

การผลิตแอลกอฮอล์จากกากตะกอนน้ำเสียร่วมกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

Alcohol Production from Mixture of Wastewater Sludge and Agricultural Residues

คำนำ

วิกฤตการณ์ด้านพลังงานเนื่องจากการขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม ทำให้น้ำมันเชื้อเพลิงมีราคาแพงและมีแนวโน้มที่จะมีราคาแพงยิ่งขึ้นในอนาคต จึงจำเป็นต้องหาแหล่งพลังงานทางเลือกอื่น ดังนั้นจึงมีการค้นคว้าวิจัยเพื่อหาแหล่งพลังงานทดแทนชนิดใหม่มาทดแทนน้ำมัน โดยเชื้อเพลิงทดแทนที่ได้รับความสนใจอยู่ในขณะนี้ ได้แก่ แอลกอฮอล์หรือเอทานอล ซึ่งส่วนใหญ่ใช้ผลิตหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหรืออุตสาหกรรมเป็นวัตถุดิบในการผลิต ดังนั้นเชื้อเพลิงทดแทนเหล่านี้จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจและมีความเป็นไปได้สูง โดยเฉพาะสำหรับประเทศไทยที่มีการเกษตรเป็นพื้นฐาน

แอลกอฮอล์เป็นพลังงานทดแทนอย่างหนึ่งที่มีศักยภาพสูง เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่สามารถผลิตได้จากวัสดุทางการเกษตรต่างๆ แอลกอฮอล์สามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำมันได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อนำเอแอลกอฮอล์มาผสมกับน้ำมันเบนซิน ในชื่อที่เรียกว่าแก๊ซโซฮอล์ ซึ่งมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับน้ำมันเบนซิน สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงให้แรงอัดของเครื่องยนต์และยังลดมลพิษในอากาศ เพราะแอลกอฮอล์ไม่มีสารตะกั่วหรือสารเมทิลเทอร์เทียริบิวทิลอีเธอร์ (MTBE) ที่ใช้เป็นสารเพิ่มออกเทนให้กับน้ำมัน นอกจากนี้แอลกอฮอล์ยังใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมยางเทียม อุตสาหกรรมพลาสติก อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมยาและเคมีภัณฑ์ต่างๆ อย่างไรก็ดี การผลิตเอทานอลของประเทศยังไม่เพียงพอต่อความต้องการและยังมีความต้องการผลิตที่สูง จากปัญหาดังกล่าวทำให้ต้องมีการพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลโดยการนำผลผลิตทางการเกษตรที่มีปัญหาราคาตกต่ำมาแปรรูปเป็นเอทานอล และเนื่องจากประเทศไทยมีพืชผลทางการเกษตรและวัสดุที่เหลือใช้อยู่มาก สามารถนำมาผลิตเอทานอลในต้นทุนที่ต่ำได้และการพัฒนากระบวนการหมักจะช่วยเพิ่มอัตราการผลิตให้สูงขึ้น

กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียกำลังเป็นปัญหาสำคัญ เนื่องจากมีปริมาณมากและมีแนวโน้มจะเพิ่มปริมาณมากขึ้น ทำให้เป็นปัญหาของโรงงานอุตสาหกรรมผู้ผลิตซึ่งต้องรับภาระค่าใช้จ่ายในการกำจัดกากตะกอนน้ำเสีย กากตะกอนน้ำเสียที่ถูกผลิตขึ้นนั้นต้องได้รับการจัดการที่ถูกต้อง โดยส่วนใหญ่กากตะกอนน้ำเสียจะถูกนำไปใช้เป็นปุ๋ยในพื้นที่การเกษตรและการหมักให้เกิดก๊าซชีวภาพ แต่ด้วยปริมาณที่มากและมีปริมาณน้ำเป็นองค์ประกอบสูง จึงมักถูกนำไปบำบัดต่อไปเพื่อลดปริมาตรลงและในที่สุดจะถูกนำไปฝังกลบ จากปริมาณกากตะกอนที่ต้องทิ้งในแต่ละวันมีปริมาณมาก จึงทำให้เกิดแนวความคิดเพื่อเพิ่มการใช้ประโยชน์ โดยการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์

พื้นฐานหลักทางเศรษฐกิจของประเทศไทยคือผลิตผลทางการเกษตรที่หลากหลาย ด้วยเหตุนี้จึงมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรปริมาณมากในแต่ละปี แม้ว่าวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ส่วนหนึ่งถูกนำไปใช้ประโยชน์โดยตรงสำหรับเป็นอาหารสัตว์หรืออาจเป็นแหล่งพลังงาน แต่ยังมีอีกเป็นปริมาณมากที่เหลือทิ้งซึ่งต้องได้รับการจัดการ หากไม่มีการจัดการวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอย่างถูกวิธี เชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติจะทำการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ในวัสดุเหลือทิ้งต่างๆ ส่งผลให้เกิดมลพิษทางอากาศจากกลิ่นไม่พึงประสงค์ หรือหากมีการชะล้างในฤดูฝน จะก่อให้เกิดการปนเปื้อนลงแหล่งน้ำและดิน ทั้งยังเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของเชื้อโรค แมลง และสัตว์นำโรคสู่ชุมชน ประกอบกับปัญหาการพึ่งพาเชื้อเพลิงพลังงานจากต่างประเทศ ทำให้ปัจจุบันมีการศึกษาเพื่อนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์ให้มากขึ้น กากมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก ด้วยปริมาณแป้งที่มีมากในวัสดุเหลือทิ้งนี้จึงเกิดแนวทางการนำวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเอทานอล ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร อีกทั้งยังก่อให้เกิดการสร้างงานและอาชีพให้กับภาคการเกษตร ซึ่งส่งผลให้คุณภาพชีวิตของประชาชนดีขึ้น

ด้วยความตระหนักถึงความสำคัญของการหาแหล่งพลังงานทดแทน งานวิจัยนี้มุ่งเสนอแนวทางการใช้กากตะกอนน้ำเสียที่ได้จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งและกากมันสำปะหลังเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงานจากระบวนการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์หรือสารเริ่มต้นที่ใช้ผลิตแอลกอฮอล์ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้อาจเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์จากกากตะกอนน้ำเสียและกากมันสำปะหลังได้อีกทางหนึ่ง เพราะนอกจากลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสียเหล่านี้แล้ว ยังเป็นการสร้างมูลค่าของวัตถุเหล่านี้ได้อีกทางหนึ่ง ซึ่งการศึกษาครั้งนี้จะเป็นแนวทางในการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับพลังงานทดแทนต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตแอลกอฮอล์จากกากตะกอนน้ำเสียร่วมกับกากมันสำปะหลัง
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสียร่วมกับกากมันสำปะหลัง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นแนวทางในการพัฒนาและประยุกต์ใช้กากตะกอนน้ำเสียในรูปแบบใหม่ที่สร้างมูลค่าของกากตะกอนน้ำเสียและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้มีมูลค่าเพิ่มขึ้น และเป็นการผลิตเชื้อเพลิงที่มีต้นทุนต่ำอีกด้วย
2. ทราบเทคนิควิธีการหมักเพื่อผลิตเอทานอลที่มีประสิทธิภาพและได้ผลผลิตสูง ซึ่งสามารถนำไปใช้เพื่อปรับปรุงและพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลในระดับขยายส่วน ซึ่งเป็นขั้นพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. กากมันสำปะหลัง

วิกฤตการณ์ด้านพลังงานเนื่องจากการขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม ทำให้น้ำมันเชื้อเพลิงมีราคาแพงและมีแนวโน้มที่จะมีราคาแพงยิ่งขึ้นในอนาคต จึงจำเป็นต้องหาแหล่งพลังงานอื่นมาทดแทน เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ ประเทศไทยมีวัตถุดิบทางการเกษตรหลายชนิดและมีปริมาณมากพอที่จะนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กากมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง เมื่อพิจารณาองค์ประกอบที่มีอยู่ในกากมันสำปะหลัง พบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแป้งที่ไม่สามารถแยกออกได้จากกระบวนการผลิตแป้งมัน ส่วนองค์ประกอบที่เหลือเป็นเส้นใยจากเปลือกของหัวมันสดและเส้นใยจากเนื้อมันสำปะหลัง มีโปรตีนและไขมันอยู่เพียงเล็กน้อย (Grace, 1997) เนื่องจากกากมันสำปะหลังมีลักษณะเปียกและมีความชื้นสูง จึงทำให้เป็นอุปสรรคอย่างยิ่งต่อการลำเลียงและต้องเสียค่าใช้จ่ายในการอบกากมันสำปะหลังให้แห้ง รวมทั้งเกิดการเน่าเสียได้ง่าย ดังนั้นจึงนิยมนำกากมันสำปะหลังไปตากแดดให้แห้งและจำหน่ายในราคาถูกเพื่อใช้ในการผสมอาหารสัตว์ เนื่องจากกากมันสำปะหลังมีแป้งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่จึงทำให้ได้รับความสนใจในทางวิชาการเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล นอกจากนี้กากมันสำปะหลังยังมีปริมาณมาก หาได้ง่าย และมีราคาถูก

1.1 องค์ประกอบกากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตแป้งมันสำปะหลังและมีน้ำหนักคิดเป็นร้อยละ 24.80-32.32 ของน้ำหนักหัวมันสำปะหลังสดที่นำมาผลิตเป็นแป้งมันสำปะหลัง (ทรงศักดิ์, 2543) กากมันสำปะหลังที่เหลือจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังนั้นจะถูกแยกออกมาเมื่อผ่านกระบวนการสกัดและบีบอัดสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยปกติกากมันสำปะหลังสดจะมีความชื้นประมาณร้อยละ 75-80 องค์ประกอบส่วนใหญ่ของกากมันสำปะหลัง คือ คาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้ยังมีโปรตีน ไขมัน เส้นใย และแร่ธาตุในปริมาณต่ำ โดยองค์ประกอบของกากมันสำปะหลังจะแตกต่างกันตามคุณภาพวัตถุดิบ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ อายุการเก็บเกี่ยว แหล่งเพาะปลูก และการจัดการการเพาะปลูก นอกจากนี้องค์ประกอบของกากมันสำปะหลังยังขึ้นกับกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังด้วย ซึ่งได้แก่ ประสิทธิภาพการสกัดแป้ง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง

ลักษณะของกาก มันสำปะหลัง	องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละ)						แหล่งข้อมูล
	คาร์โบไฮเดรต	โปรตีน	ไขมัน	เส้นใย	เถ้า	ความชื้น	
กากมันทั่วไป	75.45	1.77	0.18	8.2	1.36	13.03	ชวนิศนตากร (2500)
กากมันอบแห้ง	71.7	2.3	1	9.6	1.5	13.86	ชวนิศนตากร (2500)
กากมันตาก แดด	67.5	2.3	0.7	9.8	6.2	13.47	ชวนิศนตากร (2500)
กากมันทั่วไป	59.77	-	-	-	-	9.25	จิรากรณ์ (2525)
กากมันแห้ง	90.8	1.04	0.8	5.3	1.8	13.2	ทวี (2527)
กากมันสด (น้ำหนักแห้ง)	94	1	0.5	1.5	1.5	80	ทวี (2527)
กากมันแห้ง	77.6	1	0.8	5.3	1.8	13.2	เมธาและ ฉลอง (2533)
กากมันสด	14	2.5	0.5	1.5	-	80	เมธาและ ฉลอง (2533)

ที่มา: ดัดแปลงจาก ทรงศักดิ์ (2543)

1.2 ปริมาณไซยาไนด์

ไซยาไนด์ เป็นสารประกอบที่พบในพืชกว่า 3000 ชนิด ซึ่งพบในมันสำปะหลังด้วย โดยในมันสำปะหลังนั้นไซยาไนด์ถูกสร้างจากกรดอะมิโน 2 ตัว คือ แวลีน (valine) และ ไอโซลิวซีน (isoleucine) ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้เป็นลินามาริน (linamarin) และ โลทอสตราลิน (lotaustralin หรือ 2-hydroxy-2-methylbutyronitrile- β -D-glycoside) ในมันสำปะหลังจะมี ลินามารินอยู่ร้อยละ 93 และ โลทอสตราลินอยู่ร้อยละ 7 สารประกอบดังกล่าวจะอยู่บริเวณเนื้อเยื่อ เมื่อเนื้อเยื่อถูกทำลายสารประกอบเหล่านี้จะถูกทำลายโดยขบวนการไฮโดรไลซิสกับน้ำย่อยจะได้ อะซิโตนและกรดไฮโดรไซยานิก ซึ่งปรากฏการณ์ที่พืชสามารถปล่อยกรดไฮโดรไซยานิกออกมา เรียกว่า ไซยาโนเจเนซิส (cyanogenesis) เพื่อป้องกันตัวเองของพืชจากการทำลายโดยพืชและสัตว์ (Hughes *et al.*, 1994)

โดยทั่วไปปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกที่พบในมันสำปะหลังที่ปลูกเปลี่ยนก็มีตั้งแต่ 14-400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Coursey, 1973) ดังนี้

1.2.1 Innocuous (ไม่มีพิษ) คือมันสำปะหลังที่มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกอยู่น้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

1.2.2 Moderately poisonous คือมันสำปะหลังที่มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกตั้งแต่ 50-100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

1.2.3 Dangerous poisonous คือมันสำปะหลังที่มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกมากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ปัจจุบันนี้กากมันสำปะหลังถูกนำมาใช้ประโยชน์ต่างๆ เช่น ใช้เป็นวัตถุดิบเชื้อเพลิงในโรงงานไฟฟ้าชีวมวลเพื่อผลิตไฟฟ้า ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักให้เกิดแก๊สมีเทน ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กรดมะนาวและแซนแทนกัม แอลกอฮอล์ การเพาะเห็ด ใช้เป็นอาหารสัตว์โดยใช้เป็นอาหารเสริมร่วมกับหัวอาหารเช่น อาหารไก่ อาหารสุกร และใช้เป็นส่วนผสมในการทำปุ๋ยหมัก เป็นต้น

2. กากตะกอนน้ำเสีย

ปัจจุบันธุรกิจภาคอุตสาหกรรมในประเทศไทยได้ขยายตัวอย่างรวดเร็ว เพื่อรองรับกระบวนการผลิตที่เพิ่มขึ้นและพ่วงเพียงกับจำนวนประชากรที่มากขึ้น โดยสิ่งที่ตามมาจากการขยายตัวของธุรกิจภาคอุตสาหกรรม คือ ปัญหาสิ่งแวดล้อมด้านต่างๆ เช่น มลพิษทางน้ำและอากาศ ปัญหาปริมาณขยะที่มาก เป็นต้น ดังนั้นจึงได้มีกฎหมายควบคุมการปล่อยของเสียต่างๆ ให้อยู่ในระดับมาตรฐาน มลพิษทางน้ำเป็นปัญหาที่สำคัญของโรงงานอุตสาหกรรมเกือบทุกประเภท ไม่ว่าจะเกิดจากกระบวนการผลิตเอง หรือมาจากการล้างวัตถุดิบ การทำความสะอาดและใช้ในกิจกรรมต่างๆ ของโรงงาน โดยน้ำเสียที่เกิดขึ้นนี้จะต้องทำการบำบัดก่อนเพื่อให้ได้คุณภาพอยู่ในค่ามาตรฐาน

การบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จะใช้ระบบบำบัดน้ำเสียแบบชีวภาพ ซึ่งจะได้กากตะกอนน้ำเสียหรือที่เรียกว่าสลัดจ์ (sludge) ออกมาเป็นจำนวนมากและจะต้องทำการบำบัดเสียก่อนที่จะนำไปกำจัดต่อไป โดยทั่วไปกากตะกอนน้ำเสียที่ได้จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบชีวภาพเมื่อทำการปรับสภาพแล้วสามารถนำมาใช้ถมที่ ปรับปรุงดิน หรือหมักทำปุ๋ยใช้ประโยชน์ได้ ปัจจุบันนี้กากตะกอนน้ำเสียได้เพิ่มปริมาณมากขึ้นตามจำนวนโรงงานอุตสาหกรรม จึงได้มีการหาทางเลือกใหม่ในการใช้ประโยชน์จากกากตะกอนน้ำเสียให้ได้มากที่สุด

กากตะกอนน้ำเสียโดยทั่วไป แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

(1) กากตะกอนที่เป็นสารอนินทรีย์ (inorganic sludge)

ส่วนใหญ่เป็นตะกอนที่เกิดจากการบำบัดน้ำเสียทางเคมี โดยเกิดจากสารเคมีหรือโลหะอื่น ๆ ซึ่งมักจะอยู่ในน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมเคมี หรืออาจเกิดจากการใช้สารเคมีในการตกตะกอนน้ำเสีย เช่น การใช้ปูนขาว สารส้ม หรือพอลิเมอร์ เป็นต้น

(2) กากตะกอนที่เป็นสารอินทรีย์ (organic sludge)

เป็นกากตะกอนที่เกิดจากการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ ลักษณะของตะกอนจะเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่เกาะกลุ่มกันจนมีขนาดใหญ่ ซึ่งจะมีสารอินทรีย์อยู่มาก เช่น น้ำเสียจากชุมชน บ้านเรือน อุตสาหกรรมผลิตน้ำเสียจากโรงงานอาหารและอาหารสัตว์ เป็นต้น ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ เช่น ระบบตะกอนเร่ง (activated sludge) กากตะกอนถูกเลี้ยงให้เติบโต

และบำบัดน้ำเสียที่บ่อเติมอากาศ (aeration tank) จากนั้นกากตะกอนส่วนเกินจะถูกแยกจากน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วที่บ่อตกตะกอน (sedimentation tank) โดยกากตะกอนที่แยกได้ต้องถูกนำไปบำบัดหรือกำจัดที่เหมาะสมต่อไป

2.1 องค์ประกอบของกากตะกอนน้ำเสีย (นัยนา, 2542)

องค์ประกอบของกากตะกอนน้ำเสียบางอย่างสามารถถูกกำจัดหรือทำให้มีปริมาณน้อยลงได้ในระหว่างขั้นตอนการบำบัดน้ำเสีย แต่องค์ประกอบบางอย่างไม่สามารถกำจัดให้หมดได้ในครั้งเดียวหรือบางครั้งอาจมีความเข้มข้นในกากตะกอนสูงกว่าในน้ำเสียได้ ลักษณะทางกายภาพของกากตะกอนอยู่ในรูปกึ่งแข็งกึ่งเหลว มีลักษณะคล้ายดินเหนียว สีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ เมื่ออยู่ในรูปที่ไม่คงตัวจะมีกลิ่นเหม็น มีแก๊สและความร้อนจากการย่อยสลายกากตะกอนของจุลินทรีย์ องค์ประกอบทางเคมีของกากตะกอนจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับประเภทของน้ำเสีย ชนิดของระบบบำบัดน้ำเสีย และกระบวนการบำบัดน้ำเสีย กากตะกอนน้ำเสียประกอบด้วยสารหลายชนิดทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และอนินทรีย์ โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์

องค์ประกอบของกากตะกอนน้ำเสียแยกออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

(1) ธาตุอาหารพืช ได้แก่

- ก. ไนโตรเจน (ประมาณร้อยละ 60)
- ข. ฟอสฟอรัส (ร้อยละ 1)
- ค. โพแทสเซียม
- ง. จุลธาตุอาหารของพืช (เช่น เหล็ก แมงกานีส ทองแดง สังกะสี)
- จ. ธาตุอื่น ๆ

(2) สารปนเปื้อนและเชื้อโรค เช่น โลหะหนัก สารอินทรีย์เคมี จุลินทรีย์และหนอน

พยาธิต่างๆ

2.2 การกำจัดกากตะกอนน้ำเสีย

แนวทางการจัดการกากตะกอนน้ำเสียมีหลายวิธี ซึ่งโดยทั่วไปมีแนวทางขั้นพื้นฐานอยู่ 5 วิธี คือ

- (1) การเกลี่ยผสมกับหน้าดินเพื่อเป็นสารปรับปรุงดิน (spreading on soil)
- (2) การขนไปทิ้งทะเล (marine disposal)
- (3) การกำจัดโดยนำไปถมพื้นที่โดยตะกอนอยู่ในรูปตะกอนแห้ง (landfill)
- (4) การเผา (incineration)
- (5) การหมักทำปุ๋ย (composting)

3. เอนไซม์อะไมเลส

อะไมเลส คือ เอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะ α -1, 4-glucosidic แบบกลุ่มของ polysaccharide เช่น แป้ง ไกลโคเจน หรือ oligosaccharide ให้มีขนาดเล็กลง เช่น โมเลกุลของมอลโตส เดกซ์ทริน หรือโมเลกุลเล็กๆ ของกลูโคส เป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) สามารถผลิตได้จากพืช สัตว์และจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสมิทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ โดยแหล่งผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่สำคัญมาจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อราเป็นแหล่งเอนไซม์อะไมเลสที่ดี เชื้อราสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในทางการค้าคือ เชื้อราสกุล *Aspergillus* และ *Rhizopus* (Elegado and Fujio, 1993; Pandey, 1995) อะไมเลสมีบทบาทในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ มากมาย เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำเชื่อม โดยใช้ในขั้นตอนการย่อยสลายแป้งให้ได้ผลิตภัณฑ์ คือ เดกซ์ทรินและมอลโตสไซรัป ใช้ในอุตสาหกรรมการทำนมอบ เครื่องดื่ม แอลกอฮอล์ เยลลี่ และอุตสาหกรรมทอผ้า (Wiseman, 1975) โดยคุณสมบัติของเอนไซม์จะมีโครงสร้างเป็นโปรตีน ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโนมาต่อกันเป็นสายยาว โดยเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้และมีสภาพเป็นกรดอ่อนๆ

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งได้หลายลักษณะ ขึ้นอยู่กับว่าจะย่อยแป้งที่ตำแหน่งใด แป้งประกอบด้วยกลูแคน 2 ชนิด คือ อะไมโลส (ประกอบด้วยหน่วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วย พันธะแอลฟา 1, 4) และอะไมโลเพคติน (เป็นอะไมโลสที่มีโซ่กิ่งเพิ่มขึ้นโดยมีพันธะ 1, 6 เป็นตัวเชื่อม) เอนไซม์อะไมเลสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทตามตำแหน่งการย่อยแป้ง (ดวงพร, 2530) ได้แก่

(1) เอนโดอะไมเลส (endoamylase) เป็นอะไมเลสประเภทที่ย่อยแป้งแบบสุ่มที่พันธะแอลฟา 1, 4 กลูโคซิมิกของอะไมเลสหรืออะไมโลเพคติน แต่ไม่ย่อยที่พันธะ 1, 6 กลูโคซิมิกของอะไมโลเพคติน ถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้มอลโทสและกลูโคส แต่ถ้าไม่สมบูรณ์จะได้กลูโคส มอลโทส และเดกซ์ทริน เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้ ได้แก่ แบคทีเรียพวก *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas saccharophil* และ *Clostridium sp.* และราพวก *Aspergillus oryzae* และ *A. niger*

(2) เอ็กโซอะไมเลส (exoamylase) เป็นอะไมเลสประเภทที่ย่อยแป้งจาก non-reducing end เข้าไป เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ เบต้าอะไมเลส และอะไมโลกลูโคซิเดส (amylglucosidase) โดยเบต้าอะไมเลสจะย่อยแป้งที่ตำแหน่งพันธะแอลฟา 1, 4 กลูโคซิมิก เข้าไปที่ละ 2 หน่วยของกลูโคส ทำให้ได้น้ำตาลมอลโทส และ limit dextrin ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงปนอยู่ด้วย จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้ส่วนใหญ่จะเป็นพวกแบคทีเรีย เช่น *Bacillus cereus* และ *Bacillus megaterium* สำหรับกลูโคอะไมเลสนั้นสามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์จาก non-reducing end ที่ตำแหน่งต่างๆ คือ ที่พันธะ 1, 6 และแอลฟา 1, 4 กลูโคซิมิก ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสโดยไม่มีเดกซ์ทรินหรือมอลโทสปนมาด้วย จุลินทรีย์ที่มีการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ในปริมาณมากคือ ราพวก *Aspergillus sp.* และ *Rhizopus sp.* นอกจากราแล้ว ยีสต์และแบคทีเรียก็สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ เช่น *Endomycopsis fibuliger*, *Aerobacter* และ *Clostridium* (คุษณี, 2537)

ปริมาณและค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิต วัตถุประสงค์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับกรรมวิธีในการผลิตด้วย

3.1 กระบวนการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์

การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์แบ่งได้เป็น 2 วิธี คือการหมักแบบอาหารแข็ง (solid-state fermentation, SSF) ซึ่งเป็นวิธีการหมักเชื้อจุลินทรีย์ (โดยมากใช้เชื้อรา) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่มีน้ำอยู่ในรูปความชื้นที่ถูกดูดซับไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการหมักแบบอาหารเหลว (submerged liquid fermentation, SMF) ซึ่งเป็นวิธีการหมักเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีลักษณะเหลว เมื่อเปรียบเทียบการหมักทั้งสองวิธี พบว่าข้อได้เปรียบของการหมักแบบอาหารแข็งคือ วิธีการหมักง่ายไม่ซับซ้อน การลงทุนไม่มาก ให้ปริมาณผลผลิตความเข้มข้นสูง การแยกผลผลิตออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อทำได้ง่ายประหยัดพลังงาน และเนื่องจากสถานะความชื้นในการหมักต่ำ จึงสามารถลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียได้ วัตถุดิบที่ใช้สามารถใช้วัสดุทางการเกษตร ซึ่งทำให้ลดต้นทุนการผลิตและเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ในปัจจุบันการหมักแบบนี้ได้มีการประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักต่างๆ ได้แก่ การผลิตเนยแข็ง เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ปุ๋ยหมักชีวภาพ รวมถึงการผลิตเอนไซม์ (Mitchell *et al.*, 1992; Pandey *et al.*, 2000)

วิธีการหมักแบบอาหารแข็ง หมายถึง วิธีการหมักเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของแข็งที่ปราศจากน้ำอิสระ (Mitchell *et al.*, 1992) แต่น้ำจะอยู่ในรูปของความชื้นที่ถูกดูดซับไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ กระบวนการหมักชนิดนี้ได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นอย่างกว้างขวางเพราะมีศักยภาพสำหรับการผลิตเชิงการค้าสูง เช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร ยา และอุตสาหกรรมเกษตร กระบวนการหมักนี้ได้มีการคิดค้นมีมานานกว่า 1000 ปีก่อนคริสต์ศักราช (Ooijkaas *et al.*, 2000) ตัวอย่างเช่น การหมักโคจิ (koji) ซึ่งเป็นการนำข้าวเจ้าสุกหรือเมล็ดธัญพืชมาหมักด้วยเชื้อรา โดยเฉพาะเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus oryzae* การหมักโคจินี้จะใช้สำหรับทำหัวเชื้อเริ่มต้นในอุตสาหกรรมการผลิตซอสถั่วเหลืองและซีอิ๊วขาวในญี่ปุ่น ถั่วหมักเทมเป้ (temphe) ของอินโดนีเซีย และการหมักข้าวเป็นหัวเชื้อสำหรับทำสาเก (rice wine) หรือการหมักลูกแป้งที่ใช้ทำสุราแซใน ประเทศไทย (Soccol *et al.*, 1994) ต่างใช้เทคนิคของ SSF ทั้งสิ้นและนอกจากนั้น SSF ยังสามารถประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ ได้อีก เช่น การหมักเพื่อเพิ่มโปรตีนให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (Pandey *et al.*, 2000) เป็นต้น

3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในการหมักแบบอาหารแข็ง

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์โดยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง สามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ ได้แก่ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิตเอนไซม์ Hockenhull (1967) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการหมักที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์จะมีผลต่อทั้งปริมาณและชนิดของเอนไซม์ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ดีที่สุด ไม่จำเป็นต้องผลิตเอนไซม์ชนิดที่ต้องการสูงสุด ดังนั้นควรทำความเข้าใจถึงชนิดส่วนประกอบและสมบัติในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด

(1) อาหารเลี้ยงเชื้อในการหมัก

อาหารที่ใช้ในการหมักแบบอาหารแข็งจะเป็นวัสดุทางการเกษตรและวัสดุที่เป็นผลพลอยได้ทางการเกษตร ซึ่งมีราคาถูกและเป็นการนำของเสียมาใช้ให้เป็นประโยชน์ เช่น รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า เมล็ดข้าวเจ้า เมล็ดข้าวสาลี (Ikasari and Mitchell, 1994; Padmanabhan *et al.*, 1993) ทำให้การหมักแบบอาหารแข็งคุ้มค่าทางเศรษฐกิจมากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว แต่อย่างไรก็ตาม อาหารที่ใช้ในการหมักจำเป็นต้องมีลักษณะและส่วนประกอบที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตเอนไซม์ ซึ่งได้แก่ ปริมาณและอัตราส่วนของสารอาหารและแร่ธาตุ รวมทั้งสมบัติทางกายภาพของอาหารที่ใช้ เช่น ขนาดของอนุภาค ความพรุน พื้นที่ผิว ความเหนียวและการยึดตัวกัน เป็นต้น

(2) แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการหมักประกอบด้วยอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นหลัก โดยแหล่งไนโตรเจนมีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตโดยมีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้คาร์บอนประมาณร้อยละ 50 ถึง 55 ในการสังเคราะห์เซลล์ กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน คาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาณมากและนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ แป้งจากธัญพืชต่างๆ โกลโคเจน แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่ง เดกซ์ทริน และมอลโตส เป็นต้น โดยแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่นำมาใช้อาจอยู่ในรูปของธัญพืช หรือเมล็ดธัญพืชก็ได้ เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง มันฝรั่ง ถั่วเหลือง หรือมันสำปะหลังที่บดเป็นชิ้นเล็กๆ ก็ได้ โดยหลักการเลือกใช้จะคำนึงถึงวัสดุที่มีในประเทศ ราคาถูก หาได้ง่ายและมีทุกฤดูกาลเป็นหลัก

สำหรับแหล่งอาหารประเภทไนโตรเจน จะทำหน้าที่เป็น precursor ของกรดอะมิโนที่เชื้อราจะนำไปใช้ในการสร้างเอนไซม์และโปรตีนภายในเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต โดยเป็นตัวแทนให้อาหารเสริมในการผลิตเอนไซม์ และ pH เกิดความสมดุล แหล่งไนโตรเจนที่สามารถใช้ได้อาจอยู่ในรูปของสารอินทรีย์ เช่น น้ำแช่ข้าวโพด เมล็ดฝ้าย เมล็ดถั่วต่างๆ ส่วนสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท และยูเรีย เป็นต้น (สมใจ, 2537) แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้คือเกลือแอมโมเนีย เปปโตน สารสกัดยีสต์ แต่แหล่งไนโตรเจนที่สามารถนำมาทดแทนได้และมีราคาถูกคือ น้ำแช่ข้าวโพด การเติมเกลือหรือสารประกอบของเกลือลงไปในการเพาะเลี้ยงจะทำให้เอนไซม์มีสภาพคงตัวอยู่ในอาหารได้ โดยไม่มีการสูญเสียสภาพและช่วยทำให้การปลดปล่อยเอนไซม์สะดวกขึ้น (De Mot, 1990)

(3) แร่ธาตุและอาหารเสริม

อาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่มักมีแร่ธาตุต่างๆ เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย ได้แก่ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ซัลเฟอร์ และคลอรีน ถ้าในสารอาหารที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีแร่ธาตุต่างๆ เหล่านี้ไม่เพียงพอ จึงจำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในรูปแบบของสารประกอบที่เหมาะสม ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปของเกลือ ส่วนแร่ธาตุอื่นๆ เช่น โคบอลต์ คอปเปอร์ เหล็ก แมงกานีส โมลิบดีนัม และสังกะสี แร่ธาตุเหล่านี้เป็นส่วนประกอบที่จำเป็นของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ต้องการในปริมาณน้อย ซึ่งปกติแร่ธาตุต่างๆ เหล่านี้จะปะปนอยู่ในสารประกอบอื่นๆ เพียงพอแล้วจึงไม่จำเป็นต้องเติมอีก เช่น อาหารที่ได้จากพืชหรือสัตว์จะมีเกลือฟอสเฟตปริมาณมากอยู่แล้ว หรือน้ำแช่ข้าวโพด จะประกอบด้วยโพแทสเซียมถึงร้อยละ 20

(4) สารชักนำ (inducer)

เอนไซม์ส่วนใหญ่ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมัก มักเป็นชนิดที่สร้างขึ้นได้ต่อเมื่อมีสารที่เป็นตัวชักนำ (inducer) อยู่ด้วย สารชักนำส่วนใหญ่ คือ สับสเตรทของเอนไซม์หรือเป็นสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสับสเตรท ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์จะต้องมีสารชักนำเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย (สมใจ, 2537)

Soccol *et al.* (1994) ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากรา *Rhizopus* จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่ได้ทดลองถึงผลของการใช้น้ำมันสำปะหลังเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการหมักด้วยน้ำมันสำปะหลัง โดยใช้เทคนิค SSF สามารถให้ปริมาณเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส เอนไซม์กลูโคอะไมเลส และปริมาณโปรตีนได้สูงกว่าการหมักแบบ SMF 6-15 เท่า โดยมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 12.3-14.1 ไปเป็นร้อยละ 11.82-31.43 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการนำมันสำปะหลังมาหมักด้วยเทคนิค SSF มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส อีกทั้งมันสำปะหลังยังเป็นวัสดุที่เป็นแหล่งอาหารประเภทแป้งที่มีราคาถูก ซึ่งเหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้ทางการค้าเพื่อเพิ่มมูลค่าของระบบการหมักด้วยจุลินทรีย์ต่อไปได้อีกด้วย

Ramachandran *et al.* (2004) ทำการศึกษาการผลิตแอลฟาอะไมเลสจากตะกอนของน้ำมันมะพร้าวด้วยรา *Aspergillus oryzae* โดยการหมักแบบแห้ง พบว่าเมื่อใช้ตะกอนของน้ำมันมะพร้าวอย่างเดียวสามารถผลิตแอลฟาอะไมเลสได้ 1,372 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ในช่วงเวลาการผลิตที่ 24 และเมื่อมีการเติมอาหารเสริม โดยเติมแป้งเข้มข้นร้อยละ 0.5 และเปปโตเนอเข้มข้นร้อยละ 1 ทำให้เพิ่มปริมาณแอลฟาอะไมเลสเป็น 3,388 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง

3.3 การผลิตน้ำตาลจากแป้งโดยใช้เอนไซม์

การย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลในสมัยแรกใช้วิธีทางเคมีโดยการย่อยด้วยกรด เช่น HCl หรือ H_2SO_4 จะได้น้ำตาลที่มีค่าสมมูลเดกซ์โตรเป็น 42 และเกิดผลข้างเคียง คือ จะเกิด hydroxyl methyl furfural ซึ่งมีรสขม ต่อมาจึงมีการพัฒนาการย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูงต่อสารตั้งต้น เกิดปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรงโดยไม่มีผลข้างเคียง ทั้งนี้ อาศัย 2 กระบวนการดังต่อไปนี้

(1) กระบวนการ liquefaction เป็นการย่อยสลายแป้งโดยอาศัยเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียในการเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์โมเลกุลแป้งที่ผ่านการทำให้สุกแล้ว (gelatinized starch) แบบสุ่มให้เกิดเดกซ์ทรินและโอลิโกแซคาไรด์ โมเลกุลของอะไมเลสและอะไมโลเพคตินถูกย่อยสลายมีผลทำให้แป้งลดความหนืดได้อย่างรวดเร็ว

(2) กระบวนการ saccharification เป็นการย่อยเดกซ์ทรินที่ได้ให้เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ตามชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ เช่น เอนไซม์กลูโคอะไมเลส หรือเอนไซม์พุลูลานเนส

Sriroth *et al.* (2000) ได้ศึกษาการย่อยมันสำปะหลังร้อยละ 4 น้ำหนักแห้งด้วย เอนไซม์ผสมระหว่างเซลลูเลสเชิงการค้า Novo callulase 15 หน่วย (NCU) และเพคตินเอส polygalacturonase (PG) 122.5 หน่วยต่อกรัมกากมันสำปะหลังแห้ง สภาวะความเป็นกรด ค่า 4.5 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ผลการศึกษาได้ปริมาณแป้งร้อยละ 40 แต่การย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสหรือเพคตินเอสเพียงอย่างเดียวหนึ่งทีสภาวะการย่อยเดียวกันไม่สามารถสกัดแป้งจากกากมันสำปะหลังได้ นอกจากนี้พบว่าประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสจะมีผลต่อการสกัดแป้งมากกว่าเอนไซม์เพคตินเอส

3.4 การนำเอนไซม์อะไมเลสไปใช้ประโยชน์

อุตสาหกรรมที่ใช้เอนไซม์อะไมเลส (ดวงพร, 2530) ได้แก่

(1) อุตสาหกรรมทอผ้า โดยในการทอผ้าจะต้องนำด้ายดิบมาจึงให้ตั้งบนเครื่องทอผ้า ซึ่งจะทำให้ด้ายดิบขาดได้ง่าย ดังนั้นก่อนที่จะทำการทอต้องนำเส้นด้ายไปชุบน้ำแป้ง เพื่อให้เส้นด้ายมีความทนทานต่อแรงดึง หลังจากทอผ้าเป็นผืนจึงต้องเอาแป้งที่ตกค้างออกโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสย่อย จากนั้นนำไปซักด้วยน้ำร้อนเพื่อทำลายเอนไซม์ วิธีนี้ใช้กับการทอผ้าจากฝ้าย ขนแกะ และแพรเทียม

(2) อุตสาหกรรมทำขนมปัง โดยแป้งที่ใช้ในการผลิตขนมปังจะมีการเติมเอนไซม์อะไมเลสชนิด dextrinogenic enzyme ลงไป เพื่อย่อยโมเลกุลให้เล็กลง จากนั้นจะมีการเติมอะไมเลสชนิด saccharogenic enzyme ลงไป เพื่อเปลี่ยนแป้งบางส่วนให้เป็นน้ำตาล

(3) การทำน้ำผลไม้ให้ใส โดยบางครั้งน้ำผลไม้คั้นอาจมีความขุ่นเพราะมีปริมาณแป้งสูง จึงต้องใส่อะไมเลสลงไป บ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาฟาเรนไฮต์

(4) การผลิตแอลกอฮอล์และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ โดยใช้เป็นครั้งแรกในประเทศจีน โดยทำการผลิตแอลกอฮอล์จากรา หลังจากนั้นประเทศญี่ปุ่นได้นำหลักการนี้มาผลิตแอลกอฮอล์เมื่อประมาณ 1,700 ปีมาแล้ว ซึ่งจะแตกต่างจากประเทศทางยุโรปและอเมริกาที่จะใช้ข้าวมอลต์ แต่ปัจจุบันหันมาใช้เอนไซม์จากราแทนเอนไซม์จากมอลต์

(5) การผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมจากแป้ง โดยในระยะแรกของการผลิตกลูโคสและน้ำตาลอื่น ๆ จะใช้วิธีการย่อยแป้งด้วยกรด เกิดการย่อยแบบสุ่มจึงได้สารหลายชนิด เช่น กลูโคส มอลโทส ทำให้เกิดสารเจนิโอไบโอส ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสไม่ดีเกิดขึ้น ดังนั้นปัจจุบันการผลิตน้ำเชื่อมจากแป้งโดยการใช้เอนไซม์เป็นที่นิยมกันมาก โดยเฉพาะการผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมที่มีกลูโคส

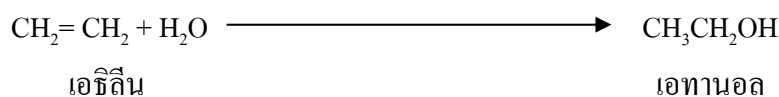
4. เอทานอล

เอทานอลเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟได้ ระเหยง่าย ละลายในน้ำและสารอินทรีย์อื่นได้ดี ให้ค่าพลังงานความร้อน (calorific value) โดยการเผาไหม้ประมาณ 64,000 บีทียูต่อกิโลกรัม มีจุดเดือด 78 องศาเซลเซียส จุดเยือกแข็ง -117.3 องศาเซลเซียส และมีความถ่วงจำเพาะ 0.794 ที่ 15.6 องศาเซลเซียส เอทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิง โดยมีข้อดีดังนี้ คือ เอทานอลเป็นของเหลวใช้ได้ทันที ต่างกับปิโตรเลียมที่ต้องการกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ที่ซับซ้อน สามารถผลิตจากทรัพยากรธรรมชาติที่สร้างขึ้นทดแทนได้หลายชนิด ช่วยแก้ปัญหาเกี่ยวกับราคาผลผลิตทางการเกษตรบางชนิด และการเผาไหม้ของเอทานอลนั้นสะอาดกว่าการเผาไหม้ของน้ำมันเบนซิน (สาวิตรี, 2540) โดยช่วยลดปริมาณก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และสารไฮโดรคาร์บอนที่เกิดจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ ซึ่งเป็นการช่วยลดมลพิษในอากาศ (Wyman, 1996)

4.1 กระบวนการผลิตเอทานอล

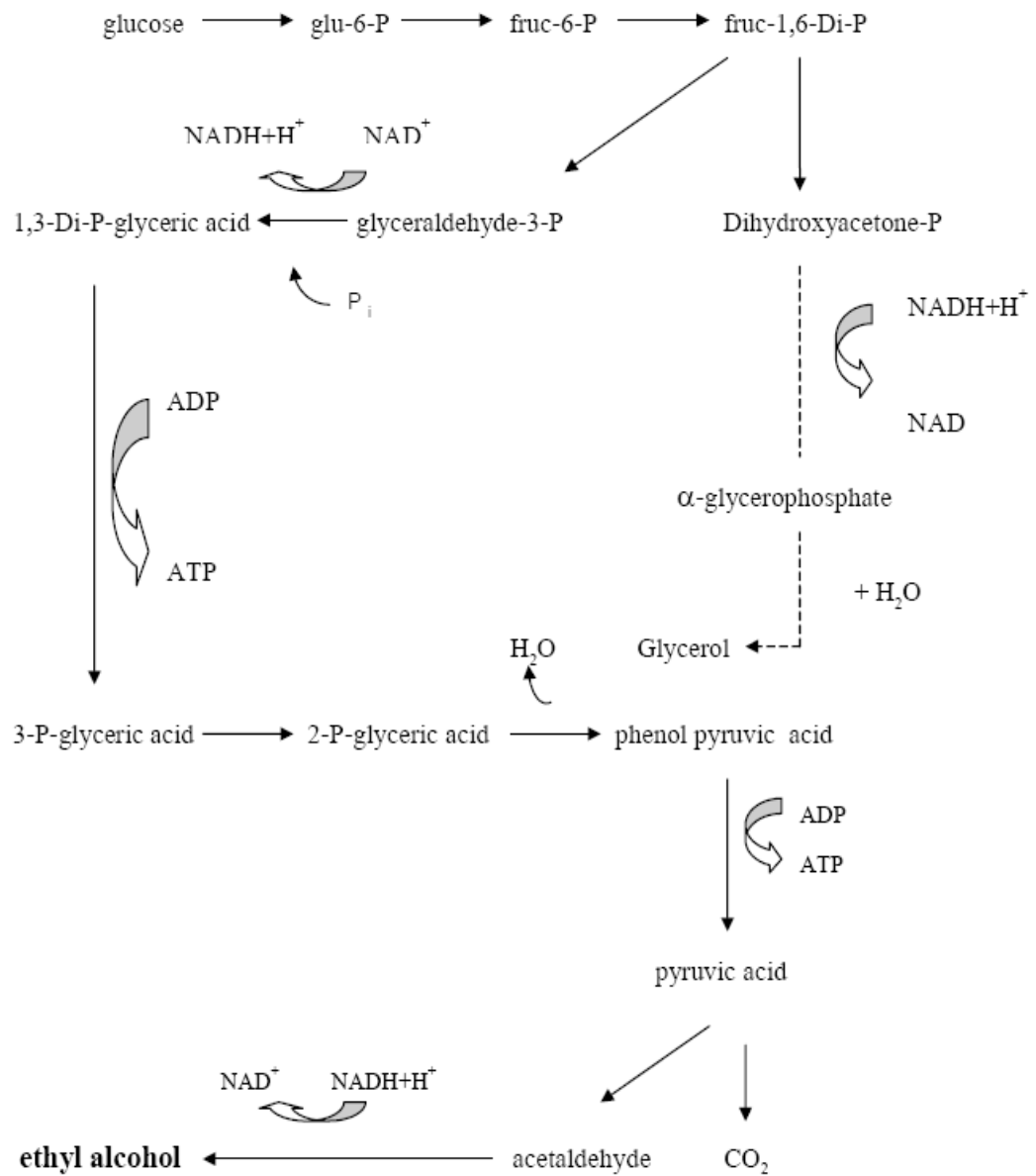
กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถกระทำ ได้ 2 วิธี คือวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีและวิธีการหมัก (fermentation) วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีทำได้โดยการนำเอเอธิลีนซึ่งเป็นก๊าซที่เป็นผลพลอยได้จากการกลั่นน้ำมันดิบมาทำปฏิกิริยากับกรดกำมะถันจะได้สารผสมของเอธิลซัลเฟต (ethylsulphate) จากนั้นนำไปไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) จนได้เอทานอลกับกรดกำมะถันเจือจางแล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นอีกครั้งหนึ่ง นอกจากนี้ยังอาจสังเคราะห์ได้โดยการนำเอเอธิลีนมา

ทำปฏิกิริยาไฮเดรชัน (hydration) โดยมีกรดฟอสฟอริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) (วิมล, 2526)
แสดงดังสมการ



การผลิตเอทานอลโดยวิธีการหมักนั้นจะอาศัยเอนไซม์ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ช่วยให้เกิดปฏิกิริยาโดยเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบให้ได้เป็นเอทานอล ซึ่งมีข้อดีกว่าการผลิตโดยวิธีทางเคมีหลายอย่าง รวมทั้งสามารถใช้ทรัพยากรธรรมชาติที่สร้างขึ้นมาทดแทนได้ (renewable resource) และวัสดุเหลือทิ้งเป็นวัตถุดิบได้ด้วย ช่วยลดปัญหาขยะที่เกิดจากวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ให้มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง (สาวิตรี, 2540)

กระบวนการหมักเอทานอลเป็นกระบวนการทางชีวเคมี อาศัยเอนไซม์ช่วยให้เกิดปฏิกิริยาโดยเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบพวกน้ำตาลกลูโคสให้เกิดเอทานอล ปฏิกิริยานี้เกิดในสภาพที่ปราศจากออกซิเจนซึ่งได้พลังงานออกมาด้วยพลังงานที่ออกมาจุลินทรีย์จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและบางส่วนปลดปล่อยออกมาในรูปพลังงานความร้อน อย่างไรก็ตามพลังงานที่ได้จากกระบวนการหมักจะน้อยกว่าพลังงานที่ได้จากกระบวนการหายใจแบบใช้ออกาศประมาณ 25 เท่า (Prescott and Dunn, 1959; Paturau, 1969; Conn and Stumpf, 1976) การหมักเอทานอลโดยยีสต์จากกลูโคสเป็นเอทานอลจะใช้วิถีทางไกลโคไลติก (glycolytic) หรือ กระบวนการเอนม์เพน เมเยอร์ฮอฟ พาร์นาส (Embden-Meyerhof-Parnas Pathway) จนได้ไพรูเวท (pyruvate) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นเอทานอลต่อไป (Paturau, 1969; Conn and Stumpf, 1976) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กระบวนการเอมบีเทน เมเยอร์ฮอฟ พาร์นาส (Embden-Meyerhof-Parnas Pathway)

ที่มา: Paturau (1969)

4.2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอทานอล ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์และรา ดังตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่น่าสนใจสำหรับการผลิตเอทานอลระดับอุตสาหกรรม คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* (carlsbergensis), *Schizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces fragilis* ยีสต์เหล่านี้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่เหมือนกัน แต่เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น ดังนั้นในปัจจุบันการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จึงใช้เชื้อ *S. cerevisiae* นอกจากนั้นปัจจุบันได้มีการพัฒนาการผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรียจีโนม *Zymomonas* คือ *Z. mobilis* และจีโนม *Clostridium* คือ *Clostridium thermocellum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนสามารถหมักเซลลูโลสและเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียทั้งสองจีโนมดังกล่าวมีความทนต่อเอทานอลได้ต่ำกว่ายีสต์ดังนั้นจึงไม่นิยมนำแบคทีเรียมาผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม (Waites and Michael, 2001)

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์	
แบคทีเรีย	
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	Extreme thermophile
<i>Clostridium thermocellum</i>	Thermophilic, hydrolyses cellulose
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	Ferments xylose and starch*
<i>Zymomonas mobilis</i>	The wild-type ferments only glucose, fructose and sucrose, but with high productivity
ยีสต์	
<i>Candida pseudotropicalis</i> , <i>C. tropicalis</i>	Ferments xylose*
<i>Candida</i> species	Ferments xylose and cellobiose*
<i>Kluyveromyces lactis</i> **	Ferments lactose in dairy wastes*
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Hydrolyses inulin (polyfructosan)
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Ferments xylose*

ตารางที่ 2 (ต่อ)

จุลินทรีย์	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Most strains ferment only glucose, sucrose, fructose, maltose and maltotriose
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>distaticus</i>	Hydrolyses starch
<i>Schwanniomyces alluvius</i>	Hydrolyses starch
ราเส้นใย	
<i>Fusarium</i> species	Ferments xylose*
<i>Monilia</i> species	Hydrolyses cellulose and xylan
<i>Mucor</i> species	Ferment xylose and arabinose*

หมายเหตุ * น้ำตาลซึ่งมีคาร์บอนจำนวนหกอะตอมที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่

** ไม่มีผลของ Crabtree effect

ที่มา: Waites and Michael (2001)

ลักษณะของจุลินทรีย์ที่ดีสำหรับการผลิตเอทานอลมีดังนี้ (สาวิตรี, 2540)

1. ให้ผลผลิตสูง
2. มีอัตราการหมักเอทานอล (rate of ethanol fermentation) สูง
3. มีความทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance)
4. ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)
5. ทน pH ต่ำ หรือทนกรด (acid tolerance)
6. มีความสามารถในการจับตัวเป็นก้อนตกลงก้นภาชนะ (flocculation)
7. มีลักษณะพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย
8. ทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerance)

4.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรหลายชนิดแบ่งออกเป็น 3 ประเภท

(1) วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาเลย์ มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น วัตถุดิบพวกนี้สามารถย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลได้ โดยการใช้เอนไซม์หรือกรด แป้งที่สามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ต้องเป็นแป้งที่สามารถละลายน้ำได้ในน้ำร้อน ซึ่งจะถูกเอนไซม์ย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลที่สามารถหมักได้ (ธีรภัทร และคณะ, 2549)

(2) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย กากน้ำตาล ข้าวฟ่างหวาน หัวผักกาดหวาน เป็นต้น (ธีรภัทร และคณะ, 2549)

(3) เศษวัสดุที่เป็นเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว ผักตบชวา หญ้าแฝก หรือเยื่อใยจากพืชชนิดต่างๆ (ธีรภัทร และคณะ, 2549) วัสดุเหลือทิ้งจากโรงเลื่อย โรงงานทำกระดาษ กระดาษหนังสือพิมพ์ และอื่นๆ ซึ่งของเสียจากโรงงานทำกระดาษเหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากมีการแยกกากกากหมดแล้ว การใช้เซลลูโลสเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลส่วนมากเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานหรือทางการเกษตร (เทพปัญญา, 2544)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 500 บริษัท EUTECH

INSTRUMENTS

1.2 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CX40RF200 บริษัท Olympus

1.3 Haemocytometer รุ่น Neubauer bright บริษัท Boeco

1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมความเย็น (refrigerate centrifuge) รุ่น Universal 16R
บริษัท Hettich

1.5 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น HVE-50 บริษัท Hirayama

1.6 อ่างน้ำร้อนชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (water bath)

1.7 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow biohazard carbinet)

1.8 ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker) รุ่น SBD-50 BIO บริษัท Scientific
Promotion Co., LTD

1.9 เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น HS 250 basic บริษัท IKA LABORTECHNIK

1.10 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) รุ่น GBC UV/VIS 918
บริษัท GBC Scientific Equipment Pty Ltd.

1.11 เครื่องชั่งแบบละเอียด (electronic balance) รุ่น HR-200 บริษัท A&D

1.12 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) รุ่น 232 บริษัท Fisherscientific

1.13 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography) รุ่น HP 6890 บริษัท Hewlett
Packard

1.14 ตู้อบ (oven) รุ่น BINDER บริษัท Scientific Promotion Co., LTD

1.15 อุปกรณ์เครื่องแก้วชนิดต่างๆ

2. สารเคมี

- 2.1 แอมโมเนียมซัลเฟต
- 2.2 กลูโคส (D-glucose)
- 2.3 กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid)
- 2.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์
- 2.5 โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต
- 2.6 โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต
- 2.7 โซเดียมคลอไรด์
- 2.8 สารละลายแป้ง (soluble starch)
- 2.9 โซเดียมไนเตรต
- 2.10 แอลกอฮอล์ 99.8%
- 2.11 ซีเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์
- 2.12 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์
- 2.13 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต
- 2.14 เปปโตน
- 2.15 ยีสต์สกัด
- 2.16 วุ้น (agar)
- 2.17 น้ำกลั่น

3. จุลินทรีย์

- 3.1 *Aspergillus oryzae* TISTR 3014
- 3.2 *Aspergillus oryzae* TISTR 3250
- 3.3 *Aspergillus oryzae* TISTR 3605
- 3.4 *Aspergillus niger* TISTR 3583
- 3.5 *Aspergillus niger* TISTR 3586
- 3.6 *Aspergillus niger* TISTR 3604
- 3.7 *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5616
- 3.8 *Zymomonas mobilis* TISTR 550

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาบางส่วนได้รับความอนุเคราะห์จากจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

4. วัตถุดิบ

- 4.1 กากตะกอนน้ำเสียในระบบตะกอนเร่งจากบริษัทยูนิลีเวอร์ไทยโฮลดิ้งส์ จำกัด
- 4.2 กากมันสำปะหลังจากโรงงานโซนิส สตาร์ท เทคโนโลยี จำกัด

วิธีการ

1. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โดยถ่ายเชื้อจากเชื้อบริสุทธิ์ลงในจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร PDA (ภาคผนวก ก) จำนวน 3-4 ครั้ง เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์แข็งแรงพร้อมที่จะเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเชื้อที่เจริญเต็มที่มาทำซัสเพนชันของสารละลายสปอร์โดยใส่น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อที่มี tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 10 มิลลิลิตร แล้วใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมเขี่ยให้สปอร์กระจายในน้ำกลั่น

2. ศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของกากตะกอนและกากวัสดุเหลือทิ้ง

วิเคราะห์องค์ประกอบพื้นฐานของกากตะกอนน้ำเสียและกากวัสดุเหลือทิ้ง เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน และวิเคราะห์ปริมาณแป้งตามวิธีของสำนักมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2521)

3. คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

นำเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด มาศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักระหว่างกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสีย เท่ากับ 4:1 น้ำหนักรวม 5 กรัมต่อฟลasks ปรับความชื้นอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ร้อยละ 70 โดยใช้น้ำกลั่น จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น เติมหาล้าเชื้อของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่เตรียมตามข้อ 1 ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24, 48, 72 และ 96 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ข1) เชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ตรวจนับจำนวนเชื้อ โดยใช้ haemocytometer (ภาคผนวก ข4) ให้ได้จำนวนสปอร์ ประมาณ 3×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

4.1 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักระหว่างกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสีย เท่ากับ 4:1 น้ำหนักรวม 5 กรัมต่อฟลasks ปรับความชื้นอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ร้อยละ 70 โดยใช้น้ำกลั่น จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น เติมหาล้าเชื้อของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองข้อ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24, 48, 72 และ 96 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ข1)

4.2 ศึกษาอัตราส่วนระหว่างกากตะกอนน้ำเสียและกากมันสำปะหลังต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักระหว่างกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสีย เท่ากับ 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 และ 0:5 น้ำหนักรวม 5 กรัมต่อฟลasks ปรับความชื้นอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ร้อยละ 70 โดยใช้น้ำกลั่น จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น เติมหาล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากการทดลอง

ข้อ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 4.1 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ข1)

4.3 ศึกษาความขึ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักระหว่างกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสียตามผลที่คัดเลือกจากการทดลองข้อ 4.2 โดยมีน้ำหนักรวม 5 กรัม ต่อ 1 ฟลasks มาปรับความขึ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ร้อยละ 50, 60, 65, 70, 75, 80 และ 90 โดยใช้น้ำกลั่น แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น เติมหงาเชื้อของจุลินทรีย์ที่ได้จากการทดลองข้อ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 4.1 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ข1)

4.4 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสีย ตามผลการทดลองข้อ 4.2 ปรับความขึ้นอาหารตามผลที่ได้จากข้อ 4.3 โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวแทน เปรียบเทียบ จากนั้นทำการปรับความขึ้นด้วยซีเทรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ 6 ค่า คือ พีเอช 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 นำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น เติมหงาเชื้อของจุลินทรีย์ที่ได้จากการทดลองข้อ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 4.1 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ข1)

4.5 ศึกษาปริมาณของกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสีย ตามผลการทดลองข้อ 4.2 ปรับความขึ้นอาหารเลี้ยงเชื้อตามผลการทดลองข้อ 4.3 โดยใช้น้ำกลั่น จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น เติมหงาเชื้อของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 โดยปรับปริมาตรของเชื้อให้ได้ปริมาตร 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 4.1 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ข1)

4.6 ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสีย ตามผลการทดลองข้อ 4.2 ปรับความเข้มข้นอาหารเลี้ยงเชื้อตามผลการทดลองข้อ 4.3 โดยใช้ น้ำกลั่น เติมกลูโคส แป้ง เปปโตนและแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 1 (กรัมต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนลงไป ส่วนตัวเปรียบเทียบกับใช้น้ำกลั่น จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น เติมกล้ำเชื้อของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 โดยปรับปริมาตรของกล้ำเชื้อตามผลการทดลองข้อ 4.5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 4.1 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ข1)

5. การสกัดเอนไซม์

ทำโดยเติมน้ำกลั่นผสม tween 80 เข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร ลงไปในพลาสติกที่เลี้ยงเชื้อไว้ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 240 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำของเหลวส่วนใสซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ที่แยกได้ไปเก็บในตู้เย็นเพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

6. ศึกษาการผลิตน้ำตาลจากกากมันสำปะหลัง

6.1 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด โดยทำการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ในตู้บ่มที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 3, 6, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง โดยแยกกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำน้ำตาลที่ได้ไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำของเหลวส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข2)

6.2 ศึกษาอัตราส่วนระหว่างกากมันสำปะหลังต่อเอนไซม์ที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

เมื่อทราบระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดแล้ว จากนั้นทำการศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างกากมันสำปะหลังต่อปริมาณของเอนไซม์ซึ่งสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีความเข้มข้นสูงที่สุด โดยการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังซึ่งใช้เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อที่คัดเลือกได้จากการทดลองข้อ 3 และสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมตามผลที่ได้จากการทดลองข้อ 4 แล้วทำการแปรค่าอัตราส่วนระหว่างกากมันสำปะหลังต่อเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 5:133, 5:200 และ 5:266 กรัมต่อหน่วยของเอนไซม์อะไมเลส เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยแยกกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำตาลที่ได้ไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข2)

7. ศึกษาการหมักเอทานอลจากน้ำตาลที่ย่อยได้จากกากมันสำปะหลัง

7.1 การเตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอล

จากผลการทดลองข้อ 6 เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์แล้ว ทำการผลิตน้ำตาลโดยใช้อัตราส่วนระหว่างกากมันสำปะหลังต่อเอนไซม์อะไมเลส จากผลการทดลองข้อ 6.2 และใช้เวลาในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ตามผลที่ได้จากการทดลองข้อ 6.1 จากนั้นนำกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วไปแยกออกด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำตาลที่ได้ไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำของเหลวส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข2) เก็บของเหลวส่วนใสในตู้เย็นเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอลต่อไป

7.2 ศึกษาการหมักเอทานอลระดับฟลาस्क

7.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอทานอลทำโดยถ่าย *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5616 หรือ *Zymomonas mobilis* TISTR 550 ลงใน YPGA (ภาคผนวก ก) 3-4 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* และ *Zymomonas mobilis* ที่เจริญเต็มที่ลงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสำหรับเตรียมกล้า (ภาคผนวก ก) บรรจุอยู่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการรวมกล้าเชื้อทั้งหมดในฟลาस्कมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ควบคุมค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

7.2.2 การคัดเลือกเชื้อเพื่อใช้หมักเอทานอล

นำกล้าเชื้อยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* และเชื้อแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ที่เตรียมตามข้อ 7.2.1 มาศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล เติมห้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรของน้ำตาลรีดิวซ์ ลงในฟลาस्कที่บรรจุน้ำตาลรีดิวซ์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังในข้อ 7.1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข2) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงในเวลาอันรวดเร็วที่สุดเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

7.2.3 ขั้นตอนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล

นำสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลส ถ่ายลงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 0.03 โดยปริมาตร ลงในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ นำไปมาเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นนำกล้าเชื้อที่คัดเลือกได้จากผลการศึกษาข้อ 7.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ถ่ายลงในน้ำตาลรีดิวซ์ โดยไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบ ที่อุณหภูมิ

4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข2) และ ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (ภาคผนวก ข3)

8. วิเคราะห์และสรุปผลการศึกษา

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของกากตะกอนน้ำเสียและกากมันสำปะหลัง

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของกากตะกอนน้ำเสียและกากมันสำปะหลัง พบว่า กากตะกอนน้ำเสียและกากมันสำปะหลัง มีองค์ประกอบของธาตุและคุณลักษณะอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 3 โดยประกอบด้วยปริมาณคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ร้อยละ 34.54 และ 42.80 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และมีปริมาณไนโตรเจน ร้อยละ 4.27 และ 0.63 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 8.1 และ 67.9 ตามลำดับ ด้วยค่าอัตราส่วนของคาร์บอน ต่อไนโตรเจนที่ต่ำของกากตะกอนน้ำเสียแสดงว่ากากตะกอนน้ำเสียมีความเป็นไปได้ในการเป็นวัสดุที่ให้ธาตุอาหารในการหมัก

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของกากตะกอนน้ำเสียและกากมันสำปะหลังที่ใช้ในงานศึกษา

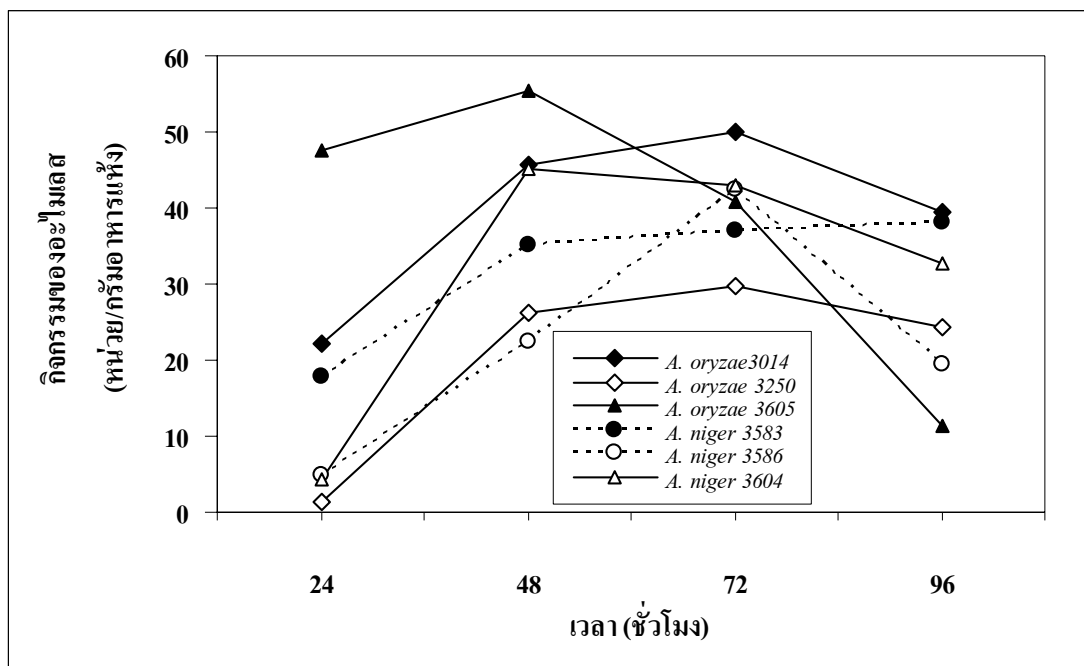
องค์ประกอบ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	กากตะกอนน้ำเสีย	กากมันสำปะหลัง
คาร์บอนทั้งหมด	34.54	42.80
ไนโตรเจนทั้งหมด	4.27	0.63
ฟอสฟอรัส	0.78	0.03
โพแทสเซียม	0.11	0.13
แคลเซียม	4.04	0.24
แป้ง	-	59.97
ค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน	8.1	67.9

ผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้งในกากมันสำปะหลัง พบว่า กากมันสำปะหลังมีแป้งเป็นส่วนประกอบปริมาณร้อยละ 59.97 ของน้ำหนักแห้ง ด้วยวิธี มอก. 274-2521 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับรายงานการศึกษาอื่นที่พบว่ามีปริมาณแป้งอยู่ในช่วงร้อยละ 56-69.9 (ชลดา, 2546; มาโนช, 2546; ชีรภัทร และคณะ, 2549) โดยปริมาณแป้งที่พบ ทำให้ทราบว่ามีความเป็นไปได้ในการนำกากมันสำปะหลังดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในการเป็นแหล่งคาร์บอน โดยจะทำการย่อยแป้งที่เหลืออยู่ใน

กากมันสำปะหลังให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์และนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตเอทานอลในการศึกษาขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* TISTR 3014, 3250 และ 3605 และสายพันธุ์ *Aspergillus niger* TISTR 3604, 3583 และ 3586 แสดงดังภาพที่ 2 ผลการศึกษาที่ได้พบว่า เชื้อราทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้แตกต่างกัน โดยเชื้อราที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงในช่วง 48-96 ชั่วโมง โดยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3014, 3250 และ 3605 และ *Aspergillus niger* TISTR 3583, 3586 และ 3604 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 72, 72, 48, 96, 72 และ 48 ตามลำดับ และสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด 45.62, 29.62, 55.3, 38.18, 42.44 และ 45.11 หน่วยต่อกรัมอาหารแห้ง ตามลำดับ จากผลการศึกษาพบว่า จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดีที่สุด คือ เชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3605 (ภาพที่ 3) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดในงานศึกษานี้และใช้เวลาในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดประมาณ 48 ชั่วโมง ซึ่งสั้นกว่าเชื้ออื่นๆ จึงคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3605 เพื่อนำไปศึกษาหาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ใช้ในการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่เกิดจากเชื้อรา ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

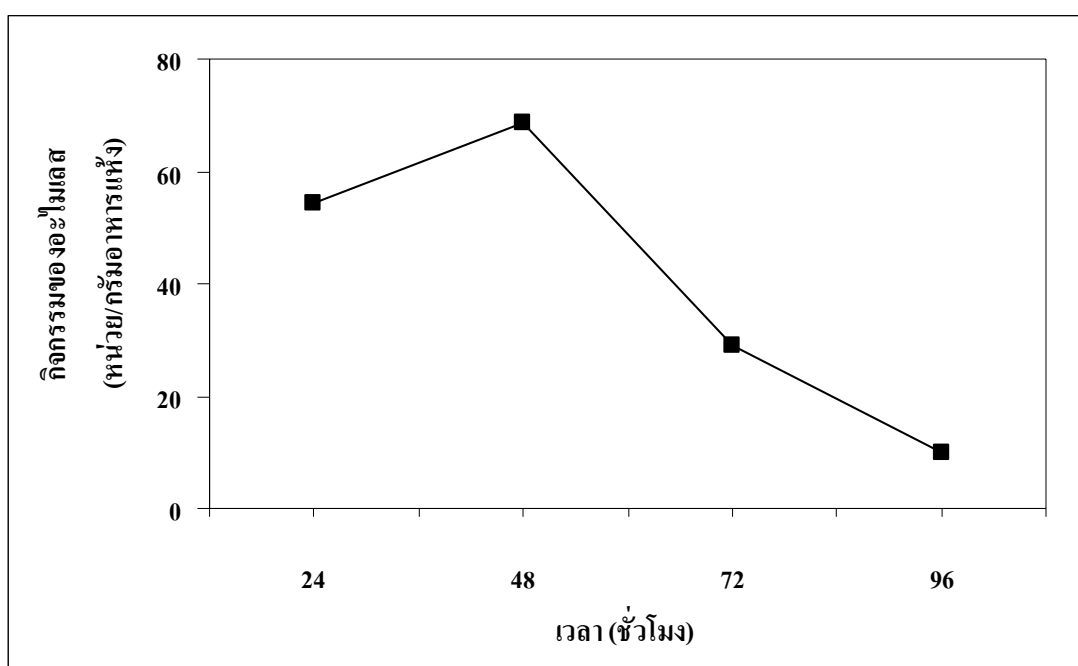


ภาพที่ 3 ลักษณะของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3605 ในอาหาร PDA ซึ่งเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

3.1 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนวัสดุหมักที่ประกอบด้วยกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสียในอัตราส่วน 4:1 ซึ่งมีน้ำหนักของวัสดุเริ่มต้นรวมเท่ากับ 5 กรัม ในสภาวะที่มีความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเท่ากับร้อยละ 70 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า *A. oryzae* TISTR 3605 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสอย่างรวดเร็วตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรก ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 54.41 หน่วยต่อกรัมอาหารแห้ง และในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก *A. oryzae* TISTR 3605 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 70.26 หน่วยต่อกรัมอาหารแห้ง แต่ในชั่วโมงที่ 72 และ 96 ของการหมัก พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสลดลงอย่างต่อเนื่อง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 28.91 และ 9.81 หน่วยต่อกรัมอาหารแห้ง ตามลำดับ โดยในช่วง 24 ชั่วโมงแรก เริ่มมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เนื่องจาก *A. oryzae* TISTR 3605 สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่ได้เร็ว จากนั้นปริมาณการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ถึง 48 ชั่วโมงของการหมัก เพราะเป็นระยะที่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อยู่ในสภาพสมดุล (balance growth) และสุดท้ายการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะลดลงอย่างรวดเร็ว การที่ปริมาณการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ *A. oryzae* TISTR 3605 ลดลงภายหลังจากการผลิตสูงสุดแล้ว อาจเกิดจากปริมาณสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงหรือความชื้นลดลง หรืออาจเกิดจากสภาพแออัดของจุลินทรีย์ทำให้เกิดการสลายตัวเอง (autolysis) ในระยะถดถอย (decline phase) โดยการลดลงของชีวมวลนี้อาจเริ่มขึ้นภายหลังจากการเจริญเข้าสู่สภาวะหยุดนิ่งหรืออาจเกิดขึ้นทันทีหลังการเจริญหยุดลง ซึ่งจะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ลดลงด้วย (วาทิต, 2545; Yang and Wang, 1999) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารอาหารเลี้ยงเชื้อค่อยๆ ลดลงหรือสภาวะแวดล้อมรอบจุลินทรีย์ไม่เหมาะสม มีการสะสมของสารพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึมมากขึ้น ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่ำลง (Ramachandran *et al.*, 2004) จึงทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลง ดังนั้นจึงคัดเลือกใช้เวลา 48 ชั่วโมงในการศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 4 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. oryzae* TISTR 3605 ในสถานะที่มี ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเท่ากับร้อยละ 70 เพาะเลี้ยงบนวัสดุหมักกากมันสำปะหลัง และกากตะกอนน้ำเสีย ในอัตราส่วน 4:1 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

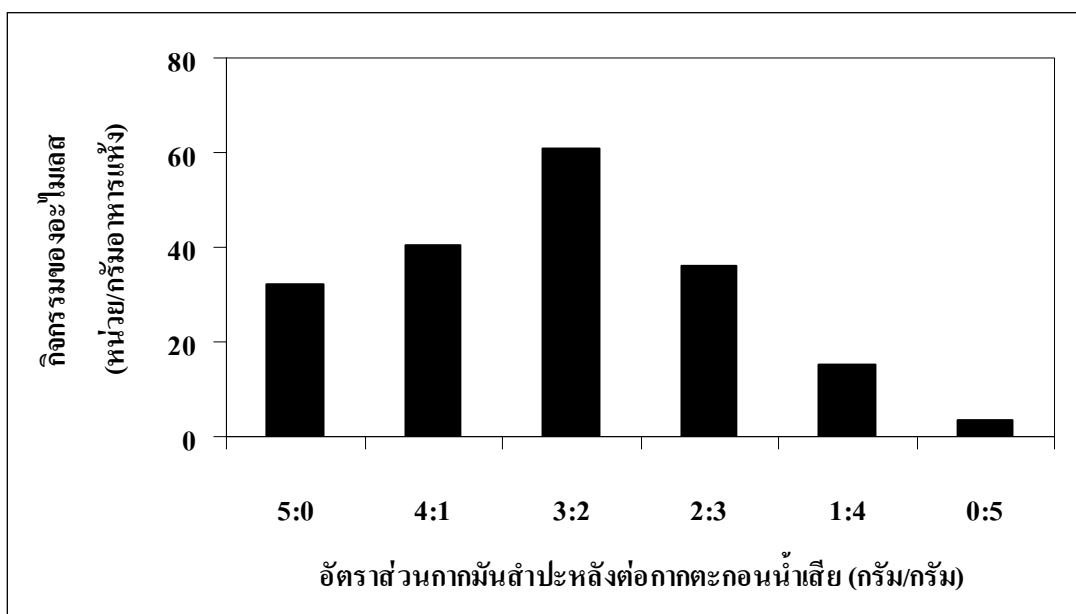
3.2 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสียต่อการผลิต เอนไซม์อะไมเลส

แหล่งของอาหารที่ใช้ในการหมักต้องมีสารอาหารที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิต เอนไซม์ของจุลินทรีย์ โดยในการศึกษานี้ได้เลือกใช้กากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสีย ซึ่งมี องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสียแสดงดังตารางที่ 4 โดยทดลอง เลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3605 ในอาหารที่มีอัตราส่วนของกากมันสำปะหลังต่อกากตะกอนน้ำเสีย ตั้งแต่ 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 และ 0:5 โดยน้ำหนัก ซึ่งค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ของอาหารแต่ละสูตร เท่ากับ 67.9, 30.3, 18.9, 13.4, 10.2 และ 8.1 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ทำ การปรับความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ที่ร้อยละ 70 และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 ค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนของสูตรอาหารที่ใช้ในการหมัก

สูตรอาหาร กากมันสำปะหลัง:กากตะกอนน้ำเสีย	ค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน
5:0	67.9
4:1	30.3
3:2	18.9
2:3	13.4
1:4	10.2
0:5	8.1

จากการทดลองพบว่า อัตราส่วนกากมันสำปะหลังต่อกากตะกอนน้ำเสียเท่ากับ 3:2 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 60.67 หน่วยต่อกรัมอาหารแห้ง แต่เมื่ออัตราส่วนของกากตะกอนน้ำเสียมากเกินไป จะส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีแนวโน้มลดลง โดยพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสต่ำสุดเท่ากับ 3.53 หน่วยต่อกรัมอาหารแห้ง ที่อัตราส่วน 0:5 แสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 อัตราส่วนของกากมันรำปะหลังต่อกากตะกอนน้ำเสีย ที่ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 70 เพาะเลี้ยงบนวัสดุหมักกากมันรำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสีย ในอัตราส่วนต่างๆ บ่มที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ในงานศึกษานี้ อัตราส่วนของกากมันรำปะหลังต่อกากตะกอนน้ำเสียที่ 3:2 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการส่งเสริมกิจกรรมของจุลินทรีย์ให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดีที่สุด จากนั้นหากมีการเพิ่มอัตราส่วนของกากมันรำปะหลังจะมีผลให้ค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ในทางกลับกันการเพิ่มอัตราส่วนของกากตะกอนน้ำเสียจะมีผลทำให้ค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนลดลง ซึ่งค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนจะมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสลดลงด้วย เนื่องจากการเพิ่มสัดส่วนของกากมันรำปะหลังเป็นการเพิ่มปริมาณแป้ง อาจทำให้ค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงเกินไปจนไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ในทางตรงกันข้ามการเพิ่มสัดส่วนของกากตะกอนน้ำเสียจะเป็นการเพิ่มธาตุอาหาร โดยเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัส แต่สัดส่วนกากตะกอนน้ำเสียที่มากเกินไปจะทำให้จุลินทรีย์มีอาหาร (แป้ง) ไม่เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตและเป็นปัจจัยจำกัดต่อการผลิตเอนไซม์ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Stentiford and Dodds (1992) ซึ่งพบว่าค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 15-30 นอกจากนี้ Aiyer (2004) ได้ทดลองแปรค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนโดยใช้แป้งมันฝรั่งเป็นแหล่งคาร์บอนและเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส พบว่า เมื่อมีการเติมแหล่งไนโตรเจนมากเกินไปจะส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ซึ่งสอดคล้อง

กับผลการศึกษานี้ที่พบว่า เมื่อเติมกากตะกอนน้ำเสีย (แหล่งธาตุอาหาร) ในปริมาณที่มากหรือน้อยเกินไปจะส่งผลให้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลดลง

นอกจากนี้การที่เชื้อรา *A. oryzae* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในแต่ละสูตรอาหารไม่เท่ากัน อาจเกิดจากปริมาณสารชักนำสำหรับผลิตเอนไซม์ไม่เท่ากันและมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในที่สุด ในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณโปรตีนมากเกินไป ภายหลังจากที่จุลินทรีย์สลายโปรตีนแล้ว จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ กรดอะมิโน และมีกรดอะมิโนถูกใช้ไปจะได้สารประกอบประเภทแอมโมเนีย ซึ่งถ้ามีปริมาณสารเหล่านี้มากเกินไป อาจเกิดการกดดันการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ (Kole *et al.*, 1988; Jarsilav *et al.*, 1991)

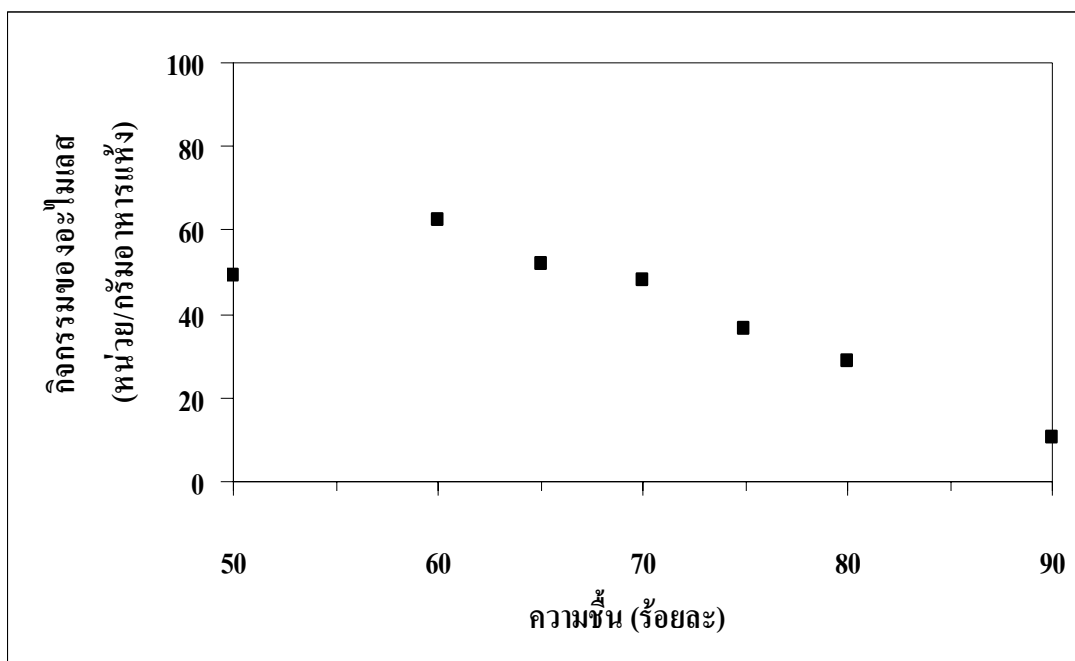
จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่ากากตะกอนน้ำเสียเป็นแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อได้ สำหรับค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในแต่ละสูตรอาหารที่ใช้ในการหมักมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ สูตรอาหารสำหรับการหมักจะต้องมีองค์ประกอบ สารอาหารและแร่ธาตุที่ครบเพียงพอที่จะผลิตเอนไซม์ จึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนระหว่างกากมันสำปะหลังต่อกากตะกอนน้ำเสียเท่ากับ 3:2 เพื่อนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ต่อไป

3.3 การศึกษาความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

ปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราในการหมักแบบอาหารแข็ง คือ ความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Aidoo *et al.*, 1981) จึงได้ทดสอบผลของความชื้นต่อการผลิตเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสีย ในอัตราส่วน 3:2 ซึ่งคัดเลือกจากการศึกษาในข้อ 3.2 ปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นร้อยละ 50, 60, 65, 70, 75, 80 และ 90 โดยการใช้น้ำกลั่น บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ *A. oryzae* TISTR 3605 โดยสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 48.98, 62.31, 51.67, 48.15, 36.67, 28.8 และ 10.65 หน่วยต่อกรัมอาหารแห้ง ตามลำดับ (ภาพที่ 6) โดยความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ ร้อยละ 60 ซึ่งเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3605 สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด 62.31 หน่วยต่อกรัมอาหารแห้ง จากการศึกษาทำให้ทราบว่าถ้าให้ปริมาณความชื้นมากเกินไป อาหารเลี้ยงเชื้อจะเกาะตัวกันแน่นขึ้น ทำให้รูพรุนของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ส่งผลให้ปริมาณอากาศและความสามารถในการแพร่ผ่านของอากาศในอนุภาคอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง มีอัตราการถ่ายเทอากาศต่ำลง

และจำกัดการเจริญเติบโตและกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Lonsane *et al.*, 1985; Ramachandran *et al.*, 2004) แต่ถ้าให้ปริมาณความชื้นต่ำเกินไปจะทำให้การละลายของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำลง ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ลดลงและในสภาวะที่แห้งเกินไปการเจริญเติบโตและกิจกรรมของจุลินทรีย์จะถูกจำกัดจากปริมาณน้ำ (water stress)

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานศึกษาของ Selvakumar *et al.* (1998) ที่รายงานว่าความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus niger* NCIM 1248 โดยใช้กากชาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแห้ง นอกจากนี้ Ramachandran *et al.* (2004) รายงานว่าความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 68 เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* โดยใช้ coconut oil cake เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแห้ง Francis *et al.* (2003) รายงานว่าความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 6270 โดยใช้ spent brewing grains เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแห้ง ซึ่งเห็นว่าแตกต่างกับผลการทดลองที่ได้เล็กน้อย เนื่องจากความแตกต่างกันของเชื้อจุลินทรีย์และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง เชื้อแต่ละชนิดต้องการความชื้นในการผลิตเอนไซม์แตกต่างกันเล็กน้อย รวมทั้งชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีลักษณะทางกายภาพและเคมีแตกต่างกัน

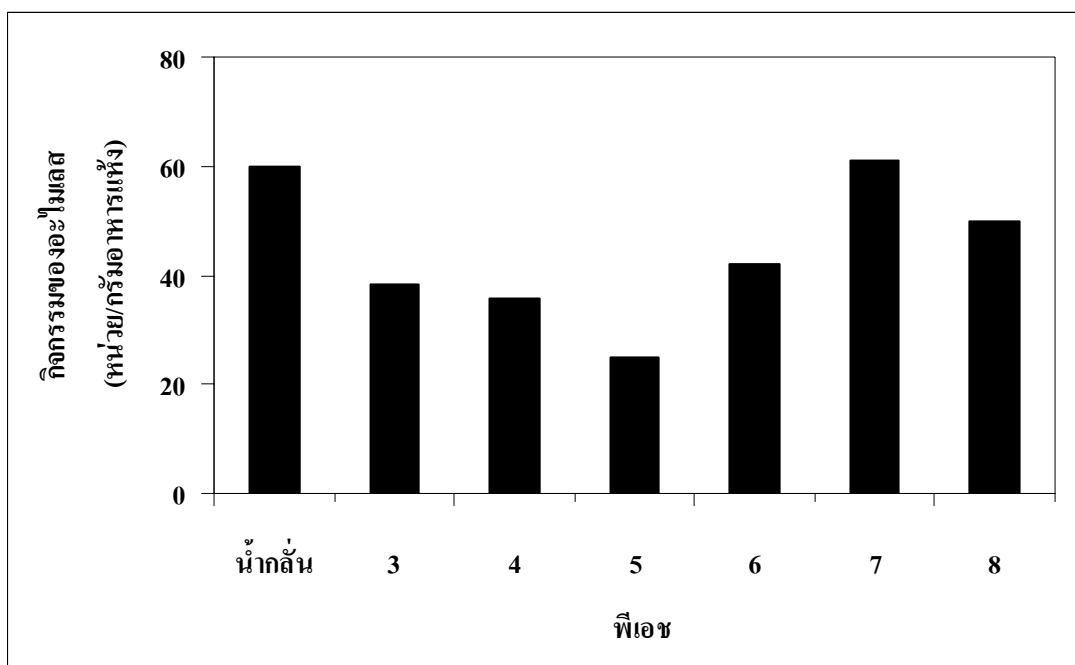


ภาพที่ 6 ปริมาณความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. oryzae* TISTR 3605 ในการเพาะเลี้ยงบนวัสดุหมักกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสียในอัตราส่วน 3:2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.4 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

การศึกษาลผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3605 ที่พีเอชต่างๆ คือ พีเอช 3, 4, 5, 6, 7, 8 และน้ำกลั่น (พีเอชเท่ากับ 7) แสดงในภาพที่ 7 โดยพบว่า ที่พีเอช 7 *A. oryzae* TISTR 3605 สามารถให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 61.11 หน่วยต่อกรัมอาหารแห้ง รองลงมา คือ การใช้ น้ำกลั่น, พีเอช 8, 6, 3, 4 และ 5 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ 59.85, 49.85, 42.07, 38.37, 35.63, และ 24.89 หน่วยต่อกรัมอาหารแห้ง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่พีเอช 7 มีค่ากิจกรรมของอะไมเลสสูงกว่ากิจกรรมที่พีเอช 6 และ 8 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่มีค่าใกล้เคียงกับการใช้น้ำกลั่นในการปรับความชื้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ วิชิตา (2546) ที่พบว่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคสอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3254 ค่าพีเอชจะส่งผลต่อการแตกตัวของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ของทั้งเอนไซม์และอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปในทางที่เหนียวหรือยับยั้งให้เกิดการจับกับสารตั้งต้น ทั้งนี้การผลิตเอนไซม์เมื่อนำน้ำกลั่นมีค่าใกล้เคียงกับเมื่อปรับพีเอชเท่ากับ 7 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดในงานศึกษานี้

ดังนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในการทดลองต่อไปจึงใช้น้ำกลั่นปรับความเข้มข้นสารละลายบัฟเฟอร์

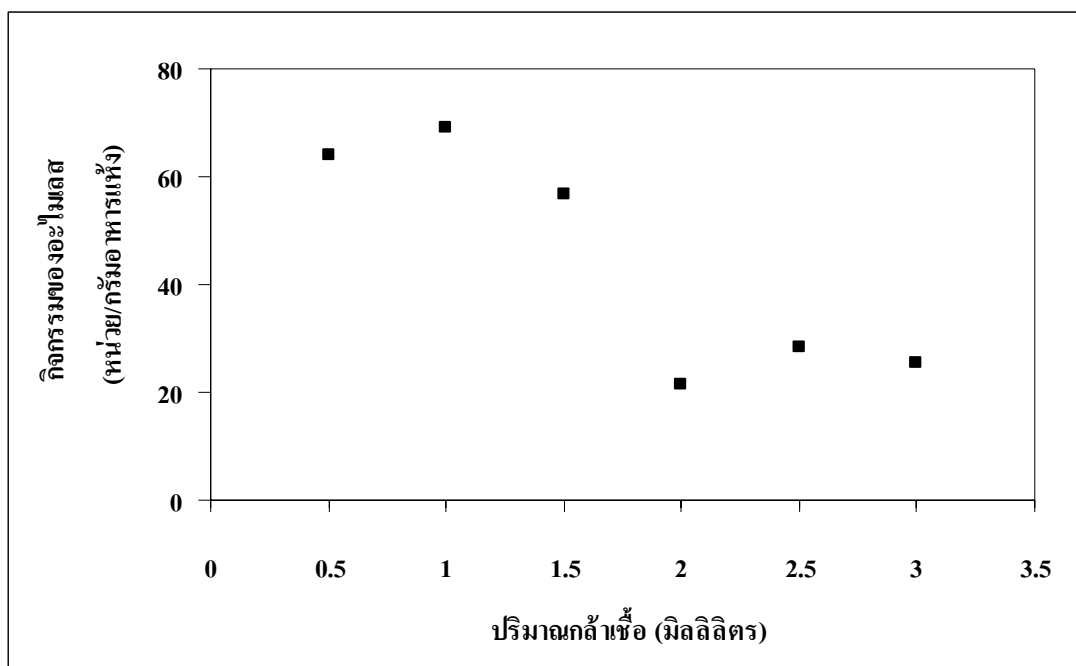


ภาพที่ 7 ฟิชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. oryzae* TISTR 3605 ในสภาวะที่มีความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเท่ากับร้อยละ 60 เพาะเลี้ยงบนวัสดุหมักกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสียในอัตราส่วน 3:2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.5 การศึกษาปริมาณของกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

ปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสทำการศึกษาโดยใช้ปริมาตรของกล้าเชื้อเท่ากับ 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิลิตร พบว่า *A. oryzae* TISTR 3605 สร้างกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสได้เท่ากับ 64.17, 69.07, 56.67, 21.3, 28.33 และ 25.37 หน่วยต่อกรัมอาหารแห้ง ตามลำดับ (ภาพที่ 8) ซึ่งปริมาณของกล้าเชื้อที่ 1 มิลลิลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการสร้างกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส อาจเป็นเพราะการใช้กล้าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ทั้งนี้เมื่อทำการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อกลับทำให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีค่าต่ำลง อาจเป็นเพราะมีปริมาณกล้าเชื้อมากเกินไปภายใต้อาหารที่มีจำกัดทำให้เกิดการแย่งอาหารกัน และมีสารอาหารไม่เพียงพอต่อความ

ต้องการของจุลินทรีย์ มีผลทำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ปริมาณน้อย (Ramchandran *et al.*, 2004) ส่วนปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่น้อยเกินไปถึงแม้จะมีสารอาหารเพียงพอ แต่เนื่องจากมีปริมาณเชื่อน้อยเกินไป จึงมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์อะไมเลสผลิตได้ปริมาณน้อยเช่นกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้กล้าเชื้อเริ่มต้น 1 มิลลิลิตร ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3605 สำหรับการทดลองเพื่อศึกษาหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป



ภาพที่ 8 ปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. oryzae* TISTR 3605 ในสภาวะที่มีความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเท่ากับร้อยละ 60 เพาะเลี้ยงบนวัสดุหมักกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสีย ในอัตราส่วน 3:2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.6 การศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3605 แสดงดังตารางที่ 5 โดยพบว่าเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนซึ่งได้แก่ กลูโคส แป้ง เปปโตन และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะส่งผลให้ค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อ

ไนโตรเจนเปลี่ยนไปเล็กน้อย (ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เปลี่ยนแปลงไปเท่ากับ 19.0, 19.0, 18.9 และ 18.6 ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนของชุดควบคุม (ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 18.9) โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส เพิ่มขึ้นจาก 53.24 เป็น 58.89 หน่วยต่อกรัมอาหารแห้งเมื่อเติมน้ำตาลกลูโคส ในขณะที่การเติมแป้งไม่มีผลต่อการส่งเสริมต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ทั้งนี้อาจเนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ง่ายกว่าแป้งและแหล่งคาร์บอนของกากมันสำปะหลังในชุดควบคุม สำหรับการเติมแหล่งไนโตรเจนทั้งเปปโตนและแอมโมเนียมซัลเฟตไม่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *A. oryzae* ให้เพิ่มขึ้น และเมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาทำการเปรียบเทียบทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธีการของเชฟเฟ (Scheffe 's test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่า การเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเพิ่มเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของชุดควบคุม

ตารางที่ 5 ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนและค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเสริมชนิดต่างๆ

ชนิด ของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน	ค่าอัตราส่วน ของคาร์บอนต่อ ไนโตรเจน	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/กรัมอาหารแห้ง)
ชุดควบคุม	18.9	53.24
กลูโคส	19.0	58.89
แป้ง	19.0	48.33
เปปโตน	18.9	47.04
แอมโมเนียมซัลเฟต	18.6	43.98

ผลการทดลองนี้แตกต่างจากรายงานของ Sadhukhan *et al.* (1990) และ Agger *et al.* (2002) ที่พบว่าแป้งเป็นสารชักนำในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดีกว่ากลูโคส นอกจากนี้ Ramachandran *et al.* (2004) ได้ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* บนอาหารตะกอนของน้ำมันมะพร้าว พบว่า

เปปโตเน แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และ corn steep solid ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นร้อยละ 1 มีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีค่าสูงขึ้น และ Aiyer (2004) ได้ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* SPT 27 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเปปโตเนที่เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วมีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีค่าสูงขึ้น ซึ่งผลการทดลองที่ไม่สอดคล้องกันนี้ อาจเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองมีความแตกต่างกัน

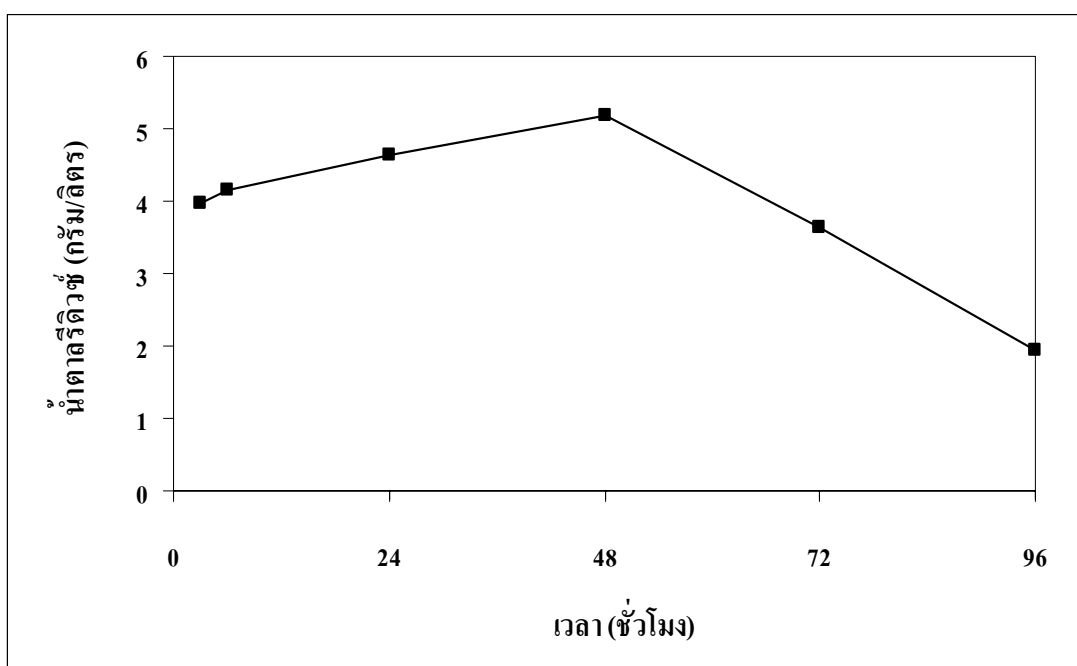
ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าการใช้วัสดุหมักที่มีกากตะกอนน้ำเสียและกากมันสำปะหลังเป็นส่วนประกอบนั้นมีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เพียงพอต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเพิ่มในการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากสามารถให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสได้สูงใกล้เคียงกันกับชุดควบคุมและยังเป็นการประหยัดต้นทุนในการผลิตอีกด้วย

4. การศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลัง

4.1 การศึกษาเวลาการหมักระหว่างกากมันสำปะหลังและปริมาณเอนไซม์อะไมเลสที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

การหาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากสภาวะในข้อ 3 แสดงดังภาพที่ 9 โดยพบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ถูกผลิตอย่างรวดเร็วใน 3 ชั่วโมงแรกของการย่อย จากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีค่าสูงสุดเท่ากับ 5.18 กรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมงหลังการย่อย และเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลง และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับการศึกษาของกัลยา (2546) ที่ทำการย่อยเปลือกและกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.17 หน่วย เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 0.33 หน่วย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ธีรภัทรและคณะ (2549) ได้ทำการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ผสม โดยพบว่าการใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเซลลูเลสและเพคติเนส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นสามารถผลิตน้ำตาลได้สูงสุดภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสในการศึกษานี้ใช้เวลานานกว่างานศึกษาอื่นที่ใช้กากมัน

ลำปะหลังเป็นวัตถุดิบเหมือนกัน โดยอาจเนื่องจากเอนไซม์อะไมเลสที่ใช้ในการทดลองเป็นเอนไซม์ที่ผลิตเองไม่ใช่เอนไซม์ทางการค้า ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตเองมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าเอนไซม์ทางการค้าจึงส่งผลให้ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานกว่า อีกทั้งการย่อยแป้งในกากมันลำปะหลังโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้เพียงอย่างเดียวทำได้ยาก เพราะแป้งในกากมันลำปะหลังอยู่ในรูปของคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำในสัดส่วนที่มาก (กัลยา, 2546) ดังนั้นจึงเลือกเวลาการย่อยกากมันลำปะหลังโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสที่เหมาะสมคือ 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการผลิตน้ำตาลต่อไป



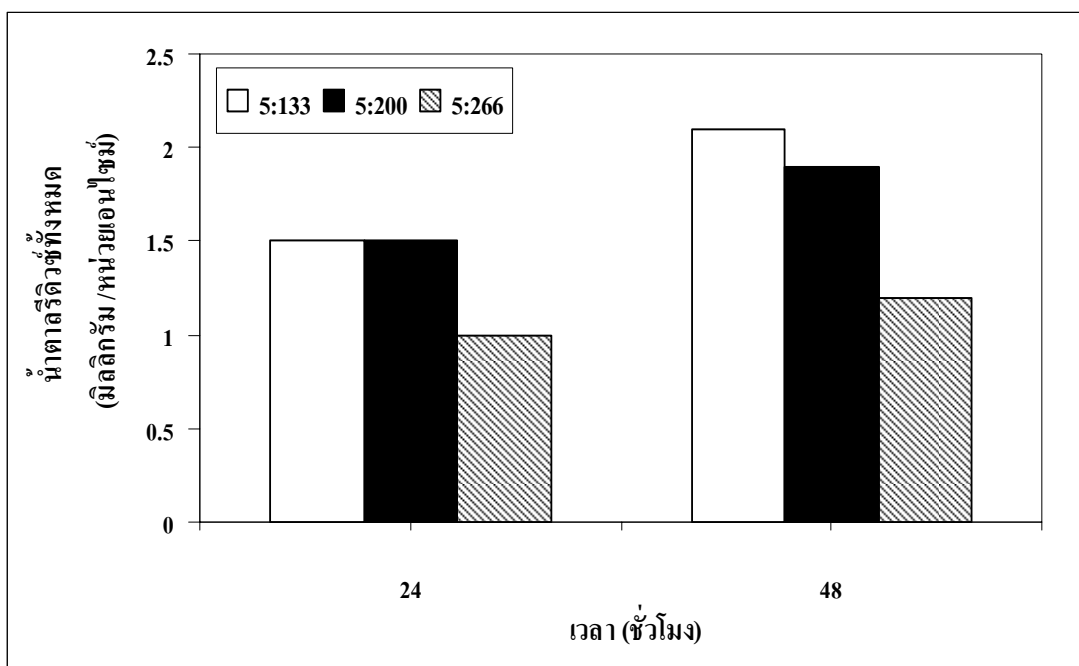
ภาพที่ 9 การหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ประกอบด้วยกากมันลำปะหลังและปริมาณเอนไซม์อะไมเลสในอัตราส่วน 5:133 กรัมต่อหน่วยของเอนไซม์อะไมเลส ที่ระยะเวลาการหมัก 3, 6, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

4.2 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างกากมันลำปะหลังและปริมาณเอนไซม์อะไมเลสที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

ผลการศึกษาอัตราส่วนระหว่างกากมันลำปะหลังและปริมาณเอนไซม์อะไมเลสที่เหมาะสมในการหมักเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด พบว่าการใช้กากมันลำปะหลัง 5 กรัมต่อเอนไซม์อะไมเลส 133 หน่วย เป็นอัตราส่วนที่ทำให้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มีความเข้มข้นสูงสุด (ภาพที่ 10) หลังจากการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทั้งนี้ไม่สามารถใช้ปริมาตรเอนไซม์ที่ต่ำ

กว่านี้ได้ เนื่องจากจะทำให้การผสมระหว่างกากมันสำปะหลังกับเอนไซม์ไม่ดีและการสกัดน้ำตาลที่ผลิตออกมานั้นทำได้ยาก ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการทดลองนี้ ดังนั้นปริมาณเอนไซม์สูงสุดที่สามารถทำงานได้ดี คือ เอนไซม์อะไมเลส 133 หน่วย ต่อกากมันสำปะหลัง 5 กรัม สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 2.1 มิลลิกรัมต่อหน่วยเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งน้ำตาลที่ผลิตได้มีความเข้มข้นน้อยกว่าการศึกษาของสุภาวดี (2543) ที่ย่อยกากมันสำปะหลัง 8 กรัม ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 75 NCU เพคติเนส 130 PG แอลฟาอะไมเลส 0.6 KNU และกลูโคอะไมเลส 48.60 AGU ซึ่งสามารถผลิตน้ำตาลได้ 8.30 กรัมต่อลิตร และต่ำกว่าการศึกษาของกัลยาและจิรศักดิ์ (2547) ที่ทำการย่อยกากมันสำปะหลัง 1.5 กรัม ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกัน คือ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 1.67 หน่วย และอะไมโลกลูโคซิเดส 3.33 หน่วย โดยสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 5.20 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในงานศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องส่วนใหญ่จะทำการปรับสภาพของกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนหรือกรดก่อนนำมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ และเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยกากมันสำปะหลังมักจะใช้เอนไซม์เชิงการค้าและเอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน ส่งผลให้สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากกว่าเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นจากงานศึกษา

อย่างไรก็ตาม งานศึกษานี้ต้องการศึกษาแนวทางในการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าของกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสีย ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดใช้ในงานศึกษาต่อไป



ภาพที่ 10 การผลิตน้ำตาลที่ละลายน้ำโดยใช้กากมันสำปะหลัง 5 กรัม และปริมาณเอนไซม์อะไมเลส 133, 200 และ 266 หน่วยเอนไซม์อะไมเลส

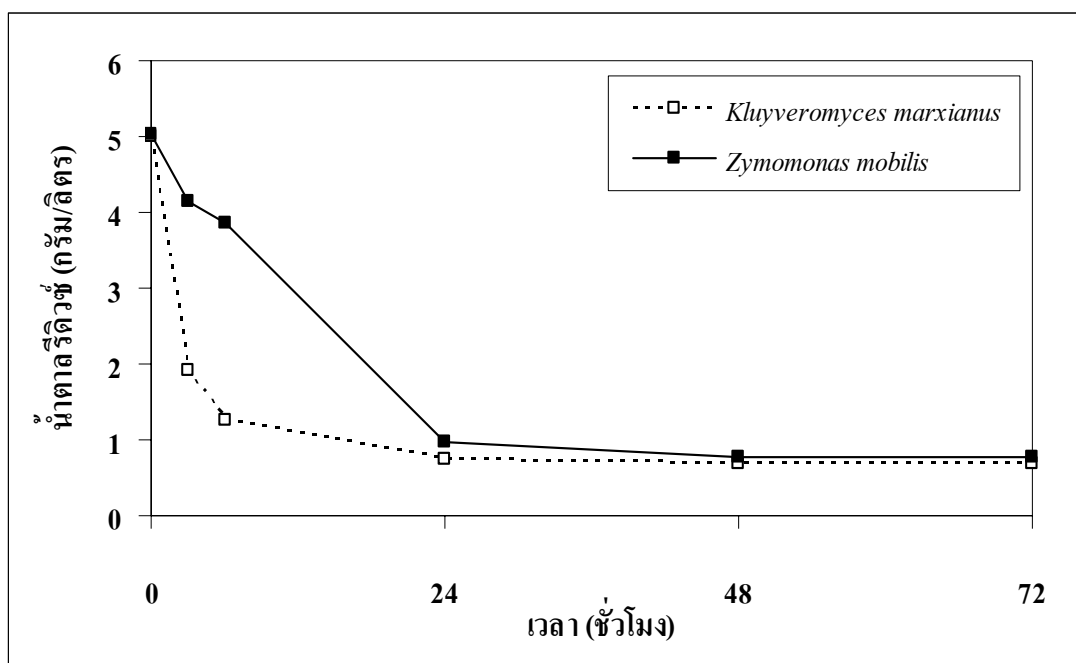
5. การศึกษาการหมักเอทานอลจากน้ำตาลที่ย่อยได้จากกากมันสำปะหลัง

การผลิตน้ำตาลที่ละลายน้ำเพื่อใช้ในการหมักเอทานอล ทำโดยหมักกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสในอัตราส่วน เท่ากับ 5:133 กรัมต่อหน่วยเอนไซม์อะไมเลส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง น้ำตาลที่ผลิตได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5.76 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำน้ำตาลที่ผลิตได้ไปเป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอลต่อไป

5.1 การคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลที่ละลายน้ำเพื่อผลิตเอทานอลระหว่างยีสต์สายพันธุ์ *Kluyveromyces marxianus* และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* พบว่า เชื้อยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* สามารถนำน้ำตาลที่ละลายน้ำไปใช้ในการสร้างเซลล์ ทำให้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น และนำน้ำตาลไปใช้ในการผลิตเอทานอลได้รวดเร็วกว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* โดยดูจากปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอย่างรวดเร็วในระยะเวลาที่สั้นที่สุด (ภาพที่ 11) Ballesterose et al. (1991) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ 27 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการ

การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส ได้แก่ *Saccharomyces*, *Candida* และ *Kluyveromyces* ที่อุณหภูมิระหว่าง 32-45 องศาเซลเซียส ผลที่ได้พบว่า *Kluyveromyces marxianus* L.G. เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด ซึ่งสามารถผลิตได้ร้อยละ 3.76 น้ำหนักต่อปริมาตรที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *K. marxianus* มีความสามารถในการผลิตเอทานอล ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อ *K. marxianus* เพื่อนำไปศึกษาการหมักเอทานอลขั้นต่อไป

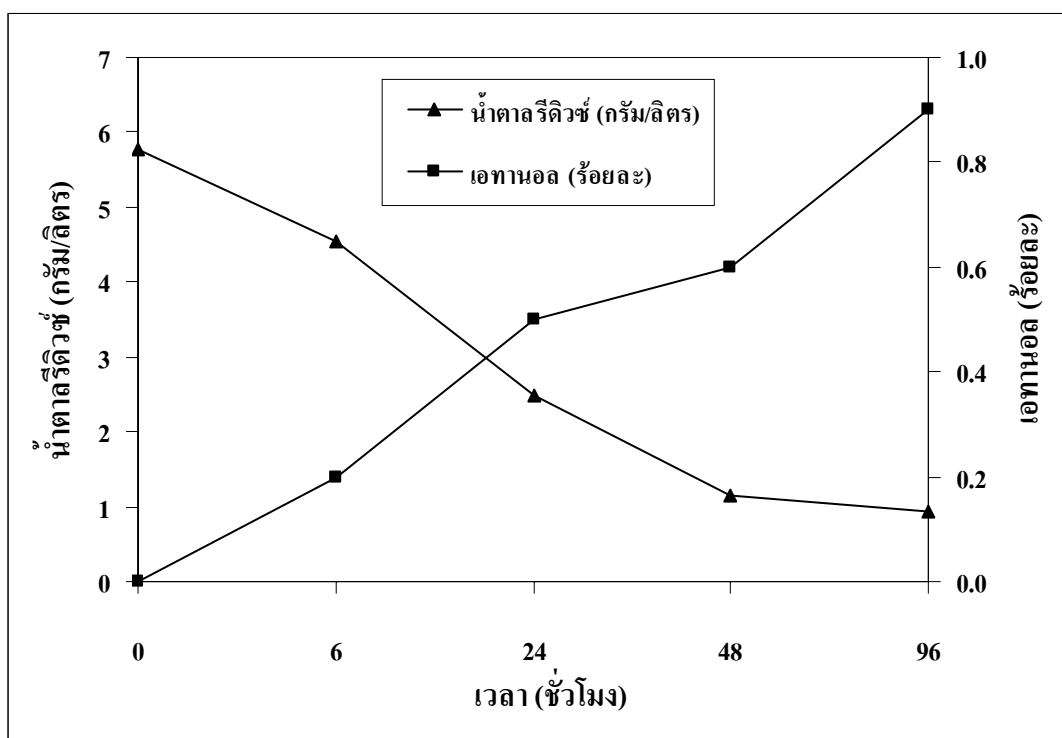


ภาพที่ 11 การคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล

5.2 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล

เมื่อนำสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอลระดับฟลาสก์ ด้วยยีสต์สายพันธุ์ *Kluyveromyces marxianus* ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 48 ชั่วโมง ในขณะที่เอทานอลถูกผลิตขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 5.76 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับร้อยละ 0.9 น้ำหนักต่อปริมาตร ในช่วงเวลาที่ 96 ของการหมัก ที่เวลา 6, 24, 48 และ 96 ชั่วโมงของการหมัก ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มลดลงจนเหลือน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้ายเท่ากับ 4.53, 2.49, 1.14 และ 0.93 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เอทานอลถูกผลิตที่เวลา 6, 24,

48 และ 96 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นร้อยละ 0.2, 0.5, 0.6 และ 0.9 น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ (ภาพที่ 12) ผลการทดลองดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาของ ชลดา (2546) พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 95 กรัมต่อลิตร สามารถหมักเอทานอลได้สูงสุดร้อยละ 3.48 น้ำหนักต่อปริมาตร ในชั่วโมงที่ 48 ค่าสูงกว่าผลการทดลองนี้ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาของพรรณวิไล (2545) พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเหง้ามันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร สามารถหมักเอทานอลได้สูงสุดร้อยละ 10.6 น้ำหนักต่อปริมาตร ในชั่วโมงที่ 60 ซึ่งมี ทั้งนี้อาจเนื่องจากในงานศึกษาของพรรณวิไล ได้ทำการปรับสภาพของเหง้ามันสำปะหลังโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และนำไปต้ม ก่อนนำมาใช้ทดลองในการศึกษา ทำให้งานศึกษาของพรรณวิไลสามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่า การผลิตเอทานอลในงานศึกษานี้



ภาพที่ 12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงและปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ที่เวลาการหมัก 0, 6, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดยเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากกระบวนการหมักในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ โดยพบว่า เอทานอลที่ผลิตได้จากงานศึกษานี้ยังมีความเข้มข้นต่ำกว่างานศึกษาอื่น ดังนั้นจึงควรมีการปรับปรุงการหมักเพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตเอทานอลที่เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ

แหล่ง คาร์บอน	จุลินทรีย์	เวลา ในการ หมัก (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น ของน้ำตาล เริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	ความ เข้มข้น ของ เอทานอล (ร้อยละ)	อ้างอิง
กากมัน สำปะหลัง	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54	101.46	4.21	เทพปัญญา (2544)
กากมัน สำปะหลัง	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48	95	3.48	ชลดา (2546)
เหง้ามัน สำปะหลัง	<i>Zymomonas mobilis</i>	60	25	10.6	พรรณวิไล (2545)
น้ำอ้อย	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	60	220	8.7	Limtong <i>et al.</i> (2007)
กากมัน สำปะหลัง	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18	5.20	2.28	จิรศักดิ์และกัลยา (2547)
เศษ อาหาร	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72	80	4.7	ทัศนีย์ (2545)
แป้งมัน สำปะหลัง	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24	89.2	3.6	ธีรภัทร และคณะ (2549)
กากมัน สำปะหลัง	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	96	5.76	0.9	งานวิจัยนี้

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากผลการทดลองคัดเลือกรูปร่างสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่า *Aspergillus oryzae* TISTR 3605 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสียได้ดีและใช้เวลาในการผลิตน้อยที่สุด ด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ เวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ที่ 48 ชั่วโมง ใช้อัตราส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากมันสำปะหลังและกากตะกอนน้ำเสียที่อัตราส่วน 3:2 โดยน้ำหนัก ใช้ความชื้นวัสดุหมักเริ่มต้นร้อยละ 60 ใช้กล้าเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร โดยไม่เติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ผลที่ได้ทำให้ทราบว่าธาตุอาหารในกากตะกอนน้ำเสียช่วยส่งเสริมการเติบโตของจุลินทรีย์และส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ได้ ด้วยเหตุนี้ชี้ให้เห็นความเป็นไปได้ในการใช้กากตะกอนน้ำเสียเป็นวัสดุร่วมกับกากมันสำปะหลังในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อทดแทนธาตุอาหารที่ต้องเติมลงไป

ในขั้นตอนการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากกากตะกอนน้ำเสีย พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมของวัสดุที่ใช้หมักน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างกากมันสำปะหลังและปริมาณเอนไซม์อะไมเลส คือ 5:133 กรัมต่อหน่วยเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้ระยะเวลาในการหมักนาน 48 ชั่วโมง การหมักเพื่อผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตข้างต้น ทำโดยใช้ยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล สามารถทำให้น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็ว ภายในเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ในการศึกษานี้ สามารถนำมาใช้ผลิตเอทานอลได้ โดยได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่ร้อยละ 0.9 น้ำหนักต่อปริมาตร ผลการศึกษานี้ทำให้ทราบว่ามีความเป็นไปได้ในการนำกากตะกอนน้ำเสียและกากมันสำปะหลังมาใช้เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลสและเอทานอลได้ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในการหมักเพื่อให้สามารถผลิตเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นและเพียงพอต่อการใช้งานจริงได้

ข้อเสนอแนะ

1. ขั้นตอนการย่อยกากมันสำปะหลัง เนื่องจากมีกากมันสำปะหลังที่มีคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่สูงมาก ปริมาณเอทานอลที่ได้จึงไม่สูงมาก คือ ประมาณร้อยละ 0.9 น้ำหนักต่อปริมาตร ดังนั้นการย่อยด้วยวิธีทางเคมี อาจให้ผลปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น ส่งผลให้เอทานอลที่หมักได้มีปริมาณสูงขึ้น แต่ควรออกแบบระบบการย่อยให้สามารถนำสารเคมีกลับมาใช้ใหม่ เพื่อลดปัญหาผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการปล่อยสารเคมีที่ใช้แล้วออกนอกระบบ
2. งานศึกษานี้ได้ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลเพียงอย่างเดียว หากได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลอาจทำให้ความสามารถในการผลิตเอทานอลเพิ่มสูงขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กัลยา อยู่นาน. 2546. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลจากเปลือกและกากมัน
สำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- กัลยา อยู่นาน และ จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร. 2547. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลาย
เปลือกมันสำปะหลัง เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์โดยสารละลายกรดเจือจางและเอนไซม์.
เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42: สาขา
วิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม.
- จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร และกัลยา อยู่นาน. 2547. การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังโดยการ
หมักด้วย แคลโครไมซิส ซีรีวีชีอี 5049. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 30.
- จิราภรณ์ โล้วงศ์วัฒน. 2525. การผลิตกรดซิตริกจากกากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Aspergillus*
niger. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชลดา ซื่อสัจย์. 2546. การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชวนิศนดากร วรวรรณ. 2500. หลักการให้อาหารสัตว์: หลักวิชาอาหารสัตว์โดยทั่วไปและคุณค่า-
วิธีให้อาหารสัตว์สำหรับประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตร
ศาสตร์.
- ดวงพร คันทโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
กรุงเทพฯ.
- คุณณี ธนะบริพัฒน์. 2537. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ทรงศักดิ์ วัฒนชัยเสรีกุล. 2543. อาหารสัตว์จากกากมันสำปะหลังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทวี แก้วคง. 2527. โภชนศาสตร์สัตว์เบื้องต้นและการให้อาหารสัตว์. สำนักพิมพ์เกษตรไทย. กรุงเทพฯ.

ทัศนีย์ เจียรพสุอนันต์. 2545. การผลิตเอทานอลจากขยะเศษอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

เทพปัญญา เจริญรัตน์. 2544. การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังแบบครึ่งคราว โดยการเติม สับสเตรตขึ้นกับฟิเอช. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธีรภัทร ศรีนรคุตร, เลิศลักษณ์ แก้ววิมล และ ละเอียด แซ่โจ้ว. 2549. การย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อ ผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลในประเทศไทย. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย 31(1).

นัยนา คุณลักษณะ. 2542. การใช้กากตะกอนน้ำเสียชุมชนในการปรับปรุงคุณภาพดินเปรี้ยวจัด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.

พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์. 2545. การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มานิช โพธิ์สูง. 2546. การผลิตเอทานอลจากน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังโดย แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เมธา วรรณพัฒน์ และ นลอง วชิราภากร. 2533. เทคนิคการให้อาหารโคเนื้อและโคนม. ภาควิชา สัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

- วาชิต ชนสรุติพันธ์. 2545. จลนศาสตร์การเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสโดย *Aspergillus oryzae* ด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- วิชุดา เกตุใหม่. 2546. การศึกษาการผลิตการทำให้บริสุทธิ์และคุณลักษณะของเอนไซม์กลูโคสอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3254. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร.
- วิมล วิริยะวิทย์. 2526. ความก้าวหน้าของอุตสาหกรรมไทย. กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.
- สมใจ ศิริโชค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. กรุงเทพฯ.
- สาวตรี ลิ้มทอง. 2540. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สุภาวดี ดีสโร. 2543. การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ผสมในเครื่องปฏิกรณ์อัลตราฟิลเทรชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Agger, T., J. B. Petersen, S. M. O'Connor, R. L. Murphy, J. M. Kelly and J. Nielsen. 2002. Physiological characterisation of recombinant *Aspergillus nidulans* strains with different *creA* genotypes expressing *A. oryzae* amylase. **Journal of Biotechnology**. 92(3): 279-285.
- Aidoo, K. E., R. Handry and B. J. B. Wood. 1981. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **European Journal Applied Microbiology Biotechnology**. 12: 6-9.

Aiyer, P. V. D. 2004. Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*

SPT 27. **American Journal of Biotechnology**. 3(10): 519-522.

Ballesterose, I., M. Ballesterose, A. Cabanas, I. Carrasco, C. Martin, M. J. Negro, F. Saez and R. Saez. 1991. Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) for cellulose to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 28-29: 307-315.

Bernfeld, P. 1951. Enzyme of starch degradation and synthesis. **Advance in enzymology**. 12: 379-481.

Conn, E. E. and P. K. Stumps. 1976. **Outline of Biochemistry**. John Wiley and Sons. Inc., New York.

Coursey, D.G. 1973. **Chronic cassava toxicity**. in B. Nestel and R. MacIntyre, ed. An Interdisciplinary Workshop. London.

De Mot, R. 1990. Conversion of starch by yeasts. **Biotechnology and Biocatalyst**. Marcel Dekker. Inc., New York and Basel: 163-222

Elegado, F. B. and Y. Fujio. 1993. Selection of raw-starch digestive glucoamylase-producing *Rhizopus sp.* **Journal of General and Applied Microbiology**. 39(6): 541-546.

Francis, F., A. Sabu, K. M. Nampoothiri, S. Ramchandran, S. Ghost, G. Szakacs and A. Pandey. 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**. 15: 107-115.

Grace, M. R. 1997. **Cassava Processing**. Rome: FAO.

Hesseltine, C. W. 1972. Biotechnology report: Solid state fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**. 14: 571-532.

Hockenhull, D. J. D. 1967. Recent Development in the Production and Industrial Application of Amylolytic Enzyme Devised from Filamentous Fungi. **Progress in Industrial Microbiology**. 63: 97-136.

Hughes, M.A., J. Hughes, S. Liddle and Z. Kereztesy. 1994. Biochemistry and molecular biology of cyanogenesis. **The Cassava Biotechnology Network**. Proceeding of the Second International Scientific Meeting. 2: 385-395.

Ikasari, L. and D. A. Mitchell. 1994. Protease Production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. **World Journal and Microbiology and Biotechnology**. 10: 320-324.

Jarislav, V., P. Jamila, D. Milada, V. Libuse, S. Marie, K. Helena, V. Vladimir, Z. Rimma and C. Jiri. 1991. External Factor Involved in the Regulation of Synthesis an Extracellular Proteinase in *Bacillus megaterium*: Effect of Temperature. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 35: 352-357.

Kole, M. M. and D. F. Gerson. 1988. Ammonium concentration control on fed-batch fermentation for the production of biomass and enzyme. **Biotechnology Research and Application**. 28: 34-103.

Limtong, S., C. Sringiew and W. Yongmanitchai. 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**. 98: 3367-3374.

- Lonsane, B. K., N. P. Ghildiyal, S. Budhiatman and S. V. Ramakrishna. 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**. 17: 258-265.
- Mitchell, D. A., B. K. Lonsane, A. Durand, R. Renaud, S. Almanza, J. Maratray and G. W. Malaney. 1992. Solid substrate cultivation. **Elsevier science publishers**. London.
- Ooijkaas, L. P., F. J. Waber, R. M. Buitelaar, J. Tramper and A. Rinzema. 2000. Defined media and inert support: their potential as solid-state fermentation production systems. **Trends in Biotechnology**. 18: 356-360.
- Padmanabhan, S., M. V. Ramana and B. K. Lonsane. 1993. Potential of *Aspergillus oryzae* CFTRI 1480 for producing protecinase in high titers by solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 40: 499-503.
- Pandey, A. 1995. Glucoamylase research: an overview. **Starch/Starke**. 47(11): 439-445.
- Pandey, A., R. C. Soccol and D. A. Mitchell. 2000. New development in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**. 35: 1153-1169.
- Paturau, J. M. 1969. **By Product of Cane Sugar Industry**. Elsevies Publishing Company, Amsterdams.
- Prescott, S. C. and C. G. Dunn. 1959. **Industrial Microbiology**. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Ramachandran, S., A. K. Patel, K. M. Nampoothiri, S. Chandran, G. Szakacs, C. R. Soccol and A. Pandey. 2004. Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. **Brazilian Achives of Biology and Technology Journal**. 47: 309-317.

- Sadhukhan R. K., S. Manna, S. K. Roy and S. L. Chakrabarty. 1990. Thermostable amylolytic enzymes from a cellulolytic fungus *Myceliophthora thermophila* D14 (ATCC 48 104). **Applied Microbiology and Biotechnology**. 33(6): 692-696.
- Scherz, H. and G. Bonn. 1999. Analytical chemistry of carbohydrates. **Carbohydrate Polymers**. 39(1): 86-87.
- Selvakumar, R., L. A. Borenstein, Y. L. Lin, R. Ahmed and F. O. Wettstein. 1995. Immunization with nonstructural proteins E1 and E2 of cottontail rabbit papillomavirus stimulates regression of virus-induced papillomas. **Journal of Virology**. 69(1): 602-605.
- Socol, C. R., I. Iloki, B. Marin and M. Raimbault. 1994. Comparative production of alpha-amylase, glucoamylase and protein enrichment of raw and cooked cassava by *Rhizopus* strains in submerged and solid state fermentation. **Journal of Food Science and Technology**. 31(4): 320-323.
- Sriroth, K., R. Chollakup, S. Chotineeranat, K. Piyachomkwan and C. G. Oates. 2000. Processing of cassava waste of improved biomass utilization. **Bioresource Technology**. 71(1): 63-69.
- Stentiford, E. I. and C. M. Dodds. 1992. Composting in solid state cultivation. **Elsevier Applied Science**. 211-245.
- Thomas, D. S., J. A. Hossack and A. H. Rose. 1978. Plasmamembrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch Microbiol journal articles**. 117: 239-245.
- Waites, M. J., N. L. Morgan, J. S. Rockey and G. Higton. 2001. **Fuels and industrial chemicals. Industrial microbiology: an introduction: Blackwell science**.

Wiseman, A. 1975. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. Ellis Horwood Ltd., Chichester.

Wyman, C. E. 1996. Ethanol production from lignocellulosic biomass: overview. **Handbook on bioethanol: production and utilization**. 1-18.

Yang, S. S. and J. Y. Wang. 1999. Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivations. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**. 40: 256-265.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดนี้มาเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ประกอบด้วยองค์ประกอบดังนี้

PDA สำเร็จรูป	39	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract-peptone glucose agar (YPG agar)

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร yeast extract-peptone glucose agar ประกอบด้วย

Glucose	50	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	10	กรัมต่อลิตร
Peptone	10	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร
Agar	15	กรัม

3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการหมักและเตรียมกล้าเชื้อ *Zymomonas mobilis* และเชื้อ

Kluyveromyces marxianus

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Zymomonas mobilis* และ เชื้อ *Kluyveromyces marxianus* ประกอบด้วย

Glucose	50	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	2.5	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1	กรัมต่อลิตร
MgSO_4	0.3	กรัมต่อลิตร
NH_4Cl	2	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของอะไมเลส

- 1) เตรียมหลอดทดลองที่มี DNS reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วพักไว้
- 2) เตรียม reaction mixture tube โดยแต่ละหลอดเติม 1.5 มิลลิลิตร ของ 2% สารละลาย แป้งและ 0.1M phosphate buffer (pH 6.0) 1 มิลลิลิตร
- 3) แต่ละหลอดเติมเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร และต้องมีหลอดหนึ่งเป็น blank โดยใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร แทน
- 4) ตั้งหลอด reaction mixture ไว้ใน water bath อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- 5) ไปเปิด 1 มิลลิลิตร ของ Reaction mixture จากแต่ละหลอดลงในแต่ละหลอดของ DNS reagent ที่เตรียมในตอนแรก
- 6) ตั้งหลอดไว้ในอ่างน้ำร้อน นาน 5 นาที ปิดปากหลอด
- 7) ย้ายหลอดทั้งหมดไปไว้ในอ่างน้ำแข็ง เพื่อให้หายร้อน
- 8) เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด
- 9) วัดค่า OD₅₄₀ โดยใช้หลอดที่เติมน้ำกลั่นเป็น blank
- 10) คำนวณค่ากิจกรรมของอะไมเลส เป็นหน่วยของกิจกรรม

นิยาม: 1 unit คือ ปริมาณไมโครโมลของกลูโคสในเวลา 1 นาที

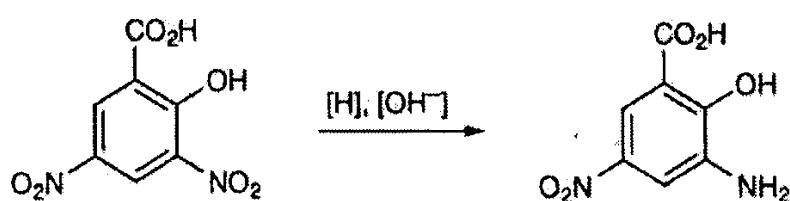
$$1 \text{ unit} = \frac{(\text{OD sample}) \times (\text{OD standard}) \times (\text{dilution factor}) \times (\text{tot. vol. of Rx Mix})}{(\text{Mw glucose}) \times (\text{Rx. time}) \times (\text{enzyme vol. use}) \times (\text{amount of Rx Mix taken})}$$

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดย DNS method (Bernfeld, 1951)

วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาล Reducing sugar ที่มีปริมาณอยู่ในช่วงระหว่าง 5-500 ไมโครกรัมของน้ำตาลกลูโคส

2.1 หลักการทางปฏิกิริยา (Scherz and Bonn, 1999)

การต้มน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายต่างที่มีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ซึ่งสารตัวนี้จะเปลี่ยนรูปไปเป็นสารที่มีสีเข้มขึ้น ซึ่งมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสงช่วง 500-550 นาโนเมตร ปฏิกิริยานี้จะไม่หยุดจนกว่าจะเกิดผลิตภัณฑ์หมด เชื่อว่าสีของผลิตภัณฑ์นั้นเป็นสีของ 3-amino-5-nitrosalicylic acid



ภาพผนวกที่ ข1 ปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และสาร 3-5 dinitrosalicylic acid ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเข้มของ 3-amino-5-nitrosalicylic acid (Scherz and Bonn, 1999)

2.2 สารเคมี

- 3-5 dinitrosalicylic acid
- Sodium hydroxide
- Sodium potassium tartrate

2.3 การเตรียมสารละลาย

- 2 N NaOH 50 มิลลิลิตร (เตรียมโดยละลาย NaOH ปริมาณ 4 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)
- DNS (3-5 dinitrosalicylic acid) reagent

เตรียมโดยละลาย 3-5 dinitrosalicylic acid (DNS) 2.5 กรัม ใน 50 มิลลิลิตร ของ 2 N NaOH เติม sodium potassium tartrate (Rochelle salt) ลงไป 75 กรัม และคนจนกระทั่งสารละลายหมด จึงเติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานหลายสัปดาห์

2.4 การเตรียมสารละลายกลูโคส

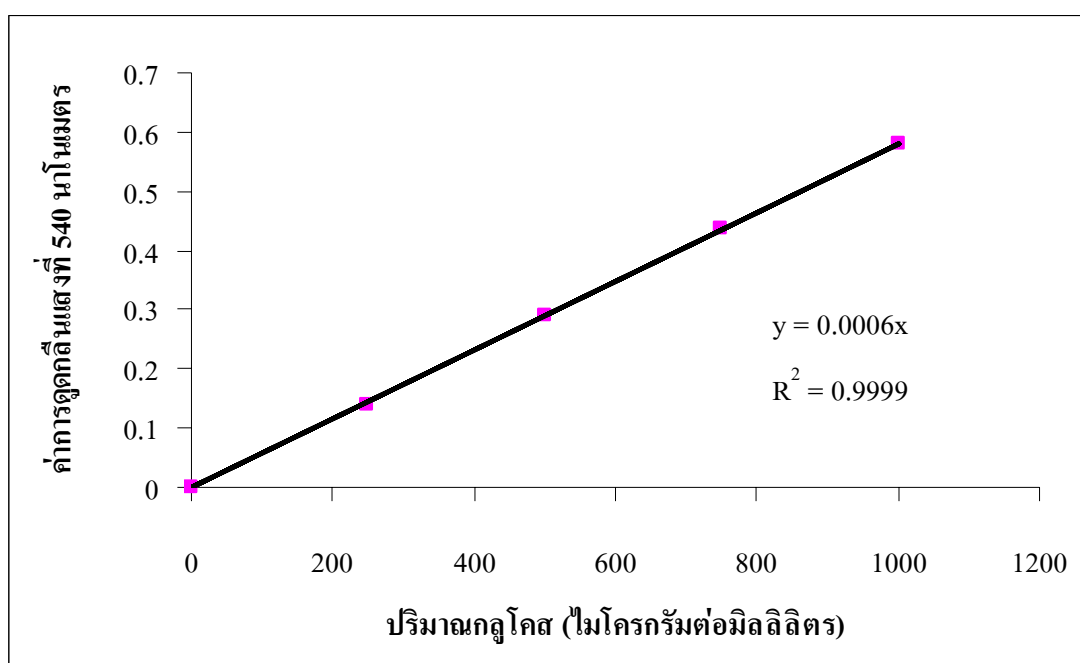
เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายที่ได้ให้มีความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.5 วิธีวิเคราะห์

- 1) ดูดตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลจำนวน 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง สำหรับหลอดที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) ใช้น้ำกลั่น
- 2) เติม DNS reagent ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 3) ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที
- 4) ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว โดยการนำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง
- 5) เติมน้ำให้ครบ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 6) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้นในช่วง 0.1-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (blank ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง)

ตารางภาพผนวกที่ ข1 ค่ามาตรฐานกลูโคสโดยวิธี DNS

ปริมาณกลูโคส (มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD ₅₄₀)
0	0
0.25	0.140
0.5	0.290
0.75	0.436
1.0	0.580



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานกลูโคสโดยวิธี DNS

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่าง

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่าง เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ในสารละลายมาตรฐาน โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร คำนวณค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐาน ทำการเจือจางตัวอย่างในกรณีที่สารละลายมีความเข้มข้นสูงกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.7 วิธีคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากสูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{ค่า OD}_{540} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

3. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลโดยใช้เครื่องแก๊สโครโมโทกราฟี

3.1 สารเคมี

เอทานอล analytical grade ความเข้มข้น 99.8 เปอร์เซ็นต์

3.2 สภาพที่ใช้ในการวิเคราะห์

Spilt ratio	200:1
Inject temperature	150 °C
Column temperature	60 °C (isothermal)
Detector (FID) temperature	200 °C
Column HP-5:	5% Phenyl Methy Siloxane Capillary 30.0 m 320 µm x 0.25 µm
Carrier gas:	He, Total flow 385 ml/min

3.3 วิธีการ

3.3.1 ถัดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี บันทึกพื้นที่ใต้กราฟ

3.3.2 นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของเอทานอล

3.4 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

เตรียมเอทานอล analytical grade ความเข้มข้น 99.8 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมความเข้มข้นเป็นร้อยละ 0.5, 1 และ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

ตารางภาคผนวกที่ ข2 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลมาตรฐาน

ความเข้มข้น (ร้อยละโดยปริมาตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.5	485.42114
1.0	1072.45068
5.0	6343.17193

4. การนับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemocytometer

Haemocytometer เป็นเครื่องมือซึ่งใช้สำหรับการนับเม็ดเลือด แต่ได้นำมาประยุกต์ใช้ในการนับจำนวนจุลินทรีย์และสปอร์ของเชื้อรา เครื่องมือนี้เป็นสไลด์มีช่องแบ่งไว้แน่นอนและมีขอบยกสูงจากบริเวณขีด เมื่อปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ขอบนี้จะรองรับกระจกปิดสไลด์ไว้ ทำให้เกิดระยะห่างระหว่างกระจกและสไลด์ในบริเวณที่มีขีดคิดเป็นความลึกได้ 0.1 หรือ 0.2 มิลลิเมตร แล้วแต่บริษัทผู้ผลิต ขีดแบ่งที่กำหนดไว้ประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2x0.2 ตารางมิลลิเมตร ในแต่ละช่องใหญ่นี้มีขีดแบ่งเป็นช่องเล็กอีก 16 ช่อง แต่ละช่องมีเนื้อที่ 0.05x0.05 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นของเหลวที่บรรจุอยู่ในแต่ละช่องเล็กจะมีปริมาตร (0.05x0.05 x0.1) ลูกบาศก์มิลลิเมตร เครื่องมือนี้จะมีกระจกปิดสไลด์ซึ่งมีขนาดและความหนาเฉพาะ ไม่ควรใช้กระจกปิดสไลด์อื่นแทน เนื่องจากน้ำหนักของกระจกจะมีผลทำให้ปริมาตรภายในช่องระหว่างสไลด์กับกระจกคลาดเคลื่อนไปได้ และเมื่อใช้กระจกที่หนาไปจะเป็นอุปสรรคต่อการโฟกัสกล้องห้ำมน้ำมันในการปรับโฟกัส

4.1 การตรวจนับจำนวนสปอร์

4.1.1 ล้างเครื่องมือให้สะอาด เช็ดให้แห้ง

4.1.2 ปิดทับบริเวณสี่เหลี่ยมซึ่งมีช่องแบ่งด้วยกระจกปิดสไลด์

4.1.3 ใช้ปิเปตแบบซึ่งใช้เฉพาะกับเครื่องมือนี้ โดยมีสายยางสวมปลายที่จะใช้ดูด ตัวอย่างอาหาร แต่ละปลายปิเปตด้านแหลมที่มีช่องระหว่างสไลด์และกระจกปิดสไลด์ เพื่อให้ตัวอย่างอาหารซึมเข้าไปในบริเวณช่อง ซึ่งกำหนดปริมาตรดังกล่าวไว้ข้างต้น

4.1.4 ตรวจนับโดยใช้ objective กำลังขยาย 40 เท่า

4.1.5 นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก ควรตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งสิ้นไม่น้อยกว่า 10 ช่อง คำนวณจำนวนสปอร์

ขนาดความลึกของ haemocytometer ที่ใช้ = 0.1 มิลลิเมตร

ขนาดพื้นที่ของแต่ละช่องเล็ก = 0.0025 ตารางมิลลิเมตร

เพราะฉะนั้นปริมาตรของแต่ละช่องเล็ก = 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

จำนวนสปอร์ต่อมิลลิเมตร =
$$\frac{\text{จำนวนสปอร์ที่นับได้} \times 10^3 \text{ สปอร์}}{\text{จำนวนช่องที่นับ} \times 0.00025}$$

ภาคผนวก ค
ตารางข้อมูลผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ค1 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *Aspergillus oryzae* 3014, 3205 และ 3605 ที่ความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 70 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/กรัมอาหารแห้ง)		
	<i>A.oryzae</i> 3014	<i>A.oryzae</i> 3205	<i>A.oryzae</i> 3605
24	22.25	1.37	47.49
48	45.62	26.22	55.30
72	50.00	29.62	40.73
96	39.43	24.29	17.33

ตารางภาคผนวกที่ ค2 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *Aspergillus niger* 3604, 3583 และ 3586 ที่ความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 70 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/กรัมอาหารแห้ง)		
	<i>A.niger</i> 3604	<i>A.niger</i> 3583	<i>A.niger</i> 3586
24	4.22	17.71	4.76
48	45.11	35.27	22.35
72	42.89	37.08	42.44
96	32.67	38.19	19.49

ตารางภาคผนวกที่ ค3 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *Aspergillus oryzae* 3605 ที่เวลา 24-120 ชั่วโมง ความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 70 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/กรัมอาหารแห้ง)
24	54.41
48	68.67
72	28.19
96	9.81

ตารางภาคผนวกที่ ค4 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *Aspergillus oryzae* 3605 ที่อัตราส่วนระหว่างกากมันสำปะหลังต่อกากตะกอนน้ำเสีย เท่ากับ 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 และ 0:5 ตามลำดับ เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 70 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

อัตราส่วน (กรัม/กรัม)	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/กรัมอาหารแห้ง)
5:0	32.03
4:1	40.33
3:2	60.67
2:3	35.94
1:4	15.11
0:5	3.53

ตารางภาคผนวกที่ ค5 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *Aspergillus oryzae* 3605 ที่ความชื้นอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 50, 60, 65, 70, 75, 80 และ 90 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ความชื้น (ร้อยละ)	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/กรัมอาหารแห้ง)
50	48.98
60	62.31
65	51.67
70	48.15
75	36.67
80	28.80
90	10.65

ตารางภาคผนวกที่ ๓6 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *Aspergillus oryzae* 3605 ที่ความชื้น
อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 60 ที่ pH ต่างๆ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

พีเอช	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/กรัมอาหารแห้ง)
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	59.85
3	38.37
4	35.63
5	24.87
6	42.07
7	61.11
8	49.85

ตารางภาคผนวกที่ ๓7 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *Aspergillus oryzae* 3605 ที่ความชื้น
อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 60 ที่ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 0.5-3.0 มิลลิลิตร
อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ปริมาณกล้าเชื้อ (มิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/กรัมอาหารแห้ง)
0.5	64.17
1.0	69.07
1.5	56.67
2.0	21.30
2.5	28.33
3.0	25.37

ตารางภาคผนวกที่ ค8 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *Aspergillus oryzae* 3605 ที่ความชื้นอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 60 ที่ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 1 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/กรัมอาหารแห้ง)
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	53.24
กลูโคส	58.89
แป้ง	48.33
เปปโตน	47.04
แอมโมเนียมซัลเฟต	43.98

ตารางภาคผนวกที่ ค9 ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอัตราส่วนระหว่างกากมันสำปะหลังต่อเอนไซม์เท่ากับ 5:133, 5:200 และ 5:266 (กรัมต่อหน่วยเอนไซม์อะไมเลส)

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/หน่วยเอนไซม์อะไมเลส)		
	อัตราส่วน 5: 133	อัตราส่วน 5:200	อัตราส่วน 5:266
24	1.5	1.5	1.0
48	2.1	1.9	1.2

ตารางภาคผนวกที่ ค10 ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ระยะเวลาการหมัก 3, 6, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนระหว่างกากมันสำปะหลังต่อเอนไซม์ เท่ากับ 5:133 (กรัมต่อหน่วยเอนไซม์อะไมเลส)

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)
3	3.96
6	4.15
24	4.63
48	5.18
72	3.63
96	1.95

ตารางภาคผนวกที่ ค11 ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง ที่ระยะเวลาการหมัก 3, 6, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ใช้อัตราส่วนระหว่างกากมันสำปะหลังต่อเอนไซม์เท่ากับ 5:133 (กรัมต่อหน่วยเอนไซม์อะไมเลส) โดยเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* และ *Zymomonas mobilis*

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>
0	5.00	5.00
3	1.92	4.15
6	1.25	3.87
24	0.73	0.93
48	0.69	0.76
72	0.68	0.76

ตารางภาคผนวกที่ ค12 ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงและการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อ *Kluyveromyces marxianus* ที่ระยะเวลาการหมัก 6, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอล (กรัม/ลิตร)
0	5.76	0.00
6	4.53	0.02
24	2.49	0.05
48	1.14	0.06
96	0.93	0.90