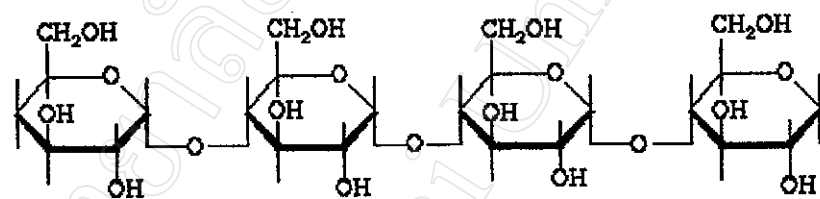


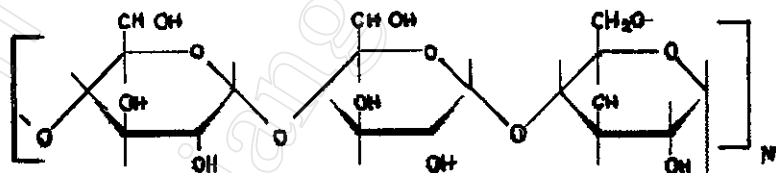
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

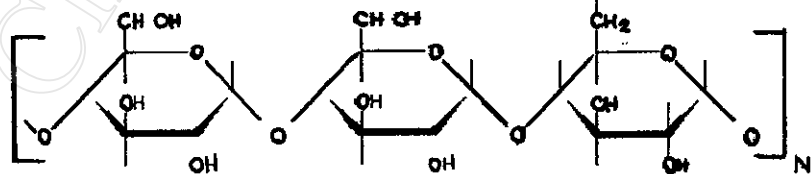
ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีผลผลิตทางการเกษตรสูงมาก ผลผลิตหลักของไทยคือข้าว ซึ่งมีอยู่ 2 ชนิดคือ ข้าวเจ้าและข้าวเหนียว โดยข้าวประกอบด้วยแป้งประมาณ 90% ซึ่งแป้งนี้มี ส่วนประกอบ 2 ส่วนคือ amylose เป็นโพลีเมอร์ของ D-glucose ที่ต่อกันเป็น linear chain และ amylopectin เป็นโพลีเมอร์ของ D-glucose ที่ต่อกันเป็น branch chain (ภาพ 1) โดยในข้าวเจ้ามี amylose ประมาณ 20-30% และมี amylopectin ประมาณ 70-80% ส่วนในข้าวเหนียวมี amylopectin สูงมากถึง 95% หรือมากกว่า และมี amylose น้อยมาก (อรรควุฒิ, 2528)



amylose

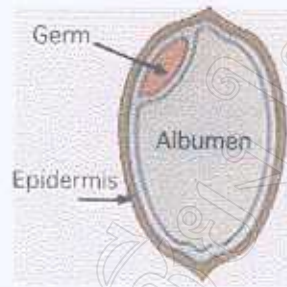


amylopectin



ภาพ 1 โครงสร้างของ amylose และ amylopectin (Johnson, 1979)

ข้าวกล้องคือข้าวที่เอาเปลือกออกโดยยังมีจมูกข้าวและเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวอยู่ (ภาพ 2) ซึ่งจมูกข้าวและเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวนี้นี้เป็นส่วนที่มีคุณค่าทางอาหารมาก ข้าวกล้องมีโปรตีนประมาณ 6-12% การขัดสีข้าวกล้องจนมีสีขาวจะทำให้โปรตีนสูญหายไปประมาณ 30% นอกจากนี้ในข้าวกล้องยังประกอบไปด้วยวิตามินและเกลือแร่หลายชนิด ดังตาราง 1



ภาพ 2 ลักษณะของข้าวกล้อง (Kubo et al, 2000)

ตาราง 1 คุณค่าทางอาหารระหว่างข้าวกล้องและข้าวขาวในข้าว 100 กรัม

สารอาหาร	หน่วย	ข้าวกล้อง	ข้าวขาว	ดีกว่า %
โปรตีน	กรัม	7.60	6.40	19.0
วิตามิน				
บี 1 (B1 Thiamine)	มิลลิกรัม	0.34	0.07	385
บี 2 (B2 Riboflavin)	มิลลิกรัม	0.05	0.03	66.0
ไนอะซิน (Niacin)	มิลลิกรัม	0.62	0.11	463
กรดแพนโทเธนิก (Pantothenic acid)	มิลลิกรัม	1.50	0.22	581
กรดโฟลิก (Folic acid)	มิลลิกรัม	20.0	3.60	455
เกลือแร่				
เหล็ก	มิลลิกรัม	1.60	0.80	100
แคลเซียม	มิลลิกรัม	32.0	24.0	33.0
แมกนีเซียม	มิลลิกรัม	52.0	14.0	271
แมงกานีส	มิลลิกรัม	1.50	0.90	67.0
สังกะสี	มิลลิกรัม	1.90	1.50	27.0
โคบอลต์	ไมโครกรัม	4.20	0.90	367
ทองแดง	ไมโครกรัม	360	230	57.0
ซีลีเนียม	ไมโครกรัม	38.8	31.8	22.0
ไอโอดีน	ไมโครกรัม	2.20	2.00	10.0

ที่มา : ชมรมถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตร, 2542

การหมักแอลกอฮอล์จากข้าวประกอบด้วยกระบวนการหลัก 2 ขั้นตอน คือ กระบวนการเปลี่ยนแป้งในข้าวให้เป็นน้ำตาลโดยอาศัยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส และกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์ (Graeme, 1998)

กระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล (อ้างโดย พิศารัตน์, 2540)

ในการสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีการทางเคมีโดยใช้กรดเจือจางและความร้อน กับวิธีการสลายแป้งโดยใช้เอนไซม์

1. การสลายแป้งโดยวิธีการทางเคมีที่ใช้กรดเจือจางและความร้อนไม่เป็นที่นิยม เพราะ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยดังกล่าวจะไม่สะอาดและไม่บริสุทธิ์ หรือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางโมเลกุล เช่น ในการสลายแป้งเป็นกลูโคส (เพื่อนำกลูโคสมาใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์) โดยความร้อนมักจะทำให้เกิดการรวมตัวใหม่ของกลูโคสเป็น dimer หรือ polymer ซึ่งทนความร้อนมากขึ้น ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวนี้จะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

2. การสลายแป้งโดยใช้เอนไซม์เป็นวิธีที่ดีกว่าและนิยมใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจาก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายโดยวิธีนี้มีความสะดวกและบริสุทธิ์และให้ผลผลิตที่สูงกว่ามาก นอกจากนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรงคือไม่ต้องการความร้อนและกรดต่ำมากเท่ากับการใช้วิธีการทางเคมี จึงเป็นวิธีที่สะอาดและมีสารเคมีตกค้างน้อยและไม่ทำให้เครื่องมือสุกเร็วเกินไป กระบวนการสลายแป้งโดยเอนไซม์นี้เกิดได้ 2 ขั้นตอนคือ liquefaction และ saccharification

2.1 Liquefaction เป็นกระบวนการลดความหนืดของแป้งโดยการปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6-7 เพื่อให้ α -amylase ชนิดแรกทำงาน โมเลกุลของแป้งจะถูกสลายให้มีขนาดสายสั้นลง (dextrinizing) ความหนืดของแป้งก็จะลดลงประมาณ 30-35% กระบวนการนี้เริ่มจากค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิของ dextrinizing เป็น 90-100°C เพื่อให้ thermostable α -amylase ทำงานได้ดี และอาจจะเติม Ca^{++} ลงไปเพื่อกระตุ้นการทำงานของ α -amylase ให้ทำงานได้ดียิ่งขึ้น ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาในถังปฏิกิริยา (เวลาขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ) จากนั้นค่อย ๆ ลดอุณหภูมิ เพื่อลดอัตราปฏิกิริยาแล้วทำการ saccharification ด้วยเอนไซม์อะไมเลสชนิดอื่นต่อไป

2.2 Saccharification เป็นกระบวนการเปลี่ยน โมเลกุลของแป้งที่มีขนาดสายสั้นให้เป็น น้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลมอลโตส หรือน้ำตาลที่มีโมเลกุลสูงกว่าเล็กน้อย เช่น มอลโตไตรโอส (maltotriose) เป็นต้น

เอนไซม์อะไมเลส

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์แป้งและไกลโคเจน (amylolytic enzyme) ที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางในทางการค้า เพราะเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในระดับอุตสาหกรรมหลายประเภท และเป็นที่ต้องการของตลาด อะไมเลสส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ถูกขับออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) สามารถพบได้ทั้งในพืช เมล็ดพืชที่กำลังงอก สัตว์ เนื้อเยื่อจากสัตว์ ในมนุษย์พบได้จากต่อมน้ำลายและตับอ่อน รวมทั้งพบได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดและหลายสายพันธุ์ (วิทยา, 2540) เช่นแบคทีเรีย *Achromobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Micrococcus* และแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซิส ได้แก่ *Micromonospora*, *Nocardia*, *Streptomyces* และเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus*, *Fusarium* และ *Rhizopus* เป็นต้น (กึ่งจันทร์, 2541)

ประเภทของเอนไซม์อะไมเลส (อ้างโดย พิศารัตน์, 2540)

เอนไซม์อะไมเลสมีหลายประเภทแบ่งแยกได้หลายแบบดังนี้

1. แบ่งตามชนิดของพันธะที่ถูกย่อยสลาย สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ endoamylase และ exoamylase

1.1 Endoamylase จะย่อยสลาย α -1,4-glucosidic linkage ภายในและภายนอกสายโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม ได้ผลิตภัณฑ์เป็น dextrin ที่เป็นลูกโซ่ของกลูโคสขนาดแตกต่างกัน เอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ α -amylase และ amylo 1,4-dextrinase

1.2 Exoamylase จะสลายโมเลกุลของแป้งจากปลาย non-reducing end การสลายอาจสลายทั้ง α -1,4-glucosidic linkage และ/หรือ α -1,6-glucosidic linkage เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ β -amylase และ γ -amylase หรือ glucoamylase

2. แบ่งโดยอาศัยปรากฏการณ์การเปลี่ยนแปลงของสับสเตรท แบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ dextrinizing amylase และ saccharifying amylase

2.1 Dextrinizing amylase สามารถลดความหนืดของแป้งได้อย่างรวดเร็ว ลดคุณสมบัติการเกิดสีน้ำตาลของ amylopectin ได้อย่างรวดเร็วจนกระทั่งสีจางหายไป และลดความข้นของไกลโคเจนได้อย่างรวดเร็ว

2.2 Saccharifying amylase สามารถลดความหนืดของแป้งและลดความข้นของไกลโคเจนได้อย่างช้า ๆ สามารถทำให้สีน้ำตาลของ amylopectin กับไอโอดีนเปลี่ยนแปลงเป็นสีม่วงอย่างช้า ๆ แต่ไม่จางหายไป

คุณสมบัติและกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

1. อัลฟา-อะไมเลส (α -amylase) มีชื่อตามระบบสากลว่า α -1,4 glucan glucanohydrolase, E.C.3.2.1.1 มีชื่อสามัญว่า diastase และชื่อที่เรียกกันตามการค้าว่า Termamyl เอนไซม์ α -amylase หมายถึงอะไมเลสที่สลายแป้งสตรกแล้วได้น้ำตาลรีดิซที่มี optical α -form และมีค่า mutarotation ในทางต่ำลงกว่าเดิม บางครั้งอาจหมายถึง dextrinizing amylase

1.1 การทำงานของ α -amylase จะย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกของแป้งและไกลโคเจนโดยมีรูปแบบการตัดพันธะอย่างอิสระที่ตำแหน่ง α -1,4-glucosidic linkage ทั้งจากด้านในและด้านนอก แต่จะไม่สามารถตัดพันธะแขนงที่ตำแหน่ง α -1,6-glucosidic linkage ได้

1.2 กิจกรรมของ α -amylase ต่อการย่อยแป้งสตรก

1.2.1 การย่อยอะไมโลส เอนไซม์สามารถสลาย α -1,4-glucosidic linkage ในอะไมโลสทั้งจากด้านในและด้านนอกของโมเลกุลได้อย่างรวดเร็ว การสลายพันธะจะเกิดขึ้นแบบสุ่มมีผลทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น dextrin มีขนาดเล็กกว่าเดิมและขนาดแตกต่างกันจึงเกิดสีกับสารละลายไอโอดีนเป็นสีม่วงแดง โดยที่เอนไซม์ยังคงสลายโมเลกุลของ dextrin ต่อไปได้อย่างช้า ๆ จน dextrin กลายเป็นโพลิแซคคาไรด์และ โอลิโกแซคคาไรด์ ที่มีขนาดเล็กมากจนไม่เกิดสีกับสารละลายไอโอดีน และในที่สุดจะได้ผลิตภัณฑ์ เช่น maltose และ maltotriose

1.2.2 การย่อยอะไมโลเพคติน เอนไซม์สามารถย่อยโมเลกุลที่ตำแหน่ง α -1,4-glucosidic linkage แต่ไม่สามารถย่อย α -1,6-glucosidic linkage ของอะไมโลเพคตินและไกลโคเจน การสลาย α -1,4-glucosidic linkage ของอะไมโลเพคตินจะเกิดขึ้นแบบสุ่ม แล้วได้ dextrin ที่มีแขนง ทำให้มีขนาดโมเลกุลปานกลาง เกิดสีกับสารละลายไอโอดีนเป็นสีม่วงและสีม่วงแดงตามลำดับ เอนไซม์จะยังคงความสามารถในการสลาย dextrin ต่อไปได้อย่างช้า ๆ จนในที่สุดกลายเป็น limit dextrin (dextrin ที่เหลือจากการย่อยโดยเอนไซม์อะไมเลสและไม่สามารถย่อยสลายโดยเอนไซม์เดิมได้อีกต่อไป)

1.2.3 การย่อยแป้งและแป้งเปียก โมเลกุลของแป้งซึ่งประกอบไปด้วยโมเลกุลของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินจับยึดกันเป็นผลึกอยู่ในส่วนที่เรียก crystalline regions และมีบางส่วนอยู่ในบริเวณที่เป็น noncrystalline regions เกิดเป็นโมเลกุลที่ซับซ้อนขนาดใหญ่มาก การสลายพันธะ glucosidic ภายในโมเลกุลแป้งเพียงจำนวนเล็กน้อยก็สามารถลดขนาดโมเลกุลลงได้หลายเท่า ดังนั้นความหนืดของแป้งเปียกจึงลดลงอย่างรวดเร็ว

2. เบต้า-อะไมเลส (β -amylase) มีชื่อตามระบบสากลว่า α -1,4 glucano- maltohydrolase exoamylase, E.C.3.2.1.2 เอนไซม์ β -amylase หมายถึงเอนไซม์อะไมเลสที่สลายแป้งสตรกแล้วได้

น้ำตาลรีดิวิซที่มี optical β -form และมีค่า mutarotation ในทางที่สูงขึ้น บางครั้งหมายถึง saccharifying enzyme

2.1 การทำงานของ β -amylase จะย่อยสลายพันธะที่ตำแหน่ง α -1,4-glucosidic linkage จากปลายด้าน non-reducing เข้าไปในสายโมเลกุลของแป้งครั้งละ 1 หน่วยมอลโตส แต่จะไม่สลายพันธะก่อนแขนงที่ตำแหน่ง α -1,6-glucosidic linkage ของอะไมโลเพคตินและไกลโคเจน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายเป็น maltose โดยมากมักจะพบ β -amylase อยู่ร่วมกับ α -amylase

2.2 กิจกรรมของ β -amylase ต่อการย่อยสลายแป้ง

2.2.1 การย่อยอะไมโลส เอนไซม์จะย่อยสลาย α -1,4-glucosidic linkage ที่สองจากปลายที่เป็น non-reducing ของโมเลกุลเท่านั้น ทำให้มีมอลโตสหลุดออกมาจากสายของอะไมโลส 1 โมเลกุล พร้อม ๆ กับการเปลี่ยน configuration ของอะตอมคาร์บอนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลจาก α -1,4-glucosidic configuration เป็น β -glucosidic configuration ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายจึงกลายเป็น β -maltose และปฏิกิริยาจะดำเนินต่อไปจนกระทั่งเอนไซม์ย่อยอะไมโลสหมดสาย ในระหว่างที่มีการย่อยสลายอะไมโลส คุณสมบัติในการเกิดสีน้ำเงินกับสารละลายไอโอดีนจะจางลงอย่างช้า ๆ จนในที่สุด เมื่อการย่อยสมบูรณ์จะไม่เกิดสีกับสารละลายไอโอดีนอีกต่อไป

2.2.2 การย่อยสลายอะไมโลเพคติน เอนไซม์จะย่อยสลายอะไมโลเพคติน ลักษณะเดียวกับการย่อยอะไมโลส คือย่อยสลาย α -1,4-glucosidic linkage จากปลายด้าน non-reducing อย่างเป็นขั้น และเกิดการเปลี่ยน configuration เมื่อการสลายพันธะดำเนินไปจนกระทั่งถึงบริเวณแขนงของโมเลกุล เอนไซม์จะหยุดปฏิกิริยาและไม่สลายอีกต่อไป ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือ β -maltose และ limit dextrin I ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่

2.2.3 การย่อยแป้งและแป้งเปียก การสลายขนาดโมเลกุลและลดความหนืดของแป้งและแป้งเปียกโดยเอนไซม์นี้เกิดขึ้นได้น้อย เนื่องจาก β -amylase ย่อยสลายพันธะ α -1,4-glucosidic linkage อย่างจำเพาะที่ปลายสายของโพลีเมอร์เท่านั้น

3. แกมมา-อะไมเลส (γ -amylase) มีชื่อตามระบบสากลว่า α -1,4-D-glucanglycohydrolase, E.C.3.2.1.3 มีชื่อเรียกกันทั่วไปว่า amyloglucosidase หรือ glucoamylase

3.1 การทำงานของ γ -amylase จะย่อยสลาย α -1,4, α -1,6 และ α -1,3 glycosidic linkage โดยการสลายพันธะ α -1,6 ได้ 3-5 % ของอัตราการสลายพันธะ α -1,4 และสลายพันธะ α -1,3 ได้ 5-10% ของอัตราการสลายพันธะ α -1,4 รูปแบบการตัดพันธะ จะเกิดขึ้นจากปลายด้าน non-reducing เช่นเดียวกับ β -amylase แต่จะตัดจากปลายเข้าไปครั้งละ 1 หน่วยกลูโคส และตัดพันธะ α -1,6 อย่างช้า ๆ ดังนั้นเมื่อ γ -amylase ย่อยแป้ง พบว่าสามารถเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์

จนในที่สุดผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่มี configuration ต่างจากเดิมคือ ให้ β -configuration หรือ β -D-glucose กับ limit dextrin ที่มีขนาดเล็ก

4. อะไมเลสชนิดอื่น

4.1 AMG-Amyloglucosidase NOVO เป็น α -1,4-glucosidase ที่ได้จากการเลี้ยง *Aspergillus niger* โดยวิธี submerged fermentation, AMG สลายได้ทั้ง α -1,4 และ α -1,6 glucosidic linkage ในโมเลกุลของแป้ง ในระหว่างการทำงานของ AMG จะมีกลูโคสเกิดขึ้นจากการย่อยครั้งละ 1 โมเลกุลอย่างต่อเนื่อง

4.2 Maltase α -1,4-glucosidase หรือ α -D-glucosidase glucohydrolase, E.C.3.2.1.20 สลาย α -1,4-glucosidic linkage ของมอลโตส ได้กลูโคส 2 โมเลกุล พบได้จากเนื้อเยื่อพืชหลายชนิดและพบร่วมกับอะไมเลสชนิดอื่นใน *Aspergillus niger* และ *Clostridium acetobutyricum*

4.3 α -1,6-glucosidase เอนไซม์นี้สามารถสลายพันธะ α -1,6-glucosidic linkage ที่ปลายโมเลกุลของ limit dextrin I แล้วได้ limit dextrin II ที่ยังคงมีโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งสามารถสลายต่อไปได้โดย β -amylase ได้อีก จนในที่สุดกลายเป็น limit dextrin III ที่ยังมีขนาดใหญ่ แต่เกิดสีน้ำตาลกับไอโอดีน

4.4 Debranching enzyme (isoamylase และ pullulanase) สลาย α -1,6-glucosidic linkage ของแป้งและไกลโคเจน เมื่อเอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยแป้งร่วมกับ β -amylase จะทำให้ β -amylase สลายโมเลกุลของแป้งได้เพิ่มขึ้น ให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น maltose มากกว่าการใช้ β -amylase ย่อยเพียงอย่างเดียว

4.5 Exo-maltopentaohydrolase เป็นอะไมเลสที่ได้จาก *Pseudomonas* sp. เมื่อย่อยแป้งแล้วเกิด maltopentaose ในช่วงแรก ๆ ของปฏิกิริยาสูงมาก

ประโยชน์ของเอนไซม์อะไมเลส (ปราณี, 2535)

1. อุตสาหกรรมทอผ้า ในการทอผ้าจะต้องนำด้ายดิบมาจึงให้ตั้งบนเครื่องทอ ซึ่งจะทำให้ด้ายดิบขาดได้ง่าย ดังนั้นก่อนจะนำมาทอต้องนำเส้นด้ายไปชุบน้ำแป้ง เพื่อให้เส้นด้ายมีความทนทานต่อแรงดึง หลังจากทอผ้าเป็นผืนแล้วจึงต้องเอาแป้งที่ตกค้างออก โดยใช้เอนไซม์อะไมเลสย่อย จากนั้นนำไปซักด้วยน้ำร้อนเพื่อทำลายเอนไซม์ วิธีการที่กล่าวมาใช้กับการทอผ้าจากฝ้าย ขนแกะ และแพรเทียม

2. อุตสาหกรรมทำขนมปัง แป้งที่ใช้ในการทำขนมปังจะเติมเอนไซม์อะไมเลสชนิด dextrinogenic enzyme ลงไป เพื่อย่อยโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลง แล้วเติมชนิด saccharogenic enzyme ลงไปเพื่อเปลี่ยนแป้งบางส่วนให้เป็นน้ำตาล

3. การทำน้ำผลไม้ให้ใส ปกติน้ำผลไม้คั้นจะมีความขุ่นเพราะมีปริมาณแป้งสูง จึงต้องใส่เอนไซม์ลงไป บ่มไว้นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 80-90°F หลังจากนั้นกรองน้ำตาลออก

4. การผลิตแอลกอฮอล์ และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ ใช้เป็นครั้งแรกในประเทศจีน โดยผลิตแอลกอฮอล์จากเชื้อราที่ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล

5. การผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมจากแป้ง ระยะแรกการผลิตกลูโคสและน้ำตาลอื่น ๆ จะใช้วิธีการย่อยแป้งด้วยกรด ทำให้ได้สารหลายชนิด และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสไม่ดีขึ้น ปัจจุบันการผลิตน้ำเชื่อมจากแป้งเป็นที่นิยมกันมาก โดยเฉพาะการผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมที่มีกลูโคส

การศึกษาเอนไซม์อะไมเลส

กฤติกานต์ (2523) ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง โดยทำการแยกเชื้อราจาก ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้า ลูกแป้งน้ำส้มสายชู ข้าวหมาก อุ น้ำแช่ข้าวโคจิ คินและแป้งในโรงงานผลิตแป้งต่าง ๆ ได้ทั้งหมด 854 ไอโซเลท คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยแป้ง 3 ชนิดคือ แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวเจ้า และแป้งมัน 10 ไอโซเลท เชื้อที่ดีที่สุดคือ *Aspergillus niger* V. tiegh ป.95 ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดจากการย่อยแป้งทั้ง 3 ชนิด สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสคือ ใช้อาหารที่มีส่วนผสมจาก ชั่งข้าวโพดป่น : แป้งถั่วเหลือง : แป้งมัน 5:3:2 ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 4 วัน

ณัฐดา (2525) ศึกษาการเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลโดยเชื้อราเพื่อใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ โดยคัดเลือกเชื้อราที่แยกจากโคจิและที่ได้รับจากสถาบันต่าง ๆ จำนวน 42 เชื้อ ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลสูงสุด 3 เชื้อคือ *Aspergillus oryzae* N1, *A. niger* H5 และ *Rhizopus delemar* ATCC 34612 สภาพที่เหมาะสมในอาหารมันบด 25% คือ เลี้ยงในอาหารที่มี pH เริ่มต้น 5.5, 5.0 และ 6.0 ตามลำดับ เวลา 48 ชั่วโมง ได้ค่า enzyme activity เท่ากับ 26.10, 23.69 และ 12.90 ยูนิต ปริมาณกลัยซีลที่ที่เหมาะสมเพื่อการหมักคือ 3 % และเมื่อนำมาหมักแอลกอฮอล์พบว่าน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วย *Aspergillus oryzae* N1 ให้แอลกอฮอล์สูงสุดคือ 9.81% ใน 72 ชั่วโมง

นันทนา (2533) ศึกษาการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซิสที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการสร้างเชื้อผสมที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งโลซินและเอนไซม์อะไมเลส โดยทำการแยกเชื้อจากดิน มูลสัตว์ และมันเส้น พบว่าเชื้อที่สร้างอะไมเลสในอาหารเหลวได้ดีที่สุดคือ S44 เอนไซม์จากเชื้อนี้มี pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ glucoamylase และ α -amylase ที่ 6.0 และ 5.0 ตามลำดับ และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 60 และ 65°C ตามลำดับ และเมื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อแอคติโนมัยซิสที่แยกได้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร MNNG ได้เชื้อรอดตาย 150 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้มี 106 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งเท่าเดิม และอีก 14 สายพันธุ์ย่อยแป้งได้น้อยกว่าเดิม เมื่อทดลองนำเชื้อแอคติโนมัยซิส S44 มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้สำหรับผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งโลซิน พบว่ามีการเจริญและสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ ส่วนการสร้างสารปฏิชีวนะเกิดได้สูงสุดเพียง 0.21 mg/ml

จิระศักดิ์ (2543) ศึกษาการคัดเลือกแอคติโนมัยซิสที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสและทนอุณหภูมิสูงโดยใช้ข้าวซ้อมมือ โดยทำการแยกแอคติโนมัยซิสจากดินทั้งหมด 30 ตัวอย่างได้ 31 ไอโซเลท พบว่าเป็นแอคติโนมัยซิสที่ทนอุณหภูมิสูงซึ่งเจริญที่ 20°C และ 45°C จำนวน 18 ไอโซเลท นำไปทดสอบความสามารถในการเกิดวงใสบนอาหารวุ้นแป้ง และทดสอบความสามารถในการย่อยข้าวซ้อมมือ พบว่าไอโซเลท SJ 24 มีความสามารถในการเกิดวงใสบนอาหารวุ้นแป้งได้ดีที่สุดคือ ให้ค่าดัชนีการเกิดวงใสเท่ากับ 2.7 และไอโซเลท SJ 21 มีความสามารถในการย่อยข้าวซ้อมมือได้ดีที่สุดคือ ให้เปอร์เซ็นต์การย่อยเท่ากับ 32% และให้ค่า amylase activity 6.65 U/ml และ specific activity 2.08 U/mg protein

Francis *et al.* (1991) ศึกษาความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงของเอนไซม์ α -amylase จากแบคทีเรีย *Bacillus caldovelox* โดยเลือกทำการทดสอบที่ pH 4.5 และ 8.0 เนื่องจากเป็น pH ที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดและรองลงมา อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบคือ 90°C พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์ โดยที่ pH 4.5 และ 8.0 ค่า กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือครึ่งหนึ่ง (half time) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 90°C นาน 0.75 นาที และ 7.0 นาที ตามลำดับ และเมื่อมีการเติม calcium 0.001 M ลงใน crude enzyme พบว่าระยะเวลาที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือครึ่งหนึ่งยาวนานออกไปเป็น 3.5 นาที และ 28.0 นาที ตามลำดับ และมากที่สุดเมื่อเติม calcium 0.001 M และ Acetamide 8 M ลงไป คือ เวลาที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือครึ่งหนึ่งนานออกไปเป็น 24.5 นาที และ 100.0 นาที ตามลำดับ

Wind *et al.* (1994) รายงานว่า *Bacillus stearothermophilus* สายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากโรงงานมันฝรั่ง เมื่อเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของ α -amylase จาก *B. stearothermophilus* สายพันธุ์อื่น ๆ พบว่า สายพันธุ์ใหม่นี้สามารถผลิต α -amylase ที่ทนอุณหภูมิได้สูง โดย half-time ของเอนไซม์ที่ได้คือ 5.1 ชั่วโมง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80°C และ 24 ชั่วโมงเมื่อบ่มที่ 90°C pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5-6.0 พบว่าที่ความเข้มข้นของแป้งต่ำ ๆ และที่อุณหภูมิที่ต่ำลง เชื่อจะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้น โดยเมื่อหมักในถังหมัก (batch fermenter) ที่อุณหภูมิ 65°C สามารถผลิตเอนไซม์ α -amylase ได้สูงสุดถึง 102 U/ml ซึ่งสูงกว่าเมื่อหมักใน Erlenmeyer flask ที่ 65°C ถึง 26 เท่า

Okolo *et al.* (1996) ศึกษาเอนไซม์อะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งดิบหรือ raw starch digesting amylase (RSDA) จาก *Thermoactinomyces thalophilus* F13 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ RSDA ได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารแป้งทั้งที่เป็นแป้งจากธัญพืช และแป้งจากพืชที่มีหัวใต้ดิน โดยน้ำตาลกลูโคส มอลโตส และกลีเซอรอล จะไปมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์ เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารแป้งจากข้าว (rice starch) จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดคือ 39 U/ml และเมื่อทดสอบที่ pH ต่าง ๆ กันพบว่า pH ที่เหมาะสมที่สุดคือ 5.0 และ 6.5

Ramadas *et al.* (1996) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ amyloglucosidase (AMG) หรือ glucoamylase จากเชื้อรา *Aspergillus niger* โดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกัน คือ solid-state fermentation (SSF) และ submerged fermentation (SmF) สำหรับการเลี้ยงแบบ SSF พบว่าเลี้ยงแบบ fed-batch จะให้ผลผลิต AMG ดีกว่าคือ 64 U/ml ในขณะที่ batch จะให้ผลผลิต AMG น้อยกว่าคือ 44 U/ml เช่นเดียวกับการเลี้ยงแบบ SmF พบว่าการเลี้ยงแบบ fed-batch จะให้ผลผลิต AMG ดีกว่าคือ 102 U/ml ในขณะที่ batch จะให้ผลผลิต AMG น้อยกว่าคือ 66 U/ml เท่านั้น เมื่อพิจารณาระยะเวลาในการหมักพบว่า SmF จะใช้เวลาสั้นกว่า SSF คือใช้เวลา 66 ชั่วโมง ในขณะที่ SSF ใช้เวลานานถึง 96 ชั่วโมง

Busch and Stutzenberger (1997) ศึกษากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของแอคติโนมัยซิสทนอุณหภูมิสูง *Thermomonospora fusca* แอคติโนมัยซิสทนอุณหภูมิสูงชนิดนี้ผลิตเอนไซม์ extracellular α -amylase แล้วให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายส่วนใหญ่เป็น maltotriose คือ 61%ของผลิตภัณฑ์สุดท้าย ทั้งหมด การเติมกลูโคสลงไปในขณะที่เซลล์กำลังเจริญบนแป้งนั้น ไม่ได้เป็นการกดให้การสร้างเอนไซม์น้อยลง เพราะแอคติโนมัยซิสนี้จะรับผลกระทบจาก maltotriose มากกว่า glucose

โดย pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อคือ 6.0 และ 65°C ตามลำดับ พลังงานของการเกิดกิจกรรมคือ 59 kJ/mol

Jong *et al.* (1999) แยก amylolytic bifidobacteria โดยใช้อาหาร BHI-starch ได้ 22 ไอโซเลท เปรียบเทียบ extracellular และ intracellular amylase พบว่า *Bifidobacterium adolescentis* Int57 และ *B. adolescentis* Z38 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารข้าว (rice medium) พบว่าพวก amylolytic bifidobacteria เจริญได้ดีกว่าพวก non-amylolytic bifidobacteria โดย *B. adolescentis* Int57 สามารถเจริญได้ดีที่สุดและให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด จึงเลือกนำมาใช้ในการศึกษาการหมักข้าว โดยพบว่าให้กรด 2.43 และ pH ลดลงเหลือ 4.4 เมื่อหมักเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง อัตราความเข้มข้นของกรดอะซิติกและกรดแลกติกค่อย ๆ ลดลงในระหว่างการหมัก ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีคิวิซ์ และกิจกรรมเอนไซม์ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นและสูงสุดที่ 14 mg maltose/ml และ 35 mU/ml ตามลำดับที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยน้ำตาลรีคิวิซ์ที่พบมากที่สุดคือ maltotriose

Elif *et al.* (2000) ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยเม็ดแป้งดิบ (raw starch granule) ของเอนไซม์ α -amylase และ β -amylase โดยได้ทำการศึกษาเอนไซม์ α -amylase จาก *Bacillus amyloliquefaciens* และ β -amylase จาก *Bacillus cereus* และ β -amylase จากถั่วเหลือง โดยใช้เม็ดแป้งดิบจากพืชชนิดต่าง ๆ มาใช้เป็นสับสเตรตดังนี้ มันฝรั่ง มันฝรั่งหวาน ข้าวสาลี ข้าว และข้าวโพด เมื่อศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดก็พบว่าเอนไซม์ amylase ทุกชนิดมีรูปแบบการย่อยที่แตกต่างกัน α -amylase จะมีประสิทธิภาพในการย่อยดีกว่า β -amylase ความสามารถในการย่อยจากน้ำตาลรีคิวิซ์ (มอลโตส) ที่ปลดปล่อยออกมา พบว่าเอนไซม์ α -amylase ให้น้ำตาลรีคิวิซ์สูงที่สุด รองลงมาคือเอนไซม์ β -amylase จาก *B. cereus* และ β -amylase จากถั่วเหลืองเป็นอันดับสุดท้าย ซึ่ง *B. cereus* สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพที่อุณหภูมิ 45°C ซึ่งดีกว่า β -amylase จากถั่วเหลืองถึง 60% และเอนไซม์ amylase ทุกชนิดที่ศึกษาสามารถใช้ข้าวเป็นสับสเตรตได้ดีที่สุด รองลงมาคือมันฝรั่ง และข้าวสาลีตามลำดับ

Stamford *et al.* (2001) รายงานการศึกษาการผลิตเอนไซม์ α -amylase จาก *Nocardia* sp. ซึ่งเป็นแอคติโนมัยซิสที่เป็นเอนโคไฟด์ของมันแกว (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) พบว่าจะได้เอนไซม์ปริมาณมากในช่วงปลายของ logarithmic phase คือที่เวลา 72 ชั่วโมง ที่ pH 8.6 แต่พบว่าการผลิตเอนไซม์สูงสุดที่ pH 5.0 และที่อุณหภูมิ 70°C เอนไซม์ที่ได้นี้มีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูง

โดยดูจากที่ 70°C มีกิจกรรมเอนไซม์ 100% และเมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ยังคงอยู่ 50% extracellular enzyme ที่ผลิตจาก *Nocardiopsis* sp. นี้ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนบางส่วนด้วย ammonium sulphate ที่ 60% saturation ได้ 1,130 U/mg protein

Belma and Semra (2001) ศึกษาการถูกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase ขณะที่เกิดการย่อยแป้งจากข้าวสาลี โดยเอนไซม์ α -amylase ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้คือ Gensize 4A ซึ่งผลิตจาก *Bacillus subtilis* เปรียบเทียบระดับการย่อย (%) และกิจกรรมเอนไซม์ α -amylase ที่สภาวะต่าง ๆ กัน ได้แก่ pH อุณหภูมิ ความหนืดของแป้ง ปริมาณเอนไซม์ที่เติมลงไปในการหมัก อัตราเร็วในการกวนของถังหมัก และระยะเวลาในการผลิต พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 60°C อัตราเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที และที่ pH 6.5 ความเข้มข้นของแป้งที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ 10 g/l พบว่าการย่อยจะมีผลแปรตามปริมาณเอนไซม์ที่เติมลงไปโดยจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งมากที่สุดที่ปริมาณเอนไซม์ 2.5 ml/l และคงที่ไปจนถึง 10 ml/l และค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งถึง 40 ml/l จะไปยับยั้งการทำงาน

การหมักแอลกอฮอล์ (Alcohol fermentation)

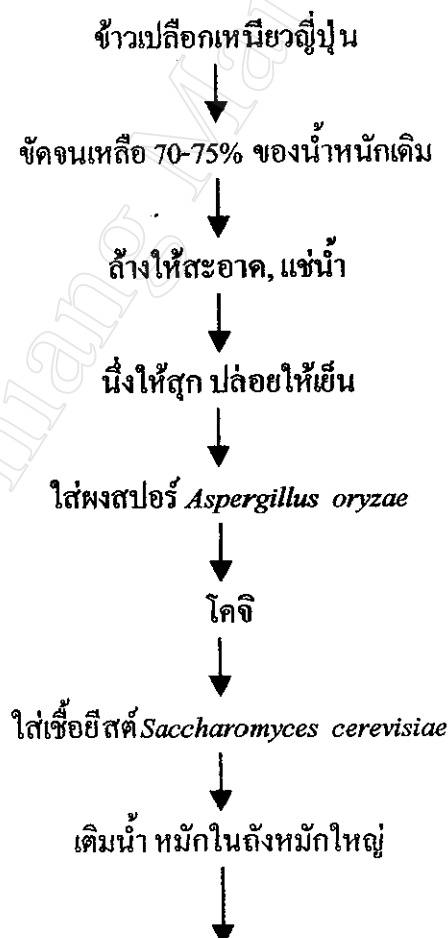
เครื่องดื่มหมักประเภทแอลกอฮอล์โดยเฉพาะ เบียร์ ไวน์ และไซเดอร์นั้นเป็นที่รู้จักกันมานานตั้งแต่สมัยโบราณ เช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นเมืองชนิดต่าง ๆ ผลิตภัณฑ์หมักเหล่านี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า ผลิตภัณฑ์หมักผสม (mixed product) ซึ่งหมายถึงผลิตภัณฑ์ที่มีสารประกอบหลาย ๆ ชนิดผสมอยู่ด้วยกัน โดยเกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์และการเปลี่ยนแปลงทางเคมี (chemical transformation) กระบวนการเมตาโบลิซึมของจุลินทรีย์เหล่านี้เป็น กระบวนการย่อยสลาย (catabolic process) คือจุลินทรีย์จะใช้สารประกอบอินทรีย์ในอาหารเป็นพลังงานเพื่อการเจริญ จุลินทรีย์บางชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้มากชนิด บางชนิดก็ย่อยสลายเฉพาะอย่าง ทำให้เกิดกลิ่น รส และเนื้อสัมผัสเฉพาะอย่างไป (อรพิน, 2526)

ไวน์เป็นเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งเช่นเดียวกับสุรา เหล้า หรือวิสกี้ แต่แตกต่างจากเครื่องดื่มเหล่านี้เพราะไวน์ไม่มีการต้มกลั่น ไวน์พื้นบ้านของไทยทำจากข้าวเหนียวหนึ่งคอกกับลูกแป้งสุราหรือลูกแป้งเหล้าที่บดละเอียด เรียกไวน์ดังกล่าวว่าสาโท เหล้าโท น้ำข้าว น้ำแดง กระแช่ หากมีแอลกอฮอล์เป็นส่วนผสมของวัตถุดิบด้วยจะเรียกว่า อุ อุแตกต่างจากสาโทหรือน้ำข้าว เพราะหมักโดยอัตราส่วนของข้าวเหนียวหนึ่งคอกผสมลูกแป้งและแอลกอฮอล์ในไหหรือภาชนะดินเผา ปิดฝาตอนข้างแน่น หมักไว้ 1-3 สัปดาห์ ก่อนดื่มจะเปิดฝาแล้วเติมน้ำสะอาดลงไปช้า ๆ ในไห ดื่มโดยใช้หลอดกลวงทำด้วยไม้ซางหรือลำไผ่เล็ก ๆ ดูน้้ำอยู่ที่ก้นไห เมื่อหมดหรือจวนแล้วจะเติมน้ำ

สะอาดลงในไหอีก 1-2 ครั้งหรือจนหมดกลิ่นรสของอุ ไวน์พื้นบ้านอีกชนิดหนึ่งคือ น้ำตาลเมา ทำจากการหมักน้ำตาลสดของต้นตาลหรือต้นมะพร้าว การหมักเป็นไปโดยเชื้อยีสต์จากธรรมชาติ หรือโดยการเติมเชื้อจากกระบอกไม้ไผ่ที่เกิดการหมักเป็นน้ำตาลเมา การนำเอาสาโท น้ำขาว หรือ กระแะไปกลั่นเป็นสุราขาวหรือเหล้าขาวที่มีแอลกอฮอล์สูงก็เป็นที่ยอดนิยมเช่นกัน ปัจจุบันการผลิต และการดื่มสุราพื้นบ้านของไทยลดน้อยลงมาก ชาวชนส่วนใหญ่ไม่รู้จัก ไม่เคยดื่ม อาจทำให้ ภูมิปัญญาชาวบ้านในการผลิตสุราพื้นบ้านของไทยสูญหายไปในอนาคต (ประดิษฐ์, 2543)

สาเกเป็นเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ของประเทศญี่ปุ่น เทียบได้กับสาโท หรือน้ำขาว และอุของไทเรา วิธีการที่สำคัญในการหมักสาเกได้แก่ การใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* เติบยให้ เจริญบนข้าวหนึ่ง เรียกว่า โคจิ เชื้อราจะสร้างเอนไซม์ในการย่อยแป้งและโปรตีนของข้าวเพื่อให้ยีสต์ หมักเป็นแอลกอฮอล์ในขั้นต่อไป เมื่อแป้งถูกย่อยออกมาเป็นน้ำตาล ยีสต์จะใช้น้ำตาลหมักเป็น แอลกอฮอล์ไปเรื่อย ๆ กระบวนการนี้เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องอย่างช้า ๆ ในถังหมักที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ ได้แอลกอฮอล์สูงถึง 20 ดีกรี ในขั้นสุดท้ายของการหมัก

กระบวนการหมักแบ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญต่าง ๆ ดังแผนภูมิ 1



หมักราว 3 สัปดาห์



กรอง



สาเกสด



พาสเจอร์ไรส์



ปั๊ม ปรงรส



ทำให้เจือจาง 15-17 ดีกรี



พาสเจอร์ไรส์



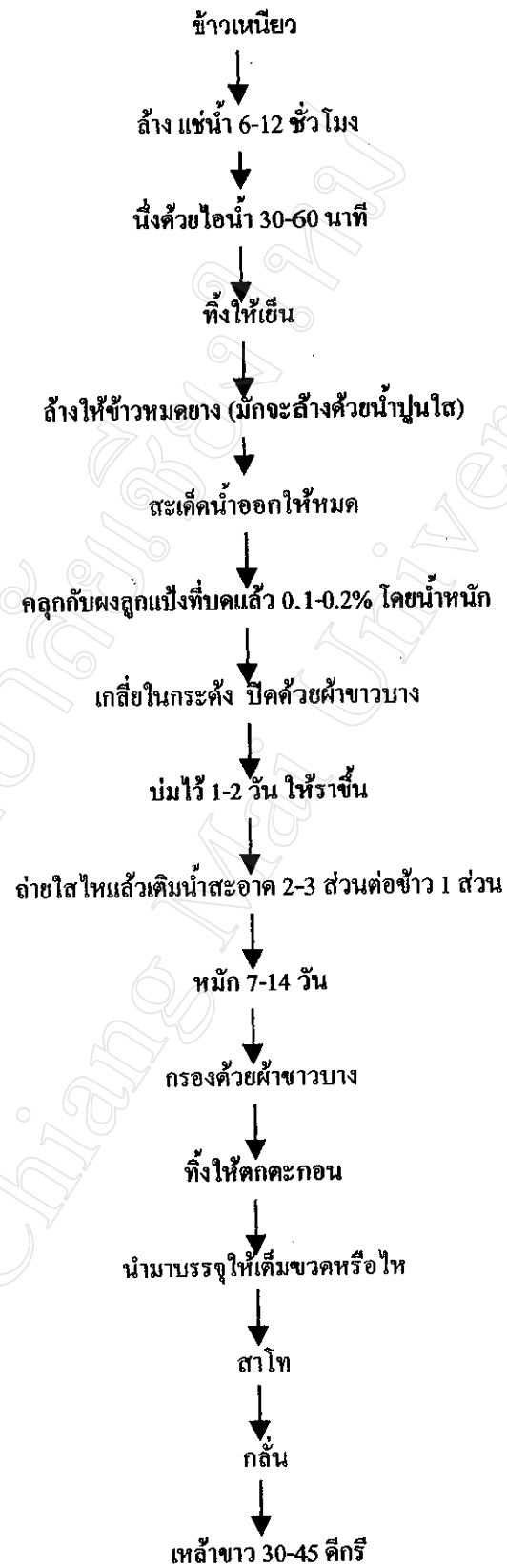
สาเก

แผนภูมิ 1 ขั้นตอนการผลิตสาเก (นภา, 2534)

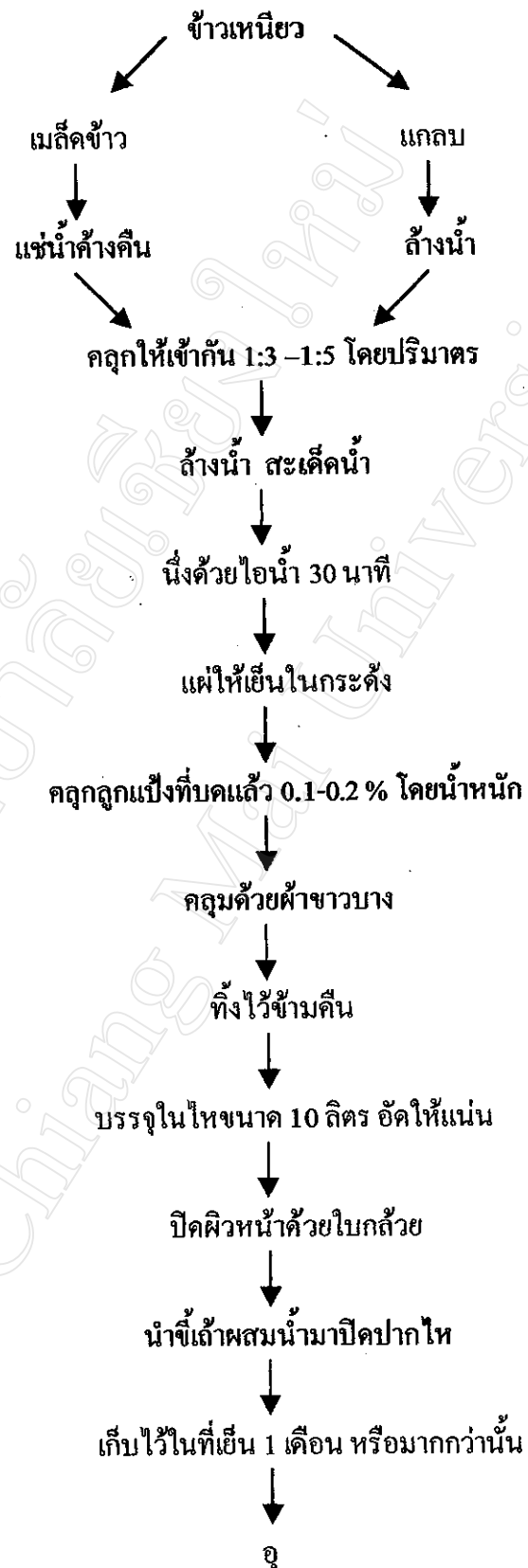
สาโท และ อุ เป็นเครื่องดื่มพื้นบ้านที่หมักมาจากข้าวเหนียว สาโท เป็นชื่อที่เรียกกันทางภาคอีสาน ภาคกลางเรียกน้ำข้าว ถ้าทำจากข้าวเหนียวแดง เรียกว่า น้ำแดง บางท้องถิ่นเรียกว่า กระแช่ แต่กระแช่ในบางท้องถิ่นหมายถึงน้ำตาลเมา ซึ่งทำมาจากน้ำตาลสดของต้นตาลหรือมะพร้าว สาโทและเหล้าขาวมีวิธีทำดังแผนภูมิ 2 (จรูญ, 2524)

จากวิธีการทำสาโทจะเห็นว่า การทำสาโทหรือน้ำข้าว มีการเติมน้ำลงไปหมักในช่วงการหมักเมล็ดข้าวจะลอยขึ้นมาที่ผิวหน้า ใช้เวลาหมักราว 2 สัปดาห์ก็กรองเอามาเค็ม น้ำที่ได้จึงมีสีขาวขุ่น เรียกว่าน้ำข้าว ถ้าทำจากข้าวเหนียวแดง สีแดงจะถูกสกัดออกมาในช่วงการหมักได้น้ำแดง เนื่องจากกรองด้วยผ้าขาวบางธรรมดา จึงไม่ใส การที่ไม่ได้พาสเจอร์ไรส์จึงเก็บไม่ได้นาน ปกติจะต้องรีบดื่มเพราะถ้าทิ้งไว้นานจะเปรี้ยว เนื่องจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดน้ำส้มสายชูเจริญขึ้นมา ทำให้เปรี้ยว ไม่อร่อย ประกติถ้าจะเก็บไว้ดื่มวันต่อ ๆ ไปจะมีการเติมน้ำตาลไปเรื่อย ๆ

สาโท เมื่อนำไปกลั่นเป็นสุราเรียกว่า เหล้าขาว โดยทั่วไปจะมีแอลกอฮอล์ 30-45 ดีกรี การกลั่นให้เป็นเหล้าจะเก็บไว้ได้นานขึ้น



แผนภูมิ 2 ขั้นตอนการผลิตสาโทและเหล้าขาว (จรูญ, 2524)



แผนภูมิ 3 ขั้นตอนการผลิตอุ (จรรยา, 2524)

สำหรับวิธีการทำอุ (แผนภูมิ 3) เมื่อเปรียบเทียบกับแล้วแตกต่างกันอยู่มาก อุหมักข้าวผสมกับแกลบในไห ไม่มีการเติมน้ำระหว่างการหมัก ไหเก็บในที่เย็นหรือฝังไว้ใต้ดินหลายเดือน เมื่อได้ที่ต้องการคั้นก็เขย่าเอาจี๊เก่าที่ปิดปากไหและเอาใบกล้วยออก เติมน้ำฝนลงไปประมาณ 2 ลิตร ทิ้งไว้สักครู่ น้ำจะไหลลงไปก้นไห พร้อมกับชะเอาแอลกอฮอล์ที่อยู่ในแกลบลงไปด้วย เมื่อจะดื่มใช้กิ่งไม้ไผ่ขนาดเท่านิ้วชี้เป็นหลอดดูด เมื่อคั้นน้ำอุหมดแล้วก็เติมน้ำฝนลงไปใหม่ รอดักครู่ แอลกอฮอล์ก็จะขึ้นออกมาจากแกลบอีก

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ น้ำอุที่มีอยู่เล็กน้อยจะมีแอลกอฮอล์ราว 15 ดีกรี ในการเติมน้ำลงไปครั้งแรกจะมีแอลกอฮอล์ประมาณ 8 ดีกรี และครั้งที่ 2 จะเหลือประมาณ 5-6 ดีกรี น้ำอุจะมีสีฟางข้าว เนื่องจากสีของแกลบ อุจะมีกลิ่นหอม รสนุ่ม ไม่บาดคอ มีรสฝาดเล็กน้อยจากสารที่สกัดจากแกลบ สีฟางข้าวค่อนข้างใส เพราะแกลบช่วยกรองน้ำให้ใส ไม่ให้เมล็ดข้าวปนออกมา เนื่องจากปริมาณข้าวมีน้อยมากเมื่อเทียบกับแกลบ

ในการผลิตเอธิลแอลกอฮอล์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ผลิตสี น้ำมันชักเงาและแลคเกอร์ เครื่องสำอาง พลาสติก ฯลฯ นั้น วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักของยีสต์ได้แก่ คาร์โบไฮเดรตต่าง ๆ เช่น แป้งข้าวโพดหรือคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลซับซ้อนมาก ๆ จะต้องนำวัตถุดิบเหล่านี้ไปเปลี่ยนแปลงให้เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวด้วยเอนไซม์หรือความร้อน อย่างไรก็ตาม วัตถุดิบที่นิยมใช้กันมากในการผลิตเอธิลแอลกอฮอล์ของประเทศไทยในปัจจุบันคือกากน้ำตาล ซึ่งจะต้องนำกากน้ำตาลมาเจือจางให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลประมาณ 14-18 % pH เริ่มต้น 4-5.5 และอุณหภูมิของการหมักที่ 30°C นอกจากนี้จะต้องเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในกากน้ำตาลประมาณ 0.5-3.0 ปอนด์ต่อกากน้ำตาล 1,000 แกลลอน เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญของยีสต์ ส่วนช่วงเวลาที่ใช้ในการหมักนาน 40-56 ชั่วโมง จะได้เปอร์เซ็นต์เอธิลแอลกอฮอล์สูงสุดประมาณ 8-16 % นำไปกลั่นเพื่อให้ได้เอธิลแอลกอฮอล์ 95 % ต่อไป สำหรับปริมาณเอธิลแอลกอฮอล์ที่ได้จากการใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญหลายประการ เช่น สายพันธุ์ของยีสต์ อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักและความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ใช้ (บัญญัติ, 2534) นอกจากนี้ปัจจุบันยังมีการศึกษาการผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง โดยวัตถุดิบที่นิยมนำมาใช้และมีการศึกษากันอยู่มากคือ วัตถุดิบทางการเกษตรจำพวกที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ (Helena and Ralph, 2001)

นอกจากจะมีการศึกษาถึงแหล่งของวัตถุดิบแล้ว ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักก็มีความสำคัญ มีผู้ให้ความสนใจจุลินทรีย์ในกลุ่มทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant microorganism) เพื่อหาทางลดค่าใช้จ่ายในการทำระบบหล่อเย็น ซึ่งจำเป็นต้องใช้เพื่อควบคุมอุณหภูมิของถังหมักพบว่าสามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะเมื่อกระบวนการ saccharification และ

alcohol fermentation เกิดขึ้นพร้อมกัน คือเมื่อกระบวนการหมักเริ่มขึ้นอุณหภูมิในถังหมักจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้ง ดังนั้นลักษณะที่สำคัญของจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์คือ ความสามารถในการผลิตและการทนอุณหภูมิสูง (Banat *et al.*, 1998)

การศึกษาเกี่ยวกับการหมักแอลกอฮอล์

Labeille *et al.* (1997) ศึกษากระบวนการ saccharification และผลิต ethanol จากแป้งสาลี โดยการเตรียมเอนไซม์ glucoamylase 2 ชนิด รายงานว่ากระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นกลูโคส ไซรัปเป็นขั้นตอนสำคัญในอุตสาหกรรม การผลิต bioethanol การพัฒนาปรับปรุงในขั้นตอนนี้จะเป็นการลดค่าใช้จ่ายได้มาก จึงได้มีการพัฒนาการเตรียมเอนไซม์ glucoamylase จาก *Aspergillus niger* (AAI) ซึ่งผลิตโดยห้องปฏิบัติการนี้ เพื่อใช้ในกระบวนการ saccharification ของแป้งสาลี เปรียบเทียบกับอีกชนิดหนึ่งคือ AMG 300L ซึ่งใช้กันอยู่ในโรงงานอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังพบว่าผลิตเอนไซม์ protease ย่อยโปรตีนจากข้าวสาลี ดังนั้นขณะเกิดกระบวนการ saccharification ก็จะได้ในโตรเจนไว้ให้ยีสต์ใช้ในการเจริญในการหมักขั้นต่อไปอีกด้วย

Kiran *et al.* (1998) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากการหมักในสภาพของแข็งโดยใช้เชื้อยีสต์ทนอุณหภูมิสูง การผลิตเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงโดยการหมักในสภาพของแข็งหรือ solid-state fermentation (SSF) จากข้าวฟ่างหวานและมันฝรั่งหวาน พบว่าการหมักโดยใช้ร่วมระหว่างยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* VS3 ซึ่งเป็นยีสต์ทนอุณหภูมิสูง และเชื้อ *Bacillus* sp.(VB9) ซึ่งผลิตเอนไซม์อะไมเลส จะให้เอทานอลที่สูงกว่าการหมักโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* VS3 เพียงอย่างเดียว โดยปริมาณเอทานอลที่มากที่สุด (ตรวจสอบโดยใช้ gas chromatography) ได้เมื่อหมักนาน 72 ชั่วโมง ได้เอทานอล 5 g/100 g substrate และ 3.5 g/100 g substrate ที่ 37°C และที่ 42°C ตามลำดับ

Sree *et al.* (1999) ศึกษาการผลิตแอลกอฮอล์โดยการหมักในสภาพของแข็งจากแป้งสาลี ข้าวฟ่าง และมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ทนอุณหภูมิสูง รายงานว่าการผลิตแอลกอฮอล์โดยการหมักในสภาพของแข็งนี้สามารถใช้ได้กับแป้งสาลี ข้าวฟ่าง และมันฝรั่งหลายชนิด เช่น ข้าวฟ่างหวาน มันฝรั่งหวาน แป้งสาลี แป้งข้าวเจ้า soluble starch และแป้งมันฝรั่ง โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* VS₃ โดยให้เกิดกระบวนการ saccharification และ fermentation ไปพร้อม ๆ กัน แอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ตรวจเช็คโดย gas chromatography หลังจากหมักนาน 96 ชั่วโมง

ที่อุณหภูมิ 37°C และ 42°C พบว่าผลิตเอธานอลได้มากที่สุดจากการใช้แป้งข้าวเจ้าและข้าวฟ่างหวานเป็นสับสเตรท โดยได้เอธานอล 10 g และ 3.5 g/100 g substrate เมื่อใช้แป้งข้าวเจ้า และ 8.2 g และ 7.5 g/100 g substrate เมื่อใช้ข้าวฟ่างหวาน ที่อุณหภูมิ 37°C และ 42°C ตามลำดับ

Suresh *et al.* (1998) ศึกษาการนำเอมัลลิกข้าวและข้าวฟ่างที่เสียหาย(แตกหัก จั่นรา ขนาดไม่ได้มาตรฐาน มีความชื้นมาก และมีสีที่ผิดปกติ) มาใช้ประโยชน์โดยการนำมาผลิตเอธานอลด้วยวิธีการหมักที่ให้กระบวนการ saccharification และ fermentation เกิดขึ้นไปพร้อม ๆ กัน โดยการทดลองนี้ใช้ *Aspergillus niger* (NCIM 1248) และ *Saccharomyces cerevisiae* VSJ1 พบว่าสามารถผลิตเอธานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างที่เสียหายได้มากกว่าข้าวที่เสียหายคือ ได้ผลิตเอธานอลได้ 2.90% ในขณะที่จากข้าวสามารถผลิตได้ 2.09% (โดยปริมาตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม และพบว่าเมล็ดข้าวและข้าวฟ่างที่เสียหายเหล่านี้สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อหมักในสภาวะของแข็ง (solid-state fermentation)

Verma *et al.* (1999) ศึกษาการเปลี่ยนแป้งให้เป็นเอธานอลในขั้นตอนเดียวโดยใช้เชื้อร่วมระหว่าง amylolytic yeasts และ *Saccharomyces cerevisiae* 21 โดยเชื้อ amylolytic yeasts ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ *Saccharomyces diastaticus* และ *Endomycopsis capsularis* พบว่าเมื่อหมักขั้นตอนเดียวโดยใช้เชื้อร่วมระหว่าง *Sacch. diastaticus* และ *Sacch. cerevisiae* 21 จะได้เอธานอล 24.8 g/l ซึ่งสูงกว่าเมื่อใช้ *Sacch. diastaticus* เพียงตัวเดียวถึง 48 % (16.8 g/l) และการหมักเอธานอลจะมี ประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของแป้ง 60 g/l ส่วนเมื่อหมักขั้นตอนเดียวโดยใช้เชื้อร่วมระหว่าง *E. capsularis* และ *Sacch. cerevisiae* 21 ให้เอธานอล 16.0 g/l ซึ่งก็สูงกว่าการใช้ *E. capsularis* เพียงชนิดเดียว การหมักแบบ batch จะให้เอธานอลสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง อุณหภูมิในการหมัก 30°C โดยใช้แป้ง 60 g/l

Krishnan *et al.* (2000) ศึกษาการผลิตเอธานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิงจากแป้งข้าวโพดโดยใช้ถึงหมักแบบ fluidized-bed bioreactors (FBRs) โดยใช้เอนไซม์ glucoamylase ที่จับกับ porous diatomaceous earth ในขั้นตอนของการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลใน packed-bed reactor และใช้ยีสต์ *Zymomonas mobilis* ที่จับกับ k-carageenan beads ในถึงหมักแบบ FBRs สามารถผลิตเอธานอลได้สูงถึง 24 g/l ในระดับของห้องปฏิบัติการและยังไม่ได้หาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับในโรงงานขนาดใหญ่ที่มีการผลิตประมาณ 15 ล้านแกลลอนต่อปี หากพัฒนาให้มีการใช้เทคโนโลยี

การหมักแบบ FBR (continuous fluidized-bed bioreactor system) จะสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ถึง 1.1-1.3 cents/gal

Thierry and Jean-Marie (2000) ศึกษาการผลิตแอลกอฮอล์จากแป้งสาลีคิบโดยใช้เอนไซม์ amyloglucosidase และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าเมื่อทำให้เกิดกระบวนการ saccharification และ fermentation ไปพร้อม ๆ กัน จะให้ผลดีกว่าคือ เมื่อหมักทีละขั้นตอนคือ ให้เอนไซม์ amyloglucosidase 270 AGU/kg starch ไป 6 ชั่วโมงแล้วจึงหมักด้วยยีสต์ จะให้แอลกอฮอล์สูงสุดที่ 60 ชั่วโมง แต่เมื่อทำให้เกิดกระบวนการ saccharification และ fermentation ไปพร้อม ๆ กัน จะใช้เวลาเพียง 31 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ amyloglucosidase เป็น 540 AGU/kg starch จะลดเวลาลงเหลือ 21 ชั่วโมง โดยให้เอทานอล 67 g/l