การหาค่าเหมาะที่สุดของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง

นางสาวธนาพร พลศักดิ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMIZATION OF NITROGEN SOURCES FOR VHG ETHANOL FERMENTATION FROM CASSAVA STARCH

Miss Thanaporn Palasak

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาค่าเหมาะที่สุดของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง
โดย	นางสาวธนาพร พลศักดิ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ศรินทิพ สุกใส

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.ศรินทิพ สุกใส)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช)

ธนาพร พลศักดิ์ : การหาค่าเหมาะที่สุดของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง (OPTIMIZATION OF NITROGEN SOURCES FOR VHG ETHANOL FERMENTATION FROM CASSAVA STARCH) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.ศรินทิพ สุกใส{, 70 หน้า.

การใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 26.39 ยูนิต/กรัมแป้ง และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 16.45 ยูนิต/กรัมแป้ง สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังให้ได้สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร การหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 280 กรัม/ลิตร แบบวีเอชจีเป็นเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* G2-3-2 พบว่า การเติมเพียงยีสต์สกัดความเข้มข้น 7.5 กรัม/ลิตร ทำให้ได้เอทานอลสูงสุด 111.13 กรัม/ลิตร (อัตราการหมักเอทานอล 2.31 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง) ที่ 48 ชั่วโมง จากผลการเปรียบเทียบสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งเตรียมได้จากยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์ 2 วิธี คือ สารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท (เซลล์ยีสต์แตกโดยการบ่มที่ 50°ซ นาน 24 ชั่วโมง) และสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท (เซลล์ยีสต์แตกโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบแรงดันสูงที่ 200° ซ เป็นเวลา 20 นาที) เพื่อใช้เป็นแหล่งสารสกัดจากยีสต์ราคาถูกแทนยีสต์สกัดทางการค้า พบว่า สารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทให้ผลผลิตเอทานอล (เอทานอล 112.01 กรัม/ลิตร อัตราการหมักเอทานอล 2.33 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง) สูงกว่าสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท (เอทานอล 107.81 กรัม/ลิตร และอัตราการหมักเอทานอล 2.25 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง) และมีความเข้มข้นของเอทานอลใกล้เคียงกับยีสต์สกัดทางการค้า (เอทานอล 113.14 กรัม/ลิตร และอัตราการหมักเอทานอล 2.36 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง) สำหรับค่าเหมาะที่สุดของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทมีปริมาณความเข้มข้น 5.23 กรัม/ลิตร ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่ 48 ชั่วโมง คือ 115.77 กรัม/ลิตร และอัตราการหมักเอทานอลเป็น 2.41 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5672197823 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS: ENZYME HYDROLYSIS / ETHANOL / VERY HIGH GRAVITY TECHNOLOGY / CASSAVA STARCH / SPENT BREWER'S YEAST

THANAPORN PALASAK: OPTIMIZATION OF NITROGEN SOURCES FOR VHG ETHANOL FERMENTATION FROM CASSAVA STARCH. ADVISOR: ASSOC. PROF. ANCHARIDA AKARACHARANYA, Ph.D., CO-ADVISOR: SARINTIP SOOKSAI, Ph.D.{, 70 pp.

Liquefaction (α-amylase, 26.39 Unit/ g cassava starch) and saccharification (glucoamylase, 16.45 Unit/ g cassava starch) enzymes were used to get clear syrup containing 280 g/L reducing sugar. VHG fermentation of the reducing sugar solution (280 g/L reducing sugar) obtained from cassava starch saccharification to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* G2-3-2 required only yeast extract supplementation to maximize ethanol production. Addition of yeast extract (7.5 g/L) gave maximum ethanol 111.13 g/L (ethanol productivity 2.31 g/L/h) at 48 h. Comparison of 2 types of yeast extract prepared from spent brewer's yeast: 1) yeast autolysate (yeast cells were incubated at 50°C, 24 h) and 2) yeast hydrolysate (yeast cells were subjected to high pressure reactor at 200°C, 20 min) as low cost yeast extract. It was found that yeast autolysate gave higher ethanol (ethanol 112.01 g/L and ethanol productivity 2.33 g/L/h) than yeast hydrolysate (ethanol 107.81 g/L and ethanol productivity 2.25 g/L/h) and ethanol concentration approximate to commercial yeast extract (ethanol 113.14 g/L and ethanol productivity 2.36 g/L/h). At optimal concentration of the yeast autolysate (5.23 g/L) maximum ethanol was 115.77 g/L at 48 h (ethanol productivity 2.31 g/L/h).

Field of Study: Biotechnology
Academic Year: 2014

Student's Signature .....
Advisor's Signature .....
Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา และ ดร. ศรินทิพ สุกใส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม จากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำปรึกษา ความช่วยเหลือ ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ภาควิชาชีววิทยา และรองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ภาคจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ บริษัท ไทยแอลกอฮอล์ จำกัด (มหาชน) จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ใช้ในงานวิจัย

กราบขอบพระคุณ บริษัท ปทุมธานี บริวเวอรี่ จำกัด จังหวัดปทุมธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์

กราบขอบพระคุณ คณาจารย์ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้แก่ข้าพเจ้าจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา เจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจนพี่ๆ และเพื่อนๆ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือเสมอมาและกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ความอุปการะ สนับสนุนและให้กำลังใจกับข้าพเจ้ามาโดยตลอด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฎ
สารบัญภาพ ..... ฐ
บทที่ 1 1
บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้ 2
บทที่ 2 3
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 พลังงานทดแทน (Renewable Energy) 3
2.2 เอทานอล 3
2.3 กระบวนการผลิตเอทานอล 4
2.4 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล 5
2.5 การผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง 7
2.5.1 แป้ง (Starch) 8
2.5.2 แป้งมันสำปะหลัง 11
2.5.3 กระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์ 13
2.5.3.1 การย่อยแป้งครั้งแรกหรือการทำให้แป้งเหลว (Liquefaction) 13

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.5.3.2 การย่อยแป้งครั้งสุดท้ายเป็นน้ำตาลหรือการทำให้หวาน (Saccharification)....15
2.6 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล....16
2.6.1 คุณสมบัติของยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล....17
2.7 การผลิตเอทานอลแบบวีเอชจี (Very high gravity, VHG)....18
2.8 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์....20
2.8.1 เอทานอล....20
2.8.2 ความเข้มข้นของซับสเตรท....20
2.8.3 ธาตุอาหาร....21
2.8.4 สภาวะแวดล้อม....22
2.8.4.1 อุณหภูมิ....22
2.8.4.2 พีเอช....22
2.8.4.3 ออกซิเจน....22
2.8.4.4 คาร์บอนไดออกไซด์....22
2.9 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)....23
2.9.1 การผลิตสารสกัดจากยีสต์....23
2.9.2 ประโยชน์ของสารสกัดจากยีสต์....24
บทที่ 3....25
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย....25
3.1 จุลินทรีย์....25
3.2 วัตถุดิบและตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย....25
3.2.1 แป้งมันสำปะหลัง....25
3.2.2 ยีสต์ใช้แล้วจากกระบวนการผลิตเบียร์ (Spent brewer's yeast)....25

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

3.3 เอนไซม์.....25
3.4 อุปกรณ์.....25
3.5 สารเคมีเกรดวิเคราะห์.....27
3.6 วิธีดำเนินการวิจัย.....29
3.6.1 การย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ให้ได้สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร.....29
3.6.2 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์.....29
3.6.3 การหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง.....29
3.6.4 การผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์.....30
3.6.4.1 การเตรียมยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์.....30
3.6.4.2 การผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่ใช้แล้ว.....30
3.6.5 ศึกษาผลของสารอาหารต่อการหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังแบบวีเอชจี .31
3.6.5.1 ผลของธาตุอาหารรอง (Trace elements).....31
3.6.5.2 ผลของสารอาหารอนินทรีย์ (Inorganic nutrients).....31
3.6.5.3 ผลของยีสต์สกัดและเพปโตน (Yeast extract และ Peptone).....32
3.6.5.4 เปรียบเทียบผลของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทและสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทกับยีสต์สกัดทางการค้า.....32
บทที่ 4.....33
ผลการทดลองและการอภิปรายผล.....33
4.1 ผลการเตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร จากแป้งมันสำปะหลัง.....33
4.2 ผลการหมักเอทานอลจากอาหาร oEPM แบบวีเอชจีโดย *S. cerevisiae* G2-3-2.....35
4.3 ผลของสารอาหารต่อการหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง.....36
4.3.1 ผลของธาตุอาหารรอง (Trace elements).....37
4.3.2 ผลของสารอาหารอนินทรีย์ (Inorganic nutrients).....38

4.3.3 ผลของยีสต์สกัดและเพปโตนต่อการหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง....40

4.3.4 ผลการผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์ 42

4.3.5 ผลการเปรียบเทียบสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทและสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทกับยีสต์สกัดทางการค้าต่อการหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังแบบวีเอชจี...44

บทที่ 5 53

สรุปผลการทดลอง....53

รายการอ้างอิง 55

ภาคผนวก....60

ภาคผนวก ก....61

อาหารเลี้ยงเชื้อ....61

ภาคผนวก ข....63

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์ 63

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 70

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 พื้นที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ของมันสำปะหลัง ปี 2549-2552 8

ตารางที่ 2.2 สมบัติที่สำคัญของอะมิโลสและอะมิโลเพกทิน.....10

ตารางที่ 2.3 รายชื่อเชื้อ เอนไซม์ที่ผลิตได้และบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์สำหรับการย่อยครั้งแรก 14

ตารางที่ 2.4 รายชื่อเชื้อ เอนไซม์ที่ผลิตได้และบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์สำหรับการย่อยครั้งสุดท้าย 15

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบของวิตามินบีในยีสต์ 16

ตารางที่ 2.6 ประโยชน์ของการหมักเอทานอลแบบวีเอชจี 19

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของอาหาร oEPM ดัดแปลง.....31

ตารางที่ 4.1 ผลของปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้.....33

ตารางที่ 4.2 ผลของปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้.....34

ตารางที่ 4.3 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง.....34

ตารางที่ 4.4 ผลผลิตเอทานอลและอัตราการหมักเอทานอลจากการหมักน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 280 กรัม/ลิตร.....36

ตารางที่ 4.5 ผลของธาตุอาหารรองต่อผลผลิตเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอลจากการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง.....38

ตารางที่ 4.6 ผลของสารอาหารอนินทรีย์ ยีสต์สกัดและเพปโตนในสูตรอาหารหมัก oEPM ดัดแปลงต่อการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* G2-3-2.....38

ตารางที่ 4.7 ผลของสารอาหารอนินทรีย์ ยีสต์สกัดและเพปโตนในสูตรอาหารหมัก oEPM ดัดแปลง ต่อการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* G2-3-2 เพื่อหมักเอทานอล.....39

ตารางที่ 4.8 ผลของยีสต์สกัดและเพปโตนต่อการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ 280 กรัม/ลิตร แบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง.....40

ตารางที่ 4.9 ผลของยีสต์สกัดและเพปโตนต่อการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* G2-3-2 เพื่อหมักเอทานอล.....41

ตารางที่ 4.10 ปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทและสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้.....42

ตารางที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์ และเศษเซลล์ยีสต์หลังการย่อยเพื่อผลิตสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท และสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท.....43

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของยีสต์สกัดทางการค้า สารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทและสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท.....43

ตารางที่ 4.13 ผลการเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทและสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทกับยีสต์สกัดทางการค้าต่อปริมาณเอทานอลจากการหมักแบบวีเอชจี.....45

ตารางที่ 4.14 ผลการเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอลของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทและสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทกับยีสต์สกัดทางการค้า.....45

ตารางที่ 4.15 ปริมาณโปรตีนทั้งหมด ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทที่ใช้ในการหมักเอทานอลแบบวีเอชจี.....46

ตารางที่ 4.16 ผลของปริมาณสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทต่อการหมักเอทานอลแบบวีเอชจี...46

ตารางที่ 4.17 ผลของปริมาณสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทต่ออัตราการผลิตเอทานอล.....47

ตารางที่ 4.18 การเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบีในยีสต์สกัดทางการค้า (YC), สารสกัดยีสต์ออโตไลเซท (YA) และสารสกัดยีสต์ไฮโดรไลเซท (YH).....48

ตารางที่ 4.19 การเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนในยีสต์สกัดทางการค้า (YC), สารสกัดยีสต์ออโตไลเซท (YA) และสารสกัดยีสต์ไฮโดรไลเซท (YH).....50

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร 6

ภาพที่ 2.2 มันสำปะหลัง 7

ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของอะมิโลส 9

ภาพที่ 2.4 โครงสร้างอะมิโลเพกทิน.....9

ภาพที่ 2.5 แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) 11

ภาพที่ 2.6 ลักษณะของ *S. cerevisiae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า 16

ภาพที่ 4.1 ผลการหมักเอทานอลจากอาหาร oEPM (กลูโคส 280 กรัม/ลิตร) โดย *S. cerevisiae* G2-3-2.....35

ภาพที่ 4.2 ผลการหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง เมื่อเติม (1) และไม่เติม (2) $CaCl_2.2H_2O$, $MnSO_4.4H_2O$ และ $ZnSO_4.7H_2O$ ในอาหารหมัก oEPM.....37

ภาพที่ 4.3 ยีสต์สกัดทางการค้า (ภาพซ้าย) สารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท (ภาพกลาง) และสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทที่ผลิตได้ (ภาพขวา) 44

ภาพประกอบภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสวิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson.....64

ภาพประกอบภาคผนวกที่ 2 Haemacytometer.....68

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไบโอเอทานอลเป็นพลังงานทางเลือกที่มีศักยภาพสูงของประเทศไทย เพราะผลิตจากผลิตผลทางการเกษตรและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ปัจจุบันประเทศไทยใช้กากน้ำตาลและหัวมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตเอทานอล (Silalertruksa และ Gheewala, 2010; Limtong และคณะ, 2007; Nguyen และ Gheewala, 2008) มันสำปะหลังจัดเป็นพืชไร่ที่นิยมปลูกกันมากในประเทศไทย พื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง ในปี 2549 จำนวน 6.9 ล้านไร่ เพิ่มขึ้นเป็น 8.6 ล้านไร่ ในปี 2552 (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2555)

ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลังประสบปัญหาของทรายและกรวดที่ปนมากับหัวมันสำปะหลัง ทำให้เครื่องจักรเสียหาย สูญเสียค่าใช้จ่ายในการซ่อมแซมอย่างมาก ผู้ประกอบการจึงเปลี่ยนมาใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบแทนการใช้หัวมันสำปะหลัง ซึ่งทำให้ต้นทุนของวัตถุดิบสูงขึ้นเพราะแป้งมันสำปะหลังราคาแพงกว่าหัวมันสำปะหลัง ดังนั้นการหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังแบบวีเอชจี (very high gravity, VHG) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีการหมักเอทานอลจากน้ำตาลความเข้มข้นเริ่มต้นสูง เพื่อให้ได้เอทานอลที่ความเข้มข้นสูงขึ้น จึงอาจเป็นวิธีหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิต เพราะการผลิตเอทานอลแบบนี้ ได้เอทานอลความเข้มข้นสูง ต้นทุนค่าการกลั่นจึงลดลง นอกจากนั้นยังช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ด้วย (Thomas และคณะ, 1996) ในสภาวะการหมักเอทานอลจากน้ำตาลความเข้มข้นเริ่มต้นสูง ยีสต์ต้องเผชิญกับแรงดันออสโมติกที่สูงมาก ส่งผลให้เซลล์ยีสต์ตาย การเจริญลดลง หรือการหมักเอทานอลลดลง แต่ยีสต์จะสามารถทนต่อสภาวะเช่นนี้ และสามารถหมักเอทานอลได้ปกติ หากยีสต์ได้รับสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน, แร่ธาตุและวิตามินอย่างพอเพียง (Bafrncová และคณะ, 1999) อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่ในระดับห้องปฏิบัติการ คือ ยีสต์สกัดและเพปโตน แต่ในระดับอุตสาหกรรมการใช้ยีสต์สกัดและเพปโตนจะทำให้ต้นทุนในการผลิตเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากยีสต์สกัดและเพปโตนมีราคาสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะหาค่าเหมาะสมที่สุดของสารอาหารในอาหารหมักเอทานอล (oEPM) และหาแหล่งไนโตรเจนราคาถูก ซึ่งได้แก่ยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์เพื่อนำมาทดแทนยีสต์สกัดและเพปโตนสำหรับการหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง

1.2 ขอบเขตของงานวิจัย

1.2.1 ย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้สารละลายน้ำตาลเข้มข้น 280 กรัม/ลิตร

1.2.2 ศึกษาผลของแร่ธาตุ สารอาหารอนินทรีย์ ยีสต์สกัด และเพปโตนต่อการหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง

1.2.3 หาค่าเหมาะสมที่สุดของสารอาหารในอาหารหมักเอทานอล (oEPM)

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

ลดต้นทุนการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังด้วยการหมักแบบวีเอชจีและเพิ่มมูลค่าให้แก่ยีสต์เหลือทิ้งจากโรงงานเบียร์ซึ่งนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนยีสต์สกัดและเพปโตน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลังงานทดแทน (Renewable Energy)

พลังงานทดแทนหรือพลังงานหมุนเวียนที่สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก เป็นพลังงานสะอาด ไม่ก่อให้เกิดมลพิษและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ในปัจจุบันประเทศต่างๆ หันมาสนใจและให้ความสำคัญกับการใช้เชื้อเพลิงชีวภาพ (Biofuel) ทดแทนการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) เนื่องจากเชื้อเพลิงชีวภาพมีแหล่งกำเนิดมาจากธรรมชาติและสามารถสร้างทดแทนได้ใหม่โดยมีพื้นฐานจากการสังเคราะห์แสงและเก็บรวบรวมพลังงานจากดวงอาทิตย์เอาไว้ในรูปของพลังงานเคมี ทั้งนี้เชื้อเพลิงชีวภาพแตกต่างจากเชื้อเพลิงฟอสซิล (ถ่านหินและปิโตรเลียม) ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงสิ้นเปลืองตรงที่เชื้อเพลิงชีวภาพจัดเป็นพลังงานหมุนเวียนที่สามารถฟื้นฟูหรือสร้างขึ้นใหม่ได้ นอกจากนี้การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงชีวภาพยังไม่ก่อให้เกิดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นและก่อให้เกิดก๊าซพิษน้อยกว่าเชื้อเพลิงชนิดอื่น จึงช่วยลดปัญหาภาวะโลกร้อนโดยการลดระดับก๊าซเรือนกระจกลงได้ (กาญจนา แสงลิ้มสุวรรณ, 2554) ชีวมวล (Biomass) เป็นแหล่งทางเลือกในการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพ ซึ่งได้แก่ ไบโอเอทานอลและไบโอดีเซล

ไบโอเอทานอล คือแอล์กอฮอล์ที่ได้จากหมักน้ำตาลหรือพืชที่ให้ความหวาน ด้วยเทคโนโลยีในปัจจุบันสามารถใช้พืชที่มีเส้นใยอื่นๆ เช่น หญ้า เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ได้เอทานอลบริสุทธิ์สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับยานพาหนะได้โดยตรง ซึ่งพลังงานชนิดนี้มีการใช้อย่างแพร่หลายในอเมริกาและบราซิล ส่วนไบโอดีเซลนั้น สกัดมาจากพืชที่ให้น้ำมันหรือไขมันสัตว์ โดยไบโอดีเซลบริสุทธิ์สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงของรถยนต์ได้เช่นกัน แต่นิยมใช้เป็นสารเติมเต็มในน้ำมันดีเซล เพื่อลดปริมาณก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์และสารไฮโดรคาร์บอนที่ได้จากการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ดีเซล โดยมีการใช้อย่างแพร่หลายในทวีปยุโรป (ทวี เวชพฤติ, 2551)

2.2 เอทานอล

เอทานอล (Ethanol) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) คือสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่สามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งเพื่อการบริโภค (Beverage alcohol ซึ่งหมายถึงรูปแบบของเอทานอลที่ถูกกลั่นและมีความเหมาะสมสำหรับการบริโภคของมนุษย์ตามกฎหมาย โดยมีข้อจำกัด

ว่าต้องเป็นแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักด้วยกระบวนการทางธรรมชาติไม่ใช่กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี) และเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง (Fuel alcohol)

ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงได้ 3 รูปแบบ ได้แก่

1. ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงเพื่อทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล

2. ใช้ผสมกับน้ำมันเบนซิน เรียกว่า แก๊ซโซฮอล์ (Gasohol) หรือผสมกับน้ำมันดีเซล เรียกว่า ดีโซฮอล์ (Diesohol)

3. ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนของน้ำมันให้กับเครื่องยนต์ ได้แก่ Ethyl Tertiary Butyl Ether (ETBE)

การใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงในหลายประเทศ เช่น บราซิลจะนำเอทานอลความเข้มข้น 99.5% โดยปริมาตร มาผสมกับน้ำมันเบนซินในอัตราสวน 20% โดยปริมาตร และใช้ชื่อผลิตภัณฑ์ว่า “Proalcohol” สหรัฐอเมริกาใช้เอทานอลผสมกับน้ำมันเบนซินไร้สารตะกั่วในอัตราส่วน 10 : 90 เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (Gasohol) ออสเตรเลียนำเอทานอลผสมกับน้ำมันเบนซินในอัตราส่วน 15 : 85 และใช้เป็นเชื้อเพลิงในรถยนต์ในชื่อผลิตภัณฑ์ “Petranol” ฟิลิปปินส์ผสมเอทานอล (ซึ่งผลิตจากอ้อย) กับน้ำมันเบนซิน ในอัตราส่วน 20 : 80 เรียกว่า “Alcogas” เป็นต้น (เกื้อกลู ปิยะจอมขวัญ และคณะ, 2546)

2.3 กระบวนการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) และกระบวนการหมัก (Fermentation)

1. กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) เป็นการผลิตจากอนุพันธ์สารปิโตรเลียม เช่น เอทิลีน ด้วยปฏิกิริยาการระเหยน้ำ (dehydration) เป็นต้น

2. กระบวนการหมัก (Fermentation) เป็นการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลด้วยเชื้อยีสต์ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกยีสต์จะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide) เป็นอาหารและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) หรือวิถี EMP (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) ดังสมการ

$C_6H_{12}O_6$	+	ยีสต์	⟶	$2CO_2$	+	$2C_2H_5O_{12}$
กลูโคส				คาร์บอนไดออกไซด์		เอทานอล
100				48.89		51.11

ในทางทฤษฎีน้ำตาลกลูโคส 100% จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอล 48.89 และ 51.11% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ แต่ในทางปฏิบัติจะเกิดการสูญเสียได้เป็นสารประกอบอื่น ๆ หรือใช้ในการสร้างเซลล์ของยีสต์ทำให้ได้เอทานอลประมาณ 48% เมื่อได้เอทานอลแล้วจากนั้นเป็นการทำให้เอทานอลมีความเข้มข้นและบริสุทธิ์สูงขึ้นโดยการกลั่น (เกื้อกลู ปิยะจอมขวัญ และคณะ, 2546)

2.4 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

ในปัจจุบันการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมทั่วโลกส่วนใหญ่จะใช้กระบวนการหมัก ซึ่งวัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลจะเป็นสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอยู่ในโครงสร้างโมเลกุล สามารถแบ่งออกได้ 3 ประเภท (ภาพที่ 2.1) ดังนี้

1. วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ น้ำอ้อย กากน้ำตาล และบีทน้ำตาล ยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบประเภทนี้ได้โดยตรงและไม่ต้องผ่านกระบวนการใด ๆ

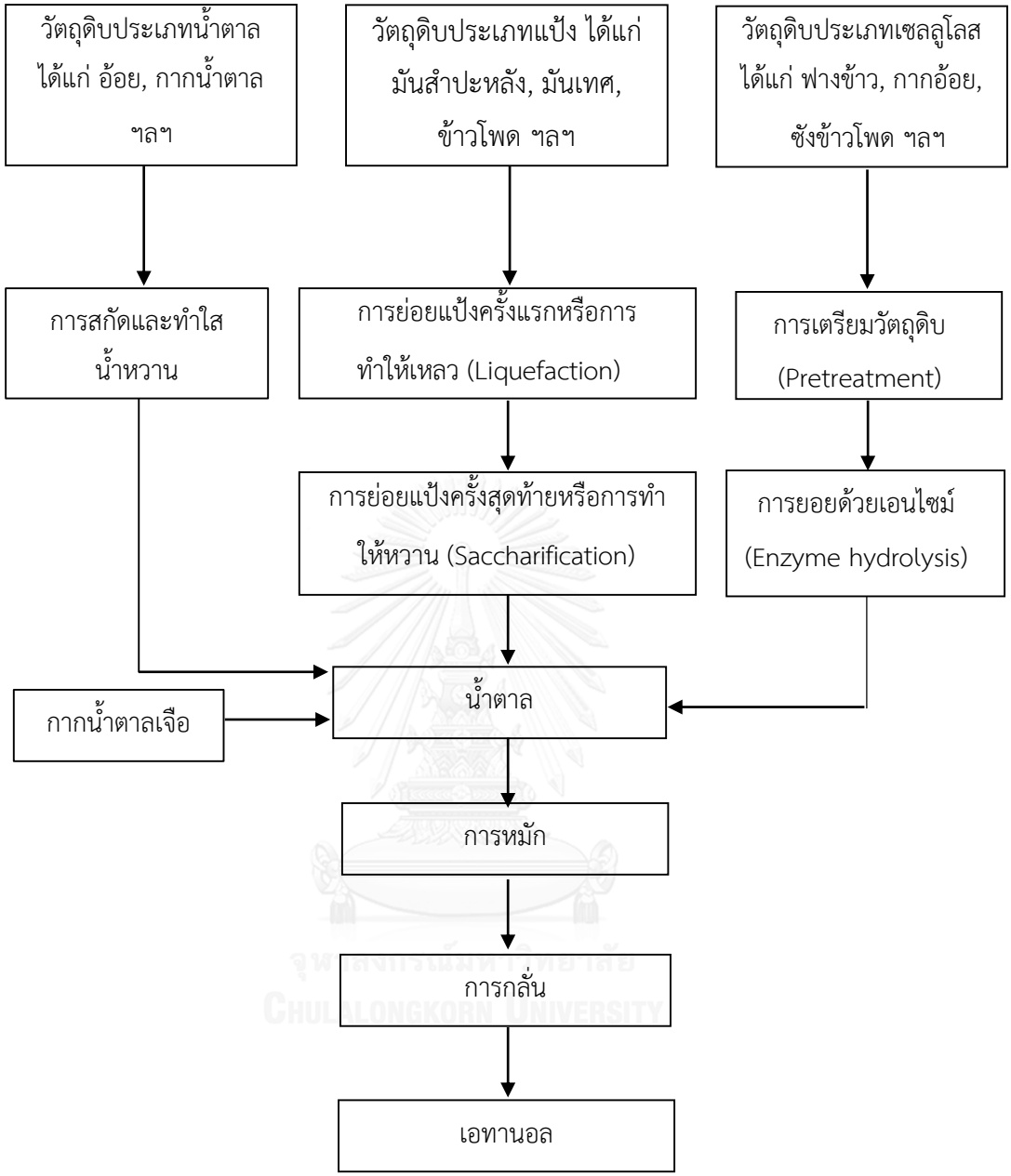
2. วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ธัญพืช ข้าวโพด มันสำปะหลัง และมันฝรั่ง เป็นต้น ในการผลิตเอทานอลนั้น แป้งในวัตถุดิบจะต้องถูกย่อย (Starch hydrolysis) ให้ได้น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อน ยีสต์จึงจะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้

3. วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ส่วนมากวัตถุดิบกลุ่มนี้จะเป็นผลิตผลพลอยได้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว กากอ้อย ซังข้าวโพด และของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบประเภทนี้ประกอบด้วยส่วนประกอบสำคัญ 4 ชนิด คือ เซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) ลิกนิน (Lignin) และสารประกอบอื่น ๆ ขั้นตอนในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบในกลุ่มนี้จะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ๆ ดังนี้

- การเตรียมวัตถุดิบ (Pretreatment) เป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของของเซลลูโลสเพื่อให้เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) สามารถเข้าถึงและย่อยเซลลูโลสได้ง่ายขึ้น สามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมี ได้แก่ การย่อยด้วยกรดเจือจาง ย่อยด้วยกรดเข้มข้นและย่อยด้วยด่าง เป็นต้น และวิธีทางกายภาพ ได้แก่ การระเบิดไอน้ำ เป็นต้น หรืออาจใช้ทั้ง 2 วิธีร่วมกันได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ

- การย่อย (Hydrolysis) มี 2 วิธีคือการย่อยด้วยกรดหรือการย่อยด้วยเอนไซม์ การย่อยด้วยกรดจะมี 2 ขั้น ขั้นแรกจะเป็นการย่อยเฮมิเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลเพนโตส จากนั้นย่อยเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลกลูโคส ส่วนการย่อยด้วยเอนไซม์ จะใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส

- การหมักน้ำตาลที่ได้ให้เป็นเอทานอลโดยเชื้อจุลินทรียที่สามารถใช้น้ำตาลชนิดนั้นๆ ได้



ภาพที่ 2.1 การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร
(ที่มา : เกื้อกลู ปิยะจอมขวัญ และคณะ, 2546)

2.5 การผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง (ภาพที่ 2.2) จัดเป็นพืชไร่ที่นิยมปลูกกันมากในประเทศไทย จากพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง ในปี 2549 จำนวน 6.9 ล้านไร่ เพิ่มขึ้นเป็น 8.6 ล้านไร่ ในปี 2552 (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2555) (ตารางที่ 2.1) นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีราคาถูกกว่าพืชผลิตแป้งชนิดอื่นๆ และเป็นพืชที่มีแป้งสะสมอยู่ในปริมาณมาก ดังนั้น มันสำปะหลังจึงเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอล เนื่องจากมีข้อได้เปรียบกว่าวัตถุดิบชนิดอื่นหลายประการดังนี้

1. ให้ผลผลิตเอทานอลต่อพื้นที่เพาะปลูกสูง
2. เพาะปลูกง่าย และสามารถปลูกได้เกือบทุกภาคของประเทศ
3. มีความต้านทานต่อโรคสูง
4. แปรรูปโดยการทำให้แห้งได้ง่าย ด้วยการใช้ลมร้อนเพื่อที่จะลดความชื้นให้ต่ำกว่าร้อยละ 20 ทำให้สามารถเก็บรักษาได้นานเป็นปี

ภาพที่ 2.2 มันสำปะหลัง

(ที่มา : https://www.dovesfarm.co.uk/gluten-free/gluten-free-ingredients/tapioca-starch : ออนไลน์)

ตารางที่ 2.1 พื้นที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ของมันสำปะหลัง ปี 2549-2552

รายละเอียด	2549	2550	2551	2552
พื้นที่เพาะปลูก (ล้านไร่)	6.9	7.5	7.8	8.6
พื้นที่เก็บเกี่ยว (ล้านไร่)	6.7	7.2	7.4	8.3
ผลผลิต (ล้านตัน)	22.6	26.4	25.2	30.1
ผลผลิตต่อไร่ (ตัน/ไร่)	3.4	3.7	3.4	3.6

(ที่มา : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2555)

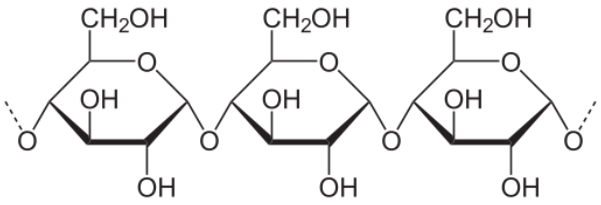
2.5.1 แป้ง (Starch)

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นส่วนใหญ่ ในอัตราส่วน 6:10:5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)n$ และมีสิ่งเจือปน เช่น โปรตีน ไขมัน เกลือแร่ น้อยมาก แป้งที่ผลิตโดยทั่วไปที่ยังมีส่วนประกอบอื่นๆ อยู่มาก จะเรียกว่า ฟลาวร์ (flour) ตัวอย่างเช่น แป้งข้าวโพดและแป้งข้าวสาลี ถ้ายังมีส่วนประกอบของโปรตีนสูงจะจัดอยู่ในแป้งประเภทฟลาวร์ เรียกว่า corn flour และ wheat flour เป็นต้น แต่เมื่อสิ่งเจือปนซึ่งหมายถึงโปรตีน ไขมัน เกลือแร่ อื่นๆ ถูกสลัดออกไป จนเหลือแป้งบริสุทธิ์เป็นส่วนใหญ่ เรียกว่า แป้งสตาร์ช (starch) สำหรับแป้งมันสำปะหลังที่ผลิตในประเทศไทย ปัจจุบันผลิตโดยกรรมวิธีที่ทันสมัย มีความบริสุทธิ์ของแป้งสูง จัดเป็นแป้งสตาร์ช (cassava starch) (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

แป้งเป็นโพลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านปลายของสายโพลิเมอร์ที่มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่แอลดีไฮด์ เรียกว่า ปลายรีดิวซิง (reducing end group) แป้งประกอบด้วยโพลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ โพลิเมอร์เชิงเส้น (อะมิโลส) และโพลิเมอร์เชิงกิ่ง (อะมิโลเพกติน) ซึ่งองค์ประกอบหลักภายในแป้ง แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่

1. อะมิโลส

อะมิโลสเป็นโพลิเมอร์เชิงเส้นที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) ชนิดแอลฟา-1,4 (α-1,4) ดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของอะมิโลส

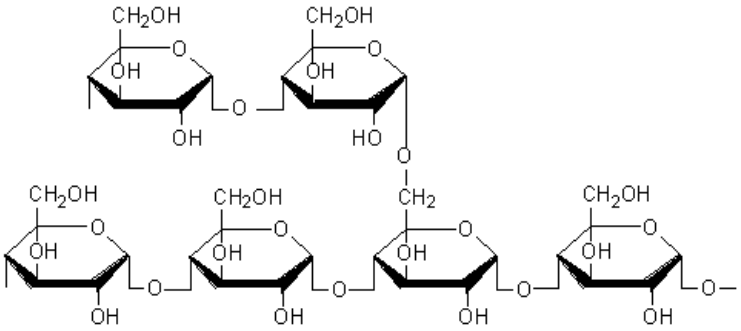
(ที่มา : http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/carbohydrates.htm : ออนไลน์)

แป้งจากรากและหัว เช่น แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่ง และแป้งสาคู มีปริมาณอะมิโลสประมาณร้อยละ 20 ซึ่งอะมิโลสในแป้งแต่ละชนิดจะมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันไป (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

2. อะมิโลเพกทิน

อะมิโลเพกทินเป็นโพลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส ส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยกลูโคซิดิก ชนิดแอลฟา-1,4 และส่วนที่เป็นกิ่งสาขาที่เป็นโพลิเมอร์กลูโคสสายสั้น มีขนาดโมเลกุล (Degree of Polymerization : DP) อยู่ในช่วง 10 ถึง 60 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก ชนิดแอลฟา-1,6 ดังภาพที่ 2.4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างอะมิโลเพกทิน

(ที่มา : http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/carbohydrates.htm : ออนไลน์)

หน่วยกลูโคสที่มีพันธะกลูโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,6 มีอยู่ประมาณร้อยละ 5 ของปริมาณหน่วยกลูโคสในอะมิโลเพกทินทั้งหมด ขนาดโมเลกุลของอะมิโลเพกทินในแป้งแต่ละชนิดจะมีค่าประมาณ 2 ล้านหน่วยอะมิโลเพกทินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,000 เท่าของอะมิโลส (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546) สมบัติที่สำคัญของอะมิโลสและอะมิโลเพกทินแสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สมบัติที่สำคัญของอะมิโลสและอะมิโลเพกทิน

คุณสมบัติ	**อะมิโลส**	**อะมิโลเพกทิน**
ลักษณะโครงสร้าง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นเส้นตรง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นกิ่งก้าน
พันธะที่จับ	แอลฟา-1,4	แอลฟา-1,4 และแอลฟา -1,6
ขนาด	200-2000 หน่วยกลูโคส	มากกว่า 10,000 หน่วยกลูโคส
การละลาย	ละลายน้ำได้น้อยกว่า	ละลายน้ำได้ดีกว่า
การทำปฏิกิริยากับไอโอดีน	สีน้ำเงิน	สีแดงม่วง
การจับตัว	เมื่อให้ความร้อนและทิ้งไว้จะจับตัวเป็นวุ้นและแผ่นแข็ง	ไม่จับตัวเป็นแผ่นแข็ง

(ที่มา : Beynum และ Roels, 1985)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.5.2 แป้งมันสำปะหลัง

แป้งมันสำปะหลังมีลักษณะเป็นผงละเอียด สีขาว (ภาพที่ 2.5) ลักษณะเด่นของแป้งมันสำปะหลังคือ มีความบริสุทธิ์สูง มีสิ่งปนเปื้อนต่ำ โดยจะมีสตาร์ชอยู่มากกว่าร้อยละ 95 แป้งมันสำปะหลังจัดเป็นแป้งที่มีปริมาณอะมิโลสค่อนข้างต่ำคือ 18-23% และมีขนาดแตกต่างกัน โดยมีค่า degree of polymerization (DP) ตั้งแต่ 1,100-3,220 ซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการวัดขนาด

คุณสมบัติในการเกิดปฏิกิริยากับน้ำเป็นคุณสมบัติที่สำคัญในการนำแป้งไปใช้ประโยชน์ เม็ดแป้งที่แขวนลอยอยู่ในน้ำเมื่อได้รับความร้อน พลังงานความร้อนจะไปทำลายพันธะไฮโดรเจนในโครงสร้างของเม็ดแป้ง ทำให้โมเลกุลของน้ำสามารถเข้าไปจับกับหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็นอิสระของเม็ดแป้งได้ เม็ดแป้งจะเริ่มพองขึ้น ซึ่งกำลังการพองตัวของเม็ดแป้งจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของแป้ง ปริมาณและโครงสร้างของอะมิโลสและอะมิโลเพกทิน สารอื่นๆ ที่มีอยู่ในแป้ง เช่น ไขมัน หมู่ฟอสเฟต เป็นต้น แป้งที่มีอะมิโลสสูงจะมีกำลังการฟองตัวต่ำกว่าแป้งที่มีอะมิโลสต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะโครงสร้างของอะมิโลสที่เป็นเส้นตรงจะทำให้เกิดพันธะระหว่างโมเลกุลได้ดี และอะมิโลสอาจจับตัวกับไขมันทำให้ขัดขวางการพองตัวของเม็ดแป้งได้ แป้งมันสำปะหลังจัดเป็นแป้งที่มีอะมิโลสต่ำ จึงมีกำลังการพองตัวที่ดี และมีค่าความสามารถในการละลายได้ซึ่งสัมพันธ์กับกำลังการพองตัวสูง โดยค่ากำลังการพองตัวซึ่งวัดได้จากน้ำหนักของเม็ดแป้งที่พองตัวอย่างอิสระในน้ำต่อน้ำหนักแห้งของแป้ง จะมีค่าประมาณ 50 และการละลายได้ประมาณ 35% ที่อุณหภูมิ 95°ซ ซึ่งมีค่ามากกว่าแป้งข้าวโพด แต่ต่ำกว่าแป้งมันฝรั่ง ทั้งนี้เนื่องจากแป้งมันฝรั่งมีหมู่ฟอสเฟตที่สามารถแตกตัวและจับกับน้ำได้ดี จึงช่วยให้แป้งมันฝรั่งมีค่ากำลังการพองตัวสูงมาก (>1,000) (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

ภาพที่ 2.5 แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch)
(ที่มา : http://www.foodsubs.com/ThickenStarch.html : ออนไลน์)

ในระหว่างที่ให้ความร้อนแก่เม็ดแป้งที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ และเม็ดแป้งเริ่มดูดซึมน้ำจากภายนอกนั้น เม็ดแป้งจะเริ่มพองตัวพร้อมๆ กับที่เม็ดแป้งสูญเสียความสามารถในการบิดระนาบแสงโพลาไรซ์ (birefringence) ลักษณะเช่นนี้จะทำให้การพองตัวของเม็ดแป้งเป็นแบบผันกลับไม่ได้และเม็ดแป้งเกิดเจลาทิไนซ์ขึ้น แป้งแต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิเริ่มต้นและช่วงของอุณหภูมิในการเกิดเจลาทิไนซ์แตกต่างกัน ในกรณีของแป้งมันสำปะหลัง อุณหภูมิในการเกิดเจลาทิไนซ์จะอยู่ในช่วง 58-70°ซ และพลังงานที่ใช้ในกระบวนการเจลาทิไนเซชัน (Gelatinization) จะประมาณ 14-17 จูลต่อกรัม เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Differential Scanning Calorimetry (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

โดยทั่วไปเมื่อเม็ดแป้งที่พองตัวได้รับความร้อน เม็ดแป้งจะเปลี่ยนไปอยู่ในสภาพของแป้งเปียก (paste) ที่มีความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างมาก และเมื่อแป้งเปียกเย็นลงจะเกิดเป็นเจลขึ้น อย่างไรก็ตาม ลักษณะความหนืดของแป้งเปียกและการเกิดเจลในแป้งแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน แป้งมันสำปะหลังเมื่อได้รับความร้อนจะมีค่ากำลังการพองตัวสูงจึงให้ความหนืดสูง แต่แป้งเปียกเมื่อได้รับความร้อนและการกวนอย่างต่อเนื่องจะมีความหนืดลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นแป้งเปียกของแป้งมันสำปะหลังจะไม่คงตัวมากนัก ซึ่งลักษณะเช่นนี้เป็นข้อจำกัดในการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารให้ความหนืดในผลิตภัณฑ์บางชนิด จึงจำเป็นต้องมีการดัดแปรแป้ง เพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวของแป้งเปียก เมื่อแป้งเปียกของแป้งมันสำปะหลังเย็นตัวลง ความหนืดจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากแป้งมันสำปะหลังมีอะมิโลสค่อนข้างต่ำ ทำให้เกิดการจับกันของหมู่ไฮดรอกซิลของอะมิโลสในระหว่างเย็นตัวต่ำ แป้งมันสำปะหลังจึงเป็นแป้งที่เกิดการคืนตัวต่ำและให้ลักษณะของแป้งเปียกที่ใส ไม่ทึบแสงเมื่อเปรียบเทียบกับแป้งชนิดอื่น (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

2.5.3 กระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์

ในการย่อยแป้งเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลจะต้องผ่านกระบวนการย่อย 2 ขั้นตอน คือการย่อยแป้งครั้งแรกหรือการทำให้แป้งเหลว (Liquefaction) และขั้นตอนที่ 2 คือ การย่อยแป้งครั้งสุดท้ายเพื่อเปลี่ยนแป้งโมเลกุลเล็กเป็นน้ำตาลหรือการทำให้หวาน (Saccharification)

2.5.3.1 การย่อยแป้งครั้งแรกหรือการทำให้แป้งเหลว (Liquefaction)

การย่อยแป้งครั้งแรกด้วยเอนไซม์ทำโดยให้ความร้อนจนแป้งเกิดการเจลาทิไนซ์ (Gelatinization) เม็ดแป้งจะพองตัวและสามารถจับกับน้ำได้ดีมากขึ้น โครงสร้างแป้งจะมีความแข็งแรงลดลง ทำให้แป้งมีความหนืดสูงขึ้นจากนั้นโมเลกุลของแป้งจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในกลุ่มแอลฟาอะมิเลส (α-amylase) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการย่อยพันธะกลูโคซิดิกที่ตำแหน่งแอลฟา-1,4 ภายในโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม ทำให้โมเลกุลของแป้งสั้นลงส่งผลให้ความหนืดของสารละลายลดลงอย่างรวดเร็ว โดยทั่วไปในการเติมเอนไซม์ชนิดนี้จะเติมลงไปก่อนที่อุณหภูมิจะสูงขึ้นจนเกิดการเจลาติไนซ์ (gelatinize) เพื่อให้เกิดการผสมที่ดีระหว่างแป้งกับเอนไซม์ เอนไซม์กลุ่มแอลฟาอะมิเลสมีกิจกรรมการย่อยแป้งที่อุณหภูมิสูงประมาณ 80 ถึง 95°ซ เพื่อให้ได้โมเลกุลขนาดเล็กลงและมีความหนืดลดลง ของเหลวที่ได้จะมีค่าสมมูลเด็กซ์โทรส (Dextrose equivalent, DE) อยู่ในช่วง 10-15 เรียกว่า เด็กซ์ทริน (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546) ตัวอย่างเอนไซม์ทางการค้าของกลุ่มแอลฟาอะมิเลส แสดงดังตารางที่ 2.3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.3 รายชื่อจุลินทรีย์ ชื่อทางการค้าของเอนไซม์ที่ผลิตได้และบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์สำหรับการย่อยครั้งแรก

จุลินทรีย์ที่ผลิต	ชื่อทางการค้าของเอนไซม์	บริษัทผู้ผลิต
Bacillus amyloliquefaciens	BACTERIAL AMYLASE	Amano International
(Bacillus subtilis liquefying)	CANALPHA	Enzyme
	HITEMPASE	Biocon/Quest
	KLEISTASE	Biocon/Quest
	ENZECO BACTERIAL	Daiwa kasei
	DEX-LO	Enzyme Development
		IBIS (Gist-Brocades)
Bacillus licheniformis	SPEZYME AA 20	Genecor (Finnsugar)
	MAXAMYL	IBIS (Gist-Brocades)
	TERMAMYL120L	Novo Nordisk
	TAKA-TERM	Solvay (Miles)
	OPTIAMYL-L	Solvay (MKC)
Bacillus stearothermophilus	G-ZYME G995	Enzyme Bio-Systems Ltd.
	THERMOLASE	Enzyme Development
	NERVANASE BT	Phone-Poulenc (ABM)

(ที่มา : Teague และ Brumm, 1992)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.5.3.2 การย่อยแป้งครั้งสุดท้ายเป็นน้ำตาลหรือการทำให้หวาน (Saccharification)

การย่อยแป้งครั้งสุดท้ายเป็นขั้นตอนในการเปลี่ยนแป้งโมเลกุลเล็กหรือเด็กซ์ทรินให้เป็นน้ำตาลกลูโคสโดยจะทำการลดอุณหภูมิจาก 90°ซ เหลือประมาณ 60°ซ โดยใช้เอนไซม์กลุ่มกลูโคอะมิเลสเพื่อย่อยแป้งโมเลกุลเล็กและเด็กซ์ทรินให้เป็นน้ำตาลที่หมักได้ โดยทั่วไปเอนไซม์กลุ่มนี้จะมีกิจกรรมที่อุณหภูมิสูงปานกลาง คือ ประมาณ 55 ถึง 65°ซ

ตารางที่ 2.4 รายชื่อจุลินทรีย์ ชื่อทางการค้าของเอนไซม์ที่ผลิตได้และบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์สำหรับการย่อยครั้งสุดท้าย

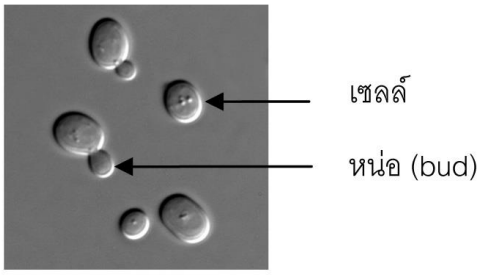
จุลินทรีย์ที่ผลิต	ชื่อทางการค้าของเอนไซม์	บริษัทผู้ผลิต
Aspergillus niger	GNL	Amano International Enzyme
	AMYLO 300L	Biocon/Quest
	G-ZYME G990	Enzyme Bio-Systems Ltd.
	ENZECO GLUCOAMYLASE	Enzyme Development
	SPEZYME GA	Genecor (Finnsugar)
	AMIGASE	IBIS (Gist-Brocades)
	AMIGASE HD2	IBIS (Gist-Brocades)
	XL-4	Nagase
	AMG300L 300L	Novo Nordisk
	AMBAZYME	Phone-Poulenc (ABM)
	ROHALASE HT	Rohm
	DIAZYME	Solvay (Miles)
	OPTIDEX	Solvay (MKC)
	ALDOMAX (immob.)	UOP
Rhizopus niveus	GLUTASE	Ueda
Rhizopus oryzae	ENZECO GLUCOAMYLASE	Enzyme Development
Rhizopus sp.	GLUCZYME 12	Amano International Enzyme
	GLUCOZYME	Nagase
	SUMIZYME	Shin Nihon Chemical

(ที่มา : Teague และ Brumm, 1992)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.6 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

Saccharomyces cerevisiae เป็นยีสต์ที่พบได้ในธรรมชาติโดยเป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอตเซลล์ ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมหรือรี สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (ภาพที่ 2.6) *S. cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์หลักที่ใช้ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมทั้งภายในและต่างประเทศ (Andrietta และคณะ, 2007) โดยยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านวิถี EMP ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นกรดเล็กน้อย และไม่มีออกซิเจน ได้ผลิตภัณฑ์หลักคือ เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์



ภาพที่ 2.6 ลักษณะของ *S. cerevisiae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
(ที่มา : www.freebase.com/view/wikipedia/images/commons_id/1069017 : ออนไลน์)

นงลักษณ์ และปรีชา สุวรรณพินิจ (2557) รายงานว่า ยีสต์บางชนิดสะสมสารต่างๆ ไว้จำนวนมาก เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และวิตามิน (ตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบของวิตามินบีในยีสต์

วิตามิน	*S. cerevisiae* (ไมโครกรัม/กรัม)	*Saccharomyces* spp. อื่นๆ (ไมโครกรัม/กรัม)
ไทอามีน	136.0	3.5
ไรโบเฟลวิน	28.0	35.6
กรดนิโคตินิก	525.0	387.0
พิริดอกซีน	40.0	29.0
กรดแพนโทเทนิก	69.5	57.4

วิตามิน	*S. cerevisiae* (ไมโครกรัม/กรัม)	*Saccharomyces* spp. อื่นๆ (ไมโครกรัม/กรัม)
กรดโฟลิก	3.5	20.8
ไบโอติน	1.0	0.53
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก	5.0	11.0
โคลีน	3,800.0	2,860.0
อิโนซิทอล	3,900.0	4,500.0

(ที่มา : นงลักษณ์ และปรีชา, 2557)

2.6.1 คุณสมบัติของยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549; Stewart, 1987; Panchal และ Tavares, 1990) ยีสต์ที่นำมาใช้ในการผลิตเอทานอลควรมีลักษณะ ดังนี้

1. สามารถใช้สับสเตรทได้หลากหลายชนิด

2. ให้ผลผลิตสูงและมีอัตราการหมักเอทานอลเร็ว ทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลง

3. มีความทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance) เนื่องจากระหว่างการหมักจะมีเอทานอลบางส่วนสะสมอยู่ในเซลล์ ซึ่งอาจทำให้เซลล์ยีสต์แตก (lysis) ได้ ยีสต์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงจึงส่งผลให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

4. ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance) เพราะในกระบวนการหมักเอทานอลจะมีการปลดปล่อยพลังงานความร้อนออกมาทำให้อุณหภูมิในการหมักสูงขึ้น มีผลต่อการอยู่รอดและกิจกรรมการทำงานของยีสต์ ยีสต์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงจึงช่วยให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

5. ทนพีเอชต่ำหรือทนกรด (acid tolerance) ในกระบวนการหมักจะเกิดกรดทำให้พีเอชของอาหารลดลง ยีสต์ที่สามารถทนพีเอชต่ำได้จึงช่วยให้มีผลผลิตเอทานอลสูงขึ้น

6. ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายในสภาวะต่าง ๆ ของการหมักและมีพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย ส่งผลให้ประสิทธิภาพและคุณภาพในการผลิตเอทานอลสม่ำเสมอ

7. มีความสามารถในการตกตะกอน (flocculation) ทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวและสามารถนำเซลล์ยีสต์กับมาใช้ใหม่ได้

8. ทนต่อแรงดันออสโมติก (osmotolerance) ทำให้สามารถใช้อาหารที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นสูงๆ และช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ทนต่อแรงดันออสโมติก จึงมีผลผลิตเอทานอลมากขึ้น

9. สร้างสารเมแทบอไลต์อื่นในระดับต่ำ เช่น กรดอินทรีย์ กลีเซอรอล ไฮเออร์แอลกอฮอล์ (higher alcohol) เอสเทอร์ และอัลดีไฮด์

10. มีอัตราการเจริญสูงแต่ให้ผลผลิตเซลล์ต่ำเพื่อให้มีการเจริญเพิ่มจำนวนเชื้ออย่างรวดเร็วสำหรับการผลิตเอทานอล

11. เพิ่มจำนวนง่าย

12. ให้ความร้อนระหว่างการหมักน้อย

13. เซลล์มีความมีชีวิตสูง

14. ทนต่อสารพิษและสารยับยั้งการเจริญ

2.7 การผลิตเอทานอลแบบวีเอชจี (Very high gravity, VHG)

การผลิตเอทานอลในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูงหรือการใช้เทคโนโลยีการหมักแบบวีเอชจี (very high gravity, VHG) เป็นวิธีหนึ่งในการปรับปรุงกระบวนการผลิตเอทานอล โดยเทคโนโลยีการหมักแบบวีเอชจีเป็นเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมและการหมักน้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 280 กรัม/ลิตร ขึ้นไป ภายใต้สภาวะแวดล้อมและสารอาหารที่เหมาะสม การหมักเอทานอลแบบวีเอชจีนี้ทำให้ได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงขึ้น ลดต้นทุนในการกลั่นและลดต้นทุนพลังงานต่อลิตรของเอทานอลและนอกจากนี้ยังลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการหมักได้อีกด้วย (Thomas และคณะ, 1996) (ตารางที่ 2.6) อย่างไรก็ตามในการหมักเอทานอลแบบวีเอชจี ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นหรือปริมาณน้ำตาลที่สูงและความเข้มข้นของเอทานอลที่เกิดขึ้นอาจจะมีผลต่อเมแทบอลิซึมของยีสต์ซึ่งนำไปสู่การลดลงของอัตราการผลิตและความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอล (Thomas และ Ingledew, 1990; Reddy และ Reddy, 2006)

ในสภาวะการหมักเอทานอลจากน้ำตาลความเข้มข้นเริ่มต้นสูง ยีสต์ต้องเผชิญกับแรงดันออสโมติกที่สูงมาก ส่งผลให้เซลล์ยีสต์ตาย การเจริญลดลง หรือการหมักเอทานอลลดลง มีรายงานว่ายีสต์จะสามารถทนต่อสภาวะเช่นนี้ และสามารถหมักเอทานอลได้ปกติ หากยีสต์ได้รับสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน, แร่ธาตุและวิตามินอย่างพอเพียง (Bafrncová และคณะ, 1999) ซึ่งแมกนีเซียม (Mg^{2+}) แคลเซียม (Ca^{2+}) และซิงค์ (Zn^{2+}) เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactors) ของเอนไซม์สำคัญหลายชนิดในกระบวนการหมักเอทานอล (Palukurty และคณะ, 2008; Xue และคณะ, 2008; Zhao และคณะ, 2009)

ตารางที่ 2.6 ประโยชน์ของการหมักเอทานอลแบบวีเอชจี

1. เพิ่มกำลังในการผลิตหรือลดราคาต้นทุน
    - เพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลมากกว่า 18% โดยปริมาตร
    - เพิ่มพื้นที่ของถังหมัก
2. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต
    - ลดค่าแรงในการผลิตต่อลิตรของเอทานอล
    - ลดค่าพลังงานในการผลิตต่อลิตรของเอทานอล เช่น ลดต้นทุนการกลั่นและเพิ่มประสิทธิภาพในการกลั่นเอทานอล
    - ลดการนำเข้าในการผลิตต่อลิตรของเอทานอล เช่น ลดการใช้น้ำในการผลิตและลดการทำความสะอาดลง
3. ประโยชน์อื่น ๆ
    - ลดการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนซึ่งทำให้ผลผลิตเอทานอลลดลง
    - มีโอกาสในการเก็บเกี่ยวจากยีสต์ที่ใช้แล้วซึ่งมีโปรตีนสูง

(ที่มา : Thomas และคณะ, 1996)

Laopaiboon และคณะ (2009) ศึกษาความสามารถหรือศักยภาพของยีสต์ในการเจริญและการผลิตเอทานอลภายใต้การหมักแบบวีเอชจีของยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูง 3 สายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048, *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* NP 01 พบว่า เมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวสูตรผลิตเอทานอลที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 280 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ในสภาวะนิ่งและมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น $1x10^8$ เซลล์/มล. พบว่า *S. cerevisiae* NP 01 สามารถเจริญและให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดคือ 104.68 กรัม/ลิตร

Hoondee และคณะ (2014) คัดแยกยีสต์ *S. cerevisiae* G2-3-2 ที่ทนแรงดันออสโมติก พบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลแบบวีเอชจี คือใช้เชื้อเริ่มต้นระยะ late log phase ให้เจริญในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 15 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณเชื้อเริ่มต้นสำหรับการหมัก 10^9 เซลล์/มล. ในอาหารหมักเอทานอลประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส, 280; แบคโตเพปโตน, 5; ยีสต์สกัด, 7.5; $((NH_4)_2HPO_4)$, 1; $MgSO_4.7H_2O$, 1.5; (KH_2PO_4), 3; $CaCl_2.2H_2O$, 1; $MnSO_4.4H_2O$, 0.5; $ZnSO_4.7H_2O$, 0.2 (โดยทั้งหมดมีหน่วยเป็นกรัม/ลิตร) pH 5.0 บ่มที่ 30°ซ เขย่าผสมที่ 100 รอบ/นาที บ่มในสภาวะออกซิเจนจำกัดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้เอทานอลสูงสุด 125.1 กรัม/ลิตร (0.45 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส)

2.8 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์

ปัจจัยหลายอย่างที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์ คือ เอทานอล ความเข้มข้นของซับสเตรท สารอาหาร และสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ พีเอช ออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งในการหมักเอทานอลให้มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องจัดการภาวะในการหมักให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.8.1 เอทานอล

โดยทั่วไปการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์จะถูกยับยั้งด้วยเอทานอล โดยพบว่าเอทานอลความเข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักทำให้การเจริญของยีสต์ลดลงและการเจริญของยีสต์โดยทั่วไปจะหยุดเมื่อมีเอทานอล 4.7-4.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังนั้นเอทานอลเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งที่จำกัดการผลิตเอทานอลของยีสต์ การเติมสารอาหารบางอย่างช่วยเพิ่มความทนเอทานอลและความสามารถในการหมักของยีสต์ได้ (Panchal และ Tavares, 1990)

Birch และ Walker (2000); Nabais และคณะ (1988) รายงานว่า แมกนีเซียม (Mg^{2+}) และแคลเซียม (Ca^{2+}) ช่วยให้ยีสต์ทนเอทานอลได้

2.8.2 ความเข้มข้นของซับสเตรท

การใช้ซับสเตรทความเข้มข้นสูงในการหมักเอทานอลทำให้ใช้น้ำในการเจือจางซับสเตรทลดลงและช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มากับซับสเตรท แต่การใช้ซับสเตรทความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอล โดยอัตราการเจริญและเอทานอลลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสและยังพบว่าประสิทธิภาพการหมักเอทานอลลดลงเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่ม

ทั้งนี้การยับยั้งเกิดจากการเพิ่มแรงดันออสโมติกเพราะความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้นทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลเสียต่อองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

Laopaiboon และคณะ (2009) รายงานว่า สารสกัดจากยีสต์และเพปโตน เป็นแหล่งสารอาหารซึ่งจะช่วยให้ยีสต์สามารถทนต่อสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกและหมักเอทานอลแบบวีเอชจีได้ดี

2.8.3 ธาตุอาหาร

ยีสต์ต้องการธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองเพื่อการเจริญและการหมักเอทานอล ต้องการธาตุอาหารที่ใช้เพื่อการเจริญเป็นสัดส่วนกับองค์ประกอบหลัก (major component) ของเซลล์ ธาตุอาหารเหล่านั้นคือ คาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ โพแทสเซียม และแมกนีเซียม สำหรับธาตุอาหารรอง (minor component) ได้แก่ แมงกานีส โคบอลท์ ทองแดง เหล็ก และวิตามิน ซึ่งมีความต้องการในปริมาณที่น้อย (Kosaric และคณะ, 1983 และ Reed, 1983) ยีสต์ต้องการวิตามินในการเจริญและผลิตเอทานอล เช่น ไทอามีน (thiamine), พิริดอกซีน (pyridoxine) และกรดแพนโทเทนิก (pentothenic acid) (Gutierrez, 1993)

นอกจากนั้นแล้วการใช้ยีสต์ที่ใช้แล้ว (spent brewer's yeast) ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากการผลิตเบียร์และมีราคาถูก ในสภาพ wet biomass เป็นแหล่งสารอาหารเติมลงไปในการหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากข้าวโพด พบว่าได้ผลผลิตเอทานอลสูงขึ้นจาก 120 กรัม/ลิตร เป็น 140 กรัม/ลิตร เนื่องจากยีสต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งของกรดอะมิโน วิตามินและแร่ธาตุ แต่การเติม ยีสต์ที่ใช้แล้วจะทำให้น้ำหมักมีความหนืดสูงขึ้น เพราะมีสารประกอบโอลิโกแซ็กคาไรด์ (มอลโทส, มอลโทไตรโอส และเด็กซ์ทริน) ที่ได้จากการแตกของเซลล์ สำหรับอาหารหมักที่ผ่านความร้อนสูงมากกว่า 100°ซ ต้องมีการเติมเอนไซม์ย่อยแป้ง (amylolytic enzyme) ลงไป หากยีสต์ที่ใช้หมักเอทานอลไม่มีเอนไซม์ย่อยแป้ง (amylolytic enzyme) ซึ่งสามารถย่อยสารประกอบโอลิโกแซ็กคาไรด์และควบคุมปริมาณของโอลิโกแซ็กคาไรด์ในอาหารหมักที่มีมากเกินไป ดังนั้นจึงไม่สามารถเติมยีสต์ที่ใช้แล้วในปริมาณมากได้ (Kawa-Rygielska และ Pietrzak, 2014)

2.8.4 สภาวะแวดล้อม

2.8.4.1 อุณหภูมิ

ความทนต่ออุณหภูมิสูงของยีสต์และจุลินทรีย์อื่นเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ เช่น *Saccharomyces* สายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic strain) ให้เซลล์ปริมาณสูงสุดและมีอัตราการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิช่วง 28-35°ซ และมีอุณหภูมิสูงสุด (maximal temperature) สำหรับการเจริญประมาณ 40°ซ แต่อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อเจริญได้นี้จะสูงขึ้นเล็กน้อยเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ การที่อุณหภูมิสูงยีสต์จะมีอัตราการเจริญลดลงมีผลให้ชีวมวลทั้งหมดลดลง (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.8.4.2 พีเอช

พีเอชเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งในการหมักเอทานอลโดยเฉพาะในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากพีเอชมีผลต่ออัตราการหมัก การสร้างผลผลิตพลอยได้ ตลอดจนควบคุมเชื้อปนเปื้อนซึ่งมีผลต่อการเจริญของยีสต์ที่กำลังหมัก พีเอชที่ *S. cerevisiae* สามารถเจริญได้ คือพีเอชในช่วง 2.4-8.6 โดยมีพีเอชที่เหมาะสม (optimal pH) สำหรับการหมักเอทานอลจากน้ำตาลเท่ากับ 4.5 โดยการหมักไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง พีเอช 3.5-6.0 (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.8.4.3 ออกซิเจน

ออกซิเจนเป็น growth factor ของยีสต์ โดยเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวซึ่งนอกจากช่วยส่งเสริมการเจริญภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนของยีสต์แล้วยังเพิ่มความทนเอทานอลของยีสต์ด้วย แต่ถ้ามีการเติมอากาศมากจะทำให้ชีวมวลหรือเซลล์ยีสต์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเนื่องจากยีสต์จะมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นในขณะที่การผลิตเอทานอลลดลง (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.8.4.4 คาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ความสามารถในการขนส่งสารเปลี่ยนแปลงไป มีผลทำให้อัตราการผลิตเอทานอลและการสร้างชีวมวลลดลง (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.9 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)

เมื่อกระบวนการย่อยที่เรียกว่า ออโตไลซิส (autolysis) เริ่มขึ้น ผนังเซลล์ของยีสต์จะถูกทำลายโดยเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์ยีสต์ เมื่อโปรตีนถูกทำลายจะปล่อยกรดอะมิโน วิตามิน ส่วนประกอบที่ละลายน้ำได้จะถูกแยกออกจากส่วนประกอบที่ละลายน้ำไม่ได้ จะเรียกสารสกัดนี้ว่า ยีสต์สกัด (Tangüler และ Erten, 2009)

ปัจจุบันมีการผลิตและบริโภคเบียร์ในประเทศไทยมากขึ้น ส่งผลให้มียีสต์ที่เหลือจากกระบวนการหมักเบียร์อยู่เป็นปริมาณมาก หรือที่เรียกว่า สเปนท์บริวเวอร์ยีสต์ (Spent brewer's yeast) หรือยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์ โดยปกติแล้วสเปนท์บริวเวอร์ยีสต์จะถูกนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ราคาถูก อย่างไรก็ตาม สเปนท์บริวเวอร์ยีสต์มีส่วนประกอบของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต รวมไปถึงวิตามินและเกลือแร่ที่สำคัญอยู่มาก (Shotipruk และคณะ, 2006) จึงควรค่าต่อการปรับปรุงให้เป็นผลิตภัณฑ์ยีสต์สกัด ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ถือเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์จากกากของเสียของโรงงานอุตสาหกรรมเบียร์ได้วิธีหนึ่ง

2.9.1 การผลิตสารสกัดจากยีสต์

กระบวนการผลิตสารสกัดจากยีสต์นั้น ได้มาจากการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้ (ศรินทิพ สุกใส และศจี น้อยตั้ง : เอกสารประกอบการสอนวิชาเทคโนโลยียีสต์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1. ยีสต์ออโตไลซิส (yeast autolysis) เป็นการปล่อยให้เอนไซม์ต่างๆ ภายในเซลล์ของยีสต์ทำงานย่อยสลายตัวเอง ซึ่งกระบวนการนี้สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ โดยเซลล์ที่ขาดอาหารจะเริ่มตายลงทำให้ภายในเซลล์ผิดปกติและกระตุ้นให้กระบวนการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เกิดขึ้น โดยการควบคุมภาวะต่างๆ เช่น ความเป็นกรด ด่าง อุณหภูมิและเวลา ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม เอนไซม์ภายในแวคิวโอล (vacuole) จะถูกปล่อยออกมาย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ๆ ในไซโตพลาสซึม โดยมีเอนไซม์โปรติเอสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ และเอนไซม์อีกกลุ่มหนึ่งที่สำคัญ คือ เอนไซม์ glucanase และ mannanase ที่ทำงานร่วมกันในการย่อยสลายผนังเซลล์จากการย่อยตัวเองของยีสต์ทำให้ผนังเซลล์สูญเสียสภาพที่เป็น semi-permeable membranes และปล่อยให้สารประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ออกมาภายนอกได้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ เรียกว่า สารสกัดจากยีสต์

2. พลาสโมไลซิส (plasmolysis) เป็นวิธีการทำให้เซลล์แตกโดยใช้เกลืออนินทรีย์ หรือตัวทำละลายอินทรีย์เติมเข้าไปเพื่อช่วยเร่งการแตกตัวของเซลล์ เช่น เกลือโซเดียมคลอไรด์ เอทานอล เป็นต้น ซึ่งในภาวะที่มีเกลือเข้มข้นสูงนั้น ยีสต์จะสูญเสียน้ำในเซลล์เพื่อรักษาสมดุลของแรงดันออสโมติกระหว่างภายในเซลล์และนอกเซลล์ไว้ เมื่อเซลล์สูญเสียน้ำมากขึ้น plasma membrane ของเซลล์จะแยกตัวออกจากผนังเซลล์และแตกออก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากวิธีนี้จะมีเกลือค่อนข้างสูง จึงเป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่งในการนำไปใช้

3. ไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เป็นวิธีที่ใช้กรดแก่หรือด่างร่วมกับความร้อน เพื่อย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ และผนังเซลล์ของยีสต์ วิธีนี้เป็นวิธีที่ทำให้ผลิตผลในปริมาณสูง ใช้เวลาน้อยแต่คุณภาพของผลิตภัณฑ์หรือคุณค่าทางโภชนาการจะด้อยลง กลิ่นรสจะถูกทำลายไป

นอกจากนี้ ยังมีการช่วยเร่งให้เซลล์ยีสต์แตกตัวด้วยวิธีอื่นๆ อีก คือ ใช้วิธีทางกายภาพโดยใช้โฮโมจิไนเซอร์ที่ความเร็วสูง เกิดแรงเฉือนและทำให้เซลล์แตก ปลดปล่อยสารต่างๆ ภายในเซลล์ออกมาหรือการใช้อุณหภูมิร่วมกับความดันในการย่อยสารประกอบในเซลล์ (subcritical water hydrolysis) หรือการใช้เอนไซม์จากภายนอกเพื่อช่วยเร่งการย่อยสลายตัวของยีสต์

2.9.2 ประโยชน์ของสารสกัดจากยีสต์

ยีสต์สกัดเป็นแหล่งอาหารที่อุดมไปด้วยวิตามินบี 1 (thiamine) วิตามินบี 2 (riboflavin) วิตามินบี 3 (niacin) วิตามินบี6 (pyridoxine) วิตามินบี 12 (cyanocobalamin) กรดโฟลิค กรดอะมิโน และแร่ธาตุต่างๆ เช่น โครเมียม สังกะสี ซีลีเนียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แมงกานีส ทองแดง และลิเธียม เป็นต้น (Tangüler และ Erten, 2009)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ *S. cerevisiae* G2-3-2 ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทนแรงดันออสโมติก แยกได้จากน้ำอ้อยภายในโรงงานผลิตน้ำตาล บริษัท ไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม จำกัด (Hoondee และคณะ, 2014)

3.2 วัตถุดิบและตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

3.2.1 แป้งมันสำปะหลัง ตราปลาไทย 5 ดาว ของ บริษัท อี.ที.ซี. อินเตอร์เนชั่นแนล เทรดดิ้ง จำกัด

3.2.2 ยีสต์ใช้แล้วจากกระบวนการผลิตเบียร์ (Spent brewer's yeast) ของบริษัท ปทุมธานี บริวเวอรี่ จำกัด จังหวัดปทุมธานี

3.3 เอนไซม์

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Spezyme alpha, 13,775 AAU/g) และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (GC 147, 580 TGAU/g ของบริษัท Genencor, Danisco US Inc., USA) ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท ไทยแอลกอฮอล์ จำกัด (มหาชน) จังหวัดนครปฐม

3.4 อุปกรณ์

3.4.1 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) บริษัท Olympus จำกัด รุ่น CH30RF200, Japan

3.4.2 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Vertical autoclave) บริษัท Tomy จำกัด รุ่น SS-325 และบริษัท Hirayama จำกัด รุ่น HV-28, Japan

3.4.3 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography) บริษัท Hewlett-Packard จำกัด รุ่น HP5890, USA

3.4.4 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Refrigerated incubator shaker) บริษัท New Brunswick Scientific จำกัด รุ่น Innova^{TM} 4330, USA

3.4.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนแบบสกรูเกลียวหมุน (Screw decanter centrifuge) บริษัท Kansai centrifugal separator manufacturing จำกัด รุ่น AD-150, Japan

3.4.6 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) บริษัท Mettler Toledo จำกัด รุ่น SevenEasy, China

3.4.7 เครื่องวัดความเข้มข้นสารละลาย ด้วยคลื่นแสง (Spectrophotometer) บริษัท Thermo Scientific จำกัด รุ่น Genesys™ 10S UV-VIS, USA

3.4.8 เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (2 decimal balance) บริษัท Mettler Toledo จำกัด รุ่น PG6002-S, Switzerland

3.4.9 เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (4 decimal balance) บริษัท Mettler Toledo จำกัด รุ่น AG 285, Switzerland

3.4.10 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Beckman coulter จำกัด รุ่น Allegra™ 25R, USA

3.4.11 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) บริษัท Scientific Industries จำกัด รุ่น G560, USA

3.4.12 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker) บริษัท Grant Instrument จำกัด รุ่น SS40-D, UK

3.4.13 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Water bath shaker) บริษัท Amerex Instrument จำกัด รุ่น GyromaxTM 939XL, USA

3.4.14 ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) บริษัท Gilson จำกัด (ขนาด 1 มล.) และบริษัท Mettler Toledo จำกัด (ขนาด 5 มล.), Switzerland

3.4.15 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) บริษัท Memmert จำกัด รุ่น UE600, Germany

3.4.16 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow) ห้างหุ้นส่วนจำกัด LAB service รุ่น V6, Thailand

3.4.17 ตู้บ่มเชื้อแบบควมคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Memmert จำกัด รุ่น INE 500, Germany

3.4.18 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำติดลบ 20°ซ แนวนอน (-20°C freezer) บริษัท Sanyo electric จำกัด, Japan

3.4.19 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำติดลบ 80°ซ (-80°C freezer) บริษัท Thermo scientific จำกัด, USA

3.4.20 เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยขนาดเล็ก (Mini spray dryer) บริษัท BÜCHI Labortechnik จำกัด รุ่น BÜCHI 190, Switzerland

3.4.21 เครื่องปฏิกรณ์แบบแรงดันสูง (High pressure reactor) บริษัท Parr Instrument จำกัด, USA

3.4.22 เครื่องย่อยโปรตีน (Digester) บริษัท BÜCHI Labortechnik จำกัด รุ่น K-424, Switzerland

3.4.23 เครื่องกลั่นโปรตีน (Distillator) บริษัท BÜCHI Labortechnik จำกัด รุ่น K-350, Switzerland

3.4.24 เครื่องดักจับไอกรด (Scrubber) บริษัท BÜCHI Labortechnik จำกัด รุ่น K-415, Switzerland

3.5 สารเคมีเกรดวิเคราะห์

3.5.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.2 กรดบอริก (H_3BO_3) บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.3 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.4 กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.5 กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) บริษัท Sigma จำกัด, USA

3.5.6 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.7 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.8 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) บริษัท Sigma จำกัด, USA

3.5.9 โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.10 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.11 ไดโซเดียมอาซิเนทเฮปตะไฮเดรต ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) บริษัท Sigma จำกัด, USA

3.5.12 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดกขะไฮเดรต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.13 ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.14 ผงวุ้น (Agar) บริษัท Becton จำกัด (มหาชน), USA

3.5.15 แบคโตเพปโตน (Bacto-peptone) บริษัท Becton จำกัด (มหาชน), USA

3.5.16 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.17 โพแทสเซียมโซเดียมทาเทรตเตตระไฮเดรต. ($KNaC_4H_4O_6.5H_2O$) Rocelle salt บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.18 โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.19 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.20 แมงกานีสซัลเฟตเตตระไฮเดรต ($MnSO_4.4H2O$) บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.21 มอลต์สกัด (Malt extract) บริษัท Becton จำกัด (มหาชน), USA

3.5.22 ยีสต์สกัด (Yeast extract) บริษัท Becton จำกัด (มหาชน), USA

3.5.23 เอทานอล (C_2H_5OH) บริษัท Merck จำกัด, Germany

3.5.24 แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) บริษัท Merck จำกัด, Germany

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.6 วิธีดำเนินการวิจัย

3.6.1 การย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ให้ได้สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร

ย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยการแปรผันปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ใช้ ละลายแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัม ในน้ำ 50 มล. ปรับ pH เป็น 5.8 เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส บ่มที่ 85°ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง รอให้เย็นแล้วปรับ pH เป็น 4.5 เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส บ่มที่ 60°ซ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°ซ 15 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson (1992) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้ด้วยเครื่อง Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)

3.6.2 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของ *Saccharomyces cerevisiae* G2-3-2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง YPD ที่อุณหภูมิ 30°ซ, 48 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ ขนาด 250 มล. บ่มที่ 30°ซ เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงสู่อาหาร YM ใหม่ ปริมาตร 50 มล. ในอามฟลาสก์ขนาด 250 มล. กำหนดความขุ่นเริ่มต้นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เป็น 0.05 บ่มที่ 30°ซ เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะการเจริญ late log phase (Hoondee และคณะ, 2014) ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

3.6.3 การหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง

ถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ลงในอาหารหมักเอทานอล (oEPM) ซึ่งประกอบด้วยกลูโคสหรือสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง แบคโตเพปโตน, 5; ยีสต์สกัด, 7.5; $(NH_4)_2HPO_4$, 1; $MgSO_4.7H_2O$, 1.5; (KH_2PO_4), 3; $CaCl_2.2H_2O$, 1; $MnSO_4.4H_2O$, 0.5; $ZnSO_4.7H_2O$, 0.2 (โดยทั้งหมดมีหน่วยเป็นกรัม/ลิตร) pH 5.0 ปริมาตร 35 มล. ในฟลาสก์ ขนาด 50 มล. จำนวน 10^9 เซลล์/มล. บ่มที่ภาวะออกซิเจนจำกัด โดยปิดฟลาสก์ด้วยจุกยางที่มีหลอดแก้วรูปตัวยูภายในหลอดแก้วบรรจุสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรตเพื่อดักจับออกซิเจนจากภายนอกและปล่อย CO_2 ที่เกิดขึ้นออกสู่ภายนอก (Hoondee และคณะ, 2014) บ่ม 30°ซ เขย่าผสมที่

ความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Jutakanoke และคณะ, 2012) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือด้วยวิธี Somogyi-Nelson (1992)

3.6.4 การผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์

3.6.4.1 การเตรียมยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์

ล้างเซลล์ยีสต์ที่ใช้แล้วที่ได้รับมาจากโรงงานเบียร์ด้วยน้ำและโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จนพีเอชเป็นกลาง ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องแยกตะกอนแบบสกรูเกลียวหมุน (screw decanter centrifuge) ที่ความเร็ว 5,800 รอบ/นาที บรรจุตะกอนเซลล์ที่ได้ใส่ในถุงพลาสติกและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.6.4.2 การผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่ใช้แล้ว แบ่งออกเป็น 2 วิธี ดังนี้

1. การเตรียมสารสกัดยีสต์ไฮโดรไลเซท (Yeast hydrolysate) ด้วยเครื่องปฏิกรณ์แบบแรงดันสูง (high pressure reactor) โดยการแขวนลอยเซลล์ยีสต์ (ผลจากข้อ 3.6.4.1) 300 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 500 มล. ให้ความร้อนและความดันไอน้ำที่ 200°ซ เป็นเวลา 20 นาที (Shotipruk และคณะ, 2006) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ด้วยวิธี Kjeldahl (1990) และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนและวิเคราะห์วิตามินที่บริษัท เอแอลเอส แลบอราทอรี กรุ๊ป (ประเทศไทย) จำกัด

2. การเตรียมสารสกัดยีสต์ออโตไลเซท (Yeast autolysate) แขวนลอยเซลล์ยีสต์ (ผลจากข้อ 3.6.4.1) 300 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 500 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 50°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Tangüler และ Erten, 2009) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนและวิเคราะห์วิตามินตามวิธีข้างต้น

3.6.5 ศึกษาผลของสารอาหารต่อการหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังแบบวีเอชจี

หมักเอทานอลจากอาหาร oEPM และอาหาร oEPM ที่ดัดแปลงสูตรโดยการเติมหรือไม่เติมองค์ประกอบบางชนิด ซึ่งมีน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 280 กรัม/ลิตร pH 5.0 โดย *S. cerevisiae* G2-3-2 จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^9 เซลล์/มล. บ่ม 30°ซ ภาวะมีออกซิเจนจำกัด เขย่าผสมที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ตามวิธีข้อ 3.6.3) ทุก 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือตามวิธีข้างต้น

3.6.5.1 ผลของธาตุอาหารรอง (Trace elements)

ศึกษาผลของ Ca^{2+} ($CaCl_2.2H_2O$), Mn^{2+} ($MnSO_4.4H_2O$) และ Zn^{2+} ($ZnSO_4.7H_2O$) ต่อการหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังแบบวีเอชจี โดยการเติมและไม่เติมธาตุอาหารรองทั้ง 3 ชนิด ในอาหาร oEPM ดัดแปลง

3.6.5.2 ผลของสารอาหารอนินทรีย์ (Inorganic nutrients)

ศึกษาผลกระทบของสารอาหารอนินทรีย์ ประกอบด้วย $(NH_4)_2HPO_4$, $MgSO_4.7H_2O$ และ KH_2PO_4 ต่อการหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังแบบวีเอชจี โดยการเติมและไม่เติมสารอาหารอนินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ในอาหาร oEPM ดัดแปลงที่ไม่เติม $CaCl_2.2H_2O$, $MnSO_4.4H_2O$ และ $ZnSO_4.7H_2O$ เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับไม่เติมยีสต์สกัดและเพปโตน (ตารางที่ 3.1)

Chulalongkorn University

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของอาหาร oEPM ดัดแปลง

สารอาหารอนินทรีย์	เติมยีสต์สกัดและเพปโตน		ไม่เติมยีสต์สกัดและเพปโตน	
	สูตรอาหาร 1	สูตรอาหาร 2	สูตรอาหาร 3	สูตรอาหาร 4
KH_2PO_4	+	-	+	-
$MgSO_4.7H_2O$	+	-	+	-
$(NH_4)_2HPO_4$	+	-	+	-

หมายเหตุ (+) เติม, (–) ไม่เติม

3.6.5.3 ผลของยีสต์สกัดและเพปโตน (Yeast extract และ Peptone)

ศึกษาผลกระทบของยีสต์สกัดและเพปโตนต่อการหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังแบบวีเอชจี โดยเติมและไม่เติมเฉพาะยีสต์สกัดหรือเฉพาะเพปโตน ลงในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

3.6.5.4 เปรียบเทียบผลของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทและสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทกับยีสต์สกัดทางการค้า

หมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท สารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทหรือยีสต์สกัด (บริษัท Bio Springer) ที่มีปริมาณไนโตรเจนและโปรตีนเท่ากัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

4.1 ผลการเตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร จากแป้งมันสำปะหลัง

การแปรผันปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัม ในน้ำ 50 มล. ปรับ pH 5.8 เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส บ่มที่ 85°ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นปรับ pH เป็น 4.5 เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส บ่มที่ 60°ซ เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 21.11 ยูนิต/กรัมแป้ง และแปรผันปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสในช่วง 12.34-20.57 ยูนิต/กรัมแป้ง สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังให้ได้สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียง 280 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ผลของปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (ยูนิต/กรัมแป้ง)	เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิต/กรัมแป้ง)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)
21.11	4.11	228.80 ± 1.98
	12.34	265.60 ± 1.73
	20.57	275.07 ± 1.44
	28.79	260.09 ± 1.53

แสดงผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ดังนั้น จึงเลือกใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส 16.45 ยูนิต/กรัมแป้ง ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยของปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในช่วง 12.34-20.57 ยูนิต/กรัมแป้ง และแปรผันปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็น 26.39, 31.67, 42.22 ยูนิต/กรัมแป้ง (ตารางที่ 4.2) ซึ่งพบว่า การใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 26.39 ยูนิต/กรัมแป้ง และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 16.45 ยูนิต/กรัมแป้ง สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังให้ได้สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.2 ผลของปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (ยูนิต/กรัมแป้ง)	เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิต/กรัมแป้ง)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)
26.39	16.45	279.00 ± 0.58
31.67		271.56 ± 1.89
42.22		262.40 ± 1.01

แสดงผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่า ประกอบด้วยธาตุอาหารต่างๆ ซึ่งได้แก่ คอปเปอร์ แคลเซียม ซิงค์ แมงกานีส โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส ไนโตรเจน และแมกนีเซียม (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

องค์ประกอบทางเคมี	ผลวิเคราะห์ (มก./กก.)	วิธีวิเคราะห์
คอปเปอร์ (Cu)	น้อยกว่า 0.36	Inhouse method based on AOAC(2010), 984.27, 975.03
แคลเซียม (Ca)	6.79	
ซิงค์ (Zn)	0.07	
แมงกานีส (Mn)	0.07	
โพแทสเซียม (K)	94.51	
ฟอสฟอรัส (P)	15.06	
ไนโตรเจน (N)	183	Inhouse method based on AOAC(2012), 991.20
แมกนีเซียม (Mg)	5.68	Inhouse method based on AOAC(2010), 984.27, 975.03

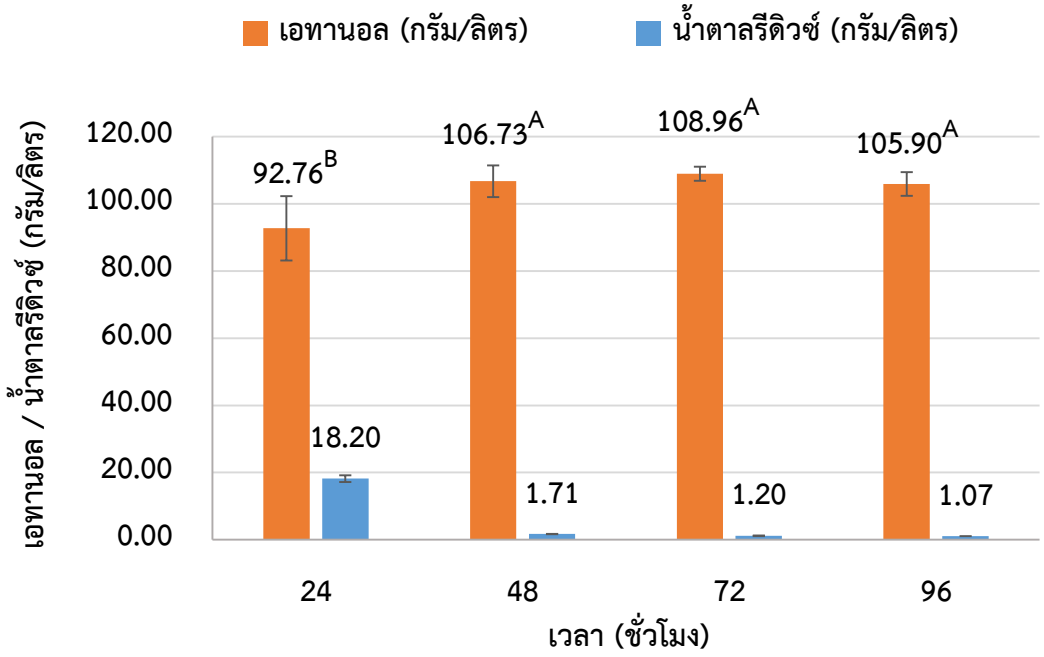
ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเหตุ Specific gravity ของสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ = 1.0953

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2 ผลการหมักเอทานอลจากอาหาร oEPM แบบวีเอชจีโดย *S. cerevisiae* G2-3-2

ผลการหมักเอทานอลจากอาหาร oEPM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 280 กรัม/ลิตร โดยเชื้อ *S. cerevisiae* G2-3-2 จำนวน 10^9 เซลล์/มล. พบว่า ที่ 72 ชั่วโมง ได้เอทานอลสูงสุด 108.96 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 4.1) ผลผลิตเอทานอลสูงสุด 0.35 กรัม เอทานอล/กรัม กลูโคส และอัตราการผลิตเอทานอล 1.51 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง (ตารางที่ 4.4)



ภาพที่ 4.1 ผลการหมักเอทานอลจากอาหาร oEPM (กลูโคส 280 กรัม/ลิตร) โดย *S. cerevisiae* G2-3-2 แสดงผลเอทานอล (■) และน้ำตาลรีดิวซ์ (■) (ผลการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ย ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$; Duncan's MRT))

ตารางที่ 4.4 ผลผลิตเอทานอลและอัตราการหมักเอทานอลจากการหมักน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 280 กรัม/ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ผลผลิตเอทานอล (กรัม เอทานอล/กรัม กลูโคส)	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)
24	0.30	3.87
48	0.34	2.22
72	0.35	1.51
96	0.34	1.10

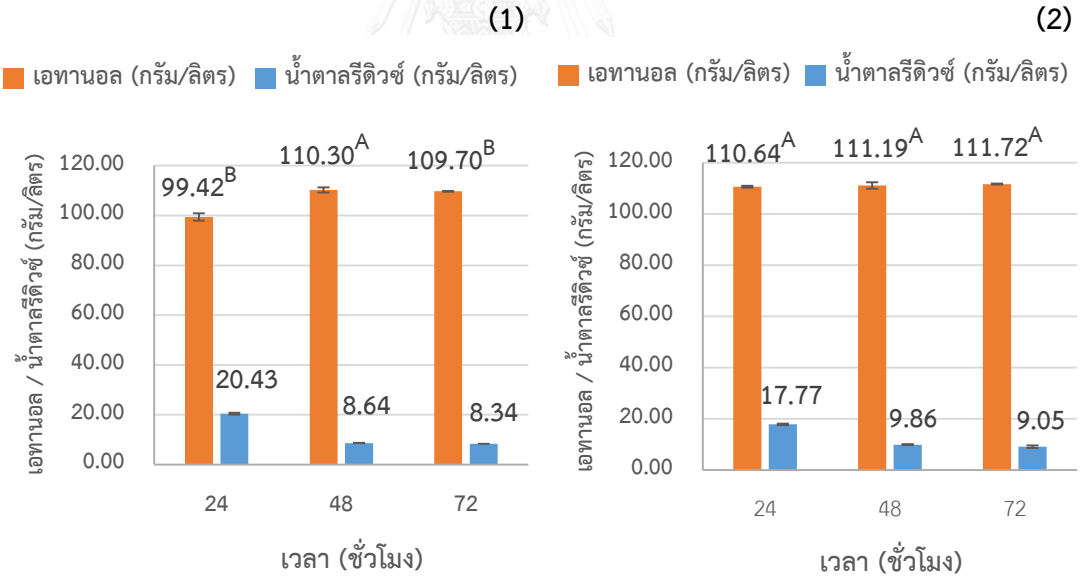
4.3 ผลของสารอาหารต่อการหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง

ผลการหมักเอทานอลจากอาหาร oEPM ที่มีสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง พบว่า ที่ 48 ชั่วโมง ได้เอทานอลสูงสุด 110.30 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 4.2) ซึ่งใช้ระยะเวลาในการหมักเอทานอลลดลง 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักเอทานอลจากอาหาร oEPM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 280 กรัม/ลิตร ที่ได้เอทานอลสูงสุด 108.96 กรัม/ลิตร ที่ 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.1) ดังนั้น การหมักเอทานอลจากอาหาร oEPM ที่มีสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง จึงมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ในการหมักเอทานอล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.3.1 ผลของธาตุอาหารรอง (Trace elements)

ผลการหมักเอทานอลจากอาหาร oEPM ที่มีสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยเชื้อ *S. cerevisiae* G2-3-2 พบว่า ที่ 48 ชั่วโมง การเติมและไม่เติมธาตุอาหารรอง ($CaCl_2.2H_2O$, $MnSO_4.4H_2O$ และ $ZnSO_4.7H_2O$) ได้เอทานอล 110.30 และ 111.19 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2) ผลผลิตเอทานอลเท่ากัน คือ 0.37 กรัม เอทานอล/กรัม กลูโคส (ตารางที่ 4.5) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทั้งนี้อาจเพราะในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังนั้นมีปริมาณของแคลเซียม แมงกานีสและซิงค์ (ตารางที่ 4.3) ในปริมาณที่เพียงพอต่อยีสต์เพื่อนำไปใช้ในการเจริญและหมักเอทานอล มีรายงานว่า ปริมาณของแคลเซียม แมงกานีสและซิงค์ที่มากเกิน จะเป็นพิษต่อเซลล์ ส่งผลให้อัตราการเจริญของเซลล์ยีสต์ลดลง (Phil และคณะ, 1959; Liang และ Zhou, 2007) นอกจากนี้ การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์เพื่อผลิตเอทานอล (ภาพที่ 4.2) พบว่า ที่ 24 ชั่วโมง การที่ไม่เติมธาตุอาหารรอง (2) ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพื่อผลิตเอทานอลได้ดีและเร็วกว่าการเติมธาตุอาหารรอง (1) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงไม่เติมธาตุอาหารรองทั้ง 3 ชนิด ในอาหาร oEPM



ภาพที่ 4.2 ผลการหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง เมื่อเติม (1) และไม่เติม (2) $CaCl_2.2H_2O$, $MnSO_4.4H_2O$ และ $ZnSO_4.7H_2O$ ในอาหารหมัก oEPM (แสดงผลเอทานอล (■) และน้ำตาลรีดิวซ์ (■) ผลการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยระหว่างชั่วโมงของอาหารแต่ละสูตร ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$; Duncan's MRT))

ตารางที่ 4.5 ผลของธาตุอาหารรองต่อผลผลิตเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอลจากการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

เวลา (ชั่วโมง)	เติมธาตุอาหารรอง		ไม่เติมธาตุอาหารรอง	
	ผลผลิตเอทานอล (กรัม เอทานอล/ กรัม น้ำตาลรีดิวซ์)	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	ผลผลิตเอทานอล (กรัม เอทานอล/ กรัม น้ำตาลรีดิวซ์)	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)
24	0.33	4.14	0.37	4.61
48	0.37	2.30	0.37	2.32
72	0.37	1.52	0.37	1.55

4.3.2 ผลของสารอาหารอนินทรีย์ (Inorganic nutrients)

ผลการหมักเอทานอลจากอาหารหมัก oEPM ดัดแปลง 4 สูตร (ตารางที่ 3.1) ที่มีสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง พบว่า เมื่อเติมยีสต์สกัดและเพปโตน การเติม (อาหารสูตร 1) หรือไม่เติมสารอาหารอนินทรีย์ (อาหารสูตร 2) ($(NH_4)_2HPO_4$, $MgSO_4.7H_2O$ และ KH_2PO_4) ที่ 48 ชั่วโมง ได้เอทานอลสูงสุดใกล้เคียงกันคือ 111.19 และ 110.76 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ผลของสารอาหารอนินทรีย์ ยีสต์สกัดและเพปโตนในสูตรอาหารหมัก oEPM ดัดแปลงต่อการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* G2-3-2

เวลา (ชั่วโมง)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)			
	เติมยีสต์สกัดและเพปโตน		ไม่เติมยีสต์สกัดและเพปโตน	
	อาหารสูตร 1	อาหารสูตร 2	อาหารสูตร 3	อาหารสูตร 4
24	$110.64^{A} \pm 0.36$	$100.16^{B} \pm 0.38$	$86.68^{C} \pm 1.22$	$78.09^{D} \pm 1.20$
48	$111.19^{A} \pm 1.28$	$110.76^{B} \pm 1.84$	$108.49^{C} \pm 0.16$	$104.69^{D} \pm 0.15$
72	$111.72^{B} \pm 0.21$	$109.13^{C} \pm 1.29$	$105.51^{D} \pm 0.39$	$113.84^{A} \pm 1.01$

แสดงผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยระหว่างชั่วโมงของอาหารแต่ละสูตร ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$; Duncan's MRT)

ในอาหารหมัก oEPM ดัดแปลง ที่ไม่เติมยีสต์สกัดและเพปโตน การเติมสารอาหารอนินทรีย์ ($(NH_4)_2HPO_4$, $MgSO_4.7H_2O$ และ KH_2PO_4) ที่ 48 ชั่วโมง จะได้เอทานอลสูงสุด 108.49 กรัม/ลิตร แต่ถ้าไม่เติมสารอาหารอนินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด (อาหารสูตร 4) แม้จะได้เอทานอลสูงสุด 113.84 กรัม/ลิตร แต่ช้ากว่าอาหารสูตรอื่นถึง 24 ชั่วโมง จากตารางที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่า ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพื่อหมักเอทานอลได้ดีที่ 72 ชั่วโมง โดยมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือเพียง 6.78 กรัม/ลิตร แต่ช้ากว่าอาหารสูตรอื่นถึง 24 ชั่วโมงเช่นกัน เนื่องจากในอาหารสูตรนี้ ไม่เติมทั้งยีสต์สกัดและเพปโตน ซึ่งยีสต์ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนหรือแหล่งโปรตีน การขาดแหล่งของโปรตีนอาจทำให้เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการผลิตเอทานอลของยีสต์มีประสิทธิภาพลดลง แต่เนื่องจากในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังประกอบด้วยไนโตรเจนและธาตุอาหารอื่น ๆ (ตารางที่ 4.3) จึงทำให้ยีสต์สามารถหมักเอทานอลได้ แต่ใช้เวลานานเมื่อขาดยีสต์สกัดและเพปโตนในอาหารหมัก oEPM ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูง แต่ใช้เวลานานกว่าอาหารสูตรอื่น

ตารางที่ 4.7 ผลของสารอาหารอนินทรีย์ ยีสต์สกัดและเพปโตนในสูตรอาหารหมัก oEPM ดัดแปลงต่อการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* G2-3-2 เพื่อหมักเอทานอล

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัม/ลิตร)			
	เติมยีสต์สกัดและเพปโตน		ไม่เติมยีสต์สกัดและเพปโตน	
	อาหารสูตร 1	อาหารสูตร 2	อาหารสูตร 3	อาหารสูตร 4
24	17.77 ± 0.30	23.88 ± 1.48	77.27 ± 0.66	79.17 ± 1.62
48	9.86 ± 0.20	8.32 ± 0.11	14.01 ± 0.41	18.45 ± 0.24
72	9.05 ± 0.54	7.77 ± 0.12	9.16 ± 0.07	6.78 ± 0.05

แสดงผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ดังนั้น การทดลองต่อไปจึงหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยการเติมเฉพาะยีสต์สกัดและเพปโตน (อาหารสูตร 2)

4.3.3 ผลของยีสต์สกัดและเพปโตนต่อการหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง

ผลการหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยเติมเฉพาะยีสต์สกัดหรือเพปโตน (ตารางที่ 4.8-4.9) พบว่า ที่ 48 ชั่วโมง การเติมเฉพาะยีสต์สกัดได้เอทานอล 111.13 กรัม/ลิตร อัตราการผลิตเอทานอล 2.31 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง มีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 7.08 กรัม/ลิตร และการเติมเฉพาะเพปโตนได้เอทานอล 107.21 กรัม/ลิตร อัตราการผลิตเอทานอล 2.23 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง มีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 11.98 กรัม/ลิตร

จากผลข้อ 4.3.2 การเติมทั้งยีสต์สกัดและเพปโตน (อาหารสูตร 2 ตารางที่ 4.6) ได้เอทานอลสูงสุด 110.76 กรัม/ลิตร จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่า การหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง สามารถเพิ่มประสิทธิผลของการหมักได้ด้วยการเติมยีสต์สกัดเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 4.8 ผลของยีสต์สกัดและเพปโตนต่อการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ 280 กรัม/ลิตร แบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง

เวลา (ชั่วโมง)	เติมยีสต์สกัด		เติมเพปโตน	
	เอทานอล (กรัม/ลิตร)	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)
24	$95.18^{A} \pm 0.05$	3.97	$79.10^{B} \pm 0.12$	3.30
48	$111.13^{A} \pm 0.89$	2.31	$107.21^{B} \pm 1.26$	2.23
72	$114.68^{A} \pm 0.31$	1.59	$109.51^{B} \pm 0.23$	1.52

แสดงผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยระหว่างชั่วโมงของอาหารแต่ละสูตร ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$; Duncan's MRT)

ตารางที่ 4.9 ผลของยีสต์สกัดและเพปโตนต่อการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* G2-3-2 เพื่อหมักเอทานอล

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	
	เติมยีสต์สกัด	เติมเพปโตน
24	55.59 ± 1.70	95.03 ± 0.26
48	7.08 ± 0.24	11.98 ± 0.18
72	7.03 ± 0.09	7.33 ± 0.10

แสดงผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง พบว่า มีแร่ธาตุและสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ เช่น แคลเซียม (Ca^{2+}) แมงกานีส (Mn^{2+}) และซิงค์ (Zn^{2+}) ซึ่งเป็น cofactors ของเอนไซม์สำคัญหลายชนิดในกระบวนการหมักเอทานอล (Palukurty และคณะ, 2008; Xue และคณะ , 2008; Zhao และคณะ, 2009) นอกจากนั้น แมกนีเซียม (Mg^{2+}) และแคลเซียม (Ca^{2+}) ยังช่วยทำให้เซลล์ยีสต์สามารถทนต่อ ethanol stress ได้ดีขึ้น (Birch และ Walker, 2000; Nabais และคณะ, 1988) ในสภาวะการหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลความเข้มข้นเริ่มต้นสูง ยีสต์ต้องเผชิญกับแรงดันออสโมติกที่สูงมาก ส่งผลให้เซลล์ตาย การเจริญลดลง หรือหมักเอทานอลได้น้อยลง มีรายงานว่ายีสต์จะสามารถทนต่อสภาวะเช่นนี้ และสามารถหมักเอทานอลได้อย่างปกติ หากยีสต์ได้รับสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน, แร่ธาตุและวิตามินอย่างพอเพียง (Bafrncová และคณะ, 1999) เป็นไปได้ว่ายีสต์สกัดทำหน้าที่เป็นแหล่งของไนโตรเจนและวิตามินซึ่งเพียงพอสำหรับการหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

ในการทดลองต่อไปจึงหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยการเติมเฉพาะยีสต์สกัด และหาค่าที่เหมาะสมของสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งผลิตได้จากยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์ เป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูก เพื่อนำมาใช้ทดแทนยีสต์สกัดทางการค้า

4.3.4 ผลการผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์

ผลการเตรียมสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท โดยการแขวนลอยเซลล์ยีสต์ 300 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 500 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 50°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทโดยการทำแห้งจากส่วนใสปริมาตร 340 มล. ได้สารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทปริมาณ 28.22 กรัม และผลการเตรียมสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทด้วยเครื่องปฏิกรณ์แบบแรงดันสูง โดยการแขวนลอยเซลล์ยีสต์ 300 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 500 มล. ให้ความร้อนและความดันไอน้ำที่ 200°ซ เป็นเวลา 20 นาที พบว่า สามารถผลิตสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทโดยการทำแห้งจากส่วนใสปริมาตร 400 มล. ได้สารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทปริมาณ 40.54 กรัม

ตารางที่ 4.10 ปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทและสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้

	สารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท	สารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท
ปริมาตรส่วนใสที่ผลิตได้หลังการย่อย (มล.)	340	400
น้ำหนักของเศษเซลล์ยีสต์หลังการย่อย (กรัม)	161.16	56.48
ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในส่วนใส (กรัม)	19.71	20.43
ปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่ผลิตได้หลังจากทำแห้ง (กรัม)	28.22	40.54
ปริมาณของแข็งที่เก็บเกี่ยวได้ (ร้อยละ)	42.95	61.64

Shotipruk และคณะ (2006) รายงานว่า ในการผลิตโปรตีนโดยใช้ความร้อนและแรงดันสูงเพื่อทำให้เซลล์แตกนั้น เมื่อใช้อุณหภูมิสูง 200°ซ เป็นเวลา 20 นาที จะทำให้น้ำหนักของเศษเซลล์ยีสต์หลังการย่อย (residual weight) น้อยกว่าการใช้อุณหภูมิต่ำ 100°ซ ดังนั้น น้ำหนักของเศษเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเตรียมสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทที่อุณหภูมิ 200°ซ (56.48 กรัม) จึงมีปริมาณน้อยกว่าการเตรียมสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทที่อุณหภูมิ 50°ซ (161.16 กรัม) ส่งผลให้ปริมาตรส่วนใสของสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท (400 มล.) มีปริมาตรมากกว่าการเตรียมสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท (340 มล.)

นอกจากนี้ ยังรายงานว่า การผลิตโปรตีนโดยใช้ความร้อนและแรงดันสูงเพื่อทำให้เซลล์แตกนั้น สามารถย่อยเซลล์ให้ได้สารอินทรีย์คาร์บอน (total organic carbon, TOC) ในปริมาณมากกว่าการผลิตด้วยอุณหภูมิต่ำ ดังนั้น จึงส่งผลให้ปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้ (40.52 กรัม) มีปริมาณมากกว่าสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท (28.22 กรัม) เนื่องจากมีสารอินทรีย์คาร์บอนปนอยู่ด้วย (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์ และเศษเซลล์ยีสต์หลังการย่อยเพื่อผลิตสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท และสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท

ชนิดของยีสต์	ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)
ยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์ (ก่อนย่อย)	78.04 ± 0.07
เศษเซลล์ยีสต์หลังการย่อยเพื่อผลิตสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท	72.99 ± 0.96
เศษเซลล์ยีสต์หลังการย่อยเพื่อผลิตสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท	63.13 ± 0.33

แสดงผลวิเคราะห์ 10 ซ้ำ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น พบว่า ยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์ก่อนการผลิตสารสกัดจากยีสต์มีปริมาณความชื้นร้อยละ 78.04 เศษเซลล์ยีสต์หลังการย่อยเพื่อผลิตสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทมีปริมาณความชื้นร้อยละ 72.99 เศษเซลล์ยีสต์หลังการย่อยเพื่อผลิตสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทมีปริมาณความชื้นร้อยละ 63.13 (ตารางที่ 4.11)

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นที่มีอยู่ในเศษเซลล์ยีสต์หลังการย่อย พบว่า ถ้ามีปริมาณความชื้นมาก จะส่งผลทำให้น้ำหนักของเศษเซลล์ยีสต์ที่ได้หลังการย่อยมีน้ำหนักมากและปริมาตรของส่วนใสที่ได้จะน้อย (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของยีสต์สกัดทางการค้า สารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทและสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท

ชนิดของยีสต์	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (ร้อยละ)	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ)
ยีสต์สกัดทางการค้า	72.83 ± 0.70	11.65 ± 0.12
สารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท	69.84 ± 0.36	11.13 ± 0.12
สารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท	50.39 ± 0.37	8.06 ± 0.06

แสดงผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด พบว่า ยีสต์สกัดทางการค้ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 72.83 และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 11.65 สารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 69.84 และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 11.13 สารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 50.39 และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 8.06 (ตารางที่ 4.12)

จากตารางที่ 4.10 แม้ว่าปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้ (40.54 กรัม) จะมากกว่าปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท (28.22 กรัม) แต่ปริมาณโปรตีนและไนโตรเจนในสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทจะมีปริมาณมากกว่าในสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท (ตารางที่ 4.12) ทั้งนี้เนื่องจากในสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทมีสารอินทรีย์คาร์บอนปนอยู่ด้วยตามที่ได้กล่าวมาแล้ว

4.3.5 ผลการเปรียบเทียบสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทและสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทกับยีสต์สกัดทางการค้าต่อการหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังแบบวีเอชจี

ภาพที่ 4.3 ยีสต์สกัดทางการค้า (ภาพซ้าย) สารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท (ภาพกลาง) และสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทที่ผลิตได้ (ภาพขวา)

ผลการหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งมีปริมาณโปรตีนและไนโตรเจนเท่ากัน (โปรตีนและไนโตรเจนร้อยละ 0.55 และ 0.09 ตามลำดับ) พบว่า ที่ 48 ชั่วโมง สารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท ให้เอทานอลใกล้เคียงกับยีสต์สกัดทางการค้า คือ 112.01 และ 113.14 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทให้เอทานอลเพียง 107.81 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 4.13)

ตารางที่ 4.13 ผลการเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทและสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทกับยีสต์สกัดทางการค้าต่อปริมาณเอทานอลจากการหมักแบบวีเอชจี

เวลา (ชั่วโมง)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)		
	ยีสต์สกัดทางการค้า	ยีสต์ออโตไลเซท	ยีสต์ไฮโดรไลเซท
24	$83.41^{B} \pm 0.42$	$88.92^{A} \pm 1.73$	$78.26^{C} \pm 1.13$
48	$113.14^{A} \pm 0.12$	$112.01^{B} \pm 0.57$	$107.81^{C} \pm 0.62$
72	$113.20^{A} \pm 0.43$	$114.77^{A} \pm 1.35$	$112.26^{A} \pm 1.17$
96	$115.67^{A} \pm 1.55$	$117.22^{A} \pm 1.13$	$114.79^{A} \pm 1.75$

แสดงผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยระหว่างชั่วโมงของอาหารแต่ละสูตร ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$; Duncan's MRT)

ในชั่วโมงที่ 48 อัตราการหมักเอทานอลของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท 2.33 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ใกล้เคียงกับอัตราการผลิตเอทานอลของยีสต์สกัดทางการค้า 2.36 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง แต่สารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทมีอัตราการผลิตเอทานอลเพียง 2.25 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง (ตารางที่ 4.14)

ตารางที่ 4.14 ผลการเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอลของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทและสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทกับยีสต์สกัดทางการค้า

เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)		
	ยีสต์สกัดทางการค้า	ยีสต์ออโตไลเซท	ยีสต์ไฮโดรไลเซท
24	3.48	3.71	3.26
48	2.36	2.33	2.25
72	1.57	1.59	1.56
96	1.21	1.22	1.20

ดังนั้น ในการทดลองต่อไปจึงแปรผันหาค่าที่เหมาะสมของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทเพื่อหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

ตารางที่ 4.15 ปริมาณโปรตีนทั้งหมด ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทที่ใช้ในการหมักเอทานอลแบบวีเอชจี

ยีสต์ออโตไลเซท(กรัม/ลิตร)	2.62	5.23	7.90	10.50
ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (ร้อยละ)	0.18	0.36	0.55	0.73
ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ)	0.03	0.06	0.09	0.12

เมื่อแปรผันปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทจากเดิม 7.90 กรัม/ลิตร (เทียบเท่ากับการใช้ยีสต์สกัดทางการค้า 7.50 กรัม/ลิตร) เป็น 2.62, 5.23 และ 10.50 กรัม/ลิตร พบว่า ที่ 48 ชั่วโมง สารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท 5.23 กรัม/ลิตร (คิดเป็นปริมาณโปรตีนและไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 0.36 และ 0.06 ตามลำดับ) ให้เอทานอลสูงสุด 115.77 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 4.15)

ตารางที่ 4.16 ผลของปริมาณสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทต่อการหมักเอทานอลแบบวีเอชจี

เวลา (ชั่วโมง)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)			
	ความเข้มข้นของยีสต์ออโตไลเซท			
	2.62 (กรัม/ลิตร)	5.23 (กรัม/ลิตร)	7.90 (กรัม/ลิตร)	10.50 (กรัม/ลิตร)
24	$94.44^{D} \pm 1.47$	$106.57^{B} \pm 1.34$	$103.51^{C} \pm 1.55$	$109.85^{A} \pm 0.55$
48	$109.35^{B} \pm 1.94$	$115.77^{A} \pm 1.58$	$113.85^{A} \pm 1.25$	$112.59^{A} \pm 1.70$
72	$113.79^{A} \pm 1.22$	$113.50^{A} \pm 0.64$	$114.17^{A} \pm 1.42$	$112.94^{A} \pm 1.00$
96	$113.26^{B} \pm 0.83$	$113.08^{B} \pm 0.41$	$115.58^{A} \pm 1.28$	$114.59^{A} \pm 1.66$

แสดงผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยระหว่างชั่วโมงของอาหารแต่ละสูตร ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$; Duncan's MRT)

ตารางที่ 4.17 ผลของปริมาณสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทต่ออัตราการผลิตเอทานอล

เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)			
	ความเข้มข้นของยีสต์ออโตไลเซท			
	2.62 (กรัม/ลิตร)	5.23 (กรัม/ลิตร)	7.90 (กรัม/ลิตร)	10.50 (กรัม/ลิตร)
24	3.94	4.44	4.31	4.58
48	2.28	2.41	2.37	2.35
72	1.58	1.58	1.59	1.57
96	1.18	1.18	1.20	1.19

เมื่อแปรผันปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท พบว่า ที่ 48 ชั่วโมง สารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทปริมาณ 5.23 กรัม/ลิตร (คิดเป็นปริมาณโปรตีนและไนโตรเจนทั้งหมด ร้อยละ 0.36 และ 0.06 ตามลำดับ) มีอัตราการผลิตเอทานอลสูงสุดเป็น 2.41 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง (ตารางที่ 4.17) ดังนั้น ค่าเหมาะที่สุดของแหล่งไนโตรเจนหรือสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทสำหรับการหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง จะมีปริมาณ 5.23 กรัม/ลิตร

การทดลองต่อไปเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินและกรดอะมิโน ที่มีในยีสต์สกัดทางการค้า สารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท และสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท

ผลการวิเคราะห์ปริมาณไบโอติน ไทอามีน กรดแพนโทเทนิกและพิริดอกซีน ในสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทเปรียบเทียบกับยีสต์สกัดทางการค้าและสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท พบว่าสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทมีไทอามีน (12.4 มิลลิกรัม/100 กรัม) มากกว่ายีสต์สกัดทางการค้า (2.19 มิลลิกรัม/100 กรัม) ส่วนยีสต์สกัดทางการค้ามีกรดแพนโทเทนิก (9.72 มิลลิกรัม/100 กรัม) และพิริดอกซีน (1.12 มิลลิกรัม/100 กรัม) มากกว่าสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท ซึ่งมีกรดแพนโทเทนิก 7.71 มิลลิกรัม/100 กรัม และมีพิริดอกซีน 0.90 มิลลิกรัม/100 กรัม สารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทมีไทอามีน กรดแพนโทเทนิกและพิริดอกซีน น้อยกว่ายีสต์สกัดทางการค้าและสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท ทั้งนี้วิตามินเหล่านี้อาจถูกทำลายด้วยความร้อนในขั้นตอนของการทำให้ยีสต์เซลล์แตกโดยเครื่องปฏิกรณ์แบบแรงดันสูง (high pressure reactor) ที่ 200°ซ เป็นเวลา 20 นาที (ตารางที่ 4.18)

ตารางที่ 4.18 การเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบีในยีสต์สกัดทางการค้า (YC), สารสกัดยีสต์ออโตไลเซท (YA) และสารสกัดยีสต์ไฮโดรไลเซท (YH)

วิตามิน	ชนิดของยีสต์	ผลวิเคราะห์	หน่วย	วิธีวิเคราะห์
ไบโอติน	YC	52.7	ไมโครกรัม/100 กรัม	USFDA (1996)
	YA	58.4		
	YH	56.7		
ไทอามีน (Thiamine)	YC	2.19	มิลลิกรัม/100 กรัม	In-house method STM No.03-022 based on Food Chemistry, Vol. 56, and No. 1, 1996, P. 81-86
	YA	12.4		
	YH	0.43		
กรดแพนโทเทนิก (Pantothenic acid)	YC	9.72	มิลลิกรัม/100 กรัม	AOAC (2012), 945.74
	YA	7.71		
	YH	0.57		
พิริดอกซีน (Pyridoxine)	YC	1.12	มิลลิกรัม/100 กรัม	In-house method STM No.03-022 based on Food Chemistry, Vol. 56, and No. 1, 1996,P. 81-86
	YA	0.90	มิลลิกรัม/100 กรัม	
	YH	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้	-	

หมายเหตุ ค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ของพิริดอกซีน คือ 0.003 มิลลิกรัม/100 กรัม

ไทอามีนเป็นวิตามินที่มีความสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส (pyruvate decarboxylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไพรูเวตให้เป็นอะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) และคาร์บอนไดออกไซด์ (Dixon และ Webb, 1964) กรดแพนโทเทนิกมีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์ (Olsson และคณะ, 1949 และ Nordstrom, 1962)

Gutierrez (1993) พบว่า ไทอามีน กรดแพนโทเทนิก และพิริดอกซีนเป็นวิตามินที่มีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์ การขาดไทอามีน กรดแพนโทเทนิกและพิริดอกซีน ทำให้การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* M-300-A ลดลง การขาดไทอามีนจะทำให้กรดไพรูวิกเพิ่มขึ้น จากการหมักเอทานอลเปรียบเทียบระหว่างอาหารหมักปกติกับอาหารหมักที่ขาดเฉพาะไทอามีน กรดแพนโทเทนิก พิริดอกซีนและไบโอติน พบว่า การขาดไทอามีนทำให้กรดไพรูวิกเพิ่มขึ้นจากเดิม 136 เป็น 474 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งผลให้การผลิตเอทานอลของยีสต์ลดลงจาก 8.69% โดยปริมาตร เป็น 8.54% โดยปริมาตร การขาดกรดแพนโทเทนิกทำให้การเจริญของยีสต์ลดลงจาก 367 เป็น 300 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ส่งผลให้การผลิตเอทานอลลดลงเป็น 8.29% โดยปริมาตร การขาดพิริดอกซีนทำให้การเจริญของยีสต์ลดลงจาก 367 เป็น 307 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร แต่การขาดไบโอตินไม่ทำให้การผลิตเอทานอลลดลง ดังนั้น ไบโอตินจึงไม่จำเป็นต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.19 การเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนในยีสต์สกัดทางการค้า (YC), สารสกัดยีสต์ออโตไลเซท (YA) และสารสกัดยีสต์ไฮโดรไลเซท (YH)

กรดอะมิโน	ชนิดของยีสต์	ผลวิเคราะห์ (มิลลิกรัม/100 กรัม)	ค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัม/100 กรัม)
Alanine	YC	5,240	5.0
	YA	5,210	
	YH	5,380	
Arginine	YC	7,850	
	YA	7,750	
	YH	4,820	
Aspartic Acid	YC	6,980	
	YA	6,830	
	YH	3,160	
Cystine	YC	300	
	YA	436	
	YH	27	
Glutamic Acid	YC	12,600	
	YA	6,690	
	YH	8,170	
Glycine	YC	3,100	
	YA	3,390	
	YH	3,030	
Histidine	YC	1,340	
	YA	1,400	
	YH	927	
Isoleucine	YC	3,680	
	YA	4,110	
	YH	2,450	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

กรดอะมิโน	ชนิดของยีสต์	ผลวิเคราะห์ (มิลลิกรัม/100 กรัม)	ค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัม/100 กรัม)
Leucine	YC	5,740	5.0
	YA	6,290	
	YH	3,990	
Lysine	YC	5,670	
	YA	5,610	
	YH	2,950	
Methionine	YC	1,520	
	YA	1,620	
	YH	966	
Phenylalanine	YC	3,370	
	YA	3,740	
	YH	2,190	
Proline	YC	3,190	
	YA	3,710	
	YH	3,140	
Serine	YC	4,350	
	YA	4,310	
	YH	3,160	
Threonine	YC	3,600	
	YA	3,690	
	YH	2,300	
Tryptophan	YC	699	
	YA	781	
	YH	293	
Tyrosine	YC	1,450	
	YA	3,050	
	YH	2,470	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

กรดอะมิโน	ชนิดของยีสต์	ผลวิเคราะห์ (มิลลิกรัม/100 กรัม)	ค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัม/100 กรัม)
Valine	YC	4,310	5.0
	YA	4,790	
	YH	3,280	

หมายเหตุ วิธีวิเคราะห์ AOAC (2012), 994.12

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทเปรียบเทียบกับยีสต์สกัดทางการค้าและสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซท พบว่า สารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทมีปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ใกล้เคียงกับยีสต์สกัดทางการค้า ยกเว้นไทโรซีน ซึ่งสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทมี 3,050 มิลลิกรัม/100 กรัม ในขณะที่ยีสต์สกัดทางการค้ามีเพียง 1,450 มิลลิกรัม/100 กรัม ส่วนยีสต์สกัดทางการค้ามีปริมาณกรดกลูตามิก (12,600 มิลลิกรัม/100 กรัม) ซึ่งสูงกว่าในสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท (6,690 มิลลิกรัม/100 กรัม) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ในการผลิตยีสต์สกัดทางการค้า (ไม่ทราบสายพันธุ์) และยีสต์ที่ใช้แล้วจากกระบวนการหมักเบียร์ (*S. cerevisiae*) จึงทำให้มีปริมาณกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน

Thomas และคณะ (1996) รายงานว่า ไกลซีนเป็นสารป้องกันแรงดันออสโมติก (osmoprotectant) ซึ่งมีในสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทมากที่สุด (3,390 มิลลิกรัม/100 กรัม) ส่วนสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทมีปริมาณกรดอะมิโนทุกชนิดน้อยกว่าสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทและยีสต์สกัดทางการค้า (ตารางที่ 4.19)

นอกจากนี้ Shotipruk และคณะ (2006) ได้รายงานว่า การสกัดโปรตีนจากยีสต์ที่ใช้แล้วหลังจากการหมักเบียร์ จะได้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดให้สูงขึ้นจาก 100°ซ เป็น 250°ซ แต่การสกัดที่อุณหภูมิสูงจะมีปริมาณกรดอะมิโนลดลง ส่งผลให้สารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทซึ่งผลิตที่อุณหภูมิและความดันสูงมีปริมาณของกรดอะมิโนน้อยกว่าสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทและยีสต์สกัดทางการค้า

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การใช้สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 280 กรัม/ลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังแทนการใช้หัวมันสำปะหลังเพื่อลดปัญหาความเสียหายของเครื่องจักร แต่ทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น เนื่องจากแป้งมันสำปะหลังมีราคาแพงกว่าหัวมันสำปะหลัง ดังนั้น การหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังแบบวีเอชจี (VHG) จึงอาจเป็นวิธีหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิต เพราะการผลิตเอทานอลแบบนี้ ได้เอทานอลความเข้มข้นสูง ต้นทุนค่าการกลั่นจึงลดลง และยังช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ด้วย นอกจากนี้ยังมีแนวคิดในการพัฒนาสูตรอาหารเพื่อลดต้นทุนในการหมักเอทานอล ซึ่งผลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ในอาหาร oEPM การเติมยีสต์สกัดทางการค้าเพียงอย่างเดียว ได้เอทานอลสูงสุด 111.13 กรัม/ลิตร อัตราการผลิตเอทานอล 2.31 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ที่ 48 ชั่วโมง โดยไม่จำเป็นต้องเติมธาตุอาหารรอง สารอาหารอนินทรีย์และเพปโตน ทั้งนี้ เนื่องมาจากองค์ประกอบของธาตุอาหารที่มีในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง สามารถนำมาใช้แทนได้

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทและสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทกับยีสต์สกัดทางการค้าต่อการหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยคำนวณปริมาณโปรตีนและไนโตรเจนเท่ากัน (โปรตีนและไนโตรเจนร้อยละ 0.55 และ 0.09 ตามลำดับ) ที่ 48 ชั่วโมง การเติมยีสต์สกัดทางการค้า 7.5 กรัม/ลิตร ได้เอทานอล 113.14 กรัม/ลิตร อัตราการผลิตเอทานอล 2.36 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และการเติมสารสกัดจากยีสต์ออโตเซทได้เอทานอลใกล้เคียงกันคือ 112.01 กรัม/ลิตร อัตราการผลิตเอทานอล 2.33 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ส่วนสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทมีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลต่ำกว่ายีสต์สกัดทางการค้าและสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซท ซึ่งสามารถหมักเอทานอลได้เพียง 107.81 กรัม/ลิตร และมีอัตราการผลิตเอทานอลเพียง 2.25 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ทั้งนี้เพราะกระบวนการเตรียมสารสกัดจากยีสต์ไฮโดรไลเซทใช้อุณหภูมิและความดันสูง ทำให้วิตามินและกรด อะมิโนที่ยีสต์จะนำไปใช้ในการหมักเอทานอลถูกทำลายไป

จากการหาค่าที่เหมาะสมที่สุดของสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทที่เตรียมได้จากยีสต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์ การเติมสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทปริมาณ 5.23 กรัม/ลิตร (โปรตีนและไนโตรเจนร้อยละ 0.36 และ 0.06 ตามลำดับ) เพียงอย่างเดียว สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่ 48

ชั่วโมง คือ 115.77 กรัม/ลิตร อัตราการผลิตเอทานอลสูงสุด 2.41 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ดังนั้น ยีสต์สกัดทางการค้าจึงสามารถทดแทนได้ด้วยสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทที่มีราคาถูก โดยไม่จำเป็นต้องเติมธาตุอาหารรอง สารอาหารอนินทรีย์และเพปโตนในอาหาร oEPM ทั้งนี้ เนื่องมาจากองค์ประกอบของธาตุอาหารที่มีในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง และวิตามินกับกรดอะมิโนในสารสกัดจากยีสต์ออโตไลเซทสามารถนำมาใช้แทนได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กล้าณรงค์ ศรีรอต, & เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. (2546). เทคโนโลยีแป้ง. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กาญจนา แสงลิ้มสุวรรณ. (2554). เชื้อเพลิงชีวภาพ: พลังงานแห่งทางเลือก. นักบริหาร, 31(4), 3-7.

เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, สิทธิโชค วัลลภาทิตย์, บุญเรียง ล้ำชัยภูมิ, & กล้าณรงค์ ศรีรอต. (2546). โอกาสของมันสำปะหลังกับอุตสาหกรรมเอทานอลของไทย. สมาคมแป้งมันสำปะหลังไทย, 1-10.

ทวี เวชพฤติ. (2551). พลังงานและสภาวะแวดล้อม (Energy and Environment). บทความวิชาการ, 16, 1-13.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, & ปรีชา สุวรรณพินิจ. (2557). จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศรินทิพ สุกใส, & ศจี น้อยตั้ง. เอกสารประกอบการสอนวิชาเทคโนโลยียีสต์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สาวิตรี ลิ่มทอง. (2549). ยีสต์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. (2555). ยุทธศาสตร์วิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมมันสำปะหลังประเทศไทย (พ.ศ.2555-2559).

ออนไลน์. http://www.foodsubs.com/ThickenStarch.html Retrieved 15 พฤษภาคม 2558

ออนไลน์. http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/carbohydrates.htm Retrieved 16 พฤษภาคม 2558

ออนไลน์. https://www.dovesfarm.co.uk/gluten-free/gluten-free-ingredients/tapioca-starch. Retrieved 15 พฤษภาคม 2558

ออนไลน์. www.freebase.com/view/wikipedia/images/commons_id/1069017. Retrieved 15 พฤษภาคม 2558

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาษาอังกฤษ

Andrietta, M. G. S., Andrietta, S. R., Steckelberg, C., & Stupiello, E. N. A. (2007). Bioethanol-Brazil, 30 years of Proalcool. *International Sugar Journal,* 109, 195-200.

Bafrncová, P., Smogrovicová, D., Sláviková, I., Pátková, J., & Dömény, Z. (1999). Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters,* 21, 337–341.

Beynum, G. M. A. V., & Roels, J. A. (1985). *Starch Conversion Technology*. New York: Marcel Dekker, Inc.

Birch, R. M., & Walker, G. M. (2000). Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology,* 26, 678–687.

Dixon, M., & Webb, E. G. (1964). *Enzymes*. New York: Academic Press.

Gutierrez, L. E. (1993). Effect of some vitamins and micronutrient deficiencies on the production of higher alcohols by Saccharomyces cerevisiae. *Scientia Agricola,* 50, 484-489.

Hoondee, P., Tolieng, V., Tanasupawat, S., Kitpreechavanich, V., & Akaracharanya, A. (2014). Very high gravity ethanol fermentation by the newly isolated osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae* isolate G2-3-2. *Chiang Mai Journal of Science,* 41, 1-16.

Jutakanoke, R., Leepipatpiboon, N., Tolieng, V., Kitpreechavanich, V., Srinorakutara, T., & Akaracharanya, A. (2012). Sugarcane leaves: Pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy,* 39, 283-289. doi: 10.1016/j.biombioe.2012.01.018

Kawa-Rygielska, J., & Pietrzak, W. (2014). Ethanol fermentation of very high gravity (VHG) maize mashes by Saccharomyces cerevisiae with spent brewer's yeast supplementation. *Biomass and Bioenergy,* 60, 50-57. doi: 10.1016/j.biombioe.2013.10.028

Kosaric, N., Wieczorek, A., Cosentino, G. P., & Magee, R. J. (1983). *Ethanol Fermentation* (Vol. 3). Weinheim: Verlag Chemie.

Laopaiboon, L., Nuanpeng, S., Srinophakun, P., Klanrit, P., & Laopaiboon, P. (2009). Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource Technology,* 100(18), 4176-4182. doi: 10.1016/j.biortech.2009.03.046

Liang, Q., & Zhou, B. (2007). Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways. *Mol Biol Cell,* 18(12), 4741-4749. doi: 10.1091/mbc.E07-05-0431

Limtong, S., Sringiew, C., & Yongmanitchai, W. (2007). Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated Kluyveromyces marxianus. *Bioresource Technology,* 98(17), 3367-3374. doi: 10.1016/j.biortech.2006.10.044

Nabais, R. C., Sá-Correia, I., Viegas, C. A., & Novais, J. M. (1988). Influence of calcium ion on ethanol tolerance of Saccharomyces bayanus and alcoholic fermentation by yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2439-2446.

Nguyen, T. L. T., & Gheewala, S. H. (2007). Life cycle assessment of fuel ethanol from cassava in Thailand. *The International Journal of Life Cycle Assessment,* 13(2), 147-154. doi: 10.1065/lca2007.06.343

Nordstrom, K. (1962). Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast III. *Journal of the Institute of Brewing,* 68, 398-407.

Olson, B. H., & Johnson, M. J. (1949). Factors producing high yeast yields in synthetic media. *Journal of Bacteriology,* 57, 235-246.

Palukurty, M. A., Telgana, N. K., Bora, H. S. R., & Mulampaka, S. N. (2008). Screening and optimization of metal ions to enhance ethanol production using statistical experimental designs. *African Journal of Microbiology Research,* 2, 087-094.

Panchal, C. J., & Tavares F.C.A. (1990). *Yeast strain selection for ethanol production*. New York: Marcel Dekker, Inc.

Phil, D., Sc, M., Mitra, S. P., ASc, F. V., & Garg, N. K. (1959). Studies on dhar yeast II. effect of inorganic ions on growth. *Journal of the Institute of Brewing,* 65, 342-346.

Reddy, L. V. A., & Reddy, O. V. S. (2006). Rapid and enhanced production of ethanol in very high gravity (VHG) sugar fermentation by Saccharomyces cerevisiae: Role of finger millet (Eleusine coracana L.) flour. *Process Biochemistry,* 41(3), 726-729. doi: 10.1016/j.procbio.2005.08.011

Reed, G. (1983). *Microbial biomass, single cell protein and other microbial products*. Wistport: An AVI Publishing.

Shotipruk, A., Lamoolphak, W., Goto, M., Sasaki, M., Suphantharika, M., Muangnapoh, C., & Prommuag, C. (2006). Hydrothermal decomposition of yeast cells for production of proteins and amino acids. *J Hazard Mater,* 137(3), 1643-1648. doi: 10.1016/j.jhazmat.2006.05.029

Silalertruksa, T., & Gheewala, S. H. (2010). Security of feedstocks supply for future bio-ethanol production in Thailand. *Energy Policy,* 38(11), 7476-7486. doi: 10.1016/j.enpol.2010.08.034

Stewart, G. G. (1987). *Alcoholic beverages*. New York: An AVI Pub Book.

Tangüler, H., & Erten, H. (2009). The effect of different temperatures on autolysis of baker's yeast for the production of yeast extract. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry,* 33, 149-154. doi: 10.3906/tar-0803-17

Teague, W. M., & Brumm, P. J. (1992). *Commercial enzyme for starch hydrolysis products*. New York: VCH Publishers.

Thomas, K. C., & Ingledew, W. M. (1990). Fuel Alcohol Production: Effects of Free Amino Nitrogen on Fermentation of Very-High-Gravity Wheat Mashes. *Applied and Environmental Microbiology,* 56, 2046-2050.

Thomas, K. C., Hynes, S.H., & Ingledew, W.M. (1996). Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. *Process Biochemistry,* 31, 321-331.

Xue, C., Zhao, X.-Q., Yuan, W.-J., & Bai, F.-W. (2008). Improving ethanol tolerance of a self-flocculating yeast by optimization of medium composition. *World Journal*

of Microbiology and Biotechnology, 24(10), 2257-2261. doi: 10.1007/s11274-008-9739-x

Zhao, X. Q., Xue, C., Ge, X. M., Yuan, W. J., Wang, J. Y., & Bai, F. W. (2009). Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation. *J Biotechnol,* 139(1), 55-60. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.08.013

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็งยีสต์สกัด เพปโตนและเดกซ์โทรส (YPD agar)

ประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส	100	กรัม
แบคโตเพปโตน	3	กรัม
ยีสต์สกัด	3	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 5.0 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110°ซ ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

2. อาหารเหลวยีสต์สกัด เพปโตนและเดกซ์โทรส (YPD broth)

ประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส	100	กรัม
แบคโตเพปโตน	3	กรัม
ยีสต์สกัด	3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 5.0 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110°ซ ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. อาหารเหลวยีสต์สกัด มอลต์สกัด (YM medium)

ประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส	150	กรัม
แบคโตเพปโตน	5	กรัม
ยีสต์สกัด	3	กรัม
มอลต์สกัด	3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 5.0 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110°ซ ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

4. อาหารเหลวที่เหมาะสำหรับผลิตเอทานอล (oEPM)

ประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส	280	กรัม
แบคโตเพปโตน	5	กรัม
ยีสต์สกัด	7.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	3	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	1.5	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	1	กรัม
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$)	1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตเตตระไฮเดรต ($MnSO_4.4H2O$)	0.5	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 5.0 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110°ซ ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1992)

วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น กลูโคส โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลายคอปเปอร์ เกิดสีโมลิบดินัมบลู (molybdenum blue) ดังปฏิกิริยา

1. $2Cu^{2+}$ + reducing sugar ------► CuO_2
2. $Cu_2O + H_2SO_4$ ------► $2Cu^{+}$
3. $2Cu^{+} + MoO_4^{2+}$ ------► $2Cu^{2+}$ + molybdenum blue

1.1 Alkaline Copper Reagent

$Na_2HPO_4.12H_2O$	71	กรัม
$KNaC_4H_4O_6.5H_2O$ (Rochelle salt)	40	กรัม
1N NaOH	100	มิลลิลิตร
10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $CuSO_4.5H_2O$	80	มิลลิลิตร
(ละลาย 8 กรัม $CuSO_4.5H_2O$ ในน้ำกลั่น 80 มล.)		
Na_2SO_4	180	กรัม

(ละลายสารละลายข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มล.)

1.2 Nelson's Reagent

$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	53.2	กรัม
กรดซัลฟิวริกเข้มข้น	21	มิลลิลิตร
12% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $Na_2HAsO_4.7H_2O$	50	มิลลิลิตร
(ละลาย 6 กรัม $Na_2HAsO_4.7H_2O$ ในน้ำกลั่น 50 มล.)		

(ละลายสารละลายข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มล.)

Chulalongkorn University

วิธีการวิเคราะห์

1. ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 20-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิลิตร หรือตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร (สำหรับ blank) ใส่ในหลอดทดลองขนาดกลาง

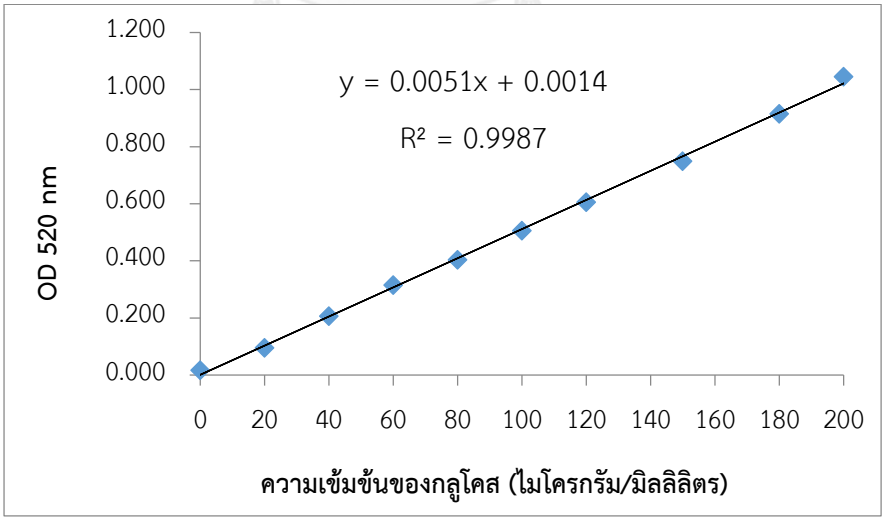
2. เติม Alkaline Copper Reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

3. เติม Nelson's reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส

1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสวิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson

2. วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl method (A.O.A.C., 1990)

Kjeldahl method เปนวิธีการวิเคราะหหาปริมาณโปรตีนในอาหารในรูปของไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยการยอยสลายโปรตีน ปลดปลอยไนโตรเจนออกมาและถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนีย โดยมีวิธีการวิเคราะห์ 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การย่อย (digestion) เป็นขั้นตอนของการเปลี่ยนสารประกอบไนโตรเจนที่มีอยู่ในตัวอย่างให้อยู่ในรูปของ $(NH_4)_2SO_4$ โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO4)

2. การกลั่น (distillation) เป็นขั้นตอนของการกลั่นเพื่อไล่แอมโมเนียออกมาโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และเก็บไว้ในสารละลายกรดบอริก (boric acid)

3. การไตเตรท (titration) ในกรณีที่ใช้กรดบอริกเป็นตัวเก็บแอมโมเนียให้ไตเตรทด้วยสารละลายกรดมาตรฐานเพื่อหาปริมาณสารละลายกรดมาตรฐานที่ทำปฏิกิริยาแอมโมเนีย

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4
3. กรดไฮโดรคลอริก
4. สารเร่งการย่อย (catalyst) ประกอบด้วย 5 กรัม $CuSO_4.5H_2O$ และ 95 กรัม K_2SO_4
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 32
6. อินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator) ระหว่างเมทิลเรดกับโบรโมครีซอลกรีน

วิธีการวิเคราะห์

การย่อยตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่าง 0.2-0.5 กรัม หรือ 5-10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดย่อยตามปริมาณไนโตรเจนที่คาดว่าจะมี (ทำ blank ทุกครั้ง)

2. ใส่สารเร่งการย่อย (catalyst) 7 กรัม

3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร สวมและเปิดเครื่องจับไอกรด

4. นำไปย่อยบนเตาไฟจนได้ของเหลวสีเขียวใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

5. นำไปกลั่น

การกลั่นตัวอย่าง

1. เติมน้ำ DI 50 มิลลิลิตร

2. ใส่หลอดเข้ากับเครื่องกลั่นและเปิดน้ำหล่อเย็น

3. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 32 ลงไปช้าๆ จนได้สารละลายสีดำ

4. เริ่มกลั่นโดยใช้กรดบอริก (ร้อยละ 4) ที่มีการเติม mixed indicator (2-3 หยด) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร รองรับ condensate โดยให้ปลายท่อจมอยู่ใต้กรด

5. กลั่นให้ได้ condensate ประมาณ 100-150 มิลลิลิตร ก่อนเสร็จการกลั่นในแต่ละครั้งให้เลื่อนฟลาสก์เก็บตัวอย่างออกแล้วนำฟลาสก์ใหม่ที่บรรจุน้ำกลั่นใส่เข้าไปแทน กลั่นต่อประมาณ 1 นาที เพื่อล้างเครื่องกลั่น

6. ไตเตรทสารที่กลั่นได้กับ 0.1 N HCl ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

การคำนวณ

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ) = $\frac{((A-B)\times N \times 0.014007) \times 100}{W}$

ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) = ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ) X factor

หมายเหตุ Factor ที่ใช้คำนวณ คือ 6.25

A คือ ปริมาณของกรดไฮโดรคลอไรด์ที่ใชในการไทเทรตกับตัวอย่าง

B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใชในการไทเทรตกับ blank

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)

W คือ น้ำหนักตัวอยาง

3. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

การวิเคราะห์หาความชื้น โดยวิธีการอบแห้ง (drying methods) เป็นการหาน้ำหนักของน้ำที่หายไปโดยใช้ความร้อนในการระเหยน้ำออกไป ดังนั้น ความชื้นที่ได้โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จึงไม่ใช่ค่าความชื้นที่แท้จริงของอาหารแต่เป็นค่าโดยประมาณเท่านั้น

อุปกรณ์

1. Aluminum foil
2. ช้อนตักสาร
3. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. โถดูดความชื้น (desiccator)
6. คีมคีบ (forcep)

วิธีการวิเคราะห์

1. นำ aluminum dish ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 ± 5°ซ แล้วนำไปใส่ในโถดูดความชื้นเพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนักและจดบันทึกน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่าง 2-5 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ใน aluminum dish
3. นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 ± 5°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. นำ aluminum dish กับตัวอย่างที่ผ่านการอบไปใส่ในโถดูดความชื้น เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งแล้วนำไปอบจนได้น้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

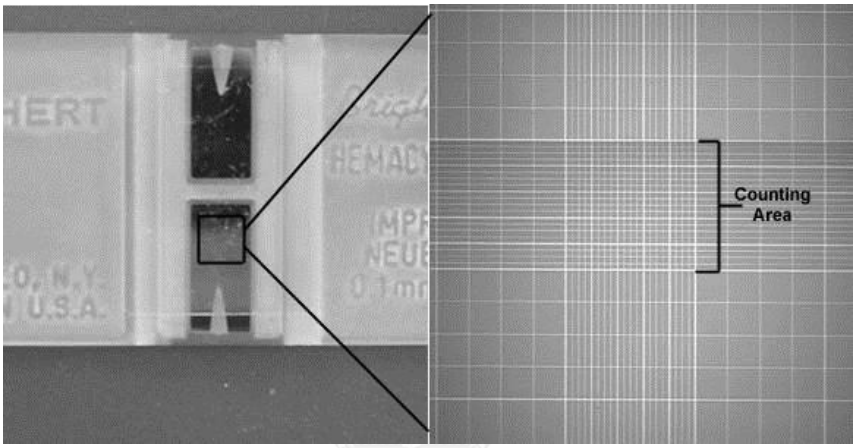
วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \; x\; 100$$

4. การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์โดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์

หลักการ

วิธีนี้ใช้ในการนับจำนวนเซลล์ยีสต์โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า Haemacytometer เมื่อนำ Haemacytometer มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ให้ปรับโฟกัสลงบนช่องที่เป็นตาราง (Grid lines) เวลาใช้ต้องปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ (Cover glass) ขีดแบ่งที่กำหนดไว้ประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจตุรัสใหญ่ตรงกลางที่ประกอบด้วย 25 ช่องจตุรัสเล็กตามภาพประกอบภาคผนวกที่ 2



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 2 Haemacytometer

(ที่มา : http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval /hemacytometer.html : ออนไลน์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แต่ละช่องมีขนาด 0.2 X 0.2 ตารางมิลลิเมตร และในแต่ละช่องนี้จะแบ่งเป็นช่องสี่เหลี่ยมจตุรัสเล็ก ๆ อีก 16 ช่อง แต่ละช่องมีเนื้อที่ 0.05 X 0.05 ตารางมิลลิเมตร เพื่อความถูกต้องและแม่นยำ ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ควรเจือจางในระดับที่สามารถตรวจนับจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็กได้ในระหว่าง 1-10 เซลล์

การคำนวณปริมาณจุลินทรีย์ที่ตรวจนับได้

ปริมาตรของ 1 ช่องใหญ่ = 0.2 x 0.2 x 0.1 ลบ. มิลลิเมตร

= 0.004 ลบ. มิลลิเมตร

= 4.0×10^{-6} มิลลิลิตร

จากจำนวนเซลล์ที่นับได้ รวมจำนวนเซลล์จากแต่ละช่องเล็กแล้วหารด้วยจำนวนช่อง จะได้ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ต่อ 1 ช่องใหญ่ สมมติได้ A เซลล์ต่อช่องใหญ่

คำนวณจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างได้ดังนี้

ตัวอย่าง 1 ช่องใหญ่มีปริมาตร = 4.0×10^{-6} มิลลิลิตร

ดังนั้น จำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่าง = $\frac{A}{4.0 \times 10^{-6}}$

= $\frac{A \times 10^{6}}{4}$ เซลล์/มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาวธนาพร พลศักดิ์

วัน เดือน ปีเกิด 22 กุมภาพันธ์ 2534

ที่อยู่ปัจจุบัน จังหวัดปทุมธานี

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2555 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมัก
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2556 ศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University