



ปัญหาพิเศษ



T097013

เรื่อง

ผลของแอลฟาไมเลสและกลูโคไมเลสที่ผลิตเป็นการค้า
ต่อการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งดิบ

Effect of α - Amylase and Glucoamylase Preparations
on Alcohol Fermentation of Raw Starch

โดย

ป.พ.
๑๕๑๒๗
๒๕๔๑

นายจิรวุฒน์ ทองบุญ
นายดุลยเทพ มังกรสินธุ์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 97013
วันที่ออก..... 1-5 2541

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร

Department of Agricultural Industry

Faculty of Agricultural Technology

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า

King Mongkut's Institute of Technology

เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Chaokuntabarn Ladkrabang

กรุงเทพฯ 10520

Bangkok 10520 Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ผลของแอลฟาไมเลสและกลูโคไมเลสที่ผลิตเป็นการค้า
ต่อการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งดิบ
Effect of α - Amylase and Glucoamylase Preparations
on Alcohol Fermentation of Raw Starch

โดย

นายจิรวัดน์ ทองบุญ
นายศุภเทพ มังกรสิทธิ์

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

(Signature)
.....
(นายวิชาญ ทองคำ)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

(Signature)
.....
(ศาสตราจารย์ ดร. ระพีพร หาเรือนกุล)
หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

- 7 ก.ค. 254๖ วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

รฟ.

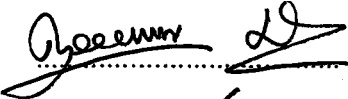
๗ 512 ๗

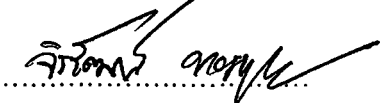
๒๕๔๐

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ในใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

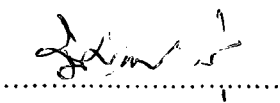
ดุสิตเทพ มังกรสินธุ์ และจิรวัดณ์ ทองบุญ 2541 : ผลของแอลฟาอไมเลสและกลูโคอไมเลสที่ผลิตเป็นการค้าต่อการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งดิบ (Effect of α - Amylase and Glucoamylase Preparations on Alcohol Fermentation of Raw Starch) . สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร ภาค วิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง . อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง . 40 หน้า .

การหมักแอลกอฮอล์จากข้าวเหนียวดิบโดยใช้เอนไซม์อไมเลสชนิดต่างๆ ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 เพื่อที่จะให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์มากที่สุด โดยใช้เอนไซม์ในหลายรูปแบบคือ ใช้แอลฟาอไมเลสเพียงตัวเดียว , แอลฟาอไมเลสกับกลูโคอไมเลสร่วมกัน และใช้แอลฟาอไมเลสร่วมกับการให้ความร้อน พบว่าการใช้กลูโคอไมเลสคือ optidex และ AMG ได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงที่สุดโดย optidex ได้ 9.1% และ AMG ได้ 8.9% หลังจากนั้นนำเอนไซม์ทั้งสองไปย่อยแป้ง 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวเหนียวดิบ , ข้าวเจ้าดิบ , แป้งมันสำปะหลัง , แป้งมันเทศ และแป้งมันฝรั่ง เพื่อหมักแอลกอฮอล์ พบว่าการใช้ optidex มีประสิทธิภาพดีกว่า AMG เล็กน้อย โดยการหมักแอลกอฮอล์จากข้าวเหนียวดิบให้ปริมาณแอลกอฮอล์มากที่สุด ข้าวเจ้าดิบ , แป้งมันสำปะหลัง และแป้งมันเทศได้ปริมาณแอลกอฮอล์รองลงมาตามลำดับ ส่วนแป้งมันฝรั่งจะได้แอลกอฮอล์น้อยที่สุดเพียง 2% และเมื่อขยายขนาดการหมักแอลกอฮอล์จากข้าวเหนียวดิบเป็น 3 ลิตร ซึ่งขยายปริมาณเป็น 30 เท่าของการทดลองในขวดหมัก พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จะสูงขึ้นเรื่อยๆ ใช้ระยะเวลาในการหมักนาน โดยได้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ 84 ชั่วโมงเท่ากับ 9.8%





ลายเซ็นนักศึกษา



ลายเซ็นอาจารย์ที่ปรึกษา

30 ธ.ค. 41

วันเดือนปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปยังหน่วยงานการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี เนื่องจากมีบุคคลหลายท่านให้ความช่วยเหลือ และสนับสนุนอย่างเต็มที่ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ที่ทำให้มีโอกาสได้ทำปัญหาพิเศษฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง ซึ่งให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้คำชี้แนะ ช่วยเหลือ และให้กำลังใจ จนประสบความสำเร็จ ขอขอบคุณที่ณัฐพล ฟ้าภิทยโณ ที่ให้ความช่วยเหลืองาน ทางด้านเอกสารด้วยดีเสมอ ขอขอบคุณ อมรินทร์ ตั้งจิระโชติ ที่เอื้อเฟื้อเครื่องพิมพ์ ขอขอบคุณพี่ๆ ห้องแล็บ และห้องธุรการทุกท่าน รวมทั้ง พี่นงๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจให้ด้วยดีเสมอมา และขอขอบคุณ อาจารย์ทุกท่าน , ภาควิชา , คณะ และสถาบัน ที่ตั้ง สอน อบรม ทุกสิ่งทุกอย่างจนสำเร็จการศึกษา **รวมเลือดเนื้อก็พันผูก ลูกเจ้าคุณ**



ดุสิตเทพ มังกรสินธุ์
จิรวัดน์ ทองบุญ
มีนาคม 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	2
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง	12
บทที่ 4 ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง	17
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	26
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก	28



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตารางแสดงองค์ประกอบของแป้งชนิดต่างๆ	3
2.2 ตารางแสดงขั้นตอนการผลิตแอลกอฮอล์ผ่านทาง Embden-Meyerhof-parnas pathway	8



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	แสดงโครงสร้างทางเคมีของไมโลส 2
2.2	แสดงโครงสร้างทางเคมีของไมโลเพคติน 3
2.3	แสดงแผนภาพ Embden-Meyerhof-parnas pathway 7
4.1	กราฟแสดงการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งข้าวเหนียวดิบโดยใช้ เอนไซม์ชนิดต่างๆ ร่วมกับเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc-90 17
4.2	แผนภูมิแสดงค่า Brix , pH , % Alcohol ที่วิเคราะห์ในน้ำหมักเมื่อ สิ้นสุดการหมักแป้งข้าวเหนียวดิบในการใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ร่วมกับ เชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc-90 18
4.3	กราฟแสดงการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งข้าวเหนียวสุกโดยใช้ เอนไซม์ชนิดต่างๆ ร่วมกับเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc-90 19
4.4	แผนภูมิแสดงค่า Brix , pH , % Alcohol ที่วิเคราะห์ในน้ำหมักเมื่อ สิ้นสุดการหมักแป้งข้าวเหนียวสุกในการใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ร่วมกับ เชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc-90 20
4.5	กราฟแสดงการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งชนิดต่างๆ โดยใช้ optidex ร่วมกับเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc-90 21
4.6	แผนภูมิแสดงค่า Brix , pH , % Alcohol ที่วิเคราะห์ในน้ำหมักเมื่อ สิ้นสุดการหมักแป้งชนิดต่างๆ ในการใช้ optidex ร่วมกับเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc-90 22
4.7	กราฟแสดงการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งชนิดต่างๆ โดยใช้ AMG ร่วมกับเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc-90 23
4.8	แผนภูมิแสดงค่า Brix , pH , % Alcohol ที่วิเคราะห์ในน้ำหมักเมื่อ สิ้นสุดการหมักแป้งชนิดต่างๆ ในการใช้ AMG ร่วมกับเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc-90 24
4.9	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์หาค่าต่างๆ ในการหมักแป้งข้าวเหนียว ระดับที่ขยายปริมาณ (Scale up) 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศกสิกรรม และสามารถผลิตสินค้าเกษตรเป็นจำนวนมากมาแล้ว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พืชที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบซึ่งทำรายได้ให้กับประเทศตลอดมา ได้แก่ ข้าวเจ้า ข้าวเหนียว ข้าวโพด มันสำปะหลัง ซึ่งในปัจจุบันวัตถุดิบทางการเกษตรเหล่านี้มีผลผลิตเพิ่มขึ้นมากแต่ราคาในตลาดโลกกลับมีราคาที่ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากการกีดกันทางการค้าและการแข่งขันเพิ่มสูงขึ้น จึงมีความคิดที่จะนำวัตถุดิบเหล่านี้มาทำการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นเพื่อเพิ่มมูลค่า ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่นิยมผลิตมีอยู่หลายชนิดด้วยกันแต่ที่นิยมผลิตอย่างแพร่หลายและมีมูลค่าสูงมากคือ แอลกอฮอล์เพราะแอลกอฮอล์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย อาทิเช่น เชื้อเพลิง เครื่องดื่ม ยา เป็นต้น การหมักแอลกอฮอล์ในปัจจุบัน ข้าวเป็นวัตถุดิบที่นิยมใช้กันมากเนื่องจากข้าวภายในประเทศมีปริมาณมากและหาได้ง่าย เดิมการผลิตแอลกอฮอล์จากแป้งจะต้องใช้พลังงานความร้อนทำให้แป้งสุกเสียก่อนแล้วใช้กรดหรือเอนไซม์ย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาล ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะสูญเสียพลังงานและค่าใช้จ่ายในปริมาณที่สูง การใช้เอนไซม์ย่อยแป้งดิบให้กลายเป็นน้ำตาลแล้วหมักแอลกอฮอล์ร่วมกับยีสต์จะช่วยประหยัดพลังงานและค่าใช้จ่ายในส่วนดังกล่าวได้ เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีอัตราการย่อยที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดเอนไซม์และชนิดของแป้งเป็นสำคัญ เพราะฉะนั้นในการหมักแอลกอฮอล์ถ้าได้แป้งที่มีความเหมาะสมและมีเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อย แอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ก็จะมีคุณภาพและปริมาณสูงขึ้น จึงเป็นเหตุผลสำคัญที่จะต้องมีการคัดเลือกเอนไซม์และแป้งที่เหมาะสมในการหมัก นอกจากนี้ยังช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายที่ไม่จำเป็นได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์

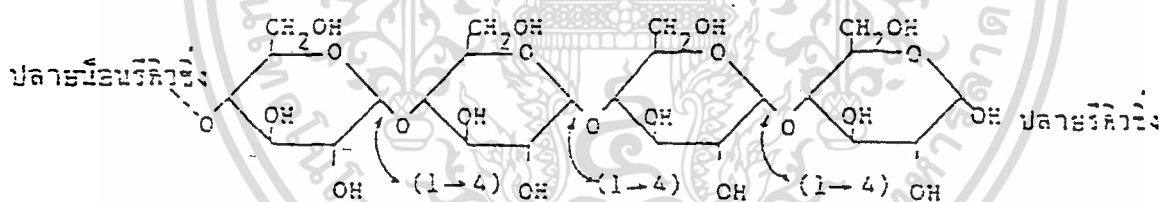
1. เพื่อศึกษาเอนไซม์อะไมเลสที่เหมาะสมในการย่อยแป้งดิบเพื่อหมักแอลกอฮอล์
2. เพื่อศึกษาผลของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้ทำการคัดเลือกแล้ว ในการย่อยแป้งชนิดต่างๆเพื่อหมักแอลกอฮอล์

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์

ในการผลิตแอลกอฮอล์นั้นแบ่งเป็นวัตถุดิบอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันมากแบ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากธรรมชาติโดยการสังเคราะห์แสงของพืช มีสูตรโมเลกุล ($C_6H_{10}O_5$)_n เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบไปด้วยกลูโคสต่อกันเป็นสายโซ่ยาวโดยปฏิกิริยาคอนเดนเซชัน ปฏิกิริยาการรวมตัวของกลูโคส 2 โมเลกุลจะสูญเสียน้ำ 1 โมเลกุล ในโมเลกุลของแป้งประกอบด้วยโครงสร้างที่แตกต่างกัน 2 ชนิดคือ อะไมโลสและอะไมโลเพคติน

อะไมโลส (amylose)

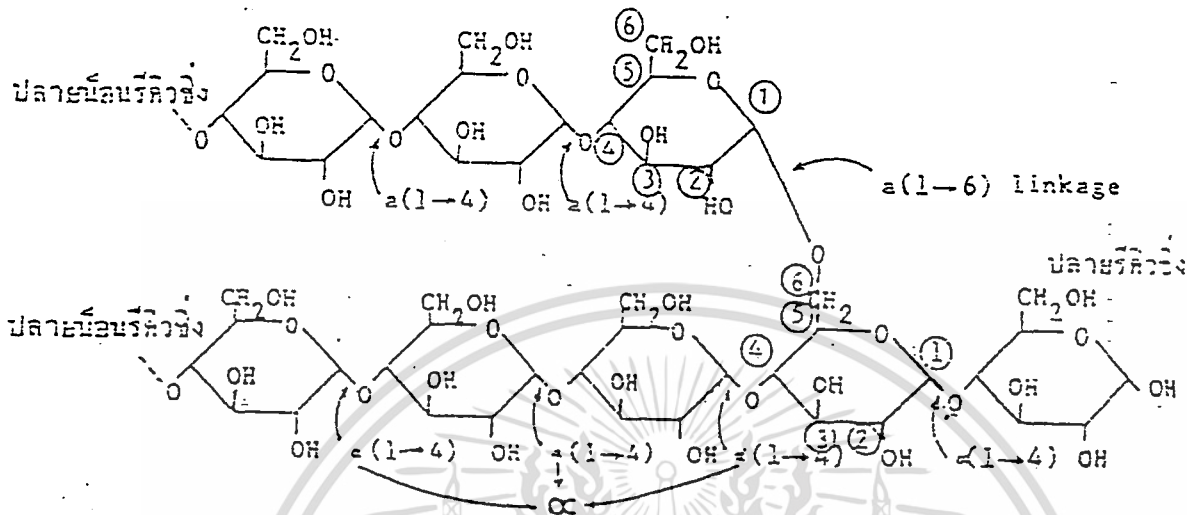
อะไมโลสประกอบด้วย ดีกลูโคสประมาณ 100 - 1000 หน่วยยึดติดกันด้วยพันธะ $\alpha(1-4)$ glycosidic linkage เป็นสายโซ่ยาว ไม่มีกิ่งก้านสาขาอะไมโลสเป็นส่วนที่ละลายน้ำได้ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนจะให้สีน้ำเงินเข้ม (intense blue) ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 2.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ amylose

อะไมโลเพคติน (amylopectin)

อะไมโลเพคตินประกอบด้วย ดีกลูโคสต่อกันเป็นสายโซ่ยาวด้วยพันธะ $\alpha(1-4)$ glycosidic linkage และ ดีกลูโคสแขนงแยกออกทุกๆ 20-30 หน่วยตรงจุดแยกกลูโคสจะต่อกันด้วยพันธะ $\alpha(1-6)$ glycosidic linkage อะไมโลเพคตินเป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำ และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนจะให้สีม่วงแดง ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2.2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ amylopectin

องค์ประกอบของแป้งชนิดต่างๆ

ชนิดของแป้ง	ความชื้น (%)	สตาร์ช (%)	เส้นใย (%)	อุณหภูมิจลาตินไนท์	อะไมโลส (%)	อะไมโลเพคติน (%)
ข้าวเหนียว	8.8	82.4	0.3	65-70-73	0.45	99.55
แป้งมัน	9.1	86.0	2.2	59-64-69	17	83

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงองค์ประกอบของแป้งชนิดต่างๆ

การพองตัวของเม็ดแป้ง

ในเม็ดแป้งจะมีการ polymerize ของลูกโซ่อะไมโลสและอะไมโลเพคตินอย่างใดอย่างหนึ่งด้วยไฮโดรเจนบอนด์ ทำให้แป้งไม่ละลายน้ำดังนั้นเม็ดแป้งจึงมีความต้านทานต่อการไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิห้องได้เมื่อนำเม็ดแป้งมาละลายน้ำและทำการให้ความร้อน โมเลกุลของน้ำจะสามารถเข้าสู่โมเลกุลของแป้งได้ เพราะที่อุณหภูมิสูงความร้อนสามารถแยกไฮโดรเจนบอนด์ออกได้ ทำให้ OH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อ³หา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

group ของแป้งที่อยู่ภายในโมเลกุลมีโอกาสจับกับน้ำและพองตัวขึ้น ยิ่งอุณหภูมิสูงขึ้นการพองตัวของแป้งก็จะมีมากขึ้นการพองตัวของเม็ดแป้งจะเพิ่มขึ้นหลายเท่าตัว และความหนืดของสารละลายแป้งก็จะมีมากขึ้นด้วย อุณหภูมิที่ทำให้เม็ดแป้งมีความหนืดเรียกว่า อุณหภูมิเจลาติไนเซชัน ช่วงของอุณหภูมิจะค่อนข้างกว้างและแตกต่างกัน ตามคุณสมบัติทางเคมีของแป้งแต่ละชนิด

การย่อยแป้งเป็นน้ำตาลมีขบวนการสองขั้นตอนคือ

1. Liquefaction เป็นขั้นตอนเพื่อลดความหนืดของแป้งที่ gelatinize แล้วโดยมีการย่อยโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม (random hydrolysis) ของลูกโซ่กลูโคสเมื่อการไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นจะทำให้ลูกโซ่กลูโคสแยกเป็นสายสั้นๆและมีความหนืดของโมเลกุลแป้งลดลงด้วย

2. Saccharification เป็นการไฮโดรไลซิสแป้งให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาล ดังนั้นหลังจากการย่อยแล้วจะได้ monosaccharide หรือ disaccharide หรือน้ำตาลที่มีโมเลกุลสูงกว่าบ้างเล็กน้อย ซึ่งจะเกิดเป็น กลูโคส มอลโทส หรือมอลโทไทรโอส

เอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยแป้ง

เอนไซม์ที่ย่อยแป้งมีดังนี้คือ

1. α -amylase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยภายในโมเลกุล (endohydrolase) ที่พันธะแอลฟา 1,4 ไกลโคซิดิก แต่ไม่สามารถย่อยพันธะ แอลฟา 1,6 ไกลโคซิดิกตรงที่จุดแขนง ได้สารผสมของโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) เอนไซม์นี้ต้องการแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เพื่อความคงตัวและกระตุ้นการทำงาน พบเอนไซม์นี้เสมอในพืช เนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกนมและจุลินทรีย์ ปัจจุบันสามารถสังเคราะห์ให้บริสุทธิ์จากข้าวมอลต์ บาร์เลย์ น้ำลาย และตับอ่อนของมนุษย์ และจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น *Bacillus Subtilis* , *Bacillus licheniformis* , *Aspergillus oryzae* , และ *Bacillus amuloliquefaciens* เป็นต้น

2. β -amylase (1,4- α -D-Glucan maltohydrolase , E.C. 3.2.1.2) เป็นเอนไซม์ที่พบมากในพืชชั้นสูง เช่น ข้าวมอลต์และมันเทศ เอนไซม์ชนิดนี้ย่อยโมดูลของแป้งที่พันธะ α -D(1,4) glucosidic bond จากปลายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติเป็นรีดิวซ์ (non reducing end) ที่ละสองโมเลกุลของกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยพันธะ α -D(1,6) glucosidic bond ทำให้ได้น้ำตาลมอลโทสเป็นส่วนใหญ่ และ limit dextrin โมเลกุลใหญ่ ๆ

3. **isoamylase** และ **pullulanase** เป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์ สามารถย่อยแบ่งได้เฉพาะตำแหน่ง α -D(1,6) glucosidic bond เท่านั้น ซึ่งจะตัดโมเลกุลของแป้งให้เป็นสายตรง ๆ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ของ oligosaccharide

4. **Glucosylase** (1,4- α -D-Glucan Glucanoglucosylase, E.C. 3.2.1.3) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) ได้อย่างสมบูรณ์โดยย่อยได้ทั้ง amylose และ amylopectin ที่ α -D(1,4) , α -D(1,2) และ α -D(1,6) glucosidic bond การเข้าย่อยของเอนไซม์จะย่อยจากปลายที่ไม่มีคุณสมบัติเป็นรีดิวซ์ (non reducing end) เข้ามาที่ละหนึ่งโมเลกุลของกลูโคส

เทอร์มามิล (Termamyl)

เป็นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสชนิดที่ทนความร้อนจาก *B.licheniformis* เป็นเอนไซม์ที่ย่อยภายในโมเลกุลอะไมโลสและอะไมโลเพคตินที่ พันธะแอลฟา 1,4 ไกลโคซิดิก ได้เดกซ์ทรินและโอลิโกแซ็กคาไรด์ มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการทำงานที่ 92 องศาเซลเซียส ส่วนแอลฟาอะไมเลสจาก *B.Subtilis* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 70 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อเอนไซม์เทอร์มามิล คือ 6-7

ความต้องการแคลเซียมไอออนเพื่อความคงตัวของเอนไซม์เทอร์มามิล จะต่ำกว่าเอนไซม์จาก *B.Subtilis* คือประมาณ 5 และ 150 ส่วนในล้านส่วนตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส 7 และเอนไซม์มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เอนไซม์เทอร์มามิลมีความคงตัวดีในสารละลายแคลเซียมไอออน 50-70 ส่วนในล้านส่วนมีค่าความเป็นกรดที่ 6-6.5 แต่จะถูกทำลายได้ง่ายที่ ค่าความเป็นกรด-เบสที่ 4.0 อุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส โดยมีครึ่งชีวิตประมาณ 0.2 นาทีและค่าความเป็นกรดที่-เบสที่ 3.5 จะมีครึ่งชีวิตเป็น 0 ส่วนกลูโคอะไมเลสจาก *A.niger* มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการทำงานที่ 60 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 4-4.5

AMG (Amyloglucosidase)

เป็นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *A.niger* จากการหมักเชื้อแบบเหลว เอนไซม์ชนิดนี้จะเข้าทำการย่อยแป้งที่พันธะแอลฟา 1,4 และ 1,6 ไกลโคซิดิก เป็นเอนไซม์สำเร็จรูปทางการค้าที่อยู่ในลักษณะของเหลวสีน้ำตาลแก่

E-5 (KLEISTASE E-5)

เป็นเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลสทางการค้าชนิดหนึ่ง

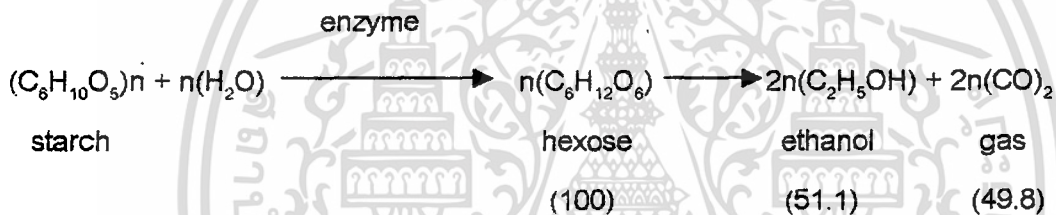
Optidex

เป็นเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสทางการค้าชนิดหนึ่ง

การเปลี่ยนน้ำตาลที่หมักให้ได้เป็นแอลกอฮอล์

ขบวนการหมักแอลกอฮอล์ที่รู้จักกันเป็นขบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ ในการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท เช่นน้ำตาลกลูโคส ภายใต้สภาพที่ไม่ต้องการอากาศทั้งนี้โดยอาศัยเชื้อยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* เชื้อยีสต์สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์ได้ โดยผ่านทาง glycolysis หรือ Embden-Meyerhof-Parnas pathway ดังรูปที่3

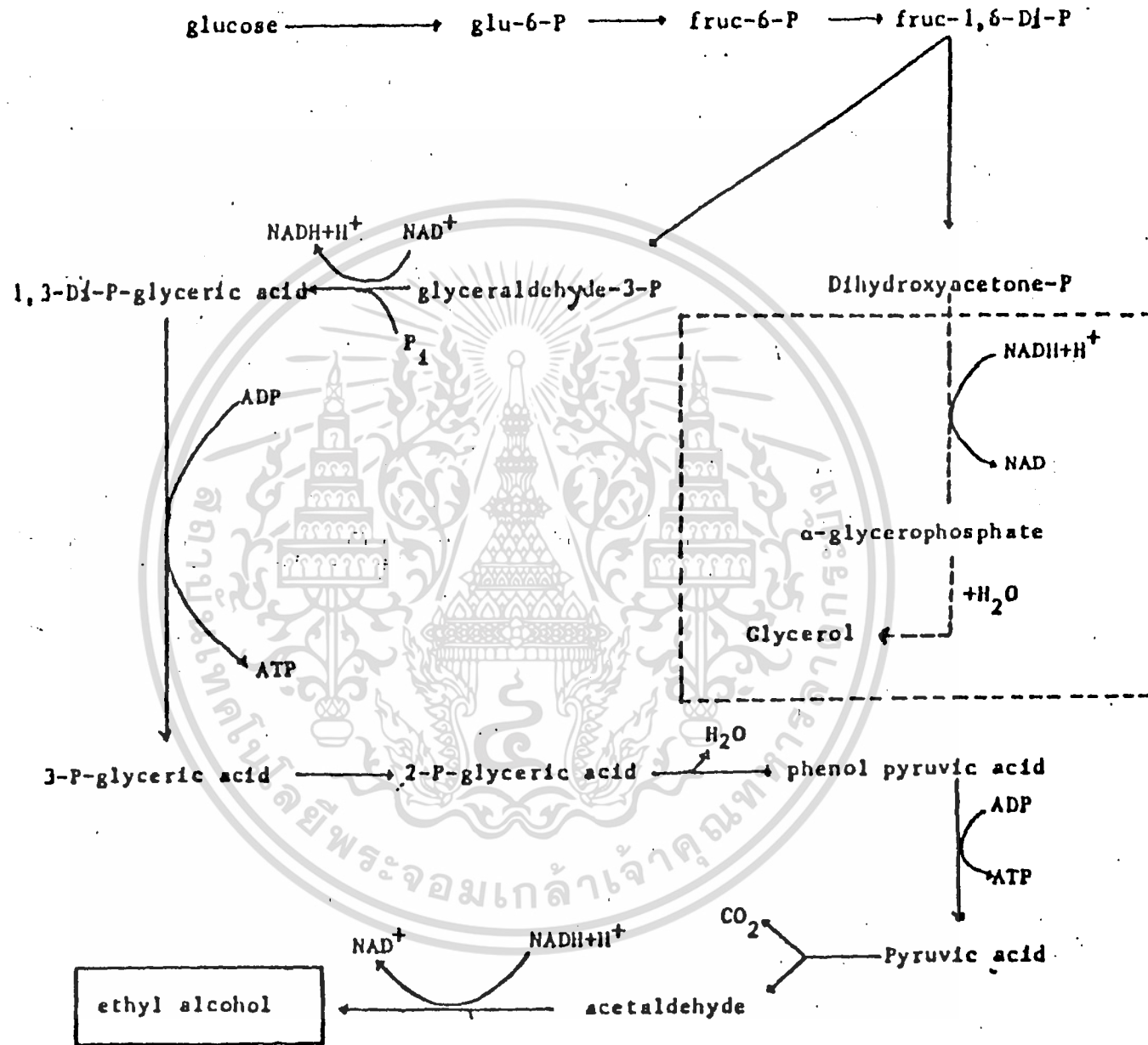
ตามทฤษฎียีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้ 51.1% และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9% โดยน้ำหนักของน้ำตาลดังสมการ



แต่ในทางปฏิบัติพบว่ายีสต์สามารถหมักน้ำตาลได้ประมาณ 95 % ให้เป็นแอลกอฮอล์ นอกจากนั้นยีสต์ใช้น้ำตาลที่เหลือสำหรับการเจริญเติบโตและเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่นๆดังนี้

1. ethanol	48.4%
2. carbondioxide	46.8%
3. acetaldehyde	0.0 – 0.03%
4. acetic acid	0.05 – 0.25%
5. glycerol	2.5 – 3.6%
6. lactic acid	0.0 – 0.2%
7. succinic	0.5 – 0.77%
8. fusel oil	0.25 – 0.5%
9. furfural	trace

ภาพที่ 2.3 แสดงแผนภาพ Embden-Meyerhof-Parnas pathway



ขั้นตอนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องข้องในการสร้างแอลกอฮอล์จากน้ำตาลโดยยีสต์ผ่านทาง
Embden-Meyerhof-parnas pathway

Step	Reaction	Enzyme	Type
1.	Glucose+ATP \longrightarrow glucose6+phosphate +ADP+H ⁺	Hexkinase	a
2.	Glucose- 6phosphate \rightleftharpoons fructose6 6-phosphate	Phosphoglucose Isomerase	c
3.	Fructose 6 -phosphate + ATP \longrightarrow fructose 1,6 - diphosphate+ATP+ H ⁺	Phosphofructokinase	a
4.	Fructose 1,6- diphosphate \rightleftharpoons Dihydroxyacetone phosphate+ Glyceraldehyde 3 phosphate	Aldolase	e
5.	Dihydroxyacetrone phosphate Glyceraldehyde 3-phosphate	Triose phosphate	c
6.	Glyceraldehyde 3-phosphate+Pi+NAD \rightleftharpoons 1,3diphosphoglycerate+NAD+ H ⁺	Glyceraldehyde 3-phosphate	f
7.	1,3 Diphosphoglycerate+ ATP \rightleftharpoons 3-phosphoglycerate+ATP	Phosphoglycerate Kinase	a
8.	3- phosphoglycerate \rightleftharpoons 2- phosphoglycerate	Phosphoglyceromutase	b
9.	2- phosphoglycerate \rightleftharpoons Phosphoenolpyruvate+H ₂ O	Enolase	d
10.	Phosphoenolpyruvate \longrightarrow pyruvate+ATP	Pruvate kinase	a
11.	Pyruvate +H ⁺ \longrightarrow acetadehyde	Pyrovate decarboxylase	
12.	Acetadehyde+NADH+ H ⁺ \longrightarrow Ethanol+NAD ⁺	Alcohol dehydrogenase	

ตารางที่ 2.2 แสดงขั้นตอนการผลิตแอลกอฮอล์ผ่านทาง Embden-Meyerhof-parnas .
pathway

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- reaction type : (a) Phosphoryl transfer
(b) Phosphoryl shift
(c) Isomerization
(d) Dehydration
(e) Aldol cleavage
(f) Phosphorylation coupled oxidation

ปัจจัยที่สำคัญต่อยีสต์ในการหมักแอลกอฮอล์

ในการทำให้เชื้อยีสต์เจริญและหมักแอลกอฮอล์ได้ดีที่สุด ปัจจัยที่สำคัญเกี่ยวกับการเจริญของยีสต์ได้แก่ ธาตุอาหาร เกลือแร่ วิตามิน อุณหภูมิ pH ความเข้มข้นของน้ำตาลและสารบางอย่างที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์

1. ผลของธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามินต่อการหมัก

เมื่อพิจารณาถึงผลของธาตุอาหารแต่ละชนิดต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ สามารถแยกออกเป็นพวกดังนี้

1.1 ไนโตรเจน ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 10% ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่ โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้ ammonium ions เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ แต่ในยีสต์บางชนิดต้องการกรดอะมิโนที่เฉพาะเท่านั้น เพราะกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นตัวควบคุมการทำงานของ glycolysis pathway สำหรับไนเตรทและไนไตรท์ ยีสต์โดยทั่วไปไม่สามารถนำมาใช้ได้ นอกจากยีสต์บางชนิด เช่น *Candida utilis*

แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์ นิยมใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นส่วนใหญ่

1.2 ฟอสฟอรัส โดยมากใช้ในรูปเกลือฟอสเฟต มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ เพราะฟอสฟอรัสจะควบคุมการสังเคราะห์ไขมันและคาร์โบไฮเดรตและรักษาสภาพของผนังเซลล์ ดังนั้นฟอสฟอรัสจึงเป็น ionic factor ที่สำคัญที่สุดในการหา อัตราการหมัก (rate of fermentation)

1.3 ซัลเฟอร์ ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบประมาณ 0.4% ของน้ำหนักแห้ง โดยอยู่ในรูปของเมไทโอนีน (methionine, amino acid) แต่เนื่องจากเมไทโอนีนมีราคาแพงมากดังนั้นในทางอุตสาหกรรมจึงใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแทน (เกลือ inorganic sulphate จะถูกเปลี่ยนเป็น methionine ภายในเซลล์ของยีสต์ แต่ต้องอาศัยพลังงาน 2 moles ATP / mole SO_4^{2-} reduce)

1.4 แร่ธาตุต่างๆ (Trace elements) แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการหมักของ ยีสต์แบ่งออกได้ 3 พวกได้แก่

1.4.1 macroelement ได้แก่ K,Mg,Ca,Zn,Fe,Mn,Cl, ยีสต์ต้องการ 0.1-1.0 mM

1.4.2 microelement ได้แก่ Co,B,Cd,Cu,I,Mo,Va ยีสต์ต้องการในระดับ 0.1-100 μ M

1.4.3 inhibitors Ag,As,Bd,Hg,Li,Ni,Os,Pd,Te ถ้ามีในระดับความเข้มข้นสูงกว่า 10-100 μ M จะมีผลในการยับยั้งเชื้อยีสต์

ในบางครั้งถ้ามี microelements และ macroelement ในปริมาณมากจะมีผลในการยับยั้งเชื้อ ยีสต์ในการหมักได้เช่นกัน

1.5 วิตามิน เป็นตัวควบคุม metabolism ของยีสต์ โดยจะทำการควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพราะวิตามินเป็น coenzyme หรือสารเริ่มต้นที่สามารถทำให้เอนไซม์ทำงานได้เต็มที่ วิตามินที่ ยีสต์ต้องการส่วนใหญ่จะเป็น ไบโอติกและแพนโทธีนิกแอซิด

1.6 Growth promoting factors ได้แก่ กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก กรดไขมัน และสเตอรอยด์ ซึ่งสารพวกนี้จะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์แอลกอฮอล์ เพื่อให้เพิ่มปริมาณของแอลกอฮอล์ Growth factor ที่สำคัญสำหรับยีสต์หลายชนิดได้แก่ inositol ในรูปของ Phosphatidyl inositol ทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสภาพของเมมเบรนของยีสต์ ซึ่งมีผลต่อการควบคุมอัตราการหมัก (rate of fermentation) ต่อไป

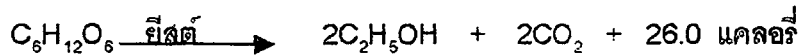
2. ผลของอุณหภูมิต่อการหมัก

อุณหภูมินับว่ามีความสำคัญมาก ระดับที่ยีสต์หมักแอลกอฮอล์ได้ดีสำหรับยีสต์ที่ใช้กันอยู่ตาม โรงงานโดยทั่วไปนั้นจะอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส และจะสามารถทนไปได้ถึง 37 องศาเซลเซียส ถ้ายีสต์เจริญไปมากพอแล้วอุณหภูมิสามารถเพิ่มขึ้นได้ถึง 40 องศาเซลเซียส

ถ้าอุณหภูมิในช่วง 10 ชั่วโมงแรกต่ำกว่า 37 องศาเซลเซียส อาจจะทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับ เชื้อแบคทีเรียขึ้นได้ และเป็นผลทำให้เชื้อยีสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ การหมักแอลกอฮอล์ใน ขณะที่มีอุณหภูมิสูง จะทำให้เกิดแอลกอฮอล์หนัก (fusel oil) ซึ่งจะมีผลต่อการมีเนและปวดหัวของผู้ บริโภคได้ การลดอุณหภูมิจะเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่าย แต่ก็คุ้มค่าถ้าสามารถหมักแอลกอฮอล์ได้ในระดับ 9-10% ภายในเวลา 24-36 ชั่วโมง

สาเหตุที่อุณหภูมิในระหว่างการหมักมีค่าเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากกิจกรรมของยีสต์ กล่าวคือ ในการหมักแอลกอฮอล์ กลูโคส 1 โมเลกุลจะให้ปริมาณความร้อน 26 แคลอรี ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงนี้ 10 และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ความร้อนที่เกิดขึ้นเป็นพวก exothermic energy ดังนั้นจึงถ่ายเทลงสู่น้ำหมักให้น้ำหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้น

3..ผลของ pH ต่อการหมัก

ยีสต์ชอบการเจริญในสภาวะที่เป็นกรดพอสมควร คือในระดับ pH 3.8-5.5 ถ้า pH ต่ำกว่า 3 ยีสต์ก็จะไม่เจริญ การปรับ pH ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ จะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาได้ เพราะแบคทีเรียชอบเจริญ ในสภาพที่ pH เป็นกลาง แต่มีแบคทีเรียบางชนิดที่สร้างกรดแลคติกและเจริญได้ดีในระดับที่เชื้อยีสต์เจริญได้ดี และมักสร้างปัญหาเมื่อแบคทีเรียพวกนี้สร้างกรดมากเกินไป

4.ผลของความเข้มข้นของเอทานอล

เอทานอลที่ได้จากการหมักเองจะมีผลในการยับยั้งการเจริญ และการหมักของเชื้อยีสต์ จะเห็นว่าเอทานอลมีความเข้มข้นที่สูงขึ้น อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ก็ลดลง ซึ่งจะทำให้อัตราในการหมักลดลงไปด้วย ทั้งนี้เนื่องจากเอทานอลไปมีผลต่อเอนไซม์และสรีรวิทยาของเซลล์ ในกรณีแรกเอทานอลจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase และ hexokinase ในกรณีหลังมีผลต่อเซลล์เมมเบรนของยีสต์ กล่าวคืออาจจะมีการทำลายให้เซลล์เมมเบรนของยีสต์เปลี่ยนแปลงไป

อย่างไรก็ตาม นอกจากการยับยั้งการหมักด้วยเอทานอลที่เกิดขึ้นแล้ว ยังต้องอาศัยปัจจัยอื่นๆ ควบคู่กันไปด้วย เช่น ความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงและอุณหภูมิที่สูง เป็นต้น ซึ่งจะมีผลต่อการยับยั้งเชื้อยีสต์อย่างรุนแรง

บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุประสงค์

1. ชำแหละเนื้อสัตว์ป่น ตราสิงห์โตคู่
2. แบ่งมันสำปะหลัง ตราปลามังกร
3. ข้าวเจ้า ตรามานุญครอง
4. แบ่งมันเทศ
5. แบ่งมันฝรั่ง

3.2 สารเคมี

1. Conc. H_2SO_4
2. KH_2PO_4
3. น้ำกลั่น
4. เอนไซม์กลูโคไมเลส (Optidex L300 , AMG 300L)
5. เอนไซม์แอลฟาไมเลส (Termamyl 120L , Kleistase E5)
6. NaCl

3.3 อุปกรณ์

1. ตะเกียง
2. loop
3. ขวดใส่อาหาร
4. หลอดดัดก้ำขา
5. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ
6. Magnetic stirrer , bar
7. pH meter
8. Refractometer
9. Ebullometer
10. Haemocytometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. กล้องจุลทรรศน์
12. เครื่องบดข้าว (Retsch miller)
13. หม้อนึ่งความดัน (Autocave)
14. ตู้ดูดควัน (Hood)
15. ตู้ป่มเชื้อ
16. ตู้เขี่ยเชื้อ
17. เครื่องชั่งน้ำหนัก
18. Shaker

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Malt extract
2. Yeast extract
3. Glucose
4. Agar
5. Peptone
6. Meat extract

3.5 เชื้อจุลินทรีย์

Saccharomyces cerevisiae Sc-90

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 เปรียบเทียบและคัดเลือกเอนไซม์อไมเลสชนิดที่เหมาะสมในการย่อยแป้งเพื่อหมักแอลกอฮอล์

1.) เลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 ใน Slant อาหาร MY agar ในตู้ป่มเชื้อ 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการนับเซลล์ยีสต์ด้วย Haemocytometer โดยในการเขี่ยเชื้อทุกครั้งจะลากยาว 2 ครั้ง โดย MY agar ในหลอดที่เตรียมจะเติม 5 มล. เท่ากันทุกหลอด หลอดที่ใช้จะขนาดเดียวกันทุกหลอดและเอียงเท่ากันทุกหลอด เพื่อให้พื้นที่ผิวหน้าเท่ากันทุกหลอดเป็นการควบคุมให้ปริมาณเชื้อยีสต์ที่ใช้มีปริมาณเท่ากันทุกๆ หลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.) บดข้าวเหนียวด้วยเครื่องบดข้าว (Retsch miller) โดยได้เม็ดแป้งข้าวเหนียวที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มม. นำไปตากแดดเพื่อไล่ความชื้น

3.) เติมแป้งข้าวเหนียว 20 กรัม ลงในขวดหมัก เติม NB ลงไป 100 มล. คนให้แป้งข้าวเหนียวละลาย เติมเอนไซม์อไมเลสชนิดต่างๆ ลงไป โดยในแต่ละขวดจะเติมเอนไซม์ไม่ซ้ำชนิดกัน เหย้าให้ละลายเข้ากัน นำขวดส่วนหนึ่งที่เติมเอนไซม์ Termamyl ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส คนจนแป้งข้าวเหนียวละลายหมด นำมาทำให้เย็นลง

รูปแบบการเติมเอนไซม์ชนิดต่างๆ ลงในแป้งข้าวเหนียว ทั้งนี้ไม่นำไปให้ความร้อน และนำไปให้ความร้อน แสดงได้ดังต่อไปนี้

ไม่นำไปให้ความร้อน

- 1.แอลฟาอไมเลส (Termamyl)
- 2.แอลฟาอไมเลส (E5)
- 3.กลูโคอไมเลส (Optidex)
- 4.กลูโคอไมเลส (AMG)
- 5.แอลฟาอไมเลส (Termamyl) + กลูโคอไมเลส (Optidex)
- 6.แอลฟาอไมเลส (Termamyl) + กลูโคอไมเลส (AMG)
- 7.แอลฟาอไมเลส (E5) + กลูโคอไมเลส (Optidex)
- 8.แอลฟาอไมเลส (E5) + กลูโคอไมเลส (AMG)

นำไปให้ความร้อน

- 9.แอลฟาอไมเลส (Termamyl)
- 10.แอลฟาอไมเลส (Termamyl) + กลูโคอไมเลส (Optidex)
- 11.แอลฟาอไมเลส (Termamyl) + กลูโคอไมเลส (AMG)

ปริมาณเอนไซม์ที่เติม

- แอลฟาอไมเลส (Termamyl , E5) 0.1 % ของน้ำหนักแป้ง
- กลูโคอไมเลส (Optidex , AMG) 1 % ของน้ำหนักแป้ง

4.) หลังจากเติมเอนไซม์ชนิดต่างๆ ลงไปแล้ว นำเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 ที่เลี้ยงไว้มาถ่ายลงในขวดหมักทุกขวดๆ ละ 1 หลอด ปิดขวดแต่

ละไปด้วยจุกยางซึ่งเสียบหลอดดักก๊าซเอาไว้ โดยในหลอดดักก๊าซแต่ละหลอดจะเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นเอาไว้หลอดละ 1 มล. เพื่อดักก๊าซและสารประกอบอื่นๆ ที่เกิดจากขบวนการหมักเอาไว้ โดยยอมให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านได้อย่างเดียว

5.) นำขวดแต่ละใบไปชั่งน้ำหนักเริ่มต้น บันทึกค่าเริ่มต้นเอาไว้ หลังจากนั้นคอยสังเกตและชั่งน้ำหนักขวด บันทึกค่าน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปทุกๆ 24 ชั่วโมง (ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น) จนค่าน้ำหนักขวดที่ได้คงที่ไม่มีมีการเปลี่ยนแปลง หลังจากนั้นนำน้ำหนักในแต่ละขวดมาวิเคราะห์หาค่า %Alcohol , Brix , pH

3.6.2 ทดลองผลของเอนไซม์อไมเลสที่ได้คัดเลือกแล้วในการย่อยแป้งชนิดต่างๆ เพื่อหมักแอลกอฮอล์

ทำการทดลองเหมือนกับข้อ 3.6.1 แต่ใช้เอนไซม์อไมเลสชนิดที่หมักแล้วเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และ %Alcohol ขึ้นมากที่สุด และมีความเหมาะสมมากที่สุดโดยคำนึงถึงความประหยัดและความสะดวกในการใช้งาน โดยทดลองกับแป้งชนิดต่างๆ คือ แป้งข้าวเหนียว , แป้งมันสำปะหลัง , แป้งข้าวเจ้า , แป้งมันเทศ และแป้งมันฝรั่ง

3.6.3 ทดลองหมักแอลกอฮอล์จากแป้งข้าวเหนียวในระดับที่ขยายปริมาณเพิ่มมากขึ้น (Scale up)

1.) เลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 ใน Slant อาหาร MY agar ในตู้ปัมเชื้อ 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาถ่ายลงในอาหาร MY broth 300 มล. (หัวเชื้อ 10 % ของน้ำหนัก) 1 หลอด นำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ทิ้งไว้ 18-24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

2.) เติมแป้งข้าวเหนียว 600 กรัม ลงในโหลแก้วที่ใช้เป็นถังหมัก เติมน้ำกลั่นลงไป 3 ลิตร คนให้แป้งข้าวเหนียวละลาย เติมเอนไซม์อไมเลสชนิดที่ได้คัดเลือกแล้วลงไปตามปริมาณ % ของเอนไซม์ชนิดนั้นที่ใช้ต่อน้ำหนักแป้งที่เติม คนให้ละลายเข้ากัน เติม KH_2PO_4 ลงไป 16.5 กรัม (0.5 %) เพื่อเป็นตัว buffer รักษา pH ให้คงที่ประมาณ 4.5 คนให้ละลายเข้ากัน หลังจากนั้นนำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 1. มาเติมลงในถังหมัก คนให้ละลายเข้ากัน นำถังหมัก (โหลแก้ว) ไปวางบน Magnetic stirrer โดยมีแผ่นโฟมวางรองอยู่เพื่อกันความร้อนที่เกิดขึ้นจาก Magnetic stirrer ถ่ายเทสู่ถังหมัก

หย่อน Magnetic bar ลงไปในถังหมักเพื่อใช้แทนใบพัดในถังหมัก ปรับระดับการหมุนของ Magnetic bar ไปที่ระดับ 7 นำแผ่นพลาสติกมารัดปิดปากถังหมัก (โหลแก้ว) เอาไว้ป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งต่างๆ

3.) เก็บตัวอย่างเริ่มต้น และทุกๆ วัน โดยเก็บทุกๆ 6 ชั่วโมงใน 1 วัน (เช้า, เที่ยง, เย็น) มาวิเคราะห์หาค่า %Alcohol , Brix และ pH เป็นเวลาประมาณ 3-4 วัน

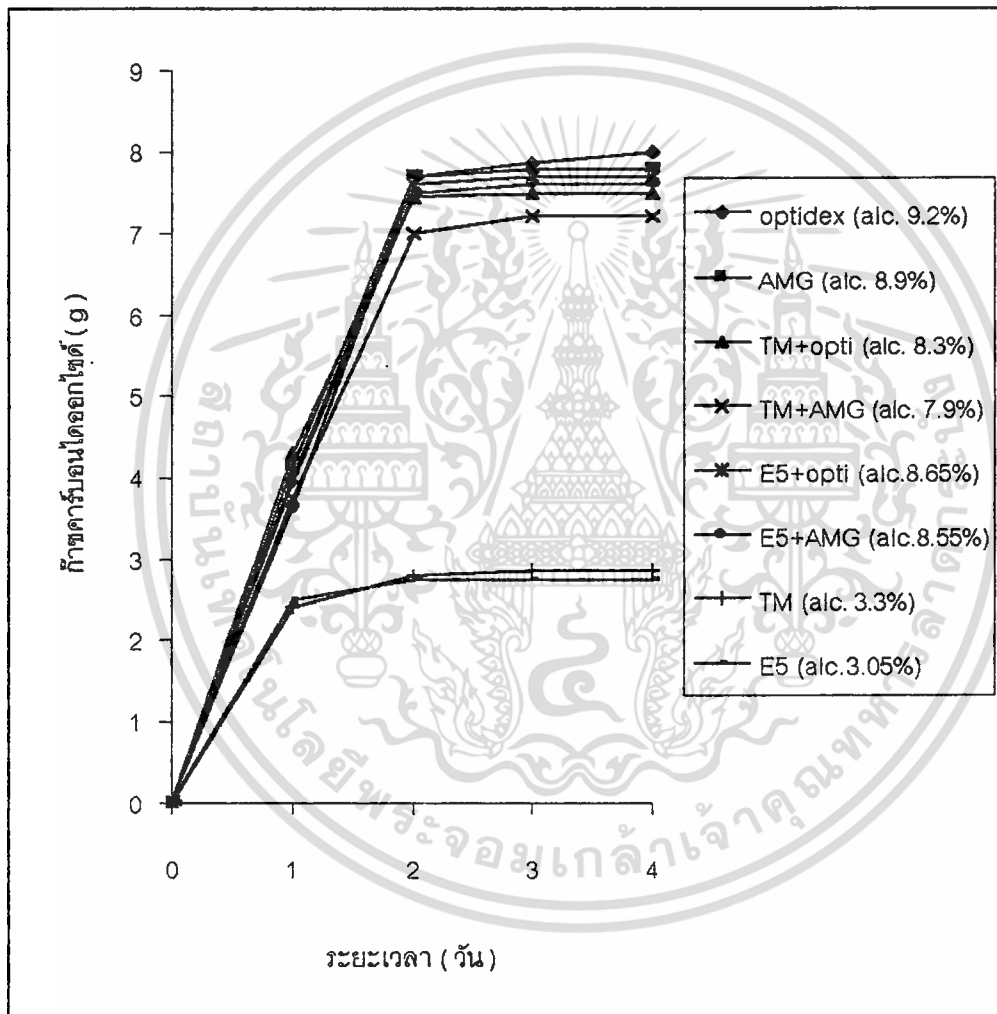


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อที่ 16 และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 เปรียบเทียบและคัดเลือกเอนไซม์อไมเลสชนิดที่เหมาะสมในการย่อยแป้งเพื่อหมักแอลกอฮอล์

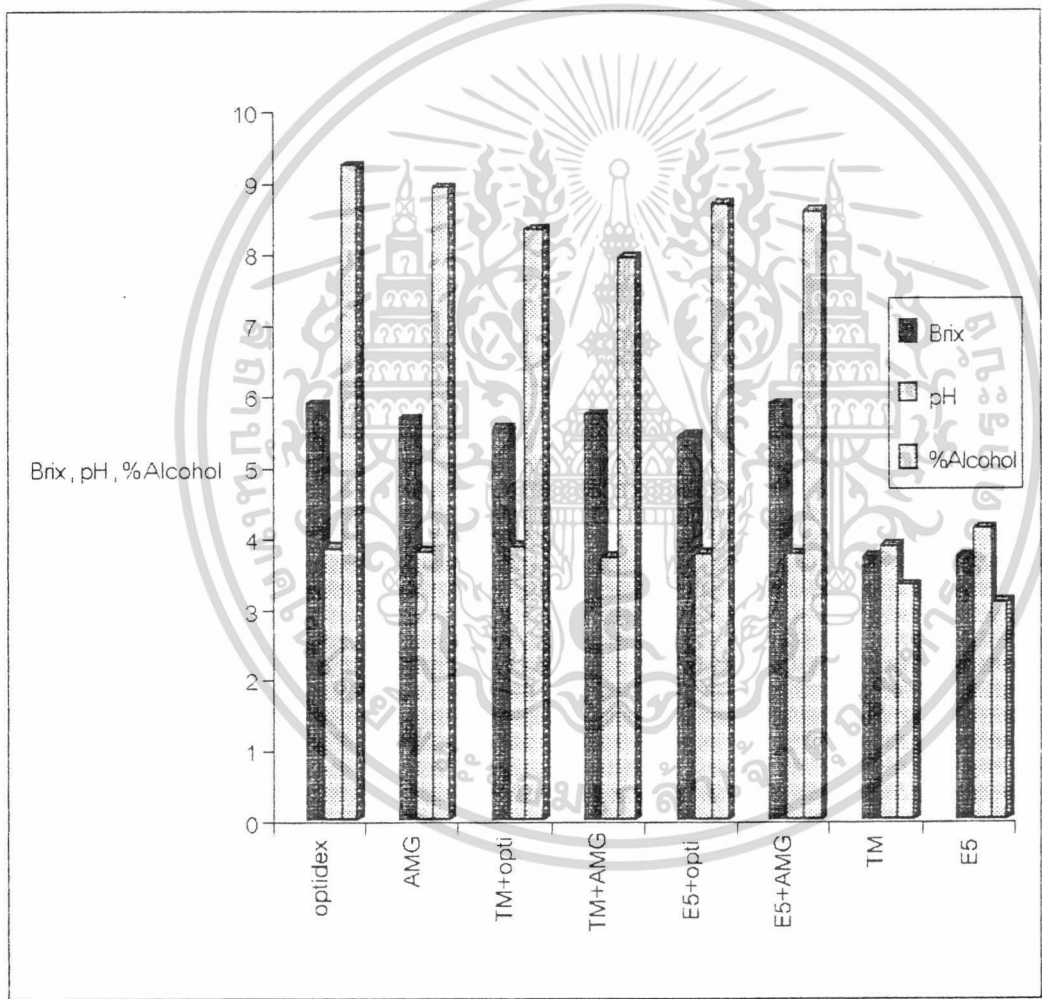


ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งข้าวเหนียวดิบโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

97013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

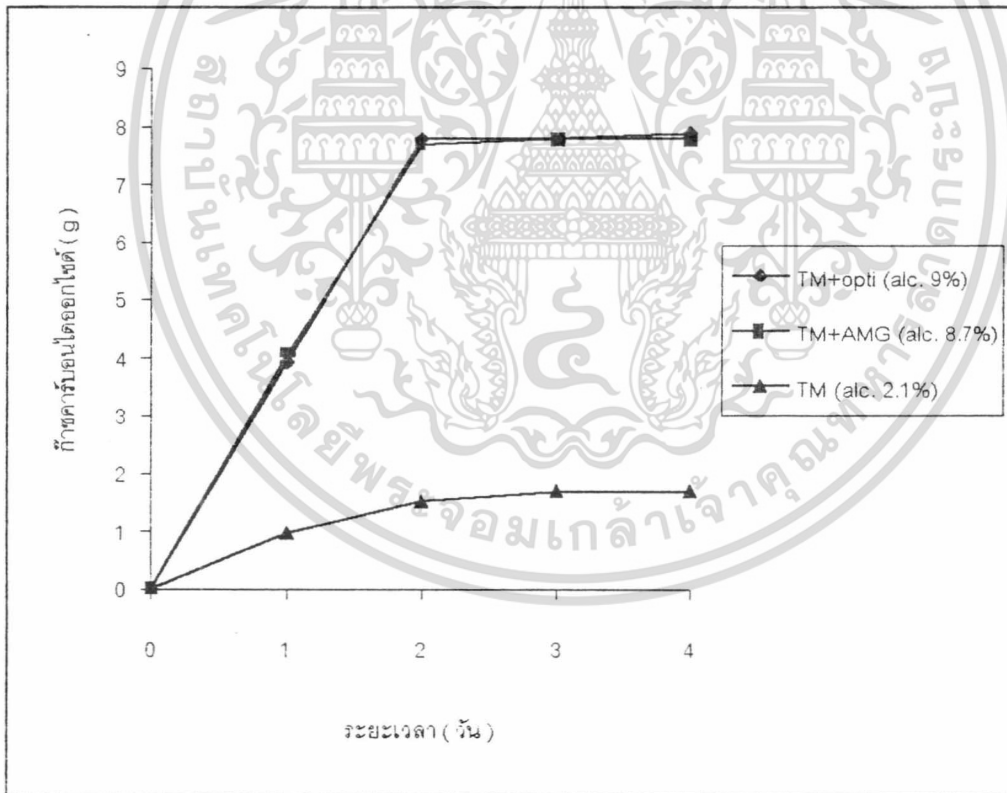
จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในแต่ละวันในขวดหมักที่เติมเอนไซม์ชนิดต่างๆ กันร่วมกับ Sc-90 จากกราฟที่ได้จะสัมพันธ์กันกับ แอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น คือเมื่อเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นมาก แสดงว่าเกิดการหมักขึ้นดี แอลกอฮอล์ที่ได้ก็จะมาก โดยในขวดที่เติม optidex ลงไปตัวเดียวจะเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มากที่สุดและได้แอลกอฮอล์มากที่สุดคือ 9.2 % , ค่า Brix 5.85 และ pH 3.83



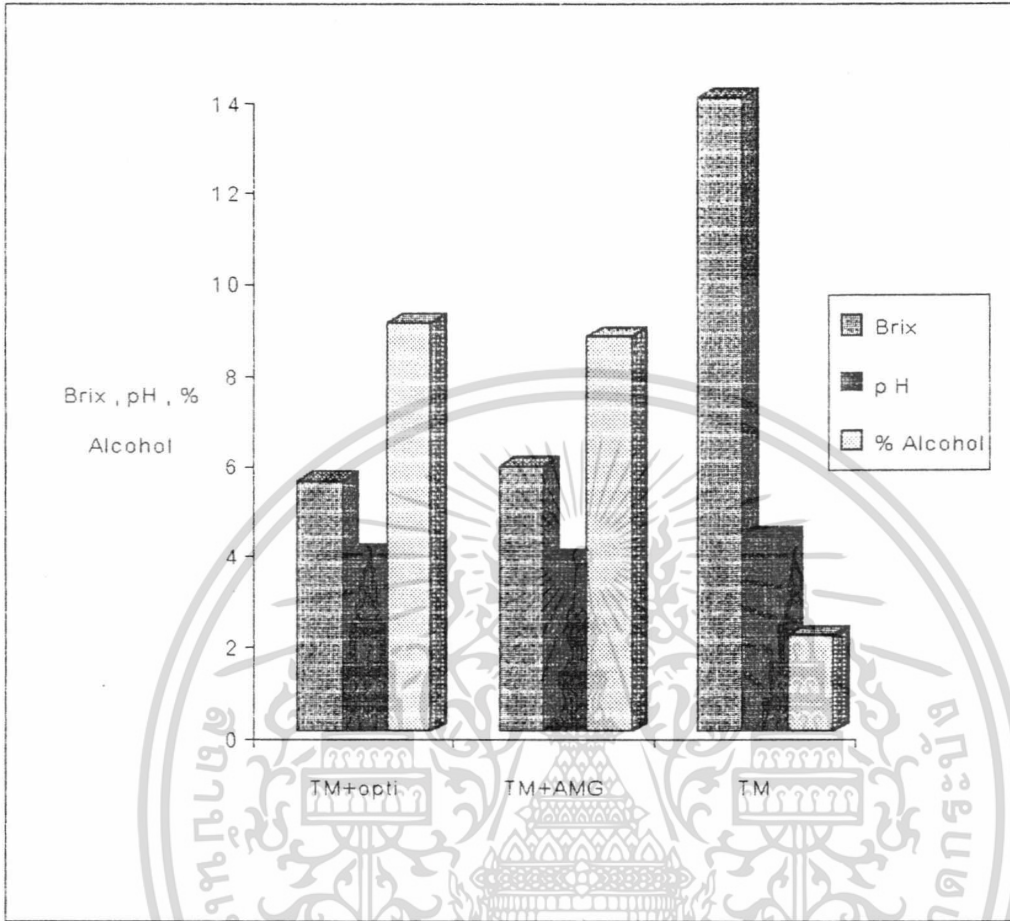
ภาพที่ 4.2 แผนภูมิแสดงค่า Brix , pH , % Alcohol ที่วิเคราะห์ในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการหมักแป้งข้าวเหนียวดิบในการใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากแผนภูมิ แอลกอฮอล์ที่ได้จะสัมพันธ์กับค่า Brix ซึ่งเมื่อ Brix มากแอลกอฮอล์ก็จะได้มากตามไปด้วย เนื่องจากมีการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลยีสต์สามารถนำไปใช้ในขบวนการหมักได้มาก จึงได้แอลกอฮอล์มากตามไปด้วย ส่วนในการเติม Tm (Termamyl) หรือ E5 ลงไปแล้วได้แอลกอฮอล์น้อยนั้นเกิดจากเอนไซม์ทั้งสองตัวนี้เป็นแอลฟาไมเลส (ย่อยพันธะ 1,4 glycosidic bond เพียงอย่างเดียว) ซึ่งย่อยแบบสุ่มได้ เดกซ์ทริน, โอลิโกแซคคาไรด์ เป็นส่วนใหญ่และได้น้ำตาลกลูโคสน้อย ยีสต์จึงไม่สามารถนำไปใช้หมักแอลกอฮอล์ได้ดี แอลกอฮอล์ที่ได้จึงน้อย ส่วนในขวดที่เติมกลูโคไมเลสเพียงอย่างเดียว และขวดที่เติมกลูโคไมเลสกับแอลฟาไมเลส จะให้แอลกอฮอล์สูงใกล้เคียงกัน และค่า pH ที่วัดได้ในทุกขวดก็จะอยู่ในช่วงที่ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดี แสดงว่าการหมักที่ได้แอลกอฮอล์ต่ำไม่ได้เกิดจาก pH ที่ต่ำลงจนยับยั้งการหมักของยีสต์



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งข้าวเหนียวสุกโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

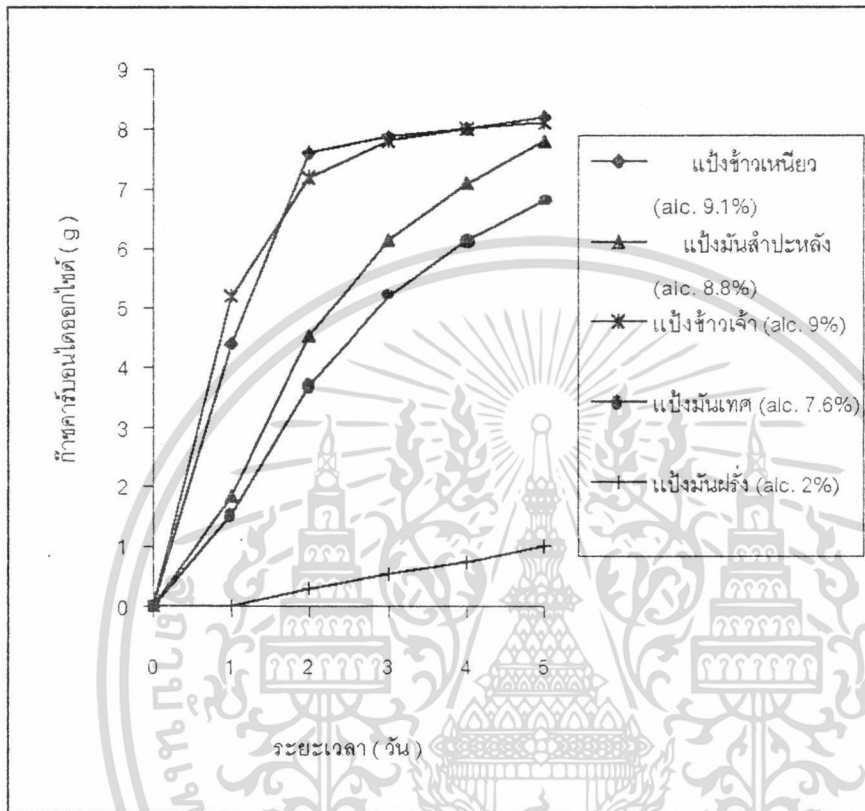


ภาพที่ 4.4 แผนภูมิแสดงค่า Brix , pH , % Alcohol ที่วิเคราะห์ในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการหมักแป้งข้าวเหนียวสุกในการใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

จากแผนภูมิจะเห็นว่า Brix และ แอลกอฮอล์ที่ได้จะสัมพันธ์กัน โดยเมื่อ Brix มาก แอลกอฮอล์ที่ได้ก็จะมากตามไปด้วยเช่นเดียวกันกับในกรณีของแป้งข้าวเหนียวดิบ ส่วนในขวดที่เติม Tm (Termamyl) ซึ่งเป็นเอนฟาอไมเลสเพียงตัวเดียวนั้น จะย่อยแป้งแบบสุ่มได้ เดกซ์ตริน , โอลิโกแซคคาไรด์ มาก ซึ่งยีสต์ไม่สามารถนำไปใช้ในขบวนการหมักได้ แอลกอฮอล์ที่ได้จึงน้อย โดยที่ค่า Brix จะสูง

จากการทดลองในข้อนี้ได้คัดเลือกเอนไซม์ที่เติมลงไปแล้วย่อยแป้งแล้วหมักให้ปริมาณแอลกอฮอล์มากที่สุด โดยคำนึงถึงความประหยัดพลังงานคือไม่ต้องต้ม , ประหยัดเอนไซม์คือใช้เพียงชนิดเดียว และสะดวกไม่ยุ่งยากในการทำงาน ได้แก่ Optidex ได้แอลกอฮอล์ 9.2 % และ AMG ได้แอลกอฮอล์ 8.9 % ซึ่งจะนำเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ไปใช้ในการทดลองข้อต่อไป

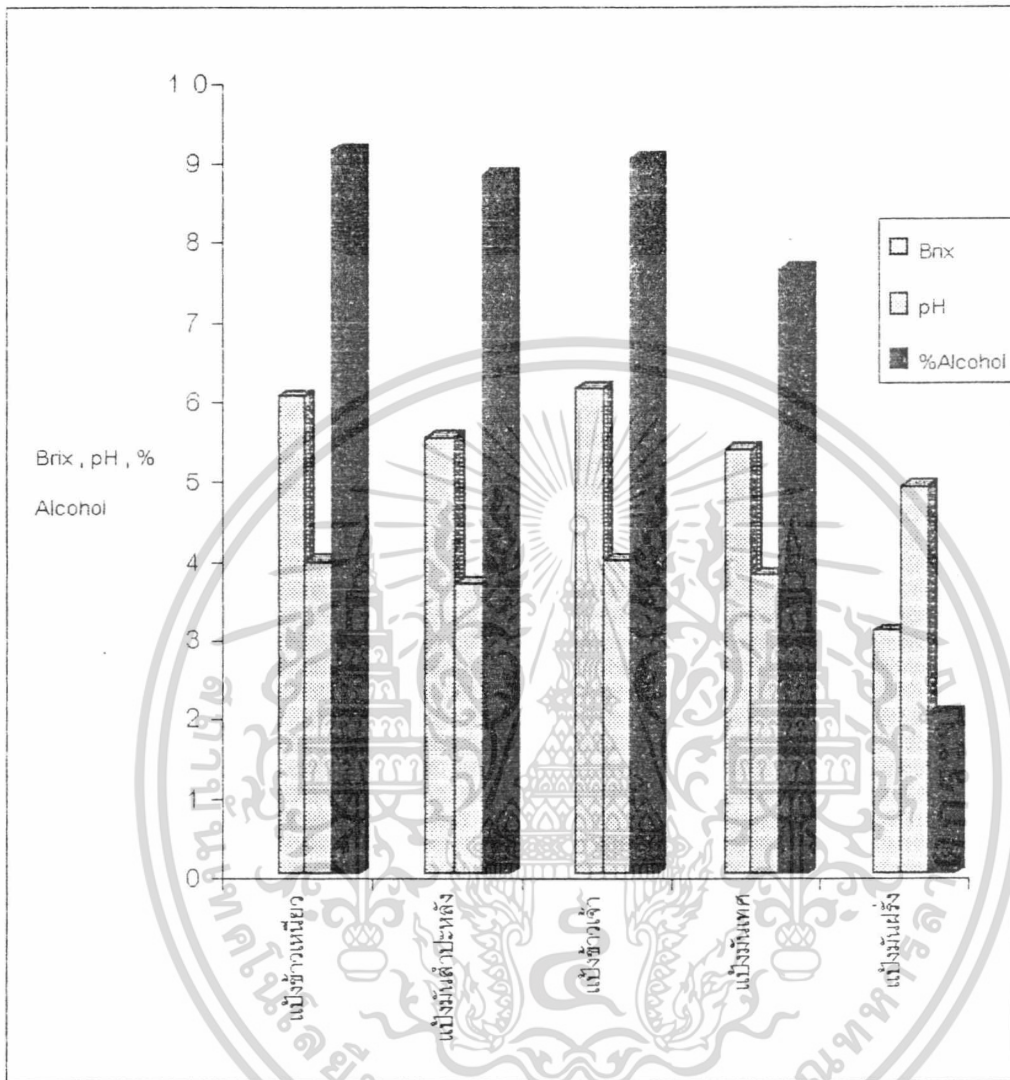
4.2 ทดลองผลของเอนไซม์อไมเลสที่ได้คัดเลือกแล้วในการย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ เพื่อหมักแอลกอฮอล์



ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งชนิดต่างๆ โดยใช้ optidex ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในแต่ละวันในขวดหมักที่เติมแป้ง 5 ชนิด ต่างๆกันคือ แป้งข้าวเหนียว, แป้งมันสำปะหลัง, แป้งข้าวเจ้า, แป้งมันเทศ และแป้งมันฝรั่ง ซึ่งใช้ optidex ในการย่อย โดยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นมาก แอลกอฮอล์ที่ได้ก็จะมากตามไปด้วยสัมพันธ์กัน โดยแป้งที่ย่อยแล้วหมักได้แอลกอฮอล์มากที่สุดคือ แป้งข้าวเหนียว 9.1 % ซึ่งใกล้เคียงกับแป้งข้าวเจ้าคือ 9.0 %

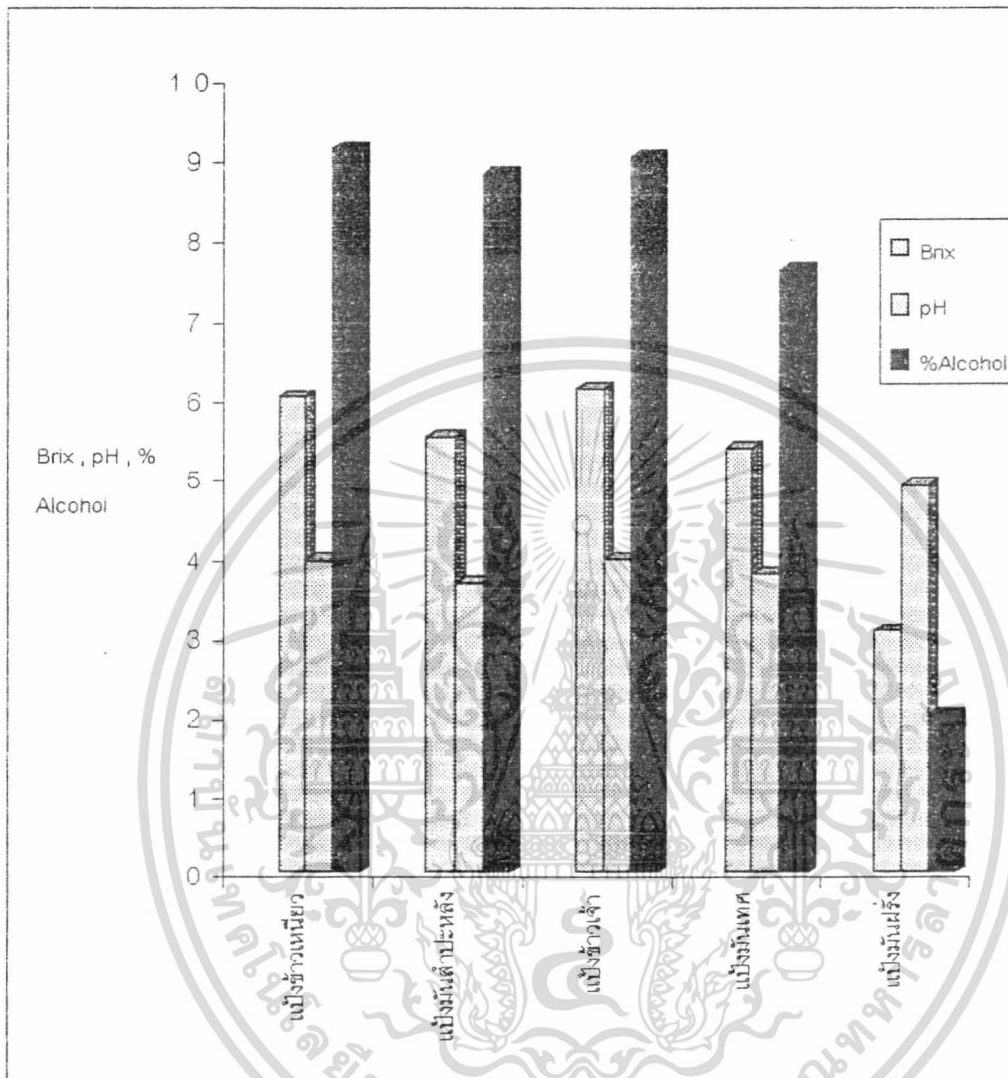
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 แผนภูมิแสดงค่า Brix , pH , % Alcohol ที่วิเคราะห์ในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการหมักแป้งชนิดต่างๆ ในการใช้ optidex ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

จากแผนภูมิ แอลกอฮอล์ที่ได้จะสัมพันธ์กับค่า Brix ซึ่งเมื่อ Brix มาก แอลกอฮอล์ก็จะได้มากตามไปด้วย โดยแป้งข้าวเหนียวกับแป้งข้าวเจ้าได้แอลกอฮอล์มากใกล้เคียงกันคือ 9.1 และ 9.0 % ตามลำดับ รองลงมาคือ แป้งมันล้าปะหลัง 8.8 % , แป้งมันเทศ 7.6 % และแป้งมันฝรั่ง 2.0 % ตามลำดับ สาเหตุที่ในแป้งมันฝรั่งได้ค่า Brix และแอลกอฮอล์ต่ำเกิดจากในโมเลกุลของแป้งมีหมู่ฟอสเฟตแทรกอยู่ระหว่างกลูโคสที่จับกันทำให้เอนไซม์ไม่สามารถย่อยได้ ค่า Brix และแอลกอฮอล์ จึงน้อย

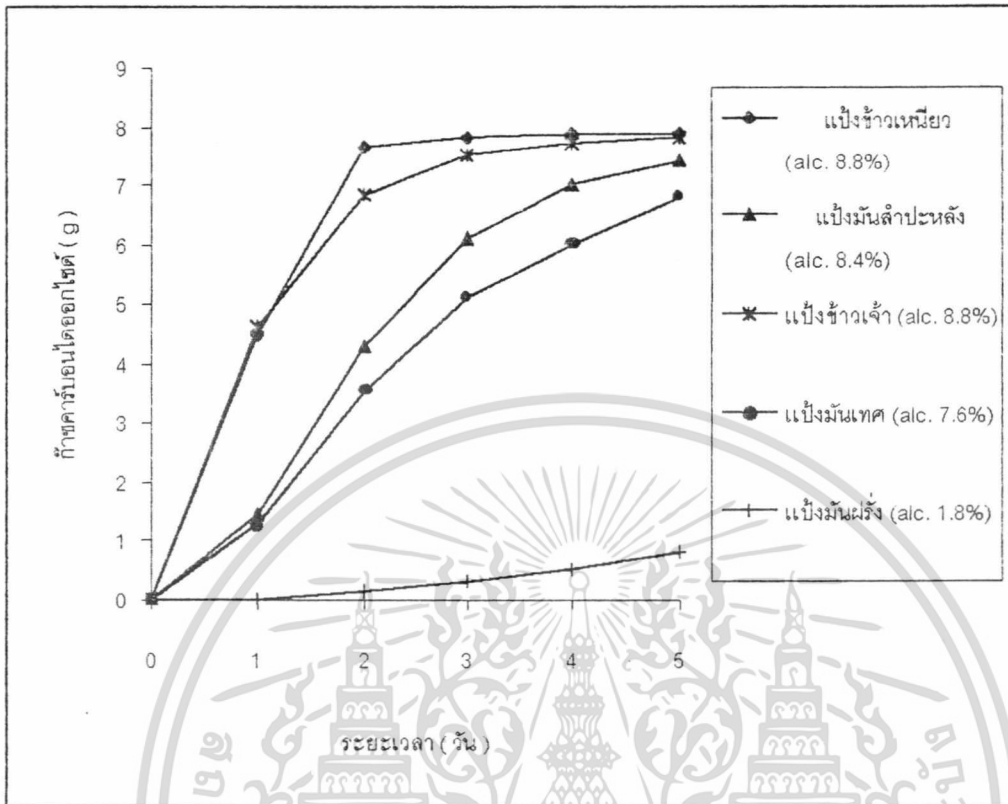
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 แผนภูมิแสดงค่า Brix , pH , % Alcohol ที่วิเคราะห์ในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการหมักแป้งชนิดต่างๆ ในการใช้ optidex ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

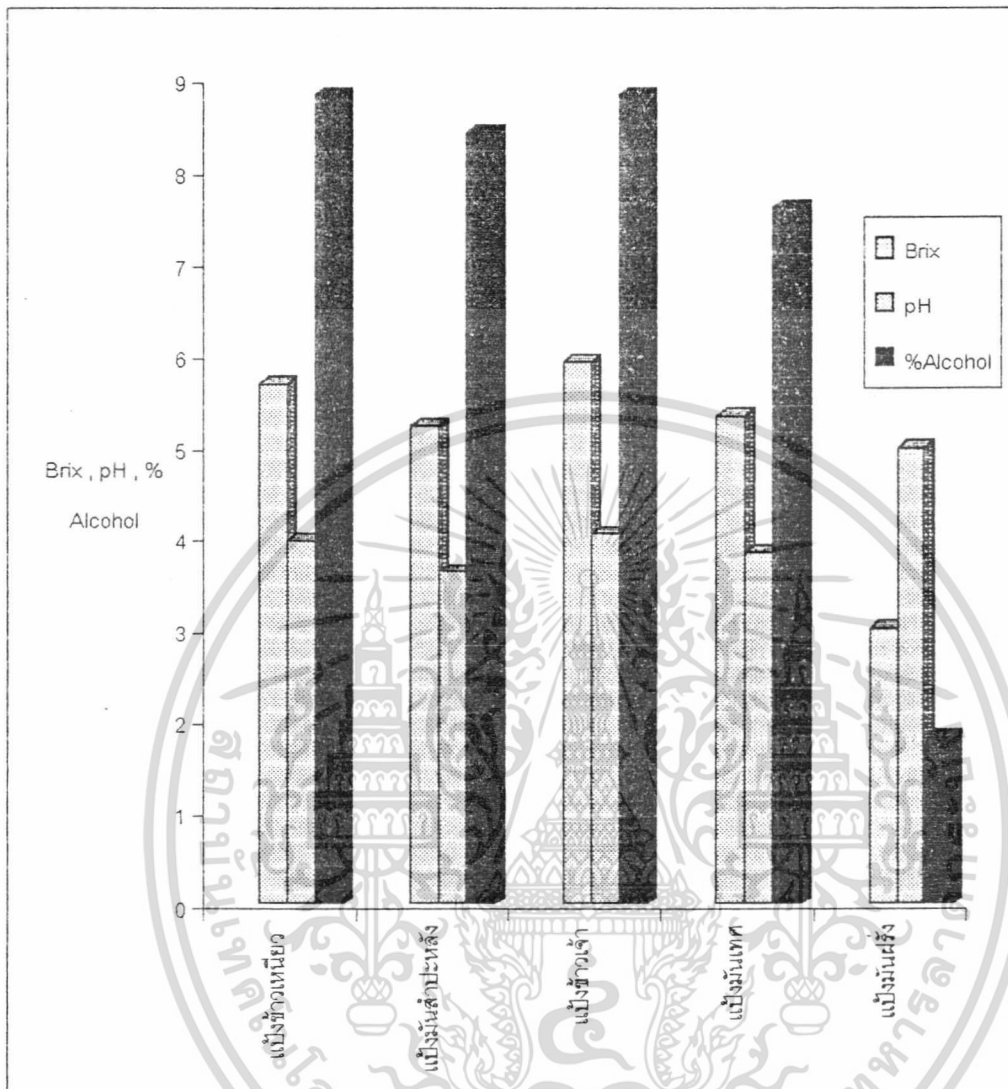
จากแผนภูมิ แอลกอฮอล์ที่ได้จะสัมพันธ์กับค่า Brix ซึ่งเมื่อ Brix มาก แอลกอฮอล์ก็จะได้มากตามไปด้วย โดยแป้งข้าวเหนียวกับแป้งข้าวเจ้าได้แอลกอฮอล์มากใกล้เคียงกันคือ 9.1 และ 9.0 % ตามลำดับ รองลงมาคือ แป้งมันสำปะหลัง 8.8 % , แป้งมันเทศ 7.6 % และแป้งมันฝรั่ง 2.0 % ตามลำดับ สาเหตุที่ในแป้งมันฝรั่งได้ค่า Brix และแอลกอฮอล์ต่ำเกิดจากในโมเลกุลของแป้งมีหมู่ฟอสเฟตแทรกอยู่ระหว่างกลูโคสที่จับกันทำให้เอนไซม์ไม่สามารถย่อยได้ ค่า Brix และแอลกอฮอล์ จึงน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงการหมักแอลกอฮอล์จากแปะงชนิดต่างๆ โดยใช้ AMG ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

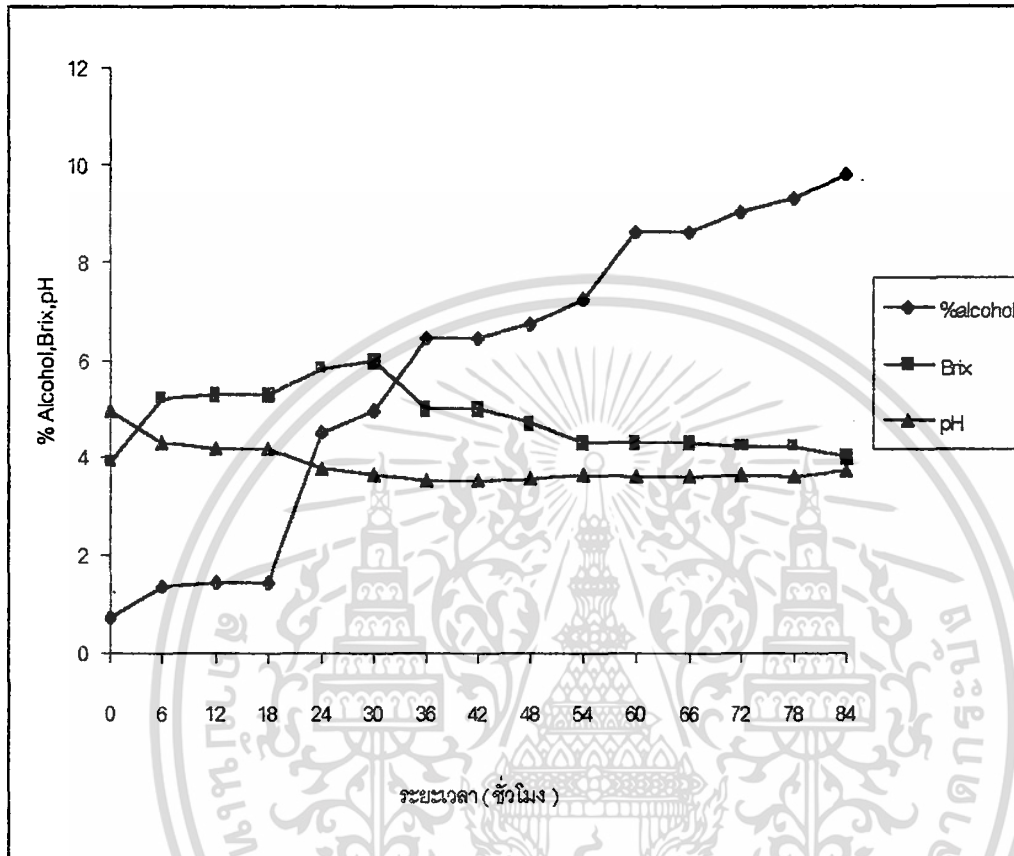
จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณก้ำคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในแต่ละวันในขวดหมักที่เติมแปะง 5 ชนิด ต่างๆกันคือ แปะงข้าวเหนียว, แปะงมันล่ำปะหลัง, แปะงข้าวเจ้า, แปะงมันเทศ และแปะงมันฝรั่ง ซึ่งใช้ AMG ในการย่อย พบว่าให้ผลใกล้เคียงกับการใช้ optidex โดยแปะงที่ย่อยแล้วหมักได้แอลกอฮอล์มากที่สุดคือ แปะงข้าวเหนียว 8.8 % ซึ่งเท่ากับแปะงข้าวเจ้าคือ 8.8 %



ภาพที่ 4.8 แผนภูมิแสดงค่า Brix , pH , % Alcohol ที่วิเคราะห์ในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการหมักแป้งชนิดต่างๆ ในการใช้ AMG ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

จากแผนภูมิ ค่าต่างๆที่วิเคราะห์ได้จะใกล้เคียงกับเมื่อใช้ optidex โดยแป้งข้าวเหนียวกับแป้งข้าวเจ้าได้แอลกอฮอล์เท่ากันคือ 8.8 % รองลงมาคือ แป้งมันสำปะหลัง 8.4 % , แป้งมันเทศ 7.6 % และแป้งมันฝรั่ง 1.8 % ตามลำดับ

4.3 ทดลองหมักแอลกอฮอล์จากแป้งข้าวเหนียวในระดับที่ขยายปริมาณ (Scale up)



ภาพที่ 4.9 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์หาค่าต่างๆ ในการหมักแป้งข้าวเหนียวระดับที่ขยายปริมาณ (Scale up)

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Alcohol , Brix และ pH ที่เกิดขึ้นที่ชั่วโมงต่างๆ ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จะสูงขึ้นเรื่อยๆ ไม่คงที่ โดยได้ 9.8 % ที่ 84 ชั่วโมง ซึ่งจะสัมพันธ์กับค่า Brix ซึ่งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงแรกเนื่องจากการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลมาก และหลังจากนั้น Brix จะลดลงเนื่องจากยีสต์จะนำน้ำตาลไปใช้ในขบวนการหมักได้แอลกอฮอล์ออกมา ส่วน pH จะลดลงเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่ในช่วงที่ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดี

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. ในการหมักแอลกอฮอล์จากข้าวเหนียวดิบโดยใช้ไมเลสชนิดต่างๆ ร่วมกับ *S. cerevisiae* Sc-90 พบว่าการใช้กลูโคไมเลส (optidex , AMG) จะให้ผลการหมักได้แอลกอฮอล์สูงกว่าการใช้กลูโคไมเลสร่วมกับแอลฟาไมเลส (Termamyl , E5) และการใช้แอลฟาไมเลสเพียงอย่างเดียว

2. การหมักแอลกอฮอล์จากแป้งชนิดต่างๆ โดยใช้กลูโคไมเลสร่วมกับ *S. cerevisiae* Sc-90 พบว่าการใช้ optidex มีประสิทธิภาพดีกว่า AMG เล็กน้อย โดยการหมักแอลกอฮอล์จากข้าวเหนียวดิบให้ปริมาณแอลกอฮอล์มากที่สุด และข้าวเจ้าดิบ , แป้งมันสำปะหลัง และแป้งมันเทศ ได้ปริมาณแอลกอฮอล์รองลงมาตามลำดับ ส่วนการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งมันฝรั่งดิบจะได้แอลกอฮอล์เพียง 2 % ซึ่งต่ำกว่าข้าวเหนียวดิบ 3.5 เท่า

3. ในการย่อยแป้งดิบจากพวงธัญพืช (ข้าวเหนียว , ข้าวเจ้า) จะย่อยได้ง่ายกว่าแป้งจากพวงพืชหัว (มันสำปะหลัง , มันเทศ , มันฝรั่ง) โดยในพืชหัว มันฝรั่งจะย่อยได้ยากที่สุด

4. เมื่อขยายขนาดการหมักแอลกอฮอล์จากข้าวเหนียวดิบเป็น 3 ลิตร ซึ่งขยายปริมาณเป็น 30 เท่าของการทดลองในขวดหมัก พบว่าจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการหมักนานกว่า

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการหมักระดับที่ขยายปริมาณ (Scale up) ควรจะหมักในถังหมักหรือ Fermenter ที่มีการควบคุมสถานะต่างๆ ที่ดีกว่านี้เพื่อที่จะให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงในระยะเวลาอันสั้น

เอกสารอ้างอิง

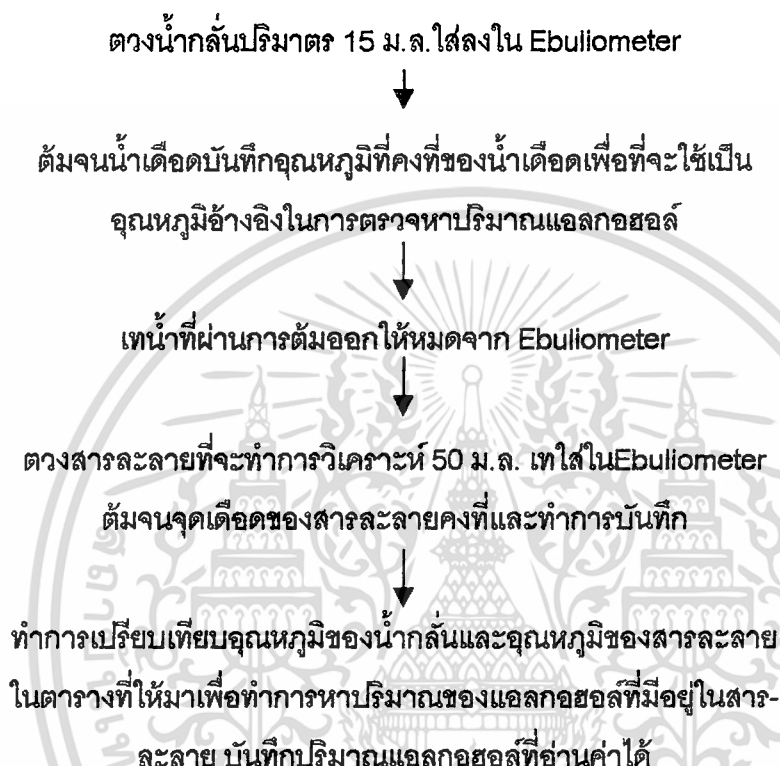
- ณัฐดา ชวศิริ . 2525 . การเปลี่ยนแปลงมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลโดยเชื้อราเพื่อใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . กรุงเทพฯ .
- ปราณี อานแป๊ะ . 2535 . เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1 . ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . กรุงเทพฯ .
- พูนสุข , ประไพศรี , อ่ำพล และสุภาพ . 2529 . การผลิตแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลังในโรงงานต้นแบบเป็นพลังงานทดแทน . วท. : กรุงเทพฯ , โครงการย่อยที่ 1 , โครงการวิจัยที่ ก. 25-02 .
- ภุชวิวัฒน์ และวรวพจน์ . 2539 . การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตมอลโทสซีรัปจากแป้งมันสำปะหลัง . ปัญหาพิเศษปริญญาตรี . ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง . กรุงเทพฯ .
- วุฒิชัย นาครักษา . เอกสารประกอบการสอนวิชาคาร์โบไฮเดรตในอาหาร . ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง . กรุงเทพฯ .
- วรรณา ตั้งเจริญชัย . 2536 . เคมีอาหาร . ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง . กรุงเทพฯ .
- วราวุฒิ , ณัฐศิษฎ์ และปราโมทย์ . 2530 . ผลของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมต่อเชื้อยีสต์ และแบคทีเรียในการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล . รายงานผลการวิจัยเสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2530-31 .
- ลัดดาพร ศรีมหาสงคราม . 2524 . การผลิตเอนไซม์อะมิเลสจากบักเตรีเพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลัง . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . กรุงเทพฯ .
- สุนีย์ โชติไธนาท . 2539 . การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังโดยการไฮโดรไลซ์และอัลตราฟิลเทรชัน . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท . จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . กรุงเทพฯ .
- อุดมเกียรติ พรรณนประเทศ . 2536 . อิทธิพลของการย่อยสตาร์ชด้วยกรดและเอนไซม์ต่อองค์ประกอบของน้ำตาลจากแป้ง 4 ชนิด . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . กรุงเทพฯ .



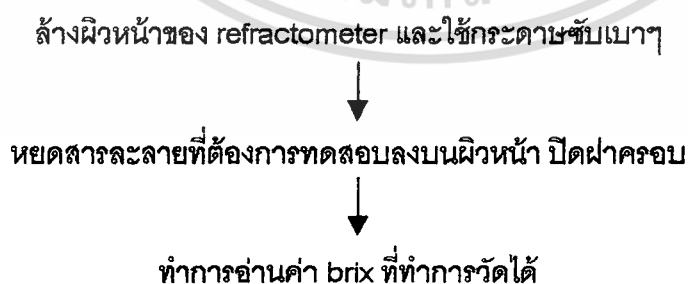
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

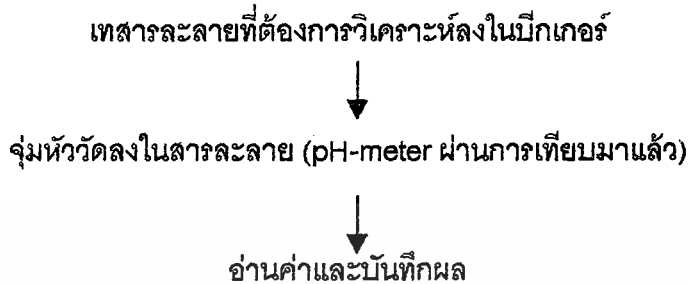
1. การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้ Ebulliometer



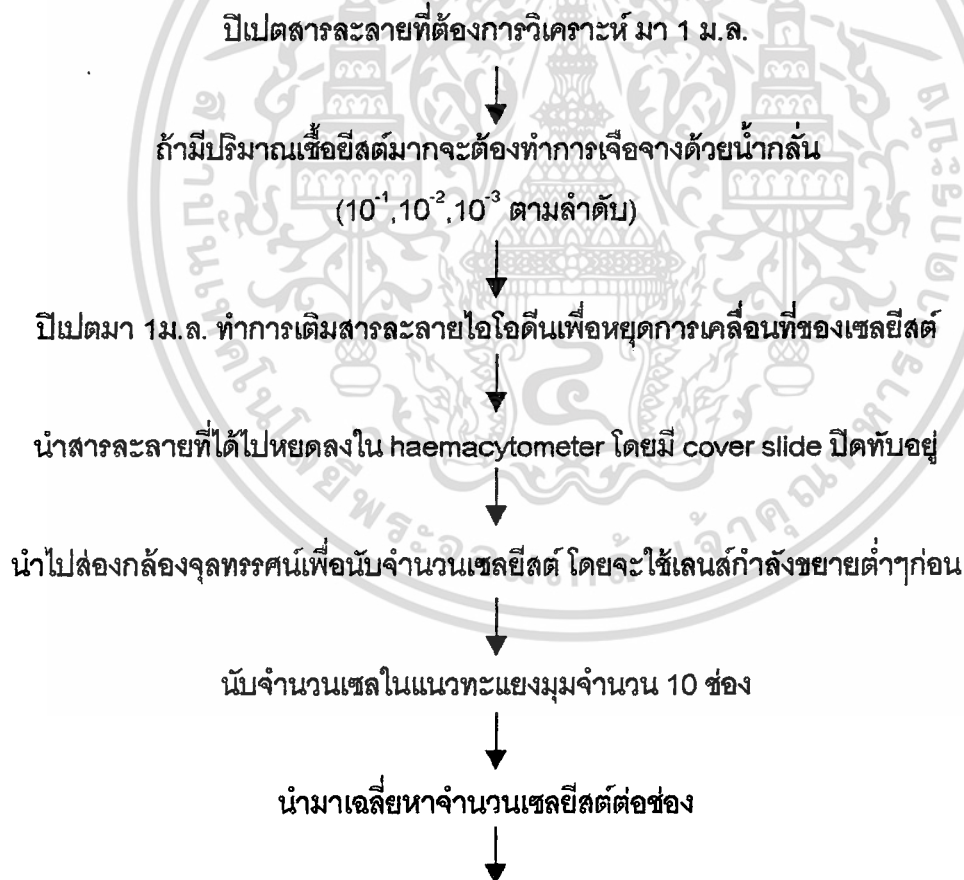
2. การวิเคราะห์หาปริมาณ brix โดยการใช้นิ refractometer



3.การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างโดยการใช่ pH-meter



4.การตรวจหาปริมาณเซลล์โดยใช้ Haemocytometer





ปริมาณเซลล์ที่ได้นำไปแทนค่าในสูตรได้ดังนี้

$$\text{อาหาร 1 ม.ล. จะมีจำนวนเซลล์} = \frac{X(10^3) \text{ เซลล์}}{0.0025}$$

หรือ = $4X(10^6)$ เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร



ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (g) ที่เกิดขึ้นในแต่ละวันในการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งข้าวเหนียวดิบโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

วันที่	Optidex	AMG	Terma myl + optidex	Terma myl + AMG	E5+opti dex	E5 + AMG	Terma myl	E5
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	3.65	4.15	4.3	3.75	4	3.95	2.4	2.5
2	7.7	7.7	7.45	7	7.6	7.5	2.8	2.75
3	7.85	7.8	7.5	7.2	7.7	7.6	2.85	2.75
4	8	7.8	7.5	7.2	7.7	7.6	2.85	2.75

ตารางที่ 2 แสดงค่า Brix , pH , % Alcohol ที่วิเคราะห์ในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการหมักแป้งข้าวเหนียวดิบ ในการใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

สิ่งที่วิเคราะห์	Optidex	AMG	Terma myl + optidex	Terma myl + AMG	E5+opti dex	E5 + AMG	Terma myl	E5
Brix	5.85	5.65	5.5	5.7	5.4	5.85	3.7	3.7
PH	3.83	3.77	3.85	3.7	3.75	3.74	3.85	4.1
%Alcohol	9.2	8.9	8.3	7.9	8.65	8.55	3.3	3.05

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (g) ที่เกิดขึ้นในแต่ละวันในการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งข้าวเหนียวสุกโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

วันที่	Termamyl+optidex	Termamyl+AMG	Termamyl
0	0	0	0
1	3.9	4.05	0.95
2	7.8	7.7	1.5
3	7.8	7.8	1.7
4	7.9	7.8	1.7

ตารางที่ 4 แสดงค่า Brix , pH , % Alcohol ที่วิเคราะห์ในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการหมักแป้งข้าวเหนียวลูก
ในการใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

สิ่งที่วิเคราะห์	Termamyl+optidex	Termamyl+AMG	Termamyl
Brix	5.5	5.85	13.95
PH	3.89	3.77	4.27
%Alcohol	9.0	8.7	2.1

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (g) ที่เกิดขึ้นในแต่ละวันในการหมักแอลกอฮอล์จาก
แป้งชนิดต่างๆ โดยใช้ Optidex ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

วันที่	แป้งข้าว เหนียว	แป้งมัน สำปะหลัง	แป้งข้าวเจ้า	แป้งมันเทศ	แป้งมันฝรั่ง
0	0	0	0	0	0
1	4.4	1.85	5.2	1.55	0
2	7.6	4.55	7.2	3.7	0.3
3	7.85	6.15	7.8	5.2	0.55
4	8	7.1	8	6.15	0.75
5	8.2	7.8	8.1	6.8	1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงค่า Brix , pH , % Alcohol ที่วิเคราะห์ในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการหมักแป้งชนิดต่างๆ ในการใช้ Optidex ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

สิ่งทีวิเคราะห์	แป้งข้าวเหนียว	แป้งมันสำปะหลัง	แป้งข้าวเจ้า	แป้งมันเทศ	แป้งมันฝรั่ง
Brix	6	5.5	6.1	5.35	3.05
PH	3.93	3.66	3.95	3.77	4.88
%Alcohol	9.1	8.8	9.0	7.6	2.0

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (g) ที่เกิดขึ้นในแต่ละวันในการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งชนิดต่างๆ โดยใช้ AMG ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

วันที่	แป้งข้าวเหนียว	แป้งมันสำปะหลัง	แป้งข้าวเจ้า	แป้งมันเทศ	แป้งมันฝรั่ง
0	0	0	0	0	0
1	4.5	1.45	4.65	1.3	0
2	7.65	4.3	6.85	3.55	0.15
3	7.8	6.1	7.5	5.1	0.3
4	7.9	7.0	7.7	6.0	0.5
5	7.9	7.4	7.8	6.8	0.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 แสดงค่า Brix , pH , % Alcohol ที่วิเคราะห์ในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการหมักแป้งชนิดต่างๆ ในการใช้ AMG ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90

สิ่งที่วิเคราะห์	แป้งข้าวเหนียว	แป้งมันสำปะหลัง	แป้งข้าวเจ้า	แป้งมันเทศ	แป้งมันฝรั่ง
Brix	5.65	5.2	5.9	5.3	3.0
PH	3.96	3.62	4.03	3.82	4.96
%Alcohol	8.8	8.4	8.8	7.6	1.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

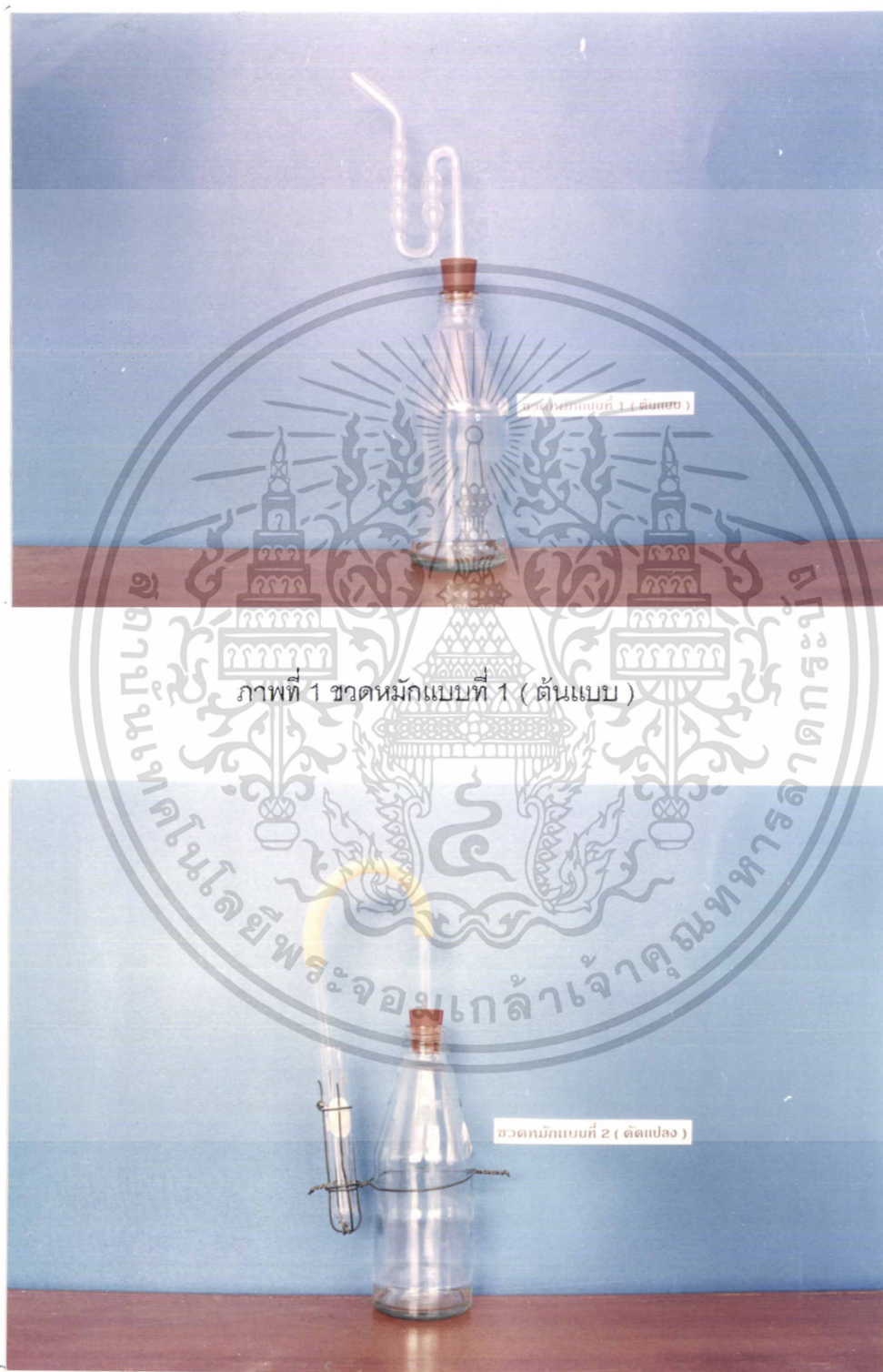
ตารางที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์หาค่าต่างๆ ในการหมักแป้งข้าวเหนียวระดับที่ขยายปริมาณ

(Scale up)

ชั่วโมงที่	% Alcohol	Brix	PH
0	0.7	3.9	4.96
6	1.35	5.2	4.32
12	1.45	5.3	4.19
24	4.5	5.8	3.77
30	4.95	6.0	3.65
36	6.45	5.0	3.53
48	6.7	4.7	3.56
54	7.2	4.3	3.64
60	8.6	4.3	3.6
72	9.0	4.2	3.64
78	9.3	4.2	3.62
84	9.8	4.0	3.73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

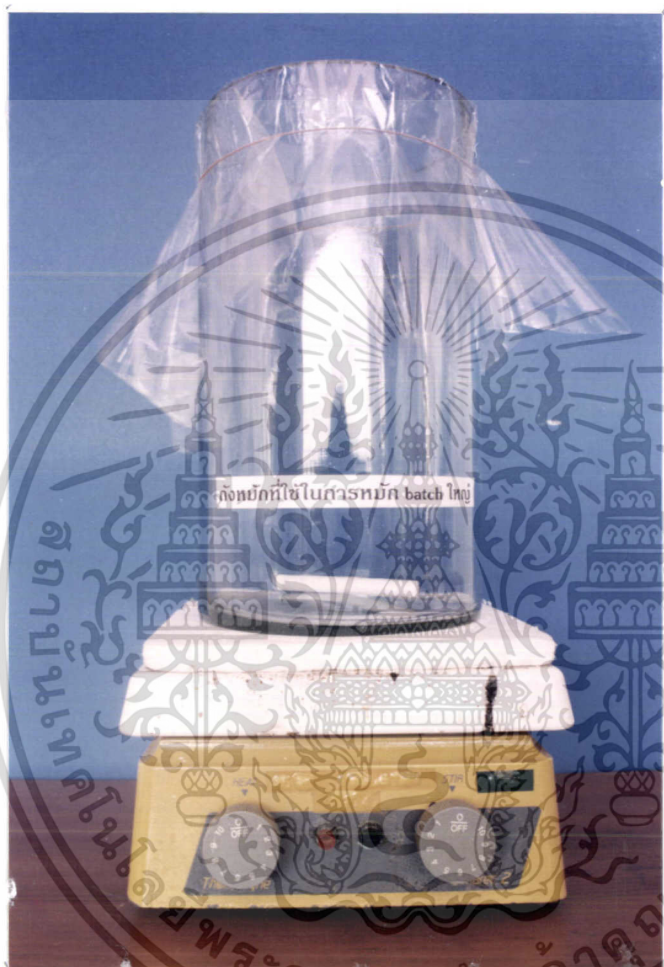
ภาคผนวก ค



ภาพที่ 1 ซวดหมักแบบที่ 1 (ต้นแบบ)

ภาพที่ 2 ซวดหมักแบบที่ 2 (ดัดแปลง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อ³⁸ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 ถังหมักที่ใช้ในการหมักระดับ Scale up

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา³⁹ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้แต่ง

นายจิรวัดน์ ทองบุญ (วิลลี่) เกิดวันที่ 30 มกราคม พ.ศ. 2520 ที่จังหวัด สุราษฎร์ธานี

สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมปลายจาก โรงเรียนหาดใหญ่วิทยาลัย จังหวัดสงขลา ในปี พ.ศ. 2537

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ว.ท.บ.) สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
ลาดกระบัง ในปี พ.ศ. 2541

นายศุภเทพ มัจกรสินธุ์ (เจ๊บบ , ปีเตอร์) เกิดวันที่ 23 ธันวาคม พ.ศ. 2518 ที่จังหวัด พังงา

สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมปลายจาก โรงเรียนสามเสนวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร ในปี พ.ศ. 2536

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ว.ท.บ.) สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
ลาดกระบัง ในปี พ.ศ. 2541



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้