



รายงานการวิจัย  
เรื่อง  
การผลิตเอทานอลโดยวิธีการตรึงเชลล์ยีสต์  
(Ethanol Production by Yeast Immobilization)

ปนัดดา จันทร์เนย  
กลิ่นแก้ว ดาวพะวัน

พ.ศ. 2549

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

## บทคัดย่อ

ศึกษาการหมัก醪ทานอลโดยวิธีการตีบีชเซลล์สต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ในโซเดียมอัลจิเนต กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ถูกใช้ในการติดตามการยึดติดระหว่าง เชลล์สต์และโซเดียมอัลจิเนต เปรียบเทียบปริมาณ醪ทานอลที่ได้จากการหมักแบบตีบีชเซลล์ (หมักแบบคงที่และต่อเนื่อง) และหมักแบบใช้เชลล์อิสระ พบว่าการหมักแบบใช้เชลล์อิสระมีปริมาณ醪ทานอลสูงสุดเท่ากับ  $4.27\text{--}4.36\text{ \%v/v}$  ที่ 16-20 วัน ส่วนการหมักแบบตีบีชเซลล์ทั้งชนิดคงที่และต่อเนื่องมีปริมาณ醪ทานอลสูงสุดเท่ากับ  $3.23\text{--}3.97\text{ \%v/v}$  ที่ 20-24 วัน และ  $4.18\text{--}4.36\text{ \%v/v}$  ที่ 30-32 วัน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ醪ทานอลที่ผลิตได้จากการหมักรอบที่ 1 และ 2 มีค่าไกล์เคียงกันเท่ากับ  $3.87\text{--}3.88\text{ \%v/v}$  ที่ 22-26 วัน และ  $4.32\text{--}4.45\text{ \%v/v}$  ที่ 20-24 วัน ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถนำเชลล์ตีบีชมาประยุกต์ใช้ในการหมักรอบต่อไปได้ จากการผลการวิจัย การหมักแบบตีบีชเซลล์ควรได้รับการปรับปรุงเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ醪ทานอลในปริมาณที่มาก ขึ้น เช่น เลือกสายพันธุ์สต์ที่มีความบริสุทธิ์สูง พัฒนาระบบถังหมัก และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่ใช้ตีบีชเซลล์

## Abstract

The study of ethanol fermentation by immobilized yeast cell (*Saccharomyces cerevisiae*) in sodium alginate was done. Scanning -Electron Microscope (SEM) was used to determine the attachment between yeast cell and sodium alginate. Ethanol quantity of immobilized yeast cell fermentation (batch and continuous type) and free cell fermentation were compares. The result showed that, ethanol production from each type was very low. The maximum ethanol quantity in batch fermentation with free cell was found in the range of 4.27-4.45% v/v at 16-20 days. The ethanol quantity of immobilized yeast cell in batch and continuous type was found in the range of 3.23–3.97 %v/v at 20-24 days and 4.18-4.36% v/v at 30-32 days, respectively. Moreover, the ethanol quantity which were produced from 1 and 2 cycle of fermentation were almost. The same as the ethanol quantity of 3.87-3.88 % v/v at 22- 26 days and 4.32-4.45% v/v at 20- 24 days in 1 and 2 cycle, respectively. Immobilized yeast cell could be used in further cycle of fermentation process. This result suggested that , immobilized yeast cell could be improved for ethanol fementation , such as selecting the purified yeast cell, developing fermentor and varying concentration of sodium alginate.

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อุ่นวรรณ วิจารณกุล ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา  
มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ป้อมา เอี่ยมสะอาด และผู้ช่วยศาสตราจารย์ -  
ดร. พิทักษ์ อุ่นเมี ที่เป็นกรรมการตรวจสอบแก้ไขหางานวิจัยนี้มีความสมบูรณ์ถูกต้องมากยิ่งขึ้น  
ตลอดจนสนับสนุนทุนวิจัยให้กับผู้ที่เขียนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีวิทยาประยุกต์  
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ทุกท่านที่ได้  
ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณ น.ส. กลิ่นแก้ว ดาวพะวัน นักศึกษาโปรแกรมวิชาเคมี ปีที่ 4 คณะวิทยาศาสตร์และ-  
เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ช่วยทำงานวิจัยและรูปเล่มงานวิจัยนี้จนสำเร็จ

ปันคดา จันทร์เนย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัจจุบัน	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
<b>บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	<b>5</b>
2.1 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	5
2.1.1 เอกสารออล	5
2.1.2 ยีสต์	6
2.1.3 การหมักเพื่อผลิตเอกสารออล	12
2.1.4 ถังหมัก	13
2.1.5 การทำปลอดเชื้อ	15
2.1.6 การตีรังเชลล์	15
2.1.7 กล้องจุลทรรศน์	23
2.1.8 การวิเคราะห์โดยเทคนิคแก๊สโครมานาโนกราฟี	25
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	37
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย</b>	<b>39</b>
3.1 การศึกษาอัตราการเจริญของยีสต์	39
3.2 การตีรังเชลล์ยีสต์	39
3.3 การหมักแบบคงที่	40
3.3.1 การหมักแบบคงที่โดยใช้เชลล์อิสระ	40
3.3.2 การหมักแบบคงที่โดยใช้เชลล์ตีรัง	40
3.4 การหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เชลล์ตีรัง	40

	หน้า
3.5 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเทคนิคแก๊ส โครมาโทกราฟ-เชดสเปช	41
3.5.1 การตั้งพารามิเตอร์ของเครื่องแก๊ส โครมาโทกราฟ	41
3.5.2 การวิเคราะห์เอทานอลในเชิงปริมาณ	41
3.5.3 การทดสอบความถูกต้อง	41
3.5.4 การทดสอบหาความเที่ยง	42
บทที่ 4 ผลการวิจัย	43
4.1 ผลการศึกษาอัตราการเจริญของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	43
4.2 การสร้างกราฟมาตรฐานเอทานอล	45
4.3 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบต่างๆ	46
4.3.1 การหมักแบบคงที่โดยใช้เชลล์อิสระ	46
4.3.2 การหมักแบบคงที่โดยใช้เชลล์ตึํing	47
4.3.3 การหมักแบบต่อเนื่อง โดยใช้เชลล์ตึํing	50
4.4 การทดสอบความเที่ยง	54
4.5 การทดสอบความถูกต้อง	55
บทที่ 5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ	56
5.1 สรุปผลการวิจัย	56
5.2 อภิปรายผลการวิจัย	57
5.3 ข้อเสนอแนะ	59
บรรณานุกรม	61
ภาคผนวก	64
ภาคผนวก ก เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และจุลินทรีย์	65
ภาคผนวก ข การเตรียมสารและเรื้อยีสต์	66
ภาคผนวก ค โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์	69
ภาคผนวก ง ภาพถ่ายเชลล์ตึํing ที่ได้จากการกล้อง SEM	74
ภาคผนวก จ ภาพที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย	76
ประวัติผู้วิจัย	78

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 ถังหมักแบบต่างๆ แบ่งตามการหมุนเวียนสารในปฏิกริยาการหมัก	14
2.2 สารอินทรีที่ใช้เป็นพาหะในการตีงเซลล์	20
2.3 เปรียบเทียบถักยนต์ระหว่างกส่องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกับ กล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอน	24
2.4 ถักยนต์เฉพาะของระบบฉีกสารตัวอย่างที่เป็นแบบ split, splitless และ on-column injection	31
2.5 ถักยนต์เฉพาะทั่วไปของดีแทคเตอร์ชนิดต่างๆ	33
4.1 อัตราการเจริญของยีสต์ของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ( $A_{620}$ ) ทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	43
4.2 ความเข้มข้นเอทานอลกับอัตราส่วนพื้นที่ไทดีฟิคระหว่างเอทานอลกับ ไฮโซโฟรพานอลที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 3, 5 และ 7% v/v	45
4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบคงที่โดยใช้เซลล์อิสระ	46
4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบคงที่ โดยใช้เซลล์ตึง (รอบที่ 1)	48
4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบคงที่ โดยใช้เซลล์ตึง (รอบที่ 2)	49
4.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบคงที่ โดยใช้เซลล์ตึง (รอบที่ 1)	51
4.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบคงที่ โดยใช้เซลล์ตึง (รอบที่ 2)	52
4.8 ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานเอทานอล 3% v/v จำนวน 10 ครั้ง	54
4.9 ผลการวิเคราะห์ % Recovery	55

## สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2.1 กระบวนการหมักของยีสต์ที่เปลี่ยนนำตาลเป็นเอทานอล	7
2.2 อัตราการเจริญของยีสต์	9
2.3 การหาความหนาแน่นของเชลล์โดยวัดความชุ่นของจุลินทรีย์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	11
2.4 ลักษณะของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.5 ชนิดของถังหมัก (ก) = ถังหมักแบบคงที่ (ข) = ถังหมักแบบต่อเนื่อง	18
2.6 โครงสร้างทางเคมีของอัลกิโนต	21
2.7 องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่องแก๊ส โครมา ไทรกราฟ	26
2.8 การฉีดแก๊สตัวอย่าง โดยการใช้ Gas Sampling Valve	27
2.9 ลักษณะของ flash vaporizer injection port	28
2.10 flash vaporizer ที่ใช้กับ glass column	28
2.11 การนำ headspace sample ไปวิเคราะห์โดยใช้ gas sampling valve	30
2.12 (a), (b) และ(c) เป็นลักษณะของ FID แบบต่างๆ กัน	34
4.1 กราฟการเจริญของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่ได้จากการวัดค่าการคูดกลืนแสงทุกๆ 1 ชั่วโมง	44
4.2 กราฟมาตรฐานเอทานอล	45
4.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบคงที่โดยใช้ เชลล์อิสระ	47
4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบคงที่ โดยใช้เชลล์ตึบในรอบที่ 1 และ 2	50
4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่อง โดยใช้เชลล์ตึบในรอบที่ 1 และ 2	53
5.1 กระบวนการเปลี่ยนสารละลายกลูโคสเป็นเอทานอลของยีสต์	58

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันรัฐบาลได้รณรงค์ให้ประชาชนประยุคพลังงานทั้งในรูปของไฟฟ้า และน้ำมัน เชื้อเพลิงเพื่อลดการนำเข้าพลังงาน โดยส่งเสริมการใช้พลังงานทดแทนให้มากยิ่งขึ้น เพื่อลดค่าใช้จ่าย การนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงจากต่างประเทศ โดยพบว่าประเทศไทยมีการนำเข้าน้ำมันถึงร้อยละ 60 ของปริมาณ การใช้พลังงานทั้งหมด ในปี 2547 มีการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงมากกว่า 4 แสนล้านบาท โดยคาดว่าปี 2548 จะสูงถึง 5 แสนล้านบาท เมื่อเทียบกับรายได้จากการส่งออกเงินตราระเงินสินค้าหลักๆ คือประมาณ 8 แสนล้านบาท ทำให้ต้องเสียเงินนำเข้าน้ำมันมากกว่าครึ่งหนึ่งของรายได้จากการส่งออกสินค้าเกษตรและเมื่อนำน้ำมันเชื้อเพลิงประสบปัญหาราคาแพง ประชาชนส่วนใหญ่จึงหันมาสนใจ พลังงานชีวภาพแทนการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิง ([www.mtec.or.th/th/news/cool\\_stuff/cool30.html](http://www.mtec.or.th/th/news/cool_stuff/cool30.html); 2 มีนาคม 2549)

“แก๊สโซฮอล์” เป็นพลังงานทดแทนชนิดหนึ่ง โดยมีส่วนผสมระหว่างเอทานอลประมาณ 10% กับน้ำมันเบนซินอีก 90% ซึ่งมีคุณสมบัติไม่แตกต่างจากน้ำมันเบนซินอื่นๆ 95 นอกจากนี้ การใช้เอทานอล 10% มาทดแทนสารเติมแต่ง MTBE (methyl tertiary-butyl ether) ซึ่งผสมอยู่ในน้ำมันเบนซิน 95% ที่จะสามารถลดการนำเข้าสารตัวนี้จากต่างประเทศได้ ในอนาคตหากราคาน้ำมันเบนซินแพงขึ้น แต่ถ้าคนไทยสามารถผลิตเอทานอลได้มากขึ้นจะมีผลให้ต้นทุนเอทานอลต่อหน่วยลดลง ([www.geocities.com/d15\\_vi/chapter2vi.html01](http://www.geocities.com/d15_vi/chapter2vi.html01); 2 มีนาคม 2549)

นอกจากนี้ กระทรวงพลังงานมีแผนยุทธศาสตร์ใช้แก๊สโซฮอล์ตามติดตามรัฐมนตรี 9 ธันวาคม 2549 กำหนดให้ยกเลิกใช้สารเติมแต่ง MTBE ในเบนซิน 95 ในปี 2549 และใช้แก๊สโซฮอล์ 91 ในบางพื้นที่ และตามติดตามรัฐมนตรี 18 พฤษภาคม 2547 กำหนดว่าปี 2549 จะมีการใช้แก๊สโซฮอล์ 95 ทั่วประเทศ ซึ่งมีความต้องการใช้เอทานอลในน้ำอยกว่าวันละ 1 ล้านลิตรต่อวัน และในปี 2554 มีเป้าหมายใช้เอทานอลถึงวันละ 3 ล้านลิตร นอกจากนี้สอดคล้องการใช้พลังงานของไทย เริ่งลำดับจากมากไปน้อยคือ ภาคชนบทใช้พลังงานร้อยละ 37 ภาคอุตสาหกรรม ร้อยละ 36 ภาคครัวเรือนร้อยละ 21 แต่ปัจจุบันมีการใช้พลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงเพียงร้อยละ 0.5 ของความต้องการใช้พลังงานทั้งหมด ในอีก 8 ปีข้างหน้าจะเพิ่มสัดส่วนเป็นร้อยละ 8 หากมีการพัฒนาการผลิตเอทานอลอย่างจริงจัง จะสามารถลดการนำเข้าพลังงานได้ถึงปีละ 35,000 ล้านบาท ([www.mtec.or.th/th/news/cool\\_stuff/cool30.html](http://www.mtec.or.th/th/news/cool_stuff/cool30.html); 2 มีนาคม 2549)

การผลิตเอทานอลเพื่อผลิตเป็นแก๊สโซเชลล์ในเมืองไทยขณะนี้ใช้อ้อยหรือกากน้ำตาล (โนมาส) และมันสำาประหลังเป็นวัตถุคุณ โดยมีการใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุคุณในการผลิตเอทานอลมากที่สุด โดยใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งเอนไซม์สำารับเปลี่ยนวัตถุคุณเป็นเอทานอล เรียกว่า “การหมัก” เพื่อเป็นทางเลือกนำมาใช้เป็นพลังงานในอนาคต หลังจากที่พลังงานจากฟอสซิลลดลง มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ถูกนำมาใช้ผลิตเอทานอล เช่น *Clostridium* sp., *Zymomonas mobilis* และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยยีสต์จำพวกนี้ จะสามารถเจริญได้ภายในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน พร้อมทั้งใช้กลูโคสในวัตถุคุณเป็นแหล่งน้ำตาลในการเจริญตามวิถีของไกลโคไลซิต ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะได้เอทานอลและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมานะ ในระหว่างการหมักโดยไม่มีการป้อนอาหารให้ยีสต์ ตลอดระยะเวลาการหมัก

แต่ยังไงก็ตาม การผลิตเอทานอลโดยการหมักจะมีปัจจัยบางอย่างที่ทำให้อัตราการผลิตเอทานอลลดลง เช่น ผลิตผลพลอยได้ และความเข้มข้นของอาหารที่ให้กับยีสต์จะมีอิทธิพลต่ออัตราการเจริญของยีสต์ โดยทั่วไปจะขัดขวางการผลิตเอทานอล รวมทั้งปริมาณเอทานอลที่ยีสต์ผลิตได้จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์โดยตรง หรือกล่าวว่าเอทานอลที่เชื้อผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีความเป็นพิษต่อยีสต์ *S. cerevisiae* ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่ามีผลิตผลพลอยได้และเอทานอลจากแมลงเนยอลิชีน์ในระหว่างการหมักสามารถนำไปยับยั้งการผลิตเอทานอลของยีสต์ในระหว่างการหมักได้ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนากระบวนการหมัก โดยการตีงเชลล์ยีสต์เพื่อใช้ในการหมัก การตีงเชลล์ทำโดยนำเชลล์ยีสต์ไปเก็บไว้ในแกนกลางของวัสดุที่มีรูพรุน เช่น อัลจิโนต (alginat) เจลาติน (gelatin) และ พงวุ้น (agar) เป็นต้น เพื่อห่อหุ้นเชลล์จะทำให้เชลล์มีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม (เช่น อุณหภูมิ พิอช และความเข้มข้นของไอออนในสารละลายน้ำ) ได้ดีกว่าเชลล์อิสระ ซึ่งเป็นสาเหตุมาจากความเข้มข้นของสับส黍ตและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เช่น เอทานอลและสารตัวอื่นๆ และยังเป็นการเพิ่มผลผลิตและเปอร์เซ็นต์ของเอทานอล โดยในปี 1993 Takamitsu และคณะได้ทดลองตีงเชลล์ *Z. mobilis* ในการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) เพื่อผลิตเอทานอลพบว่าผลิตเอทานอลได้มากกว่าแบบเดิมที่ไม่ได้ตีงเชลล์ยีสต์ถึง 2 เท่า (ภาวนิ คณาสวัสดิ์, 2537 : 30)

นอกจากนี้ในปี 2002 Yamada และคณะ ได้ตีงเชลล์ *Z. mobilis* เพื่อใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล เช่นกัน พบว่าสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อเป็นแหล่งอาหารให้กับเชลล์ยีสต์ในกระบวนการหมัก ที่ความเข้มข้นสูงถึง 12-15% v/v ได้ โดยไม่เป็นอันตรายกับเชลล์ยีสต์ ดังนั้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงแล้วก็จะได้เอทานอลในปริมาณที่สูงตามมา นอกจากนี้ข้อดีของการตีงเชลล์ในการหมักนี้จะลดขั้นตอนในขั้นแยกเชลล์ (downstream processing) ออกไปจากน้ำหมัก หลังจากหมักเสร็จ เนื่องจากเก็บเชลล์ไว้ในพาหะที่ต้องดูแลอย่างดี ไม่ปนกับน้ำหมัก อีกทั้งสามารถช่วยรักษาสภาพของเชลล์ไว้ในพาหะที่ต้องดูแลอย่างดี นอกจากนี้ข้อดีของการตีงเชลล์จะสามารถจำกัดปริมาณของอาหารที่ให้กับเชลล์ เพราะเชลล์จะรับอาหารได้โดยการค่อยๆ แพร่ของ

อาหารผ่านผนังวัสดุที่ใช้ตรึงไปสู่เซลล์ที่ถูกเก็บไว้ก่อนการผนังของวัสดุที่ตรึง (ภาวนี คณาสวัสดิ์, 2537 : 37)

อัลจิเนต (alginate) เป็นพาหะที่ใช้ดักจับเซลล์ได้ง่ายและสะดวก ดังนั้น จึงเป็นวัสดุที่ใช้ตรึงเซลล์มากที่สุด ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมทางค้านอาหาร เกษตรกรรม สิ่งทอ และอุตสาหกรรมกระดาษ มักใช้อัลจิเนตในแง่ที่เป็นตัวให้ความขันหนืด ให้ความคงตัว และเป็นตัวทำให้เกิดฟิล์ม เนื่องจาก อัลจิเนตประกอบด้วยสายโพลิแซคคาไรด์ที่แยกจากสารร้ายสีนำตาล สามารถละลายนำได้ขึ้นอยู่กับชนิดของเกลือที่จับอยู่ ดังนั้น ในปัจจุบันอัลจิเนตจึงเป็นพาหะที่นำมาใช้ตรึงเซลล์กันมาก เมื่อพิจารณาจากจำนวนงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ จะพบว่าอัลจิเนตเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้กันมากที่สุด อัลจิเนต มีโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบด้วยกลุ่มคาร์บอนออกซิลในแต่ละหน่วยบอย (โนโนแซคคาไรด์) ที่จะไปยึดจับกับไอออนของโลหะบางชนิด เช่น  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  และ  $\text{Al}^{3+}$  เป็นต้น ทำให้ได้เจลที่มีความเสถียรและตรึงเซลล์โดยวิธีดักจับได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง เป็นผลให้เซลล์ส่วนมากไม่ตาย ลักษณะรูปร่างของเจลที่ตรึงเซลล์ได้จะเป็นเม็ดกลม (ภาวนี คณาสวัสดิ์, 2537 : 41)

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการตรึงเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* เพื่อผลิตเอทานอล โดยเปรียบเทียบวิธีการหมัก 2 แบบ คือ การหมักแบบต่อเนื่องกับการหมักแบบคงที่ (batch fermentation) โดยการหมักแบบต่อเนื่องเป็นกระบวนการหมักที่มีการใช้วัตถุคินและสารอาหารเข้าไปในถังหมักตลอดเวลา ในขณะเดียวกันมีการแยกเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกมาตลอดเวลา เช่นกัน ส่วนการหมักแบบคงที่เป็นกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ โดยอาศัยการเติมวัตถุคินสารอาหาร และเติมยีสต์ลงไปเพียงครั้งเดียวตลอดการหมัก นอกเหนือนี้ยังเปรียบเทียบกับวิธีการหมักเอทานอลโดยไม่ได้ตรึงเซลล์ยีสต์หรือการใช้เซลล์อิสระและศึกษาการนำเซลล์ตรึงที่ใช้ในการผลิตเอทานอลในครั้งหนึ่งแล้วนำกลับมาใช้ใหม่ เพื่อเป็นการใช้วัตถุคินอย่างคุ้มค่าและประหยัดต้นทุน การผลิต โดยใช้โซเดียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะตรึงเซลล์

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- (1) เพื่อศึกษาแนวทางการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นพลังงานทดแทนจากการหมักยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ถูกตรึงไว้ในโซเดียมอัลจิเนต โดยการหมักแบบคงที่ต่อเนื่องและการหมักแบบต่อเนื่องและการหมักแบบคงที่
- (2) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ถูกตรึงไว้โซเดียมอัลจิเนตกับวิธีการหมักเอทานอลโดยไม่ได้ตรึงเซลล์ยีสต์หรือการใช้เซลล์อิสระที่ใช้กันในปัจจุบัน
- (3) เพื่อศึกษาการนำเซลล์ตรึงมาหมุนเวียนใช้ในการหมัก

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- (1) ศึกษาอัตราการเจริญเติบโต (growth rate) ของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae*
- (2) ตระงเชลล์ยีสต์ด้วยโซเดียมอัลจินेट
- (3) ถ่ายภาพเม็ดเซลล์ตระงดักล้องชุลทรห์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM)
- (4) หมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ที่ถูกตระงดักด้วยโซเดียมอัลจินेटและยีสต์ที่ไม่ถูกตระงดักด้วยโซเดียมอัลจินेट (เซลล์ยีสต์อิสระ)
- (5) วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเทคนิคแก๊สโครม่าโทกราฟี
- (6) หาความถูกต้องของวิธี (validation method) วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเทคนิคแก๊สโครม่าโทกราฟี

### 1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ

GC	=	Gas Chromatography
$t_R$	=	Retention time
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
g	=	Gram
%	=	Percent
MW	=	Molecular weight
v/v	=	Volume by volume
Conc.	=	Concentration
$^{\circ}\text{C}$	=	Celsius
$\mu\text{m}$	=	Micrometer
$\text{U ml}^{-1}$	=	Unit per militre
$\text{KU l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	=	Kilounit per litre per hour
1 KU	=	1000 units
$\text{U (g wet cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$	=	Unit per wet cells 1 g per hour

### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

พัฒนาวิธีการหมักเอทานอลให้ได้ปริมาณที่มากกว่าการหมักแบบเดิม ในระยะเวลาที่สั้นลง เพื่อลดต้นทุนการผลิตเอทานอล

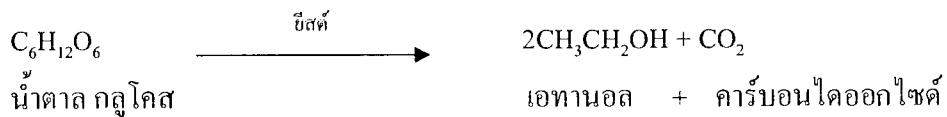
## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

##### 2.1.1 เอทานอล (Ethanol) (พิมาย มั่นเจริญ, 2547: 14)

เอทานอล เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่รับประทานได้ เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ละลายน้ำได้ดี ระหว่างน้ำ จุดไฟติด เปป่าวไฟสีน้ำเงิน ไม่มีควัน เอทานอลจากธรรมชาติเกิดจากการหมักยีสต์กับวัตถุคิบ ได้แก่ อ้อย น้ำตาล ภากน้ำตาล ภากอ้อย นิทรูท (หัวผักกาดหวาน) แบ่งน้ำสำปะหลัง มันเทศ และขัญพืชต่างๆ เช่น ข้าวโพด ข้าว ข้าวสาลี ข้าวนาร์เรย์ และข้าวฟ่าง เป็นต้น เอนไซม์จากยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาล จากพืชให้เป็นเอทานอลและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์



##### 2.1.1.1 คุณสมบัติทางกายภาพทางเคมีและฟิสิกส์

ชื่อสามัญ	เอทานอล	
ชื่อทางเคมี	เอทิลแอลกอฮอล์	
สูตรเอมพิริคัล	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	
มวลโมเลกุล	46.73	กรัม/โมล
-ค่านอนร้อบยก	52.14	
-ไอโโรเจนร้อบยก	13.13	
-ออกซิเจนร้อบยก	34.73	
น้ำหนักโมเลกุล	46.730	กรัม/โมล
ความหนาแน่น	0.790	กรัม/ลิตร
จุดเดือด	78.500	องศาเซลเซียส
จุดเยือกแข็ง	-117.300	องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	-144.100	องศาเซลเซียส
ความถ่วงจำเพาะ	0.789	กิโลกรัม/ลิตร
ค่าดัชนีหักเห	1.690	

### 2.1.1.2 ประโยชน์ของเอทานอล

- (1) เอทานอลเป็นแอลกอฮอลล์ที่นำไปใช้ผสมน้ำมัน (Fuel Alcohol) เป็นแอลกอฮอลล์ที่มีความบริสุทธิ์ตั้งแต่ 95% v/v
- (2) ส่วนใหญ่ใช้ในเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอลล์ในระดับที่เหมาะสม
- (3) ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับจุดไฟ
- (4) ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์
- (5) ใช้อทานอลร้อยละ 75 เป็นยาทแพลง ผ่าเชื้อโรคในทางการแพทย์
- (6) ใช้เป็นตัวทำละลายในห้องปฏิบัติการ

### 2.1.2 ยีสต์ (Yeast) (ไฟโรจน์ กิจจนาพานิช, 2539 : 23-24)

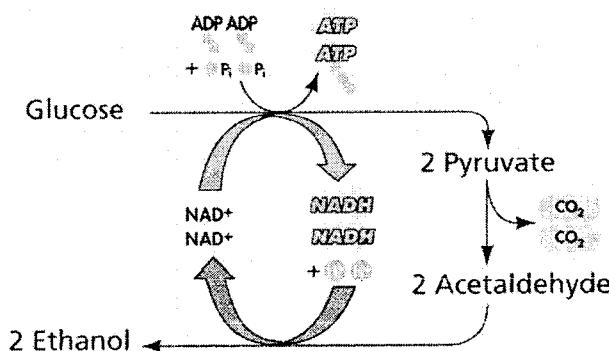
ยีสต์มีลักษณะเป็นเซลล์เดียว มีเซลล์เป็นแบบยูคาริโอติก ไม่สามารถใช้พลังงานจากแสง ส่วนมากดำรงชีพอิสระ (free-living cell) เป็นชาโพรไฟต์ (saprophyte) พบทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน ในน้ำ และตามส่วนต่างๆ ของพืช บางชนิดอยู่ในสัตว์ ที่น้ำสังเกตคือมักพบยีสต์ในแหล่งน้ำตาล ยีสต์มีเซลล์เป็นทรงรี (ellipse) ขนาดยาว 5-140  $\mu\text{m}$  กว้าง 1-15  $\mu\text{m}$  บางชนิดเป็นทรงกลม (sphere) มีผนังเซลล์ ซึ่งประกอบด้วยmannan และกลูแคน (glucans) ซึ่งต่างจากพวกรังไใจ ซึ่งมีผนังเซลล์เป็นไคติน (chitin) และเซลลูโลส (cellulose) ยีสต์สามารถมีแมลง鞭อดิซึมเป็นได้ทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวนพันธุ์แบบไม่ออาศัยเพศทำได้โดยการแตกหน่อ (budding) หรือบางครั้งอาจแบ่งตัว (fission) การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดจากเซลล์ ยีสต์ที่เป็น haploid cell 2 เซลล์ รวมกันเป็น diploid cell เรียกว่าไซโกต (zygote) และเกิดการแบ่งตัวออกไปเป็นสปอร์และงอก (germinate) เป็น haploid cell ต่อไป

ในทางอุตสาหกรรมยีสต์เป็นที่รู้จักมาเป็นระยะเวลานาน เช่น ในกระบวนการผลิต ข้นปั่น ไวน์ (wine) เบียร์ (beer) และสุรา กั่นต่างๆ (distilled alcohol) สายพันธุ์ที่สำคัญ ได้แก่ *S. Cerevisiae*, *S. uvarum* และ *S. fermentati* พวกร *Kluveromyces* เช่น *K. fragilis* ใช้ผลิตเอทานอล จากผลิตภัณฑ์นม *Saccharomycopsis fibuligera* ให้อ่อนไขม์ในการเปลี่ยนแปลงให้เป็นน้ำตาล (Saccharification), *Candida utilis*, *C. lipolytica* และ *C. tropicalis* ใช้ผลิตยีสต์ผงซึ่งใช้เป็นอาหาร สำหรับคนและใช้เลี้ยงสัตว์

#### 2.1.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์

(1) อาหาร ที่ยีสต์ใช้ได้ ได้แก่ น้ำตาล โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทส ยีสต์บางชนิดสามารถใช้ได้ เช่น *Candida utilis* หรือ *Endomycopsis fibuligera* ที่สามารถใช้กลูโคสและฟรักโทส ที่ยีสต์บางชนิดใช้ได้ คือ แป้ง ยีสต์ที่สามารถใช้แป้งได้ เช่น *S. diastaticus*, *S. chevalieri*, *Cryptococcus* ยีสต์บางพวกร เช่น พลัมยีสต์สามารถใช้กรดอินทรีย์ได้ เช่น *Candida utilis* ยีสต์บางพวกร เช่น พลัมยีสต์สามารถใช้กรดอินทรีย์ได้ เช่น *Cryptococcus*

ยีสต์มีกระบวนการไกลโคลไลซิส 2 กระบวนการ คือ สภาพที่ไม่มีออกซิเจน ยีสต์จะใช้กระบวนการเอมบ์เดน เมเบอร์ซอฟ์ พาร์ทเวร์ (EMP) ถึง 90% (ใน *S. cerevisiae* และ *Candida utilis*) ส่วนในสภาพมีออกซิเจนนอกจากกระบวนการเอมบ์เดน เมเบอร์ซอฟ์ พาร์ทเวร์ แล้วใน *S. cerevisiae* จะใช้กระบวนการเอกโซสมอนอฟอสเฟต 6-30% และใน *C. utilis* 30-50% ส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจนน้ำตาลจะเข้าสู่กระบวนการหมักได้เฉพาะน้ำตาลอ่อนๆ คือออกไซด์ (ภาพที่ 2.1) แต่การหมักให้ได้เฉพาะน้ำตาลอ่อนๆ ไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะในสภาพไม่มีออกซิเจนเท่านั้น อาจเกิดขึ้นได้เมื่อเลี้ยงยีสต์ในน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงเมื่อยู่ในสภาพที่มีออกซิเจน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกลูโคสที่มีความเข้มข้นมากกว่า 5% จะยับยั้งการสังเคราะห์oen ไซน์ที่เกี่ยวกับการหายใจแต่ถ้าหากไม่มีน้ำตาลในอาหารเลี้ยงยีสต์ พบว่าเป็นการกระตุ้นหรือเพิ่มกิจกรรมของoen ไซน์ ในวัฏจักรเครนส์ นอกจากนี้การมีน้ำตาลยังยับยั้งการสร้างไมโทคอนเดรียอีกด้วย ในสภาพมีออกซิเจนและความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำๆ ยีสต์จะใช้น้ำตาลเปลี่ยนไปเป็นการบันโคน์ออกไซด์และน้ำ หรือเกิดกระบวนการหายใจเช่นเดียวกับในพืชและสัตว์



ภาพที่ 2.1 กระบวนการหมักของยีสต์ที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล

(2) อุณหภูมิ ยีสต์แต่ละชนิดเจริญได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพากมีโซไฟล์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ระหว่าง 20-30°C อุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์ยังสามารถเจริญได้ประมาณ 35-47°C ส่วนอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญเติบโตได้อยู่ระหว่าง 0-5°C แต่ยีสต์บางชนิดที่เป็นพากมีโซไฟล์มีอุณหภูมิต่ำกว่า 0°C เช่น *C. frigida*, *C. gelida* และ *C. nivalis* มีอุณหภูมิต่ำสุดที่ (-5 -7 )°C อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 15°C และไม่สามารถเติบโตที่อุณหภูมิสูงกว่า 20°C หรือจัดเป็นพากอ่อนลิเกต โซไฟล์มีโซไฟล์ที่เป็นเทอร์โมไฟล์หรือสามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50°C

นอกจากอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตแล้วยังมีผลต่อการสร้างแอกโซโกรสปอร์ของยีสต์อีกด้วย อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแอกโซโกรสปอร์ของยีสต์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น *S. cerevisiae* อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 25-30°C สูงสุดประมาณ 35°C ต่ำสุด 11-12°C, *S. ellipsoideus* ต่ำสุด 4-7.5 °C เหมาะสม 25 °C สูงสุด 30-33°C, *S. intermedium* ต่ำสุด

0.5-4 °C เหนาสาม 25 °C สูงสุด 27-29 °C, *S. pastorianus* ต่ำสุด 0.5-4 °C เหนาสาม 27.4 °C สูงสุด 29-31.5 °C, *S. turbidans* ต่ำสุด 4.8 °C เหนาสาม 29 °C สูงสุด 33-35 °C, *S. validus* ต่ำสุด 4.8-5.0 °C เหนาสาม 25 °C สูงสุด 27-29 °C ส่วนพาก *Schizosaccharomyces octosporus*, *S. pombe*, *Kluyveromyces* sp., *Nadsonia fulvescens* และ *Hansenula saturnus* สร้างแอกโซสปอร์ได้ที่อุณหภูมิ 25 °C

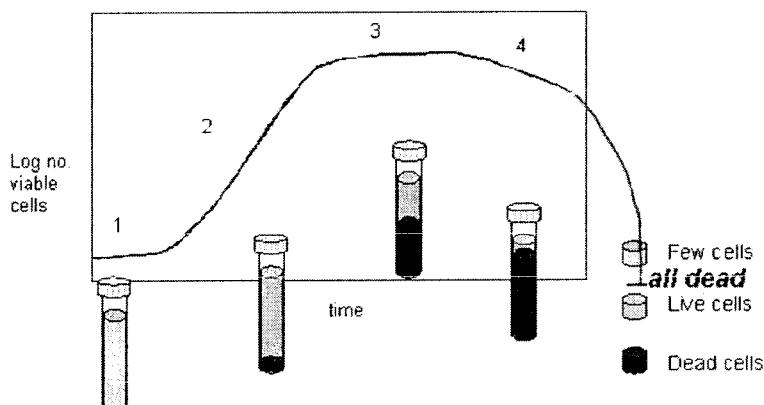
(3) ออกซิเจน ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพากเจริญได้ในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย(facultative -anaerobe) แต่ยีสต์บางสายพันธุ์ก็เจริญในสภาพมีออกซิเจนได้ดี ส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจนเติบโตได้ช้า ในสภาพมีออกซิเจนยีสต์ใช้น้ำตาลโดยการออกซิเดชันโดยสมบูรณ์ได้ ควรบ่อนไดออกไซด์และน้ำ โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจนยีสต์ใช้น้ำตาล โดยการหมักส่วนใหญ่เป็นการให้ออกซิเจนอลในการหมัก โดยยีสต์ให้ออกซิเจนอลนั้น หากมีออกซิเจนยีสต์จะใช้น้ำตาลให้บ่อนไดออกไซด์และน้ำ แทนการหมักให้ออกซิเจนอล หรือการหมักถูกยั้งโดยการหายใจเรียกว่า pasteur effect ยกเว้นในยีสต์บางชนิด ได้แก่ *Brettanomyces* ซึ่งออกซิเจนช่วยกระตุ้นการหมัก (negative pasteur effect) ยีสต์บางชนิดสามารถเติบโตได้เฉพาะในสภาพมีออกซิเจนไม่มีความสามารถในการหมัก (oxidative yeast) ยีสต์พากนี้ได้แก่ *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Endomycopsis* เป็นต้น

(4) ค่าความเป็นกรด-เบส ยีสต์เจริญได้ใน pH ช่วงกว้าง pH ต่ำสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้คือ 1.5 ส่วน pH สูงสุดเท่ากับ 8.0-8.5 สำหรับ pH ที่เหนาสาม สำหรับการเติบโตของยีสต์แตกต่างกัน ส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่าง 4.0-4.5 ยีสต์ส่วนใหญ่จะเจริญไม่ดีในสภาพที่เป็นด่าง นอกจาก pH มีผลต่อการเติบโตแล้วยังมีผลต่อการสร้างแอกโซสปอร์ของยีสต์อีกด้วย pH ในการสร้างสปอร์ของยีสต์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น *S. cerevisiae* pH สูงสุดเท่ากับ 9.1-9.2, pH ต่ำสุดเท่ากับ 2.4-2.6, *S. pombe* pH สูงสุดเท่ากับ 8.0-8.2 ต่ำสุดเท่ากับ 4.0-4.3

#### 2.1.2.2 การเจริญของยีสต์ (Yeast Growth) (<http://www.pmf.unsa.ba/biologija/talofiti/Saccharomyces-cerevisiae.jpg>. [2 มีนาคม 2549].

ยีสต์มีการเจริญเติบโตหรือเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อ (budding) และการแบ่งตัว (fission) ซึ่งแบบหลังนี้พิบไม่ป่องนัก การเจริญเติบโตโดยการแตกหน่อถือได้ว่าเป็นลักษณะเฉพาะของยีสต์ การแตกหน่อเริ่มจากผนังเซลล์ และเซลล์เมมเบรน ขยายตัวยื่นออกจากเซลล์เดิม มีลักษณะเป็นตุ่มหรือหน่อ (bud) ใช้โ拓พลาซึมของเซลล์แม่จะเข้ามารองต่อกับของหน่อนิวเคลียสของเซลล์แม่จะขยายใหญ่และเคลื่อนตัวไปสู่หน่อ เมื่อหน่อโตขึ้นขนาดใกล้เคียงกับเซลล์แม่ นิวเคลียสก็จะลูกบีบรัดโดยนิวเคลียร์ เมมเบรน (nuclear membrane) ทำให้ครึ่งหนึ่งของนิวเคลียสเข้าไปในหน่อเหลืออีกครึ่งหนึ่งอยู่ในเซลล์แม่ จากเซลล์เมมเบรน และผนังเซลล์ก็จะกันแบ่งระหว่างเซลล์แม่และหน่อโดยสมบูรณ์ หน่อจะหลุดออกจากเซลล์แม่กลายเป็นเซลล์ใหม่ ซึ่งเรียกว่า เซลล์ลูก ตำแหน่งบนเซลล์แม่ที่เกิดการหลุดของหน่อจะทึบรอยแผลเป็นไว้เรียกว่า bud scar ส่วนบนเซลล์ลูกจะมี birth scar

แต่แพลเป็นห้องสองนี้ไม่สามารถมองเห็นจากกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงธรรมชาติ จำเป็นต้องใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนต์ ไมโครสโคปี (fluorescence microscopy) จากการทดลองนับ bud scar บนเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงตามปกติ จนถึงสภาวะที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์อีก พบร่วงเซลล์ส่วนใหญ่จะมี bud scar ตั้งแต่ 0 ถึง 6 แห่ง และมีส่วนน้อยที่เซลล์ bud scar 12-15 แห่ง การมีจำนวน bud scar ต่อเซลล์มีไม่น่า ก เพราะ เมื่อยีสต์เพิ่มจำนวนทำให้มีจำนวนเซลล์หนาแน่นขึ้น เกิดการขาดแคลนอาหารเสียก่อน จึงทำให้หยุดการเพิ่มจำนวนเซลล์ (ภาพที่ 2.2) แต่ถ้าทดลองใช้ยีสต์แต่ก่อนน่อแล้วให้อาหารอย่างเต็มที่ และพยาบาลแยกเซลล์ลูกออก พบร่วงว่ายีสต์ *S. cerevisiae* สามารถแตกหน่อและเกิด bud scar ได้ตั้งแต่ 9 ถึง 43 แห่งต่อเซลล์ โดยปกติเมื่อหน่วยที่สองเริ่มเกิดหน่อแรกจะหลุดออกจากเซลล์แม่ แต่บาง สภาวะหน่อไม่หลุดออกจากเซลล์แม่ นอกจากนี้เซลล์ลูกไม่หลุดจากเซลล์แม่ยังแตกหน่อออกไปอีก ทำให้เกิดเป็นกลุ่มเซลล์หรือเป็นสายของเซลล์ยีสต์ กรณีที่เป็นสายทำให้คล้ายกับ ไมซ์เลียม (mycelium) แต่ต่างจากไมซ์เลียมที่แท้จริงของพากโนลด์ จึงเรียกว่า pseudomycelium การแตกหน่อ ของยีสต์จะใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า ประมาณ 90-120 นาที ในสภาวะปกติทั่วไปและ ถ้าอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะใช้เวลา 45 นาที



ภาพที่ 2.2 อัตราการเจริญของยีสต์

1 = lag phase, 2 = logarithmic phase, 3 = stationary phase และ 4 = death phase

นอกจากการสืบพันธุ์แบบไม่อายเพศที่กล่าวมา ยีสต์สามารถสืบพันธุ์แบบ อายเพศโดยการสร้างสปอร์ สปอร์แบบอายเพศของยีสต์เกิดจากเซลล์ยีสต์ที่กำลังเจริญเดิบ ໂຕ โดยแตกหน่อซึ่งจะมีโครโมโซมเพียงชุดเดียวหรือที่เรียกว่า haploid cell จำนวน 2 เซลล์ มาหลอม รวมกันเป็น diploid zygote จากนั้นนิวเคลียสของ diploid zygote เกิดการแบ่งตัวหนึ่งหรือหลายครั้ง เกิดเป็น ascospores ซึ่งแต่ละ ascospores จะเจริญต่อไปกลายเป็น haploid cell

ในห้องปฏิบัติการหรือในโรงงานอุตสาหกรรมก็ตาม ถ้ามีการทำปฏิกริยาของสารเคมีจำเป็นจะต้องมีภาชนะสำหรับใช้สารเคมีผสมและเกิดปฏิกริยา กัน ซึ่งภาชนะนี้โดยทั่วไป เรียกว่า ปฏิกรณ์ (reactors) ทางการหมักเรียกภาชนะนี้ว่า ถังหมัก (fermenter) ใน การหมักทุกครั้ง

จำเป็นต้องใช้ถังหมักเพื่อบรรจุอาหารและเชื้อจุลินทรีย์ จุลินทรีย์จะก่อให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆ ภายในถังหมักเพื่อสร้างชีวมวลและผลผลิตตามต้องการ ถังหมักอาจถูกสร้างสำหรับงานหมักโดยเฉพาะหรือบางครั้งอาจตัดแปลงจากเครื่องแก้วหรืออุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการหัวไปก็ได้ เพียงแต่ถังหมักนั้นจะต้องมีลักษณะสมบูรณ์พื้นฐานที่สามารถป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการสามารถทำความสะอาดและทำปลดปล่อยได้ มีอุปกรณ์ควบคุมสภาพการหมัก เช่น อุณหภูมิ pH ฯลฯ ตามความจำเป็น

การหมักบางกรณีอาจใช้อาหารที่มีสถานะเป็นของแข็ง หรือกึ่งของแข็งก็ได้ แต่ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะถังหมักที่ใช้กับอาหารเหลวเท่านั้น

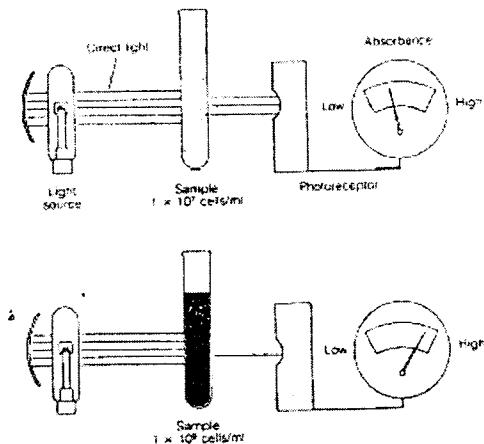
#### 2.1.2.3 การหาความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดความขุ่น (Turbidimetric methods) (นงลักษณ์ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547: 13-14)

การหาความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดความขุ่นอาศัยหลักการที่เมื่อเซลล์มีการเจริญเพิ่มมากขึ้น ทำให้สามารถเห็นความขุ่นด้วยตาเปล่า ปริมาณแสงที่ดูดกลืนไว้และกระจายออกไปเป็นสัดส่วนกับความหนาแน่นของเซลล์ และเซลล์ขนาดใหญ่จะขัดขวางทางเดินของแสงมากกว่าเซลล์ขนาดเล็ก

เครื่องมือที่ใช้วัดความขุ่น ได้แก่ สเปกโโทรฟอโตเมเตอร์ (spectrophotometer) และแคลอริมิเตอร์ (calorimeter) โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ใส่ในหลอดวัดและอ่านค่าเบอร์เซนต์ที่แสงผ่านออกมมา (% transmittance) ดังนั้นถ้านำน้ำเลี้ยงของเซลล์ขุ่นมาก เบอร์เซนต์ที่แสงผ่านออกมามากยิ่งน้อย โดยทั่วไปจะอ่านค่าความขุ่น (optical density หรือ OD) ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาแน่นหรือจำนวนเซลล์ (ภาพที่ 2.3)

วิธีนี้มีข้อดี คือ ทำได้สะดวก รวดเร็ว และใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นกับจำนวนเซลล์หรือน้ำหนักของเซลล์ได้ โดยการวัดความขุ่นของเซลล์เป็นระยะๆ ขณะเดียวกัน อาจนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทำให้แห้ง เพื่อทราบน้ำหนักแห้งหรือนำมาตรวจน้ำหนักจำนวนโคโลนีในงานเพาะเชื้อเป็นระยะๆ แล้วนำมาเขียนกราฟระหว่างค่าความขุ่นกับน้ำหนักแห้งของเซลล์ หรือ กับจำนวนโคโลนีของเซลล์ จะได้กราฟมาตรฐาน (standard curve) ดังนั้นมีการทำกราฟทดลองในครั้งต่อไป เมื่อวัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเซลล์ เรายังสามารถหาค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์หรือจำนวนโคโลนีของเซลล์ได้จากการกราฟมาตรฐานนี้

ส่วนข้อเสีย คือ เชื้อที่นำมาวัดจะต้องมีปริมาณมากพอที่จะเกิดความขุ่น และไม่สามารถตรวจเชื้อที่มีสีเข้ม หรือมีสารอันนอกจากแบคทีเรียปนอยู่ นอกจากนี้การวัดโดยวิธีนี้ เป็นการวัดทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตด้วย เพราะทำให้เกิดความขุ่นเช่นเดียวกัน



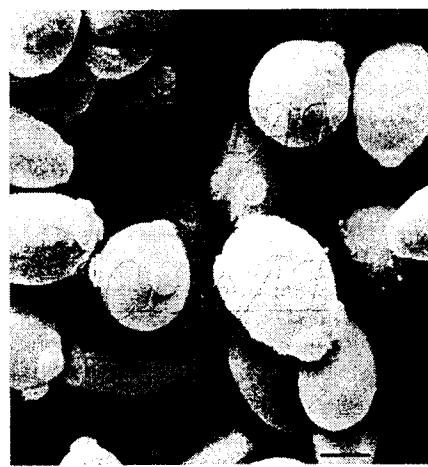
ภาพที่ 2.3 การหาความหนาแน่นของเชลล์โดยวัดความชุ่นของจุลินทรีย์ด้วยสเปกโกรโฟโตมิเตอร์

#### 2.1.2.4 ลักษณะของจุลินทรีย์ที่ดีสำหรับใช้ในการหมักเพื่อผลิตเชื้อทากanol

- (1) ให้ผลผลิตสูง
- (2) มีอัตราการหมักเพื่อผลิตเชื้อทากanol สูง
- (3) ทนอุณหภูมิสูง
- (4) ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายในสภาพต่างๆ ของการหมัก
- (5) ทนความเป็นกรด-เบส หรือทนกรด
- (6) มีความสามารถในการตัดตะกอน
- (7) มีพันธุกรรมที่ไม่ถูกพันธุ์ได้ง่าย
- (8) ทนต่อแรงออกซิเจนชีส



*S. cerevisiae* yeast. Bar: 5  $\mu\text{m}$



*S. cerevisiae* yeast. Bar: 2  $\mu\text{m}$

ภาพที่ 2.4 ลักษณะของเชื้อ *S. cerevisiae*

### 2.1.3 การหมักเพื่อผลิตเชื้อรา (พิมพ์ มั่นเริญ, 2547 : 18 และ ประมาณการ สีสุภา, 2547 : 12)

กระบวนการหมักโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

(1) **การหมักแบบคงที่ (Batch Fermentation)** เป็นกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์โดยการเติมวัตถุดิน สารอาหาร และหัวเชื้อลงไปเพียงครั้งเดียวตลอดการหมัก เช่น การหมักเพื่อผลิตเชื้อราในโรงงานผลิตสูตรต่างๆ ในประเทศไทย

(2) **การหมักแบบเพิดแบบทัช (Fed-Batch Fermentation)** เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดินและสารอาหารลงไปมากกว่า 1 ครั้งขึ้นไป เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถใช้วัตถุดินและสารอาหารได้เต็มที่และใช้ได้ในปริมาณสูง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สูงขึ้น ซึ่งนิยมใช้ในการปรับปรุงกระบวนการผลิต การหมักแบบเพิดแบบทัชนี้มีข้อได้เปรียบกว่าการหมักแบบคงที่หลายประการ ด้วยกัน เช่น การขับยั้งของอาหาร (substrate inhibition) สารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น กรดไขมัน เอทานอล เมทานอล และสารประกอบพอกจะ โรมาติก สามารถขับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้แม้ในความเข้มข้นที่น้อยๆ ก็ตาม การเติมอาหารเหล่านี้อย่างเหมาะสมและต่อเนื่องกันจะช่วยให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้โดยปราศจากการขับยั้งของสารอาหาร การผลิตเซลล์เป็นจำนวนมาก (high cell concentration) ในการเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์แบบคงที่นี้จะได้ปริมาณเซลล์ไม่มากเท่ากัน การเลี้ยงแบบเพิดแบบทัช การผลิตยีสต์ขึ้นมาปีจางานน้ำตาล/mol หรือกากน้ำตาล พนบวมเมื่อเอทานอล ละลายปนอยู่กับยีสต์ในถังหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารที่เลี้ยงสูง แม้จะให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอ เอทานอลจะทำให้ปริมาณเซลล์ลดลง การสร้างเอทานอลแบบนี้เกิดจากอิทธิพลของกลูโคส (glucose effect) เพื่อจัดการอิทธิพลของกลูโคสจึงได้นำเทคนิคการหมักแบบเพิดแบบทัชมาใช้ในการผลิตยีสต์ ในปัจจุบันซึ่งจะช่วยลดความหนืดของอาหาร (decreasing viscosity of broth) พอดีเมื่อร์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์สามารถควบคุมความหนืดของอาหาร โดยการค่อยๆ เติมอย่างต่อเนื่อง ซึ่งหากความหนืดเพิ่มมากขึ้นจะมีผลต่อระบบการเติมอากาศ เช่น ใบพัดในการกวนจะต้องใช้กำลังไฟฟ้าเพิ่มมากขึ้น เกิดฟองมากขึ้น ทำให้การละลายของออกซิเจนไม่ดีพอ ป้องกันการปะปนของจุลินทรีย์อื่นๆ (protection from contamination) กรณีการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ การหมักแบบคงที่อาจพบปัญหาเรื่องการปะปนของจุลินทรีย์อื่นๆ ทำให้ผลผลิตเอทานอลลดลง หากใช้เทคนิคเพิดแบบทัชเข้าช่วยแล้วปัญหาเหล่านี้ก็จะหมดไป

(3) **การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous Fermentation)** เป็นกระบวนการหมักอย่างต่อเนื่อง มีการใช้วัตถุดินและสารอาหารเข้าไปในถังหมักตลอดเวลา ในขณะเดียวกันก็มีการแยกอาผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกมาตลอดเวลา เช่นกัน การหมักแบบนี้จำเป็นต้องอาศัยสภาพปราศจากเชื้ออย่างมาก และต้องป้องกันการปะปนเชื้อของจุลินทรีย์จากภายนอกอย่างดี ปัจจุบันมีการศึกษากันมากในระดับห้องปฏิบัติการ กิจกรรมการหมักสำหรับคุณภาพกระบวนการผลิตเอทานอล มีความสัมพันธ์กับวัตถุดินที่

ใช้ซึ่งอาจจะเป็นกากน้ำตาล (molasses) น้ำอ้อย (cane juice) น้ำย่อยเยื่อกระดาษ (sulfide waste liquor) เป็นต้น ในอดีตที่ผ่านมาการหมักแบบนี้จะถูกนำมาใช้โดยใช้การปรับความเข้มข้นของแหล่งอาหารเริ่มต้นได้ 14-18% v/v การฆ่าเชื้อ (pasteurization) บางครั้งใช้ในความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นน้อยกว่า 5 ชั่งนับว่าเป็นสิ่งสำคัญ เพราะช่วยลดการปนเปื้อนของแบคทีเรีย โดยทั่วไปการเตรียมเชื้อริบเริ่มต้น (seed vessels) จะให้สภาวะกึ่งต้องการอากาศ (semi-aerobic) เพื่อให้ยีสต์มีการเจริญเติบโต พร้อมทั้งมีการเติมแหล่งอาหารที่จำเป็น และเริ่มทำการหมักที่อุณหภูมิ 21-27°C การหมักจะเสร็จสิ้นสมบูรณ์ในเวลา 35-75 ชั่วโมง โดยมีจำนวนยีสต์ประมาณ  $1.5 \times 10^8$  เชลล์/มิลลิเมตร และได้ปริมาณเอทานอลระหว่าง 6-9% w/v อย่างไรก็ตามระบบการหมักจะพิจารณาถึงการเจริญของยีสต์และการผลิตเอทานอลโดยคำนึงถึงปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น การเลือกสารตั้งต้น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส และถังหมัก เป็นต้น

#### **2.1.4 ถังหมัก (Fermenter) (ไฟรอน กิจจะพานิช, 2539: 46-47)**

ถังหมักโดยแท้จริงแล้วมีประเภทหลักๆ อยู่เพียงไม่กี่ประเภท แต่ที่พบจะมีส่วนประกอบและลักษณะการทำงานที่แตกต่างกันออกไปหลายแบบ ดังเดตแบบง่ายๆ จนถึงมีระบบที่ซับซ้อน เช่นนี้ก็ เพราะถังหมักได้รับการปรับปรุงพัฒนาด้วยเปลี่ยนเพื่อความเหมาะสมหรือเพื่อแก้ปัญหาสำหรับการหมักแต่ละแบบ ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะการแบ่งตามลักษณะการหมุนเวียนของสารในปฏิกริยาการหมัก

สารในปฏิกริยาการหมักในที่นี้ หมายถึง สารอาหารซึ่งเป็นสารตั้งต้น สารผลผลิตที่ได้จากการหมักและเชลล์จุลินทรีย์ ซึ่งทั้งหมดนี้รวมผสมกันอยู่ในของเหลวที่เรียกว่าน้ำหมัก (fermentation broth) นอกจากนี้รวมถึงออกซิเจน หรืออากาศ และก๊าซอื่นๆ ที่ช่วยให้จุลินทรีย์ บางชนิดเกิดการหมักภายในได้บรรยายของก๊าซอื่นที่ไม่ใช่ออกซิเจน ซึ่งทั่วไปมักใช้ในก๊าซในโตรเจน หรือคาร์บอนไดออกไซด์ การแบ่งโดยพิจารณาการหมุนเวียน (circulation) และถ่ายเทน้ำเสียงและก๊าซเข้า-ออกจากถัง สามารถแบ่งถังหมักออกได้ 4 ประเภท ดังนี้

##### **(1) ปฏิกริยาปิด (Closed Reactor)**

ถังหมักประเภทนี้ เมื่อเริ่มดำเนินการหมักจะเติมของเหลวซึ่งประกอบด้วยอาหารที่เหมาะสมและก๊าซเชื้อจุลินทรีย์ และบรรจุก๊าซตามต้องการลงในที่ว่างเหนือของเหลวในถังหมักแล้ว ปล่อยให้การหมักดำเนินไป โดยไม่มีการถ่ายเทของเหลวหรือก๊าซเข้า-ออกจากถังหมัก จนกว่าการหมักจะสิ้นสุดลง ความเข้มข้นของสารต่างๆ เช่น สับสเตรทและสารผลผลิต และความเข้มข้นของเชลล์ในน้ำหมักจะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดช่วงเวลาของการหมัก

##### **(2) ปฏิกริยา半ปิด (Semi - closed Reactor)**

ถังหมักแบบปฏิกริยานี้ปิดนิ่มคล้ายกับถังหมักแบบปฏิกริยาปิด คือไม่มีการถ่ายเทน้ำหมักเข้า-ออกในระหว่างการหมัก แต่ส่วนที่ต่างก็คือ ถังหมักแบบปฏิกริยานี้ปิดมีการหมุนเวียนอากาศ หรือก๊าซเข้า-ออก ในระหว่างการหมัก

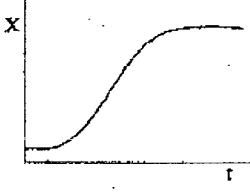
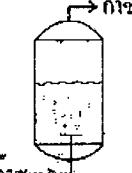
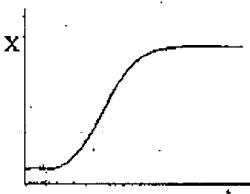
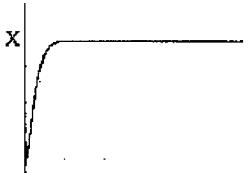
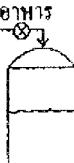
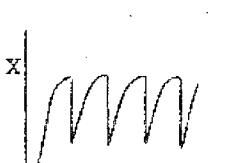
### (3) ปฏิกรณ์เปิด (Open Reactor)

ถังหมักประเภทนี้ เมื่อเริ่มทำการหมักจะบรรจุอาหารลงในถังหมัก แล้วปล่อยให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตจนได้ปริมาณเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงพอ จากนั้นจึงเริ่มการถ่ายเทน้ำหมักออกจากถังหมัก และเติมสารละลายอาหารใหม่เข้าไปด้วยอัตราที่เหมาะสมตลอดเวลาทำการหมัก โดยอัตราการเติมสารละลายอาหารและการถ่ายเทน้ำหมักจะต้องเท่ากัน เพื่อรักษาระดับของของเหลวในถังหมักให้คงที่ สภาวะการหมักในถังหมักประเภทนี้จะต้องควบคุมให้อยู่ในสภาวะคงตัว (steady state) จึงจะสามารถดำเนินการหมักได้อย่างต่อเนื่อง ความเข้มข้นของเซลล์และสารต่างๆ ในถังหมักประเภทนี้จะคงที่ตลอดเวลา

### (4) ปฏิกรณ์วงรอบ (Cycle Reactor)

ถังหมักแบบปฏิกรณ์วงรอบ มีลักษณะการทำงานเป็นแบบปฏิกรณ์ปิด แต่มีการถ่ายเทน้ำหมัก และเติมสารละลายอาหาร ณ เวลาที่เหมาะสม เมื่อเริ่มดำเนินการหมักจะบรรจุสารละลายอาหารในถังหมัก แล้วปล่อยในการหมักดำเนินต่อไป โดยไม่มีการเติมและถ่ายน้ำหมักจนถึงเวลาที่เหมาะสม เช่น ได้ผลผลิต หรือเซลล์ที่มีความเข้มข้นสูงพอ จึงถ่ายน้ำหมักออกพร้อมกับเติมสารละลายอาหารใหม่ลงไปแทน จากนั้นก็กลับอยู่ทำการหมักดำเนินไปแบบปฏิกรณ์ปิดอีกโดยการถ่ายน้ำหมักและเติมอาหารจะกระทำเฉพาะที่เวลาเหมาะสม เป็นช่วง หรือเป็นวงรอบนั้นเอง

ตารางที่ 2.1 ถังหมักแบบต่างๆ แบ่งตามการหมุนเวียนสารในปฏิกรณ์การหมัก

ประเภทถังหมัก	ลักษณะ	ความเข้มข้นของ เซลล์ระหว่างการหมัก
ก. ปฏิกรณ์ปิด		
ข. ปฏิกรณ์ทึบไว้		
ค. ปฏิกรณ์วน		
ง. ปฏิกรณ์วงรอบ		

### 2.1.5 การทำปลอดเชื้อ (Sterilization) (ไฟรอน์ กิจจะพานิช, 2539: 48)

การทำปลอดเชื้อเป็นมีกล้าเชื้อจุลินทรีย์ อาหาร และสภาวะรอบๆ เชลล์ที่เหมาะสม จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม เช่น ในดิน น้ำ และอากาศ มีมากหลายสายพันธุ์ ซึ่งบางพวกมีความใกล้เคียงกัน และสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่คล้ายกัน ดังนั้นการทำปลอดเชื้อที่เกิดจากจุลินทรีย์สายพันธุ์หนึ่งอาจถูกปนเปื้อน (contaminate) หรือรบกวนโดยจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ ถ้าไม่มีการป้องกันที่ดีพอ ผลเสียที่เกิดจากการปนเปื้อนนั้นมีหลายประการ ได้แก่ ทำให้เบอร์เซ็นต์ผลผลิตจากการหมักต่ำ ทั้งนี้ เพราะสับสเตรทบางส่วนถูกใช้โดยจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ บางครั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนจะสร้างผลผลิตข้างเคียง และแยกออกจากผลผลิตที่ต้องการ ได้ยาก หรือจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอาจทำลายหรือฆ่าจุลินทรีย์ที่เป็นกล้าเชื้อทำให้การทำปลอดล้มเหลวได้

การทำปลอดเชื้อ (sterilization) คือ การแยกหรือทำลายจุลินทรีย์ การแยกน้ำมักทำโดยวิธีการกรอง (filtration) ส่วนการทำลายนั้นกระทำได้หลายวิธี ทั้งวิธีทางกายภาพและทางเคมี ได้แก่ ใช้ความร้อน ความดัน การแช่แข็ง บด รังสี คลื่นแสง กระแสไฟฟ้า และสารเคมี ฯลฯ

ในการหมักแต่ละครั้ง สิ่งที่ต้องผ่านการทำปลอดเชื้อ ได้แก่ สารละลายอาหาร ถังหมัก และชิ้นส่วนอุปกรณ์ที่จะสัมผัสกับน้ำหมัก สารละลายที่ต้องเติมลงในน้ำหมักจะดำเนินการทำปลอดเชื้อ กรณี เบส รวมทั้งก้าซอกรซิเจนหรืออากาศในกรณีของการหมักที่ใช้อกซิเจน ถ้าพิจารณาสิ่งที่กล่าวมา อาจจำแนกได้ 3 กลุ่ม คือ สารละลายอาหารและสารเคมี ถังหมักและอุปกรณ์ และก้าซอกรซิเจน ถังหมัก และอุปกรณ์เป็นกลุ่มที่ทำการปลอดเชื้อได้ง่าย ทั้งนี้เป็นเพราะเป็นอุปกรณ์ที่ทำความสะอาดได้ดี ทนทานต่อความร้อน สามารถให้ความร้อนจนแน่ใจว่าปราศจากจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่โดยไม่มีการสูญเสียทางคุณภาพใดๆ ต่างจากพอกสารละลายโดยเฉพาะอาหาร ถ้าทำการให้ความร้อนมากเกินไป จะทำให้คุณภาพของอาหารเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการ การให้ความร้อนแก่สารละลาย เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่มีชีวิตให้หมดอย่างแน่นอน โดยที่สารละลายยังคงรักษาคุณภาพเดิม ไว้ได้ ปัจจุบันมายของการทำการปลอดเชื้อ กรณีก้าซอกรซิเจนทำปลอดเชื้อโดยการกรองซึ่งสะดวกกว่า วิธีอื่น

### 2.1.6 การตรึงเซลล์ (Cell Immobilization) (ภาวิณี คณาสวัสดิ์, 2537 : 42-49).

การทำปลอดเชื้อเกิดขึ้นจากความคิดของการสังเกตธรรมชาติ แล้วนำมาดัดแปลง เช่น พิจารณาการทำงานของจุลินทรีย์ในดินแล้วนำมาดัดแปลงใช้ในการตรึงจุลินทรีย์ เป็นต้น นอกจากนี้ ยังได้แนวความคิดจากการบวนการใช้จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมบางชนิดที่มีเซลล์ของจุลินทรีย์จับที่ผิวของของแข็งหรือสร้างเป็นฟิล์ม เช่น ในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นต้น

มีการอธิบายถึงการทำปลอดเชื้อเป็นครั้งแรกในปี ก.ศ. 1966 และหลังจากนั้นเป็นต้นมา งานวิจัยทางด้านนี้ได้มีเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว และประสบผลสำเร็จในระดับอุตสาหกรรมเมื่อไม่นานมานี้ แต่ความสำเร็จนี้ยังคงอยู่ในขอบเขตของการใช้เซลล์ที่มีปฏิกริยาขั้นตอนเดียว เอนไซม์ที่พบในเซลล์ซึ่งประสานผลลัพธ์เรื่องตั้งกล่าว ได้แก่ อะมิโนเอซิเลส (amino acidase) เพนิซิลลินเอซิเลส

(penisilin asilase) กลูโคสไอโซเมอเรส (glucose isomerase) และส파ร์เทส (aspartase) ฟูมาราส (fumarase) เลคแทส (lectase)

เนื่องจากการประยุกต์ใช้เซลล์ตระกูลในทางอุตสาหกรรม ได้พัฒนาไปอย่างรวดเร็วโดยขาดความรู้พื้นฐาน ดังนั้น ปัจจุบันมีงานวิจัยอีกส่วนหนึ่งขึ้นเพื่อช่วยในการกระบวนการจ้างซึ่งทำได้โดยใช้การศึกษารายละเอียดของปฏิกิริยาหลายขั้นตอน (multi-step reaction) ของกระบวนการหมัก และการเปลี่ยนสารผลิตภัณฑ์ของการหมักไปเป็นสารอื่น โดยใช้ออนไซม์เดี่ยวรวมถึงการศึกษาวิถีแมลงแพทย์ (metabolic pathway) ระบบการใช้ออนไซม์หลายชนิด (multi-enzyme system) การใช้โคแฟคเตอร์ พลังงานเอนทีพี (ATP) ที่ต้องการ และที่ให้ออกมาจากการกระบวนการครึ่งองค์ประกอบของเซลล์ การครึ่งสปอร์ การครึ่งเซลล์ร่วม (co-immobilization of cells) โดยใช้เซลล์หลายชนิด นอกจากนี้ ยังมีผลงานจากการครึ่งเซลล์พืช และการครึ่งเซลล์สัตว์ ที่ช่วยให้ความกระจ่างสำหรับปฏิกิริยาที่ซับซ้อน

ลักษณะของปฏิกิริยาการเร่งของระบบเซลล์ตระกูลมีความซับซ้อน ดังนี้

- (1) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั้งหมดใช้ออนไซม์ชนิดเดียวเท่านั้น
- (2) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีอ่อนไหวมายาชนิดและไม่ใช้โคแฟคเตอร์ที่จำเพาะ
- (3) ต้องการโคแฟคเตอร์ไม่ว่าจะเป็นปฏิกิริยาขั้นตอนเดียวหรือหลายขั้นตอน
- (4) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้น รวมเอาปฏิกิริยาทั้งหมดของกระบวนการเมทานอลิซึ่งทั้งหมดได้แก่ กรณีที่ได้สารผลิตภัณฑ์จากการหมัก เช่น เอนไซม์ กรดอะมิโน เป็นต้น

แม้ว่าการครึ่งเซลล์จะมีความซับซ้อนของปฏิกิริยาต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นนี้ การประยุกต์ใช้เซลล์ตระกูลเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ขยายขอบเขตอย่างกว้างขวางในทางเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปแล้วการครึ่งเซลล์จุลินทรีย์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับการครึ่งเซลล์พืชและเซลล์สัตว์

#### **2.1.6.1 การเปรียบเทียบการครึ่งเซลล์และการครึ่งออนไซม์**

ในหลายๆ กรณีที่การใช้เซลล์จุลินทรีย์ตระกูล จะช่วยลดขั้นตอนในทางปฏิบัติที่ต้องมีการลงทุนสูง เช่น การสกัด การแยก และการทำออนไซม์ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ให้บริสุทธิ์ โดยปกติความเสถียรของออนไซม์ที่ต้องการจะสูงขึ้น ได้ด้วยการรักษาสภาวะแวดล้อมให้เหมือนธรรมชาติในระหว่างการครึ่ง และการนำไปใช้งานต่อไป ซึ่งจะทำได้โดยการครึ่งเซลล์ด้วยการด้อมรอบไว้ภายในภาชนะที่ใช้ครึ่งสารอาหารและสารผลิตภัณฑ์สามารถซึมน้ำผ่านเข้าออกได้

ในระบบที่ต้องใช้ออนไซม์หลายชนิดจะทำให้เห็นชัดว่าการใช้เซลล์ตระกูลให้ความสะดวกมากกว่าการใช้ออนไซม์ตระกูลที่ต้องใช้ในปฏิกิริยาต่างๆ นั้น จะถูกต้องไว้ในเซลล์เช่นเดียวกับออนไซม์ และไม่ต้องสิ้นเปลืองกับกระบวนการแยกออนไซม์ต่างๆ ออกจากเซลล์ อ่อนไซม์และโคแฟคเตอร์จะไม่เปลี่ยนแปลง และยังคงอยู่ในสภาวะแวดล้อมภายในเซลล์ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของออนไซม์

ผลยกรณีของการตรึงเชลล์ด้วยการตักขับหรือการล้อมรอบจะทำให้เชลล์มีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม ( เช่น อุณหภูมิ พื้นที่ และความชื้นของไอกอนในสารละลายน้ำ) ได้ดีกว่าเชลล์อิสระ นอกจากนี้ยังพบว่าเชลล์ตรึงจะได้รับการป้องกันจากสารบางชนิด ( เช่น ออกซิเจน ไอกอนของโลหะบางชนิด ) ได้ดีกว่าเชลล์อิสระ

เนื่องจากเอนไซม์ตรึงจะมีปริมาณของเอนไซม์เพิ่มขึ้นในระบบการทำงาน ลักษณะเช่นนี้จะทำให้แยกตัวของเอนไซม์ลดลง เพราะผลของการประทະระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยกัน แต่ในระบบเชลล์ตรึงนั้น จะไม่ทำให้แยกตัวของเอนไซม์ลดลง แม้ว่าจะมีเชลล์จำนวนมาก ( 109 เชลล์ ต่อสารพาหะ 1 ลบ.ซม. )

แม้ว่าการใช้เชลล์ตรึงจะมีข้อได้เปรียบมากกว่าเอนไซม์ตรึง แต่ระบบเชลล์ตรึงยังมีข้อบกพร่อง 3 ประการ ดังนี้

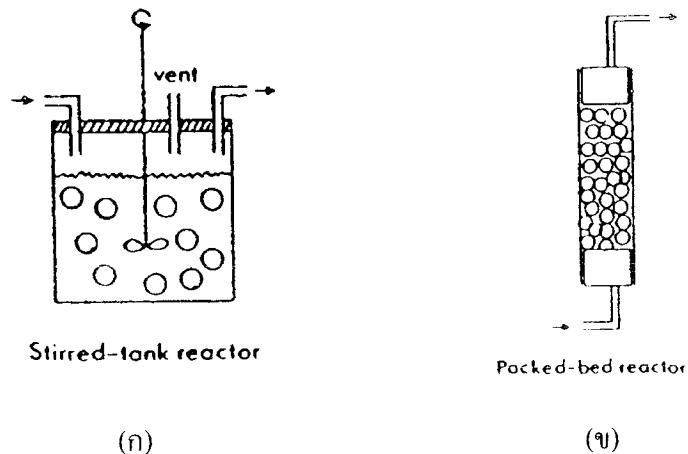
(1) การรักษาสภาพธรรมชาติให้คงตัว ทั้งนี้เนื่องจากเชลล์ตรึงมักจะไม่เจริญเติบโต และโดยธรรมชาติแล้วเชลล์ที่ไม่เจริญเติบโตมักจะสูญเสียความสามารถในการทำงาน ดังนั้น ในทางปฏิบัติจึงต้องให้อาหารกับเชลล์ตรึงตลอดเวลา ทั้งนี้เพื่อให้เชลล์มีชีวิตอยู่ได้และมีประสิทธิภาพในการทำงาน

(2) เชลล์ตรึงจะมีปัญหาของการแพร่กระจาย และการขนส่งสารละลายน้ำอาหารและสารผลิตภัณฑ์ผ่านสารพาหะที่ใช้ตรึง

(3) สารละลายน้ำอาหารและสารผลิตภัณฑ์อาจจะทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการ

#### 2.1.6.2 การเปรียบเทียบการหมักด้วยการใช้เชลล์ตรึงและการหมักแบบคงที่โดยใช้เชลล์อิสระ

การหมักแบบคงที่โดยใช้เชลล์อิสระนั้น เป็นการเดี่ยงเชลล์จุลินทรีย์ด้วยสารละลายน้ำอาหารในถังหมักแบบคงที่ (batch fermentor) (ภาพที่ 2.5 ก) การหมักวิธีนี้มีข้อเสียหลายประการ ดังนี้ จึงได้มีการพัฒนาเชลล์ตรึงขึ้นมาใช้ การใช้เชลล์ตรึงในกระบวนการหมักมีความได้เปรียบการใช้เชลล์อิสระ เพราะเชลล์ตรึงจะทำให้ใช้กันถังหมักแบบต่อเนื่องซึ่งมีลักษณะเป็นคอลัมน์ (continuous column reactor) (ภาพที่ 2.5 ข) ได้ซึ่งถังหมักในลักษณะคอลัมน์นี้จะช่วยลดขนาดของเครื่องมือต่างๆ ที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรมให้มีขนาดเล็ก และทำให้ทำงานได้ในเนื้อที่น้อยลง ซึ่งจะส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการลงทุนลดลงตามไปด้วย นอกจากนี้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องยังมีข้อได้เปรียบอีกหลายประการ ได้แก่ ทำให้ควบคุมกระบวนการหมักได้ดีกว่าลดระยะเวลาของการผลิตสาร ได้สารผลิตภัณฑ์ในรูปแบบที่คงที่ตลอดกระบวนการ ใช้สารละลายน้ำอาหารที่เจือจาก ซึ่งจะทำให้ไม่สิ้นเปลือง เพราะสารอาหารจะถูกใช้ไปจนหมด และประสิทธิภาพสูงที่สุด คือ ทำให้ไม่มีสารที่เป็นอันตรายต่อการทำงานของเชลล์ตกล้างอยู่ในคอลัมน์ เพราะมีการไหลผ่านของสารละลายน้ำอาหารตลอดเวลา ดังนั้น จึงช่วยให้ประสิทธิภาพการผลิตสารสูงขึ้น



ภาพที่ 2.5 ชนิดของถังหมัก

(ก) = ถังหมักแบบคงที่ (ข) = ถังหมักแบบต่อเนื่อง

ในการปฏิที่เซลล์ของเซลล์ตระหง่านไม่เจริญเติบโต แต่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ต้องการ โดยที่ไม่มีปฏิกิริยาอื่นแทรกซ้อน จะทำให้ระบบเซลล์ตระหง่านผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้เร็วกว่าการใช้เซลล์อิสระ ทั้งนี้ เพราะเซลล์ตระหง่านมีความหนาแน่นของเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรสารละลายน้ำมากกว่าเซลล์อิสระ

ในระบบเซลล์ตระหง่านนั้นสามารถนำเซลล์ตระหงันกลับคืนมาใช้ใหม่ และสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ด้วยการใช้สารละลายน้ำเจือจาง ซึ่งทำให้มีความสะดวกต่อการเตรียมสารละลายน้ำ และต่อการใช้งานซึ่งเป็นปัญหาของการหมักแบบเก่า เพราะการใช้สารอาหารที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้สารละลายน้ำเจือจางนี้ดี ซึ่งจะเป็นผลให้การแพร่กระจายของสารละลายน้ำเจ้าไปยังเซลล์มีอัตราต่ำ

ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนี้ จะพบว่าเซลล์ตระหง่านมีความได้เปรียบกว่าเซลล์อิสระอย่างไรก็ตามการใช้เซลล์ตระหง่านมีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ การแพร่กระจายของสารละลายน้ำเจือจางที่ต้องให้เนอนไนโตรมายในเซลล์ไม่สามารถทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ โดยทั่วไปแล้วเนอนไนโตรมายในเซลล์ตระหง่านไม่สามารถทำงานได้เต็มที่ เนื่องจากความผิวของเซลล์ตระหง่าน จากการศึกษาพบว่าข้อบกพร่องนี้ถูกทำให้ลดลงได้ด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

(1) ทำการตระหง่านให้มีเซลล์อยู่ที่พื้นที่ผิวมากที่สุด

(2) ลดขนาดของเซลล์ตึง ซึ่งทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสกับสารละลายอาหารได้มากขึ้น แต่จะต้องไม่ทำให้มีขนาดเล็กจนเกินไป เพราะจะทำให้เกิดความยุ่งยากในการไหลผ่านของสารละลายอาหาร

(3) เพิ่มความเข้มข้นของสารอาหาร แต่วิธีนี้จะต้องระวังไม่ให้มีความเข้มข้นสูงจนเกินไป เพราะจะทำให้มีปัญหาในขั้นตอนการแยกสารผลิตภัณฑ์ และทำให้ไม่สามารถหมุนเวียนสารละลายอาหารกลับคืนมาใช้ใหม่ เนื่องจากสารละลายอาหารจะมีความหนืดสูงขึ้น

(4) เพิ่มขนาดครูพรุนของพาหะตึง ซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราการแพร่กระจาย แต่กรณีนี้จะใช้ได้เฉพาะเซลล์ที่มีขนาดใหญ่

(5) ลดปริมาณของเซลล์ที่นำมาตึงต่อหน่วยน้ำหนักของสารพาหะ แต่ถ้าจะลดลง เช่นนี้จะทำให้ความจุของเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์มีปริมาณลดลง

การแก้ไขข้อบกพร่องด้วยวิธีที่กล่าวข้างต้นนี้ จะต้องเลือกให้เหมาะสมกับงานที่ต้องการ

#### **2.1.6.3 สารพาหะที่ใช้ตึงเซลล์**

มีสารละลายนิดที่สามารถใช้จับหรือยึดหรือตึงเซลล์ได้ ซึ่งสารแต่ละชนิดมีความเหมาะสมในการตึงเซลล์ได้แตกต่างกัน สารเหล่านี้บางชนิดจะมีกลุ่มฟังก์ชันนัลที่สามารถจับกับผนังเซลล์ได้ ในการเลือกใช้สารพาหะเพื่อทำการตึงเซลล์นั้น ส่วนมากจะอาศัยความสัมภากัด ประกอบกับความชำนาญ จากผลงานวิจัยจนถึงปัจจุบันจะพบว่ามีสารจำนวนน้อยมากที่ดูเหมือนว่าจะใช้ตึงเซลล์ได้ทุกกรณี แต่อย่างไรก็ตาม ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับกลไกการจับยึดของเซลล์กับสารพาหะ รวมทั้งสมบัติของสารพาหะและผลกระทบต่อเมทabolismของเซลล์จะเกิดขึ้นได้จากการประยุกต์ใช้เซลล์ตึงในแต่ละกรณี

สารพาหะที่ใช้ในการตึงเซลล์สู胤ินทรีย์ แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ สารพาหะที่เป็นสารอินทรีย์และสารพาหะที่เป็นสารอนินทรีย์ แต่สารที่นำมาใช้มาก คือ กลุ่มแรก ทั้งนี้เนื่องจาก มีกลุ่มฟังก์ชันนัลจำนวนมาก ที่สามารถทำปฏิกิริยากับกลุ่มต่างๆ ของผนังเซลล์ ซึ่งส่วนมากเป็นกลุ่มอะมิโน คาร์บอชิล และ ไฮดรอกซิล

##### **(1) สารอินทรีย์**

สารอินทรีย์ที่ใช้เป็นพาหะในการตึงเซลล์ จัดแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ พอลิเซ็คคาโรต์ โพรตีน และพอลิเมอร์สังเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 2.2 เทคนิคในการตึงที่ใช้สารเหล่านี้เป็นสารพาหะ ได้แก่ การดูดซับ การยึดโดยใช้พันธะโคลเวเลนท์ การเชื่อมไขว้ การดักจับและการล้อมรอบ

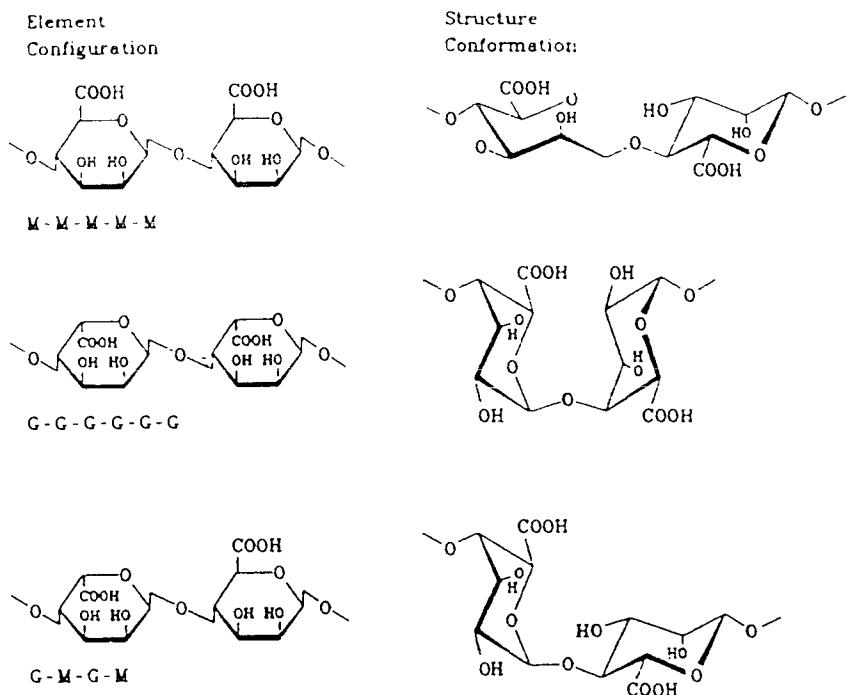
ตารางที่ 2.2 สารอินทรีย์ที่ใช้เป็นพาหะในการตรึงเซลล์

โพลิแซ็กคาไรด์	โปรตีน	โพลิเมอร์สังเคราะห์
เซลลูโลส	คอลลาเจน	โพลิเอไครเลไมค์
เอกสาร์/อกาโรส	เจลาติน	เมทาไครเลต
ชิตโตซาน	อัลบูมิน	โพลิยูเรเทน
เดกซ์แทรน	ไฟบริน	ເອພອກซີເຮັສິນ
คาร์ราจิเนน		ພອລິສໍໄຕຣິນ
อัลจิโนต		ພອລິໂສເຕອວ໌
ເພົດທະດ		ພອລອໂພຣພິລິນ
ແຫຼນແຫັນກົມ		ພອລິຟິນລິນອອກໄຈດໍ
		ພອລິໄວນິລແອລກອອກລໍ
		ພອລິໄວນິລຄຄອໄຣດໍ

### (1.1) อัลจิโนต (alginic)

อัลจิโนตเป็นพาหะที่ใช้ดักจับเซลล์ได้ง่ายและสะดวก ดังนั้นในปัจจุบัน จึงนำมาใช้กันมาก เมื่อพิจารณาจากจำนวนงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ พบร่วมกับอัลจิโนตเป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้กันมากที่สุด อัลจิโนตมีโครงสร้างทางเคมี ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มการรับออกซิลในแต่ละหน่วยย่อย (โนโนแซ็กคาไรด์) ที่จะไปขัดจับกับไอออนของโลหะบางชนิด เช่น  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  และ  $\text{Al}^{3+}$  (ภาพที่ 2.6) เป็นต้น ทำให้ได้เจลที่มีความเสถียรและตรึงเซลล์โดยวิธีดักจับได้ในสภาพที่ไม่รุนแรง เป็นผลให้เซลล์ส่วนมากมีชีวิตอยู่ได้ ลักษณะรูปร่างของเจลที่ตรึงเซลล์จะเป็นเม็ดกลม ซึ่งเตรียมได้โดยการดูดสารละลายผสมของเซลล์ความเข้มข้น 1-2% w/v กับโซเดียมอัลจิโนต ความเข้มข้น 1-7% w/v ผ่านเข็มฉีดยา แล้วรองรับหยดของสารผสมนี้ด้วยสารละลายของแคลเซียม-คลอไรด์ที่เย็นความเข้มข้น 0.05-0.5 M ปล่อยให้มีค่าเจลอยู่ในสารละลายเป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ทั้งนี้เพื่อให้เม็ดเจลมีความแข็งแรงมากขึ้น เพราะแคลเซียม ไอออนจะเข้าไปแทนที่โซเดียม ไอออนของโซเดียมอัลจิโนต ความแข็งของเม็ดเจลจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของโซเดียมอัลจิโนต อัตราส่วนของกรดเมนนูโรนิกและกรดคุกคุกโรนิกมีผลต่อความเสถียรของเจล โดยถ้าหากมีคุกคุกโรนิกจำนวนมาก จะทำให้เจลมีความเสถียรลง

## กระบวนการและผลิตภัณฑ์ อัลจิเนต



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของอัลจิเนต

ข้อนกพร่องในการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนต คือ เม็ดเจลที่ตรึงเซลล์จะละลายในสารละลายที่มีไอออนหรือโมเลกุลที่สามารถจับกับ  $\text{Ca}^{2+}$  ได้ ตัวอย่างเช่น พอสเฟต ซิเตรต และ EDTA เป็นต้น ในกรณีที่ความเข้มข้นของไอออนเหล่านี้ไม่สูงมาก จะทำให้เม็ดเจลคงรูปอยู่ได้ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของ  $\text{Ca}^{2+}$  หรือใช้สารประกอบพอลิเออมีน (เช่น พอลิอะลิลินอามีน พอลิโพรพีลีนอามีน) และตามด้วยการเชื่อมไขว้โดยใช้กลูเทรัลไดไฮด์ จากการตรึงเซลล์ยึดติดพบร่วมกับเซลล์ตรึงที่ผ่านการเคลือบด้วยพอลิเออมีนและกลูเทรัลไดไฮด์จะผลิตการทำงานลดได้ในปริมาณเท่ากับเซลล์ตรึงที่ไม่ผ่านการใช้สารทั้งสอง แต่เม็ดเจลในกรณีแรกจะมีความเสถียรโดยที่อยู่ในสารละลายฟอสเฟตไดเป็นเวลานาน

### (2) สารอนินทรีย์

สารอนินทรีย์ที่ใช้เป็นพาหะในการตรึงเซลล์ไดแก่ สารประกอบออกไซด์ที่พบในธรรมชาติ เช่น อลูมينا เซอร์โคเนียม (zirconia) แมกนีเซียม (magnesia) ซิลิกา แก้ว เชรามิกส์ ทราย ทิทานเนียม (titania) เฟอร์โรเมกเนท (ferromagnet) และสารอื่นๆ ที่เป็นอนุพันธ์ของสารเหล่านี้ซึ่งได้จากปฏิกิริยาจับกับโลหะ โดยทั่วไปสารพาหะประเภทนี้สามารถต่ออุณหภูมิสูง เมื่อผสมกับตัว

ทำผลลัพธ์จะมีลักษณะขึ้นเหนือกว่า และบริเวณผิวของสารเหล่านี้จะถูกไฮโดรไคลอส์ทำให้มีกลุ่มไฮดรอกซิลเกิดขึ้น ซึ่งจะจับเข้ากับกลุ่มคาร์บอนออกซิลและ/หรือกลุ่มอะมิโนของพนังเซลล์ เทคนิคที่นิยมใช้สารอนินทรีย์เป็นพาหะในการตรึงเซลล์ ได้แก่ การดูดซับ และการใช้พันธะโโคเวเลนท์

#### 2.1.6.4 ข้อดีและข้อเสียในการเลือกใช้สารพาหะ

กลไกที่ทำให้เซลล์ของชุดนิทรีย์ถูกตรึงบนสารพาหะได้ มีดังนี้

(1) แรงดึงดูดประจุระหว่างเซลล์และสารพาหะที่มีประจุ

(2) การสร้างพันธะไออกอนิกระหว่างกลุ่มอะมิโนและกลุ่มคาร์บอนออกซิลของเซลล์

กับกลุ่มต่างๆ บนผิวของสารพาหะ

(3) พันธะโโคเวเลนท์อย่างอ่อนระหัวงกลุ่มคาร์บอนออกซิลและกลุ่มอะมิโนบนพนังเซลล์กับกลุ่มไฮดรอกซิลบนผิวของเซรามิกส์หรือสารพาหะประเภทแก้ว

(4) การดูดติดอย่างจำเพาะ (biospecific adsorption) บนลิแกนด์ที่ถูกตรึง (immobilized ligand) โดยการใช้บริเวณของการรับอย่างจำเพาะ (specific receptor site) บนพื้นผิวนอกของเซลล์ ยึดกับพาหะตรึงที่เป็นของแข็ง

(5) การสร้างพันธะโโคเวเลนท์ระหว่างกลุ่มที่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยานพิเศษของเซลล์ และกลุ่มที่เปลี่ยนแปลงของสารพาหะที่เตรียมอนุพันธ์เชิงกัมมันต์ด้วยการใช้สารต่างๆ เหล่านี้ ไอโซไซยาเนต อัมิโนไซเดน กลูเทรอลดีไฮด์ คาร์บอโนไดอิมายด์ และอิมิโดเอสเตอร์

(6) การดักจับไว้ภายในโพลิเมอร์ ซึ่งจะเป็นการจับเซลล์ไว้แต่จะมีการซึมผ่านของสารอาหารของเซลล์ และสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเซลล์

เซลล์ชุดนิทรีย์และพนังสปอร์มีโครงสร้างที่ซับซ้อนมาก โดยทั่วไปเซลล์ชุดนิทรีย์ทุกชนิดจะมีประจุลบที่ภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์ แต่เซลล์มีสปอร์นั้นจะมีโครงสร้างที่มีความแตกต่างกันในกลไก 4 ประการแรกข้างต้นนี้จัดเป็นการตรึงด้วยการดูดซับ เมื่อต้องการตรึงเซลล์ชุดนิทรีย์ด้วยกลไกดังกล่าวเนื่องจากสารพาหะที่มีประจุบวก เช่น DEAE-sephadex amberlite

#### (1) ปัจจัยในการเลือกสารพาหะ

(1.1) ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อม

(1.2) ไม่กระทบกระเทือนต่อระบบเมแทบoliซึม

(1.3) ความจุของสารพาหะ (ปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึงต่อสารพาหะ 1 กรัม)

และการตรึงด้วยวิธีดักจับจะทำให้โพลิเมอร์ชุดนี้ได้มากกว่าการตรึงด้วยวิธีดูดซับ

(1.4) การตรึงเซลล์ในสภาพปลอดเชื้อ (sterile) จะต้องเลือกสารพาหะที่ทนต่อความร้อนได้สูง เนื่องจากจะต้องทำให้สารพาหะนั้นปลอดเชื้อ ซึ่งต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูง

(1.5) การตรึงเซลล์ปริมาณมากควรจะเลือกใช้พาหะที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ ทั้งนี้ เป็นการช่วยให้สับสเตรทซึมผ่านได้ดี

(1.6) ถ้าเป็นไปได้ ควรจะเลือกสารพาหะที่มีราคาถูกและสามารถนำกลับคืนมาใช้ได้ออก

จุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตการ เมือก กัม (gum) และสารอื่นๆ ที่ทำให้จุลินทรีย์ยึดกับสารพาหะ ได้โดยธรรมชาติ สมบัติดังกล่าวที่ได้มีการศึกษาเฉพาะในกรณีการกำจัดน้ำทึบเท่านั้น ส่วนประโยชน์ทางด้านอื่นนั้นยังไม่มีการวิจัย

#### 2.1.6.5 เทคนิคการตรวจเชลล์

เทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจเชลล์นั้นได้ดัดแปลงมาจากเทคนิคการตรวจเอนไซม์เนื่องจากการตรวจเชลล์จะต้องใช้เชลล์ปริมาณมาก ดังนั้น จึงทำให้มีเทคนิคใหม่ๆ ที่ใช้สำหรับตรวจเชลล์ แต่ไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจเอนไซม์เนื่องจากเอนไซม์เป็นโมเลกุลที่เล็กกว่าเชลล์ ในการตรวจเชลล์จะมีเทคนิคหลักอยู่ 4 วิธี ดังนี้

(1) การ เชื่อม ไขวข่องเชลล์โดยอาศัยสารที่มีกลุ่มฟังก์ชันนัล 2 กลุ่ม เป็นสารที่เชื่อมระหว่างเชลล์ด้วยกัน

(2) การใช้พันธะโโคเวเลนที่เชื่อมเข้ากับพาหะของเจ็ง

(3) การคุดซับบนสารพาหะของเจ็ง

(4) การดักจับ ไว้ด้วยพาหะประเภทพอลิเมอร์หรือเส้นใย หรือล้อมรอบด้วยแคปซูลขนาดเล็ก ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ตรวจเชลล์ได้ผลดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องการรักษาให้จุลินทรีย์นั้นมีชีวิตอยู่ได้

**2.1.7 กล้องจุลทรรศน์** (<http://61.19.145.7/student/science401/bio/bio2-2/micro.htm>: 2 มีนาคม 2549).

กล้องจุลทรรศน์ เป็นเครื่องมือสำคัญของนักชีววิทยา เพราะกล้องจุลทรรศน์ช่วยให้ศึกษาโครงสร้างและส่วนประกอบของเชลล์และสิ่งมีชีวิตเล็กๆ ได้ กล้องจุลทรรศน์แต่ละแบบจะให้กำลังขยายที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพและลำแสงที่ใช้

กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้กันทั่วไปแบ่งตามแหล่งกำเนิดแสงได้เป็น 2 ชนิด คือ

(1) กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสง (Light Microscope) หรือ L.M. ใช้แสงที่มองเห็นได้เป็นตัวให้แสง โดยแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

(1.1) กล้องจุลทรรศน์อย่างง่ายหรือแวนนิช (Simple Microscope or Magnifying Glass) ประกอบด้วยเลนส์นูนเพียงอันเดียว วัตถุประสงค์ในการใช้ก็เพื่อบาധวัตถุที่ดูให้ใหญ่ขึ้น เพื่อที่จะเห็นรายละเอียดให้ชัดเจนยิ่งขึ้น ภาพที่ได้จะเป็นภาพเสมือน และข้อสำคัญก็คือวัตถุต้องอยู่ห่างจากเลนส์อย่างกว่าทางยาวไฟก้าสของเลนส์นั้น

(1.2) กล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน (Compound Light Microscope) เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงและมีระบบเลนส์ที่ทำหน้าที่ขยายภาพ 2 ชุด มีการขยายภาพ 2 ครั้ง กล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อนมีหลายชนิด แต่ชนิดที่ใช้ในการส่องดูสิ่งต่างๆ ทั่วไปเป็นชนิด bright field

microscope เมื่อศึกษาด้วยกล้องชนิดนี้จะพบว่า พื้นที่ร่อง ๆ ตัวอย่างจะสว่าง ส่วนตัวอย่าง (Specimen) หรือวัตถุที่นำมาส่องจะมืดหินกว่า

(2) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron Microscope) หรือ E.M. ประดิษฐ์ขึ้นครั้งแรกให้ประเทศไทยมีเมื่อปี พ.ศ. 2475 โดยนักวิทยาศาสตร์ 2 ท่าน คือ แมกซ์ นอลล์ และ เอร์นสต์ รุสกา โดยแสงที่ใช้เป็นลำแสงอิเล็กตรอน ซึ่งมีขนาดเด็กมากทำให้มีกำลังขยายสูงมาก ลำแสงอิเล็กตรอนมีความยาวคลื่นประมาณ  $0.025$  อังสตروم ( $1$  อังสตروم =  $10^{-4}$  ไมโครเมตร) ดังนั้นจึงทำให้กล้องจุลทรรศน์มีค่าริโซลูชัน ประมาณ  $0.0004$  ไมโครเมตร และมีกำลังขยายถึง  $500000$  เท่า หรือมากกว่า

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในปัจจุบันมี 2 ชนิด คือ

(2.1) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope) เรียกย่อว่า TEM ซึ่งเอร์นสต์ รุสกา สร้างได้เป็นคนแรก เมื่อปี พ.ศ. 2475 ใช้ในการศึกษาโครงสร้างภายในของเซลล์โดยลำแสงอิเล็กตรอนจะส่องผ่านเซลล์ หรือตัวอย่างที่ศึกษา ซึ่งต้องมีการเตรียมกันเป็นพิเศษและบางเป็นพิเศษด้วย

(2.2) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope) เรียกย่อว่า SEM เอ็ม วอน เอนเดนนี สร้างสำเร็จเมื่อปี พ.ศ. 2481 โดยใช้ศึกษาผิวของเซลล์หรือผิวของตัวอย่างวัตถุที่นำมาศึกษา โดยลำแสงอิเล็กตรอนจะส่องกราดไปบนผิวของวัตถุ ทำให้ได้ภาพซึ่งมีลักษณะเป็นภาพ 3 มิติ

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบลักษณะระหว่างกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกับกล้องจุลทรรศน์แบบ

#### อิเล็กตรอน

ลักษณะเปรียบเทียบ	กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	กล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอน
1. ต้นกำเนิดแสง	กระเจ้าหรือหลอดไฟ	เป็นยิงอิเล็กตรอน
2. แสงที่ใช้	แสงสว่างในช่วงที่ตามองเห็นได้ (ม่วง – แดง) ความยาวคลื่น $4,000$ - $7,000$ อังสตروم	ลำแสงอิเล็กตรอน ความยาวคลื่นประมาณ $0.05$ อังสตروم
3. ชนิดของเลนส์	เลนส์แก้ว	เลนส์แม่เหล็กไฟฟ้า
4. กำลังขยาย	$1,000$ – $1,500$ เท่า	$200000$ - $500000$ เท่าหรือมากกว่า
5. ขนาดของวัตถุเล็กสุดที่มองเห็น	$0.2$ ไมโครเมตร	$0.0004$ ไมโครเมตร
6. อากาศในตัวกล้อง	มีอากาศ	สูญญากาศ
7. ภาพที่ได้	ภาพเสมือนหัวกลับดูได้จากเลนส์ตา	ภาพปรากฏบนจอรับภาพเรืองแสง
8. ระบบหล่อเย็น	ไม่มี	มีเนื่องจากเกิดความร้อนมาก

ลักษณะเบรียณเที่ยบ	กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	กล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอน
9. วัตถุที่ส่องดู	มีหรือไม่มีชีวิต	
10. การเตรียม specimen	เตรียมแบบธรรมชาติ	การเตรียมยุ่งยาก และวิธีการมาก
11. ราคา	ราคากปกติ ไม่แพงมากนัก	แพงมาก
12. การใช้งาน	ใช้ง่าย สะดวก	ใช้งาน ต้องเป็นผู้ชำนาญการ เท่านั้น
13. สถานที่	ใช้ได้ทุกสถานที่ เพราะเบากว่า ได้สะดวก	ใช้ในห้องเก็บกล้องซึ่งเป็นห้อง เฉพาะเท่านั้น
14. ภาพ	ภาพที่ได้เป็นภาพสีธรรมชาติ หรือข้อมูล	ภาพที่ได้เป็นภาพขาวดำเท่านั้น

### 2.1.8 การวิเคราะห์โดยเทคนิคแก๊สโคมาโทกราฟี (Gas Chromatography) (แม่น อมรสิทธิ์ และ อmor เพชรสม, 2535 : 28-40)

แก๊สโคมาโทกราฟีเป็นเทคนิคอีกชนิดหนึ่งที่ใช้สำหรับแยกสารผสม ซึ่งคล้ายกับ ลิควิดโคมาโทกราฟี (LC) แต่เทคนิคนี้ใช้แยกสารที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นวัตถุภาคแก๊ส ได้ที่อุณหภูมิ หนึ่ง (ไม่เกิน  $450^{\circ}\text{C}$ ) ถ้าสารใดเปลี่ยนเป็นวัตถุภาคแก๊สยากก็อาจใช้เทคนิคอื่นๆ บางอย่างเข้ามาช่วย เช่น อาศัยปฏิกิริยาเคมี เปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์อื่นๆ หรืออาจใช้หลักการแยกสลายด้วยความร้อน (pyrolysis) เมื่อสารนั้นเปลี่ยนให้อยู่ในวัตถุภาคแก๊สแล้ว ให้สารเหล่านั้นผ่านเข้าไปยัง colum ที่บรรจุ ด้วยวัตถุภาคคงที่ (stationary phase) โดยอาศัยการพาไปของวัตถุภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ (carrier gas) สารผสมเหล่านั้นจะเกิดการแยกขึ้น แก๊สโคมาโทกราฟี แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ ดังนี้

(1) โคมาโทกราฟีแบบแก๊ส-ของแข็ง (Gas-Solid Chromatography หรือ GSC) วิธีนี้ ใช้วัตถุภาคคงที่เป็นของแข็งที่สามารถดูดซับ (absorption) สารที่เป็นแก๊สซึ่งต้องการแยก ได้และไม่มี สารอื่นใดเคลื่อนอยู่ ส่วนใหญ่แล้ววิธีนี้ค่อนข้างจะควบ เพราะใช้แยกสารที่เป็นแก๊สหรือสารที่เป็น โนเมกุลเล็กๆ เท่านั้น ดังนั้น colum ที่ใช้มักจะบรรจุด้วยของแข็งกัมมันต์ (active solids) เช่น โนเมกุลาร์ซีฟ (molecular sieves) หรือพอลิเมอร์ที่มีรูพรุน (porous polymer) ซิลิคากเจล (silica gel) อะลูมินา (alumina) และคาร์บอนกัมมันต์ (activated carbon) เป็นต้น

(2) สารที่เป็นแก๊สหรือไอของสารที่ผสมกันอยู่ เมื่อผ่าน colum จะสามารถแยกออกจาก กันได้ด้วยการกระจายตัวที่แตกต่างของแก๊สหรือไอระหว่างวัตถุภาคเคลื่อนที่กับวัตถุภาคคงที่ที่มี ของเหลว (liquid phase) 作為อยู่บนของแข็ง หรือมีค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายน (partition coefficient) ต่างกัน วิธีนี้เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับแยกสารที่เป็นแก๊สหรือ สารที่สามารถเปลี่ยนเป็นไอหรือวัตถุภาคแก๊สได้ที่อุณหภูมิกำหนด

เมื่อปี ก.ศ. 1952 เอ.เจ.พี.มาร์ติน และ อาร์.แอล.เอ็ม.ชิงค์ เป็นผู้ได้รับรางวัลโนเบล (nobel prize) จากการค้นพบโกรมาโทกราฟีแบ่งสารละลาย (partition chromatography) ซึ่งมีส่วนที่สำคัญไว้มีความรวดเร็ว ความเที่ยง และความง่าย ของวิธีนี้ช่วยให้การแยกสาร การวิเคราะห์สาร และการหาปริมาณของสารระเหยได้รับความนิยมอย่างรวดเร็ว และมีผลงานวิจัยตีพิมพ์ออกมากเป็นจำนวนมาก

### 2.1.8.1 องค์ประกอบของเครื่องแก๊สโกรมาโทกราฟี

องค์ประกอบของเครื่องโกรมาโทกราฟีแสดงไว้ใน (ภาพที่ 2.7)

(1) ถังแก๊สที่บรรจุแก๊สพา (carrier gas) เพื่อจะพาไอของสารตัวอย่างผ่านเข้าไปยัง kolamn ได้แก่ ในไตรเจน ไฮเดรน หรืออาร์กอน เป็นต้น

(2) ส่วนที่ควบคุมการไหลของแก๊สต่างๆ (flow controller) ได้แก่ ไทรเจน ออกาส หรือไนโตรเจน เป็นต้น

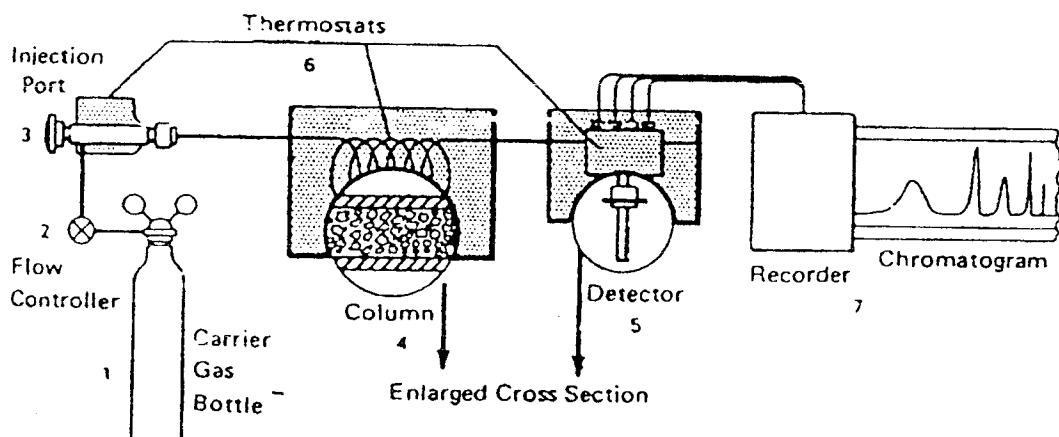
(3) ส่วนฉีดสารตัวอย่าง (injection port)

(4) kolamn (column) เป็นส่วนที่สำหรับที่สุดที่ใช้สำหรับแยกสาร

(5) ดีเทคเตอร์ (detector) เป็นส่วนที่ใช้สำหรับตรวจสารแต่ละชนิดที่ถูกแยกออกมาจาก kolamn

(6) ส่วนที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิ (temperature controller) ให้กับ kolamn ดีเทคเตอร์ และส่วนฉีดสาร

(7) ส่วนที่ใช้ประมวลผลและข้อมูลต่างๆ ได้แก่ อินทิเกรเตอร์ (integrator) เครื่องบันทึกโกรมาโทแกรม หรือเครื่องประมวลผล (data processor) หรือคอมพิวเตอร์



ภาพที่ 2.7 องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่องแก๊สโกรมาโทกราฟ

ดังนั้นในการวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยใช้เทคนิคแก๊สโกรมาโทกราฟี นั้นสามารถแสดงให้เข้าใจได้ง่ายๆ ดังนี้ คือ เมื่อเลือกสภาพว่าต่างๆ ของการวิเคราะห์ และจัดสภาพ

ของเครื่องโคม่าโทกราฟให้เรียบร้อยแล้ว จึงนำสารตัวอย่างไปฉีดเข้าที่ส่วนที่ฉีดสารตัวอย่าง สารจะถูกเป็นไอและถูกพาเข้าไปในคอลัมน์ด้วยแก๊สพาอย่างช้าๆ สารผสมจะถูกแยกออกเป็นส่วนๆ ที่คอลัมน์นี้แล้วออกไปสู่ดีเทกเตอร์ จะทำให้ได้สัญญาณเกิดขึ้นซึ่งสามารถอ่านออกมาเป็นโคม่าโทแกรมด้วยเครื่องบันทึกหรือต่อเข้ากับปรินเตอร์หรืออินพิเกรเตอร์ ก็จะทำให้ผู้วิเคราะห์สามารถทราบองค์ประกอบของสารตัวอย่างได้

#### 2.1.8.2 ระบบของการใส่สารตัวอย่าง (Sample Inlet Systems)

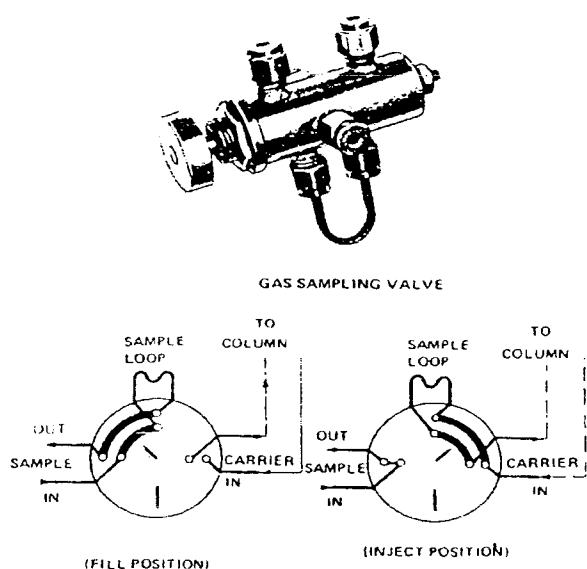
การนำสารตัวอย่างฉีดเข้าไปในเครื่องแก๊สโคม่าโทกราฟ เพื่อวิเคราะห์ มีวิธีการแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของสารตัวอย่าง เช่น แก๊ส ของแข็ง หรือของเหลว ถ้าเป็นของเหลวหรือของแข็งสารนั้นจะหายากหรือจ่าย คอลัมน์ที่ใช้เป็นอะไร เช่น เป็น packed column หรือ capillary column การออกแบบเครื่องมือในส่วนนี้จะแตกต่างกันออกไปเพื่อให้ทำงานได้ตามวัตถุประสงค์และมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปส่วนที่ฉีดสารตัวอย่างเข้าไป (inlet) จะมีเครื่องให้ความร้อน (heater) ประกอบอยู่ด้วยเพื่อทำให้สารตัวอย่างถูกเป็นไอ ปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้ก็จะจะน้อย

##### (1) Gas Sample Inlet

โดยทั่วไปตัวอย่างที่เป็นแก๊สมักจะใช้ฉีดเข้าไปด้วย gas-tight syringes แต่วิธีที่ดีที่สุดที่ใช้ gas sampling valve ดังแสดงใน (ภาพที่ 2.8) แก๊สตัวอย่างจะฉีดเข้าไปเก็บไว้ในลูป (loop) เมื่อหมุน sampling valve แก๊สตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าไปในคอลัมน์ วิธีนี้จะให้ค่าความเที่ยง

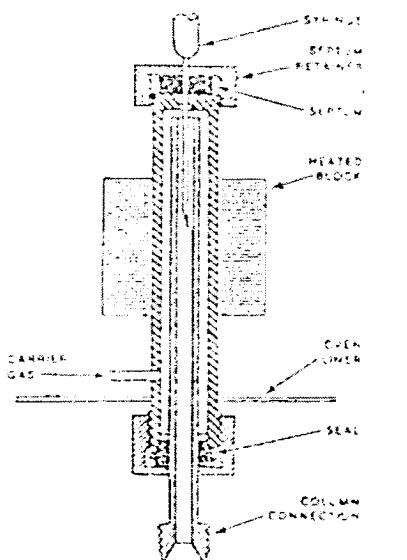
##### (2) Liquid Sample Inlet

สารตัวอย่างที่เป็นของเหลวโดยมากจะใช้ microsyringe ฉีดเข้าไปผ่าน



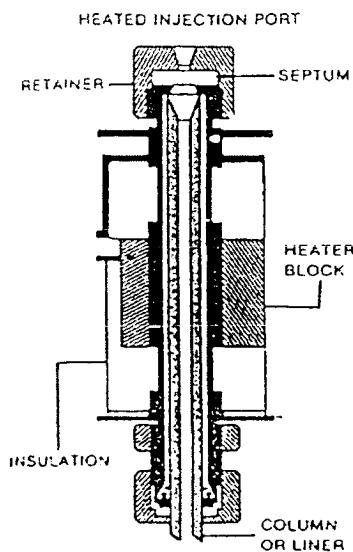
ภาพที่ 2.8 การฉีดแก๊สตัวอย่าง โดยการใช้ Gas Sampling Valve

silicone septum ไปยังปลายของคอลัมน์ หรืออาจใช้วิธีฉีดเข้าไปที่ flash vaporizer (ภาพที่ 2.9 และ 2.10) สารตัวอย่างจะถูกเปลี่ยนให้เป็นไอโดยความร้อนจาก heater block



ภาพที่ 2.9 ลักษณะของ flash vaporizer

injection port



ภาพที่ 2.10 flash vaporizer ที่ใช้กับ

glass column

เทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการฉีดสารเข้าไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่างและคอลัมน์ วิธีการที่ใช้เคราะห์อาจเป็น isothermal หรือ temperature programmed ทั้งนี้สิ่งที่สำคัญที่ต้องคำนึงถึง คือ เวลาเรtenin time (retention time) จะต้องมีค่าความเที่ยง (reproducible) และให้การแยกที่ดี (good resolution)

โดยทั่วไปอุณหภูมิของช่องฉีด (injection port) ควรจะต้องสูงพอที่จะทำให้สารกล้ายเป็นไอ แต่ให้ต่ำกว่าอุณหภูมิจำกัด (temperature limit) ของวัสดุภาชนะเหลวที่ใช้ในคอลัมน์ และไม่ควรใช้อุณหภูมิสูงเกินไป เพราะอาจทำให้วัสดุภาชนะเหลวระเหยออกไปหรือเกิดการสลายตัวซึ่งจะทำให้เกิด Base line ไม่คงที่และเกิดการดริฟท์ (drift)

### (3) สารตัวอย่างที่เป็นของแข็ง (Solid Sample)

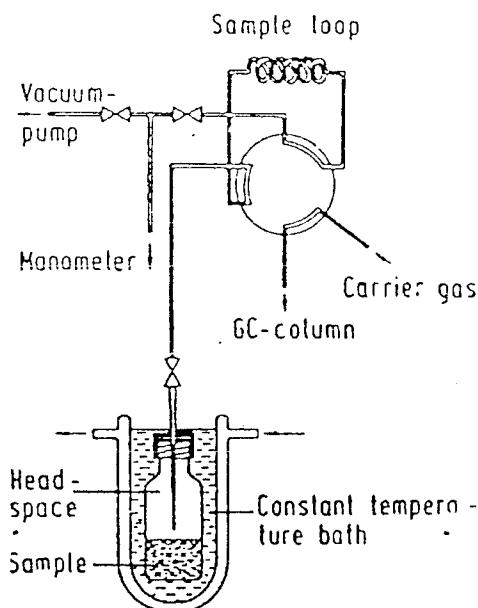
การวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นของแข็งด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟนั้น กระทำได้ก่อนข้างยากกว่าสารตัวอย่างที่เป็นแก๊สหรือเป็นของเหลว เพราะต้องใช้อุณหภูมิในการเปลี่ยนให้เป็นไอสูงกว่า อาย่างไรก็ตามวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟนี้ ก็สามารถกระทำได้โดยนำสารตัวอย่างที่เป็นของแข็งนั้นไปละลายในตัวทำละลายเสียก่อน และจึงทำการวิเคราะห์ในข้อ 2 ทั้งนี้ตัว

ทำละลายที่เลือกใช้จะต้องละลายสารตัวอย่างได้หมด ไม่ร่วมละล้าง (co-elute) ถ้าสารได้สารหนึ่งในตัวอย่างนั้น และไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างนั้นด้วย ในบางกรณีอาจใช้อุปกรณ์ที่สามารถเปลี่ยนสารที่เป็นของแข็งให้กลายเป็นแก๊ส (pyrolysis equipment) โดยเผาที่อุณหภูมิสูงถึง  $1000^{\circ}\text{C}$  เมื่อเปลี่ยนให้เป็นแก๊สแล้วจึงนำเข้าเครื่องแก๊สโคมาราฟต่อไป

#### (4) ใช้ Headspace Analysis

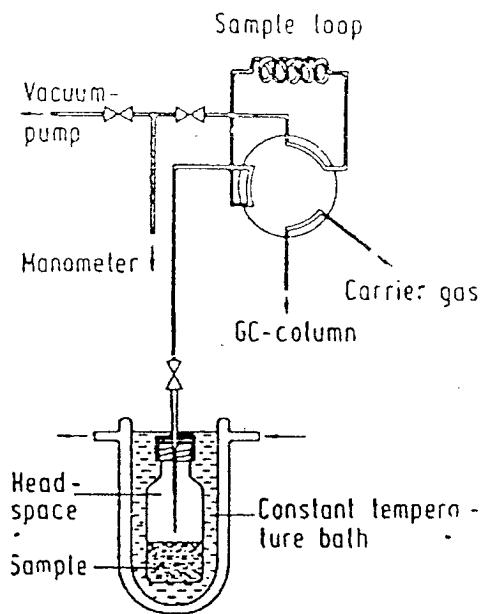
ในการณ์ที่สารตัวอย่างเป็นของแข็งหรือของเหลว โดยไม่มีสารที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้ ถ้าต้องการจะหาส่วนที่ระเหยได้ สามารถทำได้โดยใช้ headspace technique ซึ่งต่างจากเทคนิค GC ทั่วไปตรงที่วิธีการฉีดสารตัวอย่าง (sample injection) คือ จะนำส่วนที่เรียกว่าช่องหواء ส่วนที่ไม่ระเหยที่เป็นของแข็งหรือของเหลวนั้น ไปฉีดเข้าเครื่องแก๊สโคมาราฟต่อไป การวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นของเหลวนี้ จะได้ผลลัพธ์ต้องสมบูรณ์จะต้องประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

(4.1) จะต้องรู้ปริมาณของสารตัวอย่างที่ใส่ในขวด (vial) ที่ทราบขนาดฝาขวดจะเป็น septum ที่เป็นยางปิดขวดที่ใส่สารตัวอย่าง จะต้องแซ่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิคงที่



ภาพที่ 2.11 การนำ headspace sample ไปวิเคราะห์โดยใช้ gas sampling valve

(4.2) เมื่อได้สมดุลแล้วนำไอของสารตัวอย่างที่ทราบปริมาณแน่นอนไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊ส โกรมาโทกราฟต่อไป headspace vessel มีลักษณะดัง (ภาพที่ 2.11)



ภาพที่ 2.11 การนำ headspace sample ไปวิเคราะห์โดยใช้ gas sampling valve

#### (5) เครื่องฉีดสารตัวอย่างอัตโนมัติ (Automatic Samplers)

สำหรับในการฉีดสารตัวอย่างจำนวนมากๆ และต้องทำการวิเคราะห์ติดต่อกันเป็นเวลานาน การใช้เครื่องฉีดอัตโนมัติจึงเหมาะสมสมดี เพราะทำให้สะดวกและได้ผลวิเคราะห์ถูกต้องด้วย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีผู้นิยมใช้กันเป็นจำนวนมาก บริษัทผู้ผลิตเครื่องแก๊ส โกรมาโทกราฟ ทั่วโลกจึงประดิษฐ์เครื่องมือนี้ออกแบบขายทั่วไป มีทั้งชนิดที่สามารถโปรแกรมเวลาในการฉีดสารตัวอย่าง ได้ด้วย และมีชนิดที่ใช้ syringe และให้สารตัวอย่างในหลอดผ่าน syringe เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถเลือกจำนวนครั้งของการวิเคราะห์แต่ละสารตัวอย่างได้ สารตัวอย่างจะใส่ไว้ในถาด (tray) ที่หมุน ได้ แต่ถ้าสารตัวอย่างเป็นแก๊สก็จะใช้เป็น automatic gas-sampling valves เช่น ในการวิเคราะห์ตัวอย่างแก๊สจากโรงแยกแก๊สธรรมชาติ เป็นต้น

#### (6) ระบบใส่สารตัวอย่างสำหรับ Capillary Columns

เนื่องจากคลัมมน์ชนิดนี้เป็นชนิดหลอดรูเล็ก (capillary tube) ทำให้มีความจุตัวอย่างต่ำ เมื่อเทียบกับคลัมมน์ชนิดบรรจุด้วยสารบางชิ้น (packed column) ในทางปฏิบัติจริงมี

เทคนิคที่ใช้กันอยู่กับ columน์ชนิดนี้ 3 แบบ คือ split injection, splitless และ “cool” on-column injection ซึ่งลักษณะเฉพาะของเทคนิคเหล่านี้ได้สรุปไว้ในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ลักษณะเฉพาะของระบบฉีดสารตัวอย่างที่เป็นแบบ split, splitless และ on-column injection

Split	Splitless	On-column
1. ใช้วิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (major component analysis)	ใช้วิเคราะห์สารปริมาณน้อยๆ (trace analysis)	ใช้วิเคราะห์สารปริมาณน้อยๆ (trace analysis)
2. ใช้เป็นเทคนิคการระเหยสารอย่างรวดเร็ว	ใช้เป็นเทคนิคการระเหยสารอย่างรวดเร็ว	ใช้เป็นเทคนิคฉีดสารแบบเย็น (cool) โดยสารที่ฉีดจะไม่เป็นไอ
3. เป็นเทคนิคฉีดสารตัวอย่างเร็วเร็ว	เป็นเทคนิคฉีดสารช้าๆ	เป็นเทคนิคฉีดสารอย่างรวดเร็ว
4. ใช้อัตโนมัติได้	ใช้อัตโนมัติได้	ใช้มือด้วยมือ (manual)
5. ใช้กับงานประจำ	ใช้กับวิธีการยุ่งยาก	ใช้กับงานประจำ
6. ใช้หาปริมาณทางอ้อม	ใช้หาปริมาณได้โดยตรง	หาปริมาณได้โดยตรง

### 2.1.8.3 คอลัมน์ (Columns)

คอลัมน์ ถือเป็นหัวใจของการแยกสารด้วยเทคนิคทางแก๊สโกรามาโทกราฟี เมื่อแก๊สผ่านหรือไอของสารที่ปั่นกันอยู่ในสารตัวอย่าง ผ่านคอลัมน์สารที่บรรจุในคอลัมน์เปล่า จะทำหน้าที่เป็นตัวแยกแก๊สหรือไอผ่านน้ำออกจากกันเป็นส่วนๆ ดังนั้นโกรามาโทแกรมที่ได้จะดี หรือไม่ดีขึ้นอยู่กับชนิดของคอลัมน์มาก

### 2.1.8.4 เครื่องมือเก็ตเตอร์ (Detectors)

เป็นเครื่องที่สามารถดูบ่งบอกว่ามีสารที่ต้องการวิเคราะห์หรือมีสารอื่นที่แตกต่างไปจากแก๊สพ้าออกมานอกคอลัมน์หรือไม่ ถ้ามีก็จะสามารถดักได้ว่ามีปริมาณเท่าใดได้ด้วย ดังนั้น เก็ตเตอร์จึงต้องเป็นเครื่องที่มีลักษณะเฉพาะ สามารถให้สัญญาณกับสารต่างๆ ได้ให้สภาพไวที่สูง พอดีกับต้องการที่ต้องการ ความเร็วของสารที่ก่อว่างพอดี และมีหลากหลายชนิด แล้วแต่งานของห้องปฏิบัติการนั้น

GC detectors ที่พบเห็นและใช้กันมากในปัจจุบัน ได้แก่

- |  |  |
|--|--|
| 1. Thermal Conductivity Detector (TCD) | 2. Flame Ionization Detector (FID)                 |
| 3. Electron Capture Detcctor (ECD)     | 4. Nitrogen Photometric Detector (NPD)             |
| 5. Flame Photometric Detector (FPD)    | 6. Electrolytic Conductivity Detector (ELCD, Hall) |
| 7. Photo Ionization Detector (PID)     | 8. Mass Selective Detector (MSD)                   |

- |                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| 9. Infrared Detector (IRD)           | 10. Atomic Emission Detector (AED)         |
| 11. Helium Ionization Detector (HID) | 12. Redox Chemiluminescence Detector (RCD) |
| 13. Thermionic Detector (TD)         |  |

**(1) ลักษณะเฉพาะที่ต้องการของดีเทกเตอร์**

ดีเทกเตอร์ที่จะใช้ในการตรวจหาสารในเครื่องแก๊สโคมไฟกราฟินน์ควรจะต้องมีลักษณะเฉพาะในการตอบสนองต่อสารเคมีที่ต้องการวิเคราะห์ ดังต่อไปนี้ คือ

(1.1) ควรจะต้องให้สกัดไว้สูง (high sensitivity) นั่นคือ การตอบสนอง (Response) ต่อปริมาณสารควรจะต้องมาก เพื่อที่จะได้สามารถตรวจหาปริมาณของสารน้อยๆ ได้ หรือ มีค่า MDL (Minimum detectable level) ต่ำๆ ซึ่งในทางปฏิบัติจะหมายถึงปริมาณของสารที่สามารถทำให้เกิดความสูงของพิกัดเป็น 2 หรือ 3 เท่าของพีคจากสัญญาณรบกวน (signal / noise = 2 หรือ 3)

(1.2) ควรมีความสามารถต่อการตรวจหาสาร (selectivity) เช่น สารต่างประเภทกัน ควรให้การตอบสนองที่แตกต่างกัน ถ้าดีเทกเตอร์ได้ให้การตอบสนองต่อสารทุกประเภท เมื่อนาน กัน ดีเทกเตอร์นั้นก็จัดเป็นประเภททั่วไป (universal detector) และถ้าดีเทกเตอร์ที่ให้การตอบสนองเฉพาะสารใดสารหนึ่งจะทำให้ดีเทกเตอร์นั้นสามารถตรวจหาสารนั้นๆ ได้อย่างดีในของผสม ซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องการ

(1.3) ควรจะต้องมี dynamic range ที่กว้าง คือ ดีเทกเตอร์นั้นควรให้ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณมีช่วงความเข้มข้นที่กว้างพอที่จะวัด ได้อย่างถูกต้อง

(1.4) ในทางปฏิบัติ ดีเทกเตอร์ควรจะต้องมีเสถียรภาพ (stability) และความเที่ยงที่ดีด้วย มิฉะนั้นค่าที่วัด ได้จะไม่มีความถูกต้องและแตกต่างกันจึงใช้ไม่ได้

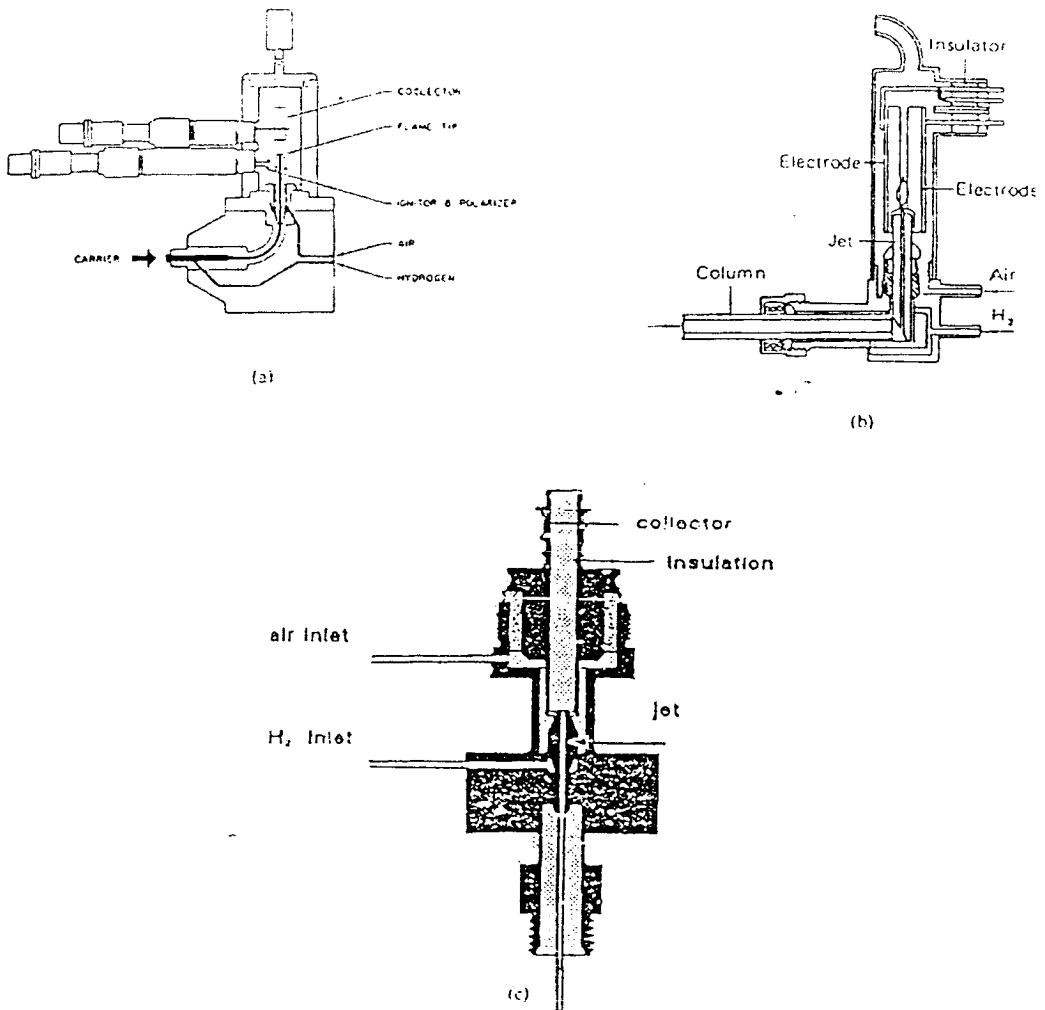
การเปรียบเทียบลักษณะเฉพาะของดีเทกเตอร์ชนิดต่างๆ ที่ใช้กันทั่วไปดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ลักษณะเฉพาะทั่วไปของดีเทกเตอร์ชนิดต่างๆ

ชื่อ	ประเภท	ความเฉพาะในการตรวจหา	MDL (S/N = 2)	Linear dynamic range
FID	Selective	สารที่แตกตัวเป็นไออ่อนได้ด้วยเปลวไฟ ไฮโตรเจน/อากาศ	5 pg. C/s	$10^7$
TCD	Universal	สารทุกชนิดที่ให้การนำความร้อนแตกต่างจากแก๊สพا	400 pg. / ml	$10^6$
ECD	Selective	Gas-phase electrophores	0.1 pg. Cl/s (Can be varied)	$10^4$
PID	Selective	สารประกอบที่แตกตัวเป็นไออ่อนได้ด้วยแสงญี่วี	2 pg. C/s	$10^7$
Thermal Conductivity Detector ; TCD	Selective	สารประกอบพากในไฮโตรเจนและฟอสฟอรัส	0.4 pg. N/s 0.2 pg. P	$10^4$
ELCD	Selective	สารประกอบพากไฮโลเจน ในไฮโตรเจนและซัลเฟอร์	0.5 pg. Cl/s 2 pg. P/s 4 pg. N/s	$10^6$ $10^4$ $10^4$
FPD	Selective	สารประกอบพากฟอสฟอรัสและซัลเฟอร์	20 pg. S/s	$10^3$
FTIR	Universal	Molecular vibrations	0.9 pg. P/s 1000 pg. of Strong absorber	$10^4$ $10^3$

## (2) เฟรมไออ่อนในเชื้อน ดีเทกเตอร์ (Flame Ionization Detector ; FID)

FID เป็นดีเทกเตอร์อิเล็กทรอนิกชนิดหนึ่งที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจหาพากสารประกอบอินทรีย์



ภาพที่ 2.12 (a), (b) และ (c) เป็นลักษณะของ FID แบบต่างๆ กัน

ลักษณะของ FID แบบต่างๆ ดังแสดงใน (ภาพที่ 2.12) แก๊สไฮโดรเจนจะถูกจุดให้คิดไฟด้วย heater ไฟฟ้าซึ่งอยู่ใกล้ๆ กับ flame jet ส่วนอาการที่ผ่านเข้าไปทำหน้าที่สองอย่างคือ ช่วยการเผาไหม้ของไฮโดรเจนและช่วยพาให้แก๊สที่เผาไหม้แล้วออกไป แก๊สพานและสารตัวอย่างที่ออกมานจากคลัมจะเข้าสู่เบลาไฟ จะทำให้สารเหล่านี้เกิดไออนในเชิงได้เป็นอิเล็กตรอนและไออนบวก อิเล็กตรอนจะวิ่งไปยัง flame jet ไออนบวกจะเคลื่อนที่ไปยังอิเล็กโโทรด ด้วยภูมิที่เกิดขึ้นจะถูกส่งไปยังอิเล็กโโทรมิเตอร์ (electrometer) และบันทึกด้วยเครื่องบันทึกได้โดยมาโทแกรม FID ที่ผลิตใช้ในแก๊สโคมไฟกราฟฟิล์มลักษณะต่างๆ กัน

FID ให้สภาพไวที่ดีกับสารต่างๆ โดยเฉพาะสารอินทรีย์ แต่ไม่ดีกับแก๊สค่าไปนี้

He	CS <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub>
Ar	COS	Co
Kr	H <sub>2</sub> S	CO <sub>2</sub>
Ne	SO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O
Xe	NO	SiCl <sub>4</sub>
O <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> O	SiHCl <sub>3</sub>
N <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	SiF <sub>4</sub>

สำหรับอัตราการไหลของ H<sub>2</sub> และอากาศที่ใช้ใน FID จะแตกต่างกันไปตามบริษัทผู้ผลิตเครื่องแก๊สโคมมาโทกราฟี

### (2.1) ข้อควรปฏิบัติในการใช้ FID

เนื่องจากการเผาไหม้ใน FID จะมีไอน้ำเกิดขึ้น เพื่อป้องกันการเกิดการกลั่นตัวของไอน้ำควรจะต้องตั้งอุณหภูมิของดีเทกเตอร์ให้สูงกว่า 100°C โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อสารตัวอย่างเป็นพลาสติก ผลกระทบจากการเผาไหม้จะก่อให้เกิดการผุกร่อนได้ง่าย สภาพไวของดีเทกเตอร์จะเสียไปด้วย บางครั้งสารประกอบพลาสติกที่มีโนเลกุลใหญ่ๆ การเผาไหม้ไม่ค่อยสมบูรณ์ทำให้เกิดเศษๆ อุดตัน flame tip หรือ jet ได้จึงต้องใช้อุณหภูมิของดีเทกเตอร์ให้สูงขึ้น

#### 2.1.8.5 การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี Internal Standardization Method

เป็นเทคนิคที่ใช้หาปริมาณของสารได้ถูกต้องที่สุด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ internal standard

##### (1) หลักการเลือกสารที่จะใช้เป็น Internal Standard

(1.1) สารจะมีสมบัติคล้ายกับสารที่จะวิเคราะห์

(1.2) สารจะถูกชะออกมากจากคลัมมน์หมุด

(1.3) สารจะให้พิคที่แยกอยู่ต่างหาก โดยพิคจะต้องไม่ซ้ำหรือเหลือมทับกับพิคอื่นๆ และอยู่ใกล้กับพิคที่ต้องการหา

(1.4) สารนั้นจะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

##### (2) ข้อดีของ Internal Standardization Method

(2.1) ผลการวิเคราะห์จะถูกต้องดีมาก

(2.2) ผลการวิเคราะห์อาจเป็นได้ทั้งค่าสัมพัทธ์และสัมบูรณ์

(2.3) ค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่ขึ้นอยู่กับสภาพไวของดีเทกเตอร์

- (2.4) สภาพไวของดิจิตอลอาจจะเปลี่ยนแปลงได้ขณะทำการวิเคราะห์  
 (2.5) ผลการวิเคราะห์ไม่เข้ากับขนาดของสารตัวอย่างที่มีดีเข้าไปในเครื่อง

### แก๊สโครมาโทกราฟ

- (2.6) สารตัวอย่างทั้งหมดไม่จำเป็นจะต้องถูกชะออกมาก่อน

### (3) ข้อเสีย

- (3.1) สารที่เป็น internal standard จะต้องผสมลงไปในสารตัวอย่างและค่อนข้างหายาก

- (3.2) เครื่องมือจะต้องมีการ calibrate

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ที่ต้องการผลของความแม่นและเที่ยงมากๆ ในทางปฏิบัติขั้นตอนต่างๆ ของการวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วยเทคนิคทางแก๊สโครมาโทกราฟนั้นพอสรุปได้ ดังต่อไปนี้

(3.2.1) ต้องตรวจสอบเสียก่อนว่าสารที่จะวิเคราะห์เป็นสารประเภทใด เช่น เป็นแอลกอฮอล์หรือไฮโดรคาร์บอน เอสเทอร์ คีโตน เป็นต้น หรือสารตัวอย่างนั้นมีสภาพ怎 อย่างไร

(3.2.2) สารตัวอย่างนั้นมีจุดเดือด หรือมีอุณหภูมิที่จะถลายเป็นไอได้อยู่ ในช่วงเท่าใด ถ้าสารตัวอย่างเป็นแก๊สก็จะคงอยู่

(3.2.3) เลือกຄอลัมน์ที่จะใช้ให้เหมาะสม

(3.2.4) เลือกดิจิตอลร์ให้เหมาะสมกับสารที่จะวิเคราะห์และสภาวะให้เหมาะสม

(3.2.5) นำຄอลัมน์ไปติดตั้งในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟให้ถูกตำแหน่ง

(3.2.6) เปิดเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟแล้วตั้งพารามิเตอร์ต่างๆ ให้เหมาะสม เช่น อัตราการไหลของแก๊สพาน อุณหภูมิของตู้อบหรือຄอลัมน์ อุณหภูมิของดิจิตอล injection port และ พารามิเตอร์ต่างๆ ที่จะใช้ในการประมวลผล เป็นต้น

(3.2.7) เลือกเทคนิคที่จะต้องใช้ทำการวิเคราะห์ คือ จะใช้วิเคราะห์แบบ isothermal หรือใช้ temperature program หรือ multi-stage temperature program ซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่าง และที่สำคัญที่ต้องระวัง คือ จะต้องไม่ใช้อุณหภูมิสูงกว่าที่กำหนดไว้

(3.2.8) เลือกโปรแกรมที่จะใช้ในการประมวลผล

(3.2.9) เมื่อจัดเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟและพารามิเตอร์ต่างๆ ตามที่ต้องการแล้วจึงเริ่มทำการวิเคราะห์ได้ และเมื่อพารามิเตอร์บางค่าไม่เหมาะสม ก็สามารถที่จะเปลี่ยนแปลงได้ในภายหลัง

## 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Abdel-Naby A. Mohamed และคณะ (2000) ได้ศึกษาการตรึงเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus - amyloliquefaciens* ในแคลเซียมอัลจิเนตเพื่อผลิตเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้มีสีเหลืองสูงมาก ประมาณ  $70.8 \text{ U ml}^{-1}$  (หมายถึงปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ที่ย่อยสับสเตรทแล้วทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ 70.8 ในโครโนมิเตอร์ภายในเวลา 1 นาที ตามสภาพที่กำหนด) นอกจากนี้ปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนตที่ใช้ตรึงเซลล์ ขนาดของเม็ดแคลเซียม-อัลจิเนตและปริมาณของเซลล์ที่ใส่ลงในกองลัมป์ ในการหมักจะหมักช้าประมาณ 14 ครั้ง หลังจากหมักแล้ว และเอนไซม์ยังคงมีสีเหลืองระหว่าง  $70 - 80 \text{ U ml}^{-1}$  ส่วนของการหมักแบบต่อเนื่องจะใช้ถังหมักแบบ packed-bed และ fluidized-bed reactor พบว่า packed-bed reactor จะได้ผลผลิต (productivity) เอนไซม์มากที่สุด เท่ากับ  $23 \text{ KU l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ส่วนความเข้มข้นของเอนไซม์ได้เท่ากับ  $48 \text{ U ml}^{-1}$  และ specific productivity ได้เท่ากับ  $141.8 \text{ U (g wet cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ส่วนปริมาณของเอนไซม์ที่ได้ใน fluidized-bed reactor จะได้มากที่สุดเท่ากับ  $30.4 \text{ KU l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ  $53.0 \text{ U ml}^{-1}$  และ specific productivity เท่ากับ  $230.9 \text{ U (g wet cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Abdel-Naby and et al., 2000: 1-9)

Iersel van M.E.M. และคณะ (2000) ได้ศึกษาการตรึงเซลล์ยีสต์ใน DEAE-cellulose โดยใช้น้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการหมัก และติดตามอัตราการเกิดริดักชัน (reduction) ของสารประกอบอัลดีไฮด์ (aldehyde) ของเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึง พบว่าเมื่อตรึงเซลล์แล้วยีสต์จะมีสีเหลืองของเอนไซม์ และกลอฮอล์ดีไฮดร็อกซีเจนส์ (alcohol dehydrogenase) เอกโซไซคานส์ (hexokinase) และไพรูเวต ดีคาร์บอคซีเลส (pyruvate decarboxylase) ที่มีประสิทธิภาพสูงมากกว่ายีสต์ที่เจริญแบบไม่ตรึงเซลล์ นอกจากนี้ในการทดลองยังได้ติดตามอัตราการไหลของกลูโคส ประกอบกับได้ศึกษาผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามในระหว่างการหมักที่เอนไซม์และกลอฮอล์ดีไฮดร็อกซีเจนส์ เสื่อมสภาพลดลง แต่เอนไซม์กลับมีสีเหลืองมากขึ้นในเซลล์ที่ถูกตรึง การเปลี่ยนแปลงเสื่อมสภาพของเอนไซม์และปริมาณการไหลของกลูโคสนี้ จะมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทำปฏิกิริยาเริดักชันของสารประกอบอัลดีไฮด์ของเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึง (Iersel, van M.F.M. and et al., 2000: 602-607)

Kourkoutas, Y. และคณะ (2003) ได้ศึกษาการตรึงเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* บนชิ้นของผลไม้ ขนาดเล็กของต้นไม้จำพวก *Cydonia oblonga* (คล้ายมะลูม) ชื่อยีสต์สายพันธุ์ AxAz-1 เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อความเข้มข้นของกลูโคส โดยนำชิ้นของผลไม้มาประมาณ 400 g ละลายในอาหารเดี้ยง เชือยีสต์ปริมาตร 500 ml จากนั้นจะเติมเซลล์ยีสต์ประมาณ 10 g ลงไปผสมกับผลไม้นี้เพื่อให้เกิดกระบวนการการตรึงเซลล์ พบว่ายีสต์ที่ถูกตรึงมีความสามารถและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ โดยเฉพาะเมื่อทำการตรึงที่อุณหภูมิต่ำในช่วง  $0-10^\circ\text{C}$  (Kourkoutas, Y., and et al., 2003: 353-360)

Najafpour Ghasem และคณะ (2004) ได้ศึกษาการหมักน้ำตาลด้วยการตรึงเซลล์ *S. cerevisiae* เพื่อให้สามารถผลิตเอทานอลได้ ซึ่งเป็นการพัฒนาประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก ถังหมักที่บรรจุเซลล์ตรึง (immobilized cell reactor, ICR) จะใช้คอลัมน์ที่บรรจุเม็ดเซลล์ที่ถูกตรึงเรียบร้อยแล้ว ด้วยแคตเช่ยมอลจินेट ปริมาณของเอทานอลจะคงที่หลังจากหมัก 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการหมักจะขึ้นอยู่กับอัตราการให้อาหารผ่านคอลัมน์และอัตราการเพร์ของอาหารไปสู่เซลล์ นอกจากนี้ยังได้ทำการหมักแบบไม่มีการให้อาหารเพิ่มเติมในระหว่างการหมักแบบคงที่ โดยเริ่มต้นการหมักโดยใช้กลูโคสเข้มข้นถึง 50 g/l เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่หมักได้กับการหมักแบบให้อาหารเพิ่มและหมุนเวียนตลอดการหมักแบบต่อเนื่อง พนว่าในการหมักแบบคงที่นั้น เซลล์สามารถใช้น้ำตาลได้ถึง 99.6% และผลิตเอทานอลได้เพียง 12.5% v/v หลังจาก 27 ชั่วโมง ในขณะที่การหมักแบบ ICR ใช้ปริมาณน้ำตาลเพียง 88.2% แต่ได้ปริมาณเอทานอลมากกว่าถึง 16.7% v/v หลังจากการหมักเพียง 6 ชั่วโมง นอกจากนี้เมื่อเพิ่มกลูโคสความเข้มข้นถึง 150 g/l จะได้ปริมาณเอทานอล 5% v/v ที่ 6 ชั่วโมง คิดเป็น %yield เท่ากับ 38% โดยพบว่าแบบ ICR ได้ %yield ที่เพิ่มขึ้น 27% และลดระยะเวลาการหมักจาก 24 ชั่วโมงเหลือ 7 ชั่วโมง อัตราการผลิตแบบ ICR ได้เท่ากับ 10.3, 2.3, 2.8 g/hour เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 25, 35, 58 g/l ตามลำดับ ส่วนอัตราการผลิตแบบคงที่จะมีเพียง 0.29 g/hour เมื่อใช้กลูโคสเข้มข้น 50 g/l โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่หมักได้มากที่สุดทั้ง 2 แบบ พนว่า ICR มีปริมาณเอทานอลที่เพิ่มมากกว่าเดิมถึง 10 เท่า และสามารถใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่มากถึง 150 g/l มาใช้ในการหมักเอทานอลได้ (Najafpour Ghasem and et al., 2004: 251-260)

บริษัท Kyowa Hakko Kogyo ในญี่ปุ่น ได้สร้างโรงงานผลิตเอทานอล โดยใช้สต์ตริงที่เตรียมด้วยการตักจับด้วยอัลจินेट โรงงานนี้จะมีถังปฏิกรณ์ขนาด 4000 ลิตร และผลิตเอทานอลบริสุทธิ์ได้ 2600 ลิตรต่อวัน เม็ดอัลจินेटจะถูกเตรียมโดยตรงในถังปฏิกรณ์ซึ่งไม่ต้องใช้เครื่องมือใดๆ เพิ่มเติม และใช้เวลาในการเตรียมเพียง 3-4 ชั่วโมง โรงงานทดลองแห่งนี้ใช้ระบบคอมพิวเตอร์ควบคุมทั้งหมด ระบบการทำงานในกระบวนการผลิตเอทานอลเป็นระบบต่อเนื่องในเวลา 4000 ชั่วโมง (ประมาณ 6 เดือน) มีอัตราการผลิตเอทานอลอย่างคงที่ (8.5-9% v/v) จากการใช้โนลัสเจ็อจางเป็นขับสตีรท ปริมาณการผลิตเอทานอลด้วยระบบนี้สูงกว่าการใช้ถังหมักแบบแบทซ์ โรงงานนี้เป็นโรงงานระดับใหญ่โรงงานแรกที่ใช้เซลล์ตรึงในระดับอุตสาหกรรม (ภาณี คณาสวัสดิ์, 2537: 46)

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การศึกษาอัตราการเจริญของยีสต์

(1) เตรียมสารละลายน้ำอหาราเหลว (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 และ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชามพู่ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นใช้สำลีปิดช่องวิดแล้วใช้พลาสติกคลุมปากช่องอีกชั้น นำไปปั่นเชือที่อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

(2) ใช้ loop เจียเชือยีสต์ *S. cerevisiae* จากอาหารร้อนอุ่น (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ข) มา 1 loop และนำมายังในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ในข้อ (1) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ยีสต์เจริญในอาหารที่เตรียมไว้

(3) เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ใช้ไนโตรปีเพ็ต (micropipette) ปีเปตสารละลายนีสต์ในข้อ (2) มา 1 มิลลิลิตร (ทิปต้องผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) ใส่ลงในสารละลายน้ำอหาราที่เตรียมไว้แล้วในข้อ (1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อวัดอัตราการเจริญของยีสต์ที่เจริญในอาหารที่เตรียมไว้

(4) วัดการเจริญเติบโตของยีสต์โดยการวัดค่าความชุนด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ทุกๆ 1 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง และนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟ การเจริญของยีสต์ ระหว่างเวลา (ชั่วโมง) กับค่าการดูดกลืนแสง (Abs) โดยใช้สารละลายน้ำอหาราที่ยังไม่ได้ใส่ยีสต์เป็น Blank

(5) เลือกช่วงเวลาที่ยีสต์มีอัตราการเจริญสูงสุด มาใช้ในการเลี้ยงยีสต์เพื่อนำยีสต์ไปตรึงเซลล์ใน หัวข้อที่ 3.2 (พบว่าที่ 16 ชั่วโมงยีสต์มีอัตราการเจริญสูงสุด)

#### 3.2 การตรึงเซลล์ยีสต์

(1) เตรียมสารละลายนีสต์โดยทำเหมือนข้อ (1) ในหัวข้อ 3.1 โดยเลี้ยงยีสต์ในสารละลายน้ำอหาร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

(2) เมื่อครบ 16 ชั่วโมงแล้ว นำสารละลายนีสต์ที่ได้มาเทลงในหลอดทดลอง (หลอดทดลองต้องปิดชูกด้วยสำลี และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) นำไปหมุนเรียงที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

(3) เทสารละลายน้ำใส (supernatant) ทิ้ง และนำตะกอนที่ได้ (เซลล์ยีสต์) มาผสมกับสารละลายน 3% w/v โซเดียมอัลจิเนตปริมาตร 50 ml (โดยสารละลายน โซเดียมอัลจิเนตผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

(4) นำสารละลายน โซเดียมอัลจิเนตที่ผสมกับยีสต์เรียบร้อยแล้วมาเทใส่ในเข็มฉีดยากระบอกแก้ว ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยหยดสารละลายน ที่จะหยดผ่านเข็มฉีดยาลงใน  $0.5 \text{ M CaCl}_2$  ที่เย็น ( $0.5 \text{ M CaCl}_2$  ต้องฆ่าเชื้อแล้ว) จะได้เซลล์ตรึงที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลมขนาดเล็ก (bead) ที่บรรจุเซลล์ยีสต์อยู่

ภายใน ดังแสดงในภาคผนวก จ (ภาพที่ จ.2) โดยขณะตั้งเวลาเพื่อป้องกันไม่ให้เม็ดเซลล์ตึงติดกัน และระยะห่างของปลายเข็มฉีดยา กับผิวของสารละลายน 0.5 M CaCl<sub>2</sub> ควรห่างกันประมาณ 2-3 เซนติเมตร เพื่อป้องกันไม่ให้แคลเซียมอัลจิเนตที่มีเซลล์ยึดติดอยู่ข้างในแตกและรูปทรงของเม็ดเจลเปลี่ยนไป

(5) ถ่ายรูปด้วยกล้องชุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องร้าด เพื่อศึกษาการเข้าไปในเม็ดเจลของเซลล์ยึดติดแสดงในภาคผนวก จ (ภาพที่ จ.2)

(6) แช่เซลล์ตึงไว้ใน 0.5 M CaCl<sub>2</sub> เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ตึงคงรูปและเส้นใยมากยิ่งขึ้น

(7) ล้างเซลล์ตึงด้วยน้ำกัลลัน (DI Water) ที่ม่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ก่อนนำเซลล์ตึงไปหมัก

### 3.3 การหมักแบบคงที่

#### 3.3.1 การหมักแบบคงที่โดยใช้เซลล์อิสระ

(1) เตรียมสารละลายน 0.5 M CaCl<sub>2</sub> โดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ (1) ในหัวข้อ 3.1

(2) เมื่อครบ 16 ชั่วโมงแล้ว ใช้ในโกรบีเปต ปีเปตสารละลายน 2 มิลลิลิตรใส่ลงในสารละลายนอาหารที่เตรียมไว้ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพื่อทำการหมักอุ่นออล

(3) เก็บตัวอย่างครั้งละ 8 มิลลิลิตร ทุกๆ 2 วัน จนกระทั่งการผลิตออกanolนั้นเริ่มงอกที่หรือคนน้อยลง โดยเก็บตัวอย่างใส่ในขวดนิคสารตัวอย่าง (vial) แล้วหยด 10% w/v KMS ลงไป 10 หยด เพื่อให้ยสต์ที่ดูดการเจริญ จากนั้นปิดฝาและใช้พาราฟิล์มพันฝาขวดอีกครั้งหนึ่ง เก็บสารตัวอย่างไว้ในตู้เย็นเพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณออกanolด้วยเครื่องแก๊สโกรามาโทรกราฟ

#### 3.3.2 การหมักแบบคงที่โดยใช้เซลล์ตึง

(1) ล้างเซลล์ตึงด้วยน้ำกัลลัน (ผ่านการม่าเชื้อแล้ว) 3 ครั้ง แล้วเทเซลล์ตึงลงในสารละลายนอาหารปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพื่อหมักอุ่นออล ดังแสดงในภาคผนวก จ (ภาพที่ จ.1)

(2) เก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อที่ (3) ในหัวข้อ 3.3.1 แต่ต่างกันตรงที่การหมักแบบคงที่โดยใช้เซลล์ตึงนั้นทำการหมักทั้งหมด 2 รอบ โดยหลังจากเก็บตัวอย่างในวันสุดท้ายของรอบแรก ต้องล้างเซลล์ตึงด้วยน้ำกัลลัน (ผ่านการม่าเชื้อแล้ว) 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ใน 0.5 M CaCl<sub>2</sub> ที่เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ตึงนั้นแข็งตัวและเส้นใย แล้วนำมารีดอุ่นออล 3 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ตึงมาใส่ลงในสารละลายนอาหาร แล้วทำการหมักต่อไปโดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน

### 3.4 การหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ตึง

วิธีการทดลองทำเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.3.2 (การหมักแบบคงที่โดยใช้เซลล์ตึง) แต่ต่างตรงที่ทุกครั้งหลังจากเก็บตัวอย่างแล้ว (8 ml) จะต้องปีเปตสารละลายนอาหารที่ใหม่ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ลงไปแทนที่ในขวดรูปปัมพ์ โดยทำการเก็บตัวอย่างและเติมอาหารทุกๆ 2 วัน

### 3.5 การวิเคราะห์ปริมาณอุทกานอลด้วยเทคนิคแก๊สโคมาโทกราฟี – เฮดสเปช (Gas Chromatography – headspace, GC - headspace )

#### 3.5.1 การตั้งพารามิเตอร์ของเครื่องแก๊สโคมาโทกราฟี

เปิดเครื่องแก๊สโคมาโทกราฟีไว้ประมาณ 30 นาที โดยตั้งสภาวะต่างๆ ของเครื่อง ไว้ดังนี้

Carrier gas	:	He
Column temp	:	50°C
Injector temp	:	150°C
Detector temp	:	150°C
Inject	:	0.5 ml

หมายเหตุ : ใช้คอลัมน์ DB-1

#### 3.5.2 การวิเคราะห์อุทกานอลในเชิงปริมาณ

##### (1) การสร้างกราฟมาตรฐาน

นำสารละลายน้ำตรฐานอุทกานอลความเข้มข้น 0.1, 1, 3, 5 และ 7% v/v (ซึ่งเตรียมได้จากข้อ ข. 4 ในภาคผนวก ข) ไปแช่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 78°C ทิกระหว่าง เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นใช้เข็มฉีดยาดูดเฉพาะ ไอของอุทกานอลส่วนบน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ปริมาณอุทกานอลด้วยเครื่องแก๊สโคมาโทกราฟี นำผลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายนับอัตราส่วนพื้นที่ได้พีก (area ratio) โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ชี้ แล้วนำค่าที่ได้มาเฉลี่ยเพื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน

##### (2) การวิเคราะห์สารตัวอย่าง

นำสารตัวอย่าง (ที่เตรียมได้จากข้อ 2 ในภาคผนวก ก.5) ไปประเทยโดยแช่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 78°C เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นใช้เข็มฉีดยาดูดเฉพาะ ไอของอุทกานอลส่วนบน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณอุทกานอลด้วยเครื่องแก๊สโคมาโทกราฟี นำอัตราส่วนพื้นที่ได้พีกที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณอุทกานอลที่ได้จากการหมัก

#### 3.5.3 การทดสอบความถูกต้อง

(1) ปีเปตสารตัวอย่างและสารละลายน้ำตรฐานอุทกานอลที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และสารละลายน้ำโซเดียมคลอโรฟอร์ฟานอลที่เป็น internal standard อย่างละ 200  $\mu$ l ใส่ลงในขวดฉีดสารตัวอย่างขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มี NaCl 0.3 g ปิดฝาให้แน่น นำไปแช่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 78°C เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นใช้เข็มฉีดยาดูดเฉพาะ ไอของอุทกานอลส่วนบน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโคมาโทกราฟี โดยทำทั้งหมด 3 ชี้

(2) ปีเปตสารตัวอย่างและสารละลายน้ำโซเดียมคลอโรฟอร์ฟานอลที่เป็น internal standard อย่างละ 200  $\mu$ l ใส่ลงในขวดฉีดสารตัวอย่าง ขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มี NaCl 0.3 g ปิดฝาให้แน่น นำไปแช่ใน

อ่างน้ำที่อุณหภูมิ 78°C เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นใช้เข็มฉีดยาดูดเฉพาะ ไอของอ Ethanol ส่วนบนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโคมากอฟราฟี โดยทดลองช้า 3 ครั้ง

(3) ปฏิเสธสารละลายน้ำที่อ่อนตัวความเข้มข้นที่แน่นอน สารตัวอย่าง และสารละลายน้ำที่อ่อนตัวที่เป็น internal standard อย่างละ 200  $\mu\text{l}$  ใส่ลงในขวดฉีดสารตัวอย่างขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มี NaCl 0.3 g ปิดฝาให้แน่น นำไปแช่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 78°C เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นใช้เข็มฉีดยาดูดเฉพาะ ไอของอ Ethanol ส่วนบนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโคมากอฟราฟี โดยทดลองช้า 3 ครั้ง

(4) ผลที่ได้ไปคำนวณหา % recovery

#### 3.5.4 การทดสอบความเที่ยง

ปฏิเสธสารมาตรฐานอ่อนตัวที่ความเข้มข้น 3% v/v และสารละลายน้ำที่อ่อนตัวที่เป็น internal standard อย่างละ 200  $\mu\text{l}$  ใส่ลงในขวดฉีดสารตัวอย่าง ขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มี NaCl 0.3 g ปิดฝาให้แน่น นำไปแช่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 78°C เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นใช้เข็มฉีดยาดูดเฉพาะ ไอของอ Ethanol ส่วนบนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ด้วยด้วยเทคนิคแก๊สโคอมากอฟราฟี โดยทำทั้งหมด 10 ช้า แล้วนำอัตราส่วนพื้นที่ไดพิกที่ไดในแต่ละครั้งมาหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ตามลำดับ

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 ผลการศึกษาอัตราการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae*

จากการศึกษาอัตราการเจริญของยีสต์ โดยอาศัยหลักการวัดความชุ่นของเซลล์ยีสต์ที่เพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป โดยใช้เครื่อง UV-vis spectrophotometer ติดตามการเจริญเติบโตของยีสต์ จากการวัดค่าความชุ่นจากค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งพบว่า ค่าความชุ่นของเซลล์ยีสต์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 1-19 หลังจากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงที่ 20-24 เนื่องจากการเจริญของยีสต์เริ่มคงที่ ความชุ่นจึงเริ่มคงที่

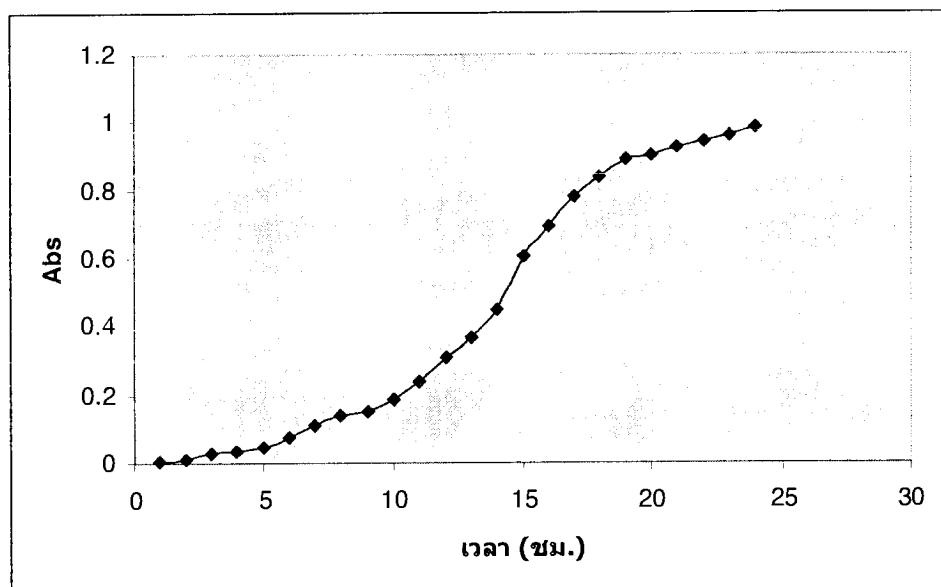
ตารางที่ 4.1 อัตราการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ( $A_{620}$ ) ทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (Abs)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
1	0.0060	0.0050	0.006
2	0.0089	0.0091	0.009
3	0.028	0.028	0.028
4	0.034	0.038	0.036
5	0.056	0.041	0.049
6	0.082	0.068	0.075
7	0.113	0.111	0.112
8	0.139	0.141	0.140
9	0.149	0.149	0.149
10	0.185	0.187	0.186
11	0.240	0.242	0.241
12	0.310	0.300	0.310
13	0.370	0.365	0.368
14	0.447	0.449	0.448
15	0.593	0.614	0.604
16	0.696	0.692	0.694
17	0.779	0.787	0.783

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (Abs)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
18	0.839	0.839	0.839
19	0.887	0.894	0.891
20	0.906	0.901	0.904
21	0.924	0.927	0.926
22	0.940	0.944	0.942
23	0.967	0.961	0.964
24	0.988	0.978	0.983

จากตารางที่ 4.1 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (ชั่วโมง) กับค่าการดูดกลืนแสง (Abs) แสดงดังนี้ (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 กราฟการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 1 ชั่วโมง

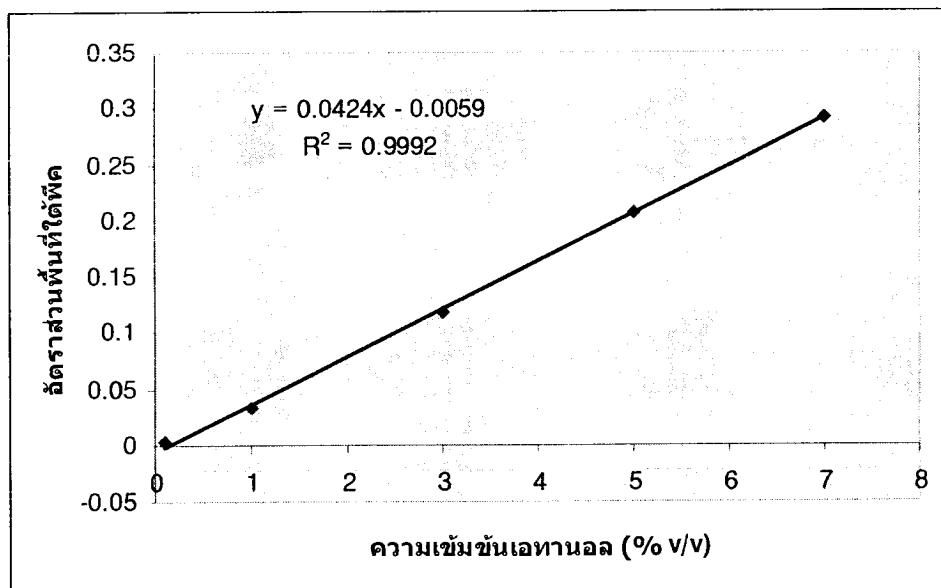
#### 4.2 การสร้างกราฟมาตรฐานเอทานอล

จากการทดลองเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของการหมักเอทานอลที่มีความเข้มข้น 0.1, 1, 3, 5 และ 7% v/v ได้ผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นเอทานอลกับอัตราส่วนพื้นที่ได้พิเศษระหว่างเอทานอลกับไฮโซโพรพานอลที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 3, 5 และ 7% v/v

ความเข้มข้นของสารละลายน้ำมาตรฐานเอทานอล (% v/v)	อัตราส่วนพื้นที่ได้พิเศษของเอทานอลต่อ Internal standard (area ratio)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0.1	0.0025	0.0029	0.0027
1.0	0.0335	0.0336	0.0336
3.0	0.1166	0.1183	0.1175
5.0	0.2018	0.2129	0.2074
7.0	0.2841	0.3000	0.2921

นำค่าจากตารางที่ 4.2 มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ได้พิเศษเอทานอลกับความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) ได้กราฟมาตรฐานดังนี้ (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 กราฟมาตรฐานของเอทานอล

### 4.3 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบต่างๆ

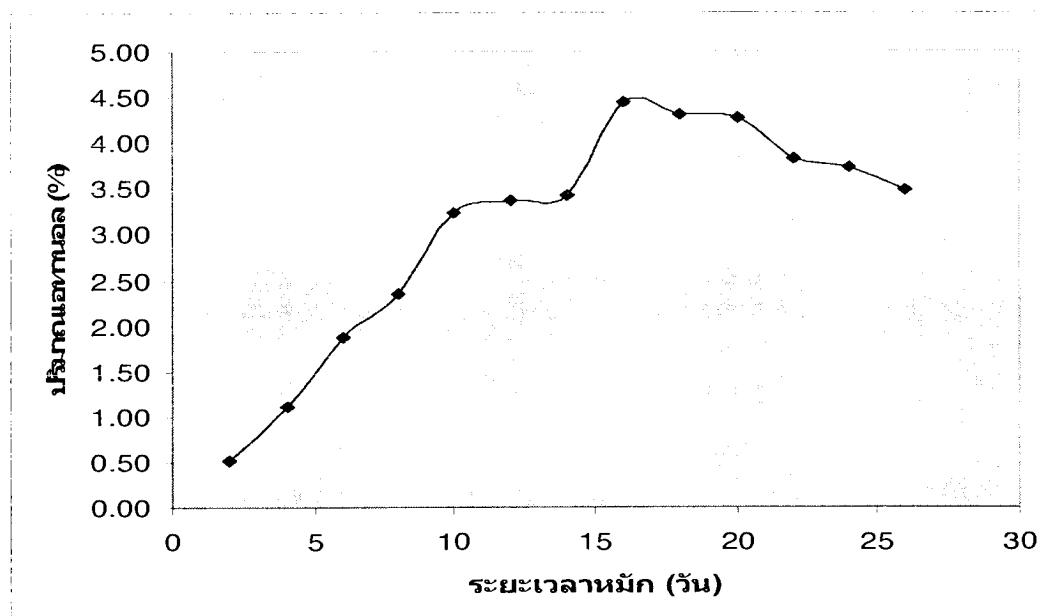
#### 4.3.1 การหมักแบบคงที่โดยใช้เซลล์อิสระ

จาก การหมักเอทานอลโดยใช้เซลล์อิสระ แล้วนำสารละลายอาหารที่ใช้หมักไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC - headspace พบร่วมปริมาณเอทานอลสูงสุดอยู่ในช่วง 4.27-4.45% v/v โดยระยะเวลาที่ใช้ในการหมักอยู่ในช่วง 16-20 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบคงที่โดยใช้เซลล์อิสระ

ระยะเวลา หมัก (วัน)	อัตราส่วนพื้นที่ได้พีคของเอทานอลต่อ Internal Standard (area ratio)			ปริมาณเอทานอล (% v/v)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	
2	0.0323	0.0211	0.0267	0.52
4	0.0595	0.0588	0.0591	1.11
6	0.0966	0.1056	0.1011	1.87
8	0.1320	0.1231	0.1276	2.35
10	0.1759	0.1763	0.1761	3.24
12	0.1790	0.1870	0.1830	3.36
14	0.1770	0.1964	0.1867	3.43
16	0.1829	0.1737	0.1783	4.45
18	0.1754	0.1707	0.1731	4.32
20	0.1751	0.1875	0.1813	4.27
22	0.1614	0.1632	0.1623	3.83
24	0.1670	0.1490	0.1580	3.73
26	0.1532	0.1418	0.1475	3.49

นำผลที่ได้จากการหมักโดยใช้เชลล์อิสระมาพลอตกราฟระหว่างปริมาณเอทานอล (% v/v) กับระยะเวลาการหมัก (วัน) ได้ผลดังนี้ (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบคงที่โดยใช้เชลล์อิสระ

#### 4.3.2 การหมักแบบคงที่โดยใช้เชลล์ตรึง

จาก การหมักแบบคงที่โดยใช้เชลล์ตรึง (รอบที่ 1) แล้วนำสารละลายอาหารที่ใช้หมักไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-headspace พบร่วมปริมาณเอทานอลสูงสุดอยู่ในช่วง 3.23-3.97% v/v โดยระยะเวลาที่ใช้ในการหมักอยู่ในช่วง 20-24 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และเมื่อนำเชลล์ตรึงไปหมักในรอบที่ 2 พบร่วมปริมาณเอทานอลสูงสุดอยู่ในช่วง 3.87-3.88% v/v โดยระยะเวลาที่ใช้ในการหมักอยู่ในช่วง 22-26 วัน ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.5

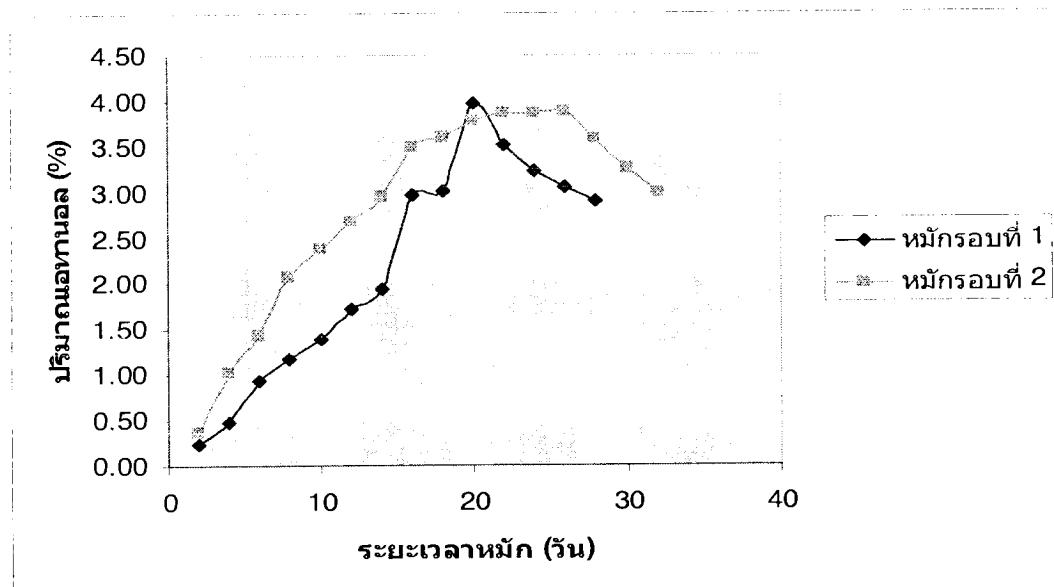
ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณยาทานอลที่ได้จากการหมักแบบคงที่โดยใช้เซลล์ตรึง (รอบที่ 1)

ระยะเวลา หมัก (วัน)	อัตราส่วนพื้นที่ต่อพื้นของยาทานอลต่อ Internal Standard (area ratio)			ปริมาณยาทานอล (% v/v)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	
2	0.0120	0.0102	0.0111	0.23
4	0.0269	0.0229	0.0249	0.48
6	0.0534	0.0460	0.0497	0.94
8	0.0698	0.0553	0.0625	1.17
10	0.0804	0.0700	0.0752	1.40
12	0.1023	0.0835	0.0929	1.72
14	0.1159	0.0951	0.1055	1.95
16	0.1179	0.1168	0.1173	2.97
18	0.1137	0.1247	0.1192	3.01
20	0.1508	0.1335	0.1421	3.97
22	0.1654	0.1317	0.1485	3.51
24	0.448	0.1275	0.1362	3.23
26	0.1363	0.1203	0.1283	3.05
28	0.1293	0.1141	0.1219	2.90

**ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบคงที่โดยใช้เซลล์ตระกูล (รอบที่ 2)**

ระยะเวลา หมัก (วัน)	อัตราส่วนพื้นที่ไดฟีคของเอทานอลต่อ Internal Standard (area ratio)			ปริมาณเอทานอล (% v/v)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	
2	0.0129	0.0136	0.0132	0.37
4	0.0360	0.0417	0.0389	1.02
6	0.0532	0.0570	0.0551	1.44
8	0.0738	0.0746	0.0742	2.07
10	0.0892	0.0822	0.0857	2.38
12	0.1012	0.0931	0.0971	2.68
14	0.1179	0.1208	0.1193	2.95
16	0.1431	0.1435	0.1433	3.49
18	0.1493	0.1480	0.1487	3.61
20	0.1578	0.1558	0.1568	3.79
22	0.1600	0.1610	0.1605	3.87
24	0.1603	0.1607	0.1605	3.87
26	0.1529	0.1691	0.1610	3.88
28	0.1456	0.1491	0.1474	3.58
30	0.1367	0.1381	0.1374	3.26
32	0.1246	0.1272	0.1259	3.00

นำผลที่ได้จากการหมักแบบคงที่โดยใช้เชลล์ตรีงในรอบที่ 1 และ 2 มาplotกราฟระหว่างปริมาณethanol (% v/v) กับระยะเวลาการหมัก (วัน) ได้ผลดังนี้ (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบคงที่โดยใช้เชลล์ตรีงในรอบที่ 1 และ 2

#### 4.3.3 การหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เชลล์ตรีง

จากการทดลองที่ 3.6 การหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เชลล์ตรีง เมื่อนำสารตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC - headspace พบร่วมปริมาณเอทานอลสูงสุดอยู่ในช่วง 4.18-4.36% v/v โดยระยะเวลาที่ 1 ใช้ในการหมักอยู่ในช่วง 30-32 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และเมื่อนำเชลล์ตรีงไปหมักในรอบที่ 2 พบร่วมปริมาณเอทานอลสูงสุดอยู่ในช่วง 4.32-4.45% v/v โดยระยะเวลาที่ใช้ในการหมักอยู่ในช่วง 20-24 วัน ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.7

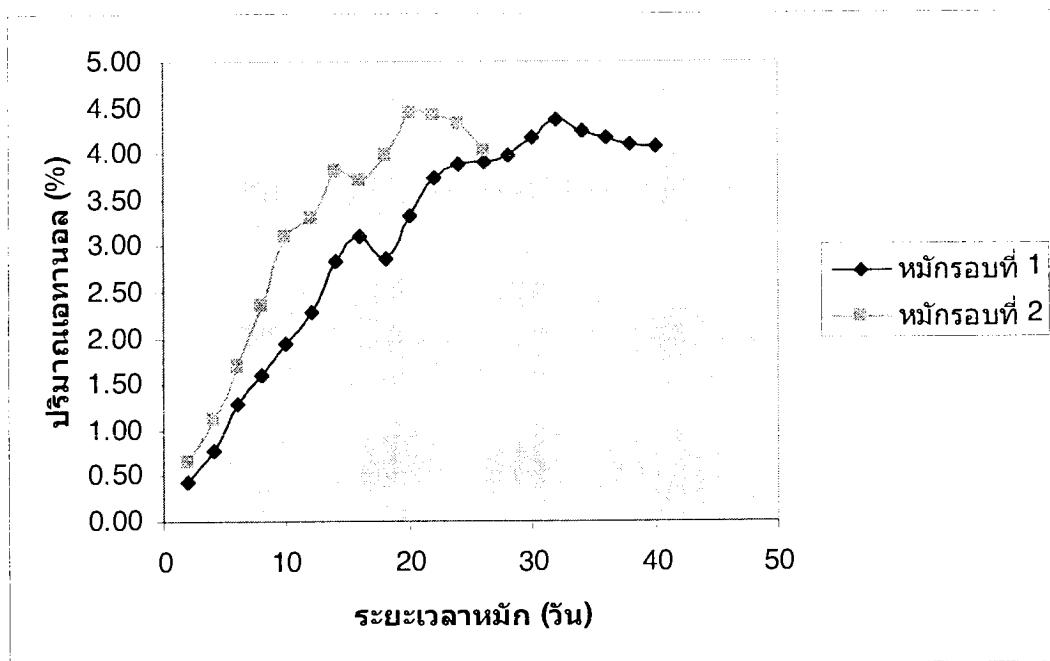
ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ครึ่ง (รอบที่ 1)

ระยะเวลา หมัก (วัน)	อัตราส่วนพื้นที่ได้พืคของเอทานอลต่อ Internal Standard (area ratio)			ปริมาณเอทานอล (% v/v)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	
2	0.0141	0.0127	0.0134	0.44
4	0.0280	0.0266	0.0273	0.78
6	0.0477	0.0485	0.0481	1.29
8	0.0627	0.0597	0.0612	1.60
10	0.0685	0.0822	0.0753	1.95
12	0.0880	0.0909	0.0894	2.29
14	0.1040	0.1197	0.1119	2.83
16	0.1178	0.1280	0.1229	3.10
18	0.1174	0.1079	0.1126	2.85
20	0.1390	0.0985	0.1187	3.33
22	0.1454	0.1209	0.1332	3.73
24	0.1516	0.1259	0.1388	3.88
26	0.1668	0.1644	0.1656	3.91
28	0.1704	0.1665	0.1684	3.97
30	0.1620	0.1628	0.1624	4.18
32	0.1664	0.1732	0.1698	4.36
34	0.1648	0.1649	0.1648	4.24
36	0.1622	0.1630	0.1626	4.18
38	0.1612	0.1585	0.1598	4.11
40	0.1590	0.1588	0.1589	4.09

**ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ตรึง  
(รอบที่ 2)**

ระยะเวลา หมัก (วัน)	อัตราส่วนพื้นที่ตัวพิคของเอทานอลต่อ Internal Standard (area ratio)			ปริมาณเอทานอล (%v/v)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	
2	0.0217	0.0212	0.0215	0.67
4	0.0386	0.0398	0.0387	1.13
6	0.0591	0.0607	0.0599	1.69
8	0.0943	0.0903	0.0923	2.35
10	0.1273	0.1250	0.1261	3.10
12	0.1351	0.1349	0.1350	3.30
14	0.1495	0.1653	3.8031	3.80
16	0.1523	0.1550	0.1537	3.72
18	0.1647	0.1651	0.1649	3.97
20	0.1806	0.1924	0.1865	4.45
22	0.1778	0.1928	0.1853	4.43
24	0.1831	0.1845	0.1838	4.32
26	0.1706	0.1719	0.1713	4.04

นำผลที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ตรีงในรอบที่ 1 และ 2 มาplotกราฟ  
ระหว่างปริมาณเอทานอล (% v/v) กับระยะเวลาการหมัก (วัน) ได้ผลดังนี้ (ภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ตรีง  
ในรอบที่ 1 และ 2

#### 4.4 การทดสอบความเที่ยง

จากการวิจัยในหัวข้อที่ 3.5.4 โดยนำสารมาตรฐานออกanol มีความเข้มข้น 3% v/v มาวิเคราะห์ทั้งหมด 10 ชั้่ว พบว่าได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.1095 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ  $3.0940 \times 10^{-4}$  และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.2827% ดังแสดงผลในตารางที่ 4.8 ดังนี้

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานออกanol 3% v/v จำนวน 10 ครั้ง

ครั้งที่	Area ratio ( $X_i$ )	$(X_i - X)$	$(X_i - X)^2$
1	0.1095	$8.6 \times 10^{-5}$	$7.396 \times 10^{-9}$
2	0.1089	$-6.7 \times 10^{-4}$	$4.489 \times 10^{-7}$
3	0.1094	$-2.2 \times 10^{-5}$	$4.84 \times 10^{-10}$
4	0.1118	$2.306 \times 10^{-3}$	$5.3176 \times 10^{-6}$
5	0.1022	$-7.252 \times 10^{-3}$	$5.259 \times 10^{-5}$
6	0.1120	$2.558 \times 10^{-3}$	$6.5434 \times 10^{-6}$
7	0.1116	$2.149 \times 10^{-3}$	$4.6182 \times 10^{-6}$
8	0.1078	$-1.645 \times 10^{-3}$	$2.7060 \times 10^{-6}$
9	0.1097	$1.97 \times 10^{-4}$	$3.8809 \times 10^{-8}$
10	0.1118	$2.295 \times 10^{-3}$	$5.2670 \times 10^{-6}$
	$\sum X = 0.1095$		$\sum (X_i - X)^2 = 7.7539 \times 10^{-6}$

ค่าเฉลี่ย

$$\bar{X} = \sum X_i / N$$

$$\bar{X} = 0.1095$$

ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N-1}}$$

N-1

$$= 3.0940 \times 10^{-4}$$

ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

$\bar{X}$

$$= \frac{3.0940 \times 10^{-4}}{0.1095} \times 100 = 0.2827\%$$

0.1095

#### 4.5 การทดสอบความถูกต้อง

จากการวิเคราะห์เพื่อทดสอบความถูกต้องในหัวข้อที่ 3.5.3 พนว่า %Recovery มีค่าเท่ากับ 103.75% ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ % Recovery

ครั้งที่	อัตราส่วนพื้นที่ไดฟิคของเอกสารนอลต่อ Internal Standard (area ratio)		
	Sample + 10% Isopropanol	3% Ethanol + 10% Isopropanol	Sample + 3% Ethanol + 10% Isopropanol
1	0.1452	0.0989	0.2539
2	0.1475	0.1023	0.2545
3	0.1428	0.1187	0.2591
เฉลี่ย	0.1452	0.1066	0.2558

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{Area Ratio (Sample + 3% Ethanol)} - \text{Area Ratio (Sample)}}{\text{Area Ratio 3% Ethanol}} \times 100$$

$$= \frac{0.2558 - 0.1452}{0.1066} \times 100$$

$$= 103.75\%$$

## บทที่ 5

### สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักทั้ง 2 แบบ โดยการหมักโดยใช้เชลล์อิสระ แบบที่สอง คือ การหมักแบบใช้เชลล์ตรีง (หมักแบบคงที่และหมักแบบต่อเนื่อง)

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาอัตราการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยการวัดความชุ่นของเชลล์ยีสต์ที่เพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปโดยใช้เครื่อง UV-vis spectrophotometer วัดความชุ่นโดยอาศัยหลักการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายยีสต์ทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะเห็นว่า เมื่อเวลาผ่านไปสารละลายยีสต์มีความชุ่นเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากมีการเพิ่มจำนวนเชลล์ในสารละลายอาหาร ทำให้มีอนามัยในการดูดกลืนแสงทำให้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยในชั่วโมงที่ 2-12 ค่าการดูดกลืนแสงมีอัตราการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก โดยลักษณะการเจริญของยีสต์จะมีลักษณะเป็นรูปตัว S (sigmoid curve) แสดงใน(ภาพที่ 4.1) โดยแบ่งการเจริญได้เป็น 3 ช่วงคือ lag phase (ชั่วโมงที่ 1-7), log phase(ชั่วโมงที่ 8-16) และ stationary phase (ชั่วโมงที่ 17-24) ดังนั้นในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยวิธีการตรึงเชลล์ยีสต์นั้น จะเลี้ยงยีสต์ให้อยู่ในช่วงของ log phase (ชั่วโมงที่ 8-16) เนื่องจากมีการเจริญเติบโตได้เร็วว่าช่วงอื่นๆ (เปรียบเทียบจากความชุ่นที่วัดได้จากการดูดกลืนแสง) เพราะถ้ามีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว การผลิตเอทานอลจะเพิ่มตามด้วยเช่นกัน

เมื่อมีการตรึงเชลล์ยีสต์ด้วยโซเดียมอัลจิเนตนี้ เชลล์ยีสต์สามารถเข้าไปในเม็ดของโซเดียมอัลจิเนตได้ ซึ่งจะเห็นได้จากการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงใน(ภาพที่ 4.2 ภาคผนวก ง) เปรียบเทียบกับพื้นผิวของเม็ดโซเดียมอัลจิเนตเมื่อไม่มีเชลล์ยีสต์ แสดงใน(ภาพที่ 4.1 ภาคผนวก ง) นั้นพื้นผิวน้ำจะเรียบแต่เมื่อมีเชลล์ยีสต์สามารถเข้าไปในเม็ดของโซเดียมอัลจิเนต พื้นผิวน้ำจะขุ่นระเนื่องจากเกิดจากโคลโนนของยีสต์ แต่หลังจากการหมักผ่านไปเม็ดเจลจะมีการแตกออกเห็นเชลล์ยีสต์อยู่ข้างใน แสดงใน (ภาพที่ 4.3 – 4.4 ภาคผนวก ง)

ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบต่างๆ จากการผลการทดลอง เมื่อนำสารตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโกรามาโทกราฟี พบว่าปริมาณเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อถึงจุดหนึ่งปริมาณเอทานอลจะเริ่มลดลง โดยในการหมักแบบคงที่โดยใช้เชลล์อิสระ ในช่วง 16-20 วัน เป็นช่วงที่ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ อยู่ในช่วง 4.23-4.45% v/v การหมักแบบคงที่โดยใช้เชลล์ตรึงช่วง 20-24 วัน ปริมาณเอทานอลสูงสุดอยู่ในช่วง 3.23-3.97% v/v ส่วนในการหมักรอบที่ 2 ช่วง 22-26 วัน ปริมาณ เอทานอลสูงสุดอยู่ในช่วง 3.87-3.88% v/v และการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เชลล์ตรึงในรอบที่ 1 ช่วง 30-32 วัน ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด อยู่ในช่วง 4.18-4.36% v/v ส่วนการหมักรอบที่ 2 ในช่วง 20-24 วัน ปริมาณเอทานอลสูงสุดอยู่ในช่วง 4.32-4.45%

v/v และหลังจากนั้นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลง ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักทั้ง 3 แบบ จะมีลักษณะที่คล้ายกัน คือ ปริมาณ เอทานอลจะเริ่มคงที่และเริ่มลดลงเรื่อยๆ ตามลำดับ

## 5.2 อภิรายผลการวิจัย

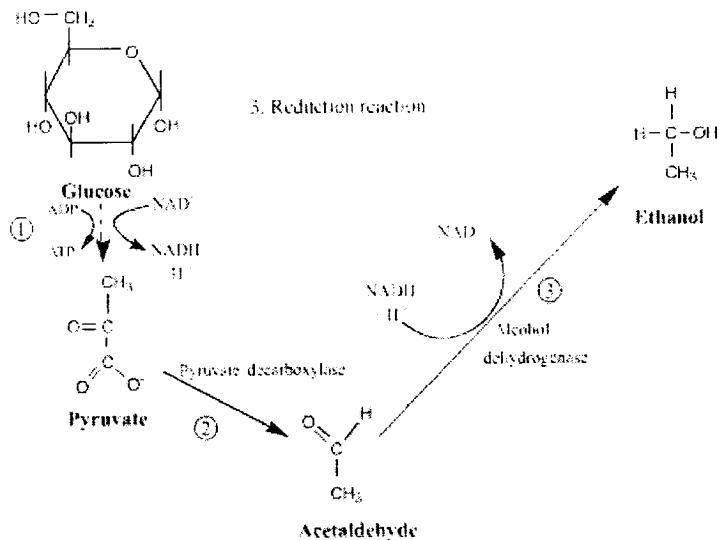
จากการศึกษาอัตราการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้เครื่อง UV-vis spectrophotometer วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายน้ำ พบว่าค่าการดูดกลืนแสงมีค่ามากขึ้นเรื่อยๆ เมื่อong จากสารละลายน้ำมีความชุ่มน้ำมากขึ้น ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่อนได้จากเครื่องมากขึ้น เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาพลอตกราฟเพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ พบว่าลักษณะของกราฟที่ได้ใน(ภาพที่ 4.1) จะแบ่งออกเป็นทั้งหมด 4 ช่วง ([www.maquah.net/media/IR/Yeast\\_GROWTH\\_CURVE.html](http://www.maquah.net/media/IR/Yeast_GROWTH_CURVE.html). [2 มีนาคม 2549] ดังนี้

**lag phase** คือ เส้นกราฟเกือบขนานกับแนวโน้มชั่งอยู่ในช่วงเวลา 1-7 ชั่วโมงแรก เป็นระยะที่ยีสต์ไม่มีการขยายขนาดหรือเพิ่มจำนวนแต่มีกิจกรรมของเซลล์ เนื่องจากปรับตัวกับอาหารที่ใช้เลี้ยงแต่ในระยะสุดท้าย จะมีบางเซลล์ที่เจริญพร้อมแบ่งเซลล์ ก็จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนทำให้จำนวนของยีสต์สูงขึ้นเล็กน้อย ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงนี้จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

**log phase** เป็นระยะที่มีอัตราการเจริญสูงสุด ชั่งอยู่ในช่วงเวลา 8-16 ชั่วโมง เมื่อong จำก่ายีสต์มีการปรับตัวเข้ากับอาหารที่ใช้เลี้ยงได้ และรับสารอาหารที่เพียงพอในการเจริญเติบโต จึงมีการแบ่งเซลล์พร้อมๆ กัน มีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว ความชุ่มน้ำเพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงนี้จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในขณะเดียวกันมีการผลิตเอทานอลออกมากล้า้วน้ำหมัก

**stationary phase** ในระยะนี้อาหารที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์เริ่มลดลงชั่งอยู่ในช่วง 17-24 ชั่วโมง ในขณะเดียวกันยีสต์ก็ปล่อยสารต่างๆ ออกจากการกระบวนการของเซลล์ เช่น เอทานอลสู่อาหารที่ใช้เลี้ยง เอทานอลอาจเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์เองทำให้เซลล์ยีสต์ตาย ประกอบกับยีสต์มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นพื้นที่เริ่มจำกัดจึงมียีสต์บางส่วนที่ตาย ในระยะนี้อัตราการตายเท่ากับอัตราการเจริญเติบโต จำนวนยีสต์คงเริ่มที่ ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ

เอทานอลที่ได้จากการหมักเป็นผลผลิตพolloย ได้ที่เกิดจากการกระบวนการทางไขข่องยีสต์ที่ใช้กลูโคสเป็นอาหาร โดยภายในเซลล์ยีสต์จะมีoen ไซม์ pyruvate decarboxylase และ alcohol dehydrogenase โดยใช้  $\text{NADH} + \text{H}^+$  เป็นโคเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนนำตากลูโคสให้เป็นเอทานอล ได้ เมื่อยีสต์ได้รับกลูโคสเป็นอาหาร ชั่งกระบวนการนี้จะเกิดภายในเซลล์ของยีสต์แสดงดัง (ภาพที่ 5.1) (ไฟโรมน์ กิจจะนะพานิช, 2539 : 23-24)



ภาพที่ 5.1 กระบวนการเปลี่ยนสารละลายน้ำกลูโคสเป็นเอทานอลของบีสต์

การหมักเอทานอลทั้ง 3 แบบ พนว่าในช่วงแรกปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อถึงจุดหนึ่งปริมาณเอทานอลจะเริ่มลดลง เนื่องจากในระบบแบคทีเรียสต์ใช้น้ำตาลในการเจริญอย่างเดียวที่ดังนั้นปริมาณเอทานอลจึงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เพราะจำนวนบีสต์เพิ่มขึ้น และเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณกลูโคสหรืออาหารเริ่มลดลงทำให้บีสต์มีอาหารไม่เพียงพอต่อความต้องการเมื่อเทียบกับจำนวนบีสต์ที่เพิ่มขึ้นจึงทำให้การผลิตเอทานอลลดลงนั่นเอง

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ได้จากการหมักทั้ง 3 แบบ พนว่าปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันมาก โดยการหมักแบบคงที่โดยใช้เซลล์อิสระในช่วง 16-20 วัน

ปริมาณเอทานอลสูงสุดอยู่ในช่วง 4.27-4.45% v/v และการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ตโรงในรอบที่ 1 ช่วง 30-32 วัน ปริมาณเอทานอลอยู่ในช่วง 4.18-4.36% v/v และในรอบที่ 2 ช่วง 20-24 วัน ได้ปริมาณเอทานอลอยู่ในช่วง 4.32-4.45% v/v จะเห็นว่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักทั้ง 2 แบบ มีค่าใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วง 4% v/v ส่วนการหมักแบบคงที่โดยใช้เซลล์ตโรงมีปริมาณเอทานอลสูงสุดประมาณ 3% v/v ซึ่งน้อยกว่าการหมัก 2 แบบแรกเล็กน้อย คือ ในรอบที่ 1 ช่วง 20-24 วัน ได้ปริมาณเอทานอลอยู่ในช่วง 3.23-3.97% v/v และรอบที่ 2 ช่วง 22-26 วัน ปริมาณเอทานอลอยู่ในช่วง 3.87-3.88% v/v สาเหตุที่ทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักในน้อยมากเนื่องมาจากการหมักต่อไปนี้

บีสต์ที่ใช้เป็นบีสต์ที่ได้มาจากการต่อเชื้อมากลายรุน ซึ่งจากการต่อแบบนี้อาจทำให้บีสต์เกิดการกล้ายพันธุ์หรือเกิดการปนเปื้อนกล้ายเป็นสายพันธุ์ที่ไม่บริสุทธิ์ เมื่อนำบีสต์ดังกล่าวมาใช้ในการหมักเอทานอลจึงอาจทำให้เอทานอลที่ได้มีปริมาณน้อย

ในการหมักเอทานอลโดยใช้เซลล์ตโรงส่วนใหญ่จะหมักแบบ Continuous Column Reactor โดยการเพิ่กเซลล์ตโรงลงในคอลัมน์แล้วป้อน(feed)สารละลายน้ำเข้าไปในคอลัมน์ สารละลายน้ำ

อาหารจึงสามารถซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์ตระกูล ได้มากขึ้น ทำให้ยีสต์ที่อยู่ภายในเซลล์ตระกูลได้รับอาหารได้ง่ายและมากยิ่งขึ้น ทำให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มสูงขึ้น แต่ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถจัดระบบการหมักแบบดังกล่าวได้ จึงทำให้ต้องหมักเอทานอลในภาชนะปูร์แทน ด้วยเหตุนี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้น้อย

สารละลายอาหารที่ให้กับเซลล์ตระกูลอาจมีความเข้มข้นสูงเกินไปหรือขั้นหนึ่ด จึงทำให้เกิดปัญหาของการแพร่กระจายสารละลายอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์ตระกูล ส่งผลให้ยีสต์ที่อยู่ภายในเซลล์ตระกูลได้รับสารละลายอาหารในปริมาณน้อย ทำให้มีการผลิตเอทานอลในปริมาณที่น้อยลง

อาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ในระหว่างกระบวนการหมัก ทำให้จุลินทรีย์เหล่านี้เข้ามาเยี่ยงอาหารที่ให้กับยีสต์ ทำให้ยีสต์ที่เราต้องการศึกษาได้รับอาหารที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญหรือแบ่งเซลล์

เนื่องจากยีสต์ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต ทำให้ป้องกันเซลล์จากการรบกวนของสิ่งแวดล้อมภายนอก (ความเข้มข้นของสับสเตรตและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เช่น เอทานอล และสารตัวอื่นๆ) ในระหว่างการหมักได้ จึงทำให้สามารถนำเซลล์ตระกูลที่ใช้ในการหมักรังชั่งแล้วมาใช้หมักในครั้งต่อไปได้อีกหลายๆ ครั้ง นอกจากนี้ข้อดีของการตระกูลเซลล์ยังลดขั้นตอนในขั้นแยกเซลล์ (downstream processing) ออกไปจากน้ำหมักหลังจากหมักเสร็จ เนื่องจากเซลล์ถูกเก็บไว้ในพาหะที่ตระกูล ดังนั้นเซลล์จะไม่ปนกับน้ำหมัก อีกทั้งสามารถช่วยรักษา activity ของเอนไซม์ไว้ในพาหะที่ตระกูลไว้ด้วย

ผลจากการวิเคราะห์เพื่อทดสอบความเที่ยง โดยนำสารมาตรฐานเอทานอลที่มีความเข้มข้น 3% v/v มาวิเคราะห์ทั้งหมด 10 ชั้ม พบร่วมได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.1095 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ  $3.0940 \times 10^{-4}$  และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.2827% และเมื่อทดสอบความถูกต้องพบว่า %Recovery เท่ากับ 103.75% แสดงให้เห็นว่าผลจากการวิจัยนี้มีความถูกต้องแม่นยำและมีความน่าเชื่อถือ

### 5.3 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาพของ การหมักเอทานอลโดยใช้เซลล์ตระกูล จึงใช้อาหารที่ยีสต์ต้องใช้การเจริญนั่นคือ กลูโคส ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาสารละลายอาหารตัวอื่นที่สามารถนำมาใช้ในการหมักเอทานอลได้ เช่น มันสำปะหลัง อ้อยเป็นต้น ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต นอกจากนี้ควรศึกษาด้วยเปลี่ยนเพิ่ม เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาล ชนิดของยีสต์ และพาหะที่ใช้ตระกูล เป็นต้น

จากที่กล่าวมาข้างต้นว่ามีการตระกูลเซลล์ยีสต์แล้วเซลล์ยีสต์จะถูกล้อมรอบในเม็ดของโซเดียมอัลจิเนต แต่มีอิเล็กตรอนประิมาณเอทานอลแล้วปริมาณที่ได้จะต่ำมาก เพราะเอทานอลจะถูกเก็บไว้ในเม็ดของโซเดียมอัลจิเนต ถึงแม้ว่าโซเดียมอัลจิเนตจะมีรูพรุนที่สามารถให้สารละลายอาหารเข้าไปในเม็ดเพื่อให้ยีสต์นำไปใช้ในการเจริญ หรือสามารถให้เอทานอลที่ผลิตได้แพร่ออกมานั่นเอง

จะเพิ่มการไอลเวียนของสารละลายน้ำอาหารโดยใช้ น้ำมันต่อเข้ากับถังหมักเพื่อให้เกิดแรงดันให้อาหารแพร่เข้าไปในเม็ดเจลของโซเดียมอัลจิเนตมากขึ้น เมื่อเกิดการไอลเวียนของสารละลายน้ำอาหารจะมีแรงดันให้อุทាដอลแพร์ออกมายากเมื่อโซเดียมอัลจิเนตสู่สารละลายน้ำของกลูโคสที่ใช้หมักได้ เช่นเดียวกัน ปริมาณของอุทាដอลที่ได้จะมากขึ้นตามลำดับ

จากการตรึงเซลล์สต์ด้วยโซเดียมอัลจิเนตเพื่อนำมาผลิตอุทាដอล พบว่า ปริมาณอุทាដอลที่ได้น้ำอย่างมาก ซึ่งอยู่ในช่วง 0.23-4.09 % v/v ทั้งนี้ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการตรึงเซลล์แล้วสามารถผลิตอุทាដอลได้ถึง 16.7 % v/v ((Najafpour Ghasem and et al., 2004: 251-260) ดังนั้นจึงควร มีการพัฒนาปรับปรุงวิธีการตรึงเซลล์สต์ต่อไป ซึ่งจากการทดลองพบวิธีที่ควรนำไปปรับปรุงดังนี้

ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่นำมาหมักอาจมีการกลายพันธุ์ ทำให้มีการผลิตอุทាដอลได้น้อยลง เพราะก่อนนำมาทดลอง ไม่ได้นำสายพันธุ์บริสุทธิ์มา แต่เกิดจากการต่อเชื้อมารุ่นต่อรุ่น

การตรึงเซลล์สต์ไว้ในโซเดียมอัลจิเนตนี้ เมื่อยีสต์มีการผลิตอุทាដอลแล้วจะถูกเก็บไว้ในเม็ดของโซเดียมอัลจิเนตแล้วปริมาณอุทាដอลอาจแพร์ออกมายากเมื่อคงของโซเดียมอัลจิเนตสู่สารละลายน้ำอาหารที่ใช้หมักได้ไม่เต็มที่ เมื่อนำอาหารที่ใช้หมักมาวิเคราะห์จึงพบปริมาณอุทាដอลที่น้อยกว่า

วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณอุทាដอลโดยใช้หลักการให้ความร้อนให้อุทាដอลระเหยกลาญเป็นไอ (hesd space) ก่อนนำมาวิเคราะห์นั้น ไอระเหยของอุทាដอลอาจระเหยออกไปในระหว่างการวิเคราะห์ นอกจากนี้ในการทดลองให้ความร้อนของอุทាដอลเป็นระยะเวลา 6 นาที ซึ่งอาจเป็นเวลาที่ไอของอุทាដอลยังไม่สมดุล ความมีการทดลองหากภาวะของระยะเวลาที่ให้อุทាដอลระเหยกลาญเป็นไอ ก่อนนำไปวิเคราะห์เข้ากอกลัมน์ของเครื่องแก๊สโคมนาฬิกาฟี

บรรณานุกรม

- กล้องจุลทรรศน์.(2548). [Online]. Available : <http://61.19.145.7/student/science401/bio/bio2-2/micro.htm>. [2 มีนาคม 2549].
- แก๊สโซเชียล. (2548). [Online]. Available:<http://www.phithan-toyota.com/news/ntopic84.htm>. [2 มีนาคม 2549].
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. (2547). จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพมหานคร: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชัน.
- เปรมนภา สีโสภาพ. (2547). การศึกษาการผลิตเอทานอลจากอ้อยโดยใช้เชื้อราโนยีสต์. ปัญหาพิเศษ-วิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พิมพ์โลก.
- พิมาย มั่นเจริญ. (2547). การศึกษาการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อราโนยีสต์. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พิมพ์โลก.
- ไฟโรจน์ กิจจะพานิช. (2539). การหมัก. เรียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พรรรณตา ลีวิสิต. (2547). การย่อยเปลือกกล้วยด้วยเอนไซม์เพื่อนำไปผลิตเอทานอล. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พิมพ์โลก.
- แม่น ออมรลิที และ ออมร เพชรสม. (2535). หลักการวิเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ทางเคมี. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เบียร์ Saccharomyces. (2548). [Online]. Available:[http://www.geocities.com/d15\\_vi/chapter2vi.html#y\\_01](http://www.geocities.com/d15_vi/chapter2vi.html#y_01). [2 มีนาคม 2549].
- กาวิณี คงาสวัสดิ์. (2537). การครึ่งเอนไซม์และเซลล์. เรียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Abdel-Naby, A. Mohamed, Reyad, M. Reyad and Abdel-Fattah, F. Ahmed. (2000). Biosynthesis of Cyclodextrin glucosyltransferase by immobilized *Bacillus amyloliquefaciens* in batch and Continuous cultures. **Biochemical Engineering Journal**. 220, (5) : 1-9.
- Iersel, van M.F.M. , Brouwer-Post, E., Rombouts, F.M. and Abee, T. (2000). Influence of yeast Immobilization on fermentation and aldehyde reduction during the production of alcohol-free beer. **Enzyme and Microbial Technology**. 37 , (26) : 602-607.
- Kourkoutas, Y., Komaitis, M., Koutinas, A.A., Kaliaras, A., Kanellaki, M., Marchant, R. and Banat, I.M. (2003). Wine production using yeast immobilized on quince biocatalyst at Temperatures between 30 and 0 °C. **Food Chemistry**. 46, (82) : 353-360.
- Najafpour, Ghasem., Younesi, Habibollah. and Ku Ismail, Ku Syahidah. (2004). Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**. 8, (92) : 251-260.
- Saccharomyces-cerevisiae. (2548). [Online]. Available:<http://www.pmf.unsa.ba/biologija/talofiti/Saccharomyces-cerevisiae.jpg>. [2 มีนาคม 2549].

Yeast Growth Curves . (2549). [Online] Available:[http://www.maquah.net/media/IR/Yeast\\_GROWTH\\_CURVE.html](http://www.maquah.net/media/IR/Yeast_GROWTH_CURVE.html). [2 มีนาคม 2549].

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และจุลินทรีย์

#### ก.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง	รุ่น	ยี่ห้อ
1) Gas Chromatograph (GC)	GC 14-B	Shimadzu : Japan
2) Scanning Electron Microscope (SEM)		
3) UV-Vis Spectrophotometer	UV-1601	Shimadzu : Japan
4) Autoclave	SS-325	Tomy : Japan
5) Centrifuge		Universal 32 Hettich Zentrifugen : Germany
6) Balance Analytical	PG-S	Mattler Toledo : Switzerland
7) Heating Water Bath	WB22	Memmert : Germany

#### ก.2 สารเคมีและจุลินทรีย์

- 1) Ethanol ( $C_2H_5OH$  : Absolute)
- 2) Sodium Alginate
- 3) Potassium Dihydrogen Phosphate ( $KH_2PO_4$ )
- 4) D (+) Glucose ( $C_6H_{12}O_6$ )
- 5) Sodium Phosphate ( $Na_3PO_4 \cdot 12 H_2O$ )
- 6) Yeast Extract
- 7) Calcium Chloride Dihydrate ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )
- 8) Sodium Chloride (NaCl)
- 9) Isopropanol [ $(CH_3)_2CHOH$ ]
- 10) Potassium Metabile Sulfide (KMS)
- 11) ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จากภาควิชาชีวเคมี สาขาวิชาชีวเคมีประยุกต์  
มหาวิทยาลัยราชภัฏพิษณุโลก

**ภาคผนวก ข**  
**การเตรียมสารและเชื้อยีสต์**

**บ. 1 การเตรียมอาหารวุ้นเยื่อง**

(1) ชั้งสารดังอัตราส่วน ต่อไปนี้

Yeast Extract	0.3 g
Malt Extract	0.3 g
Peptone	0.5 g
Glucose	1.0 g
Agar	1.5 g
Distill Water	100 ml

(2) คลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วเทลงในหลอดทดลองในปริมาตร 1 ส่วน 4 ของหลอด ปิดชูกดด้วยสำลี แล้วใช้พลาสติกคลุมปากหลอดอีกชั้นหนึ่ง

(3) นำหลอดอาหารที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำหลอดมาเยียบเพื่อเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของสารคลายอาหาร รอนอาหารวุ้นเย็น และแข็งตัว

(4) นำหลอดอาหารวุ้นที่ได้มานำมือที่อุณหภูมิ 45°C เพื่อกำจัดไอน้ำที่อยู่ภายในหลอดจนแห้งสนิท ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

**ข. 2 การเตรียมอาหารเหลว**

(1) ชั้งสารดังอัตราส่วน ต่อไปนี้

Glucose	12 g
Yeast Extract	0.1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3 g
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.45 g
Distill Water	100 ml

(2) คลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน เทสารคลายอาหารที่ได้ลงในขวดรูปทรงพู่ ปิดชูกหัวด้วยสำลี แล้วใช้พลาสติกคลุมปากหัวด้วยชั้นหนึ่ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอัดไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

\* หมายเหตุ หากต้องการสารคลายอาหารปริมาตรเท่าๆ กัน ควรตวงและใส่ภาชนะน้ำแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทั้งนี้เพื่อเป็นการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อต่างๆ จากการถ่ายโอนภาชนะ

### ข. 3 การเตรียมเชื้อยีสต์

- (1) เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ โดยใช้ loop เจี่ยยีสต์จากหลอด stock บีสต์มา 1 loop และวนนำมา streak ลงในหลอดอาหารวุ่นที่เตรียมได้จากข้อ 1 โดยเจี่ยยีสต์ให้กระจายทั่วหลอดอาหารวุ่น
- (2) นำหลอดยีสต์ที่ได้ไปปั่นในตู้น้ำมันที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อยีสต์ขึ้นจากนั้น นำมาเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น
- (3) เมื่อต้องใช้ยีสต์จาก stock บีสต์ ควรทำการเพาะกล้ายีสต์ เช่นนี้เพิ่มครั้งละ 1-2 หลอด ทุกครั้ง เพื่อจะได้มียีสต์หลอดใหม่ไว้ใช้ในครั้งต่อไป

#### \* หมายเหตุ

- (1) ทุกครั้งที่จะทำการเพาะกล้ายีสต์ ควรใช้สำลีชูบ 70% แอลกอฮอล์ เช็ดให้ทั่วบริเวณ โต๊ะที่จะปฏิบัติการ และใช้ไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ลัน loop ให้แดงเพื่อเป็นการฆ่าเชื้อ จากนั้นรอให้ loop เย็นแล้วจึงนำไปเจี่ยยีสต์
- (2) ต้องใช้ตะเกียงรอนปากหลอดยีสต์ทุกครั้งที่เปิดและปิดปากหลอด หรือรอนปากภาชนะทุกครั้งที่มีการถ่ายโอนเชื้อยีสต์จากภาชนะหนึ่งไปสู่อีกภาชนะหนึ่ง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อต่างๆ ลงไปในหลอดหรือภาชนะ (aseptic technique)
- (3) สำหรับผู้ปฏิบัติการก็ควรใช้ 70% แอลกอฮอล์ เช็ดทำความสะอาดมือทุกครั้งที่จะปฏิบัติการ เพราะเชื้อต่างๆ ที่อยู่ในมืออาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนได้เช่นกัน
- (4) ภาชนะทุกชิ้นหรือสารละลายทุกชนิดที่ต้องสัมผัสกับยีสต์ จะต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที ก่อนทุกครั้ง

### ข. 4 การเตรียมสารละลายน้ำตรฐานและ Internal standard

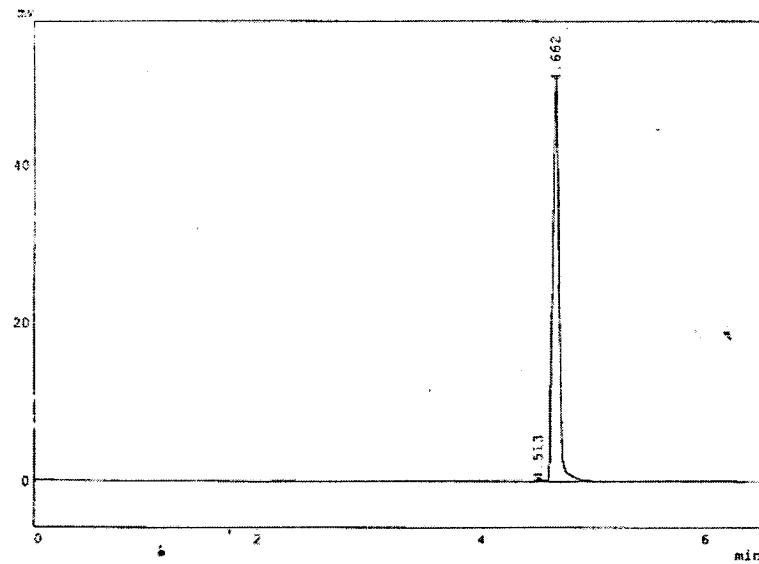
- (1) เตรียมสารละลายน้ำตรฐานเข้มข้น 0.1, 1, 3, 5 และ 7 %v/v ตามลำดับ โดยปีเปตอทานอล 10, 100, 300, 500 และ 700  $\mu\text{l}$  ตามลำดับ ใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 ใบ ตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจะได้สารละลายน้ำตรฐานอทานอลที่มีความเข้มข้น 0.1, 1, 3, 5 และ 7 % v/v ตามลำดับ
- (2) เตรียมสารละลายน้ำอิโซโปรพานอล (isopropanol) ซึ่งใช้เป็น internal standard ที่ความเข้มข้น 10 % v/v โดยปีเปตอิโซโปรพานอล 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

## บ. 5 การเตรียมสารมาตรฐานและสารตัวอย่างสำหรับทำการวิเคราะห์

(1) การเตรียมสารละลายน้ำมาตรฐาน ปีเป็ตสารละลายน้ำมาตรฐาน ethanol และสารละลายน้ำโซดา (เตรียมได้จากหัวข้อที่ 4) มาอย่างละ  $200 \mu\text{l}$  ใส่ลงในขวดน้ำดีสารละลายน้ำดี  $5 \text{ มิลลิลิตร}$  ที่มี  $\text{NaCl} 0.3 \text{ g}$  จากนั้นปิดฝาขวดให้แน่น และเตรียมสารละลายน้ำมาตรฐาน ethanol ที่ความเข้มข้นต่อๆ ไปให้ครบถ้วนความเข้มข้น (มี 5 ความเข้มข้น)

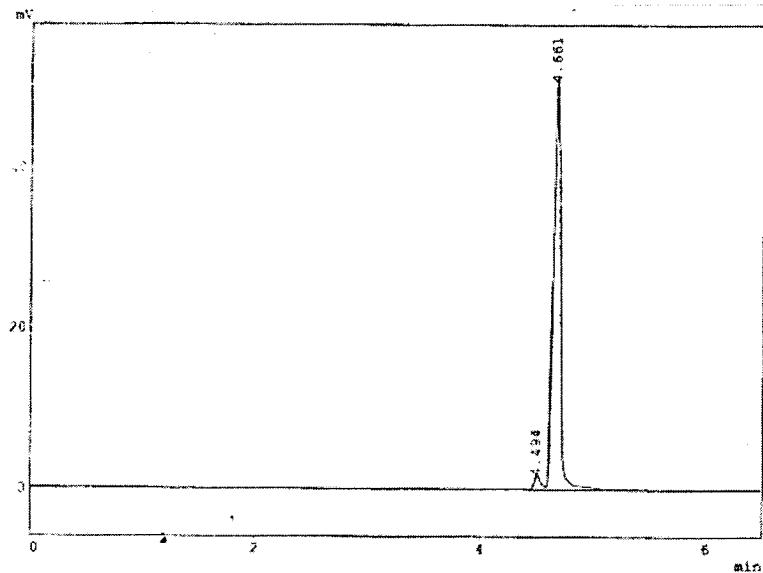
(2) การเตรียมสารตัวอย่าง ปีเป็ตสารตัวอย่างและสารละลายน้ำโซดา (เตรียมได้จากหัวข้อ 2 ในหัวข้อที่ 4) มาอย่างละ  $200 \mu\text{l}$  ใส่ลงในขวดน้ำดีสารตัวอย่าง  $5 \text{ มิลลิลิตร}$  ที่มี  $\text{NaCl} 0.3 \text{ g}$  จากนั้นปิดฝาขวดให้แน่น

ภาคผนวก ค  
โคมามาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์



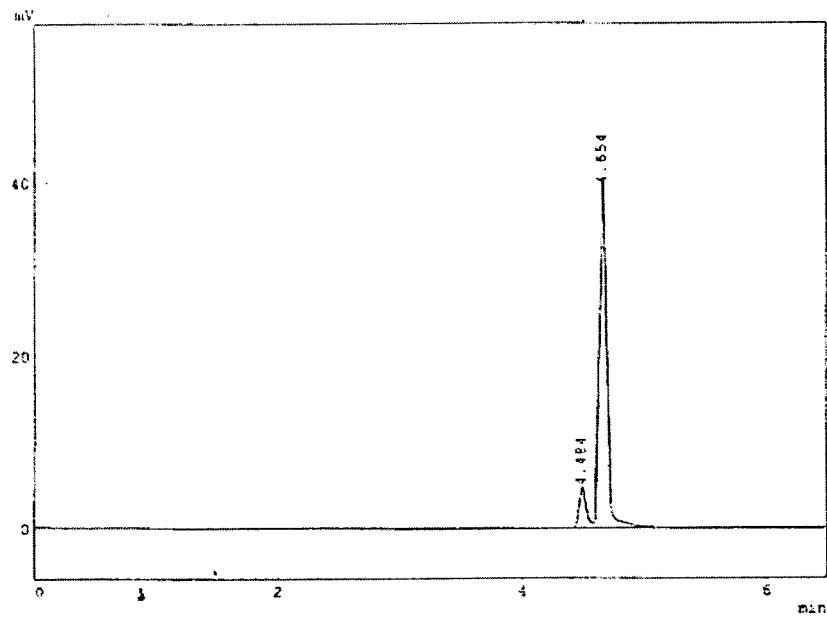
```
*** Peak Report ***
PKNO TIME AREA HEIGHT MK IDNO CONC NAME
1 4.513 544 137 SV
2 4.662 189614 50738 SV
----- 190158 50875
```

ภาพที่ ค.1 โคมามาโทแกรมของสารมาตรฐานเอทานอล 0.1% v/v



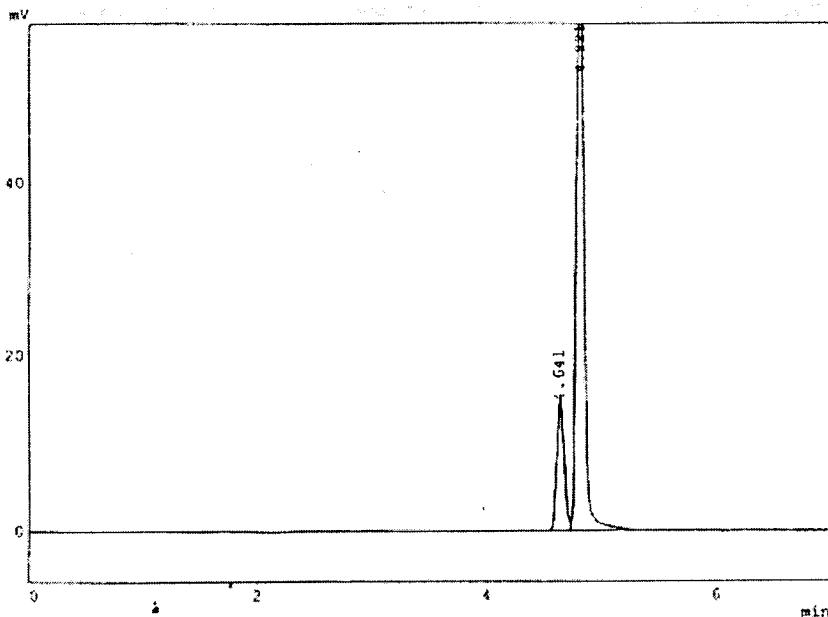
```
*** Peak Report ***
PKNO TIME AREA HEIGHT MK IDNO CONC NAME
1 4.494 6455 1686 SV
2 4.661 192147 51045 SV
----- 198602 52731
```

ภาพที่ ค.2 โคมามาโทแกรมของสารมาตรฐานเอทานอล 1% v/v



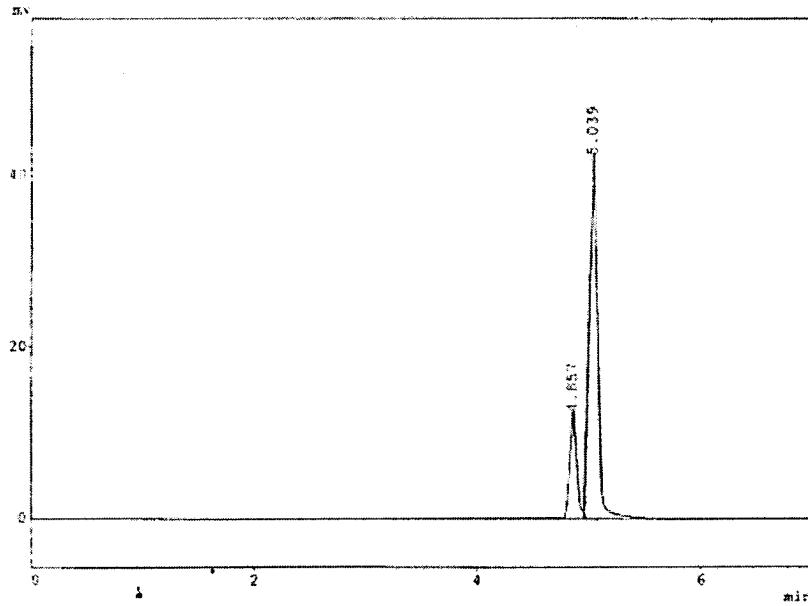
*** Peak Report ***							
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.484	17716	4738	V			
2	4.654	149779	39811	SV			
<hr/>							
	167495	44549					

ภาพที่ ค. 3 โครมაโทแกรมของสารมาตรฐานเอทานอล 3% v/v



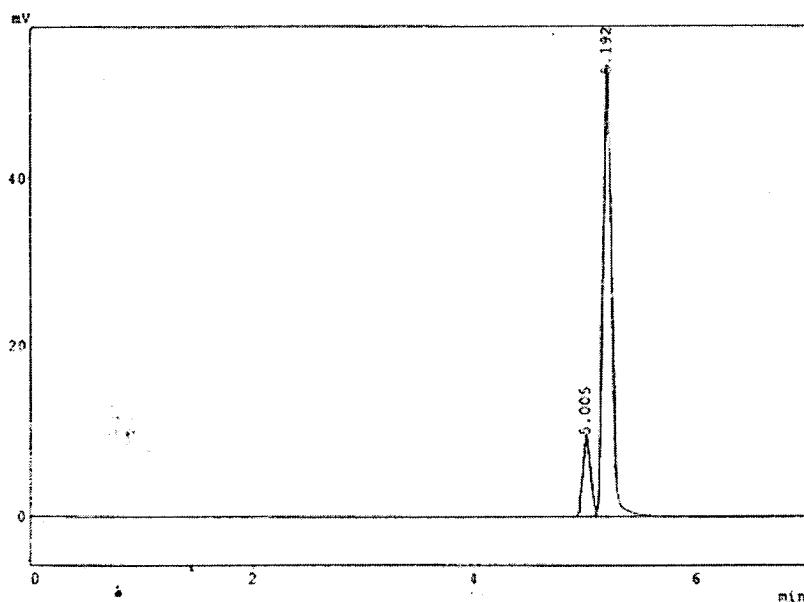
*** Peak Report ***							
NO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.641	63325	14927	V	7	0.0120	ethanol
2	4.821	313777	73294	SV	R	1	isopropanol
<hr/>							
	377102	88221					0.0120

ภาพที่ ค. 4 โครมაโทแกรมของสารมาตรฐานเอทานอล 5% v/v



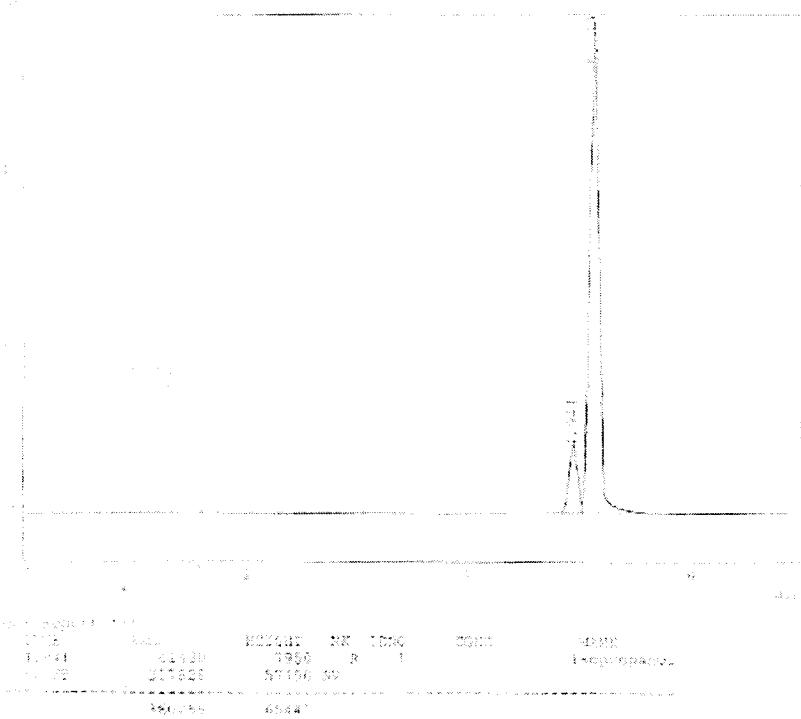
\*\*\* Peak Report \*\*\*  
 PKNO TIME AREA HEIGHT MK IDNO CONC NAME  
 1 4.857 53613 12257 R 1  
 2 5.039 188699 42367 SV isopropanol  
 -----  
 242312 54624

ภาพที่ ค. 5 โคมาร์โทแกรมของสารมาตรฐานเอทานอล 7% v/v

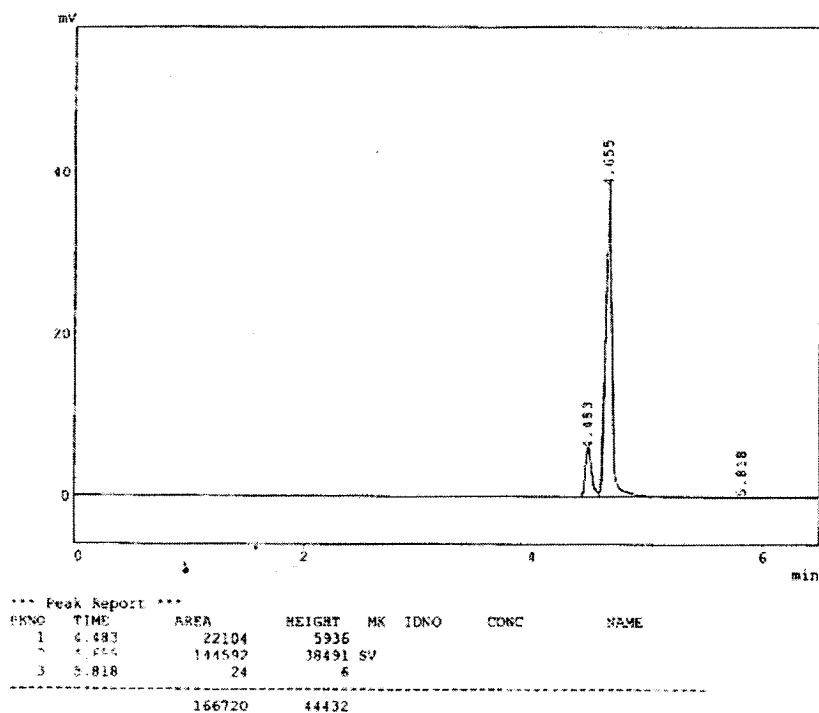


\*\*\* Peak Report \*\*\*  
 PKNO TIME AREA HEIGHT MK IDNO CONC NAME  
 1 5.005 47215 9483  
 2 5.192 269153 53465 SV  
 -----  
 316368 62948

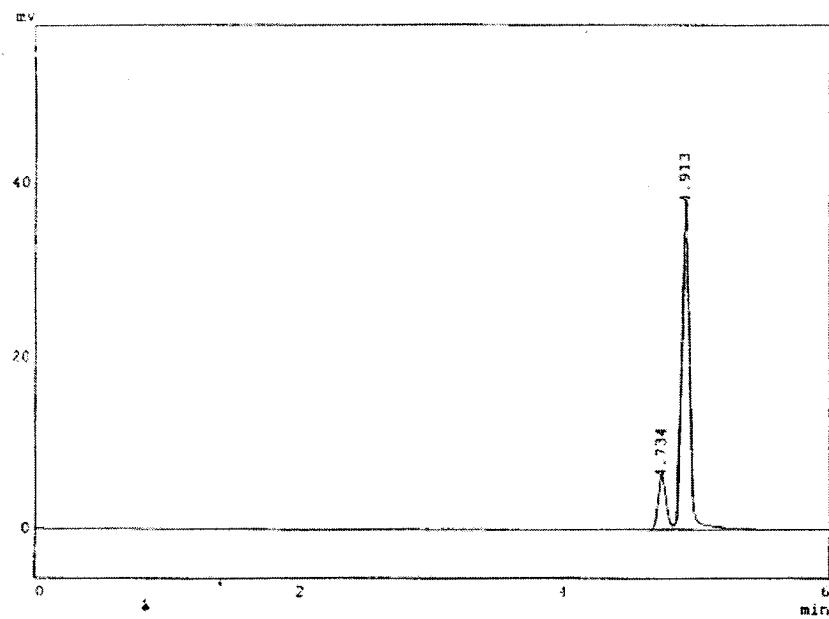
ภาพที่ ค. 6 โคมาร์โทแกรมของเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบคงที่โดยใช้เซลล์อิสระ (เวลาหมัก 18 วัน)



ภาพที่ ค. 7 โครมაโทแกรมของยาานอลที่ได้จากการหมักแบบคงที่ในรอนที่ 1 โดยใช้เซลล์ตวง  
(เวลาหมัก 20 วัน)

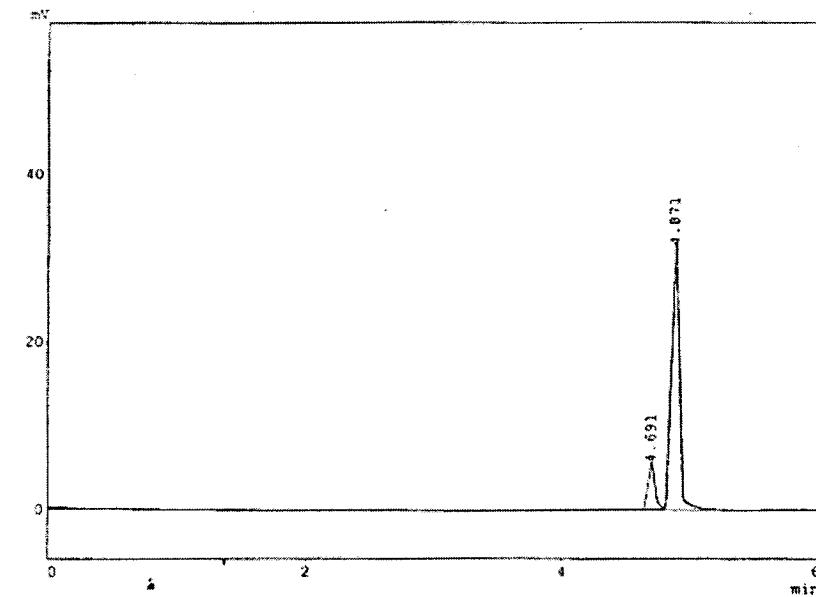


ภาพที่ ค. 8 โครมาโทแกรมของยาานอลที่ได้จากการหมักแบบคงที่ในรอนที่ 2 โดยใช้เซลล์ตวง  
(เวลาหมัก 26 วัน)



*** Peak Report ***							
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.734	24980	6136	V	2	0.0116	ethanol
2	4.913	151660	37760	SV	R		isopropanol
						0.0116	
			176640			43904	

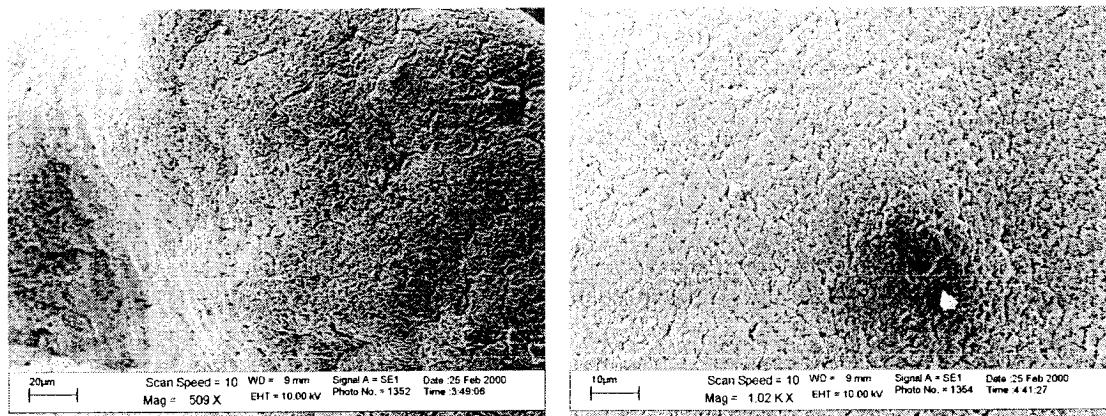
ภาพที่ ค. 9 โครมაโทแกรมของเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องในรอบที่ 1 โดยใช้เชลล์ติง  
(เวลาหมัก 34 วัน)



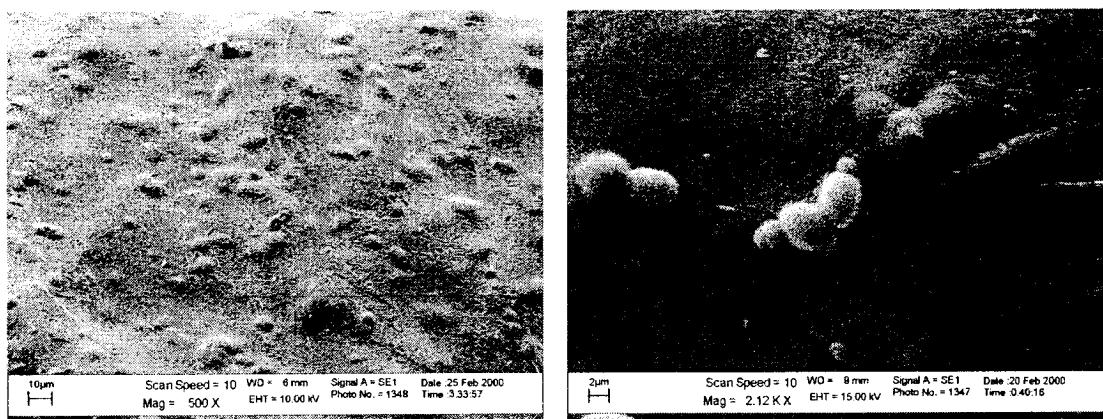
*** Peak Report ***							
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.691	22868	5667	S	1		isopropanol
2	4.871	124685	31703	SV			
						147753	37371

ภาพที่ ค. 10 โครมาโทแกรมของเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องในรอบที่ 2 โดยใช้เชลล์ติง  
(เวลาหมัก 24 วัน)

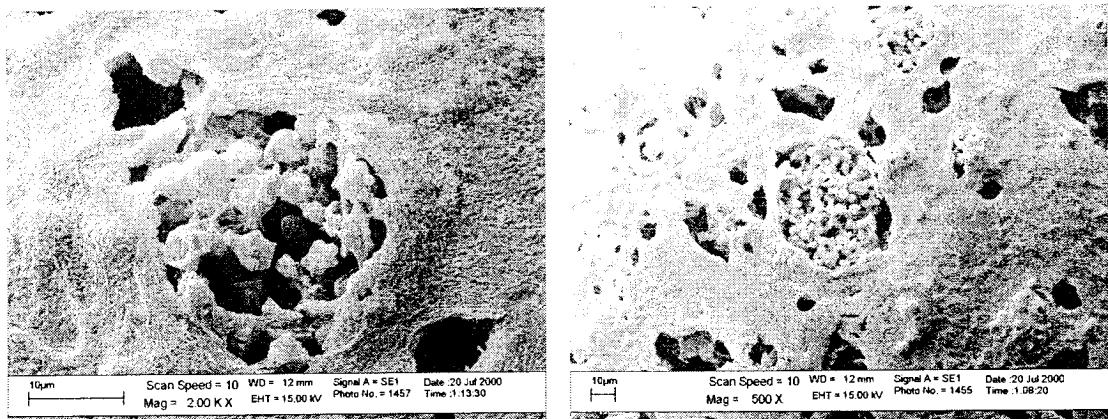
**ภาคผนวก ง**  
**ภาพถ่ายเซลล์ตับที่ได้จากการ SEM**



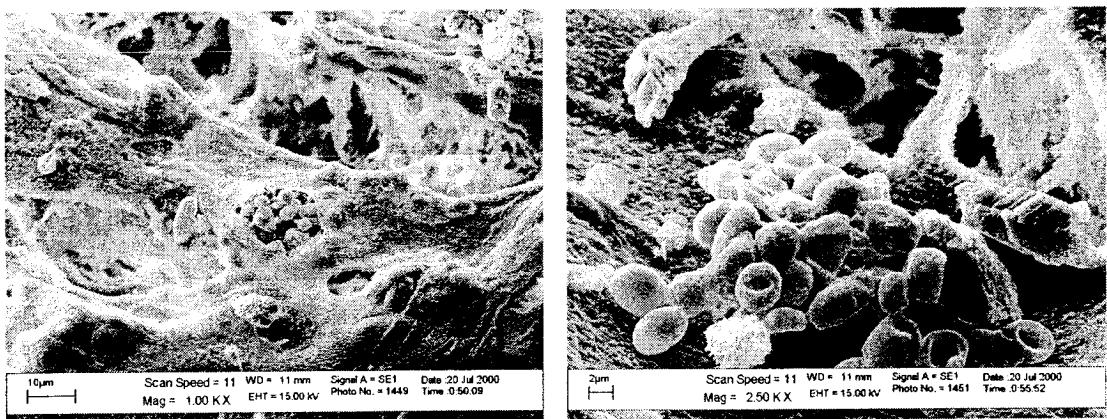
ภาพที่ ง. 1 ผิวหน้าด้านนอกของเม็ดเจลที่ยังไม่ได้ตรึงเซลล์



ภาพที่ ง. 2 ผิวหน้าด้านนอกของเซลล์ตับที่ยังไม่ได้หมัก

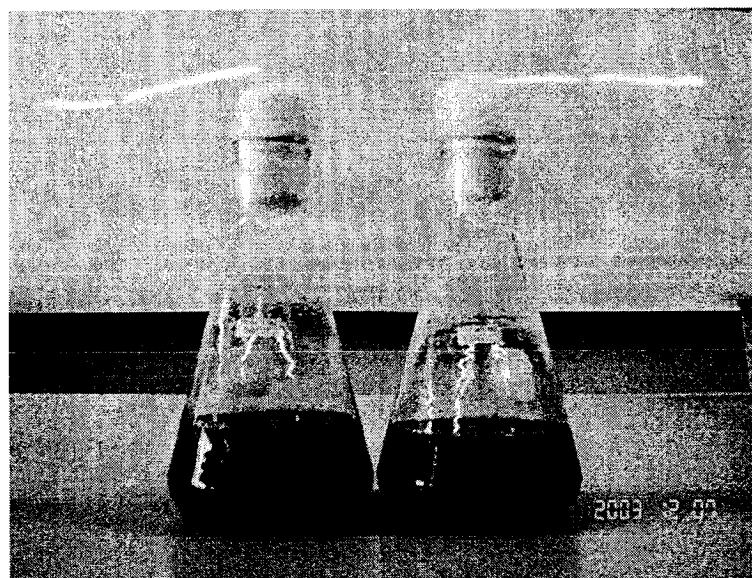


ภาพที่ ๓ ผิวน้ำด้านนอกของเซลล์ตัวเรืองหลังการหมักแบบคงที่

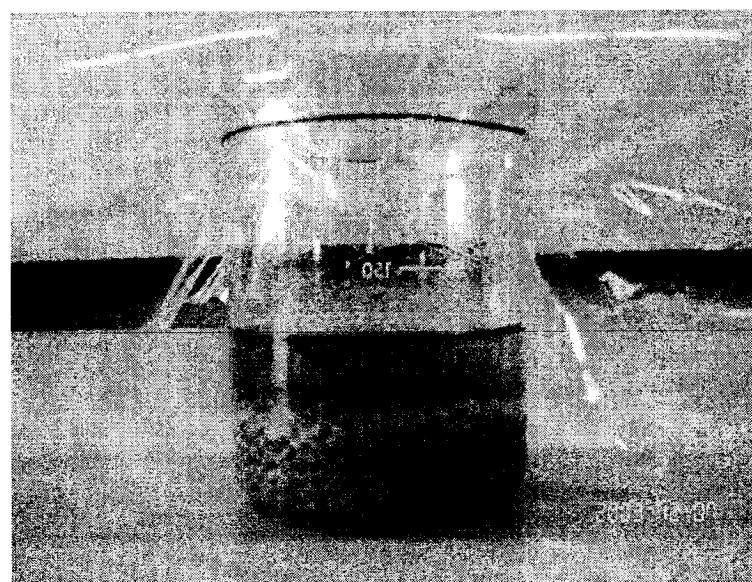


ภาพที่ ๔ ผิวน้ำด้านนอกของเซลล์ตัวเรืองหลังการหมักแบบต่อเนื่อง

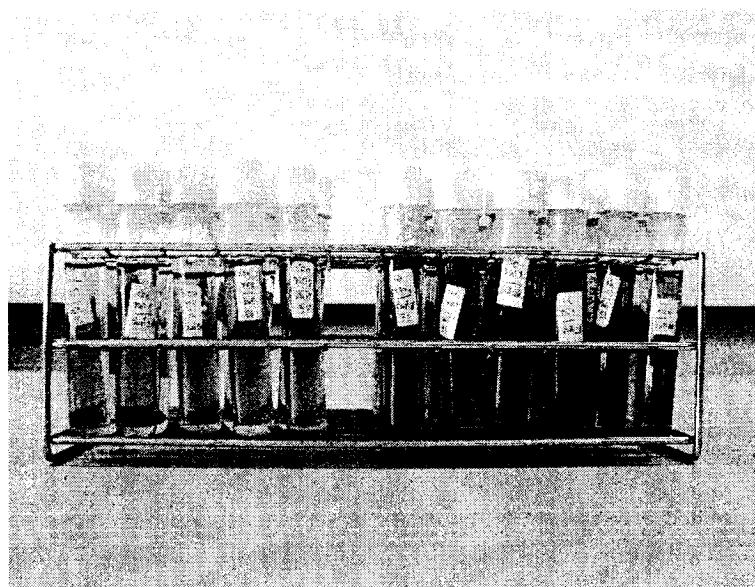
ภาคผนวก จ  
ภาพที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย



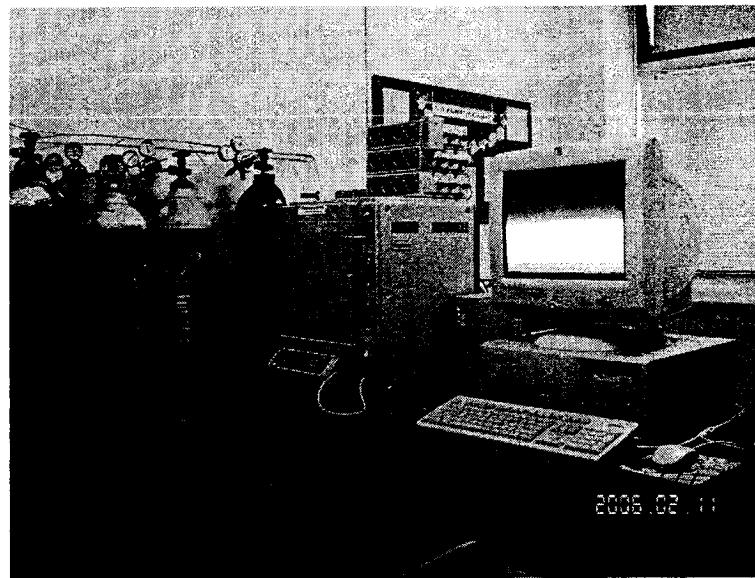
ภาพที่ จ.1 การหมักເອຫານອลໂດຍໃຫ້ເຊລລ໌ຕົງ



ภาพที่ จ.2 ຕັວອບ່າງເຊລລ໌ຕົງ



ภาพที่ จ. 3 สารตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล



ภาพที่ จ.4 เครื่องแก๊สโคลโนม่าโทกราฟ (Gas Chromatography)

## ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ- นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว ปันดา จันทร์เนย

2. ชื่อ- นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Panatda Janneoy

3. เลขหมายบัตรประชาชน 36407 00381 146

4. ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิษณุลสสกรรม

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิษณุลสสกรรม ส่วนทะเบียน กอง (055)216389 โทรสาร. (055) 267054 หรือ 089-5684671

E-mail : kek\_biotech@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปี 2545: สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปี 2547: สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโทวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขatech (โภชีวภาพ) คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ : Biotechnology, Food Chemistry, Biochemistry

6. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Lactic acid fermentation by *Pediococcus* sp. and *Lactobacillus* sp.
- Retention volatile compounds in Nham flavor.
- Volatile compounds in *fermented sausage (NHAM)* made from pork and other materials.
- Comparison of volatile compound in fermented sausage (NHAM).

7. งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ

- Cloning and characterization of gene that involving of bitter flavor in plant.