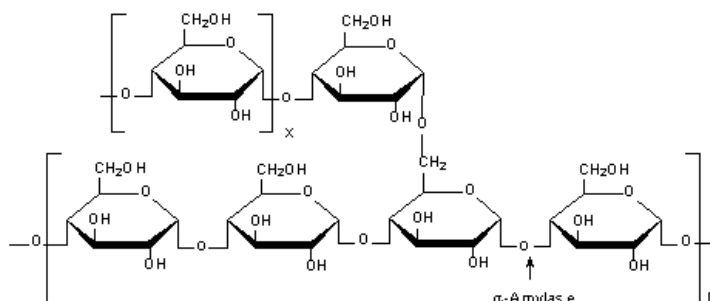
รูปที่ 2.3 การทำงานของเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนสับสเตรตเป็นผลิตภัณฑ์

ที่มา : <https://th.wikipedia.org/wiki/เอนไซม์> (สืบค้นวันที่ 31 พฤษภาคม 2563)

2.4.1 เอนไซม์อะไมเลส (Amylase)

เป็นเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำตาลโดยการย่อยหรือไฮโดรไลซ์พันธะ 1,4-ไกลโคซิดิกในโมเลกุลของแป้งหรือไกลโคเจนให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง ทำให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide) เช่น น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharide) เช่น น้ำตาลมอลโทส เอนไซม์อะไมเลสสามารถพบได้หลายที่ทั้งในน้ำลาย ตับอ่อน และเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด สามารถผลิตได้ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ เป็นต้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่

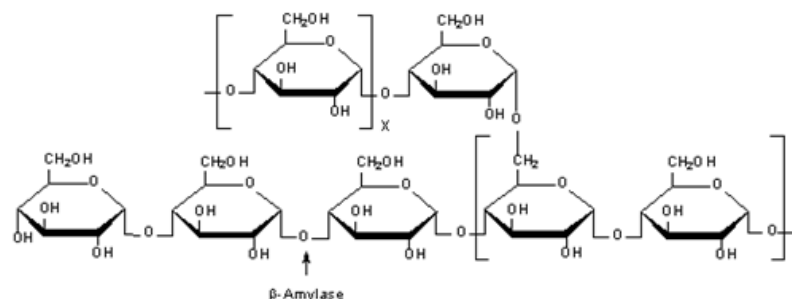
1) เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (Alpha - amylase) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกของแป้งที่มีกลูโคสที่เชื่อมต่อกันแบบ alpha-1,4 glycosidic แบบสุ่มเพียงอย่างเดียว ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสอย่างรวดเร็ว (Norman, 1979) แสดงดังรูปที่ 2.4 โดยในอุตสาหกรรมจะนิยมใช้เอนไซม์ชนิดนี้ในการย่อยแป้งในขั้นตอนของ Liquefaction (การย่อยขั้นแรก) เพื่อลดความหนืดข้นของสารละลายแป้งภายหลังการเจลาติไนซ์ (Gelatinization) แป้ง เพื่อให้ได้เป็นน้ำแป้งเหลวหรือน้ำเชื่อมกลูโคส (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2546) สามารถผลิตได้จากน้ำย่อยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จากเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Bacillus subtilis* หรือ *Bacillus licheniformis* และยังสามารถผลิตได้จากเชื้อรา เช่น *Aspergillus niger* และ *Aspergillus oryzae* เป็นต้น



รูปที่ 2.4 กลไกการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ที่มา : <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis.html> (สืบค้นวันที่ 31 พฤษภาคม 2563)

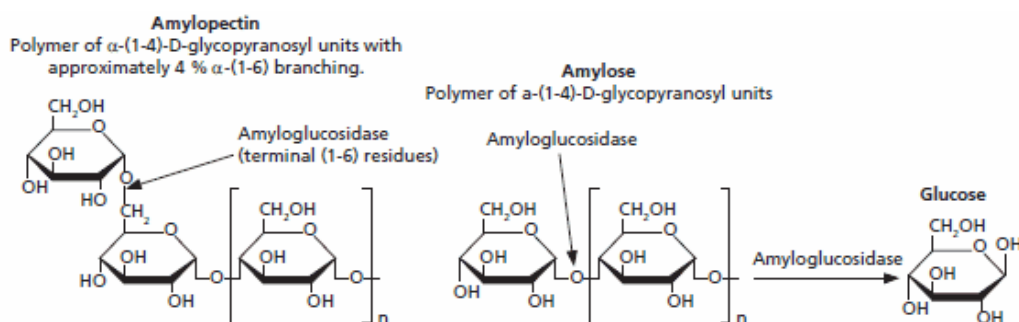
2) เอนไซม์บีต้า - อะไมเลส (Beta - amylase) เอนไซม์ชนิดนี้จะมีสามารถย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกของแป้งที่มีกลูโคสที่เชื่อมต่อกันแบบ alpha-1,4 glycosidic เฉพาะที่บริเวณปลายสายด้าน Non-reducing end เข้ามาทีละ 2 หน่วย ทำให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลมอลโตสเป็นส่วนใหญ่ เอนไซม์ชนิดนี้ไม่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่จะพบมากในแบคทีเรียและเชื้อรา แสดงดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 กลไกการทำงานของเอนไซม์บีต้า-อะไมเลส

ที่มา : <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis.html> (สืบค้นวันที่ 31 พฤษภาคม 2563)

3) เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) เรียกได้อีกชื่อว่า เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase) เอนไซม์ชนิดนี้จะสามารถย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกของแป้งที่มีกลูโคสเชื่อมต่อกันแบบ alpha-1,4 glycosidic และ alpha-1,6 glycosidic โดยจะทำการไฮโดรไลซ์จากส่วนปลายสาย Non-reducing end เข้ามาทีละ 1 หน่วย ผลผลิตที่ได้ส่วนมากเป็นน้ำตาลกลูโคส นอกจากนี้ยังได้กลูแคนและลิมิตเด็คซ์ทรินบางส่วน เอนไซม์ชนิดนี้ผลิตได้จากเชื้อราและแบคทีเรีย เช่น *Rhizopus oryzae* *Aspergillus niger* และ *Aspergillus awamori* (พิกามาต, 2552) แสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 กลไกการทำงานของเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส

ที่มา : <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis.html> (สืบค้นวันที่ 31 พฤษภาคม 2563)

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์บางชนิดที่เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์อะไมเลส (Tomasik and Horton, 2012)

เชื้อจุลินทรีย์	มวลโมเลกุล (Da)	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	pH
Alpha-amylase			
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	49-52,000	70	6.00
<i>B. subtilis</i>	48-57,000	50-80	5.40
<i>B. licheniformis</i>	62-65,000	70-90	7.90
Beta-amylase			
<i>B. circulans</i>	53-64,000	50-60	7.00
<i>Aspergillus carbonarius</i>	32,000	40	6.0-7.0
<i>B. cereus var. mycoids</i>	35,000	50	
Glucosylase			
<i>Amylomyces rouxii</i>	55,600	60	4.50
<i>Aspergillus awamori</i>	83.7-110,000	60	4.50
<i>A. oryzae</i>	38-76,000	50-65	4.50

2.4.2 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ในทางอุตสาหกรรม

เอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลสจะมีบทบาทสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมอาหารเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมประเภทที่มีการใช้แป้งเป็นวัตถุดิบหลัก เอนไซม์ชนิดนี้จะถูกใช้เพื่อเปลี่ยนแปลงให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส สำหรับโรงงานอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยที่มีการนำเอนไซม์ชนิดนี้มาใช้ ได้แก่ อุตสาหกรรมเบเกอรี่ อุตสาหกรรมขนมปังกรอบ อุตสาหกรรมแปรรูปแป้ง อุตสาหกรรมผลิตไซรัป อุตสาหกรรมสารปรุงแต่งรสชาติอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มต่างๆ นม และอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ เป็นต้น (Afroz *et al.*, 2015)

2.5 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลจากมันสำปะหลัง

2.5.1 คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (Kosaric *et al.*, 1983; Stewart, 1987; Panchal and Tavares, 1990; Walker, 1998) ได้แก่

1. ให้ผลผลิตเอทานอลสูง (Ethanol yield)
2. มีอัตราการหมักเอทานอลสูง (Rate of ethanol fermentation)
3. สามารถทนต่อเอทานอล (Ethanol tolerance)
4. สามารถทนต่ออุณหภูมิสูง (Thermotolerance)
5. สามารถทนต่อแรงดันออสโมซิส (Osmotolerance)
6. สามารถตกตะกอน (Flocculation)
7. ทนต่อสภาวะกรดหรือพีเอชต่ำ (Acid tolerance)

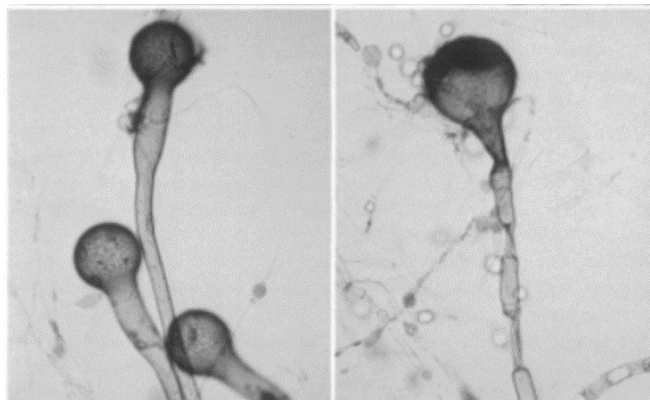
8. มีความคงตัวทางพันธุกรรม ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายเมื่อเจอสภาวะของการหมักต่างๆ
9. ใช้สารตั้งต้นได้หลากหลาย
10. สร้างสารเมแทบอไลต์ (Metabolite) ในระดับต่ำ เช่น กรดอินทรีย์ กลิเซอรอล
11. มีอัตราการเจริญเติบโตสูงแต่ให้ผลผลิตมวลเซลล์ต่ำ เพื่อให้มีการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้ออย่างรวดเร็วสำหรับการผลิตเอทานอล
12. ทนต่อสารพิษและสารยับยั้งการเจริญ

2.5.2 เชื้อรา *Amylomyces rouxii*

เชื้อรา *Amylomyces rouxii* หรือเรียกว่า *Mucor rouxii* จัดเป็นเชื้อราที่อยู่ในจันส *Amylomyces* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับราในจันส *Rhizopus* (Ellis et al., 1974) เป็นเชื้อราที่พบเป็นส่วนมากในลูกแป้งข้าวหมาก อยู่ในกลุ่ม Mucorales โดยเส้นใยจะมีสีขาวจนถึงสีเทา สามารถสร้าง Sporangium ที่มีและไม่มี Sporangiospore ได้ แต่อยู่ในสภาพที่เป็นหมัน ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นเส้นใยเหมือนจันส *Rhizopus* แต่มีลักษณะที่สำคัญคือทุกสายพันธุ์สามารถสร้าง Chlamydospore เป็นจำนวนมาก โดยจะมีรูปร่างหลายแบบตั้งแต่รูปทรงกระบอกสั้น รูปไข่ จนกระทั่งรูปร่างกลม มีขนาดตั้งแต่ 127×60 ไมโครเมตร เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (วิลาวัณย์, 2539) ดังรูปที่ 2.7 นอกจากนี้เชื้อ *A. rouxii* มีคุณสมบัติที่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างในระหว่างการเจริญเติบโตได้ทั้งแบบเส้นใย (Mycelium) และแบบเซลล์ยีสต์ (Yeast-like) ตามสภาพแวดล้อมของการเจริญ จึงเป็นข้อได้เปรียบอย่างมากในการเพาะเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้ในถังหมัก เพราะสามารถช่วยลดปัญหาเรื่องการถ่ายผ่านสารอาหาร การถ่ายเทออกซิเจน และลดการถูกทำลายของเซลล์เนื่องมาจากแรงเฉือน (Orlowski and Sypherd, 1978) นอกจากนี้เชื้อ *A. rouxii* ยังนิยมนำมาใช้ในการย่อยโมเลกุลของแป้งให้กลายเป็นน้ำตาล (Tomasik and Horton, 2012) เช่นเดียวกับเชื้อราจำพวก *Aspergillus niger* *Aspergillus oryzae* *Rhizopus oryzae* เนื่องจากเป็นเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ (Wang et al., 1984) และยังสามารถผลิตเอทานอลได้อีกด้วย (Saito et al., 2004)

2.5.2.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom	:	Fungi
Division	:	Zygomycota
Class	:	Mucormycotina
Order	:	Mucorales
Family	:	Mucoraceae
Genus	:	<i>Amylomyces</i>
Species	:	<i>Amylomyces rouxii</i>



รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะ Sporangiospore ของ *Amylomyces rouxii*

ที่มา : Ellis *et al.*, (1974)

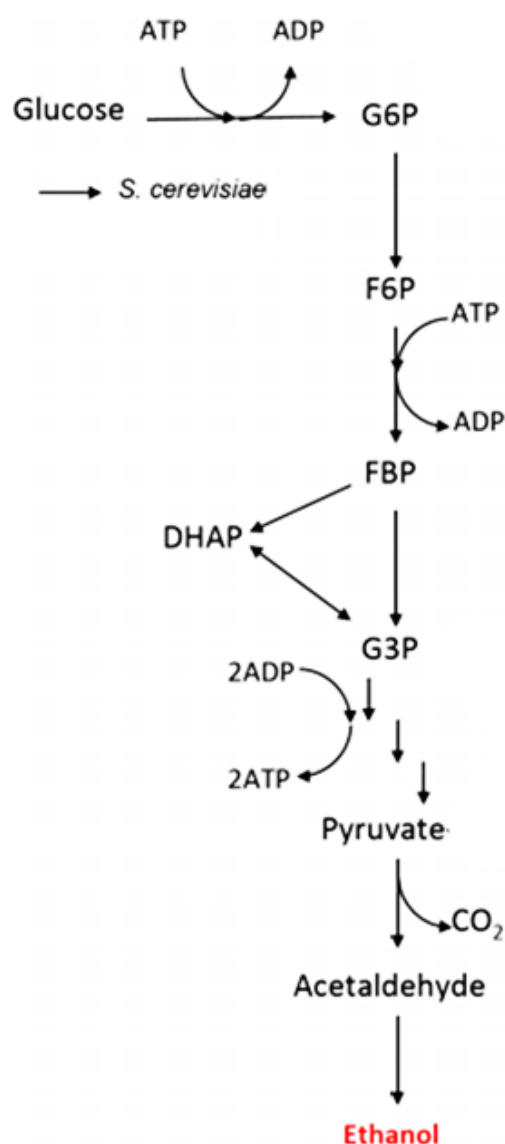
2.5.3 เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อที่มีรูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยว (Unicellular) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 ไมครอน เจริญได้ดีทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน มีทั้งการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ ยีสต์ชนิดนี้มี Generation time ที่ค่อนข้างสั้น เจริญเติบโตง่ายและรวดเร็ว แอสโคสปอร์มีรูปทรงกลมหรือไข่ โดยภายใน 1 แอสค์ส จะมีแอสโคสปอร์ 1-4 แอสโคสปอร์ (สาวิตรี, 2549) เป็นยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล และยังสามารถใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆได้อีกด้วย เช่น การผลิตขนมปัง การผลิตเบียร์ เป็นต้น นอกจากนี้ Lin and Tanaka (2006) ได้รวบรวมรายชื่อเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในหมักเอทานอลได้ พบว่านอกจากยีสต์ยังมีทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการสะสมเอทานอลไว้ภายในเซลล์ได้มากน้อยต่างกัน แต่ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae*

2.5.3.1 อนุกรมวิธาน (ธีระพงษ์ และคณะ, 2549)

Kingdom	:	Fungi
Phylum	:	Ascomycota
Subphylum	:	Saccharomycotina
Class	:	Ascomycetes
Order	:	Saccharomycetales
Family	:	<i>Saccharomycetaceae</i>
Genus	:	<i>Saccharomyces</i>

การหมักเอทานอลของยีสต์เกิดโดยการที่น้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนไปตามวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway จนได้ผลผลิตออกมาเป็นไพรูเวท โดยถ้าเริ่มต้นจากน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล จะให้ไพรูเวท 2 โมเลกุล จากนั้นไพรูเวทจะถูกแยกเอาคาร์บอนไดออกไซด์ออกกลายเป็นแอซีทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) แล้วจากนั้นเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจะรีดิวซ์แอซีทัลดีไฮด์ให้กลายเป็นเอทานอล ดังรูปที่ 2.8 และสมการการคำนวณของ Gay-Lussac สรุปได้ว่าในกระบวนการหมักเอทานอลจากกลูโคสด้วยยีสต์ โดยกลูโคส 1 กรัม จะให้เอทานอล 0.511 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.489 กรัม เทียบเป็นค่าผลผลิตทางทฤษฎีสำหรับการผลิตเอทานอลเท่ากับ 51.1 เปอร์เซ็นต์ (Kosaric *et al.*, 1983)



รูปที่ 2.8 แสดงวัฏจักรการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทานอลโดยเชื้อ *S. cerevisiae* ที่มา : Kang and Soon (2015)

2.6 กระบวนการตรึงหรืออิมโมบิไลเซชัน (Immobilization) (ปราณี, 2560)

การตรึงหรืออิมโมบิไลเซชัน หมายถึงการยึดติดหรือการห่อหุ้มให้คงอยู่ หรือไม่สามารแยกออกได้โดยง่าย การตรึงเซลล์ (Immobilized cell) หมายถึงการนำเซลล์มายึดติดไว้กับวัสดุสารพุงใดๆ (Supporter material) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการมีชีวิตของเซลล์ จำเป็นที่จะต้องอาศัยกระบวนการเมแทบอลิซึมและเซลล์ตรึงรูปจะต้องมีเมแทบอลิซึมเหมือนกับเซลล์อิสระ โดยที่สารตั้งต้นสามารถผ่านเข้าออกแล้วถูกเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ได้

การนำเซลล์จุลินทรีย์มาตรึงรูปจะต้องคำนึงถึงข้อจำกัดต่างๆ ดังนี้

- 1) เซลล์มีความต้องการสารอาหารและแหล่งพลังงาน ซึ่งอาจมีผลทำให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ลดลง อันเนื่องมาจากการนำสารตั้งต้นไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตและสร้างพลังงาน
- 2) เซลล์อาจมีการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นหรือผลพลอยได้อื่นๆที่ไม่ต้องการ
- 3) ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์อาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการผ่านเข้าออกของสารตั้งต้น ผลิตภัณฑ์ และสารอื่นๆที่จำเป็นต่อการเกิดปฏิกิริยา

2.6.1 สารพุงที่ใช้ในกระบวนการตรึง (Supports used for immobilization)

สารพอลิเมอร์ธรรมชาติพวกเซลลูโลส อะกาโรส อัลจิเนต คาร์ราจีแนน และพวกไคโตซาน นิยมนำมาใช้ในการตรึงเซลล์โดยวิธีการดูดซับ (Absorption) กันอย่างกว้างขวาง สารเหล่านี้จะเกิดสภาพเจลที่เฉื่อย (Inert) แต่มีความแข็งแรงสูง ถึงแม้ว่าจะมีความเข้มข้นต่ำ นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างทางเคมีที่ง่ายต่อการเกิดปฏิกิริยา

อัลจิเนต (Alginate) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ธรรมชาติที่มีไอออนลบ สกัดได้จากผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาลหลายสปีชีส์ เช่น *Macrocystis pyrifera* และ *Ascophyllum nodosum* รวมทั้งแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Pseudomonas* และ *Azotobacter* ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของเกลือแคลเซียม แมกนีเซียม และโซเดียม โดยโครงสร้างประกอบด้วยปีต้า-ดี-แมนนูโรนิกแอซิด (β -D-mannuronic acid : M block) และแอลฟา-แอล-กูลูโรนิกแอซิด (α -L-guluronic acid : G block) ความแข็งแรงของเซลล์จะขึ้นอยู่กับปริมาณกูลูโรนิกแอซิดที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณของกูลูโรนิกแอซิดยังขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายที่นำมาสกัด เนื่องจากเป็นโครงสร้างหลักของสาหร่าย ทำให้อัลจิเนตมีคุณสมบัติที่ดีในเรื่องของความแข็งแรงและความยืดหยุ่น อัลจิเนตมีขนาดรูพรุนตั้งแต่ 5-200 นาโนเมตร โดยสมบัติในการแพร่ของ อัลจิเนตจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและลักษณะของไอออนที่ทำให้เกิดสภาพเจล (Hardening ions) ซึ่งถ้าความเข้มข้นของไอออนสูง จะทำให้เกิดโครงสร้างเจลที่มีความหนาแน่น มีผลทำให้อัตราการแพร่ของสารโมเลกุลใหญ่เข้าสู่เจลลดลง อัลจิเนตทำปฏิกิริยาเกิดสภาพเจลกับแคลเซียมไอออนและไอออนอื่นๆ เช่น อะลูมิเนียมไอออน บาเรียมไอออน เป็นต้น จึงนิยมนำอัลจิเนตมาใช้ในการตรึงเซลล์ในรูปแบบของเม็ดบีดต่างๆ เช่น เม็ดบีดแคลเซียมอัลจิเนต (Calcium - alginate beads) เม็ดบีดอัลจิเนตพอลิอะคริลาไมด์ (Alginate - polyacrylamide beads) เป็นต้น

2.6.2 วิธีการตรึง (Method of immobilization)

วิธีการตรึงเข้ากับสารพองแบ่งออกได้เป็น 3 วิธี

2.6.2.1 วิธีการดูดซับและการยึดเกาะ (Absorption and carrier-binding)

วิธีนี้นิยมใช้กับการตรึงเอนไซม์ เป็นการนำเอนไซม์มาดูดซับหรือยึดเกาะกับสารพองที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ การดูดซับด้วยแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der waals interaction) การดูดซับด้วยพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bonding) การยึดเกาะด้วยไอออน (Ionic binding) การยึดเกาะด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding) การยึดเกาะด้วยความจำเพาะทางชีวภาพ (Biospecific binding หรือ Affinity binding) การยึดเกาะด้วยโลหะ (Metal binding หรือ Chelation) และการยึดเกาะด้วยไดซัลไฟด์ (Disulfide binding) ข้อดีของการตรึงด้วยวิธีนี้คือ ไม่จำเป็นต้องทำการปรับสภาพทางเคมีของเอนไซม์ก่อนการตรึง จึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของเอนไซม์ เป็นการป้องกันบริเวณเร่งของเอนไซม์และช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้ ส่วนข้อเสียของการตรึงด้วยวิธีนี้คือ พันธะที่เกิดขึ้นระหว่างการดูดซับเป็นพันธะที่อ่อน ส่งผลให้เอนไซม์สามารถหลุดหรือถูกชะออกจากสารพองได้ง่าย

2.6.2.2 วิธีการเชื่อมประสาน (Cross-linking)

วิธีนี้นิยมใช้กับการตรึงเอนไซม์ เป็นการเชื่อมเกาะหรือเชื่อมประสานระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับสารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ หรือหลายหมู่ เช่น กลูทราแอลดีไฮด์ ข้อดีของการตรึงด้วยวิธีนี้คือ ทำให้เอนไซม์ตรึงรูปเกิดเป็นโครงสร้างสามมิติขนาดใหญ่ เอนไซม์ที่ถูกตรึงจะมีความคงทนสูง แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือการทำให้ปฏิกิริยาจะส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ลดลง

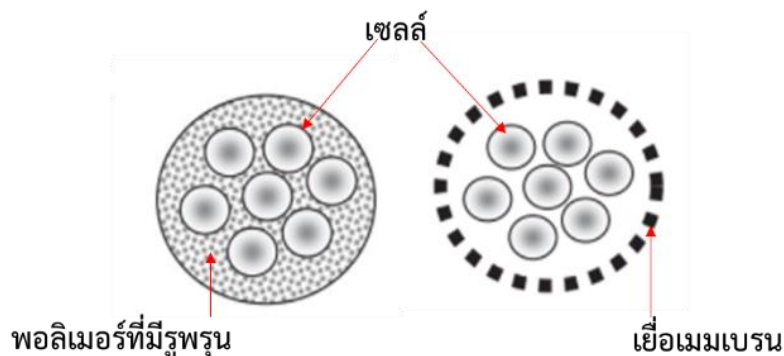
2.6.2.3 วิธีการกักเก็บ (Entrapment)

เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นการนำเซลล์มาห่อหุ้มด้วยเยื่อพอลิเมอร์ที่ยอมให้สารบางชนิดผ่านเข้าออกได้ โดยสามารถกักเก็บได้หลายวิธีได้แก่ การกักเก็บในเจล (Gel entrapment) การกักเก็บในไฟเบอร์ (Fiber entrapment) และการกักเก็บในไมโครแคปซูล (Microcapsule-type entrapment) เป็นต้น

2.6.3 การกักเก็บ (Entrapment)

การกักเก็บเป็นการนำเซลล์มาบรรจุลงในช่อง (Lattice) ของสารพองพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์ม เจล ไฟเบอร์ แผ่นเคลือบ หรือไมโครแคปซูล ดังภาพที่ 2.9 โดยที่สารตั้งต้นสามารถผ่านเข้าออกได้ วิธีนี้จะแตกต่างจากการตรึงโดยการยึดเกาะด้วยพันธะโควาเลนต์และการเชื่อมประสาน เนื่องจากว่าการตรึงจะไม่ก่อให้เกิดพันธะใด ๆ ระหว่างสารพอง โดยการกักเก็บภายในเจลเป็นการนำสารมาห่อหุ้มด้วยพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างเป็นรูพรุนและมีปริมาณเพียงพอให้สารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ผ่านเข้าออกได้ ซึ่งสารพองที่ดีควรมีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ ไม่สามารถย่อยสลายโดยสิ่งมีชีวิต มีความแข็งแรงทางกลศาสตร์สูง ไม่แตกสลายง่าย มีความคงตัว ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต มีราคาถูกและมีขั้นตอนในการตรึงที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน เป็นต้น สารพองที่ใช้ในการกักเก็บในเจลสามารถ

แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ สารพอลิเมอร์ที่มาจากธรรมชาติ ได้แก่ อัลจิเนต (Alginate) แคลปาคาร์ราจีแนน (K-carrageenan) อะกาโรส (Agarose) และสารพอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ ได้แก่ พอลิยูรีเทน (Polyurethane) พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol : PVA) เป็นต้น



รูปที่ 2.9 การกักเก็บเซลล์ภายในช่องของพอลิเมอร์ที่มีรูพรุนหรือเยื่อเมมเบรน

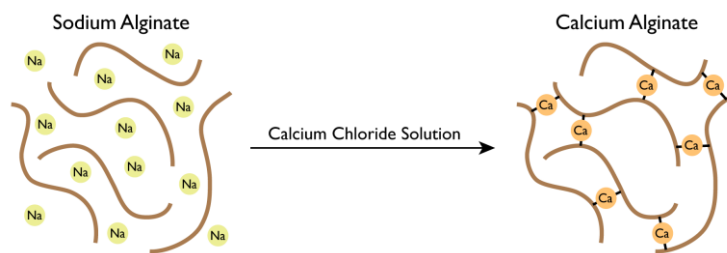
ที่มา : Kourkoutas *et al.*, (2004)

2.6.3.1 การกักเก็บในอัลจิเนต (Alginate entrapment)

อัลจิเนตทางการค้ามักจะอยู่ในรูปของกรดอัลจินิก (Alginic acid) หรือเกลือโซเดียม (Sodium salt) โดยทั่วไปนิยมเรียกว่า โซเดียมอัลจิเนต โดยกระบวนการเกิดสภาพเจลของอัลจิเนตเกิดจากการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างแคลเซียมไอออนกับโซเดียมไอออน โดยอาศัยพันธะไอออนิกภายใต้สภาวะปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง ดังแสดงในสมการที่ 1 และรูปที่ 2.10 โครงสร้างของเจลมีความคงทนต่อความร้อนในช่วง 0-100 องศาเซลเซียส ดังนั้นความร้อนจึงไม่สามารถทำให้เจลละลายได้ อย่างไรก็ตามเจลจะละลายเสียรูปร่างได้เมื่อแช่เจลอัลจิเนตในสารละลายที่มีส่วนประกอบของแคลเซียม โปแทสเซียม หรือแมกนีเซียม นอกจากนี้สารละลายแอสิตเตตบัฟเฟอร์และฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นบัฟเฟอร์ที่ไม่ควรนำมาใช้เนื่องจากจะมีผลต่อความคงทนของเจล การตรึงด้วยวิธีนี้สามารถทำให้มีรูปร่างได้หลายแบบ เช่น เม็ดบิท รูปร่างเป็นก้อนสี่เหลี่ยม เป็นต้น ข้อดีของการกักเก็บด้วยอัลจิเนตคือ สภาพแวดล้อมในการตรึงไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ขั้นตอนการตรึงไม่ยุ่งยากซับซ้อน นอกจากนี้อัลจิเนตมีราคาถูก หาซื้อได้ง่าย และมีประสิทธิภาพในการแพร่ของมวลสารสูง



ที่มา : ปรานี (2560)



รูปที่ 2.10 สมการการแลกเปลี่ยนไอออนในการเกิดเจล

ที่มา : ปราณี (2560); www.scienceandfood.com (สืบค้นวันที่ 28 พฤษภาคม 2563)

2.6.4 ประโยชน์ของการตรึงเซลล์

- 1) สามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่หรือใช้ซ้ำได้ เป็นการลดต้นทุนการผลิต
- 2) สามารถหยุดปฏิกิริยาการหมักได้อย่างรวดเร็ว โดยการแยกเอาเซลล์ตรึงรูปออกจากสารละลายหรือล้างปฏิกรณ์ได้ทันที
- 3) เซลล์ตรึงรูปมีความคงตัวสูง
- 4) ไม่มีการผสมรวมกันระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ได้กับเซลล์ ทำให้เก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ง่าย
- 5) มีประโยชน์ทางการวิเคราะห์ต่างๆ เช่น ช่วยลดขั้นตอนในกระบวนการเตรียมหัวเชื้อ และสามารถคาดคะเนการสลายตัวของเม็ดเจลได้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชนิษฐา และคณะ (2555) ศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากต้นธูปฤๅษีด้วย *Aspergillus niger* TISTR 3254 สำหรับนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล โดยการศึกษาปัจจัยต่างๆรวมทั้งปริมาณสปอร์เชื้อราเริ่มต้น พบว่าความเข้มข้นสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 102.61 ± 1.70 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการใช้สปอร์ที่มีความเข้มข้น 10^6 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

Thalisa and Pa-nga (2019) ศึกษาการผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อร่วมกันระหว่าง *A. rouxii* TISTR 3667 *Zygosaccharomyces pseudorouxii* และ *Zymomonas mobilis* ทำการศึกษาค่าพีเอช เอนไซม์เซลลูเลส และความเข้มข้นของมันสำปะหลังที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ จากผลการทดลองที่ได้พบว่า *A. rouxii* TISTR 3667 จัดว่าเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งได้ดี ย่อยแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 20 ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 38 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง

Amutha and Gunasekaran (2001) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยใช้เซลล์ตรึงร่วมกันของเชื้อ *Zymomonas mobilis* และ *Saccharomyces diastaticus* โดยพบว่าการใช้เซลล์ตรึงร่วมกันของเชื้อ 2 ตัว ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการใช้เชื้อ *S. diastaticus* เพียงอย่างเดียว เซลล์ตรึงสามารถผลิตเอทานอล 46.7 กรัมต่อลิตร จากการใช้แป้ง 150 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เซลล์ตรึงของเชื้อ *S. diastaticus* ได้เอทานอลเท่ากับ 37.5 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการเปรียบเทียบเซลล์ตรึงร่วมกันของเชื้อ 2 ตัวกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ตรึงก็ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่า และนำเซลล์ตรึงไปใช้หมักซ้ำพบว่าได้ปริมาณเอทานอลสูงถึง 53.5 กรัมต่อลิตร โดยเซลล์ตรึงยังมีประสิทธิภาพคงที่จนกระทั่งรอบที่ 7 ของกระบวนการหมัก และมีค่าผลผลิต เท่ากับ 8.9 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Behera and Ray (2015) ศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยอัลจิเนต โดยทำการย่อยแป้งเปรียบเทียบกัน 3 วิธีคือการย่อยด้วยกรด การย่อยด้วยเอนไซม์ และการย่อยทั้งกรดและเอนไซม์ ผลที่ได้พบว่าการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด และเมื่อนำไปหมักด้วยเซลล์ตรึงรูปของยีสต์จะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 189 ± 3.1 กรัมเอทานอลต่อกิโลกรัมแป้ง

Chien and Sofer (1985) ศึกษาปัจจัยต่างๆในการผลิตเอทานอลของเซลล์ตรึงรูปของเชื้อ *S. cerevisiae* โดยศึกษาอัตราการไหลของสารอาหารเข้าสู่ถังหมัก ขนาดเม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูปและชนิดของอาหารหมัก โดยพบว่าอัตราการไหลของสารอาหาร 8.8 ลิตรต่อชั่วโมง ให้ผลผลิตสูงกว่าการใช้อัตราการไหลที่ 1.0 ลิตรต่อชั่วโมง และขนาดเม็ดอัลจิเนตที่ 3.33 4.83 และ 5.63 มิลลิเมตร ให้ปริมาณผลผลิตเท่ากับ 0.34 0.27 0.22 กรัมเอทานอลต่อกรัมยีสต์ ตามลำดับ

Das et al., (2017) ทำการคัดแยกเชื้อราจากหัวเชื้อลูกแป้งที่ใช้ในการผลิตไวน์ข้าว จากผลการทดลองสามารถแยกเชื้อ 2 เชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยแป้ง ซึ่งก็คือ *A. rouxii* TU460 และ *Rhizopus oryzae* TU465 โดยเชื้อ *A. rouxii* TU460 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงเท่ากับ $14.92 \mu\text{mol}/\text{min}$ ซึ่งสูงกว่า *Rhizopus oryzae* TU465 ที่มีค่าเท่ากับ $1.41 \mu\text{mol}/\text{min}$

Duarte *et al.*, (2013) ศึกษาผลจากการใช้เซลล์ตรึงรูปในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ โดยทำการตรึงเชื้อ *S. cerevisiae* ในอัลจินเตและโคโตซานผสมกับอัลจินเต และศึกษาอาหารเริ่มต้นของการหมักเปรียบเทียบกับระหว่างการใช้น้ำตาลซูโครสกับน้ำตาลกลูโคส เมื่อนำเซลล์ตรึงหมักหนึ่งรอบจะนำเซลล์ตรึงรูปกลับมาใช้หมักซ้ำอีก 8 รอบของการหมัก โดยหมัก 10 ชั่วโมงต่อการหมัก 1 รอบ ผลที่ได้พบว่าเซลล์อิสระให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร มีอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสและซูโครสเท่ากับร้อยละ 78 และ 74.3 ตามลำดับ ส่วนเซลล์ที่ตรึงรูปด้วยอัลจินเตพบว่าอาหารน้ำตาลกลูโคสให้เอทานอลเท่ากับ 32.9 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อาหารซูโครสให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 33.5 กรัมต่อลิตร สำหรับในการตรึงรูปด้วยโคโตซานผสมอัลจินเตพบว่าอาหารน้ำตาลกลูโคสให้เอทานอลเท่ากับ 30.7 กรัมต่อลิตร อาหารซูโครสให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 31.8 กรัมต่อลิตร

Gilson and Thomas (1995) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากเซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* โดยศึกษาขนาดเม็ดเจลในช่วง 1.0 – 5.0 มิลลิเมตร พบว่าขนาดเม็ดอัลจินเตในช่วง 1 – 2 มิลลิเมตรจะมีอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสสูงกว่าการเพิ่มขนาดเม็ดเจล นอกจากนี้ยังทำการศึกษาความเข้มข้นอัลจินเตในช่วงร้อยละ 1 – 5 พบว่าแต่ละความเข้มข้นไม่มีผลกระทบต่อการใช้งานน้ำตาลกลูโคส

Goksungar and Guvenc (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาลด้วยเซลล์ตรึงรูปของ *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202 พบว่าการใช้เม็ดเจลขนาด 2.0 – 2.4 มิลลิเมตร ความเข้มข้นโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 2 ให้ประสิทธิภาพสูงสุด โดยมีผลผลิตร้อยละ 82 และอัตราการใช้น้ำตาลเท่ากับร้อยละ 90

Jing Yu and Chun Chou (2005) ศึกษาปัจจัยในเจริญเติบโตและผลิตเอโนไซม์ของเชื้อ *A. rouxii* จากข้าว โดยเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นข้าว (ร้อยละ 5-20) อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (25-40 องศาเซลเซียส) ระยะเวลาการหมัก (1-6 วัน) และความเร็วในการเขย่า (0-150 รอบต่อนาที) ผลการทดลองที่ได้พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอโนไซม์ได้สูงสุด 1.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นข้าวร้อยละ 20 ซึ่งเส้นใยจะเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาและความเร็วในการเขย่า

Kaur and Satyanarayana (2004) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอโนไซม์กลูโคอะไมเลสและการย่อยแป้งของเชื้อ *Thermomucor indica-seudaticae* ผลการทดลองที่ได้พบว่าการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารที่มีความเข้มข้นแป้งร้อยละ 5 และใช้ความเข้มข้นสปอร์เชื้อราเริ่มต้น 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ปริมาณเอโนไซม์กลูโคอะไมเลส 30,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Idris and Suzana (2006) ศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเต ขนาดของเม็ดอัลจินเต พีเอชเริ่มต้น และอุณหภูมิ ในการผลิตกรดแลกติกจากเปลือกสับปะรดโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของ *Lactobacillus delbrueckii* ผลที่ได้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมักคือการใช้ความเข้มข้นของอัลจินเตเท่ากับร้อยละ 2 ขนาดเม็ดพีทที่ 1.00 มิลลิเมตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 56 ชั่วโมง

Li *et al.*, (2015) ทำการศึกษาความเข้มข้นแป้งที่ส่งผลต่อการเจลาติไนซ์ (Gelatinization) และการทำให้ข้นหนืด (Liquefaction) จะพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นแป้งสูงขึ้นจะส่งผลให้โมเลกุลของแป้งเกิดการขยายตัว (Swelling) ต่ำลง แป้งจะไม่เป็นเนื้อเดียวกับน้ำ โมเลกุลแป้งไม่ถูกทำลาย ส่งผลให้เอนไซม์เข้าย่อยได้ยาก

Lee *et al.* (2011) ศึกษาการนำเซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* ด้วยโซเดียมอัลจินเตทกลับมาใช้ซ้ำในกระบวนการหมักเอทานอล โดยยีสต์ที่ถูกตรึงสามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่าการหมักแบบใช้เซลล์อิสระภายใต้สภาวะเดียวกัน สภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักคือ การใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 และความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 10 ทำการตรึงเซลล์ด้วยอัลจินเตทที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ระยะเวลาในการหมักของเซลล์ตรึงรูปที่ใช้แล้วเท่ากับ 10-14 ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ตรึงรูปใหม่ใช้เวลาการหมัก 24 ชั่วโมง และเซลล์อิสระใช้เวลาการหมัก 36 ชั่วโมง ซึ่งผลที่ได้พบว่าเซลล์ตรึงรูปมีค่าผลได้เอทานอลเท่ากับร้อยละ 100 ในขณะที่เซลล์อิสระมีค่าผลได้เอทานอลเท่ากับร้อยละ 88 และการส่องดูด้วยกล้อง Transmission electron microscopy (TEM) พบว่าเซลล์ตรึงรูปที่ใช้แล้วมีการเจริญเติบโตของยีสต์หนาแน่น

Najafpour *et al.*, (2004) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของเชื้อ *S. cerevisiae* โดยวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของเม็ดเซลล์ตรึงรูป พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นอัลจินเตทร้อยละ 1.5 จะทำให้เม็ดเจลไม่คงตัว แตกหักได้ง่าย การใช้อัลจินเตทที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 – 3 เม็ดเจลจะมีความคงตัว และมีความยืดหยุ่น แตกหักยาก แต่การใช้อัลจินเตทที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 พบว่าเม็ดเจลมีความหนาแน่นสูง ไม่มีความยืดหยุ่น การส่งผ่านเข้าออกของสารอาหารเป็นได้ยาก เชื้อไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้

Nikolic *et al.*, (2010) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากข้าวโพดอาหารสัตว์โดยใช้เซลล์อิสระเปรียบเทียบกับเซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* ทำการศึกษาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น และระยะเวลาในกระบวนการหมัก วิเคราะห์ผลที่ได้จากค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ ความเข้มข้นเอทานอล ค่าผลได้เอทานอล และอัตราผลผลิตเอทานอล เป็นต้น การตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยแคลเซียมอัลจินเตท ผลที่ได้พบว่าปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับร้อยละ 2 โดยปริมาตร และระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมเท่ากับ 38 ชั่วโมง ทั้งในเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป จากผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงรูปมีประสิทธิภาพมากกว่าเซลล์อิสระในด้านการทนต่อเอทานอล และไม่เกิดการยับยั้งด้วยสารตั้งต้น

Rakin *et al.* (2009) ศึกษาการผลิตไบโอเอทานอลจากการใช้เซลล์ตรึงรูปของยีสต์ *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* โดยทำการหมักเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยมีการเปรียบเทียบการตรึงเซลล์ด้วยอัลจินเตทและพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) ผลที่ได้พบว่าการตรึงด้วยอัลจินเตทให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับร้อยละ 10.05 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยการใช้หัวเชื้อร้อยละ 5 และนำเซลล์ตรึงไปใช้ในการหมักซ้ำ พบว่าเซลล์ตรึงรูปแตกตัวหลังจากหมักรอบที่ 2

Slivinski *et al.*, (2011) ทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์กลูโคสไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus niger* โดยเอนไซม์กลูโคสไมเลสบริสุทธิ์ที่เชื้อผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 118.17 กิโลดาลตัน และพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5 - 5.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมเอนไซม์ 152.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Swain *et al.*, (2007) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากต้น Mahula โดยเปรียบเทียบการใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในกระบวนการหมัก งานวิจัยนี้ทำเพื่อหาวัตถุดิบที่เหมาะสมในการนำมาผลิตเอทานอลทดแทนวัตถุดิบเดิมที่ใช้ในการผลิตเอทานอล เช่น กากชานอ้อย โมลาส แป้ง และมันเทศ เป็นต้น โดยต้น Mahula เป็นต้นไม้ที่มีปริมาณมากในประเทศอินเดียและดอกให้ปริมาณน้ำตาลสูงเมื่อนำไปทำการหมักเปรียบเทียบกัน ผลที่ได้พบว่าเซลล์อิสระให้ค่าผลได้เอทานอลเท่ากับ 193 กรัมต่อกิโลกรัม เซลล์ตรึงให้ค่าผลได้เท่ากับ 205 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

Wang *et al.*, (1984) ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคสไมเลสของเชื้อ *A. rouxii* โดยทำการเลี้ยงเชื้อในข้าวและมันสำปะหลัง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นแป้งหรือสารตั้งต้นก็จะส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น จากนั้นทำการสกัดเพื่อให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่างๆ เอนไซม์กลูโคสไมเลสที่สกัดได้จัดว่าเป็นไกลโคโปรตีน และมีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 4.5 อุณหภูมิเหมาะสม 60 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล 55,600 ดาลตัน ค่า K_m เมื่อหมักด้วยสารละลายแป้ง ไกลโคเจนและอะไมโลเพกตินเท่ากับ 15.8, 27.6 และ 16.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Williams and Munnecke (1981) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากการใช้เซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง โดยนำยีสต์มาทดสอบความทนต่อเอทานอล หลังจากนั้นนำไปผสมกับอัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลังจากนั้นนำไปหยดลงบน 0.05 M ของแคลเซียมคลอไรด์ ทำการหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นเอทานอล ความเข้มข้นอัลจิเนต และความหนาแน่นของเซลล์โดยการใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการหมัก ผลที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระในสภาวะเดียวกันพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลคือ การหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชอยู่ในช่วง 3.0-7.5 และความเข้มข้นอัลจิเนตเท่ากับร้อยละ 1 เพราะถ้ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นอัลจิเนตจะทำให้อัตราการผลิตเอทานอลลดลง และยังพบว่าเซลล์ตรึงให้ปริมาณเอทานอลมากกว่าเซลล์อิสระ

Pa-nga and Thalisa (2018) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อรา *A. rouxii* และเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยทำการศึกษาความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น ผลการทดลองที่ได้พบว่าเชื้อ *A. rouxii* สามารถย่อยแป้งที่ความเข้มข้นสูงเท่ากับร้อยละ 20 และ 25 ได้ โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 115.94 ± 0.99 และ 159.72 ± 4.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเชื้อ *S. cerevisiae* ลงไปหมัก จะได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 73.68 ± 1.81 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นแป้งร้อยละ 20 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลถึงร้อยละ 87.46 เมื่อเทียบกับทฤษฎี

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 เลี้ยงบนอาหาร PDA (Potato dextrose agar) และเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เลี้ยงบนอาหารแห้งเอียง YPD (Yeast extract peptone dextrose) จุลินทรีย์เหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research)

3.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) จากตลาดหัวตะเข้ ตลาดกระบ้ง กรุงเทพฯ นำมาล้างให้สะอาด เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 3.3.1 อาหาร Potato dextrose agar (PDA) แสดงในภาคผนวก ก
(Sisco research laboratories Pvt. Ltd., India)
- 3.3.2 อาหาร Yeast extract peptone dextrose (YPD) แสดงในภาคผนวก ก
- 3.3.3 สารละลาย Tween 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$)
(Laboratory reagents and fine chemicals, India)
- 3.3.4 สารละลาย Sodium hydroxide (NaOH)
(Laboratory reagents and fine chemicals, India)
- 3.3.5 สารละลาย 3-5,Dinitrosalicylic acid (DNS) ($C_7H_4KNaO_6$) (Sigma-Aldrich, India)
- 3.3.6 สารละลาย Potassium sodium tartrate ($C_7H_4KNaO_4 \cdot 4H_2O$)
(Laboratory reagent and fine chemicals, India)
- 3.3.7 สารละลาย Glucose standard ($C_6H_{12}O_6$) (Sisco research laboratories, India)
- 3.3.8 สารละลาย Iodine resublimed (I_2) (Carlo ERBA reagents, France)
- 3.3.9 สารละลาย Potassium iodide (KI) (VWR international Ltd., England)
- 3.3.10 สารละลาย Sodium acetate trihydrate ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$)
(Sisco research laboratories Pvt. Ltd., India)
- 3.3.11 สารละลาย Gracial acetic acid ($C_2H_4O_2$) (Carlo ERBA reagents S.A.S, France)
- 3.3.12 สารละลาย Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)
(Qrec, New Zealand)
- 3.3.13 สารละลาย Boric acid (H_3BO_3) (Merk KGaA, Germany)

- 3.3.14 สารละลาย Sodium alginate ($C_6H_9NaO_7$) (Sisco research laboratories, India)
- 3.3.15 สารละลาย Calcium chloride dehydrated ($CaCl_2$) (Sigma-Aldrich, China)
- 3.3.16 สารละลาย Sodium chloride ($NaCl$) (Sisco research laboratories, India)
- 3.3.17 สารละลาย Ethanol absolute (C_2H_6O) (VWR international S.A.S., France)
- 3.3.18 สารละลาย Propan-1-ol (C_3H_8O) (Carlo ERBA reagents, France)

3.4 อุปกรณ์

- 3.4.1 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Balance) (Sartorius BP2215, Switzerland)
- 3.4.2 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave)
(Tomy high pressure steam sterilizer ES-315, Japan)
- 3.4.3 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (Bosstech, Thailand)
- 3.4.4 กล้องจุลทรรศน์แบบไบรท์ฟิลด์ (Bright field microscope)
(Nikon eclipse E100, Japan)
- 3.4.5 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (Memmert, Germany)
- 3.4.6 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp, USA)
- 3.4.7 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Memmert UN 110, Germany)
- 3.4.8 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Shimadzu UV-1601, Japan)
- 3.4.9 เครื่องไมโครเพลตรีดเดอร์ (Microplate reader) (Fluostar omega, Germany)
- 3.4.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath) (Memmert, Germany)
- 3.4.11 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (Scientific industrial Inc. Genies2, USA)
- 3.4.12 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) (Isolab laborgerate GmbH, Germany)
- 3.4.13 คิวเวตต์แก้ว (Glass cuvette) (Hellma analytics, Germany)
- 3.4.14 ไมโครปิเปต (Micropipettes) (Socorex, Switzerland)
- 3.4.15 ตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ (Sieve) (Endecotts Ltd., England)
- 3.4.16 กระบอกฉีดยาและเข็มฉีดยา (Syring and needle) (Nipro, Thailand)
- 3.4.17 อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่น ฟลาสก์ (Erlenmeyer Flask) หลอดทดลอง (Test Tube)
- 3.4.18 เครื่องกวนสารให้ความร้อน (Hot plate with magnetic stirrer) (Stuart, England)
- 3.4.19 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Mettler Toledo, USA)
- 3.4.20 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-Gas chromatography) (Shimadzu 2014, Japan)
- 3.4.21 เครื่องปั่น (Blender) (Tafal, France)
- 3.4.22 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Hermle labortechnik GmbH, Germany)
- 3.4.23 ไมโครเวฟ (Microwave) (Toshiba ER-SM20(W)TH, Thailand)
- 3.4.24 เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC - High performance liquid

Chromatography) (Shimadzu, Japan)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมผงมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังนำมาล้างทำความสะอาด ปอกเปลือกและหั่นให้มีขนาดเล็ก นำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนแห้ง จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดเป็นผงและกรองผ่านตะแกรงร่อนขนาด 50 mesh ผงมันสำปะหลังที่ได้จะมีขนาดน้อยกว่า 300 ไมโครเมตร นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

3.5.2.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อรา

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ในอาหารแข็งเอียง PDA (Potato dextrose agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นทำสารละลายสปอร์โดยการเติมสารละลาย Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อหลอด ใช้ลูบชุดเพื่อให้สปอร์หลุดจากเส้นใยและกรองด้วยกรวยบุสาลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายสปอร์มานับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ให้มีจำนวนสปอร์ตามที่ต้องการ (Mercial *et al.*, 2006) นำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการศึกษาต่อไป

3.5.2.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของยีสต์

เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 จำนวน 1 หลบ มาขีตลงบนอาหารแข็งเอียง YPD (Yeast extract peptone dextrose) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเชื้อลงบนอาหารเหลว YPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 1 หลบ บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายยีสต์มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 (Petrea, 2008) นำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการศึกษาต่อไป

3.5.3 การเตรียมอาหารหมัก

ซังมันสำปะหลังจากข้อ 3.5.1 มาเตรียมสารละลายผงมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นตามต้องการ ในน้ำกลั่นปริมาตรรวม 150 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ จากนั้นนำสารละลายผงมันสำปะหลังไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส คนตลอดเวลา เป็นเวลา 30 นาที จนได้มันสำปะหลังที่มีลักษณะเหนียวข้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.5.4 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล (Saccharification) จากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182

3.5.4.1 ความเข้มข้นของสปอร์เชื้อราเริ่มต้น

เตรียมสารละลายสปอร์เชื้อราดังข้อ 3.5.2.1 ให้มีความเข้มข้นสปอร์ 10^6 , 10^7 , 10^8 และ 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำหัวเชื้อสปอร์ที่ได้ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เติมในอาหารหมักที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.3 ที่มีความเข้มข้นมันสำปะหลังร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน วิเคราะห์ปริมาณมันสำปะหลังด้วยไอโอดีน (Thalisa and Pa-nga, 2019) (ภาคผนวก ข) และอีกส่วนหนึ่งนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller *et al.*, 1959) (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสไมเลส (Ramadas *et al.*, 1996) (ภาคผนวก ข) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโตสด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (ภาคผนวก ข) คัดเลือกความเข้มข้นสปอร์เชื้อราเริ่มต้นที่ให้ปริมาณน้ำตาลสูงนำไปใช้ในการศึกษาต่อ

3.5.4.2 ความเข้มข้นของมันสำปะหลังเริ่มต้น

เตรียมสารละลายสปอร์เชื้อราให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.5.4.1 นำมาเติมความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาหารหมักที่มีความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 4, 6, 8, 10 และ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งเตรียมตามข้อ 3.5.3 บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.5.4.1 คัดเลือกความเข้มข้นของมันสำปะหลังเริ่มต้นที่ให้ปริมาณน้ำตาลสูงนำไปใช้ในการศึกษาต่อ

3.5.4.3 ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมัก

เตรียมมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.4.2 ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นดังนี้ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ด้วยการใช้ Britten-Robinson universal buffer (Reynolds *et al.*, 2013) (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปทำให้มันสำปะหลังชื้นหนืดตามวิธีข้อ 3.5.3 แล้วเติมสารละลายสปอร์เชื้อราความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.4.1 ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน นำไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับหัวข้อ 3.5.4.1 คัดเลือกค่าพีเอชเริ่มต้นอาหารหมักที่ให้ปริมาณน้ำตาลสูงนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

3.5.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งของเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 โดยใช้เซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* TISTR 5088

3.5.5.1 ความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนต

เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 2, 3 และ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เพื่อให้โซเดียมอัลจิเนตละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ที่ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปิเปตหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่เตรียมจากข้อ 3.5.2.2 ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (อัตราส่วนเชื้อยีสต์ต่อสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเท่ากับ 1:1) (Swain *et al.*, 2007) แล้วนำมาหยดที่ระดับความสูงจากปากฟลาสก์ 1 เซนติเมตร ลงบนแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ (Idris and Suzana, 2006) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แช่เม็ดเจลทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองเอาเฉพาะเม็ดเจลมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ตรึงรูปเติมในอาหารหมักที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.5.4 เปรียบเทียบกับการใช้เซลล์อิสระของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 นำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) (ภาคผนวก ข) และวัดค่าพีเอช นำผลที่ได้จากหมักระหว่างการใช้เซลล์ตรึงรูปเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์อิสระ คัดเลือกความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนตที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงนำไปใช้ในการศึกษาหัวข้อต่อไป

3.5.5.2 ขนาดเม็ดโซเดียมอัลจิเนต

เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.5.1 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่เตรียมจากข้อ 3.5.2.2 ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (อัตราส่วนเชื้อยีสต์ต่อสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเท่ากับ 1:1) แล้วนำมาหยดด้วยเข็มขนาดต่างๆ ลงบนแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แช่เม็ด เจลทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองเอาเฉพาะเม็ดเจล นำไปร่อนผ่านตะแกรงร่อนเพื่อวัดขนาด โดยตะแกรงร่อนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2.00, 2.36-2.80 และมากกว่า 3.35 มิลลิเมตร จากนั้นกรองเอาเฉพาะเม็ดเจลมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์ตรึงรูปเติมในอาหารหมักที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.5.4 เปรียบเทียบกับการใช้เซลล์อิสระของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 นำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที 4

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.5.5.1 ทำการคัดเลือกขนาดเม็ดโซเดียมอัลจิเนตที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงนำไปใช้ในการศึกษาต่อในหัวข้อต่อไป

3.5.6 ศึกษาการผลิตเอทานอลในสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088

เตรียมมันสำปะหลังความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.4.2 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส คนตลอดเวลา เป็นระยะเวลา 30 นาที นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไออนุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายสปอร์ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 3.5.4.1 ปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน นำไปฆ่าเชื้อ จากนั้นนำมาเติมเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่มีสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.5.5 นำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (GC) วัดค่าพีเอช และนำเม็ดเจลก่อนหมัก-หลังหมักไปถ่ายภาพภายใต้กล้องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : SEM) นำผลที่ได้จากหมักระหว่างการใช้เซลล์ตรึงรูปเปรียบเทียบกับหมักที่ใช้เซลล์อิสระ จากนั้นทำการกรองเอาเม็ดเจลที่ผ่านกระบวนการหมักไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.5.7 ศึกษาประสิทธิภาพเซลล์ตรึงรูปของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักซ้ำ (Repeat batch process)

นำเซลล์ตรึงที่ได้จากการกระบวนการหมักในข้อ 3.5.6 ล้างด้วยอาหาร Potato dextrose broth (PDB) 1 ครั้ง จากนั้นนำลงในอาหารหมักในสภาวะที่เหมาะสมเช่นเดียวกับข้อ 3.5.6 บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (GC) และวัดค่าพีเอช เปรียบเทียบกระบวนการหมักระหว่างการใช้เซลล์ตรึงรูปกับการใช้เซลล์ตรึงรูปซ้ำ (Lee *et al.*, 2011)

3.5.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองใช้การวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) มีจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.5.9 ศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักเอทานอล

ศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยใช้กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis fermentation : SHF) ซึ่งใช้เชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 ในกระบวนการย่อยมันสำปะหลังและใช้เซลล์ตรึงรูปของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ย่อยได้ โดยทำการวิเคราะห์ค่าผลได้เอทานอล (Ethanol yield : $Y_{g/g}$) (Castro and Roberto, 2015) ค่าอัตราการผลิตเอทานอล (Volumetric ethanol productivity : Q_p) (EL-Dalatony *et al.*, 2016) วิเคราะห์ค่าประสิทธิภาพการหมัก (Fermentation efficiency) (Fernandes *et al.*, 2015) และประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล (Conversion efficiency : CE) (Duangmanee *et al.*, 2007) โดยมีสูตรในการคำนวณดังนี้

ค่าจลนพลศาสตร์	สูตรการคำนวณ
Ethanol Yield ($Y_{g/g}$)	$\frac{\text{Ethanol (g/L)}}{\text{Utilized glucose (g/L)}}$
Volumetric ethanol productivity (Q_p)	$\frac{\text{Ethanol (g/L)}}{T_f(\text{h})}$
Fermentation efficiency (%)	$\frac{\text{Ethanol (g/L)}}{\text{Theoretical ethanol(g/L)}} \times 100$

หมายเหตุ : ค่า T_f หมายถึง ระยะเวลาการหมักเอทานอล (ชั่วโมง)

จากทฤษฎี แป้ง 100 กรัม จะให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 56.79 กรัม และ แป้ง 1 กรัม จะให้น้ำตาลกลูโคส 1.11 กรัม (Fernades *et al.*, 2015 ; Choi *et al.*, 2011)

บทที่ 4

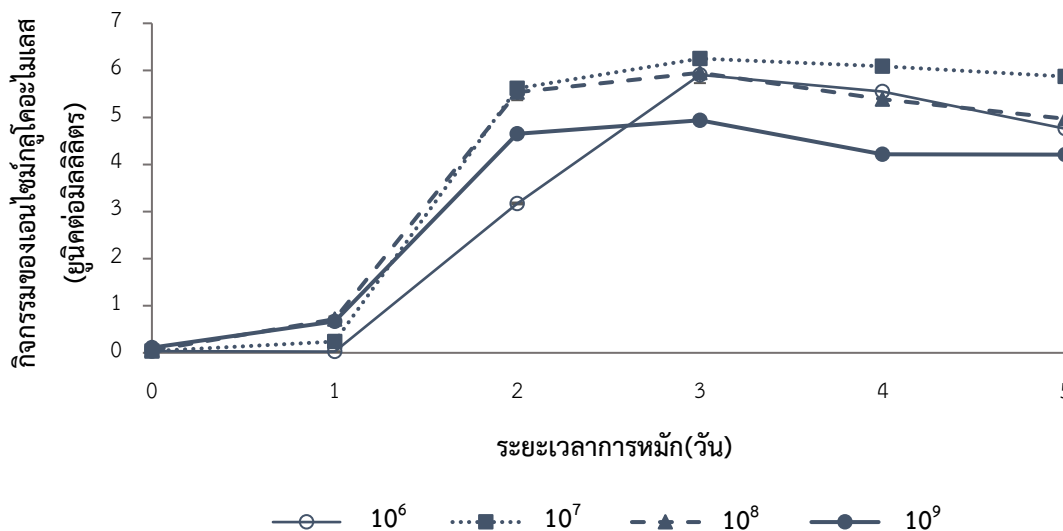
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล (Saccharification) จากมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182

4.1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นของเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182

4.1.1.1 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

จากการศึกษาความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นของ *A. rouxii* TISTR 3182 ซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 โดยแปรผันความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นดังนี้ 10^6 , 10^7 , 10^8 และ 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่ากิจกรรมกลูโคอะไมเลสจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยในวันที่ 3 ของการหมัก มีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด และอาหารหมักที่ความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 6.26 ± 0.07 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นอาหารหมักที่ความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 5.90 ± 0.11 และ 5.95 ± 0.09 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการใช้สปอร์เริ่มต้น 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในวันที่ 3 ต่ำกว่าการใช้สปอร์เริ่มต้น 10^6 , 10^7 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากการทดลองจะพบว่าการใช้ความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นสูง จะส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลดลง เนื่องจากเชื้อราเกิดสภาวะการแข่งขันเพื่อแย่งสารอาหารมาใช้ในกระบวนการเจริญเติบโต (Kaur and Satyanarayana, 2004) แต่ถ้าหากใช้ความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นต่ำเกินไป จะส่งผลให้ไม่เพียงพอในการเริ่มต้นการเจริญเติบโต (Kashyap *et al.*, 2002) เมื่อเข้าสู่วันที่ 4 และ 5 ของกระบวนการหมัก ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะลดลงเล็กน้อย แสดงดังรูปที่ 4.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเนื่องจากสารอาหารเริ่มหมดจึงส่งผลให้กระบวนการเมทาบอลิซึมของเชื้อลดลง (Sabu *et al.*, 2005) จากการทดลองนี้เชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงเมื่ออาหารหมักมีความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นที่ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Puri *et al.*, (2013) ได้ศึกษาความเข้มข้นของสปอร์ *Aspergillus oryzae* ต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นสปอร์ในช่วง 10^5 - 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จะทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 2.37 เป็น 4.14 IU เมื่อความเข้มข้นสปอร์เป็น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จะทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ลดลง และ Yegin *et al.*, (2010) พบว่าความเข้มข้นสปอร์ของ *Mucor mucedo* DSM 809 เท่ากับ 2×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จะทำให้มีปริมาณกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสสูงเมื่อเทียบกับสปอร์ 10^3 และ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.1 กิจกรรมเอนไซม์กลูโคสอะไมเลสของเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในการย่อยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกันในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

4.1.1.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

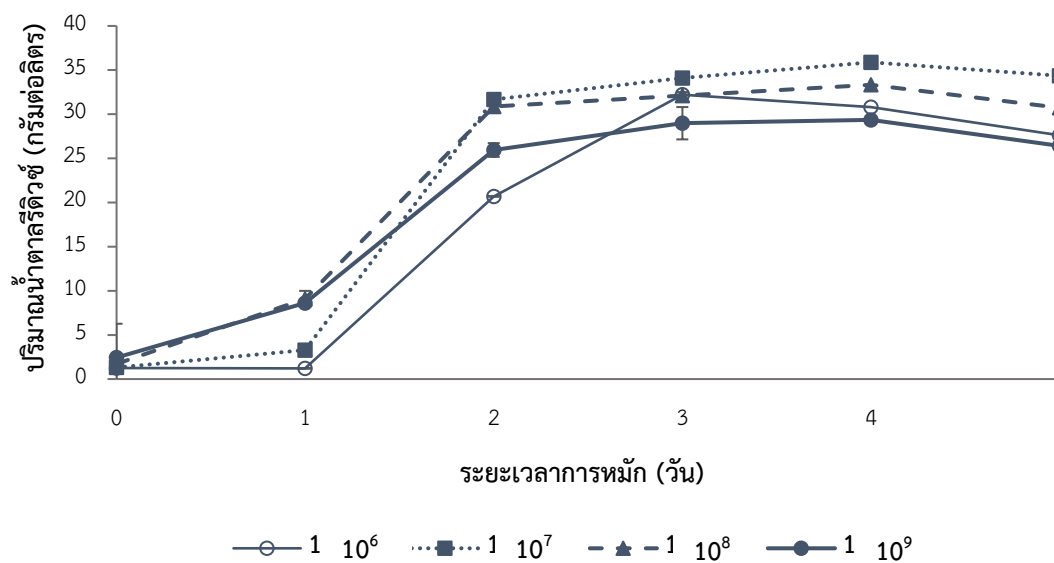
จากการทดลองพบว่า *A. rouxii* TISTR 3182 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคสอะไมเลส ออกมาย่อยมันสำปะหลังกลายเป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส เป็นต้น โดยน้ำตาลเหล่านี้จัดว่ามีคุณสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (Kunz *et al.*, 2011) ดังนั้นเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 จึงถูกจัดว่าเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในกระบวนการย่อยแป้ง (Dung *et al.*, 2006) จากการทดลองที่ได้พบว่า ในวันแรกของการหมักมีการย่อยมันสำปะหลังและผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมัก ซึ่งจะสัมพันธ์กับค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสอะไมเลส การใช้สปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 34.10 ± 0.73 กรัมต่อลิตร ขณะที่การใช้ความเข้มข้นสปอร์ 10^6 , 10^8 และ 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 32.21 ± 0.73 , 32.12 ± 1.36 และ 28.98 ± 3.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 4 และ 5 ของการหมักปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลง แสดงดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.2 จากการทดลองจะพบว่า *A. rouxii* TISTR 3182 สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงเมื่อใช้ความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะสอดคล้องกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสอะไมเลส แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นสปอร์มากขึ้นเป็น 10^8 และ 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะลดลง สอดคล้องกับการศึกษาของชนิษฐาและคณะ. (2555) ได้ศึกษาการแปรผันปริมาณสปอร์เชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3254 ในการย่อยลำต้นธูปฤๅษีพบว่าการใช้สปอร์ที่มีความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 102.61 ± 1.70 กรัม

ต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการใช้ความเข้มข้นสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้การใช้ความเข้มข้นสปอร์สูงไม่ได้มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Panday, 1990)

ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกันของเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

ความเข้มข้นสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)					
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)					
	0	1	2	3	4	5
10^6	1.25±0.01 ^d	1.21±0.03 ^c	20.69±7.89 ^b	32.21±0.73 ^{ab}	30.82±1.92 ^b	27.62±1.92 ^b
10^7	1.31±0.01 ^c	3.28±0.24 ^b	31.69±1.54 ^a	34.10±0.73 ^a	35.88±1.35 ^a	34.36±1.32 ^a
10^8	1.72±0.01 ^b	9.10±0.24 ^a	30.86±1.25 ^a	32.12±1.36 ^{ab}	33.33±1.69 ^{ab}	30.74±2.59 ^{ab}
10^9	2.44±0.01 ^a	8.63±0.57 ^a	25.95±0.67 ^{ab}	28.98±3.18 ^b	29.36±3.41 ^b	26.43±5.08 ^b

หมายเหตุ : ^{abc}ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกันของเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

จากผลการทดลองจะพบว่าในวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก จะมีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงมากกว่าวันอื่นๆของการหมัก จึงนำมันสำปะหลังที่ผ่านการหมักด้วยความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกันในวันที่ 3 มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและ

ปริมาณมันสำปะหลังที่เชื้อใช้ไป พบว่าการใช้ *A. rouxii* TISTR 3182 ที่มีความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 35.97 ± 3.29 กรัมต่อลิตร และแตกต่างทางสถิติกับการใช้ความเข้มข้นสปอร์อื่นๆ ($p \leq 0.05$) ขณะที่การใช้ความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 , 10^8 และ 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสน้อยกว่าเท่ากับ 28.06 ± 0.53 , 30.82 ± 0.58 และ 27.16 ± 4.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณามันสำปะหลังที่ใช้ไป จะพบว่าการใช้ความเข้มข้นสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพสูงในการใช้มันสำปะหลัง ซึ่งพบว่าใช้ไปร้อยละ 92.09 ± 2.56 รองลงมาเป็นความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้น 10^6 , 10^8 และ 10^9 ที่มีการใช้มันสำปะหลังร้อยละ 86.00 ± 2.89 , 86.28 ± 0.11 และ 79.59 ± 4.49 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.2 ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Murthy *et al.*, (2009) พบว่าการใช้ปริมาณสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นสปอร์ที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณน้ำตาลและมีกิจกรรมของเอนไซม์สูง เมื่อเทียบกับความเข้มข้นสปอร์ที่ 10^6 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เนื่องจากการใช้ความเข้มข้นสปอร์สูงส่งผลให้เชื้อใช้สารตั้งต้นอย่างรวดเร็วทำให้การเติบโตและผลผลิตที่ได้ลดลง แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นเชื้อต่ำก็จะใช้เวลานานในการผลิตผลผลิต Kheng and Omar (2004) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus niger* USM A11 เท่ากับ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จะให้ปริมาณผลผลิตสูงกว่าการใช้ความเข้มข้นสปอร์ 10^3 และ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นต้น

ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เชื้อใช้ไปในกระบวนการหมักที่มีความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกันของเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก

ความเข้มข้นสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแป้งที่ใช้ไป (ร้อยละ)
10^6	28.06 ± 0.53^b	86.00 ± 2.89^b
10^7	35.97 ± 3.29^a	92.09 ± 2.56^a
10^8	30.82 ± 0.58^b	86.28 ± 0.11^b
10^9	27.16 ± 4.17^b	79.59 ± 4.49^c

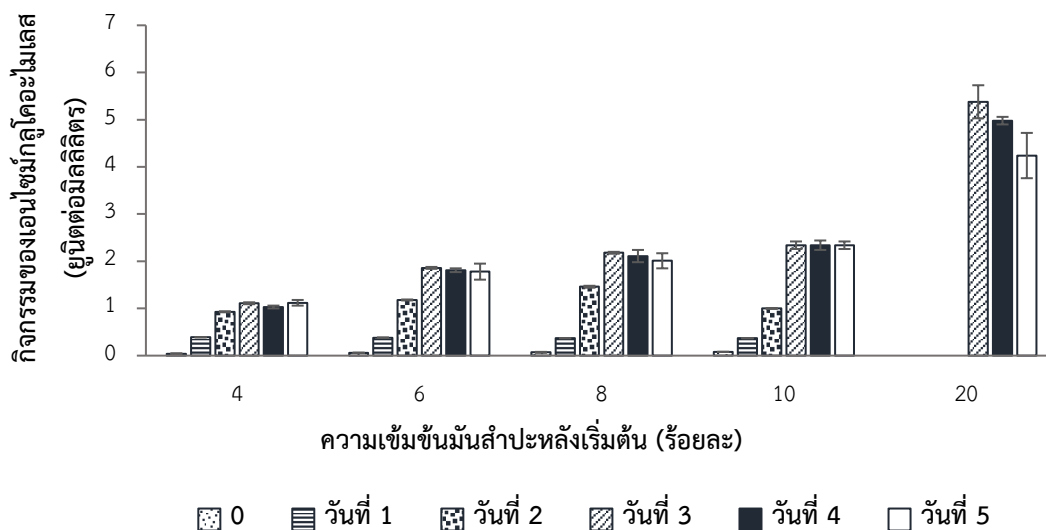
หมายเหตุ : ^{abc}ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของมันสำปะหลังเริ่มต้นที่ใช้เป็นอาหารหมัก

4.1.2.1 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

จากการศึกษาความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นของอาหารหมัก หมักด้วยเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 มีความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อโดยแปรผันความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นดังนี้ ร้อยละ 4, 6, 8, 10 และ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากผลการทดลองที่ได้พบว่าความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นร้อยละ 4, 6, 8

และ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เริ่มมีการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตั้งแต่วันแรกของกระบวนการหมัก และผลิตสูงขึ้นเรื่อยๆ ในวันที่ 2 ของกระบวนการหมัก มันสำปะหลังเริ่มต้นร้อยละ 4, 6, 8 และ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 0.93 ± 0.02 , 1.18 ± 0.01 , 1.46 ± 0.04 และ 1.00 ± 0.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ยังไม่สามารถเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ ในช่วง 2 วันแรกของกระบวนการหมัก เนื่องจากสารละลายมันสำปะหลังมีลักษณะหนืดข้น ซึ่งมีผลมาจากเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ยังผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสออกมาได้น้อยไม่เพียงพอต่อการย่อยมันสำปะหลัง และเมื่อเข้าสู่วันที่ 3 ของกระบวนการหมัก พบว่าทุกความเข้มข้นของมันสำปะหลัง จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด โดยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด เท่ากับ 5.38 ± 0.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้ความเข้มข้นมันสำปะหลังอื่นๆ สำหรับมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 8 และ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสรองลงมาเท่ากับ 2.18 ± 0.03 และ 2.34 ± 0.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงให้เห็นว่าการใช้ความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นสูง จะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงตามไปด้วยเนื่องจากเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ต้องผลิตเอนไซม์ออกมาให้เพียงพอการย่อยโมเลกุลของมันสำปะหลัง เพื่อจะได้นำน้ำตาลที่ได้ไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมและการเจริญเติบโต หลังจากนั้นเมื่อเข้าสู่วันที่ 4 และ 5 ของกระบวนการหมักจะพบว่าการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเริ่มมีปริมาณคงที่และลดลง แสดงดังรูปที่ 4.3 จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ดีเมื่ออาหารหมักมีความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jing Yu and Chun Chou (2005) รายงานว่าเชื้อ *A. rouxii* สามารถเจริญเติบโต สร้างเส้นใยและผลิตเอนไซม์ได้สูงในข้าวที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 1.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้เชื้อ *Amylomyces sp.* YTH3 ยังสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 25 ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อ *Aspergillus sp.* MSU, BT1 และ *A. niger* TISTR 3254 (Pa-nga and Thalisa, 2018) แต่ถ้าหากเพิ่มความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังให้สูงเกินไป การขยายตัวภายในโมเลกุลของแป้งมันสำปะหลังจะลดต่ำลง ทำให้แป้งมีความหนืดข้นสูง ไม่มีรูพรุน (Li et al., 2015) อาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ เนื่องจากออกซิเจนมีอยู่อย่างจำกัด และเชื้อจะไม่สามารถสร้างเส้นใยทะลุผ่านแป้งมันสำปะหลังได้ (Rukhair and Srivastava, 1995)



รูปที่ 4.3 กิจกรรมเอนไซม์กลูโคสไมเลสของเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในการย่อยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นแป้งเริ่มต้นที่ต่างกัน ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

4.1.2.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าในวันแรกของกระบวนการหมักเริ่มเกิดการย่อยมันสำปะหลังพร้อมกับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ขึ้นและผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของกระบวนการหมัก โดยอาหารหมักที่มีความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นร้อยละ 4 6 8 และ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เท่ากับ 23.52 ± 0.36 , 26.99 ± 0.27 , 27.48 ± 1.01 และ 29.81 ± 0.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ยังคงผลิตน้ำตาลรีดิวซ์อย่างต่อเนื่องจนกระทั่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก ซึ่งอาหารหมักที่ใช้ความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 90.86 ± 1.26 กรัมต่อลิตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับการใช้มันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นอื่นๆ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้รองลงมา ได้จากอาหารหมักที่ใช้ความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นร้อยละ 10, 8, 6 และ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 45.95 ± 2.44 , 42.38 ± 1.14 , 36.21 ± 0.45 และ 27.19 ± 0.58 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อัตราการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มลดลงในวันที่ 4 ของกระบวนการหมัก โดยอาหารหมักในแต่ละความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 25.50 ± 0.26 ถึง 89.31 ± 4.69 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.4 หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มคงที่จนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมัก ในวันที่ 5 พบว่าอาหารหมักที่มีความเข้มข้นมันสำปะหลังร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ยังคงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 79.17 ± 4.14 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10, 8, 6 และ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยมี

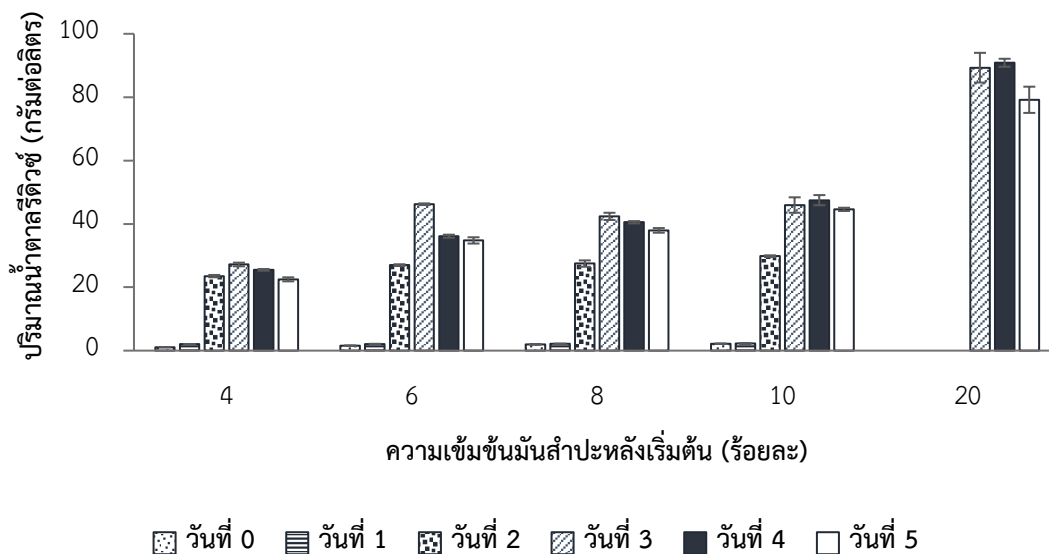
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เท่ากับ 44.59 ± 0.52 , 37.95 ± 0.73 , 34.79 ± 0.99 และ 22.5 ± 0.63 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงเมื่ออาหารหมักมีความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกับการผลิตเอนไซม์กลูโคสไมเลส และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thalisa and Pa-nga (2019) พบว่าเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3667 สามารถย่อยมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นสูงได้ โดยมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 38 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการย่อยที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ครึ่งหนึ่งของมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และการศึกษาของ Saelim *et al.*, (2008) พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้น แสดงให้เห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นมันสำปะหลังสูงจะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ย่อยออกมาได้สูงตามไปด้วย เนื่องมาจากโครงสร้างของมันสำปะหลังเกิดจากการเชื่อมต่อกันของโมเลกุลกลูโคสหลายโมเลกุลเข้าเชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกได้เป็นโครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน (Horstmann *et al.*, 2017)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่แตกต่างกันด้วยเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบ ต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

ความเข้มข้น มันสำปะหลัง (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)					
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)					
	0	1	2	3	4	5
ร้อยละ 4	1.09 ± 0.02^d	2.07 ± 0.36^b	23.52 ± 0.36^c	27.19 ± 0.58^c	25.5 ± 0.26^e	22.5 ± 0.63^d
ร้อยละ 6	1.56 ± 0.05^c	2.11 ± 0.05^b	26.99 ± 0.27^b	36.21 ± 0.45^b	36.12 ± 0.48^d	34.79 ± 0.99^c
ร้อยละ 8	1.98 ± 0.02^b	2.14 ± 0.08^{ab}	27.48 ± 1.01^b	42.38 ± 1.14^b	40.52 ± 0.36^c	37.95 ± 0.73^c
ร้อยละ 10	2.18 ± 0.01^a	2.25 ± 0.11^a	29.81 ± 0.47^a	45.95 ± 2.44^b	47.48 ± 1.61^b	44.59 ± 0.52^b
ร้อยละ 20	N.D.	N.D.	N.D.	90.86 ± 1.26^a	89.31 ± 4.69^a	79.17 ± 4.14^a

หมายเหตุ : N.D. คือไม่สามารถเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ได้เนื่องจากมันสำปะหลังมีลักษณะขุ่นหนืด

^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ต่างกันด้วยเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในสถานะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

จากผลการทดลองจะพบว่าในวันที่ 3 ของกระบวนการหมักจะให้ปริมาณเอนไซม์กลูโคสไมเลสและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด จึงนำมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ต่างกันในวันที่ 3 มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส และปริมาณมันสำปะหลังที่เชื้อใช้ไป ผลการทดลองพบว่ามันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 88.85 ± 0.11 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลมอลโตสเล็กน้อย 0.25 ± 0.00 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นอื่นๆ นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้รับรองลงมาเป็นมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 10, 8, 6 และ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 45.45 ± 0.46 , 38.49 ± 0.02 , 32.68 ± 0.05 และ 23.29 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับปริมาณน้ำตาลมอลโตสจะพบได้น้อยมากอยู่ในช่วง $0.08 \pm 0.00 - 0.22 \pm 0.01$ กรัมต่อลิตร สำหรับความเข้มข้นมันสำปะหลังร้อยละ 4 และ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีประสิทธิภาพการใช้น้ำมันสำปะหลังสูงที่สุดโดยมีปริมาณมันสำปะหลังที่ใช้ไปร้อยละ 93.47 ± 0.73 และ 91.73 ± 1.42 ตามลำดับ ขณะที่มันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นร้อยละ 8 และ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีการใช้น้ำมันสำปะหลังรองลงมาเท่ากับร้อยละ 83.95 ± 0.96 และ 82.47 ± 0.32 สำหรับมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 มีการใช้น้ำมันสำปะหลังน้อยที่สุด แสดงดังตารางที่ 4.4 จากการทดลองจะพบว่า *A. rouxii* TISTR 3182 ผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลกลูโคสได้สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wang *et al.* (1984) ได้รายงานเอนไซม์กลูโคสไมเลสบริสุทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อ *A. rouxii* สามารถย่อยมันสำปะหลังได้ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้น

มันสำปะหลังจาก 4.8 ไปเป็น 12.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วยจาก 2.25 สูงขึ้นเป็น 3.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นถ้าหากค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูง จะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยมันสำปะหลังจะสูงตามไปด้วย (Dung *et al.*, 2006)

ตารางที่ 4.4 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส และมันสำปะหลังที่ใช้ไปในกระบวนการหมักที่มีความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นที่ต่างกันด้วยเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 เป็นระยะเวลา 3 วัน

ความเข้มข้นแป้งมัน สำปะหลัง (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัม/ลิตร)	ปริมาณมอลโตส (กรัม/ลิตร)	ปริมาณมันสำปะหลัง ที่ใช้ไป (ร้อยละ)
ร้อยละ 4	23.29±0.02 ^e	0.08±0.00 ^e	93.47±0.73 ^a
ร้อยละ 6	32.68±0.05 ^d	0.16±0.01 ^d	91.73±1.42 ^b
ร้อยละ 8	38.49±0.02 ^c	0.20±0.00 ^c	83.95±0.96 ^c
ร้อยละ 10	45.45±0.46 ^b	0.22±0.01 ^b	82.47±0.32 ^{de}
ร้อยละ 20	88.85±0.11 ^a	0.25±0.00 ^a	81.63±0.15 ^e

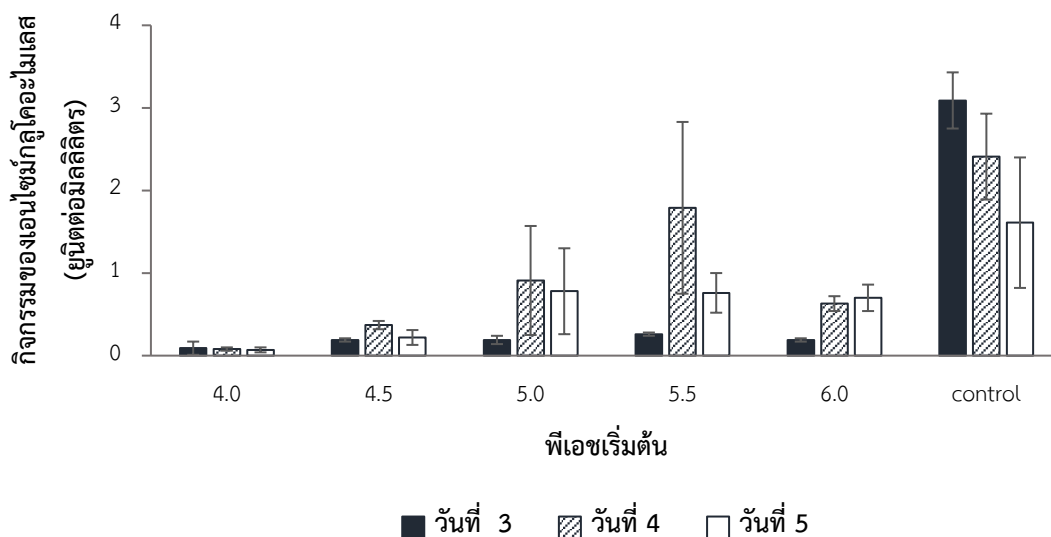
หมายเหตุ : ^{abc}ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.1.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมัก

4.1.3.1 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

จากการศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นของมันสำปะหลัง ซึ่งย่อยด้วยเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ที่มีความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และมีความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของมันสำปะหลังดังนี้ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ด้วย Britten robinson buffer และมีชุดควบคุมที่เป็นมันสำปะหลังที่ไม่ปรับพีเอช (พีเอชเท่ากับ 5.66) จากผลการทดลองที่ได้พบว่าช่วง 1-2 วันแรกของกระบวนการหมัก ไม่สามารถเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ เนื่องจากสารละลายมันสำปะหลังมีลักษณะหนืดข้น เป็นผลมาจากเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 มีการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสออกมาได้น้อย ไม่เพียงพอต่อการย่อยมันสำปะหลังไปเป็นน้ำตาล สามารถเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ในช่วงวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก จากการทดลองพบว่าเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในมันสำปะหลังที่ปรับค่าพีเอชต่างๆ เริ่มผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้เล็กน้อย โดยมันสำปะหลังที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสอยู่ในช่วง 0.09 ± 0.14 ถึง 0.26 ± 0.04 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อเข้าสู่วันที่ 4 ของกระบวนการหมัก พบว่ามันสำปะหลังที่มีพีเอชต่างๆ จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูง

สุด โดยมันสำปะหลังที่พีเอช 5.5 จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด มีค่าเท่ากับ 1.79 ± 1.81 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นมันสำปะหลังที่มีพีเอชเท่ากับ 5.0, 6.0, 4.5 และ 4 ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 0.91 ± 1.81 , 0.63 ± 0.16 , 0.37 ± 0.08 และ 0.08 ± 0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นเมื่อเข้าสู่วันที่ 5 ของกระบวนการหมัก จะพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเริ่มลดลง แสดงดังรูปที่ 4.5 ขณะที่มันสำปะหลังชุดควบคุม มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดตั้งแต่วันที่ 3 ของกระบวนการหมัก มีค่าเท่ากับ 3.09 ± 0.59 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าชุดควบคุมมีกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงกว่าชุดที่ผ่านการปรับพีเอชด้วย Britten robinson buffer อาจมีผลเนื่องมาจากบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ในการปรับพีเอชมีส่วนประกอบของกรดบอริก (H_3BO_3) และกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ซึ่งกรดเหล่านี้มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. rouxii* และทำให้อัตราการผลิตเอนไซม์ของเชื้อลดลง (See Ang *et al.*, 2011) และ Saied *et al.*, (2007) รายงานว่ากรดบอริกร้อยละ 2 (0.47 mol/dm^3) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aspergillus flavus* ได้ถึงร้อยละ 44.4 และกรดฟอสฟอริกจัดว่าเป็นสารยับยั้งเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงเมื่อเทียบกับกรดซอร์บิก กรดโพพรีโอนิก เป็นต้น (Lin and Chen, 1995) หลังจากนั้นปริมาณกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของชุดควบคุมจะเริ่มลดลงในวันที่ 4 และ 5 ของกระบวนการหมัก มีค่าเท่ากับ 2.41 ± 0.9 และ 1.61 ± 1.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการใช้มันสำปะหลังที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 5.50 ถึง 5.66 จะส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูง เนื่องจากเป็นช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hung and Chou (1997) ได้ทำการศึกษาพบว่าเชื้อ *A. rouxii* สามารถเจริญเติบโตและสร้างเส้นใยได้ดีในช่วงพีเอชตั้งแต่ 5.0 ถึง 8.0 และการศึกษาของ Kanlayakrit *et al.*, (1989) รายงานว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *A. rouxii* และ *Aspergillus awamori* มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 3.5 – 5.0 และเอนไซม์จะมีความคงตัวอยู่ในช่วงพีเอช 4.0 -5.0 ที่ช่วงอุณหภูมิ 35 – 60 องศาเซลเซียส (Slivinski *et al.*, 2011) ขณะที่การศึกษาของ Wang *et al.*, (1984) พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบริสุทธิ์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *A. rouxii* มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่พีเอชประมาณ 4.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้อาจมีผลเนื่องมาจากเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ผลิตได้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเอนไซม์ที่เชื้อผลิตออกมาโดยมันสำปะหลังโดยตรง โดยไม่ได้ผ่านการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ มีผลทำให้ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แตกต่างจากงานวิจัยข้างต้น



รูปที่ 4.5 กิจกรรมเอนไซม์กลูโคสไมเลสของเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในการย่อยมันสำปะหลังที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกันในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

4.1.3.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

จากผลการทดลองที่ได้พบว่า เชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ย่อยมันสำปะหลังที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคสไมเลสออกมาย่อยมันสำปะหลังและมีการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ขึ้นในวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก โดยอาหารหมักที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 4.17 ± 0.29 , 6.51 ± 2.82 , 6.84 ± 1.41 , 15.72 ± 3.69 และ 10.28 ± 0.57 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ยังคงผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็วในวันที่ 4 ของกระบวนการหมัก ซึ่งมันสำปะหลังที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0, 5.5 และ 6.0 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 32.79 ± 8.36 , 37.83 ± 4.98 และ 34.48 ± 2.03 กรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้รองลงมาได้จากมันสำปะหลังที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และ 4.0 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 14.70 ± 1.38 และ 4.04 ± 0.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 ของกระบวนการหมัก โดยมันสำปะหลังที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดเท่ากับ 52.26 ± 1.49 กรัมต่อลิตร รองลงมาเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากมันสำปะหลังที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0, 5.0 และ 4.5 ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 48.14 ± 1.92 , 45.30 ± 4.13 และ 38.36 ± 3.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับอาหารหมักที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลง อาจเนื่องมาจากที่พีเอชที่ต่ำกว่า 4.0 จะยับยั้งการเจริญเติบโตของ *A. rouxii* ส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำที่สุด (Watanabe and Oda, 2008) แสดงดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.6 ขณะที่มันสำปะหลังชุดควบคุม มี

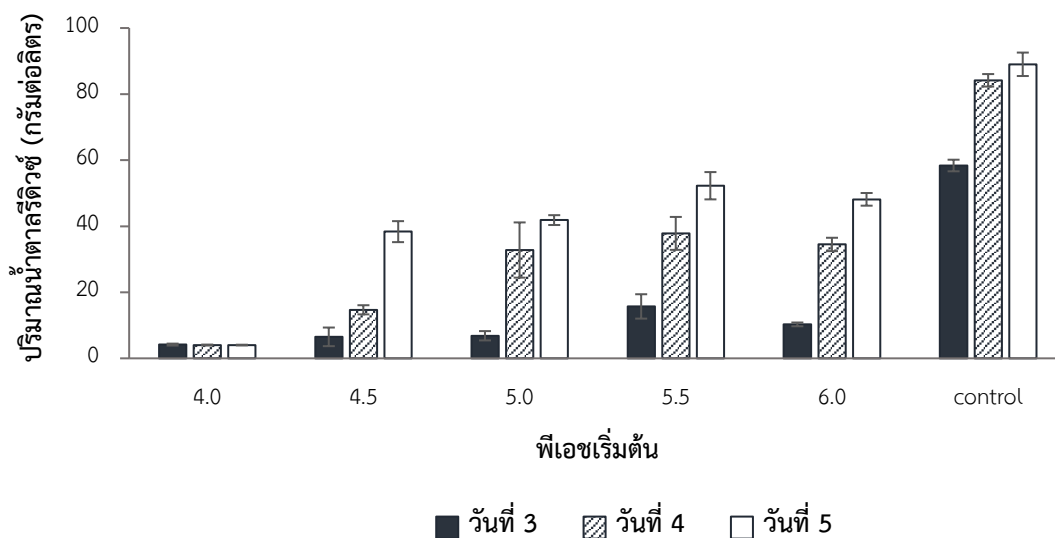
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงตั้งแต่วันที่ 3 ของกระบวนการหมัก มีค่าเท่ากับ 58.38 ± 1.76 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 5 ของกระบวนการหมัก พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 89.02 ± 3.55 กรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่าชุดควบคุมให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าชุดที่ผ่านการปรับพีเอชด้วย Britten robinson buffer ซึ่งมีความสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้วิเคราะห์ก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่าถ้ามีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงก็จะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงตามไปด้วย

จากการทดลองพบว่ามันสำปะหลังที่ปรับค่าพีเอชแตกต่างกันมีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดในวันที่ 4 และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 4 เช่นเดียวกัน สำหรับอาหารหมักชุดควบคุมจะให้ผลการทดลองไปในแนวทางเดียวกับมันสำปะหลังที่ปรับพีเอชต่างๆ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจะใช้ระยะเวลา 4 วัน เพื่อเป็นการลดระยะเวลาการหมักให้สั้นลง จากนั้นนำมันสำปะหลังที่มีพีเอชเริ่มต้นที่ต่างกันย่อยด้วย *A. rouxii* TISTR 3182 เป็นเวลา 4 วัน นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตสด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และวิเคราะห์ปริมาณมันสำปะหลังที่เชื้อใช้ไปพบว่ามันสำปะหลังที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงที่สุดเท่ากับ 49.03 ± 0.04 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลมอลโตสเพียงเล็กน้อยเท่ากับ 0.47 ± 0.00 กรัมต่อลิตร รองลงมาเป็นอาหารหมักที่มีพีเอช 5.0, 6.0, 4.5 และ 4.0 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 46.82 ± 0.04 , 43.08 ± 0.13 , 21.03 ± 0.87 และ 4.3 ± 0.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับปริมาณน้ำมอลโตสจะพบได้น้อยมากอยู่ในช่วง $0.26 \pm 0.01 - 0.87 \pm 0.00$ กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.6 ในขณะที่ประสิทธิภาพในการใช้มันสำปะหลังของอาหารหมักที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0, 5.5 และ 6.0 มีอัตราการใช้แป้งเท่ากับร้อยละ 67.59 ± 4.67 , 67.88 ± 1.04 และ 71.23 ± 3.18 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) มันสำปะหลังที่ผ่านการปรับพีเอชต่างๆ จะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส และอัตราการใช้แป้งต่ำกว่ามันสำปะหลังชุดควบคุมที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 91.58 ± 0.30 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลมอลโตสเท่ากับ 2.28 ± 0.04 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยมันสำปะหลังโดยมีอัตราการใช้มันสำปะหลังอยู่ที่ร้อยละ 95.33 ± 1.03 ดังนั้น *A. rouxii* TISTR 3182 ผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลกลูโคสได้สูงขึ้นเมื่ออาหารหมักไม่ผ่านกระบวนการปรับพีเอชด้วย Britten robinson buffer

ตารางที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีค่าพีเอชที่แตกต่างกันด้วยเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

พีเอชเริ่มต้นของอาหารหมัก	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)		
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)		
	3	4	5
ชุดควบคุม (พีเอช 5.66)	58.38±1.76 ^a	84.17± 1.89 ^a	89.02 ±3.55 ^a
พีเอช 4.0	4.17±0.29 ^d	4.04±0.10 ^d	4.03 ±0.10 ^e
พีเอช 4.5	6.51±2.82 ^{cd}	14.70±1.38 ^c	38.36 ±3.18 ^d
พีเอช 5.0	6.84±1.41 ^{cd}	32.79 ±8.36 ^b	45.30 ±4.13 ^c
พีเอช 5.5	15.72 ±3.69 ^b	37.83 ±4.98 ^b	52.26 ±1.49 ^b
พีเอช 6.0	10.28±0.57 ^c	34.48 ±2.03 ^b	48.14 ±1.92 ^{bc}

หมายเหตุ : abc ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีค่าพีเอชที่แตกต่างกันด้วยเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

ตารางที่ 4.6 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส และแป้งที่ใช้ไปในกระบวนการหมักที่มีค่าพีเอช เริ่มต้นที่แตกต่างกันด้วยเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในวันที่ 4 ของกระบวนการหมัก

ค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำสำหรับล้าง	ปริมาณกลูโคส (กรัม/ลิตร)	ปริมาณมอลโตส (กรัม/ลิตร)	ปริมาณน้ำสำหรับล้าง ที่ใช้ไป(ร้อยละ)
ชุดควบคุม (พีเอช 5.66)	91.58±0.30 ^a	2.28±0.04 ^a	95.33±1.03 ^a
พีเอช 4.0	4.30±0.15 ^f	0.26±0.01 ^e	N.D.
พีเอช 4.5	21.03±0.87 ^e	0.87±0.00 ^b	N.D.
พีเอช 5.0	46.82±0.04 ^c	0.49±0.00 ^c	67.59±4.67 ^b
พีเอช 5.5	49.03±0.04 ^b	0.47±0.00 ^c	67.88±1.04 ^b
พีเอช 6.0	43.08±0.13 ^d	0.40±0.02 ^d	71.23±3.18 ^b

หมายเหตุ : N.D. คือไม่สามารถเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ได้เนื่องจากแป้งมีลักษณะข้นเหนียว

^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.1.3.3 ค่าพีเอช

จากการย่อยแป้งสำหรับล้างความเข้มข้นร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ย่อยด้วยเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ผลการทดลองที่ได้พบว่า น้ำสำหรับล้างของชุดควบคุมมีค่าพีเอชลดลงอย่างต่อเนื่อง จากค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.66 ± 0.00 ลดลงเป็นพีเอช 4.52 ± 0.00 ในวันที่ 5 ของกระบวนการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของชัยวัฒน์ (2520) ศึกษาการหมักข้าวหมากด้วยเชื้อ *Amylomyces* spp. จะทำให้ข้าวหมากมีรสชาติเปรี้ยวขึ้น และมีปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.35 เป็นร้อยละ 0.95 ในวันที่ 7 ของกระบวนการหมัก และการศึกษาของ Bechman *et al.*, (2012) ได้รายงานค่าพีเอชของข้าวหมากที่หมักด้วยเชื้อ *Aspergillus oryzae* มีพีเอชลดลงจากพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.37 ลดลงจนเหลือพีเอช 5.14 ในชั่วโมงที่ 118 ของกระบวนการหมัก โดยค่าพีเอชที่ลดลงนี้มีสาเหตุเนื่องมาจากเชื้อ *Amylomyces rouxii* สามารถผลิตกรดอินทรีย์จำพวกกรดแลกติก กรดฟูมาลิก และกรดมาลิก เป็นต้น (Kito *et al.*, 2009) น้ำสำหรับล้างที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นต่างๆ ภายหลังการหมักมีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเล็กน้อย แสดงดังตารางที่ 4.7 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า Britten robinson buffer มีประสิทธิภาพในการควบคุมค่าพีเอชของอาหารหมักให้มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยหรือคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก Voet and Voet (2004) รายงานว่าประสิทธิภาพในการควบคุมพีเอชของบัฟเฟอร์ชนิดนี้จะอยู่ในช่วงพีเอช 2.6 ถึง 12.0

ตารางที่ 4.7 ค่าพีเอชระหว่างกระบวนการย่อยมันสำปะหลังด้วยเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน

ค่าพีเอชเริ่มต้นของแป้งสำปะหลัง	ค่าพีเอช		
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)		
	3	4	5
ชุดควบคุม (พีเอช 5.66)	5.12±0.01 ^a	4.97±0.01 ^b	4.52±0.00 ^c
พีเอช 4.0	4.41±0.01 ^b	4.41±0.01 ^b	4.57±0.01 ^a
พีเอช 4.5	4.79±0.01 ^c	4.89±0.00 ^b	4.95±0.01 ^a
พีเอช 5.0	5.13±0.01 ^c	5.22±0.02 ^b	5.34±0.01 ^a
พีเอช 5.5	5.48±0.01 ^c	5.51±0.00 ^b	5.55±0.01 ^a
พีเอช 6.0	5.73±0.01 ^b	5.77±0.01 ^a	5.69±0.01 ^c

หมายเหตุ : ^{abc}ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสำปะหลังของเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 โดยใช้เซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088

4.2.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นแคลเซียมอัลจินเตของเซลล์ตรึงรูป *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในกระบวนการหมักเอทานอลจากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย

4.2.1.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล และค่าพีเอช

จากการศึกษาความเข้มข้นแคลเซียมอัลจินเตในการตรึงเซลล์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เพื่อผลิตเอทานอล โดยแปรผันความเข้มข้นแคลเซียมอัลจินเตดังนี้ ร้อยละ 2, 3 และ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับการใช้เซลล์อิสระ (ชุดควบคุม) จากอาหารหมักมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยในสภาวะที่เหมาะสม โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 65.24 ± 1.44 ถึง 65.88 ± 11.58 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองที่ได้พบว่าความเข้มข้นแคลเซียมอัลจินเตร้อยละ 2, 3, 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และชุดควบคุม มีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันแรกของการกระบวนการหมัก และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) การใช้ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจินเตร้อยละ 2, 3 และ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 4.13 ± 0.18 , 4.05 ± 0.14 และ 3.97 ± 0.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับชุดควบคุมมีน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 5.52 ± 0.09 กรัมต่อลิตร โดยที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของทุกชุดการทดลองลดลงพร้อมกับผลิตเอทานอลเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันแรกของการกระบวนการหมัก โดยความเข้มข้นแคลเซียม

อัลจินตร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 36.19 ± 0.09 กรัมต่อลิตร รองลงมาเป็นความเข้มข้นแคลเซียมอัลจินตร้อยละ 3 และ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีปริมาณเอทานอลเท่ากับ 36.44 ± 1.65 และ 35.76 ± 1.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) สำหรับชุดควบคุมมีปริมาณเอทานอลเท่ากับ 34.25 ± 0.29 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นการใช้แคลเซียมอัลจินต์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ $3.90 \pm 0.04 - 3.65 \pm 0.03$ กรัมต่อลิตร และมีปริมาณเอทานอลเท่ากับ $37.29 \pm 0.51 - 34.16 \pm 1.07$ กรัมต่อลิตร สำหรับการใช้แคลเซียมอัลจินต์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ $4.02 \pm 0.10 - 3.74 \pm 0.19$ กรัมต่อลิตร และมีปริมาณเอทานอลเท่ากับ $40.89 \pm 3.75 - 36.52 \pm 3.26$ กรัมต่อลิตร และการใช้แคลเซียมอัลจินต์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ $3.79 \pm 0.14 - 3.48 \pm 0.05$ กรัมต่อลิตร และมีปริมาณเอทานอลเท่ากับ $38.69 \pm 4.99 - 37.43 \pm 6.25$ กรัมต่อลิตร สำหรับชุดควบคุม มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ $5.55 \pm 0.09 - 4.92 \pm 0.13$ กรัมต่อลิตร และมีปริมาณเอทานอลเท่ากับ $39.65 \pm 1.76 - 35.99 \pm 3.18$ กรัมต่อลิตร จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก จากการทดลองพบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 มีความสามารถในการเจริญเติบโตโดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์และผลิตเอทานอลออกมาได้อย่างรวดเร็วไม่แตกต่างกันทั้งการใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปหมักภายในเวลา 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับเชื้อ *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* ที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ได้หมดภายในเวลา 38 ชั่วโมง (Nikolic *et al.*, 2010) แต่เซลล์ตรึงรูปจะมีประโยชน์ในแง่ของการนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำ ทำให้เป็นการลดต้นทุนของกระบวนการหมัก (Duarte *et al.*, 2013) หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและคงที่จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลที่ลดลง แสดงดังตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.7 จากการทดลองพบว่าการใช้เซลล์ตรึงรูปและเซลล์อิสระของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 จะให้ปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Swain *et al.*, (2007) รายงานว่าการผลิตเอทานอลของเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของเชื้อ *S. cerevisiae* จะให้ปริมาณเอทานอลใกล้เคียงกันมีค่าเท่ากับ 193 ± 8 และ 206 ± 10 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และการศึกษาของ Behera *et al.*, (2010) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* ด้วยแคลเซียมอัลจินต์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับการใช้เซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ตรึงรูปจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าเซลล์อิสระเพียงเล็กน้อย ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกับการศึกษาของ Roukas (1994) และ Singh *et al.*, (1998) นอกจากนี้ Najapfour *et al.*, (2004) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นแคลเซียมอัลจินตร้อยละ 1.5, 2, 3 และ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลของเซลล์ตรึงรูป พบว่าเซลล์ตรึงรูปที่ใช้แคลเซียมอัลจินตร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น และการศึกษาของ Lee *et al.*, (2011) พบว่าการใช้ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจินตร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการใช้ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจินตร้อยละ 2.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เนื่องจากที่การใช้แคลเซียม

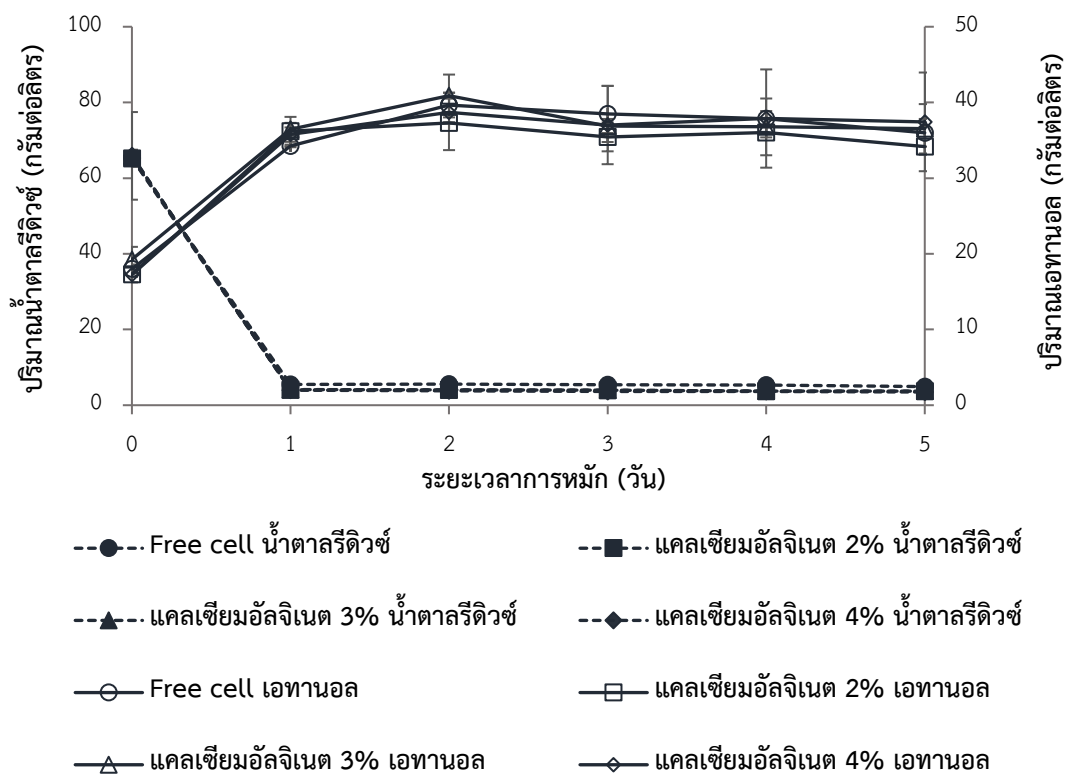
อัลจินตความเข้มข้นสูงจะทำให้พื้นผิวของเม็ดเจลมีความแข็งแรงและหนาแน่นส่งผลต่อการซึมผ่านของกลูโคสเข้าสู่รูพรุนเป็นไปได้ยากมากขึ้น ในขณะที่การศึกษาของ Thanaporn *et al.*, (2018) พบว่าการใช้แคลเซียมอัลจินตสูงจะส่งผลให้มีปริมาณผลผลิตสูงตามไปด้วย โดยที่ใช้แคลเซียมอัลจินตความเข้มข้นร้อยละ 4 - 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้ปริมาณผลผลิตเอทานอลสูงกว่าการใช้ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจินตร้อยละ 1 - 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เนื่องจากที่แคลเซียมอัลจินตร้อยละ 1-3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เม็ดเจลมีลักษณะอ่อนนุ่ม ซึ่งอาจจะถูกทำลายจากสภาวะในการหมัก จึงทำให้มีอัตราการผลิตเอทานอลลดลง

สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างกระบวนการหมัก ผลการทดลองที่ได้พบว่า ในวันแรกของกระบวนการหมักความเข้มข้นแคลเซียมอัลจินตร้อยละ 2, 3 และ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะมีค่าพีเอชลดลงจากเริ่มต้นเท่ากับ 4.14 ± 0.01 , 4.07 ± 0.00 และ 4.09 ± 0.01 ตามลำดับ จากนั้นค่าพีเอชจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 2 จนกระทั่งวันสุดท้ายของกระบวนการหมัก มีค่าพีเอชเท่ากับ 5.35 ± 0.02 , 4.58 ± 0.02 และ 4.58 ± 0.02 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมจะมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อยในวันแรกของกระบวนการหมัก มีค่าเท่ากับ 4.44 ± 0.03 จากนั้นค่าพีเอชก็จะคงที่ตลอดในช่วงวันที่ 2-3 และจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย วันสุดท้ายของกระบวนการหมักมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.58 ± 0.03 แสดงดังตารางที่ 4.8 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Naulchan *et al.*, (2010) รายงานว่าพีเอชของกระบวนการหมักเอทานอลด้วย *S. cerevisiae* มีค่าพีเอชลดลงจากค่าพีเอชเริ่มต้น และ Clementz. *et al*, (2015) รายงานว่าเมื่อหมักเอทานอลจากส่วนเหลือทิ้งของแครอทด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไปพีเอชจะลดลง 1.50 – 2.00 หน่วย

ตารางที่ 4.8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอลและค่าพีเอชที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังโดยใช้ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตที่แตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

ระยะเวลา การหมัก (วัน)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)				ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)				ค่าพีเอช			
	ชุดควบคุม (เซลล์อิสระ)	แคลเซียมอัลจิเนต (ร้อยละ)			ชุดควบคุม (เซลล์อิสระ)	แคลเซียมอัลจิเนต (ร้อยละ)			ชุดควบคุม (เซลล์อิสระ)	แคลเซียมอัลจิเนต (ร้อยละ)		
		2	3	4		2	3	4		2	3	4
0	65.26±3.91 ^a	65.24±1.44 ^a	65.86±1.46 ^a	65.88±11.58 ^a	18.00±1.02 ^a	17.31±0.36 ^a	19.26±1.66 ^a	17.24±1.01 ^a	4.53±0.00 ^b	5.18±0.01 ^a	5.13±0.08 ^a	5.01±0.17 ^a
1	5.52±0.09 ^a	4.13±0.18 ^b	4.05±0.14 ^b	3.97±0.29 ^b	34.25±0.29 ^b	36.19±0.09 ^a	36.44±1.65 ^{ab}	35.76±1.54 ^{ab}	4.44±0.03 ^a	4.14±0.01 ^b	4.07±0.00 ^c	4.09±0.01 ^c
2	5.55±0.09 ^a	3.90±0.04 ^b	4.02±0.10 ^b	3.79±0.14 ^b	39.65±1.76 ^a	37.29±0.51 ^a	40.89±3.75 ^a	38.69±4.99 ^a	4.40±0.01 ^a	4.35±0.01 ^b	4.15±0.01 ^c	4.09±0.01 ^d
3	5.44±0.16 ^a	3.80±0.01 ^b	3.96±3.96 ^b	3.67±0.15 ^b	38.47±2.82 ^a	35.45±1.91 ^a	36.89±0.93 ^a	37.02±5.18 ^a	4.40±0.01 ^c	4.71±0.01 ^a	4.48±0.01 ^b	4.33±0.00 ^d
4	5.32±0.25 ^a	3.75±0.06 ^b	3.73±0.04 ^b	3.59±0.11 ^b	37.85±6.42 ^a	36.04±0.66 ^a	36.77±0.39 ^a	37.87±6.49 ^a	4.42±0.03 ^d	5.11±0.01 ^a	4.86±0.01 ^b	4.68±0.01 ^c
5	4.92±0.13 ^a	3.65±0.03 ^b	3.74±0.19 ^b	3.48±0.05 ^b	35.99±3.18 ^a	34.16±1.07 ^a	36.52±3.26 ^a	37.43±6.25 ^a	4.58±0.03 ^c	5.35±0.02 ^a	4.58±0.02 ^b	4.58±0.02 ^c

หมายเหตุ : ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



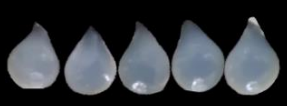
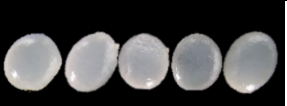

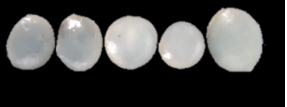

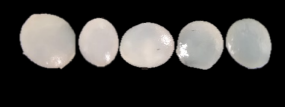
รูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไปและปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยใช้ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตที่แตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

4.2.1.2 ผลการศึกษาขนาดและลักษณะเซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตที่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าขนาดเม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูปก่อนกระบวนการหมักของแคลเซียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีขนาดไม่แตกต่างกันคือ 4.50 ± 0.35 และ 4.40 ± 0.22 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเม็ดเจลมีลักษณะค่อนข้างกลมแต่มีหางเกิดขึ้นเล็กน้อย สีขาวขุ่น สำหรับที่ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เม็ดเจลมีขนาดเล็กกว่าความเข้มข้นอื่น มีค่าเท่ากับ 3.80 ± 0.45 มิลลิเมตร และเม็ดเจลมีลักษณะเป็นหยดน้ำ มีหางค่อนข้างยาว สีขาวใส หลังจากนำเม็ดเจลไปหมักเป็นระยะเวลา 5 วัน เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย พบว่าวันสุดท้ายของกระบวนการหมักเม็ดเจลมีขนาดเล็กลง โดยที่ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตร้อยละ 2, 3 และ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีขนาดเท่ากับ 2.90 ± 0.22 , 3.04 ± 0.43 และ 3.20 ± 0.45 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าเม็ดเจลมีลักษณะอ่อนนุ่ม เมื่ออยู่ในมันสำปะหลังที่มีความหนืดและมีแรงเฉือนจากการเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ส่งผลให้บริเวณหางของเม็ดเจลหลุดและพื้นผิวหลุดออกไป

บางส่วน แสดงดังตารางที่ 4.9 ซึ่งเหตุผลที่น่าจะทำให้กระบวนการผลิตเอทานอลของเซลล์ตรึงรูปมีปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างจากการใช้เซลล์อิสระ เนื่องมาจากเชื้อบริเวณทางและพื้นผิวของเม็ดเจลอาจจะหลุดออกมาได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Najafpour *et al.*, (2004) รายงานว่าการใช้ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตต่ำเกินไป จะทำให้เม็ดเจลมีลักษณะอ่อนนุ่ม แตกหักได้ง่าย ส่วนการใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้เม็ดเจลแข็ง จะส่งผลต่อการผ่านเข้าออกของสารอาหารไปสู่ภายในเซลล์ เป็นไปได้ยากมากขึ้น นอกจากนี้ถ้าใช้ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตต่ำกว่าร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะส่งผลให้มีการเจริญเติบโตของเชื้อภายในเม็ดเจลสูง ทำให้เม็ดเจลเกิดการขยายตัวได้ ส่วนความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตในช่วงร้อยละ 2-5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นช่วงที่เม็ดเจลคงตัวไม่ค่อยมีความเสียหายในระหว่างกระบวนการหมัก แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตมากกว่าร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะส่งผลให้กิจกรรมของเชื้อลดลง (Gilson and Thomas, 1995)

ตารางที่ 4.9 ขนาดและลักษณะเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ก่อนกระบวนการหมักและหลังกระบวนการหมักเอทานอล

ความเข้มข้น แคลเซียมอัลจิเนต (น้ำหนักต่อ ปริมาตร)	เม็ดแคลเซียมอัลจิเนต ก่อนการหมัก	ขนาด (มิลลิเมตร)	เม็ดแคลเซียมอัลจิเนต หลังกระบวนการหมัก	ขนาด (มิลลิเมตร)
ร้อยละ 2		3.80 ± 0.45^b		2.90 ± 0.22^a
ร้อยละ 3		4.50 ± 0.35^a		3.04 ± 0.43^a
ร้อยละ 4		4.40 ± 0.22^a		3.20 ± 0.45^a

หมายเหตุ : ^{abc}ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.2.2 ผลการศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ตรึงรูป *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในกระบวนการหมักเอทานอลจากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย

4.2.2.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล และค่าพีเอช

จากการศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลเซียมอัลจิเนตในการตรึงเซลล์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เพื่อผลิตเอทานอลโดยแปรผันขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลเซียมอัลจิเนต ดังนี้ น้อยกว่า 2.00, 2.00 - 2.36, มากกว่า 3.35 มิลลิเมตร และการใช้เซลล์อิสระ (ชุดควบคุม) จากอาหารหมักมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยในสภาวะที่เหมาะสม โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ

66.45 ± 2.87 – 67.12 ± 4.83 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองที่ได้พบว่าเซลล์รีจรูปร่างขนาดของเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตและชุดควบคุมมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันแรกของกระบวนการหมัก ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) สำหรับแคลเซียมอัลจิเนตที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2.00, 2.00 - 2.36 และมากกว่า 3.35 มิลลิเมตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 10.62 ± 2.37 , 9.09 ± 4.17 และ 7.34 ± 2.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับชุดควบคุมมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 6.04 ± 0.58 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของทุกชุดการทดลองลดลงพร้อมกับผลิตเอทานอลเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันแรกของกระบวนการหมัก โดยแคลเซียมอัลจิเนตที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3.35 มิลลิเมตร มีปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 32.77 ± 3.12 กรัมต่อลิตร แคลเซียมอัลจิเนตที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2.00 และ 2.00 - 2.36 มิลลิเมตร มีปริมาณเอทานอลเท่ากับ 30.45 ± 0.45 และ 30.22 ± 4.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) สำหรับชุดควบคุมมีปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 40.39 ± 1.19 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การหมักด้วยเซลล์อิสระให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการหมักด้วยเซลล์รีจรูปร่าง เมื่อเข้าสู่วันที่ 2 - 5 ของกระบวนการหมัก พบว่าแคลเซียมอัลจิเนตที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3.35 มีปริมาณเอทานอล 28.32 ± 2.44 – 27.76 ± 0.83 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 5.57 ± 0.51 – 4.48 ± 0.46 กรัมต่อลิตร สำหรับแคลเซียมอัลจิเนตที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.00 - 2.36 จะมีปริมาณเอทานอล 26.58 ± 2.69 – 23.78 ± 0.07 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 5.10 ± 0.15 – 3.99 ± 0.18 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมอัลจิเนตที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2.00 มีปริมาณเอทานอล 29.02 ± 2.09 – 24.33 ± 0.93 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 4.54 ± 0.28 – 3.73 ± 0.11 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและคงที่จนสิ้นสุดกระบวนการหมักสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อยและคงที่จนสิ้นสุดกระบวนการหมักเช่นกัน แสดงดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.8 จากการทดลองจะพบว่าแคลเซียมอัลจิเนตที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดต่างๆไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอล น่าจะมีผลเนื่องมาจากเมื่อระยะเวลาผ่านไปเม็ดเจลถูกความหนืดของมันเป็นสำปะหลังและแรงเฉือนทำให้มีขนาดเล็กลงจนมีขนาดไม่แตกต่างกันมากนัก Gilson and Thomas (1995) รายงานว่าเมื่อเพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดเจล มากกว่า 2 มิลลิเมตร จะส่งผลให้อัตราการใช้น้ำตาลลดลง เนื่องจากเม็ดเจลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่จะมีพื้นที่ผิวหน้าสำหรับการผ่านเข้าออกของสารเมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดเจลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็ก (Idris and Suzana, 2006) และ Goksungur and Guvenc (1999) พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดเจลในช่วง 1.30 - 1.70 และ 2.00 – 2.40 มิลลิเมตร ให้ค่าผลผลิตสูงกว่าการใช้เม็ดเจลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2.80 – 3.20 มิลลิเมตร นอกจากนี้ Abdel-Naby *et al.*, (1992) รายงานว่าเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดเจลขนาด 2.00 มิลลิเมตร จะเป็นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เหมาะสมและให้ผลผลิตสูงเมื่อเทียบกับเม็ดเจลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากขึ้น เนื่องจากเม็ดเจลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กจะมีพื้นที่ผิวมากเพียงพอต่อการผ่านเข้าออก

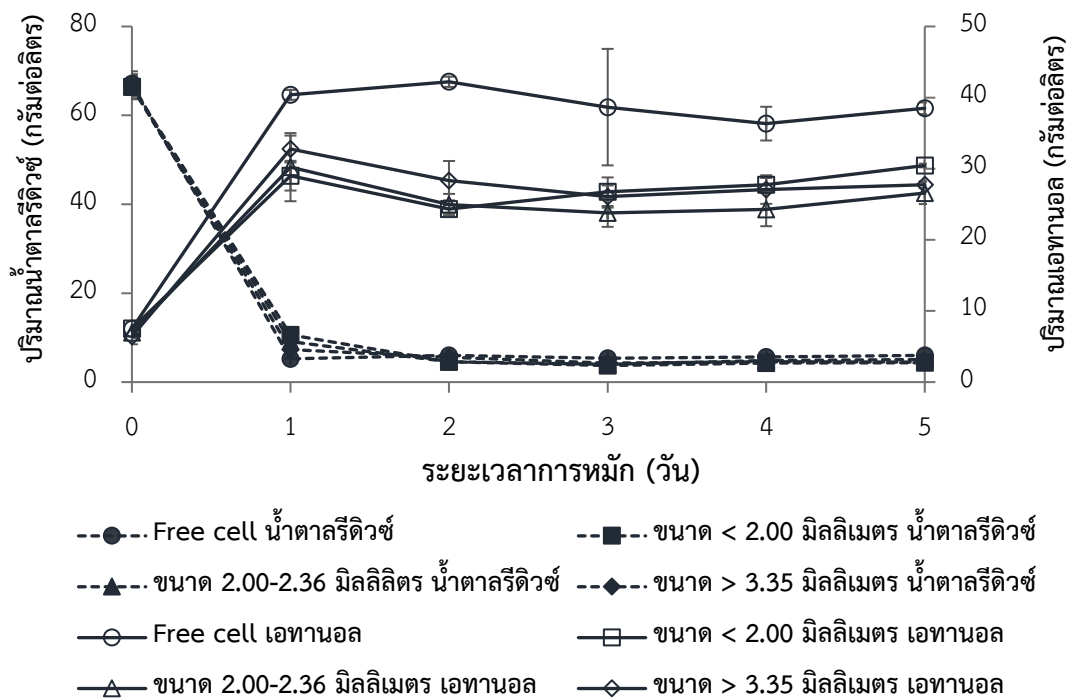
ของสับสเตรทจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ที่ถูกตรึงอยู่ภายใน (Margaritis and Kilonzo, 2005) ดังนั้น การเพิ่มพื้นที่ผิวจะเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการถ่ายโอนสับสเตรทเข้าสู่ภายในมากขึ้น ทำให้ผลผลิตสูงตามไปด้วย (Ahmed, 2008)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างกระบวนการหมัก ผลการทดลองที่ได้ พบว่า ในวันแรกของกระบวนการหมักขนาดเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตที่น้อยกว่า 2.00, 2.00 - 2.36 และ มากกว่า 3.35 มิลลิเมตร จะมีค่าพีเอชลดลงจากเริ่มต้นเท่ากับ 4.24 ± 0.01 , 4.43 ± 0.01 และ 4.27 ± 0.01 ตามลำดับ จากนั้นค่าพีเอชจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 3 จนถึงสุดท้ายของ กระบวนการหมัก มีค่าพีเอชเท่ากับ 5.29 ± 0.01 , 5.57 ± 0.01 และ 5.60 ± 0.01 ตามลำดับ ในขณะที่จุดควบคุมจะมีค่าลดลงในวันแรกของกระบวนการหมัก มีค่าเท่ากับ 4.39 ± 0.01 จากนั้นค่าพีเอชก็จะค่อยๆเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจนถึงสุดท้ายของกระบวนการหมัก มีค่าพีเอชเท่ากับ 4.61 ± 0.01 แสดงดังตารางที่ 4.10 พีเอชที่ลดลงมีผลมาจากเชื้อ *S. cerevisiae* สร้างคาร์บอนไดออกไซด์ และเมื่อ คาร์บอนไดออกไซด์ละลายอยู่ในอาหารจะทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนประจุกลายเป็นกรดคาร์บอนิก จากนั้นจะกลายเป็นไอออนคาร์บอเนตและโปรตอนจึงทำให้พีเอชมีค่าคงที่หรือเพิ่มขึ้น (Shen *et al.*, 2004)

ตารางที่ 4.10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังโดยใช้ขนาดเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตที่แตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

ระยะเวลา การหมัก (วัน)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)				ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)				ค่าพีเอช			
	ชุดควบคุม (เซลล์อิสระ)	ขนาดเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต (มิลลิเมตร)			ชุดควบคุม (เซลล์อิสระ)	ขนาดเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต (มิลลิเมตร)			ชุดควบคุม (เซลล์อิสระ)	ขนาดเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต (มิลลิเมตร)		
		<2.00	2.00-2.36	>3.35		<2.00	2.00-2.36	>3.35		<2.00	2.00-2.36	>3.35
0	67.12±4.83 ^a	66.45±2.87 ^a	66.78±0.71 ^a	66.69±2.09 ^a	7.51±0.12 ^a	7.25±0.50 ^a	6.97±2.86 ^a	6.42±0.38 ^a	5.47±0.01 ^a	5.46±0.01 ^a	5.42±0.06 ^a	5.42±0.06 ^a
1	6.04±0.58 ^a	10.62±2.37 ^a	9.09±4.17 ^a	7.34±2.97 ^a	40.39±1.19 ^a	30.45±0.45 ^b	30.22±4.79 ^b	32.77±3.12 ^b	4.39±0.01 ^b	4.24±0.01 ^d	4.43±0.01 ^a	4.27±0.01 ^c
2	6.00±0.46 ^a	4.54±0.28 ^c	5.10±0.15 ^{bc}	5.57±0.51 ^{ab}	42.22±1.25 ^a	29.02±2.09 ^b	26.58±2.69 ^b	28.32±2.44 ^b	4.36±0.01 ^a	4.22±0.01 ^d	4.28±0.01 ^c	4.34±0.01 ^b
3	5.40±0.15 ^a	4.39±0.26 ^{bc}	4.56±0.26 ^b	4.27±0.36 ^c	38.66±14.19 ^a	26.77±3.48 ^a	24.26±8.29 ^a	26.09±2.70 ^a	4.45±0.01 ^c	4.66±0.00 ^a	4.59±0.01 ^b	4.66±0.01 ^a
4	5.67±0.27 ^a	4.31±0.44 ^b	4.84±0.29 ^b	4.60±0.36 ^b	38.50±1.42 ^a	27.73±1.69 ^b	24.97±3.28 ^b	27.07±3.48 ^b	4.44±0.01 ^d	4.91±0.01 ^c	5.14±0.00 ^a	5.09±0.01 ^b
5	5.24±0.06 ^a	3.73±0.11 ^c	3.99±0.18 ^c	4.48±0.46 ^b	36.34±4.11 ^a	24.33±0.93 ^b	23.78±0.07 ^b	27.76±0.83 ^b	4.61±0.01 ^d	5.29±0.01 ^c	5.57±0.01 ^b	5.60±0.01 ^a

หมายเหตุ : ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)




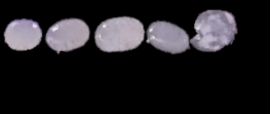
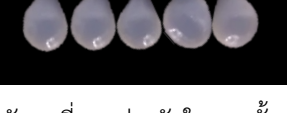
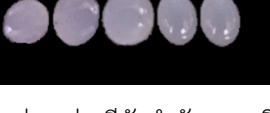


รูปที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไปและปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตร้อยละ 2 ที่ขนาดเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตแตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

4.2.2.2 ผลการศึกษาขนาดและลักษณะเซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตที่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าขนาดเม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูปก่อนกระบวนการหมักของเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2.00, 2.36-2.80 และมากกว่า 3.35 มิลลิเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง $1.92 \pm 0.26 - 4.20 \pm 0.45$ มิลลิเมตร และเม็ดเจลมีลักษณะคล้ายหยดน้ำ สีขาวขุ่น หลังจากนำเม็ดเจลไปหมักเป็นระยะเวลา 5 วัน เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย พบว่าวันสุดท้ายของการหมักเม็ดเจลทุกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาดเล็กลง โดยที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่น้อยกว่า 2.00, 2.00 - 2.36 และมากกว่า 3.35 มิลลิเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 1.80 ± 0.57 , 1.90 ± 0.55 และ 2.70 ± 0.67 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าเม็ดเจลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3.35 มิลลิเมตร จะมีการเปลี่ยนแปลงขนาดหลังจากหมักเป็นระยะเวลา 5 วัน มากกว่าเม็ดเจลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก เนื่องจากเม็ดเจลที่มีขนาดเล็กจะได้รับแรงเฉือนต่ำกว่าเม็ดเจลขนาดใหญ่ แสดงดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ขนาดและลักษณะเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางแตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ก่อนกระบวนการหมักและหลังกระบวนการหมัก

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	เม็ดแคลเซียมอัลจิเนต ก่อนกระบวนการหมัก	ขนาด (มิลลิเมตร)	เม็ดแคลเซียมอัลจิเนต หลังกระบวนการหมัก	ขนาด (มิลลิเมตร)
น้อยกว่า 2.00		1.92 ± 0.26^b		1.80 ± 0.57^b
2.00 - 2.36		2.10 ± 0.22^b		1.90 ± 0.55^{ab}
มากกว่า 3.35		4.20 ± 0.45^a		2.70 ± 0.67^a

หมายเหตุ : ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพเซลล์ตรึงรูปของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักซ้ำ (Repeated batch process)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในกระบวนการย่อยมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลและเซลล์ตรึงรูป *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในกระบวนการหมักเอทานอล เปรียบเทียบกับการใช้เซลล์อิสระ (ชุดควบคุม) ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้างต้นสามารถแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการ ได้แก่ กระบวนการย่อยมันสำปะหลังเป็นน้ำตาล โดยการใช้ความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นของเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 เท่ากับ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นมันสำปะหลังเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไม่มีการปรับพีเอชของมันสำปะหลังเริ่มต้น (พีเอชเท่ากับ 5.66) และกระบวนการหมักเอทานอล โดยใช้เซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ใช้ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดเจลมากกว่า 3.35 มิลลิเมตร ผลการทดลองที่ได้พบว่า มันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วย *A. rouxii* TISTR 3182 ในสภาวะที่เหมาะสม มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 87.69 ± 1.16 กรัมต่อลิตร หลังจากเติมเซลล์ตรึงรูป *S. cerevisiae* TISTR 5088 และเซลล์อิสระพบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่แรกของการหมัก เซลล์ตรึงรูป *S. cerevisiae* TISTR 5088 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 6.07 ± 1.22 กรัมต่อลิตร ชุดควบคุมมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 6.89 ± 1.29 กรัมต่อลิตร โดยที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของทั้งสองชุดการทดลองลดลงพร้อมกับผลิตเอทานอลเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่แรกของการหมัก โดยเซลล์ตรึงรูป *S. cerevisiae* TISTR 5088 มี

ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 35.14 ± 13.99 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุมที่มีปริมาณเอทานอลเท่ากับ 34.01 ± 8.44 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลงตามระยะเวลาการหมัก โดยพบว่าวันสุดท้ายของการหมัก (5 วัน) เซลล์ตรึงรูป *S. cerevisiae* TISTR 5088 มีปริมาณเอทานอล 24.33 ± 14.87 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 4.51 ± 1.95 กรัมต่อลิตร สำหรับชุดควบคุมจะมีปริมาณเอทานอล 29.08 ± 6.46 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 5.98 ± 0.33 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.9 นอกจากนี้เซลล์ตรึงรูปมีค่าผลได้เอทานอล ($Y_{g/g}$) เท่ากับ 0.36 ± 0.18 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) 1.46 ± 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และประสิทธิภาพการหมักเท่ากับร้อยละ 65.44 ± 31.25 สำหรับชุดควบคุมมีค่าผลได้เอทานอล ($Y_{g/g}$) เท่ากับ 0.42 ± 0.12 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) 1.42 ± 0.07 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และประสิทธิภาพการหมักเท่ากับร้อยละ 75.73 ± 18.75 ดังแสดงในตารางที่ 4.13 ดังนั้นการใช้เซลล์ตรึงรูปและเซลล์อิสระให้ผลผลิตเอทานอลที่ไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Swain *et al.*, (2007) พบว่าผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการใช้เซลล์อิสระของ *S. cerevisiae* เท่ากับ 193 ± 8.00 กรัมต่อกิโลกรัมของดอก Mahula ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้เซลล์ตรึงรูปที่มีค่าผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 206 ± 10.00 กรัมต่อกิโลกรัมของดอก Mahula และ Behera *et al.*, (2010) พบว่าการใช้เซลล์อิสระ เซลล์ตรึงรูปด้วยวุ้น (Agar-agar) และเซลล์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ให้ปริมาณเอทานอลสุดท้ายไม่แตกต่างกัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 24.83, 25.20 และ 25.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ Roukas (1994) รายงานว่าเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อ *S. cerevisiae* มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลเท่ากัน ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 62 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตเอทานอล (Productivity) เท่ากับ 4.40 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 300 กรัมต่อลิตร ถึงแม้ว่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เซลล์ตรึงรูปจะมีประโยชน์ในแง่ของการนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำได้หลายรอบของกระบวนการหมัก ทนต่อเอทานอล และการยับยั้งจากสารตั้งต้น (Nikolic *et al.*, 2010) ในงานวิจัยนี้ได้นำเซลล์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำในกระบวนการหมักในสภาวะที่เหมาะสมเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น ผลการทดลองที่ได้พบว่า อาหารหมักมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วย *A. rouxii* TISTR 3182 ในสภาวะที่เหมาะสม มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 87.41 ± 0.68 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณเอทานอลเริ่มต้นที่ผลิตได้จากเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในระหว่างกระบวนการย่อยมันสำปะหลังเท่ากับ 4.75 ± 0.63 กรัมต่อลิตร เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 1 วัน เซลล์ตรึงรูปแตกสลายตัวกลายเป็นเนื้อเดียวกับอาหารหมักมันสำปะหลัง เนื่องจากเซลล์ตรึงรูปที่นำมาใช้ซ้ำอาจจะมีการเจริญเติบโตของเซลล์ *S. cerevisiae* ภายในเม็ดเจล ประกอบกับความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตที่ใช้ไม่สูงมาก ส่งผลให้เม็ดเจลเกิดการขยายตัว (Najafpour *et al.*, 2004) เมื่อนำไปหมักซ้ำในอาหารหมักที่มีความขุ่นหนืดและแรงเฉือนสูง จึงทำให้เม็ดเจลแตกตัวได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Yadav *et al.*, (1996) รายงานว่าเซลล์ตรึงรูป *S. cerevisiae* HAU-1 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต สามารถใช้ได้ในการหมักเพียงแค่ระยะสั้นๆเท่านั้น ไม่เหมาะสมในการ

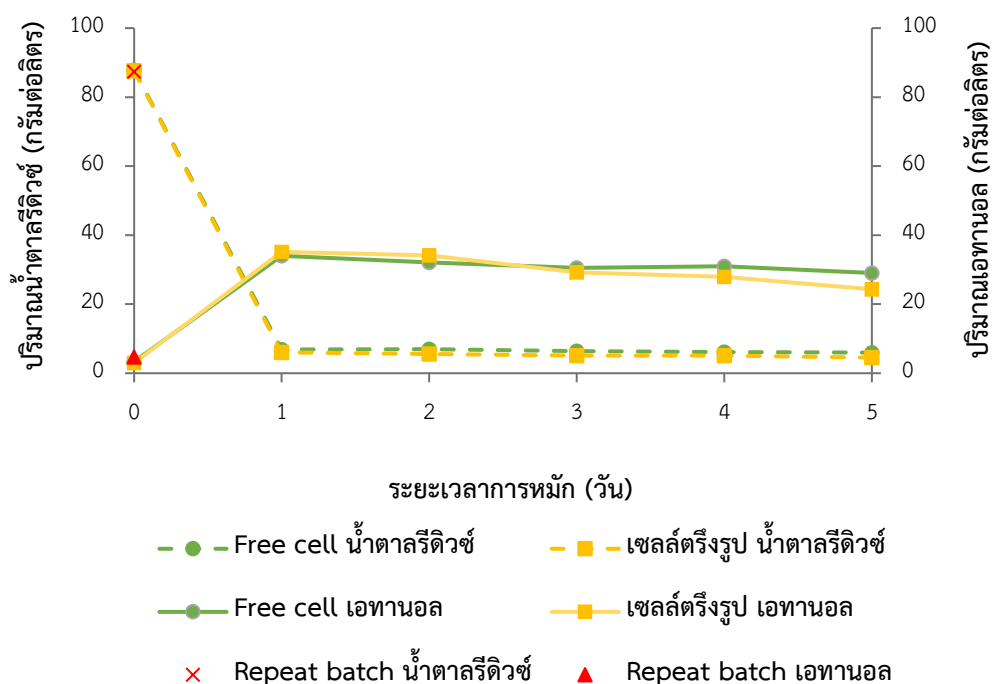
นำไปหมักซ้ำหลายครั้ง Rakin *et al.* (2009) พบว่าเซลล์ตรึงรูป *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* สามารถนำมาใช้หมักเอทานอลได้เพียงแค่ 2 ครั้งของการหมัก (38 ชั่วโมงต่อการหมัก 1 รอบ) เนื่องจากเมื่อเข้าสู่กระบวนการหมักรอบที่ 3 เม็ดเจลเสียหาย มีผลเนื่องมาจากการเติบโตและขยายตัวของเซลล์ยีสต์ภายในเม็ดเจล Bekers *et al.*, (2001) รายงานว่าเซลล์ตรึงรูป *Zymomonas mobilis* ใช้หมักเอทานอลได้เพียง 4 – 5 วัน เท่านั้น หลังจากนั้นเม็ดเจลจะสลายตัว และเซลล์ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ขนาดเม็ดเจล 3 มิลลิเมตร สามารถใช้หมักเอทานอลได้เพียงแค่ 72 ชั่วโมง จากนั้นเม็ดเจลจะสลายตัวและเสียหาย (Orrego *et al.*, 2018) ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต แต่ในทางกลับกัน Lee *et al.*, (2011) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากการนำเซลล์ตรึงรูป *S. cerevisiae* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ผลการทดลองที่ได้พบว่าเซลล์ตรึงรูปที่นำมาใช้ซ้ำสามารถหมักแล้วให้ประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้เซลล์ตรึงรูปใหม่ โดยสามารถใช้เซลล์ตรึงรูปซ้ำได้ถึง 4 รอบของกระบวนการหมัก (10 - 14 ชั่วโมงต่อการหมักหนึ่งรอบ) Kiran Sree *et al.*, (2000) พบว่าเซลล์ตรึงรูป *S. cerevisiae* เมื่อนำมาใช้หมักซ้ำจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการใช้เซลล์ตรึงรูปใหม่ โดยรอบแรกของกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปใหม่จะให้ปริมาณเอทานอล 34 กรัมต่อลิตร หลังจากหมักไปเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อนำเซลล์ตรึงรูปมาใช้หมักซ้ำพบว่า การใช้ซ้ำในรอบที่ 6 ของกระบวนการหมัก จะให้ปริมาณเอทานอล 62 กรัมต่อลิตร Mariam *et al.*, (2009) รายงานว่าการใช้เซลล์ตรึงรูปแคลเซียมอัลจิเนตของเชื้อ *S. cerevisiae* เมื่อนำเซลล์ตรึงรูปมาใช้ในกระบวนการหมักซ้ำจะให้ประสิทธิภาพเอทานอลเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์ตรึงรูปใหม่ และการศึกษาของ El-Dalatony *et al.*, (2016) พบว่าเซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต สามารถนำมาหมักซ้ำได้ถึง 7 รอบของกระบวนการหมัก (ระยะเวลาการหมัก 70 – 72 ชั่วโมงต่อรอบ) และให้ประสิทธิภาพการหมักสูงถึงร้อยละ 79 ในการหมักรอบที่ 1 – 5 โดยให้ปริมาณเอทานอลเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 9.7 กรัมต่อลิตร รวมทั้งการศึกษาของ Farid *et al.*, (2002) พบว่าในแต่ละรอบของการหมักซ้ำ โดยเซลล์ตรึงรูป *S. cerevisiae* จะให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงขึ้นจากร้อยละ 3.50 เป็น 3.90 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเซลล์ตรึงรูปสามารถนำมาใช้หมักซ้ำได้ 12 รอบ

ตารางที่ 4.12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังในสภาวะที่เหมาะสมและการหมักซ้ำ (Repeat batch) ด้วยเซลล์ตรึงรูปที่ผ่านการหมักแล้ว (Reused immobilized cell)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)		
	ชุดควบคุม (เซลล์อิสระ)	เซลล์ตรึงรูป	Repeat Batch รอบที่ 1	ชุดควบคุม (เซลล์อิสระ)	เซลล์ตรึงรูป	Repeat Batch รอบที่ 1
	0	87.88±0.23 ^a	87.69±1.16 ^a	87.41±0.68	3.37±0.35 ^a	3.00±0.55 ^a
1	6.89±1.29 ^a	6.07±1.22 ^a	N.D.	34.01±8.44 ^a	35.14±13.99 ^a	N.D.
2	6.99±1.15 ^a	5.57±0.55 ^a	N.D.	32.08±10.21 ^a	34.16±13.22 ^a	N.D.
3	6.41±0.79 ^a	5.15±2.36 ^a	N.D.	30.53±7.67 ^a	29.23±13.65 ^a	N.D.
4	6.11±0.54 ^a	5.11±2.19 ^a	N.D.	30.95±11.04 ^a	27.91±6.77 ^a	N.D.
5	5.98±0.33 ^a	4.51±1.95 ^a	N.D.	29.08±6.46 ^a	24.33±14.87 ^a	N.D.

หมายเหตุ : N.D. คือไม่สามารถเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ได้เนื่องจากเม็ดเจลแตก

^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

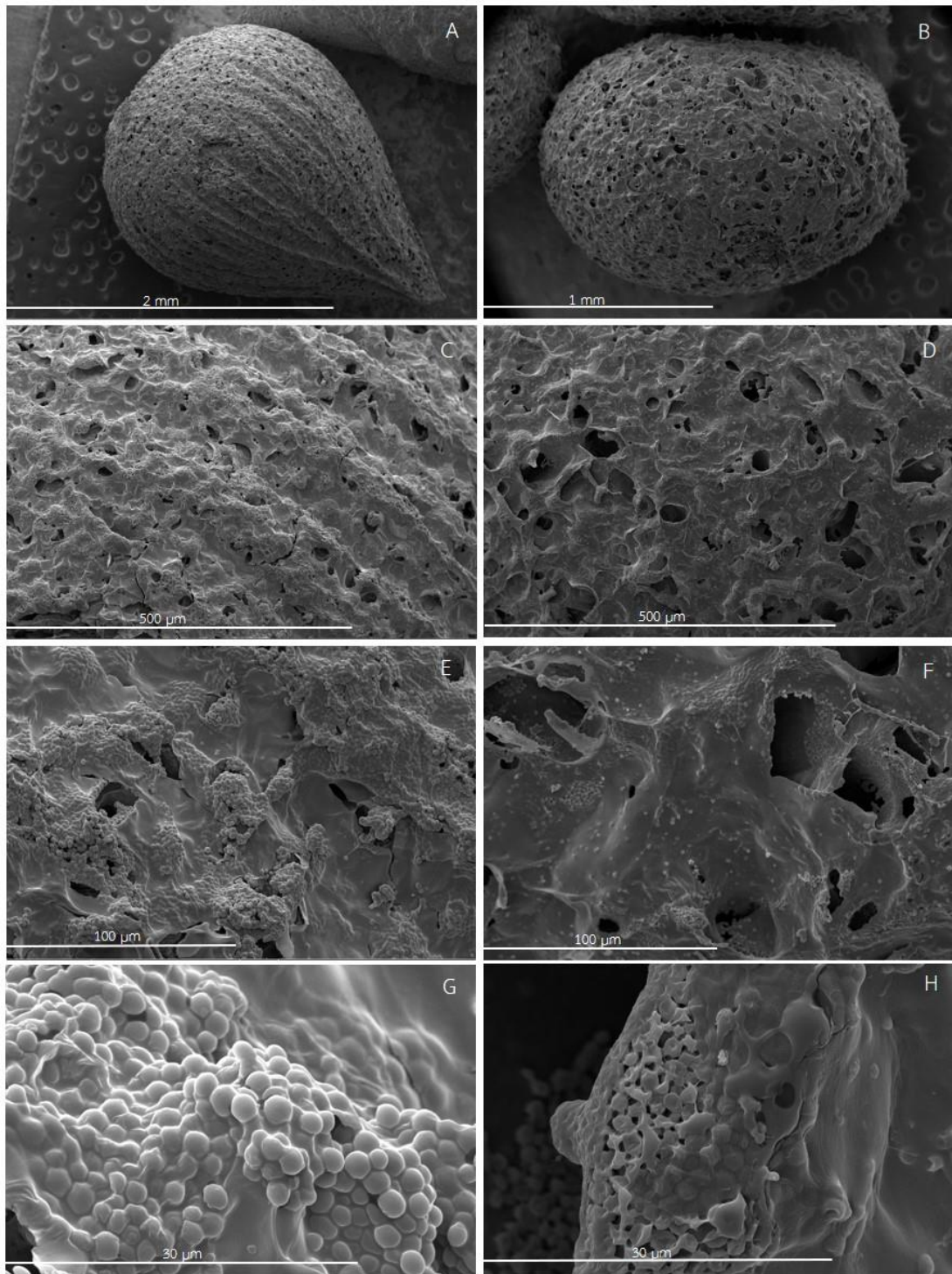


รูปที่ 4.9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช่และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังในสภาวะที่เหมาะสมและการหมักซ้ำ (Repeat batch) ด้วยเซลล์ตรึงรูปที่ผ่านการหมักแล้ว (Reused immobilized cell)

ตารางที่ 4.13 ค่าจลนพลศาสตร์ที่ได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังในสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* TISTR 5088

ค่าจลนพลศาสตร์	ชุดควบคุม (เซลล์อิสระ)	เซลล์ตรึงรูป
Ethanol Yield (Yg/g)	0.42±0.12	0.36±0.18
Volumetric ethanol productivity (Q _p : g/L/h)	1.42±0.07	1.46±0.11
Fermentation efficiency (%)	75.73±18.75	65.44±31.25

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังในสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 จะพบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป ปริมาณเอทานอลสูงขึ้นพร้อมกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง เซื้อยีสต์ที่ถูกตรึงอยู่ในแคลเซียมอัลจิเนตมีการเจริญเติบโตและมีกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์ เมื่อนำเม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูปก่อนกระบวนการหมักและหลังกระบวนการหมักรอบที่ 1 (ระยะเวลาการหมัก 5 วัน) มาส่องดูพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ผลการทดลองที่ได้พบว่า เม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูปหลังกระบวนการหมักมีลักษณะเป็นกลมรี ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปจากเม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูปก่อนกระบวนการหมักที่จะมีส่วนหางยื่นออกมา ดังรูปที่ 4.10A และ 4.10B นอกจากนี้บริเวณพื้นผิวของเม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูปหลังการหมักจะมีช่องโหว่ รอยฉีกขาด หรือรูพรุน เป็นจำนวนมาก อาจส่งผลให้เซลล์ภายในแคลเซียมอัลจิเนตหลุดออกมาได้ เชื่อที่บริเวณ พื้นผิวจึงดูบางเบา เมื่อเทียบกับเม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูปก่อนกระบวนการหมัก แสดงดังรูปที่ 4.10C 4.10D 4.10E และ 4.10F บริเวณพื้นผิวของเม็ดเจลเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป เม็ดเจลเจอกับสภาวะต่างๆ ได้แก่ ความหนืดของมันสำปะหลัง แรงเฉือนจากการเขย่า ปริมาณเอทานอลที่เพิ่มสูงขึ้น จึงส่งผลให้พื้นผิวถูกทำลาย เซลล์ที่อยู่บริเวณพื้นผิวจึงถูกทำลายตามไปด้วย สังเกตเห็นว่าลักษณะเซลล์ไม่ค่อยกลม มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับเม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูปก่อนการหมัก ดังรูปที่ 4.10G และ 4.10H Najafpour *et al.*, (2004) รายงานว่าเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 72 ชั่วโมง เชื้อจะมีการเจริญเติบโต แผ่ขยายไปทั่วบริเวณพื้นผิวของแคลเซียมอัลจิเนต และ Shiang Lee *et al.*, (2012) พบว่าพื้นผิวของเม็ดเจลมีลักษณะเรียบก่อนการนำไปหมัก เมื่อนำไปหมักเป็นระยะเวลา 13 วัน บริเวณพื้นผิวของเม็ดเจลจะถูกปกคลุมด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* *Aspergillus oryzae* และ *Monascus purpureus* เนื่องจากเชื้อต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต เพราะบริเวณพื้นผิวน่าจะเป็นส่วนที่มีการไหลเวียนของสารอาหารและออกซิเจนสูงกว่าภายในเม็ดเจล



รูปที่ 4.10 พื้นผิวเม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูป *S. cerevisiae* TISTR 5088 : (A) ก่อนหมัก กำลังขยาย 70x; (B) หลังหมัก กำลังขยาย 100x; (C) ก่อนหมัก กำลังขยาย 300x; (D) หลังหมัก กำลังขยาย 300x; (E) ก่อนหมัก กำลังขยาย 1000x; (F) หลังหมัก กำลังขยาย 1000x (G) ก่อนหมัก กำลังขยาย 5000x; (H) หลังหมัก กำลังขยาย 5000x

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษากระบวนการผลิตไบโอเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 และเซลล์ตรึงรูปของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 หัวข้อหลัก ได้แก่ 1.) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล (Saccharification) จากมันสำปะหลัง ด้วยเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 2.) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันสำปะหลังของเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 โดยใช้เซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ 3.) การศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงรูปของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักซ้ำ (Repeat batch process)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลของมันสำปะหลังด้วยเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 พบว่าความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการหมัก มีค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 6.26 ± 0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 34.10 ± 0.73 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 35.97 ± 3.29 กรัมต่อลิตร และอัตราการใช้น้ำมันสำปะหลังร้อยละ 92.09 ± 2.56 และจากการศึกษาความเข้มข้นมันสำปะหลัง พบว่ามันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 สามารถย่อยได้สูงสุดในวันที่ 3 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 5.38 ± 0.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้นจากการย่อยมันสำปะหลัง 90.86 ± 1.26 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 88.85 ± 0.11 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลมอลโตสเล็กน้อย 0.25 ± 0.00 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการใช้น้ำมันสำปะหลังร้อยละ 81.63 ± 0.15 จากนั้นนำไปศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นของมันสำปะหลังดังนี้ พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ปรับพีเอช (พีเอช 5.66) พบว่า มันสำปะหลังชุดควบคุม เชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 มีความสามารถย่อยมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 2.41 ± 0.90 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 84.17 ± 1.89 กรัมต่อลิตร น้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 91.58 ± 0.30 กรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 2.28 ± 0.04 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการใช้น้ำมันสำปะหลังร้อยละ 95.33 ± 1.03

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเซลล์ตรึงรูป *S. cerevisiae* TISTR 5088 พบว่า การตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผลิตเอทานอลสูงสุด โดยพบว่าในวันที่ 1 ของการหมัก เซลล์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตความเข้มข้น

ร้อยละ 2.00 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 36.19 ± 0.09 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้น ปริมาณเอทานอลจะลดลงซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง เม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูปที่ใช้ แคลเซียมอัลจินเตความเข้มข้นร้อยละ 2.00 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีขนาดเม็ดเจลเล็กกว่าการใช้ แคลเซียมอัลจินเตความเข้มข้นร้อยละ 3.00 และ 4.00 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เม็ดเจลมีลักษณะเป็น หอยตั่ว มีหางค่อนข้างยาว สีขาวใส มีขนาด 3.80 ± 0.45 มิลลิเมตร ขณะที่การใช้แคลเซียมอัลจินเต ความเข้มข้นร้อยละ 3.00 และ 4.00 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีเม็ดเจลขนาดใหญ่กว่า เม็ดเจลมีลักษณะ ค่อนข้างกลม มีหางเกิดขึ้นเล็กน้อย สีขาวขุ่น เมื่อเซลล์ตรึงรูปผ่านกระบวนการหมักเป็นระยะเวลา 5 วัน เม็ดเจลจะมีขนาดเล็กลง จากการศึกษาเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูปพบว่า เม็ดเจลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3.35 มิลลิเมตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่าเม็ดเจลที่มีขนาด เส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2.00 และ 2.00- 2.36 มิลลิเมตร โดยสามารถผลิตเอทานอลได้ 32.77 ± 3.12 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 ของการหมักภายหลังการหมัก 5 วัน เม็ดเจลทุกขนาดมีขนาดที่เล็กลง จากการหมักเอทานอลในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาขั้นต้น คือ เติрымมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไม่ปรับพีเอชของมันสำปะหลัง ใช้ความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้น ของ *A. rouxii* TISTR 3182 เท่ากับ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นเติมเซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจินเตความเข้มข้นร้อยละ 2.00 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดเจลมากกว่า 3.35 มิลลิเมตร หมักเอทานอลในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว รอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เปรียบเทียบกับการหมักด้วย เซลล์อิสระ พบว่าการหมักเอทานอลด้วยเซลล์ตรึงรูปและเซลล์อิสระให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดในวันที่ 1 ของการหมักเท่ากับ 35.14 ± 13.99 และ 34.01 ± 8.44 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ค่า ทางจลนพลศาสตร์ของการหมักเอทานอลพบว่า เซลล์ตรึงรูปมีค่าผลได้เอทานอล (Yg/g) เท่ากับ 0.36 ± 0.18 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิตเอทานอล (Qp) 0.24 ± 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ ประสิทธิภาพการหมักเท่ากับร้อยละ 65.44 ± 31.25 สำหรับชุดควบคุมมีค่าผลได้เอทานอล (Yg/g) เท่ากับ 0.42 ± 0.12 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิตเอทานอล (Qp) 0.28 ± 0.07 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และประสิทธิภาพการหมักเท่ากับร้อยละ 75.73 ± 18.75 จากการศึกษาประสิทธิภาพเซลล์ตรึงรูป ของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักซ้ำ (Repeat batch process) พบว่าภายหลัง การหมัก 1 วัน เซลล์ตรึงรูปแตกสลายกลายเป็นเนื้อเดียวกับมันสำปะหลัง ไม่สามารถนำมาใช้ในการ หมักครั้งต่อไปได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการย่อยมันสำปะหลังของเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราให้ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส แล้วนำไปทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ แล้วถึงนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบริสุทธิ์มาย่อยมันสำปะหลัง เพื่อหลีกเลี่ยงสภาวะของสารตั้งต้นและสภาวะการหมักที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อ นอกจากนี้ควรเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการตรึงเซลล์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เพื่อผลิตเอทานอลและนำมาใช้ในกระบวนการหมักซ้ำได้หลายครั้ง โดยการนำความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตที่สูงกว่าร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มาศึกษาในกระบวนการหมักซ้ำ เนื่องจากยิ่งความเข้มข้นสูง ความแข็งแรงของเม็ดเจลจะสูงตามไปด้วย น่าจะทนต่อสภาวะของการหมักได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นแคลเซียมอัลจิเนตต่ำ

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2537. **มันสำปะหลัง**. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.
- ชนิษฐา เอี่ยมละออ., ชนาการ์ต สีนนิคม., ไพบูลย์ ชิวภา และสุภักดิ์ ยินดีรูป. 2555. “การผลิตน้ำตาลรีดิวิซจากลำต้นรูปฤๅษีด้วย *Aspergillus niger* TISTR 3254 สำหรับนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.
- คณะกรรมการการพลังงาน. 2545. **พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล**. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : บริษัท แพลน ฟรันทิ่ง จำกัด.
- ชัยวัฒน์ จาติกเสถียร. 2520. “การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราและยีสต์ในลูกแป้งสำหรับการหมักข้าวหมาก” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.
- ธีระพงษ์ สิงหาปัด., กรรณิการ์ แสงศรีเรือง และสุรัสวดี ปันรัตน์. 2549. “การผลิตเอทานอลโดยการหมักจากน้ำอ้อย.” ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2560. **เทคโนโลยีการตรึงเอนไซม์**. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์วิทยาลัย
- ผกามาศ ปุรินทรภิบาล. (2552). **เคมีเอนไซม์ทางอาหาร**. [online]. Available : <http://agro-industry.rmutsv.ac.th/upload/papers> (สืบค้นวันที่ 31 พฤษภาคม 2563)
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2546. **ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส**. [online] Available : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1174/amylase>. (สืบค้นวันที่ 31 พฤษภาคม 2563)
- วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2563. **เอนไซม์**. [online]. Available : <https://th.wikipedia.org/wiki/เอนไซม์> (สืบค้นวันที่ 31 พฤษภาคม 2563)
- วิลาวลัย เจริญจิระตระกูล. 2539. **จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร**. กรุงเทพฯ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ : สำนักพิมพ์ไอเดียเนสโตร์.
- สาวิตรี ลีมหอง. 2549. **ยีสต์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ**. เล่มที่ 1 กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2016. **มันสำปะหลัง**. [online]. Available : <http://oldweb.oae.go.th/production.html>. (สืบค้นวันที่ 3 สิงหาคม 2561)
- สำนักงานพัฒนาพลังงาน. 2003. **มันสำปะหลัง**. กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์ พลังงาน กระทรวงพลังงาน.

- Adel-Naby, M., Mok, C. and Lee, C. 1992. "Production of organic acid from enzymatic hydrolysate of starch by immobilized lactic acid bacteria. " **United Nations Industrial Development Organization proceeding.** 227-243.
- Ahmed, S.A. 2008. "Invertase production by *Bacillus macerans* immobilized on calcium alginate beads." *Journal of Applied Science Research.* 4 (12) : 1777-1781.
- Afroz, Q.M., Khan, K.A., Ahmed, P. and Uprit, S. 2015. "Enzymes used in dairy industries." *International Journal of Applied Research.* 1 (10) : 523-527.
- Amutha Ramasamy and Gunasekaran Paramasamy. 2001. "Production of ethanol from liquid cassava starch using co-immobilized cells of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces diastaticus*." *Bioscience and Bioengineering.* 92 : 560-564.
- Axelsson, J. 2011. "Separate Hydrolysis and Fermentation of Pretreated Spruce." Master's Thesis of department of physics, chemistry and biology, Linköping University.
- Balat, M., Balat, H., and Cahide, O. 2008. "Progress in bioethanol processing." *Progress in Energy and Combustion Science.* 34 : 551-573.
- Baras, J., Gacesa, S., and Pejin, D. 2002. "Ethanol is a strategic raw material." *Chem Ind.* 56 : 89-105.
- Bechman, A., Phillips, R.D. and Chen, J. 2012. "Changes in selected physical property and enzyme activity of rice and barley koji during fermentation and storage." *Journal of food science.* 77.
- Bedford M.R. and Partridge G. 2010. **Enzymes in Farm Animal Nutrition.** 2nd edition UK : CAB International.
- Behera, S. and Ray, R.C. 2015. "Batch ethanol production from Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) flour using *Saccharomyces cerevisiae* cell immobilized in calcium alginate." *Annals of Microbiology.* 65 : 779-783.
- Behera, S., Kar, S., Mohanty, R.M. and Ray, R.C. 2010. "Comparative study of bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca – alginate matrices."

- Bekers, M., Laukevics, J., Karsakevich, A., Ventina, E., Kaminska, E., Upite, D., Vina, I., Linde, R. and Scherbaka, R. 2001. "Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment." *Process Biochemistry*. 36 : 979-986.
- Bottema, J.W., Taco, H. and Guy, H. 1990. "History, Current status and potential of Cassava use in Asia and cassava breeding, agronomy and utilization research in Asia". 22-27. **Proceedings of the third regional workshop held in Malang Indonesia**. OCT.
- British Petroleum. 2017. **BP Statistical Review of World Energy**. 66. London : Pure print : Group Limited.
- Castro, R.C.d.A. and Roberto, I.C., 2015. "Effect of nutrient supplementation on ethanol production in different strategies of saccharification and fermentation from acid pretreated rice straw." *Biomass Bioenergy*. 78 : 156–163.
- Chien Nan K. and Sofer Sam S. 1985. "Flow rate and bead size as critical parameter for Immobilized-yeast reactors." *Enzyme and Microbial Technology*. Vol.7.
- Choi, J.A., Hwang, J.H., Dempsey, B.A., Abou-Shanab, R.A.I., Min, B., Song, H., Lee, D. S., Kim, J.R., Cho, Y., Hong, S. and Jeon, B.H., 2011. "Enhancement of fermentative bioenergy (ethanol/hydrogen) production using ultrasonication of *Scenedesmus obliquus* YSW1 5 cultivated in swine wastewater effluent." *Energy and Environmental Science*. 4 : 3513.
- Choudhary, J., Singh, S. and Nain L. 2016. "Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass." *Electronic Journal of Biotechnology*. 21 : 82-92.
- Chrisnasari, R., Susetyo, D.H., Sugianto, A.P. and Pantjajani, T. 2013. "Optimization Model of ethanol production from *Shorghum bicolor* grain comparison between separate hydrolysis fermentation and simultaneous saccharification fermentation." *Microbiology Indonesia*. 7 : 9-16.
- Chum, L.H., and Overend, R.P. 2001. "Biomass and renewable fuels." *Fuel Bioprocess Technol*. 17 : 187-195.

- Clementz, A.L., Aimaretti, N.R., Manuale, D., Codevilla, A. and Yori, J.C. 2015. "Optimization of ethanol fermentation from discarded carrots using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*." *International Journal of Energy and Environmental Engineering*. 129-135.
- Das A.J., Miyaji T. and Deka S.C. 2017. "Amylolytic fungi in starter cakes for rice beer production." *The Journal of General and Applied Microbiology*. 63 : 236-245.
- Dung, N.T.P., Rombouts, F.M. and Nout, M.J.R. 2006. "Functionality of selected strains of moulds and yeast from Vietnamese rice wine starters." *Food Microbiology*. 23 : 331-340.
- Duangmanee, T., Padmasiri, S.I., Simmons, J.J., Raskin, L. and Sung, S., 2007. "Hydrogen production by anaerobic microbial communities exposed to repeated heat treatments." *Water Environment Research*. 79 : 975-983.
- Duarte, C., Rodrigues, R., Moran, S., Valenca, P. and Nunhez, J. 2013. "Effect of immobilize cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation." *AMB express*. 3 : 31.
- Eldalatony, M.M., Kabra, A.N., Hwang, J.H., Govindwar, S.P., Kim, K.H., Kim, H. and Jeon, B.H. 2016. "Pretreatment of microalgal biomass for enhanced recovery/ extraction of reducing sugars and proteins." *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 39 : 95-103.
- Ellis, J.J., Rhodes, L.J. and Hesseltine, C.W. 1974. "The Genus *Amylomyces*." *Annales de l'Institut Pasteur / Immunologie*. 6 : 611-1892.
- Farid, M.A., EL-Enshasy, H.A. and Noor EL-Deen, A.M. 2002. "Alcohol production from starch by mixed cultures of *Aspergillus awamori* and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* at different agitation speeds." *Journal of Basic Microbiology*. 42 (3) : 162-171.
- Fernandes, M.C., Ferro, M.D., Paulino, A.F., Mendes, J.A., Gravitis, J., Evtuguin, D.V. and Xavier, A.M., 2015. "Enzymatic saccharification and bioethanol production from *Cynara cardunculus* pretreated by steam explosion." *Bioresour. Technology*. 186 : 309-315.

- Gardening Know How. 2020. **Cassava plant care, Information on how to grow cassavas.**[online].Available:<https://www.gardeningknowhow.com/edible/Vegetables/cassava/growing-cassava-yuca.htm>
- Gilson, C.D. and Thomas, A. 1995. "Ethanol production by alginate immobilised yeast in a fluidized bed bioreactor." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 62 : 38-45.
- Goksungar, Y. and Guvenc, U. 1999. "Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 74 : 131-136.
- Hung, Y.C. and Chou, C.C. 1997. "Growth and milk-clotting enzyme production in submerged culture of *Amylomyces rouxii*", *Journal of the Chinese Chemical Society.* 35 : 422-432
- Horstmann, S.W., Lynch, K.M. and Arendt E.K. 2017. "Starch characteristics linked to gluten-free products." *Foods.* 6 : 29.
- Idris, A. and Suzana, W. 2006. "Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*." *Process Biochemistry.* 41 : 1117-1123.
- Jing Yu, P. and Chun Chou, C. 2005. "Factors affecting the growth and production of milk-clotting enzyme by *Amylomyces rouxii* in rice liquid medium." *Food Technology and Biotechnology.* 43 (3) 283-288.
- Kanlayakrit, W., Nakahara, K., Teramoto, Y. and Hayashida S. 1989. "Raw-starch digesting glucoamylase from *Amylomyces* sp.4-2 isolated from Loopang Kaomag in Thailand." *Journal Faculty of Agriculture Kyushu University.* 33 (3.4) : 177-187.
- Kashyap, P., Sabu, A., Pandey, A. and Szakacs, G. 2002. "Extra-cellular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid-state fermentation." *Process Biochemistry.* 38 : 307-312.
- Kang, A. and Soon, L.T. 2015. "Converting sugars to biofuels : Ethanol and beyond." *Bioengineering.* 2 : 184-203.

- Kaur, P. and Satyanarayana, T. 2004. "Production and starch saccharification by thermostable and neutral glucoamylase of a thermophilic mould *Thermomucor indicae-seudaticae*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20 : 419-425.
- Kenneth, R. 2011. "Evaluation of three cassava varieties for tuber quality and yield." *Gladstone road agricultural center crop research report*. No.4.
- Kheng, P.P. and Omar, I.C. 2004. "Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate." *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 27 (2) : 325-336.
- Kiran Sree, N., Sridhar, M., Suresh, K., Banat, IM. And Rao, L.V. 2000. "High alcohol production by repeated batch fermentation using an immobilized osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 24 : 222-226.
- Kito, H., ABE, A., Sujaya, I.N., Oda, Y., Asano, K. and Sone, T. 2009. "Molecular characterization of the relationships among *Amylomyces rouxii*, *Rhizopus oryzae*, and *Rhizopus delemar*." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 73 (4) : 861-864.
- Kosaric, N., Wieczorek, A., Cosentino, G.P. and Magee, R.J. 1983. "Ethanol fermentation" *Biotechnology*. 3 : 119-124.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., and Koutinas, A.A. 2004. "Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production : a review." *Food Microbiology*. 21 : 377-397.
- Kunz, T., Lee, E.J., Schiwiek, V., Seewald. and Methner, F.J. 2011. "Glucose – a reducing sugar? Reducing Properties of sugars in Beverages and food." *Brewing Science*. 64.
- Lee, K.H., Choi, I.S., Kim, Y.G., Yang, D.J. and Bae, H.J. 2011. "Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads." *Bioresource Technology*. 102 : 8191-8198.

- Li, Z., Liu, W., Gu, Z., Li, C., Hong, Y. and Cheng, Li. 2015. "The effect of starch concentration on the gelatinization and liquefaction of corn starch." *Food Hydrocolloids*. 48 : 189-196.
- Lin, C.D. and Chen, T.C. 1995. "Relative antifungal efficacies of phosphoric acid and other compounds on fungi." *Animal Feed Science and Technology*. 54 : 217-226.
- Lin, Y. and Tanaka, S. 2006. "Ethanol fermentation from biomass resource: current State and prospects." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 69 : 627-642.
- Liu, R., Shen, F. 2008. "Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC1308)." *Bioresour. Technol.* 99 : 847-854.
- Margaritis, A. and Kilonzo, P.M. 2005. "Production of ethanol using immobilized cell bioreactor systems." *Application of cell Immobilisation Biotechnology*. 375-405.
- Mariam, I., Manzoor, K., Ali, S. and Iram-UL-Haq. 2009. "Enhanced production of ethanol from free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* under stationary culture." *Pakistan Journal of Botany*. 41 (2) : 821-833.
- Mercial, J., Barrios, G.J. and Tomasini, A. 2006. "Effect of medium composition on pentachlorophenol removal by *Amylomyces rouxii* in solid-state culture." *Process Biochemistry*. 41 : 496-500.
- Merck. **Glycobiology - Carbohydrate Enzymes and Proteins**. [online]. Available : <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis.html> (สืบค้นวันที่ 31 พฤษภาคม 2563)
- Miller, G.L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." *Analytical Chemistry*, 31 (3) : 426-428.
- Murthy, P.S., Naidu, M.M. and Srinivas, P. 2009. "Production of α -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 84 : 1246-1249.

- Najafpour, G., Younesi, H. and Syahidah KU Ismail, K. 2004. "Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*." 92 : 251-260.
- Naulchan, K., Lakkana, L. and Pattana, L. 2010. "Growth and batch ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on sweet sorghum stem juice under normal and very high gravity conditions." *Biotechnology*. 9 (1) : 9-16.
- Nikolic, S., Mojovic, L., Pejin, D., Rakin, M., and Vukasinovic, M. 2010. "Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*." *Biomass and Bioenergy*. 34 : 1449-1456.
- Norman, B.E. 1979. "The application of polysaccharide degrading enzymes in the starch industry." *Microbial Polysaccharides and Polysaccharases*. 339-376.
- Orlowski, M. and Sypherd, P.S. 1978. "Regulation of translation for fuel ethanol production." *Yeast Strain Selection*. 8 : 225-236.
- Orrego, D., Zapata-Zapata, A.D. and Kim, D. 2018. "Ethanol production from coffee fermentation by *S. cerevisiae* immobilized in calcium-alginate beads." *Bioresource Technology Reports*. 3 : 200-204.
- Panchal, C.J., and Tavares, F.C.A. 1990. "Yeast strain selection for ethanol production" *Yeast strain selection*. 225-243
- Pandey, A. 1990. "Improvements in solid-state fermentation for glucoamylase production." *Biological Wastes*. 34 : 11-19.
- Pa-nga, Y. and Thalisa, Y.A. 2018. "Bioconversion of cassava starch to bio-ethanol in a single step by co-cultures of *Amylomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae*." *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 40 (4) : 776-783.
- Perera, F. 2017. "Pollution from fossil-fuel combustion is the leading environmental threat to global pediatric health and equity : Solutions exist." *Environment Health Sciences*. 15-16.
- Petrea, L. 2008. "Characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained by UV mutagenesis." *Innovative Romanian Food Biotechnology*. 2 : 40-47.

- Puri, S., Arora, M. and Sarao, L. 2013. "Production and optimization of amylase and glucoamylase using *Aspergillus oryzae* under solid state fermentation." *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*. 3 (3) : 83-88.
- Rakin, M., Mojovic, L., Nikolic, S., Vukasinovic, M. and Nedovic, V. 2009. "Bioethanol production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* cells." *African Journal of Biotechnology*. 8 : 464-471.
- Ramadas. M., Hoist, O. and Mattiasson, B. 1996. "Production of amyloglucosidase by *Aspergillus niger* under different cultivation regimens." *Word Journal of Microbiology and Technology*. 12 : 267-271.
- Ray, R.C. 2004. "Extracellular amylase(s) production by fungi *Botryodiplodia Theobromae* and *Rhizopus oryzae* grown on cassava starch residue." *J. Environ. Biol.* 25 : 489-495.
- Renewable Fuel Association. 2017. **Building Partnerships and Growing Markets.** Washing DC.
- Reynolds, J.E., Josowicz, M., Vegh, R.B. and Solntsev, K.M. 2013. "Spectral and redox properties of the GFP synthetic chromophores as a function of pH in buffered media." *The Royal Society of Chemistry*.
- Robinson, P.K. 2015. "Enzyme: Principles and biotechnological applications." *Essays in Biochemistry*. 59 : 1-41.
- Roukas, T. 1994. "Ethanol production from nonsterilized carob pod extract by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture." *Biotechnology and Bioengineering*. 43 : 189-194.
- Rukhair, R. and Srivastava, S.K. 1995. "Effect of various carbon substrate on α -amylase production from *Bacillus* sp." *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10 : 76-82.
- Sabu, A., Pandey, A., Jaafar Daud, M. and Szakacs G. 2005. "Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620." 96 : 1223-1228.

- Saelim, K., Dissara, Y. and H-Kittikun, A. 2008. "Saccharification of cassava starch by *Saccharomyces fibuligera* YCY1 isolated from Loo-Pang (rice cake starter)." *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 30 : 65-71.
- Saied, S.M., Basheer, A.A. and Alubaidy, G.F. 2007. "Effect of gientian violet and boric acid on growth of the fungi: *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* and *P. expansum*." *Rafidain journal of science*. 18 (12) : 1-5.
- Saito, K., Abe, A., Sujaya, I.N., Sone, T. and Oda, Y. 2004. "Comparison of *Amylomyces rouxii* and *Rhizopus oryzae* in lactic acid fermentation of potato pulp." *Food Science and Technology Research*. 10 (2) : 224-226.
- Science and food. 2013. **Deconstructed apple pie**. [online] Available : <https://www.scienceandfood.org/deconstructed-apple-pie>.
(สืบค้นวันที่ 28 พฤษภาคม 2563)
- See Ang, S., Baker Salleh, A., Abu Baker, F., Azah Yusof, N., Zukhrufuz Zaman, M. and Yook Heng, L. 2011. "Effect of boric acid on the growth and production of β -glucosidase in *Paecilomyces variotii*"
- Shen, H.Y., Schrijver, S.D., Moonjai, N., Verstrepen, K.J., Delvaux, F. and F.R. Delvaux. 2004. "Effect of CO₂ on the formation of flavour volatiles during fermentation with immobilized brewers yeast." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64 : 636-643.
- Shiang Lee, W., Chu Chen, I., Hsiung Chang, C. and Shyng Yang, S. 2012. "Bioethanol production from sweet potato by co-immobilization of saccharolytic molds and *Saccharomyces cerevisiae*." 39 : 216-222.
- Singh, D., Nigam, P., Banat, L.M., Marchant, R. and Mchale, A.P. 1998. "Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: part II – Use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14 : 823-834.
- Sitton, O.C., and Gaddy, J.L. 1980. "Ethanol production in an immobilized cell reactor." *Biotechnol. Bioeng.* 22 : 1735-1748.
- Slivinski, C.T., Machado, A.V.L., Lulek, J., Ayub, R.A. and De Almeida, M.M. 2011. "Biochemical characterization of a glucoamylase from *Aspergillus niger*

- produced by solid-state fermentation.” *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 54 (3).
- Stewart, G.G. 1987. “Alcoholic beverages.” *Food and Beverage Mycology*. 2 : 307-354.
- Swain, M.R., Kar, S., Sahoo, A.K., and Ray, R.C. 2007. “Ethanol fermentation of mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers using free and immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae*.” *Microbiology Research*. 162 : 93-98.
- Thalisa Yuwa-Amornpitak and Pa-nga Yeunyaw. 2019. “Comparative study of ethanol production from cassava pulp by mixed culture of *Amylomyces rouxii* with *Zygosaccharomyces pseudorouxii* and *Zymomonas mobilis*.” *Biomedical and Pharmacology Journal*. 12 (1) : 199-210.
- Thanaporn, M., Saranya, P., Peter, L. and Cherdsak, M. 2018. “Enhanced hydrogen production.” *Biomass and Bioenergy*. 111 : 88-95.
- Tomasik, P. and Horton, D. 2012. “Enzymatic conversions of starch.” *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Vol 68.
- U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 2019. **Cassava, Raw**. [online]. Available : <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169985/nutrients>
- Voet, D. and Voet, JG. 2004. “Rates of enzymatic reactions.” *Biochemistry*. 472-495.
- Voet, D. and Voet, JG. 2004. “Enzymatic catalysis.” *Biochemistry*. 496-546.
- Walker, G.M. 1998. **Yeast Physiology and Biotechnology**. Chichester, England : John Wiley and Sons Ltd.
- Wang, H.L., Swain, E.W., and Hesseltine, C.W. 1984. “Glucoamylase of *Amylomyces rouxii*” *Food Science*. 49.
- Watanabe, T. and Oda, Y. 2008. “Comparison of sucrose-hydrolyzing enzymes produced by *Rhizopus oryzae* and *Amylomyces rouxii*.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 72 : 3167–3173.
- Williams, D., and Munnecke, D.M. 1981. “The production of ethanol by immobilized Yeast cells.” *Biotechnology and Bioengineering*. 1813-1825.
- Yadav, B.S., Rani, U., Dhamija, S.S., Nigam, P. and Singh, D. 1996. “Process optimization for continuous ethanol fermentation by alginate-immobilized cells of

- Saccharomyces cerevisiae* HAU-1.” *Journal of Basic Microbiology*. 36 (3) : 205-210.
- Yegin, S., Fernandez-Lahore, M., Guvenc, U. and Goksungur, Y. 2010. “Production of extracellular aspartic protease in submerged fermentation with *Mucor mucedo* DSM 809.” *African Journal of Biotechnology*. 9 (38) : 6380-6386.
- Yuan Wang T. 2015. “Engineering yeast for cellulosic ethanol production.” *Austin Chemical Engineering*. 2 (2) : 1018.
- Yu, K.L., and Po, M.L. 2016. “Bioethanol production from potato starch by a novel Vertical mass-flow type bioreactor with a co-cultured-cell strategy.” *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 62 : 162-168.
- Yuvadetkun, P., Reungsang, A., and Boonmee, M. 2018. “Comparison between free cells and immobilized cells of *Candida shehatae* in ethanol production from rice straw hydrolysate using repeated batch cultivation.” *Renewable Energy*. 115 : 634-640.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB)

ประกอบด้วย

Potato Dextrose Broth	24	กรัม
วุ้น	20	กรัม

วิธีการเตรียม

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ให้ความร้อนจนกระทั่งวุ้นละลายจนหมด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract Peptone Dextrose Agar (YPD agar)

ประกอบด้วย

กลูโคส	20	กรัม
เปปโตเน	20	กรัม
ยีสต์สกัด	10	กรัม
วุ้น	20	กรัม

วิธีการเตรียม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. พีเอชบัฟเฟอร์ Britten-Robinson universal buffer (Reynold *et al.*, 2013)

ประกอบด้วย

5 M ของสารละลายไฮโดรเจนไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Sodium dihydrogen ortho phosphate : $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

5 M ของสารละลายกรดอะซิติก (CH_3COOH)

0.04 M กรดบอริก (H_3BO_3)

วิธีการเตรียม

1. เตรียม 5 M ของสารละลายไฮโดรเจนไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (M.W. = 137.99 กรัมต่อโมล) โดยชั่ง 68.995 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2. เตรียม 5 M ของสารละลายกรดอะซิติก (M.W. = 30.025 กรัมต่อโมล) โดยปิเปตสารละลายกรดอะซิติก 28.54 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3. เตรียม 0.04 M กรดบอริก (M.W. = 61.83 กรัมต่อโมล) โดยชั่ง 2.4732 กรัม

4. จากนั้นปิเปตสต็อก 5 M ของสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนอโทรฟอสเฟต ปริมาตร 8 มิลลิลิตร มาผสมกับสต็อก 5 M ของสารละลายกรดอะซิติกปริมาตร 8 มิลลิลิตร และเติม 2.4732 กรัม ของ 0.04 M กรดบอริก เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
5. นำสารละลายที่ได้ไปปรับพีเอช ให้ได้พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 เป็นต้น จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Dinitrosalicylic) (Miller *et al.*, 1959)

ประกอบด้วย

สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic (DNS) ร้อยละ 1

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

วิธีการเตรียม

1. สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic (DNS) ร้อยละ 1

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (M.W. = 40 กรัมต่อโมล) โดยชั่ง 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม 3,5-dinitrosalicylic ลงไป 10 กรัม คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปผสมกับสารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (ซึ่งมา 300 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร) คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

อบกลูโคสที่ตู้อบ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่ง กลูโคสที่ผ่านการอบ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้เป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง สารละลายกลูโคสที่ได้ความเข้มข้นต่างๆดังแสดงในตาราง

ความเข้มข้นกลูโคส ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาตรกลูโคส (ml)	ปริมาตรน้ำกลั่น (ml)
0	-	5
100	0.5	4.5
200	1	4
400	2	3
600	3	2
800	4	1
1000	5	-

วิธีการวิเคราะห์

1. การทำกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส

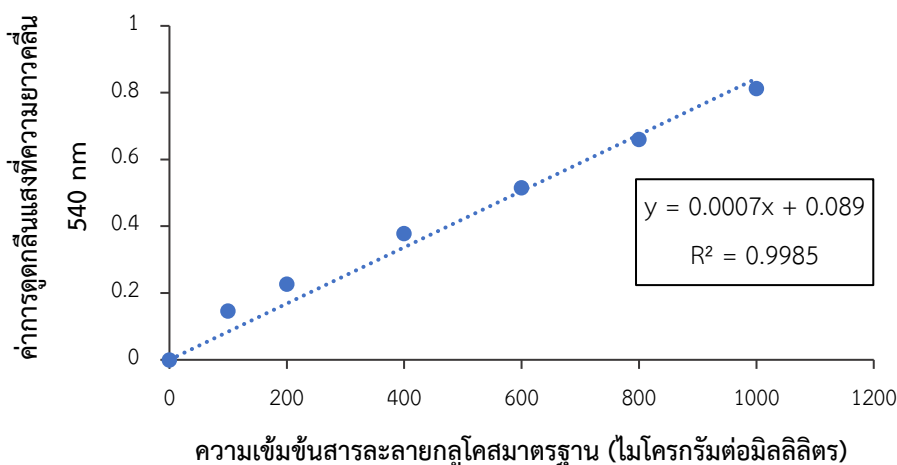
นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมได้ตั้งตาราง โดยปิเปตมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ) ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นปิเปตสารละลายดีเอ็นเอส (DNS) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆ ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นทันที จากนั้นปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการต้มแล้ว ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร พร้อมนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

2. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

นำตัวอย่างมาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยปิเปตมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ) ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นปิเปตสารละลายดีเอ็นเอส (DNS) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายตัวอย่าง ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นทันที จากนั้นปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการต้มแล้ว ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร พร้อมนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบจากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

สูตรคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} = \left(\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}} \times \text{อัตราการเจือจาง} \right) \div 1000$$



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสไมเลสโดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid (Ramadas *et al.*, 1996)

ประกอบด้วย

มันสำปะหลัง

0.02 M โซเดียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ pH 4.5 (Sodium acetate buffer)

สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic (DNS) ร้อยละ 1

สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

วิธีการเตรียม

1. สารละลายมันสำปะหลัง

ชั่งมันสำปะหลัง 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปคนตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2. 0.02 M โซเดียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ pH 4.5

เตรียมสต็อกสารละลาย 0.2 M โซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรต (Sodium acetate trihydrate) (M.W. = 136.09 กรัมต่อโมล) โดยชั่งมา 27.22 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และเตรียมสต็อกสารละลาย 0.2 M กรดอะซิติก (Acetic acid) โดยปิเปตปริมาตร 11.40 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสต็อกของสารละลายกรดอะซิติกมา 82 มิลลิลิตร แล้วจึงค่อยๆเติมสต็อกของสารละลายโซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรต วัดพีเอชบัฟเฟอร์ให้ได้เท่ากับพีเอช 4.5 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

3. สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic (DNS) ร้อยละ 1

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (M.W. = 40 กรัมต่อโมล) โดยชั่ง 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม 3,5-dinitrosalicylic ลงไป 10 กรัม คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปผสมกับสารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต (ชั่งมา 300 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร) คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

4. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

อบกลูโคสที่ต้อน 70 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งกลูโคสที่ผ่านการอบ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้เป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายกลูโคสที่ได้ความเข้มข้นต่างๆ ตามตารางในหัวข้อการวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธีดีเอ็นเอส

วิธีการวิเคราะห์

1. การทำกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส

นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมได้ตั้งตาราง โดยปิเปตมาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ) ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นปิเปตสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 0.5 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.2 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ (pH 4) 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอส (DNS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นทันที จากนั้นปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการต้มแล้ว ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร พร้อมนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

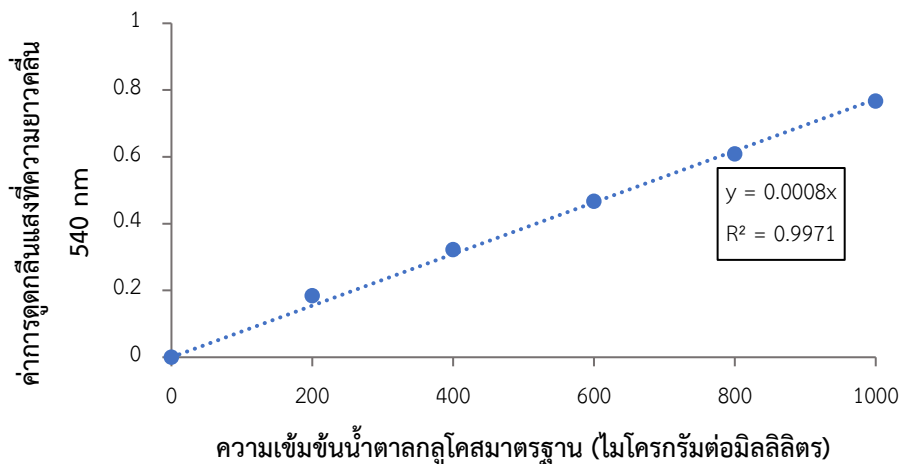
2. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

นำตัวอย่างมาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยปิเปตมาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ) ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นปิเปตสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 0.5 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.2 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ (pH 4) 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอส (DNS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายตัวอย่าง ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นทันที จากนั้นปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการต้มแล้ว ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร พร้อมนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบจากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสเพื่อนำมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคสไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

สูตรคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคสไมเลส

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} = \left(\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}} \times \text{อัตราการเจือจาง} \right) \div 1000$$

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์กลูโคสไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \left(\left(\frac{\text{น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} \times 10^6}{\text{M.W. น้ำตาลกลูโคส (180.156)}} \right) \div 1000 \right) \times \text{อัตราการเจือจาง}$$



รูปที่ ข-2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

3. การวิเคราะห์ปริมาณมันสำปะหลังด้วยวิธีไอโอดีน (Thalisa *et al.*, 2019)

ประกอบด้วย

สารละลายไอโอดีน (Iodine resublimed : I₂)

สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide : KI)

มันสำปะหลัง

วิธีการเตรียม

1. สารละลายไอโอดีน

ชั่งสารไอโอดีนมา 0.2 กรัม จากนั้นผสมน้ำกลั่นเพียงเล็กน้อย แล้วนำไปบดด้วยโกร่งเพื่อให้ผงไอโอดีนละลายเป็นเนื้อเดียวกับน้ำกลั่น จากนั้นนำมาผสมกับสารโพแทสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม คนจะสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ได้เป็น 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายมันสำปะหลังมาตรฐาน

อบมันสำปะหลังที่ตู้อบ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการอบ ให้มีความเข้มข้นต่างๆเท่ากับ 0, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. ทำกราฟมาตรฐานสารละลายมันสำปะหลัง

นำสารละลายมันสำปะหลังมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมได้ เริ่มจากปิเปตมา 100 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ) ใส่ในหลอดทดลอง ผสมกับสารละลายไอโอดีน ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตลงไมโครเพลตปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลตรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พร้อมนำข้อมูลที่

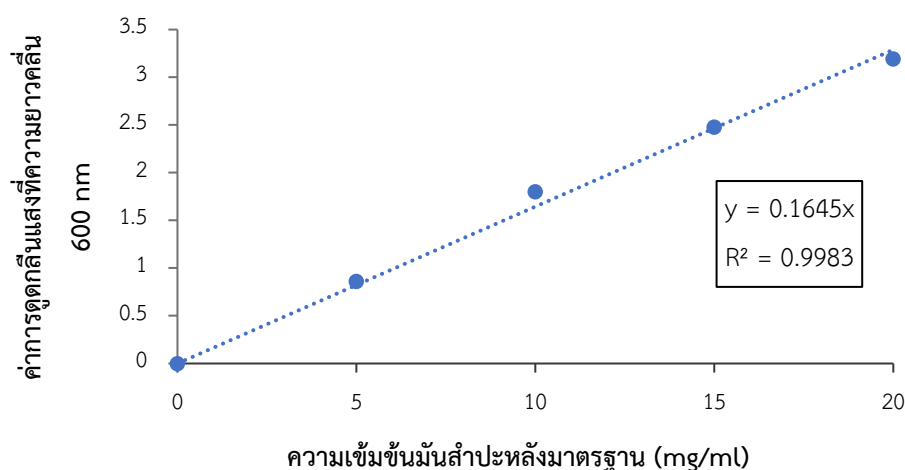
ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของน้ำมันสำปะหลัง

2. การหาปริมาณน้ำมันสำปะหลังในตัวอย่าง

นำตัวอย่างมาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยปิเปตมาปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ) ใส่ในหลอดทดลอง ผสมกับสารละลายไอโอดีนปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตลงไมโครเพลตปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลตรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พร้อมนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณปริมาณน้ำมันสำปะหลังเทียบจากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานน้ำมันสำปะหลัง

สูตรคำนวณหาปริมาณน้ำมันสำปะหลัง

$$\text{ปริมาณน้ำมันสำปะหลัง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \left(\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}} \times \text{อัตราการเจือจาง} \right) \div 1000$$



รูปที่ ข-3 กราฟมาตรฐานน้ำมันสำปะหลัง

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตสด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography : HPLC)

ประกอบด้วย

สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

สารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส

วิธีการเตรียม

1. สารละลายมาตรฐานกลูโคส

อบกลูโคสที่ตู้อบ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่ง กลูโคสที่ผ่านการอบ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร

2. สารละลายมาตรฐานมอลโตส

อบมอลโตสที่ตู้อบ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่ง มอลโตสที่ผ่านการอบ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมอลโตสมาตรฐานความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายมอลโตสให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร

3. เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ใช้คอลัมน์ Benson polymeric (BP-800H+) ใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวพา (Mobile phase) มีอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ใช้ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด RI

วิธีการวิเคราะห์

1. ทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตส

โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานกลูโคสและน้ำตาลมอลโตสที่มีความเข้มข้นต่างๆ 1000 ไมโครลิตร ลงในขวดไวแอลขนาด 1.5 มิลลิลิตร สำหรับฉีด HPLC จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยโครมาโตแกรมจะแสดงเวลาที่น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตสถูกชะออกจากคอลัมน์ อยู่ที่เวลาประมาณ 12 และ 10 นาที ตามลำดับ นำพื้นที่ใต้ กราฟ (Peak Area) ของสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตสแต่ละความเข้มข้นมาสร้าง กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลต่อพื้นที่ใต้กราฟ

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตสในตัวอย่าง

นำส่วนใสของตัวอย่างมาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วกรองผ่าน กระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ปิเปตลงในขวดไวแอลขนาด 1.5 มิลลิลิตร สำหรับฉีด HPLC ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากนั้นนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตสในตัวอย่าง

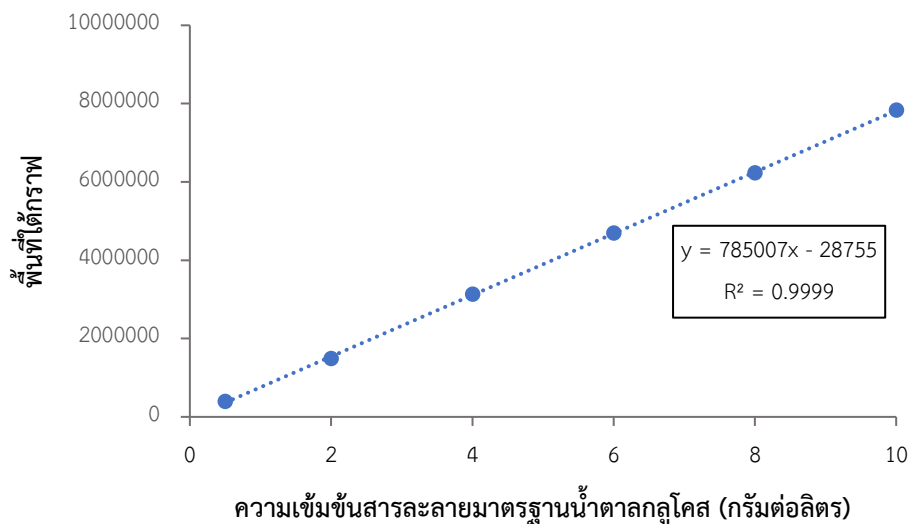
สูตรคำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคส

$$\text{สมการ} \quad y = 785007x - 28755$$

$$\text{ให้} \quad y = \text{พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง}$$

$$X = \text{ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)}$$

$$\text{ดังนั้น ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส} = (y + 28755) \div 785007 \text{ กรัมต่อลิตร}$$



รูปที่ ข-4 กราฟสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่วัดด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลว
สมรรถนะสูง

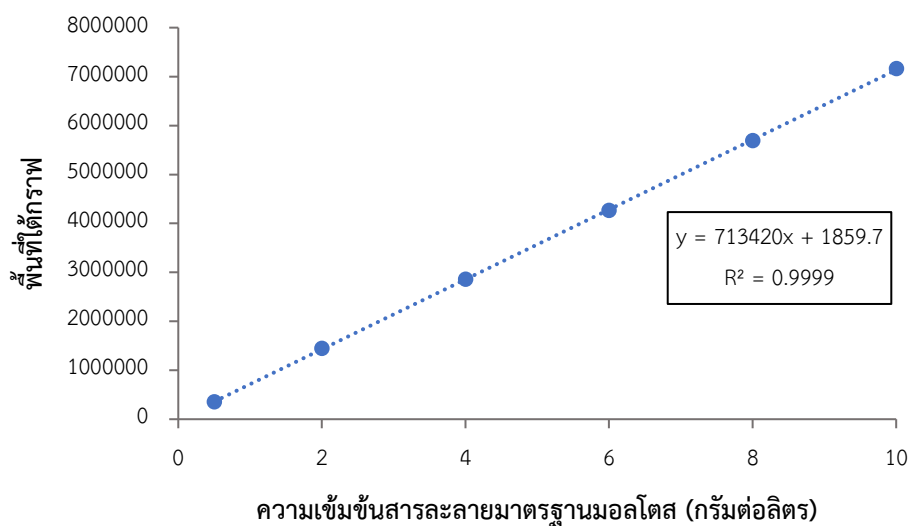
สูตรคำนวณปริมาณน้ำตาลมอลโตส

สมการ $y = 713420x + 1859.7$

ให้ $y =$ พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง

$X =$ ความเข้มข้นน้ำตาลมอลโตส (กรัมต่อลิตร)

ดังนั้น ความเข้มข้นน้ำตาลมอลโตส $= (y - 1859.7) \div 713420$ กรัมต่อลิตร



รูปที่ ข-5 กราฟสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโตสที่วัดด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลว
สมรรถนะสูง

5. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph : GC)

ประกอบด้วย

สารละลายมาตรฐานเอทานอล (Absolute ethanol)

สารละลายมาตรฐานโพรพานอล (N-propanol)

วิธีการเตรียม

1. สารละลายมาตรฐานโพรพานอลความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปิเปตสารละลายโพรพานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2. สารละลายมาตรฐานเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปิเปตสารละลายเอทานอลปริมาตร 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-2014) โดยต่อเข้ากับตัว Auto injector (AOC-20i) ใช้คอลัมน์ชนิด DB-1 (Agilent J&W GC Column) ที่มีความยาวเท่ากับ 30 เมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร มีความหนาของฟิล์ม 5 ไมครอน ใช้อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส ใช้ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด FID ที่อุณหภูมิเท่ากับ 180 องศาเซลเซียส อัตราการฉีดตัวอย่างเท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อวินาที อุณหภูมิของตำแหน่งฉีดสาร (Injector) เท่ากับ 150 องศาเซลเซียส และใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพา (Carrier gas) เลือกโหมด Linear Velocity เป็นโหมดในการวิเคราะห์

วิธีการวิเคราะห์

3. ทำกราฟมาตรฐานเอทานอล

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ 500 ไมโครลิตร ลงในขวดไวแอลขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายมาตรฐานโพรพานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ นำพื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area) ของสารมาตรฐานเอทานอลแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นต่อพื้นที่ใต้กราฟ โดยพื้นที่ใต้กราฟได้จากการคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลต่อพื้นที่ใต้กราฟของโพรพานอลในแต่ละความเข้มข้น

4. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในตัวอย่าง

นำส่วนใสของตัวอย่างมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ปิเปตลงในขวดไวแอลขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายมาตรฐานโพรพานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้น

นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นเอทานอลในตัวอย่าง

สูตรคำนวณปริมาณเอทานอล

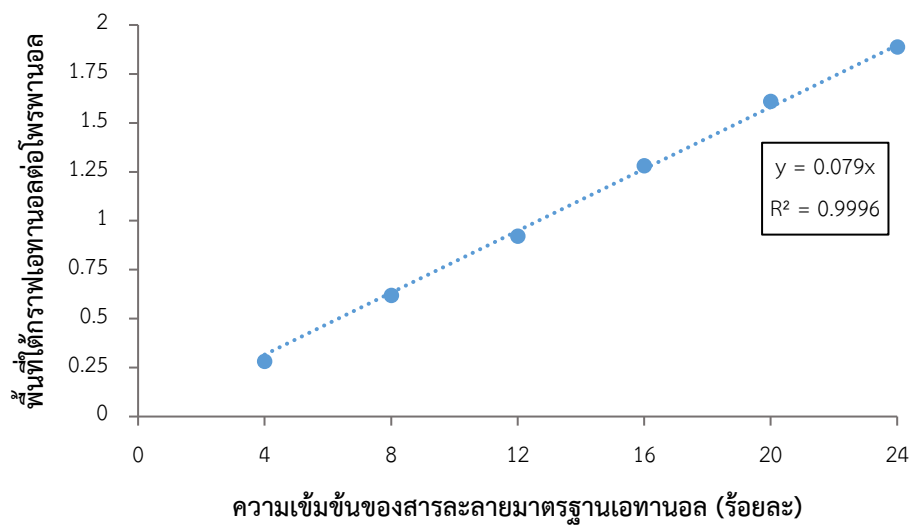
สมการ $y = 0.079x$

ให้ $y =$ อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟเอทานอลต่อโพรพานอล

$X =$ ความเข้มข้นของเอทานอล (ร้อยละ)

โดยความหนาแน่นของเอทานอล = 0.789 กรัมต่อลิตร

ดังนั้น ความเข้มข้นเอทานอล = $(x)(0.789)(10)$ กรัมต่อลิตร



รูปที่ ข-6 กราฟมาตรฐานเอทานอลวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ค-1 กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในการย่อย
มันสำปะหลังที่มี ความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกัน ในสภาวะเขย่า 150
รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Day 0	Between Groups	.012	3	.004	6.590	.015
	Within Groups	.005	8	.001		
	Total	.016	11			
Day 1	Between Groups	.964	3	.321	167.629	.000
	Within Groups	.015	8	.002		
	Total	.979	11			
Day 2	Between Groups	11.646	3	3.882	58.729	.000
	Within Groups	.529	8	.066		
	Total	12.175	11			
Day 3	Between Groups	2.911	3	.970	101.950	.000
	Within Groups	.076	8	.010		
	Total	2.987	11			
Day 4	Between Groups	5.566	3	1.855	125.147	.000
	Within Groups	.119	8	.015		
	Total	5.685	11			
Day 5	Between Groups	4.310	3	1.437	24.552	.000
	Within Groups	.468	8	.059		
	Total	4.778	11			

Post Hoc Test (Duncan)

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day 0				
spore	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	
10 ⁷	3	.0367		
10 ⁶	3	.0433		
10 ⁸	3	.0467		
10 ⁹	3			.1133
Sig.		.639		1.000
Day 1				
spore	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
10 ⁶	3	.0333		
10 ⁷	3		.2400	
10 ⁹	3			.6600
10 ⁸	3			.7067
Sig.		1.000	1.000	.228
Day 2				
spore	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
10 ⁶	3	3.1733		
10 ⁹	3		4.6533	
10 ⁸	3			5.5400
10 ⁷	3			5.6233
Sig.		1.000	1.000	.702
Day 3				
Spore	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
10 ⁹	3	4.9400		
10 ⁶	3		5.9000	
10 ⁸	3		5.9467	
10 ⁷	3			6.2533
Sig.		1.000	.574	1.000

Day 4				
spore	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
10 ⁹	3	4.2233		
10 ⁸	3		5.3933	
10 ⁶	3		5.5533	
10 ⁷	3			6.0900
Sig.		1.000	.146	1.000
Day 5				
spore	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
10 ⁶	3	4.2100		
10 ⁹	3		4.7600	
10 ⁸	3		4.9733	
10 ⁷	3			5.8733
Sig.		1.000	.312	1.000

ตารางที่ ค-2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการกระบวนกรย่อยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นสปอร์ เริ่มต้นที่แตกต่างกันของเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Day 0	Between Groups	2.689	3	.896	17927.278	.000
	Within Groups	.000	8	.000		
	Total	2.689	11			
Day 1	Between Groups	138.186	3	46.062	420.339	.000
	Within Groups	.877	8	.110		
	Total	139.063	11			
Day 2	Between Groups	232.265	3	77.422	4.651	.036
	Within Groups	133.171	8	16.646		
	Total	365.437	11			
Day 3	Between Groups	40.525	3	13.508	4.160	.047
	Within Groups	25.977	8	3.247		
	Total	66.502	11			
Day 4	Between Groups	74.257	3	24.752	4.957	.031
	Within Groups	39.946	8	4.993		
	Total	114.203	11			
Day 5	Between Groups	113.333	3	37.778	3.987	.052
	Within Groups	75.796	8	9.474		
	Total	189.129	11			

Post Hoc Test (Duncan)

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day 1					
spore	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
10 ⁶	3	1.2467			
10 ⁷	3		1.3133		
10 ⁸	3			1.7200	
10 ⁹	3				2.4367
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Day 1				
spore	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
10 ⁶	3	1.2100		
10 ⁷	3		3.2833	
10 ⁹	3			8.6300
10 ⁸	3			9.1000
Sig.		1.000	1.000	.120
Day 2				
spore	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	
10 ⁶	3	20.6933		
10 ⁹	3	25.9500	25.9500	
10 ⁸	3		30.8567	
10 ⁷	3		31.6933	
Sig.		.153	.137	
Day 3				
spore	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	
10 ⁹	3	28.9767		
10 ⁸	3	32.1200	32.1200	
10 ⁶	3	32.2133	32.2133	
10 ⁷	3		34.0967	
Sig.		.068	.233	
Day 4				
spore	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	
10 ⁹	3	29.3567		
10 ⁶	3	30.8200		
10 ⁸	3	33.3333	33.3333	
10 ⁷	3		35.8833	
Sig.		.070	.200	

Day 5			
spore	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
10 ⁹	3	26.4267	
10 ⁶	3	27.6200	
10 ⁸	3	30.7400	30.7400
10 ⁷	3		34.3567
Sig.		.138	.188

ตารางที่ ค-3 กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในการย่อย
มันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นแป้งเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ
150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Day 0	Between Groups	.012	4	.003	63.357	.000
	Within Groups	.000	10	.000		
	Total	.012	14			
Day 1	Between Groups	.337	4	.084	4218.667	.000
	Within Groups	.000	10	.000		
	Total	.338	14			
Day 2	Between Groups	3.625	4	.906	2091.092	.000
	Within Groups	.004	10	.000		
	Total	3.629	14			
Day 3	Between Groups	25.879	4	6.470	627.313	.000
	Within Groups	.103	10	.010		
	Total	25.982	14			
Day 4	Between Groups	33.314	4	8.328	464.585	.000
	Within Groups	.179	10	.018		
	Total	33.493	14			
Day 5	Between Groups	17.624	4	4.406	24.840	.000
	Within Groups	1.774	10	.177		
	Total	19.397	14			

Post Hoc Test (Duncan)

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day 0					
starch	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
20%	3	.0000			
4%	3		.0400		
6%	3			.0567	
8%	3				.0700
10%	3				.0800
Sig.		1.000	1.000	1.000	.103
Day 1					
starch	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	
20%	3	.0000			
10%	3		.3600		
8%	3		.3667		
6%	3			.3833	
4%	3			.3867	
Sig.		1.000	.098	.383	
Day 3					
starch	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
4%	3	1.1100			
6%	3		1.8567		
8%	3			2.1767	
10%	3			2.3400	
20%	3				4.9800
Sig.		1.000	1.000	.077	1.000

Day 4					
starch	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
4%	3	1.0333			
6%	3		1.8133		
8%	3			2.1133	
10%	3			2.3400	
20%	3				5.3833
Sig.		1.000	1.000	.065	1.000
Day 5					
starch	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	
4%	3	.9667			
6%	3		1.7833		
8%	3		2.0133		
10%	3		2.3433		
20%	3			4.2367	
Sig.		1.000	.151	1.000	

ตารางที่ ค-4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการกระบวนการย่อยมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่แตกต่างกันด้วยเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในสถานะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Day 0	Between Groups	9.051	4	2.263	3327.564	.000
	Within Groups	.007	10	.001		
	Total	9.058	14			
Day 1	Between Groups	11.071	4	2.768	682.847	.000
	Within Groups	.041	10	.004		
	Total	11.112	14			
Day 2	Between Groups	1803.893	4	450.973	1561.001	.000
	Within Groups	2.889	10	.289		
	Total	1806.782	14			
Day 3	Between Groups	6942.084	4	1735.521	291.626	.000
	Within Groups	59.512	10	5.951		
	Total	7001.596	14			
Day 4	Between Groups	7620.170	4	1905.042	2062.523	.000
	Within Groups	9.236	10	.924		
	Total	7629.406	14			
Day 5	Between Groups	5461.648	4	1365.412	352.690	.000
	Within Groups	38.714	10	3.871		
	Total	5500.363	14			

Post Hoc Test (Duncan)

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day 0						
starch	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
20%	3	.0000				
4%	3		1.0867			
6%	3			1.5633		
8%	3				1.9800	
10%	3					2.1767
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Day 1						
starch	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3		
20%	3	.0000				
4%	3		2.0667			
6%	3		2.1133			
8%	3		2.1400	2.1400		
10%	3			2.2500		
Sig.		1.000	.208	.060		
Day 2						
starch	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
20%	3	.0000				
4%	3		23.5233			
6%	3			26.9900		
8%	3			27.4767		
10%	3				29.8133	
Sig.		1.000	1.000	.293	1.000	

Day 4						
starch	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
4%	3	25.5033				
6%	3		36.1200			
8%	3			40.5233		
10%	3				47.4767	
20%	3					90.8567
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Day 5						
starch	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
4%	3	22.5000				
6%	3		34.7867			
8%	3		37.9533			
10%	3			44.5967		
20%	3				79.1667	
Sig.		1.000	.077	1.000	1.000	

ตารางที่ ค-5 กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในการย่อยมัน
 สำปะหลังที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกันในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อ
 นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Day 3	Between Groups	21.125	5	4.225	68.262	.000
	Within Groups	.743	12	.062		
	Total	21.868	17			
Day 4	Between Groups	12.001	5	2.400	2.651	.077
	Within Groups	10.866	12	.905		
	Total	22.866	17			
Day 5	Between Groups	5.607	5	1.121	2.299	.110
	Within Groups	5.854	12	.488		
	Total	11.460	17			

Post Hoc Test (Duncan)

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day 3			
Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
pH4.5	3	.0933	
pH4.0	3	.1867	
pH5.0	3	.1867	
pH6.0	3	.1867	
pH5.5	3	.2600	
control	3		3.0867
Sig.		.467	1.000

Day 4			
Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
pH4.0	3	.0767	
pH4.5	3	.3700	
pH6.0	3	.6267	.6267
pH5.5	3	.9067	.9067
pH5.0	3	1.7933	1.7933
control	3		2.4067
Sig.		.066	.054
Day 5			
Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
pH4.5	3	.2233	
pH4.0	3	.4233	.4233
pH5.5	3	.7567	.7567
pH5.0	3	.7767	.7767
control	3		1.6100
pH6.0	3		1.7033
Sig.		.386	.063

ตารางที่ ค-6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการกระบวนกรย่อยมันสำปะหลังที่มีค่าพีเอชที่แตกต่างกันด้วยเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในสถานะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Day 3	Between Groups	6411.635	5	1282.327	284.998	.000
	Within Groups	53.993	12	4.499		
	Total	6465.628	17			
Day4	Between Groups	11401.676	5	2280.335	131.147	.000
	Within Groups	208.652	12	17.388		
	Total	11610.328	17			
Day5	Between Groups	11142.917	5	2228.583	173.569	.000
	Within Groups	154.077	12	12.840		
	Total	11296.994	17			

Post Hoc Test (Duncan)

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day 3						
Sample	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
pH4.0	3	4.1700				
pH4.5	3	6.5133	6.5133			
pH5.0	3	6.8367	6.8367			
pH6.0	3		10.2833			
pH5.5	3			15.7167		
control	3				58.3833	
Sig.		.168	.060	1.000	1.000	
Day 4						
Sample	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
pH4.0	3	4.0367				
pH4.5	3		14.7033			
pH5.0	3			32.7867		
pH6.0	3			34.4767		
pH5.5	3			37.8300		
control	3				84.1667	
Sig.		1.000	1.000	.184	1.000	
Day 5						
Sample	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
pH4.0	3	4.0333				
pH4.5	3		38.3567			
pH5.5	3			45.3833		
pH6.0	3			48.1433	48.1433	
pH5.0	3				52.2633	
control	3					89.0200
Sig.		1.000	1.000	.364	.184	1.000

ตารางที่ ค-7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ ที่ใช้ไปในกระบวนการหมักมันสำปะหลังโดยใช้ความเข้มข้น
 แคลเซียมอัลจิเนตที่แตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ใน
 สภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น
 ระยะเวลา 5 วัน

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Day 0	Between Groups	1.149	3	.383	.010	.999
	Within Groups	307.268	8	38.409		
	Total	308.417	11			
Day1	Between Groups	5.492	3	1.831	51.152	.000
	Within Groups	.286	8	.036		
	Total	5.779	11			
Day2	Between Groups	8.170	3	2.723	159.810	.000
	Within Groups	.136	8	.017		
	Total	8.307	11			
Day 3	Between Groups	3.464	3	1.155	60.631	.000
	Within Groups	.152	8	.019		
	Total	3.616	11			
Day4	Between Groups	4.906	3	1.635	36.721	.000
	Within Groups	.356	8	.045		
	Total	5.262	11			
Day5	Between Groups	5.450	3	1.817	77.057	.000
	Within Groups	.189	8	.024		
	Total	5.638	11			

Post Hoc Test (Duncan)

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day 0				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1		
2%	3	65.2367		
free cell	3	65.2633		
3%	3	65.8567		
4%	3	65.8800		
Sig.		.907		
Day 1				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4%	3	3.5900		
2%	3	3.8000	3.8000	
3%	3		3.9633	
free cell	3			5.3167
Sig.		.211	.321	1.000
Day 2				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4%	3	3.4800		
3%	3		3.7400	
2%	3		3.7533	
free cell	3			5.5467
Sig.		1.000	.904	1.000
Day 3				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	
2%	3	3.6500		
4%	3	3.6733		
3%	3	3.7300		
free cell	3		4.9233	
Sig.		.515	1.000	

Day 4				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	
2%	3	3.9000		
4%	3	3.9700		
3%	3	4.0200		
free cell	3			5.4367
Sig.		.523		1.000
Day 5				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4%	3	3.7967		
3%	3	4.0533	4.0533	
2%	3		4.1300	
free cell	3			5.5233
Sig.		.075	.558	1.000

ตารางที่ ค-8 ปริมาณเอทานอล ที่ใช้ไปในกระบวนการหมักมันสำปะหลังโดยใช้ความเข้มข้น
 แคลเซียมอัลจิเนตที่แตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ใน
 สภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น
 ระยะเวลา 5 วัน

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Day 0	Between Groups	7.909	3	2.636	2.143	.173
	Within Groups	9.842	8	1.230		
	Total	17.751	11			
Day1	Between Groups	14.859	3	4.953	3.642	.064
	Within Groups	10.880	8	1.360		
	Total	25.739	11			
Day2	Between Groups	23.615	3	7.872	1.118	.397
	Within Groups	56.311	8	7.039		
	Total	79.925	11			
Day 3	Between Groups	13.763	3	4.588	.467	.714
	Within Groups	78.629	8	9.829		
	Total	92.392	11			
Day4	Between Groups	36.498	3	12.166	.761	.547
	Within Groups	127.907	8	15.988		
	Total	164.405	11			
Day5	Between Groups	17.030	3	5.677	.353	.789
	Within Groups	128.752	8	16.094		
	Total	145.782	11			

Post Hoc Test (Duncan)

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day 0			
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
4%	3	17.2400	
2%	3	17.3067	
free cell	3	17.9967	
3%	3	19.2600	
Sig.		.070	
Day 1			
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
free cell	3	34.2533	
4%	3	35.7600	35.7600
3%	3	36.4433	36.4433
2%	3		37.2900
Sig.		.058	.162
Day 2			
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
2%	3	36.1900	
3%	3	36.7667	
4%	3	38.6967	
free cell	3	39.6467	
Sig.		.172	
Day 3			
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
2%	3	35.4467	
3%	3	36.8967	
4%	3	37.0167	
free cell	3	38.4733	
Sig.		.298	

Day 4		
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05
		1
2%	3	36.0367
free cell	3	37.8467
4%	3	37.8633
3%	3	40.8933
Sig.		.199
Day 5		
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05
		1
2%	3	34.1633
free cell	3	35.9900
3%	3	36.5200
4%	3	37.4267
Sig.		.375

ตารางที่ ค-9 น้ำตาลรีดิวิซ์ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังโดยใช้ขนาดเม็ดแคลเซียม อัลจิเนตที่แตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในสภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Day 0	Between Groups	.679	3	.226	.025	.994
	Within Groups	72.803	8	9.100		
	Total	73.482	11			
Day1	Between Groups	36.053	3	12.018	1.492	.289
	Within Groups	64.431	8	8.054		
	Total	100.484	11			
Day2	Between Groups	3.543	3	1.181	8.200	.008
	Within Groups	1.152	8	.144		
	Total	4.695	11			
Day 3	Between Groups	3.302	3	1.101	15.407	.001
	Within Groups	.571	8	.071		
	Total	3.873	11			
Day4	Between Groups	3.107	3	1.036	8.634	.007
	Within Groups	.960	8	.120		
	Total	4.067	11			
Day5	Between Groups	3.985	3	1.328	20.831	.000
	Within Groups	.510	8	.064		
	Total	4.496	11			

Post Hoc Test (Duncan)

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Day 0				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1		
<2.00 mm	3	66.4533		
>3.35 mm	3	66.6900		
2.00-2.26 mm	3	66.7767		
freecell	3	67.1167		
Sig.		.805		
Day 1				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1		
freecell	3	6.0433		
>3.35 mm	3	7.3400		
2.00-2.36 mm	3	9.0900		
<2.00 mm	3	10.6200		
Sig.		.101		
Day 2				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
<2.00 mm	3	4.5400		
2.00-2.36mm	3	5.1033	5.1033	
>3.35mm	3		5.5733	5.5733
freecell	3			6.0000
Sig.		.107	.168	.206
Day 3				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
>3.35 mm	3	3.9567		
<2.00 mm	3	4.3967	4.3967	
2.00-2.36 mm	3		4.5567	
freecell	3			5.4033
Sig.		.079	.484	1.000

Day 4				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	
<2.00 mm	3	4.3067		
>3.35 mm	3	4.6000		
2.00-2.36 mm	3	4.8367		
freecell	3		5.6733	
Sig.		.110	1.000	
Day 5				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
<2.00 mm	3	3.7267		
2.00-2.36 mm	3	3.9867		
>3.35 mm	3		4.4767	
freecell	3			5.2400
Sig.		.243	1.000	1.000

ตารางที่ ค-10 เอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังโดยใช้ขนาดเม็ดแคลเซียม อัลจิเนตที่แตกต่างกันในการตรึงเซลล์ของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในสภาวะ เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Day 0	Between Groups	1.955	3	.652	.303	.823
	Within Groups	17.222	8	2.153		
	Total	19.177	11			
Day1	Between Groups	370.969	3	123.656	20.559	.000
	Within Groups	48.117	8	6.015		
	Total	419.086	11			
Day2	Between Groups	434.698	3	144.899	18.295	.001
	Within Groups	63.362	8	7.920		
	Total	498.060	11			
Day 3	Between Groups	368.848	3	122.949	2.164	.170
	Within Groups	454.591	8	56.824		
	Total	823.439	11			
Day4	Between Groups	352.261	3	117.420	5.469	.024
	Within Groups	171.766	8	21.471		
	Total	524.028	11			
Day5	Between Groups	302.478	3	100.826	21.920	.000
	Within Groups	36.797	8	4.600		
	Total	339.275	11			

Post Hoc Test (Duncan)

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Day 0				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1		
>3.35 mm	3	6.4233		
2.00-2.36 mm	3	6.9700		
<2.00 mm	3	7.2533		
freecell	3	7.5100		
Sig.		.417		
Day 1				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
>3.35 mm	3	25.0367		
2.00-2.36 mm	3		30.2200	
<2.00 mm	3		30.4533	
freecell	3			40.3967
Sig.		1.000	.910	1.000
Day 2				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1		2
2.00-2.36 mm	3	26.5767		
<2.00 mm	3	29.0233		
>3.35 mm	3	30.4933		
freecell	3			42.2167
Sig.		.141		1.000
Day 3				
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1		
2.00-2.36 mm	3	24.9667		
>3.35 mm	3	26.0900		
<2.00 mm	3	26.7733		
freecell	3	38.6600		
Sig.		.070		

Day 4			
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00-2.36 mm	3	24.2600	
>3.35 mm	3	27.0733	
<2.00 mm	3	27.7333	
freecell	3		38.5000
Sig.		.404	1.000
Day 5			
Alginate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00-2.36 mm	3	23.7767	
<2.00 mm	3	24.3333	
>3.35 mm	3	27.7633	
freecell	3		36.3367
Sig.		.060	1.000

ตารางที่ ค-11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ที่ใช้ไปกระบวนการหมักมันสำปะหลังในสภาวะที่เหมาะสมและการหมักซ้ำ (Repeat batch) ด้วยเซลล์ตรึงรูปที่ผ่านการหมักแล้ว (Reused immobilized cell)

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Day 0	Between Groups	.341	2	.171	.275	.769
	Within Groups	3.722	6	.620		
	Total	4.063	8			
Day1	Between Groups	85.024	2	42.512	40.396	.000
	Within Groups	6.314	6	1.052		
	Total	91.339	8			
Day2	Between Groups	82.069	2	41.034	75.391	.000
	Within Groups	3.266	6	.544		
	Total	85.335	8			
Day 3	Between Groups	69.121	2	34.561	16.750	.004
	Within Groups	12.380	6	2.063		
	Total	81.501	8			
Day4	Between Groups	64.492	2	32.246	19.022	.003
	Within Groups	10.171	6	1.695		
	Total	74.663	8			
Day 5	Between Groups	58.232	2	29.116	22.352	.002
	Within Groups	7.816	6	1.303		
	Total	66.048	8			

Post Hoc Test (Duncan)

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Day 0			
Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
Repeat batch	3	87.4067	
Immobilized	3	87.6933	
free cell	3	87.8800	
Sig.		.503	
Day 1			
Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Repeat batch	3	0.0000	
Immobilized	3		6.0733
free cell	3		6.8900
Sig.		1.000	.367
Day 2			
Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Repeat batch	3	0.0000	
Immobilized	3		5.5767
free cell	3		6.9967
Sig.		1.000	.056
Day 3			
Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
repeat	3	0.0000	
Immo	3		5.1467
free cell	3		6.4067
Sig.		1.000	.324

Day 4			
Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Repeat batch	3	0.0000	
Immobilized	3		5.1100
free cell	3		6.1133
Sig.		1.000	.382
Day 5			
Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Repeat batch	3	0.0000	
Immobilized	3		4.5133
free cell	3		5.9767
Sig.		1.000	.167

ตารางที่ ค-12 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมันสำปะหลังในสถานะที่เหมาะสม และการหมักซ้ำ (Repeat batch) ด้วยเซลล์ตรึงรูปที่ผ่านการหมักแล้ว (Reused immobilized cell)

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Day 0	Between Groups	5.076	2	2.538	9.340	.014
	Within Groups	1.630	6	.272		
	Total	6.706	8			
Day1	Between Groups	2392.996	2	1196.498	13.440	.006
	Within Groups	534.154	6	89.026		
	Total	2927.150	8			
Day2	Between Groups	2200.800	2	1100.400	11.839	.008
	Within Groups	557.671	6	92.945		
	Total	2758.471	8			
Day 3	Between Groups	1700.059	2	850.029	11.182	.009
	Within Groups	456.109	6	76.018		
	Total	2156.167	8			
Day4	Between Groups	1746.278	2	873.139	15.607	.004
	Within Groups	335.669	6	55.945		
	Total	2081.947	8			
Day 5	Between Groups	1562.594	2	781.297	8.372	.018
	Within Groups	559.944	6	93.324		
	Total	2122.538	8			

Post Hoc Test (Duncan)

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Day 0			
Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Immobilized	3	3.0033	
free cell	3	3.3667	
Repeat batch	3		4.7467
Sig.		.426	1.000
Day 1			
Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Repeat batch	3	0.0000	
free cell	3		34.0133
Immobilized	3		35.1400
Sig.		1.000	.889
Day 2			
Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Repeat batch	3	0.0000	
free cell	3		32.0833
Immobilized	3		34.1633
Sig.		1.000	.800
Day 3			
Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Repeat batch	3	0.0000	
free cell	3		29.0833
Immobilized	3		29.2267
Sig.		1.000	.985

Day 4			
Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Repeat batch	3	0.0000	
Immobilized	3		27.9133
free cell	3		30.9500
Sig.		1.000	.637
Day 5			
Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Repeat batch	3	0.0000	
Immobilized	3		24.3267
free cell	3		30.5333
Sig.		1.000	.461

ชื่อ	นางสาววชิรญาณ์ จันทโชติ
วัน เดือน ปีเกิด	22 พฤษภาคม 2537
ที่อยู่ปัจจุบัน	64/64 หมู่ที่ 9 ตำบลหนองปรือ อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี
ประวัติการศึกษา	(2558) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม เกรด เฉลี่ย 2.72 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2562) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	Wachiraya Janthachot, Cherdsak Maneeruttanarungroj and Duangjai Ochaikul. 2019. "Bioethanol from Cassava Starch Using <i>Amylomaces rouxii</i> TISTR 3182 and Immobilized <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5088" <i>Proceeding on the 5th EnvironmentAsia International Conference</i> : 245-255.