การผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*

นายภูมิมาศ สนั่นเสียง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF ETHANOL AND SINGLE CELL PROTEIN FROM SORGHUM GRAIN USING A MIXED CULTURE OF *Saccharomycopsis fibuligera* AND *Saccharomyces cerevisiae*

Mr. Pumimas Sanunsieng

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*
โดย	นายภูมิมาศ สนั่นเสียง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ศิริลักษณ์ ธีระดากร

คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ศิริลักษณ์ ธีระดากร)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สาวิตร ตระกูลน่าเลื่อมใส)

ภูมิมาศ สนั่นเสียง : การผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*. (ETHANOL PRODUCTION AND SINGLE CELL PROTEIN FROM SORGHUM GRAIN USING A MIXED CULTURE OF *Saccharomycopsis fibuligera* AND *Saccharomyces cerevisiae*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร. ศิริลักษณ์ ธีระดากร, 121 หน้า

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการนำเมล็ดข้าวฟ่างมาใช้ในการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยว ข้าวฟ่างเป็นพืชทางเลือกใหม่ เนื่องจากสามารถให้ผลผลิตได้ต่อเนื่องตลอดทั้งปี อายุการเก็บเกี่ยวสั้น ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวฟ่าง พบว่ามีคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 80.7 โปรตีนร้อยละ 7.23 ไขมันร้อยละ 3.36 เถ้าร้อยละ 1.27 เส้นใยร้อยละ 1.69 และความชื้นร้อยละ 5.75 ต่อน้ำหนักแห้ง คาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเมล็ดข้าวฟ่าง ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวได้ เมื่อศึกษาการปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างทางกายภาพ พบว่า ภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ การบดผ่านตะแกรงร่อนขนาด 400 ไมครอน และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที สามารถให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 2.04 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้วไปหมักเพื่อผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ การใช้อัตราส่วนของกล้าเชื้อที่ 1 : 1 โดยใช้เมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพ 10 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.3 เปอร์เซ็นต์ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 10.45 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมักที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง และปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการหมักแล้ว 38.39 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง การผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อ *S. fibuligera* หมักร่วมกับเชื้อโดยตรงของ *S. cerevisiae* โดยใช้เมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพและ นำมาย่อยด้วยเอนไซม์อะมิโลไลติคที่ผลิตจากเชื้อ *S. fibuligera* ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาหมักด้วย *S. cerevisiae* โดยเติมยูเรีย 0.3 เปอร์เซ็นต์ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 0. 01 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงสุด คือ 1.12 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง และปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการหมักแล้ว 19.55 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต……

ปีการศึกษา.....2553..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก……

5172408823: MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS: ETHANOL/SINGLE CELL PROTEIN/MIXED CULTURE/FERMENTATION

PUMIMAS SANUNSIENG : PRODUCTION OF ETHANOL AND SINGLE CELL PROTEIN FROM SORGHUM GRAIN USING A MIXED CULTURE OF *Saccharomycopsis fibuligera* AND *Saccharomyces cerevisiae*. ADVISOR : SIRILUK TEERADAKORN,Ph.D, 121 pp.

This research involved a study on production of ethanol and single cell protein. Sorghum was considered as an alternative crop because of its availability throughout the year, a short-term harvest and resistance to an inappropriate environment. From chemical composition analysis, sorghum grain contains 80.7 % carbohydrate, 7.23 % protein, 3.36 % fat, 1.27 % ash, 1.69 % fiber and 5.75 % moisture of dry weight. Carbohydrate, the main composition of sorghum grain, is used as a carbon-source for ethanol and single cell protein production. The study of physical pretreatment of sorghum grain showed that the optimal conditions were milling and sieving to 400 μm-size and subsequently autoclaving at 121 ^{o}C for 20 minutes. Total sugar of 2.04 g/l was obtained under this condition. Pretreated sorghum grain was used for ethanol and single cell protein production using a mixed culture of *Saccharomycopsis fibuligera* and *Saccharomyces cerevisiae*. The optimal condition was inoculums ratio 1 : 1, 10 % pretreatment sorghum grain, 0.3 % urea, 0.1% potassium dihydrogen phosphate, 0.1 % magnesium sulfate, 0.01 % sodium chloride, and 0.01 % calcium chloride (w/v). The fermentation conditions were conducted at 30 ^{o}C, 150 rpm. Ethanol 10.45 g/l and protein content in sorghum grain residues 38.39 % were obtained at 36 hr and 120 hr of fermentation, respectively. Productions of ethanol and single cell protein using an amylolytic enzyme from *S. fibuligera* and the cell culture of *S. cerevisiae* were also investigated. The pretreated sorghum grain was saccharified by the amylolytic enzyme of *S. fibuligera* at 90 ^{o}C for 30 minutes, subsequently, fermented with *S. cerevisiae* by adding 0.3 % urea, 0.1% potassium dihydrogen phosphate, 0.1 % magnesium sulfate, 0.01 % sodium chloride, and 0.01 % calcium chloride (w/v). The fermentation conditions were at 30 ^{o}C, 150 rpm. Ethanol at 1.12 g/l and protein content in grain sorghum residues at 19.55 % were obtained after 24 hr and 120 hr of fermentation, respectively.

Field of Study : ..... Biotechnology..... Student's Signature : .....

Academic Year :.....2010..... Advisor's Signature : .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาในหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต ซึ่งสำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจาก อาจารย์ ดร. ศิริลักษณ์ ธีระดากรที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งได้ให้แนวความคิด คำแนะนำและ ข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย รวมทั้งตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์จึงขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. อมร เพชรสม ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์ อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส และผศ. ดร. สาวิตร ตระกูลน่าเลื่อมใส ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณผู้บริหารสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ นักวิจัย เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ พี่ๆ เพื่อนๆและน้องๆทุกคนในห้องปฏิบัติการ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ สารเคมี ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆในการวิจัย

ขอขอบพระคุณผู้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้ ได้แก่ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (EN1191B)

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณตา คุณยาย คุณพ่อและคุณแม่ที่ให้กำลังใจ ที่สนับสนุนด้านการเงินในด้านการศึกษาตลอดมา และขอบคุณที่ให้กำลังใจตลอดในช่วงเวลาการศึกษา

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญรูป..... ฎ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ณ

บทที่

1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

1.3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 เอทานอล (Ethanol)..... 4

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล..... 4

2.3 ข้าวฟ่าง..... 5

2.3.1 ความสำคัญของข้าวฟ่าง..... 5

2.3.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์..... 6

2.3.3 องค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่าง..... 8

2.3.4 แป้งในเมล็ดข้าวฟ่าง..... 10

2.3.5 กระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์..... 13

2.4 กระบวนการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์..... 19

2.5 โปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single cell protein ; SCP)..... 22

2.5.1 โปรตีนเซลล์เดี่ยว..... 22

2.5.2 ประวัติการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว..... 22

2.5.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว..... 22

หน้า		หน้า
	2.6 ยีสต์ (Yeast)……	23
	2.6.1 ปัจจัยที่จำเป็นต่อการทำงานของยีสต์ในกระบวนการหมักเอทานอล.....	25
	2.6.2 *Saccharomyces cerevisiae*.....	28
	2.6.3 S*accharomycopsis fibuligera*.....	31
	2.7 กระบวนการผลิตเอทานอลโดยการย่อยสลายแป้งร่วมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation process; SSF).....	33
3	วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	37
	3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	37
	3.2 เคมีภัณฑ์.....	38
	3.3 วิธีดำเนินการทดลอง.....	39
	3.4 วิธีวิเคราะห์ต่างๆ.....	43
4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	45
	4.1 องค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่าง……...	45
	4.2 ภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างด้วยวิธีทางกายภาพ……..	46
	4.3 ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้เชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*……...	50
	4.4 ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคโดยโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*…….....	67
	4.5 การผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เอนไซม์อะไมโลไลติคจากเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* หรือเอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*.....	72
5.	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ……..	74
รายการอ้างอิง.....		78
ภาคผนวก.....		86
ภาคผนวก ก……...		87
ภาคผนวก ข…….....		89
ภาคผนวก ค.....		96
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....		120

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	องค์ประกอบเมล็ดข้าวฟ่าง……..	8
2.2	องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวฟ่างทั้งเมล็ดของแต่ละส่วน……..	9
2.3	องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวโพดทั้งเมล็ดของแต่ละส่วน……..	9
2.4	สมบัติที่สำคัญของอะมิโลสและอะมิโลเพกติน…….....	13
2.5	รายชื่อและบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์สำหรับการย่อยครั้งแรก (liqucfaction)…….....	15
2.6	รายชื่อและบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์สำหรับการย่อยครั้งสุดท้าย (saccharification)..…	18
4.1	องค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่างที่ใช้ในการงานวิจัย…….....	45
4.2	ค่าของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างด้วยวิธีทางกายภาพ…….....	47
4.3	ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อ *S. fibuligera* หรือ *S. cerevisiae* และใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae*……..	52
4.4	ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อ ผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* ในแต่ละอัตราส่วนของกล้าเชื้อ 1 : 1, 2: 1 และ1 : 2.....	54
4.5	ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยการลงเชื้อ *S. fibuligera* ที่เวลา 0 ชั่วโมง และศึกษาการลงเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ช่วงระยะเวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง……	57
4.6	ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอล ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยแปรผันความเข้มข้นของเมล็ดข้าวฟ่างที่ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์.....	60
4.7	ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอล ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและยูเรีย……..	63
4.8	ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมงโดยแปรผันความเข้มข้นของยูเรียที่ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)……	66

ตารางที่ หน้า

4.9 ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอล ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้เอนไซม์อะมิโลไลติคจากเชื้อ *S. fibuligera* หรือเอนไซม์ทางการค้า (Termamyl 120) หมักร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae*..... 73

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	สูตรโครงสร้างของเอทานอล.....	4
2.2	ส่วนประกอบต่างๆของข้าวฟ่าง.....	7
2.3	โครงสร้างของอะมิโลส.....	10
2.4	ลักษณะเกลียวของอะมิโลส.....	11
2.5	โครงสร้างของอะมิโลเพกติน (Amylopectin).....	12
2.6	กิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มอะมิเลสในการย่อยแป้ง.....	17
2.7	กระบวนการเมตาบอลิซึ่มการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็น pyruvate และเอทานอล.....	21
2.8	ตัวอย่างยีสต์สกัด.....	24
2.9	ลักษณะเซลล์ของยีสต์ในจีนัส *Saccharomyces* Sp. ที่เลี้ยงในกลูโคส.....	29
2.10	รูปร่างลักษณะของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*.....	32
4.1	เมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการทำความสะอาด.....	46
4.2	เมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการทำความสะอาด อบแห้ง และบดผ่านตะแกรงร่อน 400 ไมครอน.....	46
4.3	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการปรับสภาพทางกายภาพเมล็ดข้าวฟ่างที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร).....	49
4.4	ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เชื้อ *S. fibuligera* หรือ *S. cerevisiae* และใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae*.....	51
4.5	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆโดยใช้เชื้อ *S. fibuligera* หรือ *S. cerevisiae* และใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ*S. cerevisiae*.....	51
4.6	ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* ในแต่ละอัตราส่วนของกล้าเชื้อ 1 : 1, 1 : 2 และ 2 : 1.....	53
4.7	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* ในแต่ละอัตราส่วนของกล้าเชื้อ 1 : 1, 1 : 2 และ 2 : 1.....	54

รูปที่ หน้า

4.8 ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* ที่ช่วงระยะเวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง..... 56

4.9 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* ที่ช่วงระยะเวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง..... 56

4.10 ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* โดยแปรผันความเข้มข้นของเมล็ดข้าวฟ่างที่ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์..... 59

4.11 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* โดยแปรผันความเข้มข้นของเมล็ดข้าวฟ่างที่ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์..... 59

4.12 ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* โดยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือแอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และยูเรีย..... 62

4.13 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* โดยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือแอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และยูเรีย..... 62

4.14 ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* โดยแปรผันความเข้มข้นของยูเรียที่ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)..... 65

4.15 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* โดย แปรผันความเข้มข้นของยูเรียที่ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)..... 66

รูปที่		หน้า
4.16	แสดงผลการเปรียบเทียบสูตรอาหารทั้ง 4 ชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera*.....	67
4.17	แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera*.....	69
4.18	แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคในกระบวนการหมัก ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera*.....	70
4.19	แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค ในกระบวนการหมัก ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera*.....	71
4.20	ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เอนไซม์อะมิโลไลติคจากเชื้อ *S. fibuligera* หรือเอนไซม์ทางการค้า หมักร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae*.....	73
ก.1	กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส.....	90
ก.2	กราฟมาตรฐานเอทานอล.....	94

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	เปอร์เซ็นต์
ml	มิลลิลิตร
L	ลิตร
mg	มิลลิกรัม
g	กรัม
g/L	กรัมต่อลิตร
w/v	น้ำหนักต่อปริมาตร
v/v	ปริมาตรต่อปริมาตร
h	ชั่วโมง
M	โมลาร์
U	หน่วยของเอนไซม์
g/g	กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมสับเสตรต
rpm	รอบต่อนาที

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยต้องนำเข้าพลังงานโดยเฉพาะน้ำมันดิบจากต่างประเทศทุกปีทำให้ต้องสูญเสียเงินตราต่างประเทศจำนวนมาก ขณะเดียวกันประเทศไทยยังได้รับผลกระทบจากความผันผวนของราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น และปัญหาของแหล่งพลังงานสำรองจากธรรมชาติที่กำลังจะหมดไป และพลังงานทดแทนที่ได้รับความสนใจคือ เอทานอล (ethanol) ซึ่งถือว่าเป็นพลังงานทางเลือกที่สามารถใช้ในประเทศให้เกิดประโยชน์ และลดผลกระทบทางสิ่งแวดล้อม เพื่อทดแทนการนำเข้านั้นเป็นทางออกที่ดีในการแก้ปัญหาสภาวะน้ำมันแพงอย่างยิ่ง เนื่องจากประไทยมีพื้นฐานเป็นประเทศเกษตรกรรม ทำให้มีผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิดเป็นจำนวนมากเกินความต้องการของตลาด ส่งผลให้เกิดปัญหาราคาพืชผลตกต่ำ จึงหันมาผลิตเอทานอลจากพืชผลทางการเกษตร ซึ่งมีความเหมาะสมหลายประการ เช่น เป็นการใช้ทรัพยากรอย่างหมุนเวียน การใช้พืชผลทางการเกษตรที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในประเทศให้เกิดประโยชน์ และเป็นการลดผลกระทบทางสิ่งแวดล้อม รัฐบาลจึงได้กำหนดเป้าหมายที่จะรณรงค์การใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิง เอทานอลจึงเป็นพลังงานทางเลือกใหม่ที่จะช่วยสร้างเสถียรภาพทั้งทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อมของประเทศได้ (อนุสรณ์ แสงนิ่มนวล, 2550)

การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจะอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ในการหมัก ซึ่งโดยทั่วไปนั้นวัตถุดิบที่นำมาใช้จะเป็นวัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาล เชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ก็ได้แก่เชื้อยีสต์ ซึ่งสามารถหมักได้ในภาวะไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) ยีสต์ที่นำมาผลิตเอทานอลมีหลายชนิดด้วยกันที่นิยมใช้กันคือยีสต์ในจีนัส *Saccharomyces* ทั้งนี้เนื่องจากเจริญได้รวดเร็ว มีความคงทนต่อแอลกอฮอล์ได้สูง และให้ปริมาณแอลกอฮอล์ในปริมาณสูง (วราวุฒิ บุญส่ง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2532) จากข้อดีเหล่านี้จึงเลือกใช้เชื้อ *saccharomyces cerevisiae* ในกระบวนการผลิตเอทานอล

ข้าวฟ่าง (Sorghum bicolor) เป็นพืชทางเลือกใหม่ที่มีศักยภาพที่จะเข้ามาเสริมในระบบการผลิตเอทานอล เนื่องจากข้าวฟ่างหวานเป็นพืชที่ใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน เช่น น้ำหวานที่คั้นหรือหีบจากลำต้น กากที่เหลือจากการหีบน้ำหวานออก และส่วนเมล็ดข้าวฟ่างหวานพบว่ามีองค์ประกอบหลักประกอบไปด้วยโปรตีน 12.4 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 3.6 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรตชนิดละลายน้ำได้ 79.7 เปอร์เซ็นต์ (Hall และคณะ, 1950 ; Schaffert และคณะ, 1982) ซึ่งสามารถ

ใช้ประโยชน์ทั้งในรูปของอาหาร พลังงาน และเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย พืชชนิดนี้นอกจากจะให้พลังงานสูงแล้ว ยังเป็นพืชที่ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีมาก ทนทานต่อความแห้งแล้ง น้ำท่วมขัง ดินเค็มและดินด่าง แล้วยังให้ผลผลิตต่อต้นสูง โดยที่วัตถุดิบประเภทนี้จะต้องนำมาผ่านกระบวนการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสด้วยการย่อย 2 ขั้นตอน คือ การย่อยแป้งครั้งแรกหรือการทำให้แป้งเหลว (liquefaction) และการย่อยครั้งสุดท้ายหรือการเปลี่ยนสารละลายแป้งเป็นน้ำตาล (saccharification) โดยจะใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ตามลำดับ โดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลสส่วนใหญ่จะใช้เชื้อราในสกุล *Aspergillus* sp. จากนั้น แต่มีการศึกษาพบว่ามียีสต์บางสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มของอะมิโลไลติคได้ เช่น เชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* ให้ผลผลิตเอนไซม์ที่สูง นำไปทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย ใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำ (Futatsugi และคณะ, 1993) จากข้อดีเหล่านี้จึงเลือกใช้เชื้อ *S. fibuligera* ชนิดนี้ในขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล **จากนั้นจึงจะทำการหมักเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล** แต่ขั้นตอนดังกล่าวเป็นขั้นตอนที่สิ้นเปลืองทั้งเวลาและพลังงานความร้อน แต่อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากแป้งได้มีการพัฒนาขึ้นอย่างมาก โดยเฉพาะในสหรัฐอเมริกา โดยพัฒนาให้กระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล (saccharification) เกิดขึ้นพร้อมกันกับการหมัก (fermentation) เรียกกระบวนการนี้ว่า กระบวนการย่อยน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation; SSF) ซึ่งมีหลายวิธีการ เช่น การใช้เอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ในสภาวะเดียวกับการหมัก (Lyon, 1999) การดัดแปลงพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ให้มีความสามารถทั้งในการย่อยแป้งและการหมักพร้อมกัน (Shigechi และคณะ, 2002) การใช้เชื้อจุลินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิด (Mamma และคณะ,1995 ; Verma และคณะ, 1999) เป็นต้น ซึ่งจะทำให้สามารถลดทั้งเวลาและพลังงานที่ใช้ในกระบวนการหมักให้ต่ำที่สุด จึงเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการผลิตอันจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม

โปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single Cell Protein; SCP) คือ จุลินทรีย์ที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน ในการเจริญเติบโตและเปลี่ยนสารประกอบไนโตรเจนอนินทรีย์ ให้เป็นโปรตีนในเซลล์ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการ เป็นโปรตีนในเซลล์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการ โดยสามารถนำมาทดแทนโปรตีนจากพืชและสัตว์ที่มีราคาสูง ซึ่งยีสต์จัดเป็นจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตมากที่สุด ยีสต์สามารถเจริญเติบโตเร็ว ใช้เวลาน้อย จึงเป็นที่นิยมนำยีสต์แห้งมาใช้เป็นอาหารสัตว์ ซึ่งยีสต์สามารถสร้างกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตทั้งคนและสัตว์ (Dostalek, 1986 ; Trien และคณะ, 1994) ซึ่งโปรตีนเซลล์เดี่ยวจะเกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเอทานอล

ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมล็ดข้าวฟ่าง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ โดยใช้พืชทางเลือกใหม่ที่มีการนำไปใช้ค่อนข้างจำกัดและราคาถูก เพื่อการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยว ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการลดการพึ่งพาจากต่างประเทศ และเพิ่มคุณค่าทางอาหารของกากเมล็ดข้าวฟ่างจากโปรตีนเซลล์เดี่ยวที่ได้จากกระบวนการหมักให้เกิดประโยชน์สูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมล็ดข้าวฟ่าง โดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*

1.3 วิธีดำเนินการวิจัย

1.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่าง

1.3.2 หาภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างด้วยวิธีทางกายภาพ

1.3.3 หาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมล็ดข้าวฟ่าง โดยใช้เชื้อโดยตรงระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*

1.3.4 หาภาวะที่เหมาะของการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคจากเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera*

1.3.5 ศึกษาการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยการหมักเอนไซม์จากเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* ร่วมกับเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมล็ดข้าวฟ่าง โดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisi*ae

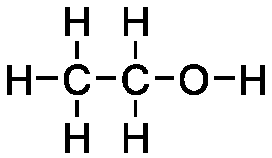
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล (Ethanol)

เอทานอล หรือ เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) มีสูตรโครงสร้างเป็น C_2H_5OH ดังแสดงในรูปที่ 2.1 น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 40.07 จุดเดือดประมาณ 78 องศาเซลเซียส ติดไฟง่าย ลักษณะทั่วไปเป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีกลิ่นเฉพาะตัวของเอทานอล

ประโยชน์ของเอทานอลนั้นใช้เป็นสารเคมีที่มีความเกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวัน เช่น ทางด้านการแพทย์ เภสัชกรรม และสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันเบนซินได้ นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบในเครื่องดื่มที่นิยมกันทั่วไป คือ สุรา เบียร์ และไวน์ เป็นต้น



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของเอทานอล

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

ในการผลิตเอทานอลโดยวิธีการหมัก วัตถุดิบที่นำมาใช้มีหลายประเภทด้วยกัน ได้แก่ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล แป้ง สารประกอบเซลลูโลส และผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น whey กากผลไม้จากโรงงานผลไม้กระป๋อง และน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ (sulfite liquor) เป็นต้น

วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ น้ำตาลจากอ้อย sugar beet และกากน้ำตาล (molasses) ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมโดยเฉพาะกากน้ำตาล เนื่องจากสามารถนำเข้าสู่กระบวนหมักได้โดยตรง ขั้นตอนการผลิตไม่ยุ่งยาก และให้ผลผลิตสูง

วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ มันสำปะหลัง ข้าวโพด เมล็ดข้าวฟ่าง และ ธัญพืชต่างๆเนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของแป้งประกอบด้วย อะมิโลส และ อะมิโลเปคติน ดังนั้นจึงต้องมีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ อัลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส ให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสก่อนแล้วจึงนำไปหมักเป็นเอทานอลต่อไป

วัตถุดิบประเภทสารประกอบเซลลูโลส ได้แก่ เศษไม้จากอุตสาหกรรมแปรรูปไม้เศษวัสดุที่เป็นเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว ผักตบชวา หญ้าแฝก ชานข้าวฟ่าง หรือเยื่อใยจากพืชชนิดต่างๆ รวมถึงวัสดุเหลือทิ้งจากโรงเลื่อย โรงงานทำกระดาษ กระดาษหนังสือพิมพ์ และ อื่นๆ ซึ่งของเสียจากโรงงานทำกระดาษเหมาะสมมากที่สุดเนื่องจากแยกลิกนินออกหมดแล้ว ดังนั้นการใช้เซลลูโลสเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลส่วนมากจึงเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานหรือทางการเกษตร
(เทพปัญญา เจริญรัตน์, 2545)

2.3 ข้าวฟ่าง

2.3.1 ความสำคัญของข้าวฟ่าง

วัตถุประสงค์ในการนำข้าวฟ่างมาปลูกในประเทศไทย เพื่อใช้ต้นเลี้ยงสัตว์แต่เมื่อปลูกแล้วปรากฏว่าให้ผลผลิตเมล็ดดี และเมื่อมีตลาดต่างประเทศให้ความสนใจซื้อเมล็ดข้าวฟ่างจากประเทศไทย จากวัตถุประสงค์ของการนำข้าวฟ่างมาปลูกเพื่อใช้ต้นเลี้ยงสัตว์จึงเปลี่ยนไปปลูกเพื่อผลิตเมล็ดวางเป็นสินค้าออกคือ ข้าวฟ่างเมล็ดหรือข้าวฟ่างปลูกเพื่อใช้เมล็ด (sorgrum grain) ข้าวฟ่างชนิดนี้มีขนาดของเมล็ดใหญ่กว่า ต้นเตี้ยกว่า และผลผลิตเมล็ดจะมากกว่าข้าวฟ่างชนิดอื่น (จุฬี ทิพยรักษ์, 2533) ข้าวฟ่างเมล็ดมีความสำคัญมากเป็นหนึ่งในห้าของธัญพืชที่เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์และเป็นวัตถุดิบในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ คุณค่าทางอาหารหรือส่วนประกอบทางเคมี รวมทั้งสารแทนนินของเมล็ด ไม่สามารถบ่งบอกได้ชัดเจนจากสีของเมล็ดข้าวฟ่างที่มองเห็นจำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ทางเคมี คุณค่าทางอาหารเมื่อคำนึงเฉพาะกรดอะมิโนของเมล็ดข้าวฟ่างเทียบกับเมล็ดข้าวโพด มีรายงานไว้ว่าใกล้เคียงกัน ยกเว้นปริมาณของแคโรทีนและแซนโทฟิล ซึ่งข้าวฟ่างจะมีน้อยกว่า แต่ปริมาณที่แตกต่างขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวฟ่างด้วย ในอุตสาหกรรมน้ำตาลของประเทศบราซิลได้มีการทดสอบการผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างในระดับ pilot plant สามารถผลิตได้ 120,000 ลิตรต่อวัน (Schaffert และ Gourley, 1982) ประเทศอินเดียตอนใต้และหลายประเทศในอัฟริกานำเมล็ดข้าวฟ่างมาแปรรูปเป็นอาหารหลักแทนข้าว ข้าวสาลี ที่ผลผลิตได้ผลดีไม่เท่ากับข้าวฟ่าง ทั้งนี้เนื่องจากสภาพดินฟ้าอากาศของประเทศเหล่านั้นค่อนข้างแห้งแล้งและร้อน ข้าวฟ่างเป็นพืชที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าธัญพืชหลายชนิด รวมทั้งข้าวโพด ประเทศยุโรปได้ให้ความสนใจและทดลองใช้แป้งจากเมล็ดข้าวฟ่างทดแทนข้าวสาลีเป็นบางส่วนเพื่อลด

ต้นทุนการผลิตในอุตสาหกรรมต่างๆ หากมีการศึกษาการใช้ประโยชน์จากข้าวฟ่างเพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดผลดีหลายด้าน เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงานทางเลือก ขณะเดียวกันช่วยในการพัฒนาการใช้วัตถุดิบในท้องถิ่นให้เกิดประโยชน์สูงสุด

2.3.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ข้าวฟ่าง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ Sorghum bicolor (L) Moench จัดเป็นพืชตระกูลหญ้า ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะมีลำต้นเดียว แต่อาจจะแตกกอหรือหน่อได้แล้วแต่ละชนิดและพันธุ์ของข้าวฟ่าง โดยทั่วไปข้าวฟ่างพวกที่ใช้ประโยชน์จากเมล็ดจะไม่มีการแตกหน่อ ยกเว้นกรณีที่ต้นเดิมหรือยอดถูกทำลายไปก็จะมีการแตกหน่อขึ้นมาใหม่ข้าวฟ่างส่วนใหญ่เป็นพืชฤดูเดียวหรือล้มลุก คือ ออกดอกให้เมล็ดแล้วก็ตายไป แต่มีข้าวฟ่างหลายประเภทก็สามารถอยู่ข้ามปีได้โดยการแตกกอจากต้นเดิม ส่วนประกอบที่สำคัญของข้าวฟ่างมีดังนี้ คือ (vanderlip, 1979) แสดงดังรูปที่ 2.2

ราก ข้าวฟ่างมีระบบรากฝอย (fibrous root system) รากที่เกิดจากเมล็ดโดยตรงมีรากเดียวและจะมีรากเล็กๆ แตกออกมาจากรากนี้ เรียกว่ารากแขนง เมื่อต้นอ่อนของข้าวฟ่างใช้อาหารจากคัพภะหรือเอ็มบริโอ (embryo) จวนหมด จะเริ่มมีรากเป็นจำนวนมากแตกออกจากข้อของลำต้นที่อยู่ใต้ดิน ซึ่งจะแผ่ออกไปอย่างกว้างขว้างทั้งแนวราบและแนวลึก

ลำต้น ลำต้นข้าวฟ่างมีความสูงแตกต่างกันตั้งแต่ 45 เซนติเมตร ถึงกว่า 4 เมตร แต่ข้าวฟ่างที่นิยมปลูกกันทั่วไปจะมีลำต้นสูงประมาณ 1-2 เมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางลำอยู่ระหว่าง 0.5 – 3.0 เซนติเมตร ลำต้นจะเจริญโตตั้งตรงเหมือนพืชทั่วไป

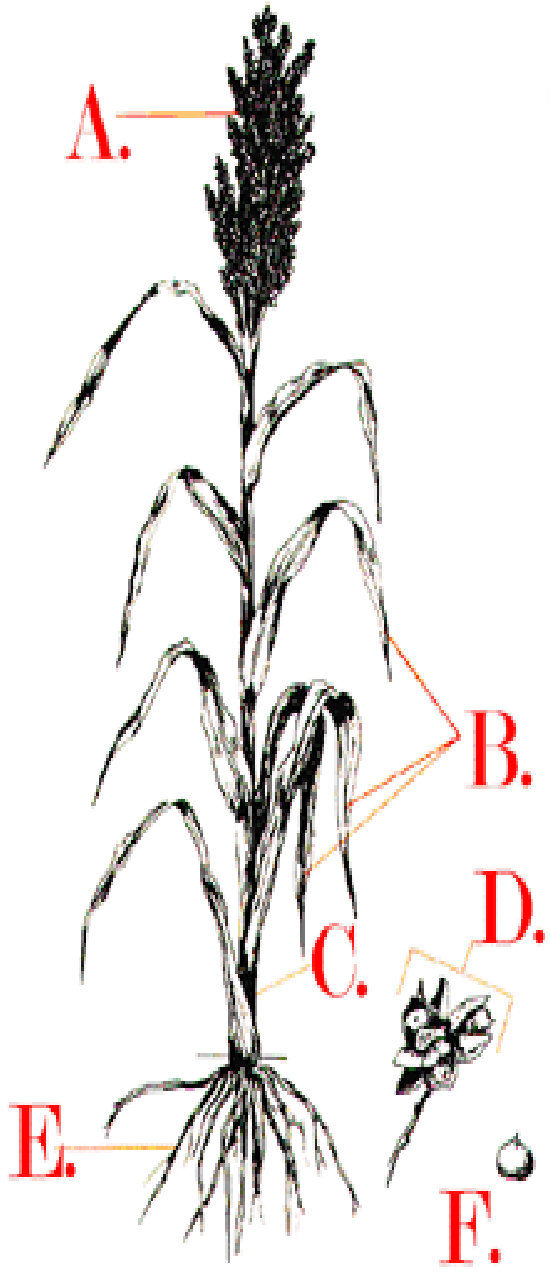
ใบ ข้าวฟ่างที่ปลูกอยู่ทั่วไปมีใบอยู่ระหว่าง 7 ถึง 24 ใบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อม ใบอ่อนของข้าวฟ่างที่แก่โค้งลง ใบจะเกิดตามข้อและสลับด้านกันไปตลอดลำต้น ใบมีลักษณะเป็นรูปใบหอกหรือใบหอกเรียวๆ และขอบใบมีลักษณะเรียบตลอด

กาบใบ กาบใบจะหุ้มอยู่รอบลำต้นโดยซ้อนวนเริ่มจากขวาทับซ้ายแล้วซ้ายทับขวา กาบใบจะมีความยาวตั้งแต่ 15-35 เซนติเมตร ด้านหน้าของกาบใบอาจมีขี้ผึ้งปกคลุมอยู่ ตรงฐานหรือโดนของกาบใบส่วนที่ติดกับข้อจะมีแถบขนสั้นๆสีขาวติดอยู่

ช่อดอก ช่อดอกข้าวฟ่างเกิดจากปล้องบนสุดของลำต้น ซึ่งปล้องที่ยาวที่สุด ช่อดอกประกอบด้วย ก้านช่อดอก แกนกลางของช่อดอก กิ่งแขนงและกิ่งย่อยของช่อดอก ซึ่งเป็นที่เกิดของดอกและเมล็ด

เมล็ด เมล็ดจะเกิดจากการผสมระหว่างเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย ภายในเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง หลังจากที่เกสรตัวผู้ตกลงบนยอดเกสรตัวเมีย หลังจากนั้นไข่ที่ได้รับการผสมจะพัฒนากลายเป็นเมล็ดแก่ (mature seed) ซึ่งระยะเวลาดอกบานจนถึงเมล็ดแก่ใช้เวลาประมาณ 30 - 32 วัน เมล็ดข้าวฟ่างอาจมีรูปทรงกลม หรือแบนข้างหนึ่งเหมือนหลังเต่า และขนาดของเมล็ดจะแตกต่าง

กันไปขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์ สีของเมล็ดข้าวฟ่างที่มองเห็นด้วยตาเปล่าอาจจะมีหลายสี ขาว แดง น้ำตาล เหลือง และครีมเป็นต้น



รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบต่างๆของข้าวฟ่าง

A = ช่อดอก B = ใบ C = ลำต้น D = ดอก E = ราก F = เมล็ดข้าวฟ่าง

2.3.3 องค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่าง

องค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่างคล้ายกันกับข้าวโพดหลายประการ ความคล้ายคลึงกันนี้รวมไปถึงลักษณะของแป้งและโปรตีน เช่นเดียวกับส่วนประกอบอื่นๆ ต่างกันที่มีปริมาณไขมันต่ำกว่าแต่มีปริมาณโปรตีนและปริมาณแป้งสูงกว่า ค่าการวิเคราะห์องค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่างแสดงดังตารางที่ 2.1, 2.2 และองค์ประกอบของเมล็ดข้าวโพดแสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่าง

	Range (% dry basis)	average (% dry basis)
Water (% wet basis)	8 - 20	15.5
Starch	60 - 77	74.1
Protein (N x 6.25)	6.6 - 16	11.2
Fat ($CCl_{4\ extrract}$)	1.4 - 6.1	3.7
Ash	1.2 -7.1	1.5
Fibre (crude)	0.4 - 13.4	2.6
Pentoglycans	1.8 - 4.9	2.5
Sugar (as dextrose)	0.5 - 2.5	1.8
Tannin	0.003 - 0.17	0.1
Wax	0.2 - 0.5	0.3

ที่มา : (Watson, 1967)

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวฟ่างทั้งเมล็ดของแต่ละส่วน

Component Part of Kernel	Whole Grain	Bran	Horny	Endosperm Starch	Endosperm Germ
%Proportion of Kernel	100	5.5	54.7	28.7	11.1
%Starch	68.52	1.6	72.24	82.5	1.53
% Protein	13.99	7.08	15.11	8.91	20.84
%Nitrogen free Extract	78.72	70.16	83.49	89.29	40.67
% Ash	1.89	3.07	0.56	0.71	9.46
% Fiber (crude)	1.93	15.36	0.69	0.81	9.11
% Ether Extract	3.47	4.33	0.15	0.28	19.92

ที่มา : (Hubbard และคณะ, 1950)

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวโพดทั้งเมล็ดของแต่ละส่วน

Component Part of Kernel	Whole Kernel	Bran	Tip Cap	Endosperm Starch	Endosperm Germ
%Proportion of Kernel	100	5.3	0.8	82.9	11
%Starch	75	7.3	5.3	88.4	11.9
% Protein	8.9	3.7	9.1	8	18.4
%Oil	4	1	3.8	0.8	29.6
% Ash	1.5	0.8	1.6	0.3	10.5
%Sugars	1.7	0.3	1.6	0.6	10.8
% Fiber (crude)	8.9	86.9	78.6	1.9	18.8

ที่มา : (Philppe, 2004)

ปริมาณผลผลิตและองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวฟ่างขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ สภาพดินและอากาศ ในปีที่ฝนแล้งและอุณหภูมิสูงผลผลิตของข้าวฟ่างจะลดลงและปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณแป้งและไขมันลดลง นอกจากนี้สถานที่เพาะปลูกก็มีผลต่อความผันแปรขององค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่างเช่นกัน (Joseph และ Jerrold, 1978)

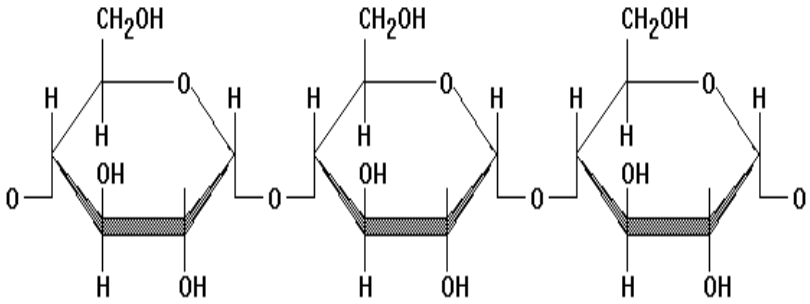
2.3.4 แป้งในเมล็ดข้าวฟ่าง

เมล็ดข้าวฟ่างมีองค์ประกอบเป็นแป้ง โดยที่ Subramanian และ Jambunathan (1986) ได้รายงานว่า เมล็ดข้าวฟ่างจาก 45 สายพันธุ์มีแป้งเป็นองค์ประกอบอยู่ในช่วง 62.6-73.3 เปอร์เซ็นต์ และมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 8-14 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการนำเมล็ดข้าวฟ่างมาใช้เป็นวัตถุดิบจึงต้องผ่านขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮเดรเจน และออกซิเจนในอัตราส่วน 6:10:5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสซึ่งประกอบด้วย anhydroglucose unit เชื่อมด้วยต่อกันด้วยพันธะ glucosidic linkage ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของหน่วยกลูโคส (glucose unit) ทางด้านตอนปลายสายพอลิเมอร์มีหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde group) เรียกว่า reducing end group แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคสที่มีโครงสร้าง 2 แบบ คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (amylose) และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (amylopectin) แป้งจากแหล่งที่ต่างกันจะมีอัตราส่วนของอะมิโลสและอะมิโลเพกตินแตกต่างกันซึ่งจะทำให้คุณสมบัติของแป้งแต่ละชนิดแตกต่างกัน

<u>อะมิโลส</u> (Amylose)

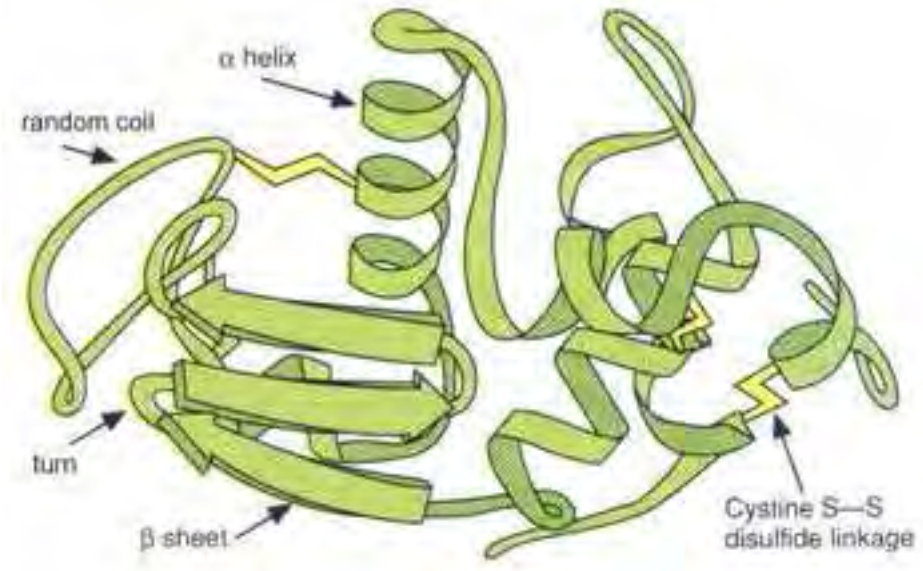
อะมิโลสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วยเชื่อมต่อกัน ด้วยพันธะ α –1,4-glucosidic linkage แสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของอะมิโลส (Whistler, 1965)

น้ำหนักโมเลกุลของอะมิโลสอยู่ในช่วง 10^5 ถึง 10^6 ดาลตัน ซึ่งอะมิโลสในแป้งแต่ละชนิดจะมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างไป แป้งที่มีโมเลกุลของอะมิโลสยาวขึ้นจะมีแนวโน้มในการเกิดรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) ลดลงคุณสมบัติทางโครงสร้างของอะมิโลสในแป้งบางชนิด อะมิโลสสามารถรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับไอโอดีนได้เป็นสารสีน้ำเงิน นอกจากนี้อะมิโลสยังรวมตัวกับสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ เช่น บิวทานอล กรดไขมัน สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ฟีนอล และไฮโดรคาร์บอน สารประกอบเชิงซ้อนเหล่านี้จะไม่ละลายในน้ำ โดยอะมิโลสจะพันเป็นเกลียวล้อมรอบสารประกอบอินทรีย์ (Galliard และคณะ, 1987)

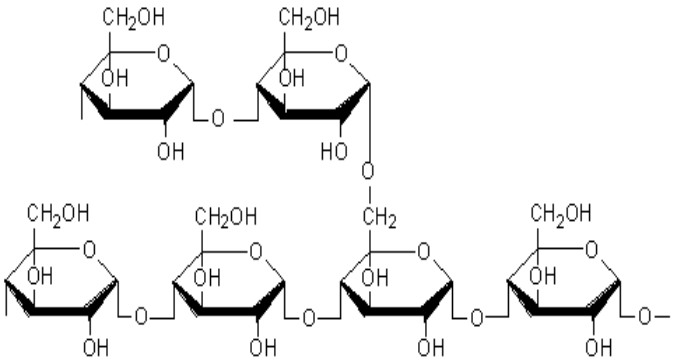
อะมิโลสบางส่วนอยู่ในกลุ่มของอะมิโลเพกติน บางส่วนกระจายอยู่ทั้งในรูปอสัณฐาน (amorphous) และผลึก (crystalline) อะมิโลสที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะมีลักษณะเป็นเกลียวคู่กับอะมิโลเพกทินอยู่ใจกลางเม็ดแป้ง สำหรับอะมิโลสขนาดโมเลกุลเล็กจะพบอยู่ตามขอบเม็ดแป้ง โครงสร้างของอะมิโลสเมื่ออยู่ในสารละลายจะมีหลายรูปแบบ คือ ลักษณะเป็นเกลียวม้วน (helix) เกลียวที่คลายตัว (interrupted helix) หรือ ม้วนอิสระ (random coil) แสดงดังรูปที่ 2.4 ในสารละลายที่อุณหภูมิห้อง อะมิโลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 6,500 ถึง 160,000 มีโมเลกุลเป็นแบบม้วนอิสระและจะไม่ละลายในสารละลาย สำหรับอะมิโลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 6,500 อาจจะมีบางส่วนละลายได้ โมเลกุลจะอยู่ในลักษณะเกลียวคู่ที่แข็ง (Whistler, 1984)



รูปที่ 2.4 ลักษณะเกลียวของอะมิโลส

อะมิโลเพกทิน (Amylopectin)

อะมิโลเพกทินเป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส ส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4-glucosidase linkage และส่วนที่เป็นกิ่งก้านสาขาที่เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสสายสั้น DP อยู่ในช่วง 10 ถึง 60 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4-glucosidase linkage และเชื่อมต่อกับส่วนที่เป็นเส้นตรงหลักด้วยพันธะ α -1,6-glucosidase linkage แสดงดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของอะมิโลเพกติน (Amylopectin)

ซึ่งหน่วยกลูโคสที่มี พันธะ α -1,6-glucosidase linkage แสดงดังรูปที่ 1.4 ซึ่งหน่วยของกลูโคสที่มีพันธะ α -1,6-glucosidase linkage มีอยู่ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณหน่วยของกลูโคสในอะมิโลเพกทินทั้งหมด DP ของอะมิโลเพกทินในแป้งแต่ละชนิดจะมีค่าประมาณ 2 ล้านหน่วย อะมิโลเพกทินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,000 เท่าของอะมิโลส คือ ประมาณ 10^7 ถึง 10^9 ดาลตัน และมีอัตราในการคืนตัวต่ำ เนื่องจากอะมิโลเพกทินมีลักษณะโครงสร้างเป็นกิ่ง โดยแป้งจากแหล่งต่างกันจะมีอัตราส่วนของอะมิโลสและอะมิโลเพกตินแตกต่างกันทำให้คุณสมบัติของแป้งแตกต่างกันดังในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 สมบัติที่สำคัญของอะมิโลสและอะมิโลเพกติน

คุณสมบัติ	อะมิโลส	อะมิโลเพกติน
ลักษณะโครงสร้าง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นเส้นตรง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นกิ่งก้าน
พันธะที่จับ	α-1,4	α-1,4 และα-1,6
ขนาด	200-2000 หน่วยกลูโคส	มากกว่า 10,000 หน่วยกลูโคส
การละลาย	ละลายน้ำได้น้อยกว่า	ละลายน้ำได้ดีกว่า
การทำปฏิกิริยากับไอโอดีน	สีน้ำเงิน	สีแดงม่วง
การจับตัว	เมื่อให้ความร้อนและทิ้งไว้จะจับตัวเป็นวุ้นและแผ่นแข็ง	ไม่จับตัวเป็นแผ่นแข็ง

ที่มา : Beynum และ Roels (1985)

2.3.5 กระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์

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

การทำให้แป้งเหลว (Liquefaction)

การทำให้แป้งเหลวด้วยเอนไซม์จะทำโดยการต้มให้ร้อนจนแป้งเกิดเจลาติไนซ์ (Gelatinization) กล่าวคือ เม็ดแป้งจะเกิดการพองตัวและสามารถจับน้ำได้ดีมากขึ้น โครงสร้างแป้งจะมีความแข็งแรงลดลง ทำให้แห้งมีความหนืดสูงขึ้นจากนั้นโมเลกุลของแป้งจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในกลุ่มแอลฟาอะมิเลส (α-amylase) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการย่อยพันธะ α-1,4-glucosidase linkage ภายในโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม (endo-acting enzyme) ทำให้โมเลกุลของแป้งสั้นลงส่งผลให้ความหนืดของสารละลายลดลงอย่างรวดเร็ว การเติมเอนไซม์ลงในกระบวนการจะต้องมีความเข้มข้นที่เหมาะสม ถ้าไม่เพียงพอจะทำให้การย่อยไม่สมบูรณ์และใช้เวลานาน โดยทั่วไปในการเติมเอนไซม์ชนิดนี้ จะเติมลงไปก่อนที่อุณหภูมิจะสูงขึ้นจนเกิดเจลาติไนซ์ (geratinize) เพื่อให้เกิดการผสมที่ดีระหว่างแป้งกับเอนไซม์ โดยอุณหภูมิอยู่ที่ประมาณ 60 องศาเซลเซียส (ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของแป้ง) ช่วงอุณหภูมิที่ใช้จะต้องอยู่ในช่วงที่เหมาะสม (ที่นี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์)

เพื่อให้เกิดการย่อยอย่างมีประสิทธิภาพและสมบูรณ์ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการนี้จะได้แป้งโมเลกุลขนาดเล็กและเด็กซ์ตริน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยในครั้งแรกจะมีค่าสมมูลเด็กซ์โทรส (Dextrose Equivalent ; DE ซึ่งเป็นค่าสัดส่วนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสต่อปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด) ประมาณ 20

กลุ่มเอนไซม์เพื่อการย่อยครั้งแรกเป็นเอนไซม์ประเภท endo-enzyme คือ เป็นเอนไซม์ที่ทำงานหรือเกิดจากกิจกรรมภายในโมเลกุลของแป้ง ทำให้แป้งถูกย่อยเป็นโมเลกุลขนาดย่อมๆ หรือเล็กๆ เท่าๆกันในระยะเวลาอันรวดเร็ว เกิดเป็นของเหลวที่มีความหนืดต่ำ และมีค่าสมมูลเด็กซ์โทรส (Dextrose Equivalent; DE) ประมาณ 20 โอกาสที่แป้งจะจับตัว เนื่องจากเกิดการจัดเรียงตัวใหม่เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง (retrogradation) เป็นไปได้ต่ำ เอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ α-amylase ตัวอย่างเอนไซม์ทางการค้าของกลุ่ม α-amylase แสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 รายชื่อและบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์สำหรับการย่อยครั้งแรก (liquefaction)

เชื้อที่ผลิต	ชื่อเอนไซม์	บริษัทผู้ผลิต
Bacillus amyloliquefaciens	BACTERIAL AMYLASE	Amano International Enzyme
(Bacillus subtilis liquefying)	CANALPHA	Biocon/Quest
	HITEMPASE	Biocon/Quest
	KLEISTASSE	Daiwa kasei
	ENZECO BACTERIAL ALPHA-AMYLASE	Enzyme Development
	DEX-LO	IBIS(Gist-Brocades)
Bacillus Licheniformis	SPEZYME AA 20	Genecor (Finnsugar)
	MAXAXYL	IBIS(Gist-Brocades)
	TERMAMYL120L	Novo Nordisk
	TAKA-TERM	Solvay (Miles)
	OPTIAMYL-L	Solvay (MKC)
Bacillus stearothermophilus	G-ZYME G995	Enzyme Bio-systems Ltd.
	THERMOLASE	Enzyme Development
	NERVANASE BT	Phone-Poulene

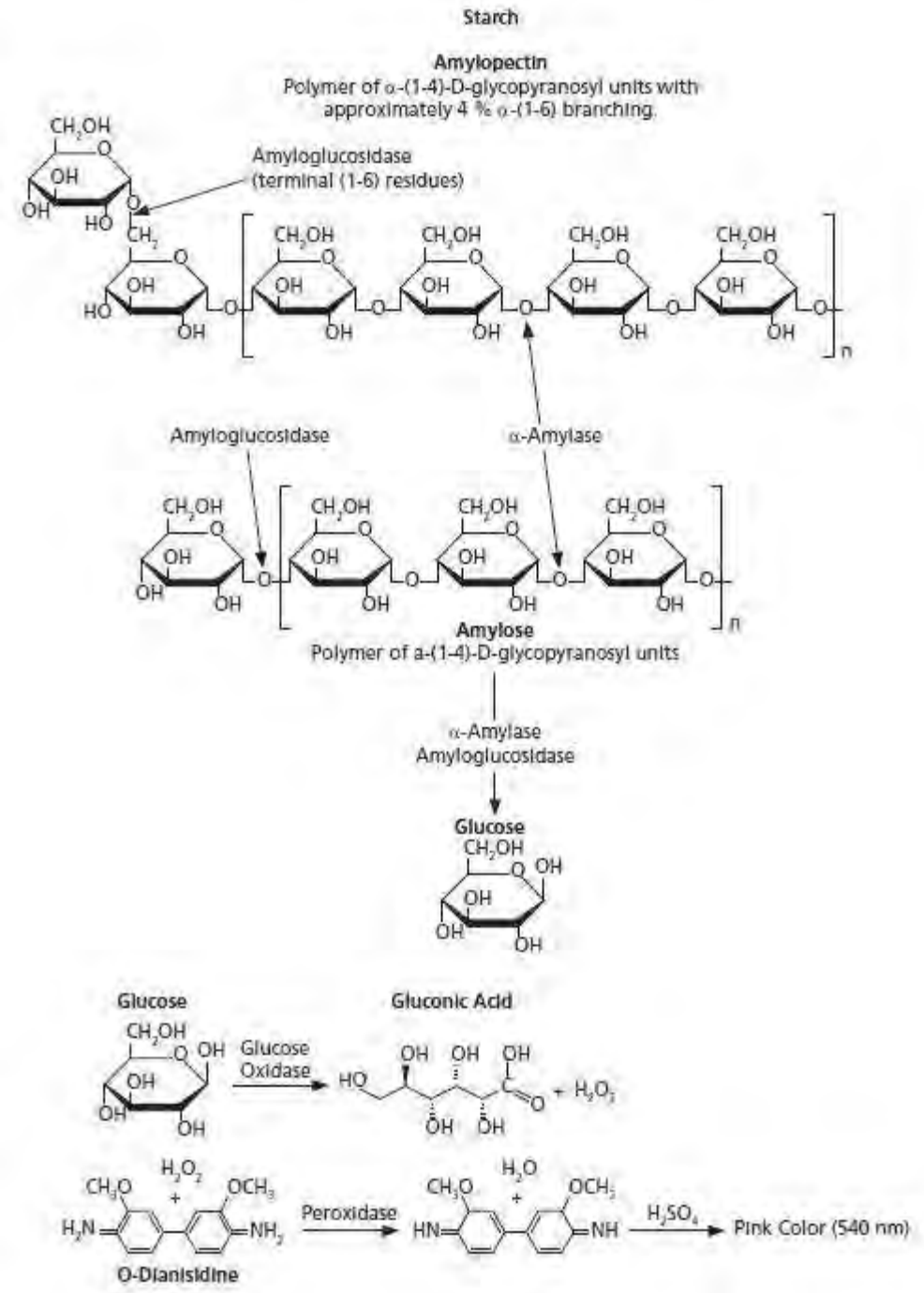
ที่มา : Teague และ Brumm (1992)

<u>การย่อยแป้งครั้งสุดท้ายเป็นน้ำตาลหรือการทำให้หวาน</u> (Saccharification)

กระบวนการย่อยแป้งให้หวานนี้จะเป็นขั้นตอนในการเปลี่ยนแป้งโมเลกุลเล็กหรือเด็กซ์ทรินให้เป็นน้ำตาลกลูโคสโดยจะทำการลดอุณหภูมิจาก 90 องศาเซลเซียส เหลือประมาณ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งในขั้นตอนนี้จะอาศัยเอนไซม์ในกลุ่มกลูโคอะมิเลสเพื่อย่อยแป้งโมเลกุลเล็กและเด็กซ์ทรินให้เป็นน้ำตาลที่หมักได้ แสดงดังรูปที่ 2.6 เวลาในการย่อยจะนานกว่ากระบวนย่อยในครั้งแรก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ รวมทั้งสภาวะในการย่อย

เอนไซมที่ใช้ในการย่อยแป้งครั้งสุดท้ายในการผลิตน้ำตาลกลูโคสเพื่อที่จะทำเป็นวัตถุดิบของการผลิตผลิตภัณฑ์ต่อเนื่องต่อไป เช่น น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลซอร์บิทอล จำเป็นต้องใช้น้ำตาล

กลูโคสในปริมาณที่สูงการย่อยจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ประเภท Exo-enzyme ที่ย่อยพันธะจากภายนอกเข้ามาและสามารถย่อยพันธะได้ทั้ง α-1,4-glucosidase และ α-1,6-glucosidase เอนไซม์ดังกล่าว คือ กลูโคอะมิเลสหรืออะมิโลกลูโคซิเดสที่ได้จากจากเชื้อรา *Aspergillus niger* หรือ *Rhizopus* sp. ตัวอย่าง เอนไซม์ทางการค้าของกลุ่มนี้ แสดงดังตารางที่ 2.6 ลักษณะของเอนไซม์กลุ่มนี้คือ มีความสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 55 องศาเซสเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์) ค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 4-9 (ค่าความเป็นกรดด่างเหมาะสมคือ 4.5 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์) ไม่ต้องการแคลเซียมในการทำกิจกรรมโดยทั่วไปเอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยได้ทั้งพันธะ α-1,4 และพันธะ α-1,6 แต่การเกิดกิจกรรมการย่อยที่พันธะ α-1,6จะเกิดได้ช้ากว่าพันธะ α-1,4 ดังนั้นในการย่อยอาจจะมีการเติมเอนไซม์อีกจำพวกคือ เอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง (Debranching Enzyme) ซึ่งสามารถย่อยพันธะแอลฟา (1,6) ได้เอนไซม์จำพวกนี้ได้แก่ Pullulanase และ Iso-amylase



รูปที่ 2.6 กิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มอะมิเลสในการย่อยแป้ง

ตารางที่ 2.6 รายชื่อและบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์สำหรับการย่อยครั้งสุดท้าย (saccharification)

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

ที่มา : Teague และ Brumm (1992)

2.4 กระบวนการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์

ในภาวะที่มีอากาศเชื้อยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสในการหายใจเพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ น้ำคาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานในรูป ATP ดังแสดงในสมการที่ 1

$$C_6H_{12}O_6 + 6CO_2 \longrightarrow 6H_2O + 6CO_2 + 38\ ATP \qquad (1)$$

การผลิตเอทานอลเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยอาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลในภาวะที่ไร้อากาศ ซึ่งเชื้อยีสต์ทำการหมักเอทานอลโดยผ่านวิถี Glycolysis หรือ Embden-Meyerhof-Parnas ซึ่งในการหมักน้ำตาลโดยเชื้อยีสต์จะได้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอทานอลตามทฤษฎีเป็น 0.51 กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ นอกจากเอทานอลแล้วยังได้คาร์บอนไดออกไซด์และพลังงานในรูป ATP จากวิถีดังกล่าวเล็กน้อย ดังแสดงในสมการที่ 2

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2\ ATP \qquad (2)$$

ในขั้นตอนของวิถี Glycolysis เพื่อให้ได้เป็นเอทานอล แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. การสลายกลูโคสให้เป็น 2 ไทรโอสฟอสเฟท (trios phosphate)
2. การเปลี่ยนไทรโอสฟอสเฟทให้เป็นไพรูเวท (pyruvate)
3. เป็นการเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็น 2 คาร์บอน เช่น เอทานอล หรือ 3 คาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 2.7

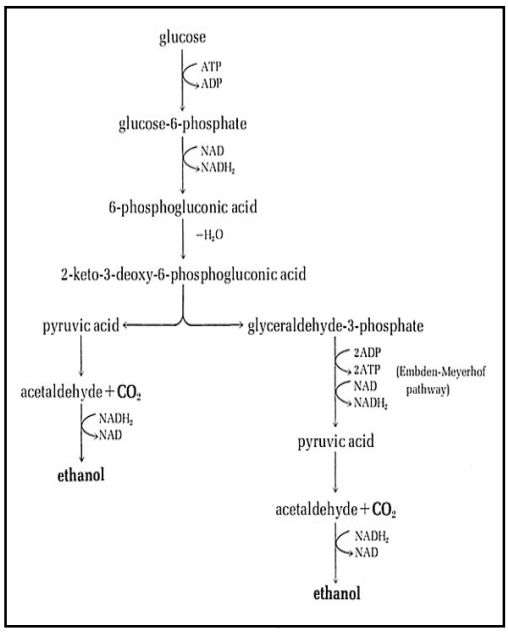
ขั้นตอนที่หนึ่งประกอบด้วย 4 ปฏิกิริยา ปฏิกิริยาของ hexokinase หรือ glucokinase ใช้ ATP เพื่อเปลี่ยนกลูโคสให้เป็น glucose-6-phosphate (G6P) ซึ่งเปลี่ยนเป็น fructose-6-phosphate (F6P) ด้วย phosphohexoisomerase จากนั้น phosphofructokinase จะเปลี่ยน (F6P) ให้เป็น fructose 1,6-diphosphate (FDP) ซึ่งแตกตัวเป็นสารที่มีสามคาร์บอน 2 ชนิด คือ glyceraldehydes-3-phosphate (G3P) และ dihydroxyacetonephosphate (DHAP) โดยอาศัยการเร่งของเอนไซม์ aldolase จากนั้น DHAP จะเปลี่ยนเป็น glycerol phosphate และได้ glyceral (Paturau, 1989)

ขั้นตอนที่สองมี 6 ปฏิกิริยาเริ่มด้วย DHAP เปลี่ยนเป็น G3P โดยเอนไซม์ triosephosphate isomerase ต่อจากนั้น G3P จะทำปฏิกิริยากับฟอสเฟตให้ได้ 1,3-diphosphoglycerate (DPG) ขณะเดียวกันก็ปล่อยอิเล็กตรอนให้ NAD^+ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งด้วย glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase ซึ่ง DPG จะทำปฏิกิริยากับ ADP ได้ 3-phosphoglycerate (3PG) และ ATP ใน

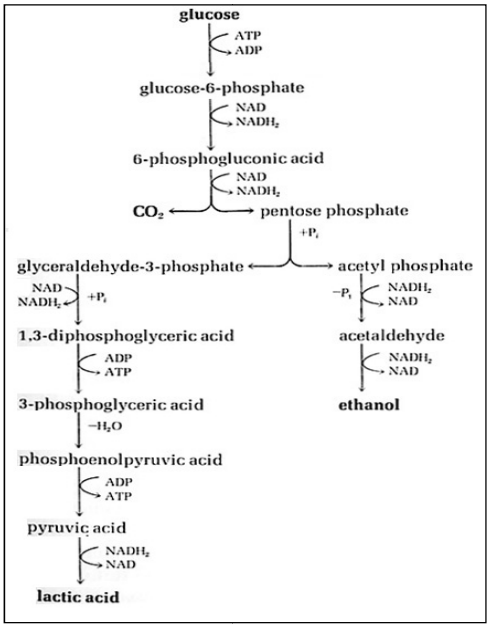
ปฏิกิริยาของเอนไซม์ phosephoglycerate kinase ปฏิกิริยานี้สร้าง ATP โดยวิธี substarte level phosphorylation โดย 3PG จะเปลี่ยนแปลงเป็น phosphoenol-pyruvate (PEP) ซึ่งจะให้ ATP อีกหนึ่งโดยวิธี substarte level phosphorylation เช่นเดียวกัน รวมทั้งให้ไพรูเวทด้วย ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งโดย pyruvate kinase

ขั้นตอนที่สามจะเป็นการเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นสารประกอบที่มี 2 หรือ 3 คาร์บอน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงนั้นๆ ในกรณีที่ขาดออกซิเจนหรือไม่สามารถใช้ออกซิเจนไพรูเวทจะเปลี่ยนแลคเตท (lactate) โดยใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาของ lactate dehydrogenase เมื่อมีออกซิเจนไพรูเวทอาจเปลี่ยนเป็น acetyl CoA โดยเอนไซม์ pyruvate dehydrogenase complex ซึ่ง acetyl CoA จะเข้าสู่วัฏจักรเครบต่อไป เอนไซม์ เอนไซม์นี้อยู่ในไมโตคอนเดรียและเป็น enzyme complex ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดไพรูเวทอาจสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์กลายเป็น acetaldehyde โดยการเร่งของ pyruvate decarboxylase ต่อจากนั้น acetaldehyde จะถูกออกซิไดซ์ด้วย NAD^+ กลายเป็นอะซิเตท (acetate) หรือถูกรีดิวซ์ด้วย NADH โดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ได้เป็นเอทานอล (มนตรี จุฬาวัฒนทล, 2542)

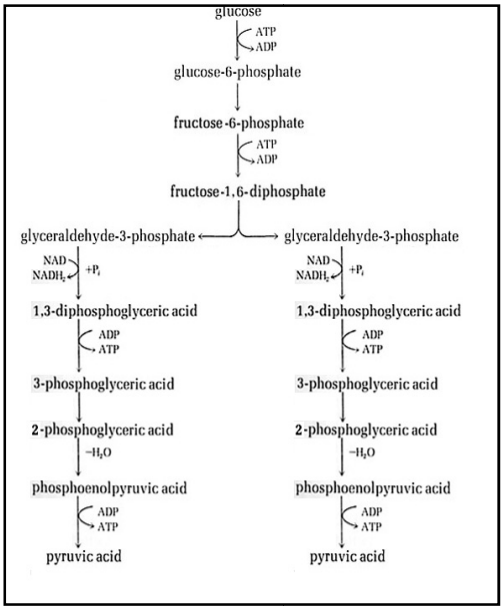
ก.)



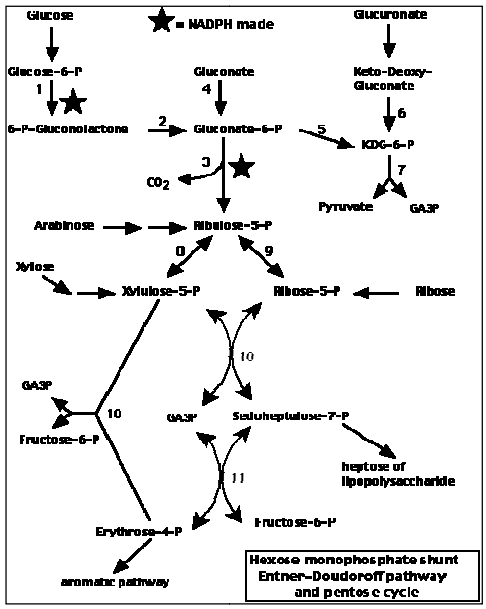
ข.)



ค.)



ง.)



รูปที่ 2.7 การกระบวนการเมตาบอลิซึ่มการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็น pyruvate และเอทานอล (Okamura-Mutsui และคณะ, 2003)

ก.) Enter-Doudoroff pathway (ED)

ข.) Phosphoketolase pathway

ค.) Enbden-Meyerhof-Panas pathway (EMP)

ง.) Hexose monophosphate pathway (HMP)

2.5 โปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single cell protein ; SCP)

2.5.1 โปรตีนเซลล์เดี่ยว

โปรตีนเซลล์เดี่ยว หมายถึง จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารมนุษย์หรือสัตว์ ซึ่งอาจอยู่ในรูปโปรตีนที่สกัดออกมาจากเซลล์แล้ว หรืออาจอยู่ในรูปเซลล์จุลินทรีย์ทั้งเซลล์ก็ได้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันเริ่มมีการใช้คำว่า microbial biomass protein (MBP) เข้ามาแทนที่ SCP เพื่อให้ครอบคลุมฟังไจซึ่งเป็นจุลินทรีย์หลายเซลล์ด้วย

2.5.2 ประวัติการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว

การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวครั้งแรกเริ่มขึ้นในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 ที่ประเทศเยอรมนี เนื่องจากภาวะสงครามทำให้เกิดการขาดแคลนอาหาร จึงได้มีการผลิตเซลล์ยีสต์ขนมปัง (*Saccharomyces cerevisiae*) เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสำหรับมนุษย์ โดยใช้กากน้ำตาลเป็นสับสเตรทหลัก ต่อมาในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ก็ได้มีการพัฒนาการผลิตโดยใช้เชื้อ *Candida utilis* หมักใน sulfite waste liquor ที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ และน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายไม้มาเป็นสับสเตรท หลังจากนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวกันอย่างกว้างขวางและจริงจัง จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1968 ได้มีการก่อตั้งโรงงานผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวขึ้นเป็นจำนวนมากในหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา สวิสเซอร์แลนด์ ไต้หวัน สหภาพโซเวียต ญี่ปุ่น ฟินแลนด์ ฝรั่งเศส อังกฤษและไทย เป็นต้น

2.5.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวมีหลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา สาหร่าย แต่เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปัจจัยประกอบทั้งหลายทั้งในด้านคุณค่าทางอาหาร ทางด้านการผลิต และความคุ้นเคยของผู้บริโภคแล้ว จะพบว่ายีสต์มีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่ดี โดยมีคุณสมบัติที่ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆดังนี้คือ

1. ยีสต์มีอัตราเติบโตเร็ว สามารถเติบโตได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบง่ายๆ ทั้งยังมีความต้องการวิตามิน หรือธาตุอาหารต่างๆน้อย
2. เซลล์ยีสต์สามารถคลุกเคล้ากับอาหารเพาะเลี้ยงได้ดี และสามารถแยกเซลล์ยีสต์ออกจากอาหารเพาะเลี้ยงได้ง่าย เนื่องจากเซลล์ยีสต์มีขนาดใหญ่แยกออกจากน้ำหมักได้โดยง่าย จึงเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิตได้เป็นอย่างดี

3. ยีสต์สามารถต้านทานต่อการทำลายของไวรัส และเชื้อชนิดอื่นที่ปนเปื้อน เนื่องจากยีสต์สามารถเติบโตได้ในภาวะที่เป็นกรด คือ พีเอชประมาณ 3.5-5.0 จึงเป็นการป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ดี ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงยีสต์ได้ทั้งในระบบปลอดเชื้อและระบบที่ไม่ปลอดเชื้อ

4. ยีสต์มีความคงตัวสูงต่อการหมักเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้แหล่งพลังงานจากสารอาหารที่เพาะเลี้ยงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เราสามารถใช้ยีสต์ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

5. ยีสต์มีคุณลักษณะของกลิ่นรสที่ดี ไม่เป็นพิษ และสามารถถูกย่อยได้ง่าย

6. เซลล์ยีสต์มีองค์ประกอบของโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และเกลือแร่ในปริมาณที่สูง และยังประกอบด้วยวิตามินและกรดอะมิโนที่สำคัญอีกหลายชนิด

7. ยีสต์สามารถถูกปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติที่ดีตามต้องการได้โดยง่าย

8. หลังจากผ่านกระบวนการผลิตที่ใช้ยีสต์แล้ว จะมีวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้อยมากหรือแทบจะไม่มีเลย (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.6 **ยีสต์** (Yeast)

ยีสต์จัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของรากลุ่มหนึ่งที่มีการดำรงชีวิตเป็นแบบเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่นรูปร่างกลม ทรงรี สามเหลี่ยม รูปร่างคล้ายผลมะนาวแถบประเทศตะวันตก (Lemon) หรือรูปร่างยาว เป็นต้น ยีสต์จะมีการสืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีการแตกหน่อ (budding) หรือแบบอาศัยเพศโดยวิธีการสร้างสปอร์ชนิดแอสโคสปอร์ (ascospore) หรือเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ยีสต์ส่วนใหญ่จะมีการใช้สารอินทรีย์ (organic) เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน (Reed, 1991)

ปัจจุบันยีสต์ถูกใช้เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของอาหารสัตว์ที่เรียกว่า ฟีดยีสต์ (feed yeast) หรือโฟดเดอร์ยีสต์ (fodder yeast) และอาจใช้เป็นแหล่งอาหารเสริม (nutritional supplement) หรือสิ่งเพิ่มรสชาติ (flavor additive) ในอาหารสำหรับคน เซลล์ของยีสต์มีองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นประโยชน์หลายอย่าง คือ มีโปรตีน 47-50 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีปริมาณโปรตีนที่แท้จริงซึ่งคำนวณจากกรดอะมิโนทั้งหมดเท่ากับ 36.4-43.6 % และโปรตีนในยีสต์มีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่สำคัญหลายชนิด ซึ่งจะเห็นว่ามีปริมาณไลซีนสูง นอกจากนั้นยังมีอาร์จินีนและ
ฮิสติดีนซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเด็ก มีคาร์โบไฮเดรตประมาณ 30-35 % ซึ่งประกอบด้วยไกลโคเจนซึ่งเป็นพลังงานของคน มีกลูแคนและแมนแนนซึ่งเป็นแหล่งที่สำคัญของสารเยื่อใยที่ละลายได้ (soluble fiber) สำหรับคน มีไนโตรเจน 7.5-9 % กรดนิวคลีอิก 6-12 % เถ้า 5-9.5 %

มีไขมันต่ำ คือ 2-6 % และมีเถ้ามาก นอกจากนั้นยีสต์ประกอบไปด้วยโปรตีนหลายชนิด เช่น วิตามินบีรวม ยิ่งกว่านั้นเซลล์ของยีสต์ยังประกอบด้วยเกลือแร่หลายชนิดที่เป็น trace element สำหรับคนและสัตว์ เช่น โครเมียม (chromium) ซีลีเนียม (selenium) โมลิบดีนัม (molybdenum) และสังกะสี (zinc) (Reed, 1991) นอกจากนั้นยีสต์ยังมีรสชาติดีช่วยเพิ่มความน่ารับประทานของอาหาร ดังนั้นยีสต์จึงถูกใช้เป็นส่วนหนึ่งของหารสัตว์และใช้เป็นแหล่งธาตุอาหารเสริมหรือเพิ่มรสชาติของอาหารคนและสัตว์เป็นเวลานาน โดยสามารถนำไปใช้ในรูปแบบต่างๆ ดังนี้

รูปที่ 2.8 ตัวอย่างยีสต์สกัด

ยีสต์สกัด (Yeast extract) เป็นสารสกัดซึ่งเป็นส่วนของของเหลวภายในเซลล์ หรือไซโตพลาสซึม (cytoplasm) มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้มหรือเป็นผงละเอียด ซึ่งอุดมไปด้วยสารอาหารต่างๆ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด โดยสามารถนำไปใช้ได้อย่างหลากหลาย เช่น ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเมตาบอไลท์ (metabolite) ชนิดอื่นๆ ใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในการผลิตขนมขบเคี้ยว ใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในอุตสาหกรรมการแปรรูปเนื้อสัตว์และอาหารสำเร็จรูป รวมทั้งใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ ซึ่งตัวอย่างของยีสต์สกัด ดังแสดงในรูปที่ 2.8

เซลล์ยีสต์ (Yeast Cell) โดยใช้ได้ทั้งในรูปแบบที่มีชีวิต (Live Yeasts or Active Yeast) ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ ส่งผลให้สัตว์มีการกินอาหารได้มากขึ้น อีกทั้งยังเป็นแหล่งของวิตามินบีรวม หรืออาจใช้ในรูปแบบเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้ว (Inactive Yeast) ซึ่งอาจจะไม่มีคุณสมบัติเป็นสารเสริมปฏิชีวนะ แต่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ของการเป็นแหล่งของสารอาหารเสริม โดยมักใช้เป็นแหล่งของอาหารเสริมโปรตีนที่มีคุณภาพดีเนื่องจาก มีปริมาณโปรตีนสูง (ร้อยละ 45-50) อีกทั้งยังประกอบไปด้วยกรดอะมิโนอิสระ วิตามินบีรวม แร่ธาตุ และกรดไขมันซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสัตว์หลายชนิด

สารสีจากเซลล์ยีสต์ (Colorants derived from yeast) โดยเฉพาะกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ซึ่งมักนิยมนำมาผสมในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มคุณภาพให้สัตว์ เช่น การใช้ผสมในอาหารปลาเพื่อเพิ่มปริมาณเม็ดสีในปลา เป็นต้น

ผนังเซลล์ยีสต์ (Yeast cell wall) ซึ่งประกอบไปด้วยองค์ประกอบที่สำคัญหลายอย่าง ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการเจริญของสัตว์ โดยมักนิยมใช้เป็นสารพรีไบโอติค (prebiotic) เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคโดยใช้ในการลดพิษจากเชื้อรา และใช้เป็นสารเสริมภูมิคุ้มกัน (เบต้ากลูแคน)

2.6.1 ปัจจัยที่จำเป็นต่อการทำงานของยีสต์ในกระบวนการหมักเอทานอล

เพื่อให้มีประสิทธิภาพการหมักสูงสุด และได้ปริมาณเอทานอลสูงนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการทำงานของยีสต์ในการหมักเอทานอล ได้แก่ อุณหภูมิ pH ความเข้มข้นน้ำตาล คาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจน ความเข้มข้นเอทานอล และสารอาหารต่างๆ เป็นต้น (พรเทพ และคณะ, 2541)

2.6.1.1 แหล่งคาร์บอน ภายในเซลล์ยีสต์มีคาร์บอนประมาณ 50 %ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ยีสต์เป็นคีโมออร์กาโนโทรฟ (chemoorganotroph) ซึ่งต้องใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนใหญ่สารอินทรีย์ที่ใช้คือน้ำตาล ในสภาพการหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจะช่วยลดการปนเปื้อนเชื้ออื่นได้ดี แต่ น้ำตาลสูงจะยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอล และคุณสมบัตินี้เป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ของยีสต์ เมื่อเทียบกันกับกรณีความเข้มข้นเอทานอลจะมีผลยับยั้งการหมักรุนแรงกว่า แต่หากมีสภาวะทั้งน้ำตาลเข้มข้นและเอทานอลสูงจะยิ่งเสริมกันให้มีลักษณะยับยั้งการหมักรุนแรงขึ้น ในกรณีสารละลายของน้ำตาลสูงเกินไป จะทำให้ยีสต์เจริญเติบโตได้ยาก การหมักเป็นไปอย่างช้าและไม่สมบูรณ์ทำให้เกิดกรดแลคติก กรดน้ำส้ม และสารอินทรีย์ต่างๆเกิดขึ้นได้ โดยปกติกระบวนการหมักจะใช้ความเข้มข้นน้ำตาลไม่เกิน 18% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลาย เพื่อให้เกิดการเจริญเติบโตของยีสต์เป็นไปได้ปกติ และให้แอลกอฮอล์ในปริมาณสูงเหมาะแก่การนำไปกลั่น คือ ประมาณ 10% โดยปริมาตร ถ้าน้ำตาลเป็นแบบโมเลกุลเล็กๆ เช่น กลูโคส ฟรุคโตส อัตราการหมักจะเกิดได้เร็วกว่าพวกที่มีโมเลกุลใหญ่ๆ เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำตาลมอลโตส ทั้งนี้เพราะว่ายีสต์สามารถนำน้ำตาลโมเลกุลเล็กไปใช้ได้ทันที (รัฐพงศ์ ปกแก้ว, 2545)

2.6.1.2 ไนโตรเจน ยีสต์มีไนโตรเจนภายในเซลล์ประมาณ 10 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่มีปริมาณมากรองลงมาจากคาร์บอน สารหลายชนิดสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ เช่น แอมโมเนียม ไนโตรเจนในรูปของ

แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้มีโมเลกุลขนาดเล็กและใช้ได้ง่าย มักใช้ในอุตสาหกรรมการหมักโดยยีสต์ โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟตมักใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงยีสต์ เพราะนอกจากให้ไนโตรเจนแล้วยังให้ซัลเฟอร์ด้วย ยีสต์บางชนิดใช้ไนเตรต เช่น *Citeromyces* และบางสายพันธุ์ของ *Pichia* และ *Candida* ในขณะที่บางชนิดไม่ใช้ไนเตรต เช่น *Derbaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* และบางสายพันธุ์ของ *Pichia* และ *Candida* ยีสต์ที่ใช้ไนเตรตได้อาจใช้ไนไตรต์ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นที่เป็นพิษกับยีสต์ได้ นอกจากอนินทรีย์ไนโตรเจนแล้ว อินทรีย์ไนโตรเจนหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ พิวรีน และเอมีน (amine) ส่วนใหญ่สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของยีสต์ได้ (Cooper, 1982)

ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดี แต่เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นจำเป็นต้องมีการเติมไบโอตินลงในอาหารด้วย นอกจากนั้นการใช้ยูเรียของยีสต์ลดลงเมื่อมีแหล่งไนโตรเจนอื่นที่ยีสต์ใช้ได้ดีกว่าเนื่องจากการกดดันของไนโตรเจน (nitrogen suppression) ในอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม ถ้ามีแหล่งไนโตรเจนมากกว่า 1 ชนิดอย่างที่ปรากฏเสมอๆ ไนโตรเจนเหล่านั้นจะถูกใช้ในอัตราที่ต่างกัน ยีสต์จะเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดก่อนเป็นอันดับแรก ซึ่งเข้าใจว่าเกิดโดยการกดดันและการแบ่งส่วนของเมแทบอไลต์ (metabolite compartmentation) ดังนั้นการที่มีแหล่งไนโตรเจนที่ดี เช่น กลูทาเมต ในอาหาร เป็นผลให้มีการกำจัดแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ดี (เช่น โพรลีน) จากเซลล์ โดยมีผู้เสนอว่าการที่จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดี สารประกอบนั้น จะต้องนำเข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็ว เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ด้วยขั้นตอนที่น้อยที่สุด และต้องไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นพิษ (Berry, 1987)

2.6.1.3 อุณหภูมิ มีผลโดยตรงต่อการทำงานของยีสต์ แต่มีผลทางอ้อมต่อปริมาณแอลกอฮอล์ และAromatic compounds ต่าง ๆ ซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงมาก ๆ จะทำให้เอนไซม์ในยีสต์เกิดการเสียสภาพอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์จะลดลงในระหว่างที่อุณหภูมิอยู่ในช่วง 55 – 58 ◌ำC และอาจทำให้ยีสต์ตายได้ ในการหมักยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารเจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลางในช่วง 25 – 35 °C และอุณหภูมิต่ำสุดที่จะทนได้คือ 5 – 10 °C (Halasz, 1991)

2.6.1.4 ค่าพีเอช ค่าความเป็นกรด – ด่าง ของน้ำหมักมีผลต่ออัตราการหมัก การสร้างผลผลิตได้ ตลอดจนการควบคุมเชื้อปนเปื้อนซึ่งล้วนแล้วแต่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์ชอบเจริญในสภาพความเป็นกรด - ด่าง ในระดับ 3.5 - 5.5 ถ้าต่ำกว่า 3.5 ยีสต์จะมีอัตราการเจริญลดลง ถ้าต่ำกว่า 3.0 เชื้อยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ แต่ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถเจริญได้ดีในสภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลที่ค่าพีเอช อยู่ในช่วง 2.4 - 8.6 โดยมีค่าที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5 ซึ่งในสภาพเป็นกรดอ่อนนี้สามารถช่วยควบคุมการปนเปื้อน

แบคทีเรียได้ดี การหมักเอทานอลจากซูโคสมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชมากกว่าการใช้กลูโคส (ชรินทร์ นันทนาคร, 2546)

2.6.1.5 ความเข้มข้นของเอทานอล ในสภาพที่มีเอทานอลสูง การเจริญของยีสต์และการหมักยีสต์ จะถูกยับยั้ง เพราะเอทานอลมีผลต่อเอนไซม์ และสรีระวิทยาของเซลล์ เมื่อเปอร์เซ็นต์เอทานอลมากกว่า 1 โดยน้ำหนัก มีผลทำให้การเจริญลดลง และจะหยุดลงเมื่อมีเอทานอล 4.7 – 7.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยต่อจากนั้นจะเป็นการหมักเอทานอล จนถึงเอทานอลความเข้มข้น 14 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก การที่ยีสต์ไม่ 27 เจริญทำให้อัตราการหมักลดลงด้วย แต่มียีสต์บางสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นเอทานอล ประมาณร้อยละ 18 โดยปริมาตร เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลักของการหมัก และเมื่อเอทานอลมีการสะสมในระหว่างการหมักมากขึ้นยีสต์จะเกิดความเครียดมากขึ้น เนื่องจากเอทานอลเป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ การเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลจะเริ่มจากการยับยั้งยีสต์จนกระทั่งฆ่ายีสต์

2.6.1.6 ออกซิเจนละลาย ออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้ายในลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน และทำหน้าที่เป็น growth factor ของยีสต์ โดยร่วมในการสังเคราะห์กรดโอลีอิก (oleic acid) เออร์กอสเตอรอล และกรดนิโคตินิก ซึ่งส่งเสริมการเจริญของยีสต์ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

2.6.1.7 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนที่ความดันบรรยากาศปกติ หากมีคาร์บอนไดออกไซด์สูงจะเกิดการยับยั้งการเจริญและการหมักอย่างรุนแรง ทำให้อัตราเร็วการหมักลดลง โดยทฤษฎีการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ จะพบปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 33.33% ซึ่งมีปริมาณรองลงมาจากเอทานอล และพบว่าการหมักระบบที่ใหญ่จะมีคาร์บอนไดออกไซด์มากแรงดันในระบบจะเพิ่มตามปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในการเพาะเลี้ยงจำเป็นจะต้องให้ระบบมีการระเหยก๊าซเพื่อป้องกันการระเบิด เนื่องจากแรงดันก๊าซเพิ่มขึ้นและยังต้องจัดระบบที่นำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไปใช้ในเกิดประโยชน์ต่อไป

2.6.1.8 เกลือแร่ ยีสต์ต้องการเกลือแร่ (mineral elements) เหมือนกับจุลินทรีย์อื่น เกลือแร่ที่ยีสต์ต้องการประกอบด้วยโพแทสเซียม แมกนีเซียม และธาตุที่ต้องการในปริมาณต่ำหลายชนิด สำหรับ โพแทสเซียมและแมกนีเซียมเป็นธาตุอาหาร macroelement ที่ยีสต์ต้องการที่ความเข้มข้นเป็นมิลลิโมลาร์เพื่อทำให้เกิดสภาวะที่มีประจุบวกภายในเซลล์ยีสต์

2.6.1.9 Growth factor เป็นสารอินทรีย์ซึ่งยีสต์ต้องการที่ความเข้มข้นต่ำมาก มีบทบาทในการเร่งหรือเป็นส่วนในโครงสร้าง สารที่เป็น growth factor สำหรับยีสต์คือ วิตามิน พิวรีน ไพริมิดีน นิวคลีโอไทด์ นิวคลีโอไซด์ (nucleoside) กรดอะมิโน กรดไขมัน และอื่นๆ เช่น พอลิเอมีน (polyamine) โคลีน และมีโซอินอซิทอล (meso-inositol) การที่ยีสต์ต้องการ growth factor

หมายความว่า ยีสต์นั้นไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง ในบางครั้งความต้องการอาจไม่ใช้ความต้องการที่แท้จริง แต่เมื่อเติม growth factor ลงไปยีสต์จะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้น สำหรับ growth factor แบบนี้เรียกว่า relative growth factor

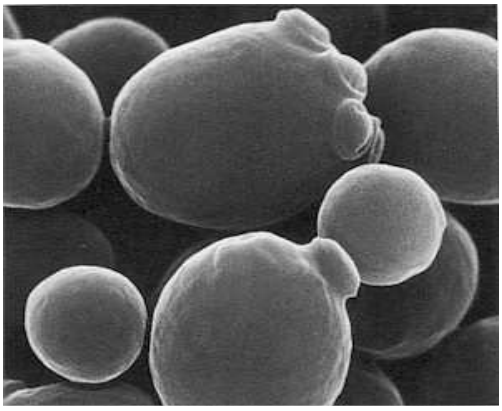
ยีสต์มักต้องการวิตามินที่ระดับความเข้มข้นไมโครโมล เช่น ไบโอตินซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยาที่เร่งโดยคาร์บอกซีเลส (carboxylase) กรดแพนโททีนิกซึ่งรูปที่ทำหน้าที่คือโคเอนไซม์เอ (coenzyme A) ที่ร่วมในปฏิกิริยารีดอกซ์ และไทเอมีน (thiamine) หรือวิตามินบี 1 ในรูปของ ไทเอมีนไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate) ซึ่งร่วมในปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชัน (decarboxylation) (Walker, 1998)

2.6.2 *Saccharomyces cerevisiae*

ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์พวก eukaryote ในกลุ่ม fungi ดำรงชีวิตในลักษณะเซลล์เดี่ยว (unicellular organism) สืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) หรือการแบ่งตัว (binary fission) และมีการสร้าง แอสโคสปอร์ในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Trivedi และคณะ, 1986)

อนุกรมวิธานของ ***Saccharomyces cerevisiae***

Phylum	:	Ascomycota
Order	:	Saccharomycetales
Family	:	Saccharomycetaceae
Subfamily	:	Saccharomycetoideae
Genus	:	Saccharomyces
Species	:	cerevisiae



รูปที่ 2.9 ลักษณะเซลล์ของยีสต์ในจีนัส *Saccharomyces* ที่เลี้ยงในกลูโคส

2.6.2.1 ลักษณะทางกายภาพและสรีรวิทยาของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae*

เซลล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* มีลักษณะกลมไปถึงรูปไข่ (round or ovule shape) อยู่ในลักษณะเซลล์เดี่ยว ขนาดทั่วไปของยีสต์ขนมปัง มีความกว้างประมาณ 2.5 – 10.5 ไมครอน ยาวประมาณ 4.5 – 2.1 ไมครอน ยาวประมาณ 4.5-2.1 ไมครอน ยีสต์ขนมปัง 1 เซลล์มีปริมาตรประมาณ 40 ลูกบาศก์ไมครอน และน้ำหนักแห้งของยีสต์ขนมปัง 1 เซลล์หนักประมาณ 10^{-11} กรัม (Reed และ Peppler, 1973)

เมื่อศึกษาลักษณะของยีสต์ *S. cerevisiae* ผ่านกล้องจุลทรรศน์จะพบส่วนประกอบของเซลล์แบ่งเป็นส่วนๆ ดังนี้คือ ผนังเซลล์ ไซโตพลาสซึมและนิวเคลียส ในไซโตพลาสซึมพบออร์กาเนลอื่นๆ เช่น ไมโตครอนเดรียและแวคิวโอ (Halasz และ Lasztity, 1991) แสดงดังรูป 2.9

ผนังเซลล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นสารชีวภาพพวกโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูแคน แมนแนนและไคติน (Walker, 1998) ผนังเซลล์มีลักษณะเป็นชั้นๆ (layer structure) ไคตินที่พบในผนังเซลล์มีในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น อาจพบในรูปของ killer toxin receptor และมีหน้าที่รักษาแรงดันออสโมติคของเซลล์ นอกจากนั้นพบไคตินมากบริเวณ bud scar ซึ่งเป็นรอยที่เกิดจากการแตกหน่อของเซลล์

เยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ขนมปังมีลักษณะเหมือนเยื่อชีวภาพทั่วไปคือมีลักษณะเป็น lipid bilayer ที่มี globular protein เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างทำให้มีลักษณะเป็น fluid mosaic นอกจากนั้นเมื่อศึกษาทางองค์ประกอบในเยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ขนมปังแต่ละสายพันธุ์พบว่ามีความแตกต่างกันในยีสต์แต่ละสายพันธุ์ เช่น จะพบ phosphodicholine ใน brewing yeast มากกว่าใน baking yeast (Walker, 1998) ซึ่งสามารถแตกหน่อได้รอบเซลล์

ในบางสภาวะที่มีการควบคุมการให้สารอาหารในการเพาะเลี้ยง พบว่ายีสต์มีการแตกหน่อแบบ synchronous budding คือ การที่เซลล์ทุกเซลล์ในการเพาะเลี้ยงมีอายุในการแตกหน่อพร้อมกัน การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์จะพบในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเจริญ เช่น ในสภาวะขาดแคลนอาหาร โดยที่ยีสต์ที่มีนิวเคลียสเป็นดิพพลอยจะเข้าคู่กันโดยการชักนำของ mating pheromone เรียกว่าการ conjugation ของเซลล์ที่มี mating type แตกต่างกันคือนิวเคลียสชนิด a และชนิด α เซลล์ที่เข้าคู่กันนี้จะมีสร้างแอสโคสปอร์ 4 แอสโคสปอร์ที่ได้ก็จะสามารถเจริญไปเป็นเซลล์ใหม่ได้ (Walker, 1998 ; Trivedi และคณะ, 1986)

2.6.2.2 ลักษณะทางชีวเคมีและคุณสมบัติของยีสต์ *S. cerevisiae*

S. cerevisiae เป็นยีสต์ที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ ซึ่งกระบวนการผลิตพลังงานและผลผลิตที่ได้ทั้งสองก็แตกต่างกัน ตัวแปรสำคัญในการที่ยีสต์จะใช้กระบวนการใด

ในการใช้สารอาหารในการผลิตพลังงานและได้ผลผลิตออกมานั้นขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจนและความเข้มข้นของน้ำตาลในสภาวะแวดล้อมที่ยีสต์เจริญอยู่ (Neway, 1989)

การใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการสร้างพลังงานของยีสต์ในสภาวะไม่มีอากาศ (anaerobic condition) โดยทั่วไปเรียกว่าการหมัก (fermentation) พลังงานในรูป ATP ได้มาจากการใช้สับสเตรทผ่านกระบวนการ Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP pathway)

การเพาะเลี้ยงยีสต์ในระบบกะธรรมดาพบว่าในช่วงแรกของการเจริญปริมาณเซลล์ (biomass) และแอลกอฮอล์จะเพิ่มขึ้นพร้อมๆกันแบบ exponential แต่เมื่อการเจริญมาจนถึงจัดที่มีการกำจัดของออกซิเจนและไนโตรเจนการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเซลล์จะหยุด ส่วนการผลิตแอลอฮอล์จะดำเนินต่อไปและเพิ่มแบบเส้นตรง (linear) (Neway, 1989) พบว่าในกระบวนการสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์นั้นจะมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับสารตัวกลาง intermediate ที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยา และ intermediate ที่เกิดจะเข้าไปใน tricarboxylic acid cycle และ glyoxylate cycle นอกจากนั้นพบว่าในระหว่างการเจริญของยีสต์ขนมปังในสภาวะไม่มีอากาศ การทำงานของไมโตครอนเดรียถูกกดเอาไว้ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยา aerobic respiration

ในกระบวนการหมักแบบไม่มีอากาศโดย *S. cerevisiae* มีการใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการ aerobic respiration มีการผลิตพลังงานในรูปของ ATP และผลผลิตที่ได้ คือปริมาณเซลล์ (biomass) ในขั้นตอนแรกเซลล์จะใช้กลูโคสผ่านกระบวน glycolysis หลังจากนั้น ไพรูเวตที่ได้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นอะซิติลโคเอ (acetyle CoA) และผ่านไปใน tricarboxylic acid cycle (TCA) ได้ NADH และ $FADH_2$ ซึ่งสารให้พลังงานทั้งสองชนิดนี้จะผ่านเข้าไปในลูกโซ่การถ่ายทอดอิเลคตรอนและได้พลังงานออกมามากมาย (Neway, 1989 ; Halasz และ Lasztity, 1991)

ในสภาวะที่มีอากาศ Louis Pasteur พบว่าออกซิเจนมีผลทำให้ไม่เกิดกระบวนการหมักทำให้การผลิตแอลกอฮอล์ลดลงเรียกสภาพเช่นนี้ว่า Pasteur effect (Walker, 1998) โดยในสภาวะที่มีออกซิเจนเอนไซม์ ในกระบวนการ aerobic respiration จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการ fermentation คือ pyruvate decarboxylase

ในกรณีที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงจะได้ผลผลิตปริมาณเซลล์ (biomass yield) ต่ำและมีแอลกอฮอล์เกิดขึ้นมากซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยา aerobic respiration ถูกกดการทำงาน แอลกอฮอล์ที่ได้มาจากกระบวนการ fermentation ถึงแม้จะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะนั้นมีออกซิเจนก็ตาม ซึ่งเกิดจากการที่กลูโคสที่เข้มข้นมากเกินไปในอาหารจะมีผลลดการสังเคราะห์เอนไซม์ในการ respiration และการขนส่งน้ำตาลเข้าเซลล์ เรียกการที่ความเข้มข้นของน้ำตาลที่มากไปกดการทำงานของ aerobic respiration นี้ว่า crabtree effect หรือ catabolite repression หรือ glucose repession (Neway, 1989)

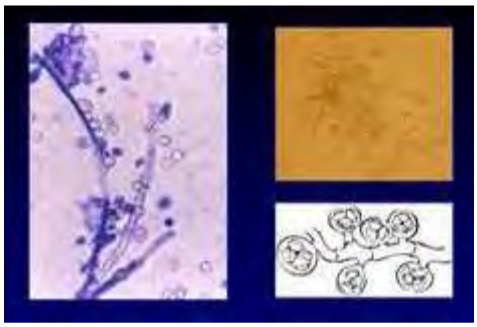
2.6.3 *Saccharomycopsis fibuligera*

Saccharomycopsis fibuligera เป็นหนึ่งในสปีชีเทเลโอมอร์ฟิกแอสโคไมซีติส (teleomorphic ascomycetes) ซึ่งเป็นชนิดที่สร้างสปอร์ และเป็นสายพันธุ์ดีที่สุดสายพันธ์หนึ่งที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ บางสายพันธุ์สามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ใช้ย่อยแป้ง (starch saccharification) ในกระบวนการหมักอาหาร และผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่เป็นแป้ง หรือใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Eva, 2000)

อนุกรมวิธานของ *Saccharomycopsis fibuligera*

Phylum	:	Ascomycota
Class	:	Hemiascomycetes
Order	:	Saccharomycetales
Family	:	Saccharomycopsidaceae
Genus	:	Saccharomycopsis
Species	:	Fibuligera

(Barnett และคณะ, 2000)



รูปที่ 2.10 รูปร่างลักษณะของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*

2.6.3.1 ลักษณะทางกายภาพและสรีรวิทยาของยีสต์สายพันธุ์ *S. fibuligera*

ยีสต์ *S. fibuligera* พบในขนมปัง มักกะโรนี ราจิ (ragi) ฟางข้าว หรือ หญ้าแห้ง ลักษณะของเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* และโคโลนี แสดงดังรูปที่ 2.10 มีลักษณะเป็นแผ่นสีขาวครีม มีการสืบพันธุ์แบบแตกหน่อ (budding) การสร้างเส้นใยที่มีผนังกั้น (septate hyphae) หรือสร้างแอสคัย (asci) ประกอบด้วย 4 แอสโคสปอร์(ascospores) ที่มีรูปร่างคล้ายหมวก เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารมอลต์ ร้อยละ 5 (Difco malt agar) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Barnett และคณะ, 2000)

เชื้อยีสต์ในตระกูลนี้มีคุณสมบัติสำคัญคือสร้างทัลลัส (thallus) ที่เป็นแบบเซลล์เดี่ยว (unicellular) แต่บางครั้งก็พบว่ามีการสร้างซูโดมัยซีเลียม (pseudomycelium) ได้ด้วย ซึ่งก็คือเซลล์ของยีสต์ที่มีลักษณะยาวต่อเรียงกันเป็นแถว เกิดจากการแตกหน่อของเซลล์นั้นเอง ทำให้ดูคล้ายกับว่าเป็นเส้นใย โดยปกติแล้วหลังการแตกหน่อเซลล์ที่เกิดใหม่ มักแยกหลุดออกจากเซลล์ที่ให้กำเนิด แต่ในบางครั้งก็พบว่าเซลล์ที่แตกออกมายังคงติดอยู่ไม่แยกออกจากกัน และแตกหน่อต่อๆไปอีก จึงทำให้ได้ลักษณะที่เป็น ซูโดมัยซีเลียม ข้อแตกต่างระหว่าง ซูโด-มัยซีเลียม และ ไมซีเลียม ที่แท้จริงคือ เซลล์ปลายสุดของซูโดมัยซีเลียม เป็นเซลล์ที่สั้นกว่าเซลล์อื่น ในขณะที่เซลล์ปลายสุดของไมซีเลียม ที่แท้จริงนั้นจะยาวกว่าเซลล์อื่นๆ

2.6.3.2 ลักษณะทางชีวเคมีและคุณสมบัติของยีสต์ *S. fibuligera*

ในปี ค.ศ. 1944 Wickerham ทำการทดสอบให้เห็นว่า *S. fibuligera* สามารถผลิตเอนไซม์อะมิเลสได้ โดยการนำไปเลี้ยงในอาหารวุ้นที่มีแป้งร้อยละ 1 และทดสอบเคลียร์โซน (clear zone) โดยทดสอบกับสารละลายไอโอดีน

สำหรับช่วงการสร้างเอนไซม์อะมิเลสของ *S. fibuligera* จะเริ่มสร้างเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะตอนปลายของช่วงการเจริญ (log phase) แต่ยังสร้างในปริมาณที่น้อยมาก การสร้างเอนไซม์จะเกิดสูงสุดเมื่อเซลล์อยู่ในระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) (Gogoi และคณะ, 1987)

มีรายงานว่า มียีสต์หลายชนิดสามารถปลดปล่อยเอนไซม์ α -amylase ที่มีแอคติวิตีสูงในการย่อยแป้ง ออกมาภายนอกเซลล์รวมทั้งยีสต์ *S. fibuligera* ปลดปล่อยเอนไซม์ α -amylase ย่อยแป้งโดยตัดตรงพันธะ 1,4-α-glycosidic bondsได้เป็นเด็กทริน โอลิโกแซกคาไรด์ มอลโทส และน้ำตาลกลูโคส โดยในกระบวนการย่อยแป้งนั้น เอนไซม์ α -amylase จะถูกเติมเข้าไปในขั้นตอนการทำแป้งให้เหลว (liquefaction) (Knox และคณะ, 2004)

นอกจากเอนไซม์ α -amylase แล้ว *S. fibuligera* ยังปลดปล่อยเอนไซม์ glucoamylase ออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งมีแอคติวิตีสูงในการย่อยโมเลกุลแป้งตรงส่วนปลายบริเวณนอนรีดิวซ์ (non-reducing ends) ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสออกมา (Chi และคณะ, 1993)

S. fibuligera มียีน BGL1 และ BGL2 ในการผลิต เอนไซม์ เบต้า กลูโคซิเดส ซึ่งเป็นยีนที่แยกได้จากการทำห้องสมุดจีโนม (genomic library) ของ *S. fibuligera* (Machida และคณะ, 1988) โดยเบต้ากลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ มีคุณสมบัติในการย่อยแซกคาไรด์ประเภทเซลโล-ไบโอส และเซลโลโอลิโกแซกคาไรด์ ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส มีความสำคัญที่สุดในขั้นตอนการย่อยเซลลูโลสเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสโดยเอนไซม์ เอ็นโดกลูคาเนส และเอ็กโซกลูคาเนส ซึ่งก็คือเซลโลไบโอส จะเกิดการยับยั้งแบบย้อนกลับของตัวผลิตภัณฑ์ การมีอยู่ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจึงช่วยเปลี่ยนเซลโล

ไบโอส ให้เป็นกลูโคสประสิทธิภาพในการย่อยของเซลลูเลสจึงดีกว่า (Zhenming Chi และคณะ, 2009)

2.7 กระบวนการผลิตเอทานอลโดยการย่อยสลายแป้งร่วมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation process; SSF)

กระบวนการย่อยสลายแป้งร่วมกับกระบวนการหมัก คือ กระบวนการย่อยสลายพอลิเมอร์ทางธรรมชาติ เช่น เซลลูโลส แป้ง ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสโดยใช้เอนไซม์ และในขณะเดียวกันก็เกิดกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นให้เป็นเอทานอลโดยใช้เชื้อยีสต์ หรือแบคทีเรียร่วมด้วย ซึ่งกระบวนการดังกล่าวทั้งคู่จะเกิดภายใต้สภาวะ หรือถังหมักเดียวกัน (Venkatesh, 1997)

กระบวนการย่อยสลายแป้งร่วมกับกระบวนการหมักดังกล่าวจะมีข้อได้เปรียบกว่ากระบวนการหมักที่แยกกันกับกระบวนการย่อย (Separate hydrolysis and fermentation; SHF) ซึ่งกระบวนการหมักและกระบวนการย่อยสลายแป้งที่เกิดขึ้นพร้อมกันภายในถังหมักเดียวกันจะทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ ส่วนข้อดีและข้อได้เปรียบอื่นๆ คือ ทำให้ประสิทธิภาพของการหมักเกิดขึ้นได้สูง อันเป็นผลสืบเนื่องมาจากการที่สารผลิตภัณฑ์จะถูกใช้ไป หรือลดปริมาณลง ซึ่งจะเป็นการลดโอกาสที่เกิดการยับยั้งของกระบวนการย่อยสลายโดยสารผลิตภัณฑ์ เช่น การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสอาจถูกยับยั้งการทำงานโดยน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลเซลลูไบโอสซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลาย แต่สำหรับสารผลิตภัณฑ์(กลูโคส)ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักร่วมกับกระบวนการย่อยสลายจะถูกเปลี่ยนให้เป็นเอทานอลโดยยีสต์อย่างรวดเร็วจึงไม่ทำให้เกิดการสะสมของสารผลิตภัณฑ์(กลูโคส)ขึ้น

สำหรับข้อได้เปรียบอื่น คือ กระบวนการหมักร่วมกับการย่อยสลาย นอกจากนี้ยังสามารถลดต้นทุนการผลิตได้เนื่องจากสามารถที่จะลดจำนวนของถังหมักที่จะใช้ในการย่อยสลายและการหมักลงให้เหลือเฉพาะที่จำเป็นเท่านั้น และสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตของเอทานอลได้

อย่างไรก็ตามกระบวนการย่อยสลายแป้งร่วมกับกระบวนการหมักยังมีข้อเสีย คือ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลาย และจุลินทรีย์ที่ใช้หมักจะมีขอบเขตแตกต่างกัน นอกจากนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการย่อยสลาย และกระบวนการหมักจะมีความแตกต่างกัน ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ เช่น *S.cerevisiae*, *Z. mobilis* และ *E. coli* ที่นำมาใช้ในการหมักเอทานอลจะเจริญได้ดีที่สภาวะอุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส คือ ประมาณ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิสำหรับการย่อยสลายโดยเอนไซม์จะสูงถึงประมาณ 50 องศาเซลเซียส โดยจะเกิดผลในแง่ลบต่อประสิทธิภาพการผลิตซึ่งพบว่าถ้าใช้

อุณหภูมิในการหมัก 40 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดอัตราการผลิตเอทานอลจะสูงขึ้นแต่การเจริญของเซลล์ยีสต์กลับลดลงส่งผลให้ปริมาณผลผลิตเอทานอลอยู่ในระดับต่ำ

สำหรับข้อเสียอีกประการหนึ่งที่สำคัญ คือ ปัญหาในการแยกเซลล์ยีสต์ออกจากพวก solid residue ภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการโดยจะเป็นปัญหาต่อกระบวนการเก็บเกี่ยว และการนำเซลล์ยีสต์กลับมาใช้ใหม่ในอุตสาหกรรม จากความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิที่เหมาะสมของกระบวนการย่อยสลาย และกระบวนการหมักนี้จึงมีความจำเป็นที่จะต้องปรับให้มีความเหมาะสมเพื่อใช้ในกระบวนการหมักร่วมกับวัตถุดิบตั้งต้นต่อไป

Mamma และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างหวานโดยโดยวิธีการย่อยเป็นน้ำตาลและการหมักพร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation process; SSF) โดยการใช้กล้าเชื้อผสมระหว่าง *Fusarium oxysporum* และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้เชื้อ *Fusarium oxysporum* เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่จำเป็นในการย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาล ส่วน *Saccharomyces cerevisiae* ใช้น้ำตาลในกระบวนการหมักเอทานอลซึ่งเป็นการทำงานร่วมกัน ได้ผลผลิต 5.2-8.4 กรัมเอทานอล ต่อ 100 กรัมข้าวฟ่างสด

Suresh และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกข้าวฟ่างหวานและเปลือกข้าวโดยใช้วิธีการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (simultaneous saccharification and fermentation ; SSF) โดยใช้กล้าเชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus niger* (NCIM 1248) และ *Saccharomyces cerevisiae* VSJ1 เชื้อ *A. niger* มีคุณสมบัติในการผลิต amylolytic enzyme ซึ่งทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลและยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลทั้งนี้พบว่าเปลือกข้าวฟ่างหวาน (ร้อยละ 2.90 โดยปริมาตร)ให้ผลผลิตที่มากกว่าเปลือกข้าว (ร้อยละ 2.09 โดยปริมาตร) ภายใต้สภาวะการหมักที่เหมาะสม

Montesinos และคณะ (2000) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้งข้าวสาลี (raw wheat flour) โดยใช้วิธีการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (simultaneous saccharification and fermentation ; SSF) โดยใช้เอนไซม์ amyloglucosidase และเชื้อยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ในกระบวนการหมักแบบปกตินั้นเมื่อผ่านการย่อยแป้งขั้นแรก (Liquefaction) จะได้น้ำตาลมอลโตสจากนั้นนำไปผ่านกระบวนการย่อยครั้งสุดท้ายในเวลาการย่อย 6 ชั่วโมง (Presaccharification) ด้วยเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (AMG300L) ที่ความเข้มข้น 270 AGU ต่อกิโลกรัมแป้ง จากนั้นใช้เวลาในการหมักทั้งหมด 60 ชั่วโมง แต่เมื่อใช้กระบวนการหมักแบบ SSF นั้นจะใช้เวลาในการหมักเพียง 31 ชั่วโมง โดยในกระบวนการนี้จะใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า คือ 540

Ramasamy และ Paramasamy (2001) ได้ทำการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยการใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิดนำมาตรึงเซลล์รวมกัน (co-immobilized cells)ระหว่าง *Saccharomyces diastaticus* และ *Zymomonas mobilis* จากนั้นนำไปหมักแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยครั้งแรก (Liquefied starch) ในการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (batch fermenation) โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักระหว่างเซลล์ที่ถูกตรึงชนิดเดียวเซลล์ที่ถูกตรึงแบบผสม 2 ชนิด ซึ่งพบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงแบบผสม 2 ชนิดมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลสูงกว่าการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงแบบเซลล์ชนิดเดียวคือ 46.7 กรัมต่อลิตร และ 37.5กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และยังพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลจากการผลิตด้วยเซลล์ที่ถูกตรึง(immobilized cells) มีค่าสูงกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการตรึง (free cells) ของเชื้อทั้ง *S. diastaticus* และ*Z. mobilis* ซึ่งพบว่าเซลล์ที่ผ่านการตรึงสามารถที่จะผลิตเอทานอลได้ถึง 53.5 กรัมต่อลิตร และพบว่าสามารถที่จะหมุนเวียนเซลล์เพื่อที่จะนำกลับมาใช้ใหม่ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง(continuous fermentation) ได้ถึง 7 รอบ

Shigechi และคณะ (2002) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากการใช้วิธีการสร้างรีคอมบิแนนท์ยีสต์ (recombinant yeast strain) เพื่อให้ยีสต์มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ (SSF process) โดยใช้พลาสมิดที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์แอลฟาอะมิเลสและกลูโคอะมิเลสต่อเข้าไปในยีสต์ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ใช้กระบวนการแบบ fed-batch fermentation ทำให้สามารถลดขั้นตอนของกระบวนการหมักได้และสามารถผลิตเอทานอลได้ถึง 60 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นในการงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisia* ซึ่งจะเป็นประโยชน์ โดยใช้พืชทางเลือกมาใหม่ที่มีการนำไปใช้ค่อนข้างจำกัดและราคาถูก เพื่อการผลิตเอทานอล และโปรตีนเซลล์เดี่ยว ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการลดการพึ่งพาจากต่างประเทศ และเพิ่มคุณค่าทางอาหารของกากเมล็ดข้าวฟ่างจากโปรตีนเซลล์เดี่ยวที่ได้จากกระบวนการหมัก ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Electronic balance) รุ่น AR 2140 ของบริษัท Ohaus Corporation ประเทศอเมริกา

2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Electronic balance) รุ่น AR 2140 ของบริษัท Ohaus Corporation ประเทศอเมริกา

3. เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie 560E ของบริษัท Scientific Industries, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota Corporation ประเทศญี่ปุ่น

5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge) รุ่น TOMY MC-15A ของบริษัท TOMY SEIKO ประเทศญี่ปุ่น

6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น MV Spectronic 21 ของบริษัท BAUSCH&LOMB ประเทศญี่ปุ่น

7. ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ของบริษัท Sanyo ประเทศญี่ปุ่น

8. เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (Rotary incubator shaker) รุ่น G-25 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

9. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น HV-50 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น

10. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) ของบริษัท International Scientific Supply ประเทศไทย

11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น TE-8D ยี่ห้อ Tempette ของบริษัท Techne ประเทศอังกฤษ

12. เครื่อง Ultrasonic disruption รุ่น UD-201 ของบริษัท Tomy Seiko Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

13. เตาอบไมโครเวฟ (Microwave oven) รุ่น NE-767C ของบริษัท Matsushita Electric Industrial ประเทศญี่ปุ่น

14. ปั๊ม (Pump) รุ่น MPN125 ของบริษัท Thakita Electric Works., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

15. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน รุ่น Buchi 345 Distillation unit และ รุ่น Buchi 345 Digestor ของบริษัท Buchi Labortory Techniques Ltd., ประเทศสวิตเซอร์แลน

16. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น CHS ของบริษัท Olympus Optical ประเทศญี่ปุ่น

17. เครื่อง gas chromatography (Model 163, Hitachi, Ltd. Tokyo Japan)

18. เครื่อง HPLC (High performance Liquid Chromatography) ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น ที่ประกอบด้วย HPLC column: Aminex HPX-42A ของบริษัท Bio-Rad Laboratories.Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา

19. เครื่องกรอง PTFE Micro filter ขนาดรูพรุน 0.45 µm ของบริษัท Sartorius ประเทศเยอรมัน

20. เครื่องกวนควบคุมอุณหภูมิ (hot plate stirrer) รุ่น PC-101 บริษัท Corning ประเทศ ประเทศสหรัฐอเมริกา

21. เครื่องระเหยแห้ง (Rotary evaporator) รุ่น N-1000 ของบริษัท EYELA ประเทศญี่ปุ่น

22. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (High Speed Micro Refrigerated Centrifuge รุ่น MTX-150 บริษัท Tomy ประเทศญี่ปุ่น

3.2 เคมีภัณฑ์	**บริษัท**	**ประเทศ**
Acetronitrile, HPLC grade	Merck	Germany
Agar (วุ้นผงตรานางเงือก)	พัฒนสินเอนเตอร์ไพรส์	ไทย
Albumin from bovine serum (BSA)	Sigma	Germany
Ammonium chloride (NH_4Cl)	Fluka	Switzerland
Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)	Carlo Erba	Italy
Boric acid (H_3BO_3)	Merck	Germany
Calcium chloride dehydrate ($CaCl_2.2H_2O$)	Fluka	Switzerland
Citric acid ($C_6H_8O_7$)	Merck	Germany
Copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$)	Fluka	Switzerland
Dinitrosalicylic acid	Sigma	U.S.A
Ethanol	กรมสรรพสามิต	ไทย
Ethanol absolute 99.5%	Merck	Germany

เคมีภัณฑ์	บริษัท	ประเทศ
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	Fluka	Switzerland
Glucose (Dextrose)	สยามชัย เคมิคอล	ไทย
Hydrochloric acid (HCl)	Merck	Germany
Magnesium sulfate heptahydrate	Fluka	Switzerland
Malt extract	Difco	U.S.A
Milli Q water	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
Methanol, HPLC grade	Merck	Germany
Peptone	Difco	U.S.A
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck	Germany
Potassium sodium tartrate	Carlo Erba	Italy
Propanol (C_3H_8O)	Merck	Germany
Sodium chloride (NaCl)	Merck	Germany
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck	Germany
Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck	Germany
Termamyl 120L	Novozymes	Denmark
Urea $(NH_2)_2CO$	Merck	Germany
Yeast extract	Difco	U.S.A
3,5 –Dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$)	Sigma	U.S.A

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1. วิเคราะห์องค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่าง

เมล็ดข้าวฟ่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบตามวิธีดังนี้

3.3.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธี Association of Official Analytical Chemist (A. O. A. C.). 1990.

3.3.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (kjeldahl method) ตามวิธีของ AOAC, 1990

3.3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (ether extraction) ตามวิธีของ AOAC, 1990

3.3.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย ตามวิธีของ (AOAC, 1990)

3.3.1.5 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าตามวิธีของ American Association of Cereal Chemist (A. A. C. C.). 1995.

3.3.1.6 วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต คำนวณจากผลต่าง คือ เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรต = 100 - เปอร์เซ็นต์โปรตีน - เปอร์เซ็นต์ไขมัน - เปอร์เซ็นต์เส้นใย - เปอร์เซ็นต์เถ้า – เปอร์เซ็นต์ความชื้น

3.3.2 หาภาวะที่เหมาะของการปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างด้วยวิธีทางกายภาพ

ปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างด้วยวิธี Physiochemical pretreatment โดยแปรขนาดของเมล็ดข้าวฟ่างเป็น 2 แบบคือ เมล็ดข้าวฟ่างไม่ผ่านการบด และเมล็ดข้าวฟ่างบด โดยใช้เครื่องปั่น moulinex รุ่น AW9 จากนั้นนำมาผ่านเครื่องร่อน ขนาด 400 ไมครอน นำเมล็ดข้าวฟ่างที่ได้ทั้ง 2 แบบ มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร โดยทำการศึกษาตัวแปรต่างๆดังนี้

3.3.2.1 ความเข้มข้นของเมล็ดข้าวฟ่าง 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.3.2.2 ระยะเวลาในการแช่สารละลายเมล็ดข้าวฟ่างที่ 0 และ 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปปรับสภาพด้วยความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส

3.3.2.3 ระยะเวลา 10, 20 และ 30 นาที ปรับสภาพด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส

นำตัวอย่างที่ได้หลังจากการปรับสภาพแล้วนำมากรองแยกส่วนใสและส่วนที่เป็นของแข็งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง และนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริค

3.3.3. การเตรียมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.3.1. การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองคือ ยีสต์ 2 สายพันธุ์ได้แก่ เชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ คือ อาหารแข็ง YPD AGAR ประกอบด้วย Yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์, เปปโตน 1 เปอร์เซ็นต์, กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์, วุ้นผง 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH 5.5 นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมงและเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อทำโดยถ่ายเชื้อยีสต์จากอาหารแข็งในข้อ 3.3.3.1 ลงใน

อาหารเหลว YPD มีสูตรอาหารเหมือนกับสูตรอาหารแข็ง แต่ไม่มีส่วนประกอบของวุ้นผง ทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในอาหารแข็งเหลวและนำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไป

3.3.3.3 สูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวนำเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้วจากข้อ 3.3.2 เติมสารอาหารซึ่งประกอบไปด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.5 เปอร์เซ็นต์, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.1 เปอร์เซ็นต์, แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.1 เปอร์เซ็นต์, แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.01 เปอร์เซ็นต์, และ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.01 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเติมกล้าเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae* ที่เตรียมได้ในข้อ 3.3.3.2 โดยใช้ปริมาตรเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และทำการหมักบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที ระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เพื่อศึกษาผลผลิตที่ได้จากการหมัก ทำการแยกส่วนของแข็งและของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง นำส่วนที่เป็นของแข็งนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ส่วนเหลวนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล

3.3.4 หาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้วโดยใช้เชื้อโดยตรงระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*

โดยศึกษาปัจจัยดังต่อไปนี้

3.3.4.1 ใช้เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมโดยเชื้อเดี่ยวในกระบวนการหมัก คือ เชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* หรือเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* และใช้เชื้อผสมหมักร่วมกันระหว่างเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* และเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.4.2 อัตราส่วนของกล้าเชื้อโดยแปรผันอัตราส่วนของกล้าเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* และเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 2:1

3.3.4.3 ช่วงระยะเวลาในการลงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* โดยแปรผันช่วงระยะเวลาในการลงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ระยะเวลา 0, 6, 12 ชั่วโมง

3.3.4.4 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยแปรผันความเข้มข้นของเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้วที่ 5, 10,15 และ 20 เปอร์เซ็นต์

3.3.4.5 แหล่งไนโตรเจนโดยแปรผันแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ คือ แอมโมเนียมคลอ

ไรด์, แอมโมเนียมซัลเฟต, ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และยูเรีย

3.3.4.6 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนโดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.5 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์

3.3.5 หาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคจากเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera*

ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรอาหาร(สูตรอาหารที่1 – 4 ในภาคผนวก ก) เพื่อผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อศึกษาผลผลิตที่ได้จากการหมัก โดยทำการแยกส่วนของแข็งและของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง และนำไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ภาคผนวก ข)

จากสูตรอาหารที่เหมาะสมข้างต้นนำมาศึกษาปัจจัยต่างๆดังนี้

3.3.5.1 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยแปรผันความเข้มข้นของแป้งที่ละลาย 1, 3, 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร

3.3.5.2 แหล่งไนโตรเจนโดยแปรผันแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย เปปโตน และ Yeast extract

3.3.5.3 ความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนโดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5.2 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์

3.3.5.4 การเก็บรักษาเอนไซม์อะมิโลไลติคโดยเลี้ยงเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.5.3 จากนั้นนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) โดยนำสารละลายเอนไซม์ปริมาณ 30 มิลลิลิตร บรรจุลงในขวดแก้วก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ทำเยือกแข็งที่อุณหภูมิ – 50 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30 นาที นำตัวอย่างที่ได้ไปทำการระเหิดภายใต้สภาวะสุญญากาศ นานประมาณ 8 ชั่วโมง จะได้เอนไซม์อยู่ในรูปผงแห้งเพื่อ ไว้ใช้ในการวิจัยต่อไป

3.3.6 ศึกษาการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* เปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้าหมักร่วมกับเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

โดยนำเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้วจากข้อ 3.3.2 นำมาเติมเอนไซม์อะมิโลไลติคที่มีความเข้มข้น 0.516 หน่วยต่อกรัมสับเสรท ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นมาเติมเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในข้อ 3.3.3.2 นำมาหมักเพื่อผลิตผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยว เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อศึกษาผลผลิตที่ได้จากการหมัก ทำการแยกส่วนของแข็งและของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง นำส่วนที่เป็นของแข็งนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ส่วนเหลวนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล

3.4 วิธีวิเคราะห์ต่าง ๆ

3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริค (ภาคผนวก ข ข้อ1)

โดยใช้วิธีฟีนอล-ซัลฟูริค (Dobois, 1956)

3.4.2 การวัดปริมาณน้ำตาล (ภาคผนวก ข ข้อ2)

โดยใช้วิธี DNSA (Miller, 1959)

3.4.3 การวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)

นำตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตทฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่องเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) เพื่อหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส

คอลัมน์	: Biorad Aminex HPX-42A column ขนาด 300 มิลลิเมตร x 7.8 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	: DDI water
อุณหภูมิ	: 85 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	: 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	: RI detector (Shimadzu รุ่น RID-6A)
เวลาที่อยู่ในคอลัมน์	: 25 นาที

คำนวณเทียบกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร

3.4.4 **การวิเคราะห์เอทานอล (ภาคผนวก ข ข้อ 9)**

นำตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตทฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำการผสมกับ propanol มาตรฐานที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

คอลัมน์	: *Porapak Q* capillary column
ก๊าซตัวพา	: ไนโตรเจน, ไฮเดรเจน และออกซิเจน
อุณหภูมิคอลัมน์	: 190 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิฉีด	: 210 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	: 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	: flame ionization detector (FID)
เวลาที่อยู่ในคอลัมน์	: 10 นาที

คำนวณเทียบกราฟมาตรฐานของเอทานอลที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร

3.4.5 **การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ข ข้อ 3)**

โดยวิเคราะห์ตามวิธีเจลดาห์ (Kjeldahl protein, A.O.A.C., 1975)

3.4.6 **การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์อะมิโลไลติค (ภาคผนวก ข ข้อ 10)**

นำ reaction mixture ที่ประกอบด้วยสับเสรทและเอนไซม์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ spectroohotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วผลของอัตราการเกิดปฏิกิริยาไปคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

3.4.7 **วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ทางสถิติ**

วางแผนการทดลองแบบ RBD (Randomized Block Design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Tukey และ Duncan แบบ multiple comparision ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 องค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่าง

เมล็ดข้าวฟ่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จากการศึกษาองค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่าง พบว่ามีคาร์โบไฮเดรตอยู่สูงถึงประมาณ ร้อยละ 80 โดยน้ำหนักแห้ง และมีองค์ประกอบอื่นๆ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้า เส้นใย และความชื้นดังตารางที่ 4.1 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแป้งที่มีอยู่ในเมล็ดข้าวฟ่างในงานวิจัยนี้มีองค์ประกอบใกล้เคียงกับเมล็ดข้าวฟ่างแหล่งอื่นๆ ซึ่งองค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่างนี้จะมีความแปรผันขึ้นอยู่กับสภาพดินที่ใช้เพาะปลูกและอากาศ (Joseph และ Jerrold, 1978) ลักษณะภายนอกของเมล็ดข้าวฟ่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้จะมีสิ่งเจือปนของดิน และเปลือกที่ห่อหุ้มเมล็ด จะเกาะติดกับเมล็ดข้าวฟ่างบางเมล็ด จึงต้องทำการล้างเพื่อให้สิ่งเจือปนออกจากเมล็ดข้าวฟ่าง และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำไปใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในกระบวนการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวต่อไป

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่างที่ใช้ในงานวิจัย

องค์ประกอบเมล็ดข้าวฟ่าง	ค่าปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)
คาร์โบไฮเดรต	80.70±0.10
โปรตีน	7.23±0.07
ไขมัน	3.36±0.06
เถ้า	1.27±0.03
เส้นใย	1.69±0

หมายเหตุ *ความชื้นร้อยละ 5.75±0.11

4.2 ภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างด้วยวิธีทางกายภาพ

ทำการศึกษาหาวิธีการปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างทางกายภาพให้เหมาะสมก่อนการนำไปใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในกระบวนการหมักได้แก่ 1. ความเข้มข้นของเมล็ดข้าวฟ่างที่ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร 2. ขนาดของเมล็ดข้าวฟ่างโดยเมล็ดข้าวฟ่างไม่บดและเมล็ดข้าวฟ่างบดผ่านตะแกรงขนาด 400 ไมครอน 3.ความนุ่มของเปลือกเมล็ด โดยนำไปแช่น้ำ(Soaked) ระยะเวลา 0 และ 2 ชั่วโมง 4. ระยะเวลาในการปรับสภาพด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศสาเซลเซียส โดยแปรผันระยะเวลาที่ 10, 20 และ 30 นาที เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ที่มากเพียงพอต่อความต้องการของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตผลิตภัณฑ์

รูปที่ 4.1 เมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการทำความสะอาด

รูปที่ 4.2 เมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการทำความสะอาด อบแห้ง และบดผ่านตะแกรงร่อน 400 ไมครอน

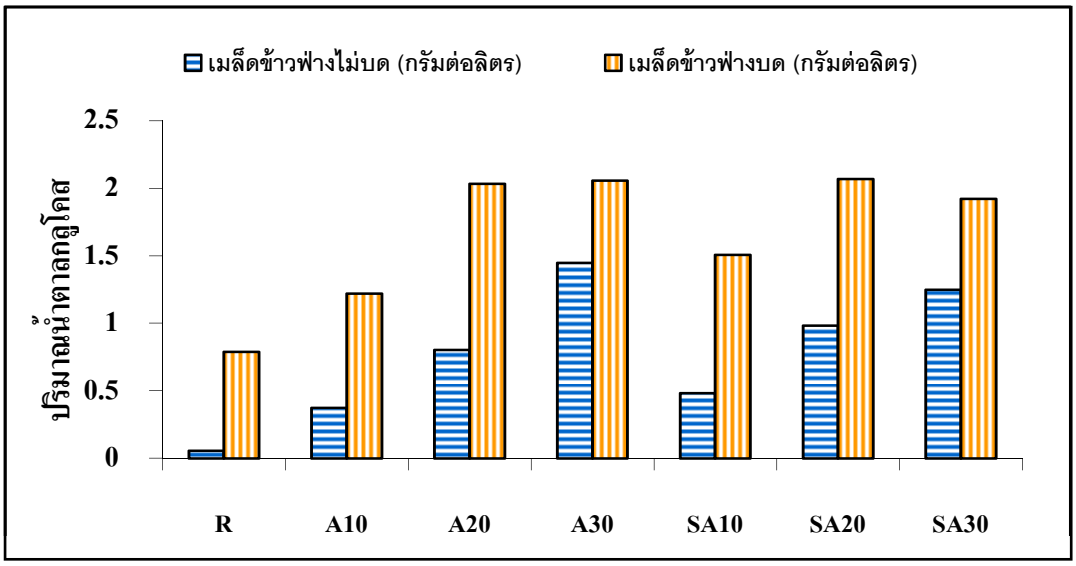
ตารางที่ 4.2 ค่าของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างด้วยวิธีทางกายภาพ

Pretreatment	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)			
	ไม่บด		บด	
	ปริมาณเมล็ดข้าวฟ่าง 5 เปอร์เซ็นต์	ปริมาณเมล็ดข้าวฟ่าง 10 เปอร์เซ็นต์	ปริมาณเมล็ดข้าวฟ่าง 5 เปอร์เซ็นต์	ปริมาณเมล็ดข้าวฟ่าง 10 เปอร์เซ็นต์
เมล็ดข้าวฟ่าง (R)	0.04±0.01	0.31±0.07	0.06±0.01	0.79±0.13
ความร้อน 121°C 10 นาที (A 10 min)	0.10±0.00	0.61±0.14	0.37±0.09	1.22±0.27
ความร้อน 121°C 20 นาที (A 20 min)	0.26±0.06	0.78±0.05	0.80±0.05	2.04±0.10
ความร้อน 121°C 30 นาที (A 30 min)	0.43±0.07	0.85±0.27	1.45±0.07	2.06±0.54
แช่น้ำ 2 ชั่วโมง และความร้อน 121°C 10 นาที (SA 10 min)	0.49±0.08	0.71±0.03	0.48±0.03	1.51±0.21
แช่น้ำ 2 ชั่วโมง และความร้อน 121°C 20 นาที (SA 20 min)	0.63±0.07	0.75±0.07	0.99±0.07	2.07±0.63
แช่น้ำ 2 ชั่วโมง และความร้อน 121°C 30 นาที (SA 30 min)	0.99±0.10	0.77±0.11	1.25±0.02	1.92±0.67

จากผลการทดลองตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริค ที่ได้จากการปรับสภาพทางกายภาพด้วยวิธีต่างๆ พบว่าการปรับสภาพด้วยวิธี SA20, SA30 , A20 และ A30 ให้ผลใกล้เคียงกันคือ ได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.92 - 2.07 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเมล็ดข้าวฟ่างจะมีเปลือกที่ห่อหุ้มด้านนอก (เพอริคาร์พ) ของเนื้อเมล็ดหรือส่วนที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบสูง ซึ่งเปลือกจะมีโครงสร้างที่แข็งแรง ต้องมีการปรับสภาพทางกายภาพ เพื่อทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงนั้น ให้เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ โดยการบดเมล็ดข้าวฟ่างจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์อะมิเลส (Wilke, 1975) มีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ปลดปล่อยออกมาจากเมล็ดข้าวฟ่างบดมากกว่าเมล็ดข้าวฟ่างที่ไม่ผ่านการบด การแช่เมล็ดข้าวฟ่างด้วยน้ำก่อนการปรับสภาพจะทำให้ส่วนของเปลือกที่ห่อหุ้มเนื้อเมล็ดมีความอ่อนนุ่มง่ายต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Hoseney, 1994) จากผลการทดลองทำให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากเมล็ดข้าวฟ่างบดเมื่อเทียบกับเมล็ดข้าวฟ่างที่ไม่บด เมล็ดข้าวฟ่างบดจะให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่า เมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการบดจะเป็นการทำลายส่วนของเปลือกที่ห่อหุ้มเมล็ดโดยตรง ซึ่งจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวและทำให้ส่วนที่เป็นเนื้อเมล็ดที่มีองค์ประกอบเป็นแป้ง ง่ายต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์จึงช่วยให้เกิดประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น และระยะเวลาของการปรับสภาพด้วยความร้อน ก็จะทำให้แป้งเกิดการพองตัวและสามารถจับน้ำมากขึ้น โครงสร้างแป้งจะมีความแข็งแรงลดลง ทำให้แป้งมีความหนืดสูงขึ้นจากนั้นโมเลกุลของแป้งจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้มากขึ้นด้วย

เมื่อนำมาทดสอบค่าทางสถิติที่ความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทดสอบความแตกต่างแบบ Multiple comparison พบว่า วิธี SA20, SA30 , A20 และ A30 อยู่ในกลุ่มที่ดีที่สุดที่ไม่มีความแตกต่างกัน ดังตารางที่ 1 แสดงค่าทางสถิติ (ภาคผนวช ค)

จากการศึกษาการปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างทางกายภาพจะเลือกใช้วิธีให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เนื่องจากเมื่อเพิ่มกระบวนการแช่ก่อนการปรับสภาพและเพิ่มระยะเวลาเป็น 30 นาที ผลของน้ำตาลทั้งหมดที่ได้ก็ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ จึงใช้วิธีนี้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการปรับสภาพทางกายภาพของเมล็ดข้าวฟ่างที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

R = ไม่มีการปรับสภาพ

A10 = ให้ความร้อน 121°C 10 นาที

A20 = ให้ความร้อน 121°C 20 นาที

A30 = ให้ความร้อน 121°C 20 นาที

SA10 = แช่น้ำ 2 ชั่วโมง และความร้อน 121°C 10 นาที

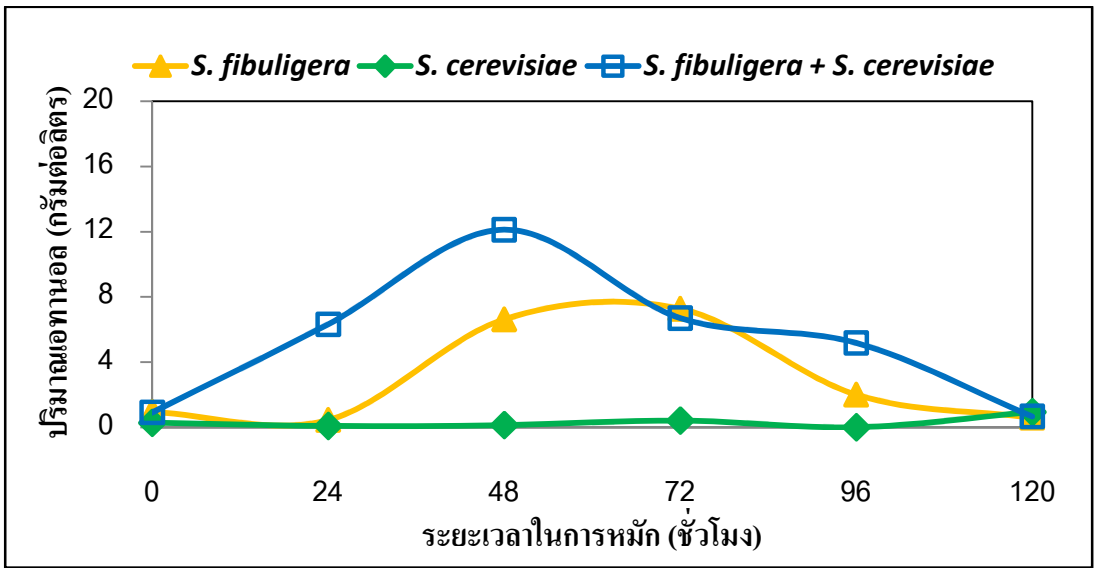
SA20 = แช่น้ำ 2 ชั่วโมง และความร้อน 121°C 20 นาที

SA30 = แช่น้ำ 2 ชั่วโมง และความร้อน 121°C 30 นาที

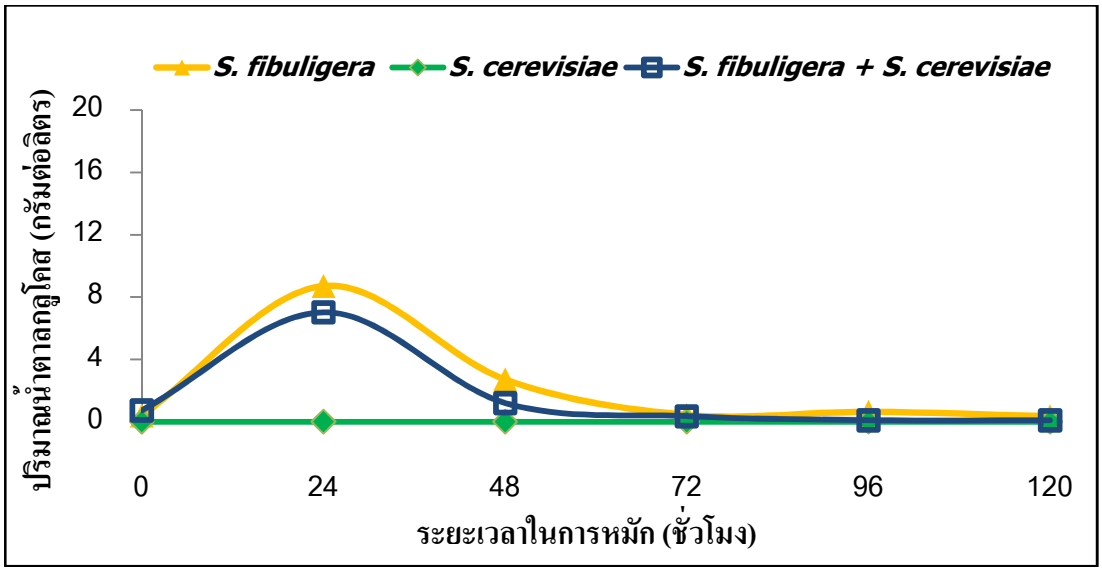
4.3 ภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้เชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*

4.3.1 การใช้เชื้อเดี่ยวโดย *Saccharomycopsis fibuligera* หรือ *Saccharomyces cerevisiae* และใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*

การผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อเดี่ยวและใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* โดยมีรายงานว่าเชื้อ *S.fibuligera* สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะมิเลส และปลดปล่อยออกนอกเซลล์ในการย่อยสลายแป้งโดยตัดตรงพันธะ 1,4-α-glycosidic ได้เป็นเด็กซ์ทริน โอลิโกแซกคาไรด์ มอลโทส และน้ำตาลกลูโคส (Knox และคณะ, 2004) นอกจาก α-amylase แล้ว *S. fibuligera* ยังปลดปล่อย glucoamylase ออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งสามารถย่อยโมเลกุลแป้ง ตรงส่วนปลายบริเวณนอนรีดิวซ์ (non-reducing ends) ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสออกมา (Chi และคณะ, 1993) ส่วนเชื้อ *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ มีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยว ซึ่งผลผลิตขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นและปริมาณออกซิเจนในภาวะแวดล้อมที่เชื้อเจริญอยู่ (Neway, 1989) ปริมาณเอทานอลและน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น จากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพแล้วโดยใช้เชื้อชนิดเดียวและใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* แสดงดังรูปที่4.4 และรูปที่ 4.5 ตามลำดับ



รูปที่ 4.4 ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆโดยใช้เชื้อ *S. fibuligera* หรือ *S. cerevisiae* และใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae*



รูปที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เชื้อ *S. fibuligera* หรือ *S. cerevisiae* และใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* (1:1)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อ *S. fibuligera* หรือ *S. cerevisiae* และใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae*

เชื้อยีสต์	**ปริมาณโปรตีน (%)**		
	0 h	120 h	**เพิ่มขึ้น (เท่า)**
S. fibuligera	9.82	19.72	1.01
S. cerevisiae	8.82	11.22	0.27
S. fibuligera + *S. cerevisiae*	9.25	25.11	1.72

จากผลการทดลองรูปที่ 4.4 พบว่าการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* ในการกระบวนการหมักสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงสุด คือ 12.22 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อ *S. fibuligera* หรือ *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงสุดที่ 7.27 และ 0.93 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 72 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ และกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลนำไปวิเคราะห์ค่าปริมาณโปรตีน พบว่า การใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* ร่วมกับ *S. cerevisiae* ในการกระบวนการหมักสามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณ 25.11 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง ส่วนการหมักโดยใช้เชื้อเดี่ยวโดยเชื้อ *S. fibuligera* สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณสูงสุดที่ 19.72 และ 11.22 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมงตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.3

การใช้เชื้อร่วมกันสามารถผลิตเอทานอลได้ดีกว่าการหมักโดยใช้เชื้อเดี่ยว และใช้ระยะเวลาในการกระบวนการหมักสั้นกว่า เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายแป้งร่วมกับกระบวนการหมักเอทานอลเชื้อ *S. fibuligera* มีความสามารถย่อยสลายแป้งในเมล็ดข้าวฟ่างเป็นน้ำตาลกลูโคส และเชื้อ *S. cerevisiae* ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยว ทำให้ประสิทธิภาพของการหมักเมล็ดข้าวฟ่างเกิดขึ้นได้สูง อันเป็นผลสืบเนื่องมาจากการที่สารผลิตภัณฑ์ (กลูโคส)จะถูกใช้ไป หรือลดปริมาณลงเนื่องจากถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งจะเป็นการลดโอกาสที่จะเกิดการยับยั้งของกระบวนการย่อยสลายโดยสารผลิตภัณฑ์ โดยการทำงานของอะมิเลส

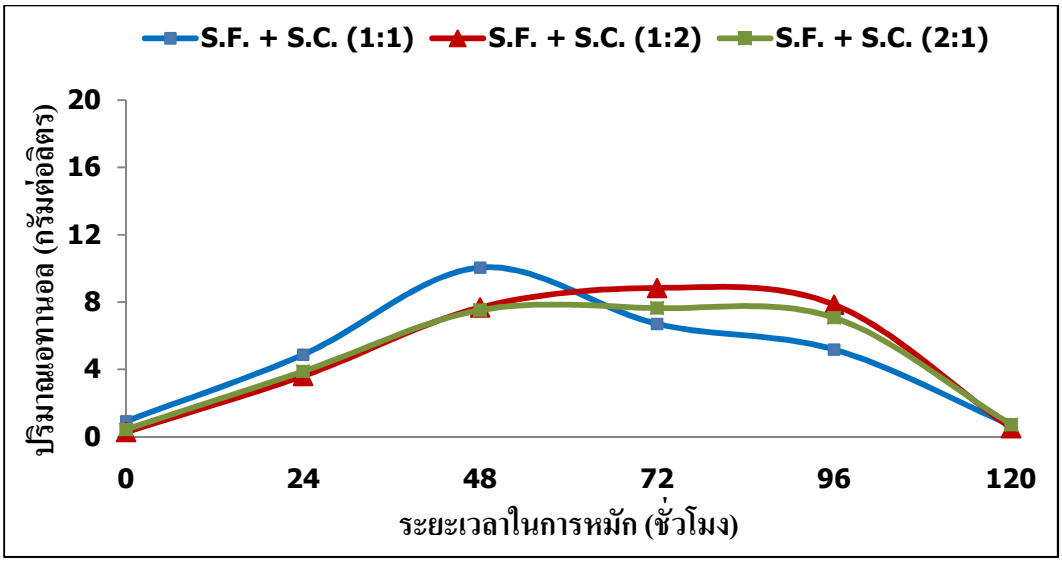
จะถูกยับยั้งการทำงานโดยน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลเซลลูไบโอส ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนหมักร่วมกับกระบวนการย่อยสลายจะถูกเปลี่ยนให้เป็นเอทานอล โดยเชื้อยีสต์ผสมดังกล่าวอย่างรวดเร็วจึงไม่ทำให้เกิดการสะสมของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นและระยะเวลาในการหมักสั้นลงเมื่อเทียบกับการใช้เชื้อเพียงชนิดเดียว (Neway, 1989 และ Ghose, 1979)

เมื่อนำมาทดสอบค่าทางสถิติที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทดสอบความแตกต่างแบบ Multiple comparison พบว่า การหมักแบบเชื้อผสมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากการหมักแบบเชื้อเดี่ยวทั้งสองแบบ

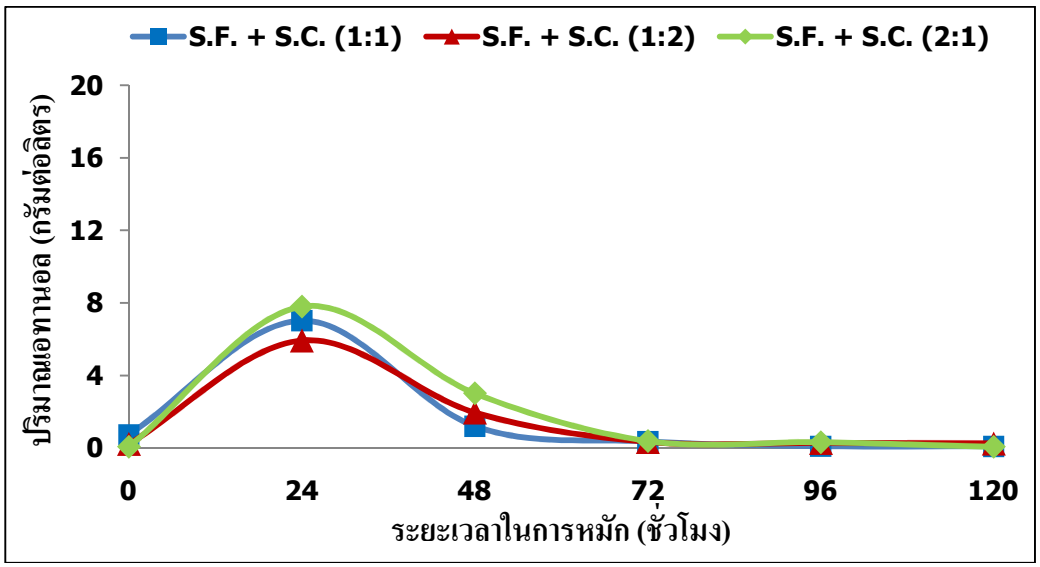
จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อเดี่ยวและใช้เชื้อผสม โดยจากผลการทดลองจะเลือกใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* จึงใช้ภาวะนี้ทำการทดลองต่อไป

4.3.2 ศึกษาอัตราส่วนของกล้าเชื้อ

จากการทดลองศึกษาอัตราส่วนของกล้าเชื้อในการผลิตเอทานอลโดยเชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* (S.F.) และ *S. cerevisiae* (S.C) ในอัตราส่วน 1 : 1, 1 : 2 และ 2 : 1



รูปที่ 4.6 ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* ในแต่ละอัตราส่วนของกล้าเชื้อ 1 : 1, 2 : 1 และ1: 2



รูปที่ 4.7 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เชื้อ ผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* ในแต่ละอัตราส่วนของกล้าเชื้อ 1 : 1, 2: 1 และ1 : 2

ตารางที่ 4.4 ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง ในอัตราส่วนของกล้าเชื้อ 1 : 1, 1 : 2 และ 2 : 1

อัตราส่วนของกล้าเชื้อ	**ปริมาณโปรตีน** (%)		
	0h	120h	**เพิ่มขึ้น** (เท่า)
S. fibuligera + *S. cerevisiae* (1:1)	9.25	25.11	1.72
S. fibuligera + *S. cerevisiae* (1:2)	8.58	23.74	1.77
S. fibuligera + *S. cerevisiae* (2:1)	9.28	21.99	1.37

จากผลการทดลองรูปที่ 4.6 พบว่า อัตราส่วนของกล้าเชื้อ 1 : 1 สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงสุด คือ 10.15 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง อัตราส่วนของกล้าเชื้อ 1 : 2 และ 2 : 1 มีค่าปริมาณเอทานอลใกล้เคียงกัน คือ สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงสุดที่

7.68 และ 7.52 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมงตามลำดับ และกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลนำไปวิเคราะห์ค่าปริมาณโปรตีน พบว่า อัตราส่วนของกล้าเชื้อ 1 : 1, 1 : 2 และ 2 : 1 ในการกระบวนการหมัก สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน คือ 25.11, 23.74 และ 21.99 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมงตามลำดับแสดงดังตารางที่ 4.4

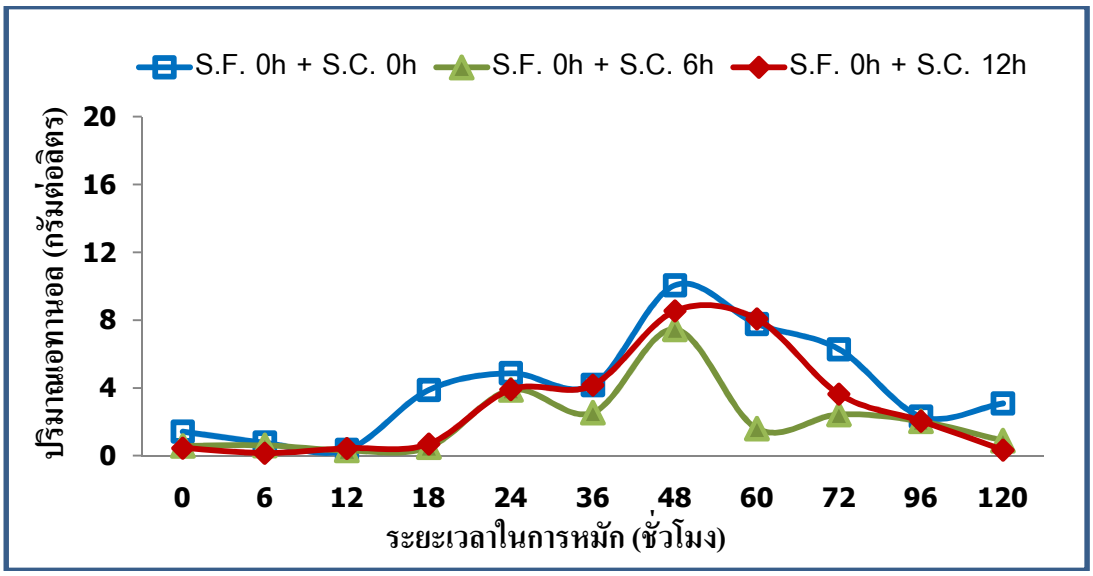
มีรายงานการศึกษาของอริสรา (2546) อัตราส่วนของเชื้อยีสต์ผสมในการเจริญและการผลิตเอทานอลในน้ำตาลผสมระหว่างไซโลสและกลูโคสระหว่างเชื้อ *Candida tropicals* และ *Saccharomyces cerevisiae* ที่อัตราส่วนของเชื้อ 1 : 1, 2 : 1 และ 1 : 2 สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณ 7.06, 6.19 และ 6.69 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำมาทดสอบค่าทางสถิติที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทดสอบความแตกต่างแบบ Multiple comparison พบว่า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีผลคล้ายคลึงกัน

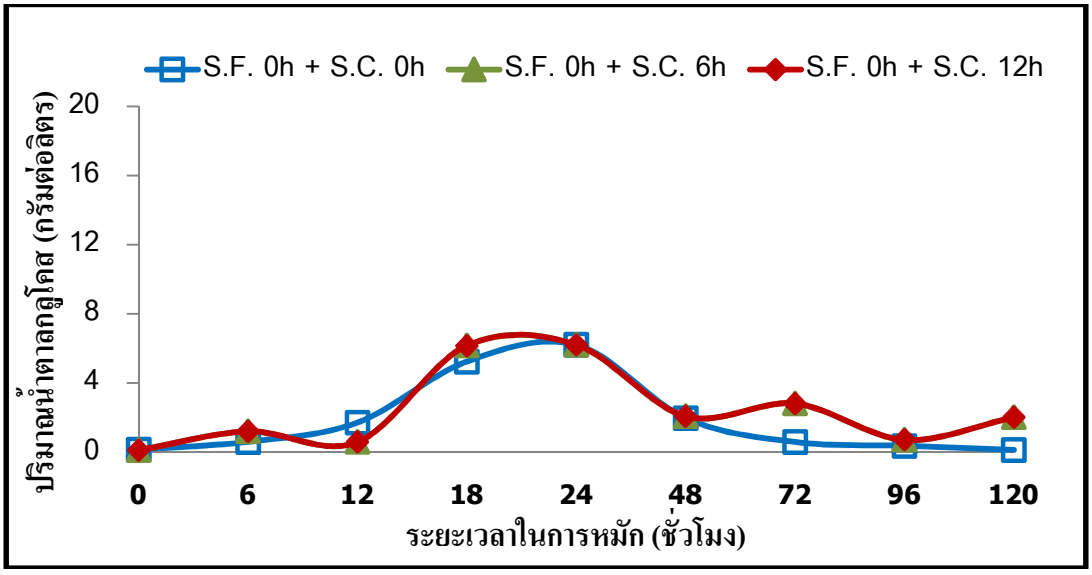
จากการศึกษาการผลิตเอทานอลจากอัตราส่วนของเชื้อ 1 : 1, 1 : 2 และ 2 : 1 จากผลการทดลอง จึงเลือกใช้อัตราส่วนของเชื้อ 1 : 1 เนื่องจากสามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด จึงใช้ภาวะนี้ทำการทดลองต่อไป

4.3.3 **ศึกษาช่วงระยะเวลาในการลงเชื้อ** *S. cerevisiae*

สาวิตรี ลิ่มทอง (2536) รายงานว่าประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นและปริมาณของผลผลิต โดยปริมาณน้ำตาลสูงมากกว่า 14 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการเติบโตและการหมักเอทานอล ดังนั้นช่วงระยะเวลาในการลงเชื้อ *S. cerevisiae* จึงมีผลต่อการผลิตเอทานอลในกระบวนการหมักการลงเชื้อ *S. fibuligera* ที่เวลา 0 ชั่วโมง และ ศึกษาการลงเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ช่วงระยะเวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.8 และรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.8 ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาโดยการลงเชื้อ *S. fibuligera* ที่เวลา 0 ชั่วโมง และศึกษาการลงเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ช่วงระยะเวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง



รูปที่ 4.9 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้วที่ระยะเวลาต่างๆ โดยการลงเชื้อ *S. fibuligera* ที่เวลา 0 ชั่วโมง และศึกษาการลงเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ช่วงระยะเวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.5 ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยการลงเชื้อ *S. fibuligera* ที่เวลา 0 ชั่วโมง และ ศึกษาการลงเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ช่วงระยะเวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง

ช่วงระยะเวลาในการลงเชื้อ	**ปริมาณโปรตีน (%)**		
	0h	120h	**เพิ่มขึ้น (เท่า)**
S. fibuligera 0 h + *S. cerevisiae* 0 h	8.29	19.72	1.38
S. fibuligera 0 h + *S. cerevisiae* 6 h	8.41	18.53	1.20
S. fibuligera 0 h + *S. cerevisiae* 12 h	8.53	17.44	1.05

จากผลการทดลองพบว่าช่วงเวลาในการลงเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ระยะเวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง และภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนนั้น การลงเชื้อ *S. cerevisiae* และเชื้อ *S. fibuligera* ที่ช่วงเวลา 0 ชั่วโมงพร้อมกัน สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงสุด คือ 9.15 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ส่วนการลงเชื้อ *S. cerevisiae* ระหว่างกระบวนการหมักผ่านไปแล้ว 6 และ 12 ชั่วโมง สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงสุดที่ 8.53 และ 8.06 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 48 และ 60 ชั่วโมงและ กากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลนำไปวิเคราะห์ค่าปริมาณโปรตีน พบว่า ช่วงเวลาในการลงเชื้อ *S. cerevisiae* ระหว่างกระบวนการผลิตเอทานอลที่ช่วงเวลา 0, 6 และ12 ชั่วโมง ในการกระบวนการหมักสามารถผลิตโปรตีนสูงสุดที่ปริมาณ 19.72, 18.53 และ17.44 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 4.5

ในกระบวนการหมักโดยลงเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ระยะเวลาต่างๆ สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน จากรายงานการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Schwanniomyces occidentalis* ร่วมกับ *S. cerevisiae* โดยศึกษาช่วงเวลาในการลงเชื้อ *S. cerevisiae* ระหว่างกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่าง 8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าช่วงเวลาในการลงเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ 0 และ 6 ชั่วโมง ระหว่างกระบวนการหมักมีปริมาณเอทานอลที่ได้ไม่แตกต่างกัน แต่ระยะเวลาการหมักโดยการลงเชื้อ 2 สายพันธุ์พร้อมกันที่ 0 ชั่วโมง ทำให้ระยะเวลาในการหมักที่สั้น

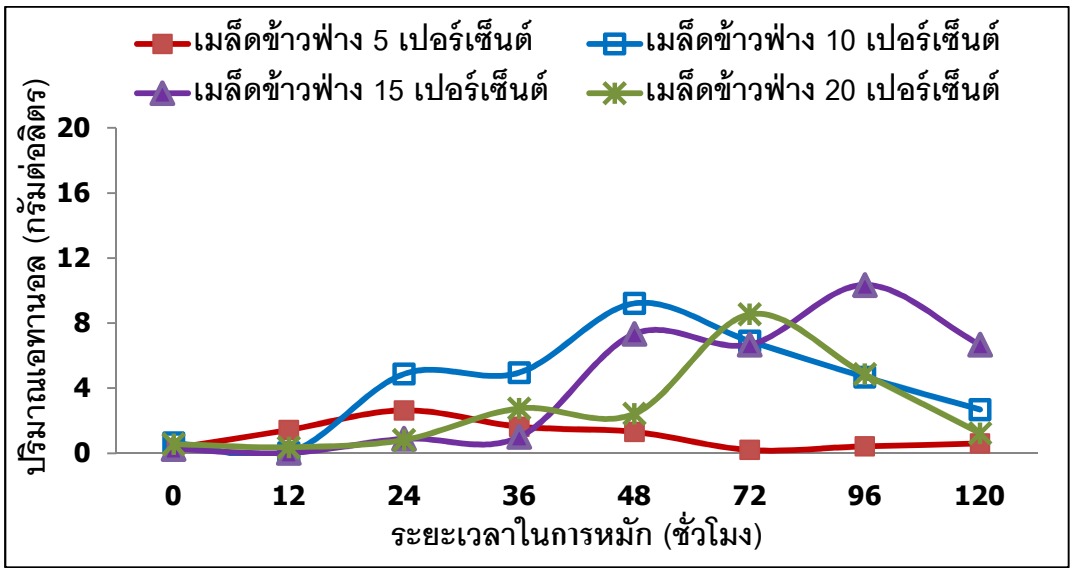
กว่า โดยน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายจากเชื้อยีสต์ *S. occidentalis* จะถูกเปลี่ยนให้เป็นเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* จากกระบวนหมักพร้อมกันอย่างรวดเร็ว จึงไม่ทำให้เกิดการสะสมของน้ำตาลเกิดขึ้นและทำให้ระยะเวลาในการหมักสั้นลง (C. H. Horn, 1992)

เมื่อนำมาทดสอบค่าทางสถิติที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์โดยทดสอบความแตกต่างแบบ Multiple comparison พบว่า ช่วงเวลาในการลงเชื้อ 0, 6, และ 12 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มของช่วงเวลาในการลงเชื้อพบว่าทั้ง 3 ภาวะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญซึ่งมีผลคล้ายคลึงกัน

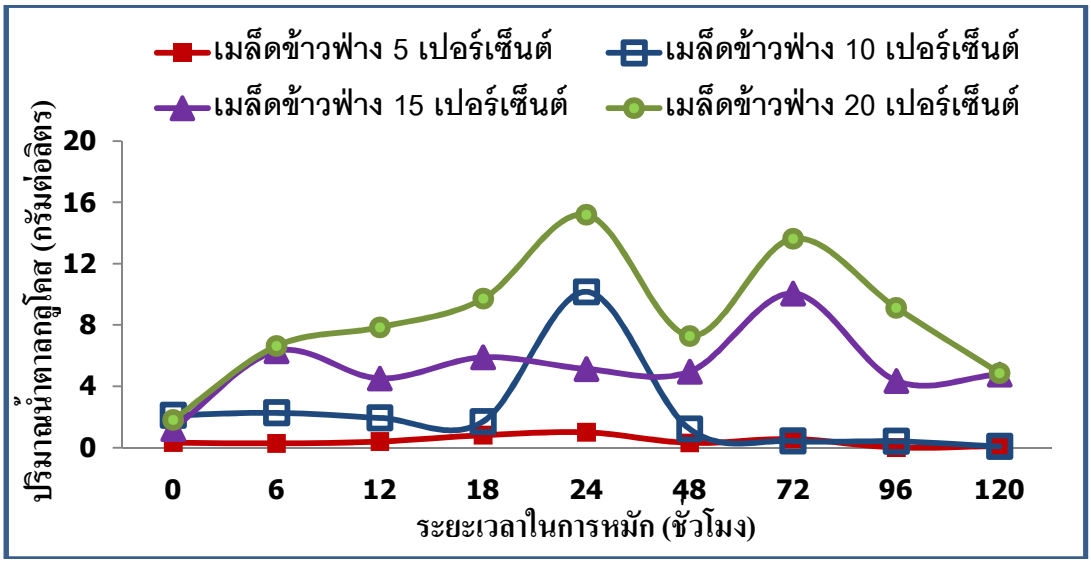
จากการศึกษาการผลิตเอทานอลช่วงระยะเวลาในการลงเชื้อ *S. cerevisiae* โดยจะเลือกใช้ที่ระยะเวลาในการลงเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ 0 ชั่วโมง ทำการทดลองต่อไป

4.3.4 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae*

Miller (1983) มีรายงานว่าในการเจริญของเชื้อยีสต์ทุกชนิดสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ ยีสต์บางชนิดอาจใช้แหล่งคาร์บอนอื่นๆ โดยต้องอาศัยเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนนั้นๆให้เป็นน้ำตาลก่อน โดยเอนไซม์ที่ย่อยสลายนั้นจะมีการทำงานอยู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งน้ำตาลที่ได้จากกระบวนการย่อยจะถูกส่งผ่านเข้ามาในเซลล์และถูกนำไปใช้ในการสร้างพลังงานและผลผลิตอื่น โดยปริมาณแหล่งคาร์บอนในอาหารมีความสำคัญมาก ถ้าระดับความเข้มข้นของน้ำตาลสูงหรือต่ำเกินไปก็ส่งผลต่อการเติบโตและการผลิตเอทานอล จากผลการทดลองแสดงดังรูป 4.10 และ รูป 4.11



รูปที่ 4.10 ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลา ต่างๆ โดยแปรผันความเข้มข้นของเมล็ดข้าวฟ่างที่ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.11 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยแปรผันความเข้มข้นของเมล็ดข้าวฟ่างที่ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.6 ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอล ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยแปรผันความเข้มข้นของเมล็ดข้าวฟ่างที่ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์

เมล็ดข้าวฟ่าง (%)	**ปริมาณโปรตีน (%)**		
	0h	120 h	**เพิ่มขึ้น (เท่า)**
5	9.75	22.79	1.34
10	9.42	21.88	1.32
15	9.37	15.22	0.63
20	9.38	12.25	0.31

จากการทดลองรูปที่ 4.10 พบว่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณ คือ 2.63 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 10, 15, 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันที่ 9.21, 10.34 และ 8.53 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 48, 96 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ และกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลนำไปวิเคราะห์ค่าปริมาณโปรตีน พบว่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ในการผลิตเอทานอลโดยเชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* และกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลนำไปวิเคราะห์ค่าปริมาณโปรตีน พบว่าความเข้มข้นของเมล็ดข้าวฟ่างที่ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณ 22.97, 21.88, 15.88 และ 12.25 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 4.6

จากกระบวนการหมักเมื่อมีปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอน 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ จะเกิดเจลาติไนซ์ และมีความหนืดสูง เชื้อจึงไม่สามารถย่อยแป้งได้หมด โดยพบว่าเชื้อจะใช้แป้งและเจริญได้เพียงส่วนผิวหน้าของแป้งที่เกิดเจลเท่านั้น (รัฐพงศ์ ปกแก้ว, 2545) ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอลที่ได้มีปริมาณต่ำ ต้องใช้ระยะเวลานานในการย่อยสลายโมเลกุลแป้งให้เป็นน้ำตาล มีรายงานว่าการใช้น้ำตาลมอลโทสของ baker's yeast และ brewer's yeast ระยะเวลาการหมักน้ำตาลมอลโทสสั้นกว่าการหมักน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นปริมาณของแหล่งคาร์บอน (แป้ง)

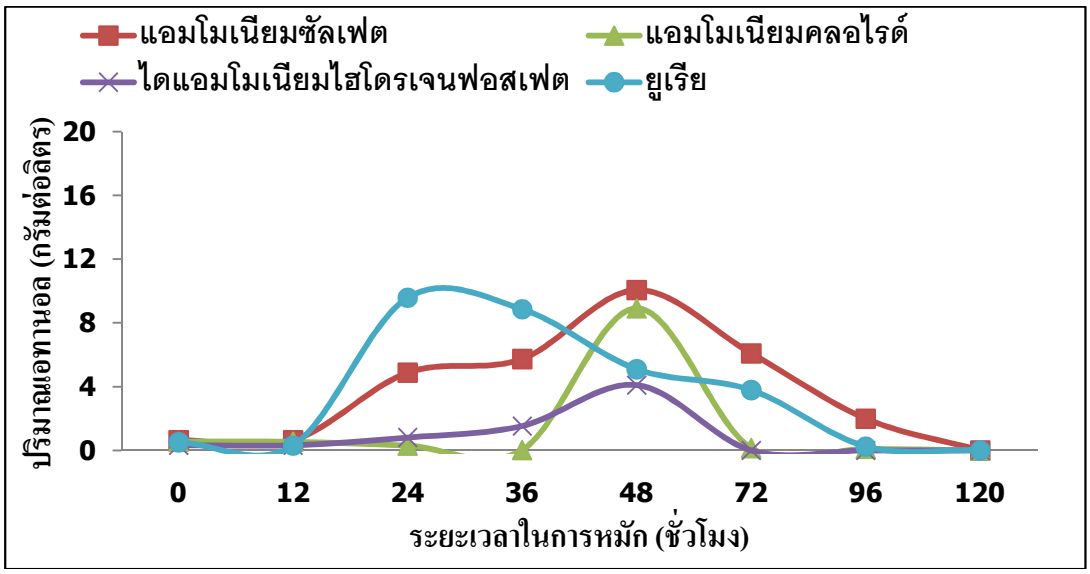
ต้องมีความเหมาะสมต่อปริมาณเอนไซม์ที่เชื้อยีสต์ผลิตขึ้นมา เพื่อสามารถย่อยสลายให้ได้น้ำตาล ทำให้เกิดประสิทธิภาพในการเติบโตและการผลิตเอทานอล

เมื่อนำมาทดสอบค่าทางสถิติที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทดสอบความแตกต่างแบบ Multiple comparison พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 คือ ความเข้มข้นของคาร์บอน 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะมีการผลิตการเอทานอลดีที่สุด รองลงมา กลุ่มที่ 2 ของปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอน 15 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ 3 ของปริมาณความเข้มข้นคาร์บอน 5 และ 20 เปอร์เซ็นต์

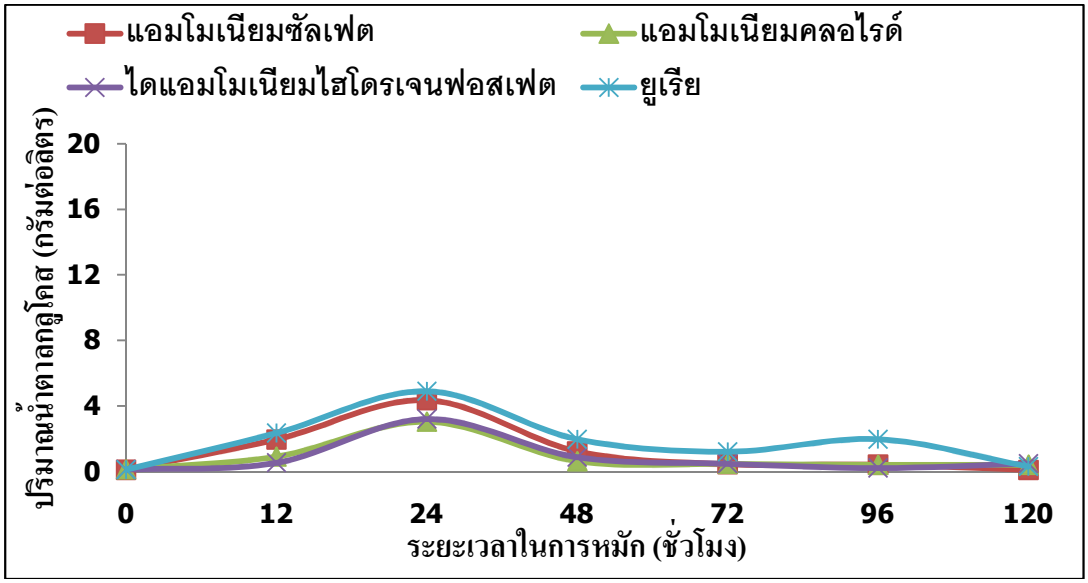
จากการศึกษาการผลิตเอทานอลจากความเข้มข้นของเมล็ดข้าวฟ่างที่ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลอง จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของเมล็ดข้าวฟ่างที่ 10 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากสามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด จึงใช้ภาวะนี้ทำการทดลองต่อไป

4.3.5 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เชื้อผสม ระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae*

ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของอาหารที่สำคัญรองลงมาจากแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์ สารหลายชนิดสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้แอมโมเนียและไนเตรท เพื่อสังเคราะห์สารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเช่น กรดอะมิโน, พิวรีน และไพริมิดิน (Geasham, 1993) ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงมีผลต่อการผลิตเอทานอลสารแหล่งไนโตรเจนที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และยูเรีย



รูปที่ 4.12 ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟส และยูเรีย



รูปที่ 4.13 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และยูเรีย

ตารางที่ 4.7 ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอล ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและยูเรีย

แหล่งไนโตรเจน	**ปริมาณโปรตีน** (%)		
	0h	120h	**เพิ่มขึ้น (เท่า)**
แอมโมเนียมซัลเฟต	9.13	22.85	1.50
แอมโมเนียมคลอไรด์	15.67	21.51	0.37
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	12.10	19.56	0.62
ยูเรีย	20.26	37.82	0.87

จากผลการทดลองรูปที่ 4.12 พบว่า เมื่อใช้ยูเรียหรือแอมโมเนียม เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อผสม 2 สายพันธุ์ สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงสุด ที่ 11.69 และ 8.79 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ขณะที่เมื่อใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต หรือแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณเอทานอลที่ได้ค่อนข้างต่ำ คือ 4.53 และ 2.59 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 36 และ 48 ชั่วโมงและกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลนำไปวิเคราะห์ค่าปริมาณโปรตีน พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมคลอไรด์,ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน 19.56 - 22.85 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง แต่ยูเรียสามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณสูงสุดที่ 37.82 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.7

โดยแอมโมเนียมซัลเฟตนิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน เพราะนอกจากให้ไนโตรเจนแล้วยังให้ซัลเฟอร์อีกด้วย ยีสต์บางชนิดสามารถใช้ไนเตรตได้ เช่น *Citeromyces* sp., *Pichia* sp. และ *Candida* sp. ในขณะที่ยีสต์บางสายพันธุ์ไม่ใช้ไนเตรต เช่น *Derbaryomyces* sp., *Kluyveromyces* sp. และ *Saccharomyces* sp. จึงทำให้มีการเจริญเติบโตได้น้อยและผลิตเอทานอลในปริมาณ เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า เชื้อยีสต์ชนิด *Basidiomycetous* sp. ส่วนใหญ่จะมีการสร้างเอ็นไซม์ยูรีเอส (Urease) และ *Ascomycetous* sp. จะอยู่ในพวกที่ไม่สร้างเอ็นไซม์ยูเรียเอส เชื้อยีสต์ *Saccharomyces* sp. จะใช้ยูเรียได้เท่ากับแอมโมเนียมซัลเฟต จึงทำให้ผลของการผลิตเอทานอล

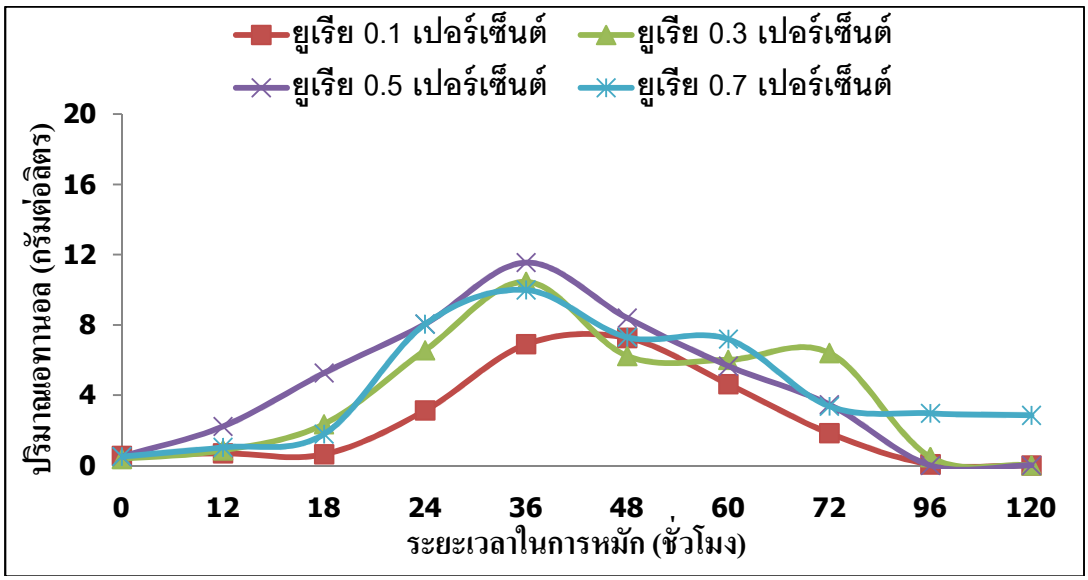
สูงขึ้นและระยะเวลาในการหมักสั้นลงกว่าแอมโมเนียมซัลเฟต สำหรับสารแหล่งไนโตรเจน ไนไทร์ต (nitrite) และไนเตรท (nitrate) เชื้อ *S. cerevisiae* ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ (Rose และ Harrison, 1971)

เมื่อนำมาทดสอบค่าทางสถิติที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทดสอบความแตกต่างแบบ Multiple comparison พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มที่แตกต่างกัน กลุ่มที่ดีที่สุด คือกลุ่มของยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟต โดยค่าทางสถิติไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

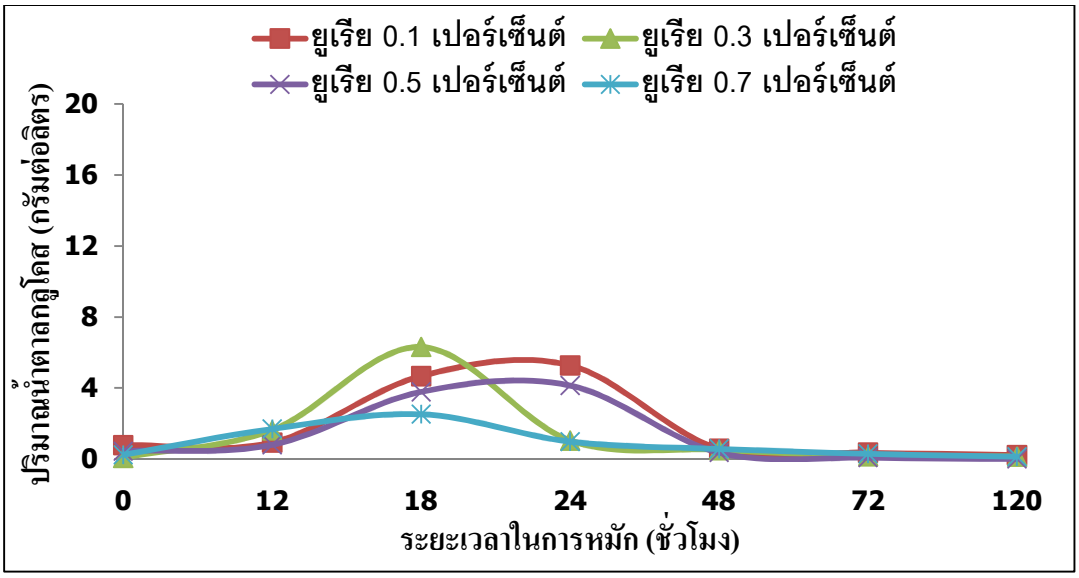
จากการศึกษาการผลิตเอทานอลจากแหล่งไนโตรเจนต่างๆ คือ แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมซัลเฟต, ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและยูเรีย จากผลการทดลอง จึงเลือกใช้ยูเรีย เนื่องจากสามารถผลิตเอทานอลได้ดีในระยะเวลาการหมักที่สั้น จึงใช้ภาวะนี้ทำการทดลองต่อไป

4.3.6 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae*

จากการผลทดลองที่ 4.3.5 ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดี แต่การใช้นั้นต้องคำนึงถึงปริมาณความเข้มข้นของยูเรียที่ใช้ด้วย เนื่องจากสารประกอบจะต้องนำเข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็วและเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ด้วยขั้นตอนที่น้อยที่สุด และต้องไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นพิษต่อเซลล์ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนจึงมีผลต่อการผลิตเอทานอล



รูปที่ 4.14 ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยแปรผันความเข้มข้นของยูเรียที่ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)



รูปที่ 4.15 ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยแปรผันความเข้มข้นของยูเรียที่ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ตารางที่ 4.8 ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมงโดยแปรผันความเข้มข้นของยูเรียที่ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ความเข้มข้นของยูเรีย (%)	**ปริมาณโปรตีน (%)**		
	0h	120h	**เพิ่มขึ้น (เท่า)**
0.1	11.26	26.83	1.38
0.3	13.72	38.40	1.80
0.5	16.85	38.77	1.30
0.7	22.05	38.99	0.77

จากการผลทดลองรูปที่ 4.14 พบว่า ที่ความเข้มข้นของยูเรีย 0.3, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน คือ 10.45, 11.55 และ 9.99กรัมต่อลิตรตามลำดับ ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงสุด 7.26 กรัมต่อลิตรที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นของยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีการผลิตเอทานอลน้อยที่สุด แต่เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของยูเรียเป็น 0.3, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การผลิตเอทานอลเพิ่มมากขึ้น และจากการทดลองนี้กากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลนำไปวิเคราะห์ค่าปริมาณโปรตีน พบว่าความเข้มข้นของยูเรียที่ 0.3 - 0.7 เปอร์เซ็นต์ ในการผลิตเอทานอลสามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณใกล้เคียงกันที่ 38.40 - 38.98 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง ขณะที่ใช้ความเข้มข้นของยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณโปรตีนที่ได้จะต่ำกว่าเล็กน้อย คือ 26.83 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.8

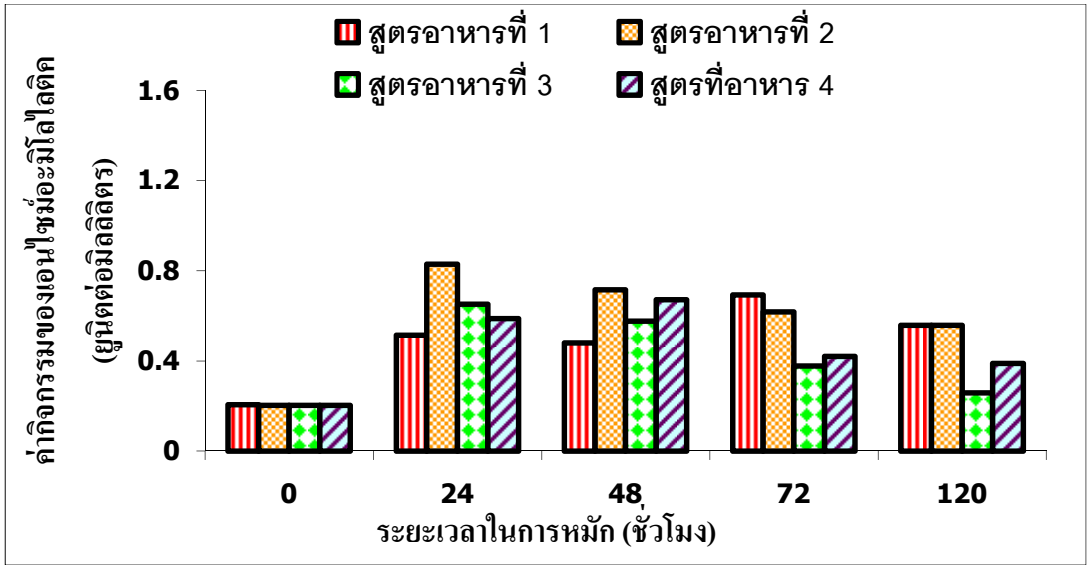
เมื่อนำมาทดสอบค่าทางสถิติที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทดสอบความแตกต่างแบบ Multiple comparison พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของทั้ง 4 สภาวะ โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือ ความเข้มข้นยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ 2 จัดเป็นกลุ่มที่สามารถผลิตเอทานอลได้ดี ที่ปริมาณความเข้มข้นของยูเรีย 0.3, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ซึ่งกลุ่มที่ 2 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากการทดลองจึงใช้ปริมาณความเข้มข้นของยูเรียที่ 0.3 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากปริมาณเอทานอลใกล้เคียงกับความเข้มข้นของยูเรีย 0.5 และ 0.7เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกใช้ยูเรียที่ 0.3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนมากที่สุด

4.4 ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*

4.4.1 คัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค

การคัดเลือกสูตรอาหารแต่ละสูตรเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในกระบวนการหมัก ต้องมีองค์ประกอบต่างๆที่เหมาะสมต่อการเจริญ การสร้างผลผลิต และการเก็บรักษาสภาพของเซลล์ โดยแต่ละสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีองค์ประกอบของ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน และสารอาหารอื่นๆ เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดต้องการธาตุอาหารที่แตกต่างกัน เพื่อชักนำให้ได้ผลผลิตที่ต้องการจึงต้องกำหนดสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ให้เหมาะสม (สมใจ ศิริโภค, 2001) งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสูตรอาหารทั้งหมด 4 สูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคของเชื้อยีสต์ *S. fibuligera*



รูปที่ 4.16 ผลการเปรียบเทียบสูตรอาหารทั้ง 4 ชนิด ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera*

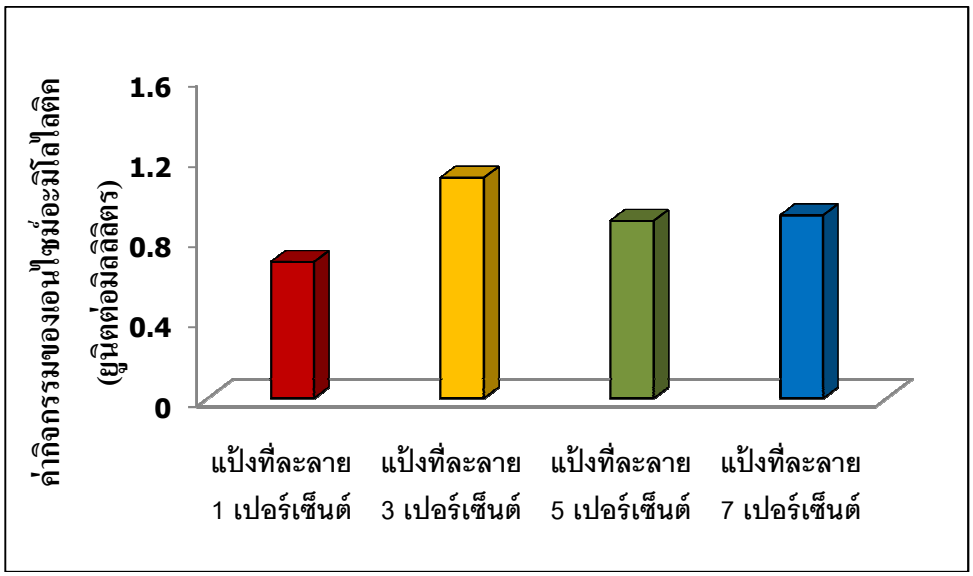
การทดลองรูปที่ 4.16 พบว่า สูตรอาหารที่ 1, 3,และ 4 สามารถผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคได้สูงสุดใกล้เคียงกันที่ 0.694, 0.653 และ 0.672 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 72, 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ และสูตรอาหารที่ 2 สามารถผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคได้สูงสุด 0.830 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง เนื่องจากส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเชื้อยีสต์เลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค จะมีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ได้ เนื่องจากอาหารเพาะเลี้ยงอาจทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญสูงสุด แต่ไม่ได้หมายความว่าจะได้ปริมาณของเอนไซม์สูงสุด โดยที่อาหารเพาะเลี้ยงจะต้องมีความสมดุลของธาตุอาหาร มีสารเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เกิดขึ้นได้ โดยแหล่งอาหารชนิดต่างๆจะสามารถเกิดการกดดัน (repression) ต่อการสร้างเอนไซม์ได้ (De Mot, 1990)

เมื่อนำมาทดสอบค่าทางสถิติที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทดสอบความแตกต่างแบบ Multiple comparision พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของสูตรอาหารทั้ง 4 ชนิด แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบของระยะเวลาในการหมัก มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่1ที่ระยะเวลาที่ 0 ชั่วโมง และกลุ่มที่ 2 ที่ระยะเวลาที่ 24, 48, 72, 120 ชั่วโมง กลุ่มที่2 เป็นกลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคได้ดีไม่แตกต่างกัน

จากการทดลองเมื่อคำนึงถึงการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค จึงเลือกสูตรอาหารที่ 2 เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ได้มีปริมาณมากที่สุดและใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่า

4.4.2 **ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค**

ความเข้มข้นสูงของแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถเมทาบอไลท์ได้ จะทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตการเจริญได้อย่างรวดเร็ว แต่เมื่อน้ำตาลกลูโคสมีความเข้มข้นมากอาจเป็นตัวยับยั้งการสร้างของเชื้อจุลินทรีย์ (สมใจ, 2001) จึงทำการศึกษาความเข้มข้นของแป้งที่ละลาย (soluble starch) ในการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคในกระบวนการหมักโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera*



รูปที่ 4.17 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของแป้งที่ละลายที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera*

จากผลการทดลองรูปที่ 4.17 พบว่า ความเข้มข้นของแป้งที่ละลายที่ 1, 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์สามารถผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคได้ใกล้เคียงกันที่ 0.681, 0.887และ 0.914 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของ soluble starch ที่ 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคได้สูงสุด 1.102 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

โดยมีรายงานว่าการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลมอลโทส และ soluble starch ซึ่ง soluble starch สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์ได้สูงกว่าการใช้มอลโทส สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ 1.5 – 2.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Sukhumavasi, 1975)

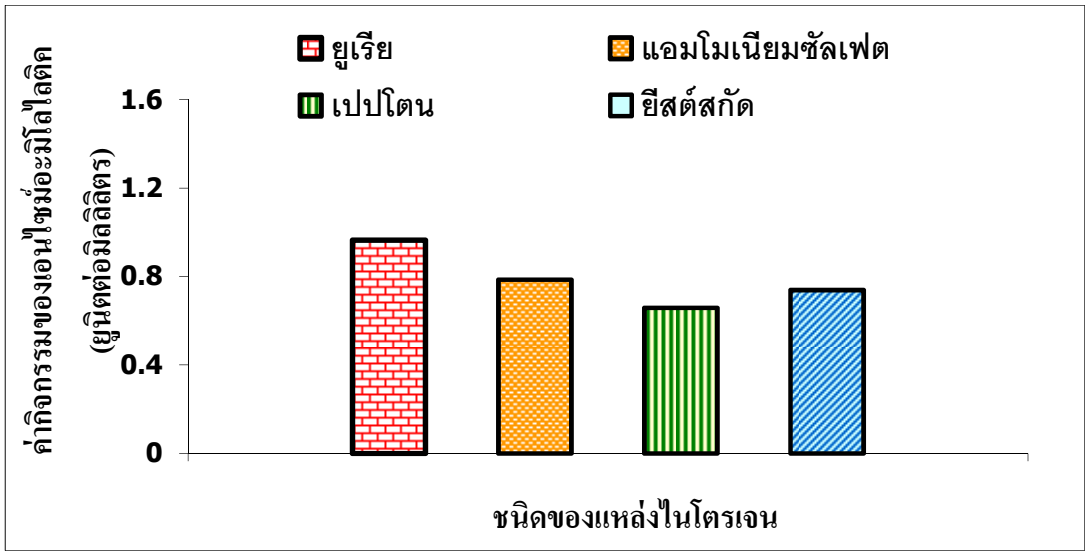
เมื่อนำมาทดสอบค่าทางสถิติที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทดสอบความแตกต่างแบบ Multiple comparison พบว่า มีความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มของระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มของระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 3, 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคได้ดีไม่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาถึงการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค จึงเลือกความเข้มข้นของแป้งที่ละลาย ที่ 3 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ได้มีปริมาณมากที่สุด โดยใช้

ปริมาณ soluble starch ปริมาณน้อยที่สุดแต่สามารถผลิตได้มากกว่าทั้ง 3 ภาวะ จึงใช้ในการทดลองต่อไป

4.4.3 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค

เชื้อยีสต์ได้รับไนโตรเจนจากสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เพื่อนำไปสร้างโปรตีน และเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้แอมโมเนียมไอออนได้ ความสามารถในการใช้ไนเตรทและไนไตรต์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์แต่ละสายพันธุ์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547) จึงทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคในกระบวนการหมักโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera*



รูปที่ 4.18 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค ในกระบวนการหมัก ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera*

จากผลการทดลองรูปที่ 4.18 พบว่า แหล่งไนโตรเจนได้แก่ ยูเรีย, แอมโมเนียมซัลเฟต, Yeast extract และ เปปโตน สามารถผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคได้สูงสุด 0.966, 0.786, 0.739 และ 0.658 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง มีรายงานว่าจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน (สมใจ, 2001) ดังนั้นเชื้อยีสต์อาจนำยูเรียซึ่งเป็นอินทรีย์ไนโตรเจนไปใช้ได้เร็วกว่าและชักนำให้ผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคได้เร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ ในการใช้แหล่งไนโตรเจนจากอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต อาจทำให้เกิดการสะสมของซัลเฟต

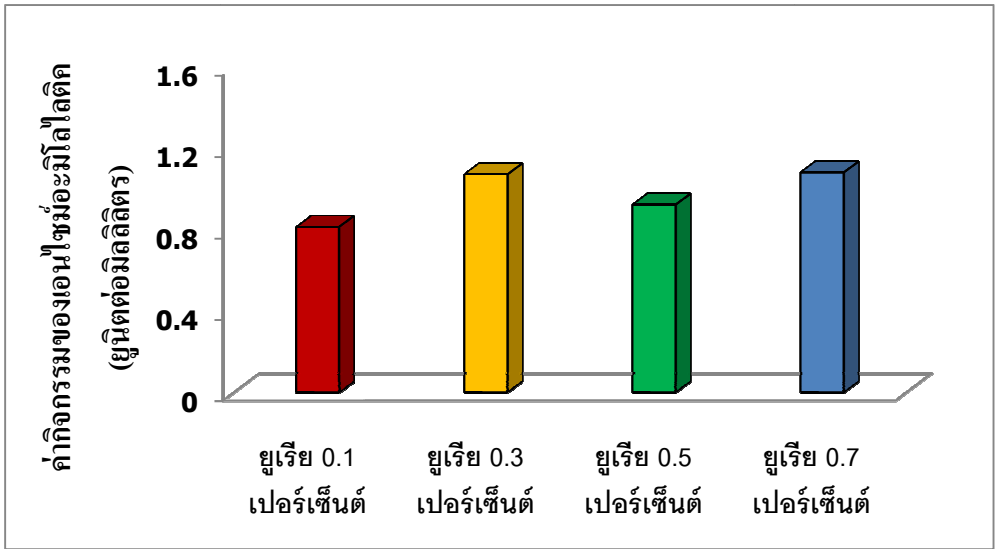
ไอออนที่เหลือจากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตของเซลล์ร่วมกับกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้น ทำให้ค่าพีเอชของอาหารลดต่ำลงมากจนทำให้เอนไซม์ที่ผลิตเกิดการเสียสภาพ ซึ่งการลดลงของพีเอชสามารถป้องกันได้โดยใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน (Yang และ Wang, 1999)

เมื่อนำมาทดสอบค่าทางสถิติที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทดสอบความแตกต่างแบบ multiple comparison พบว่า มีความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือ ยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟต มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคได้ดีกว่ากลุ่มที่ 2 คือ Yeast extract และ เปปโตน

จากผลการทดลองและต้นทุนราคาของสารแหล่งไนโตรเจน จึงเลือกยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ในการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติก

4.4.3 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค

ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดี แต่เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนจะต้องคำนึงถึงปริมาณความเข้มข้นของยูเรียที่ใช้ ซึ่งสารประกอบจะต้องนำเข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็วเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ด้วยขั้นตอนที่น้อยที่สุด และต้องไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นพิษต่อเซลล์



รูปที่ 4.19 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค ในกระบวนการหมัก ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera*

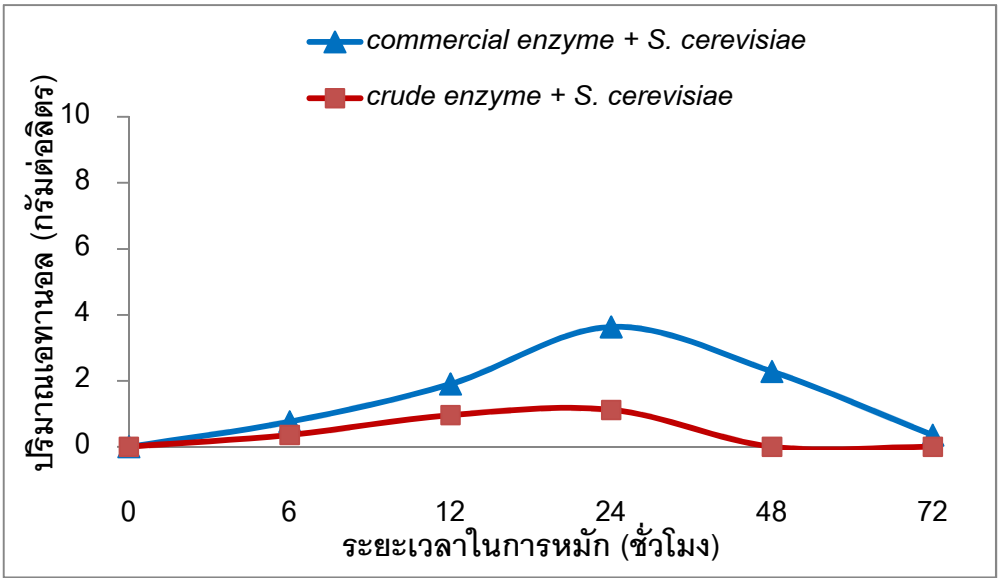
จากผลการทดลองรูปที่ 4.19 พบว่า ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร สามารถผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคได้สูงสุด 0.814, 1.073, 0.924 และ 1.082 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง มีรายงานว่า การใช้ยูเรียปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักรำข้าวสาลี) เป็นความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด (Ellaiah, 2002) แต่เนื่องจากวัตถุดิบและสภาวะในกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน ทำให้การใช้ปริมาณไนโตรเจนของเชื้อแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน

เมื่อนำมาทดสอบค่าทางสถิติที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทดสอบความแตกต่างแบบ multiple comparison พบว่า มีความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.1 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.3, 0.5, และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 2 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคได้ดีกว่ากลุ่มที่ 1

จากผลการทดลองเมื่อคำนึงถึงการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค จึงเลือกความเข้มข้นของยูเรีย 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีและประหยัดที่สุด

4.5 การผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เอนไซม์อะไมโลไลติคจากเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* หรือเอนไซม์ทางการค้า(Termamyl 120L) หมักร่วมกับเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลาย และจุลินทรีย์ที่ใช้หมักจะมีขอบเขตแตกต่างกัน นอกจากนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการย่อยสลาย และกระบวนการหมักก็มีความแตกต่างกัน จึงได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อ *S. fibuligera* หรือเอนไซม์ทางการค้า (Termamyl 120L) หมักร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* ผลการทดลองแสดงดังรูป 4.20



รูปที่ 4.20 ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการสภาพแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เอนไซม์อะมิโลไลติคจากเชื้อ *S. fibuligera* หรือเอนไซม์ทางการค้า (Termamyl 120) หมักร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae*

ตารางที่ 4.9 ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอล ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้เอนไซม์อะมิโลไลติคจากเชื้อ *S. fibuligera* หรือเอนไซม์ทางการค้า (Termamyl 120) หมักร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae*

ประเภทของการหมัก	**ปริมาณโปรตีน (%)**		
	0h	72h	**เพิ่มขึ้น (เท่า)**
เอนไซม์ทางการค้า + *S. cerevisiae*	10.34	20.23	0.96
เอนไซม์อะมิโลไลติคจากเชื้อ *S. fibuligera* + *S. cerevisiae*	10.82	19.55	0.81

จากผลการทดลองรูปที่ 4.20 พบว่าเอนไซม์อะมิโลไลติคจากเชื้อ *S. fibuligera* หมักร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงสุด คือ 1.12 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง และเมื่อใช้เอนไซม์ทางการค้า หมักร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงสุด คือ 3.63 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง มีรายงานว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ ที่ใช้ในการหมักเอทานอลจะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ ประมาณ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายโดยเอนไซม์อะมิโลไลติคจะสูงถึงประมาณ 50 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่ต่ำเกินไปทำให้การย่อยสลายแป้งให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลไม่ดี ทำให้ปริมาณน้ำตาลในระบบมีน้อย ไม่เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* จึงทำให้การผลิตเอทานอลไม่มีประสิทธิภาพ เมื่อนำกากเมล็ดข้าวฟ่างจากทั้งสองสภาวะมีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกัน คือ 20 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้งที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 4.9

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

องค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่าง

จากการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ในเมล็ดข้าวฟ่าง ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยว พบว่า มีปริมาณแป้งร้อยละ 80.7 โปรตีนร้อยละ 7.23 ไขมันร้อยละ 3.36 เถ้าร้อยละ 1.27 เส้นใยร้อยละ 1.69 และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 5.75

ภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างด้วยวิธีทางกายภาพ

จากผลการทดลองการปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างโดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ขนาดของเมล็ดข้าวฟ่าง คือ เมล็ดข้าวฟ่างไม่บดและเมล็ดข้าวฟ่างบด ความนุ่มของเมล็ดข้าวฟ่างโดยการแช่น้ำ (Soaked) เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 นาที และการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส โดยวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้ด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริค พบว่า ภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพทางกายภาพ คือ เมล็ดข้าวฟ่างบดแช่น้ำเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมงและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที (SA20) สามารถให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 2.07 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างบดที่แช่น้ำเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที (SA30) และเมล็ดข้าวฟ่างบดโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 และ 30 นาที (A20, A30) ดังแสดงดังตารางที่ 4.2 พบว่าสามารถให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด คือ 1.92, 2.04, 2.06 กรัมต่อลิตรใกล้เคียงกัน เมื่อนำมาทดสอบความแตกต่างอย่างมีระดับนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทดสอบความแตกต่างแบบ Multiple comparison พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงเลือกใช้เมล็ดข้าวฟ่างบดให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 20 นาที โดยพิจารณาถึงค่าใช้จ่ายและระยะเวลาการให้ความร้อนในการปรับสภาพ จึงเลือกใช้ภาวะนี้ในการปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างในงานวิจัย

ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้เชื้อโดยตรงระหว่างเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* และเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

จากผลการทดลองการศึกษาภาวะต่างๆ ได้แก่ อัตราส่วนของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ ช่วงเวลาในการลงเชื้อ *S. cerevisiae* แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* พบว่า การใช้อัตราส่วนของกล้าเชื้อที่อัตราส่วนของเชื้อ 1 : 1 โดยการลงเชื้อ *S. fibuligera* และ *S. cerevisiae* ที่ช่วงระยะเวลา 0 ชั่วโมง โดยใช้เมล็ดข้าวฟ่างที่ปรับสภาพแล้ว 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที สามารถผลิตเอทานอลได้ 10.45 กรัมต่อลิตรที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง และกากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลแล้ว มีปริมาณโปรตีน 38.40 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง

ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคจากเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera*

จากผลการทดลองการศึกษาภาวะต่างๆ ได้แก่ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* พบว่า การใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยแป้งที่ละลาย 30 กรัมต่อลิตร และใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติค โดยเชื้อ *S. fibuligera* ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1.073 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

การผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เอนไซม์อะไมโลไลติคจากเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* เปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า (Termamyl 120L) หมักร่วมกับเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

จากผลการทดลองการศึกษาการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้เอนไซม์อะไมโลไลติคที่ผลิตโดยเชื้อ *S. fibuligera* หมักร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงสุด คือ 1.12 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง และเมื่อใช้เอนไซม์ทางการค้า(Termamyl 120L) หมักร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงสุด คือ 3.63 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง จากการทดลองนี้ กากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อ *S. fibuligera* หมักร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณ 19.55 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง และเมื่อหมักเมล็ดข้าวฟ่างด้วยเอนไซม์ทางการค้าหมักร่วมกับเชื้อ *S.*

cerevisiae สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณ 20.23 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์ที่ นำมาใช้ในการหมักเอทานอลจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ ประมาณ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายวัตถุดิบ คือ เมล็ดข้าวฟ่างโดยเอนไซม์อะมิโลไลติคค่อนข้างสูงถึง 90 องศาเซลเซียส แต่งานวิจัยนี้ เราศึกษาการผลิตเอทานอลแบบ Simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) โดยใส่เอนไซม์ที่ย่อยแป้งในเมล็ดข้าวฟ่างเป็นน้ำตาล และใส่เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ให้เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลเลย ซึ่งทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อาจทำให้ประสิทธิภาพการทำงานเอนไซม์ไม่เหมาะสม มีผลทำให้น้ำตาลในระบบไม่เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการผลิตเอทานอล จึงควรมีการศึกษาปรับปรุงคุณสมบัติของเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลให้สามารถในการเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง

2. เอนไซม์อะมิโลไลติคที่ผลิตได้จากเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* ในงานวิจัยนี้ยังไม่ได้ผ่านการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ ควรนำเอนไซม์ไปผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ เช่น นำไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อะมิโลไลติคที่ผลิตได้ การนำเอนไซม์ไปใช้งานต้องคำนึงความเหมาะสมของคุณสมบัติของเอนไซม์กับภาวะที่เหมาะสมของการหมักด้วย

3. ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่าง ที่ผ่านกระบวนการหมักเอทานอลในงานวิจัยนี้มี

ค่าค่อนข้างสูง ดังนั้นควรมีการนำผลผลิตพลอยได้ ไปศึกษาต่อเพื่อให้เกิดมูลค่าเพิ่ม เนื่องจากวัตถุดิบอาหารหลักที่ใช้มาจากพืช โดยวัตถุดิบเหล่านี้อยู่ในรูปของสารไฟเตท (phytate) ซึ่งไม่สามารถเป็นประโยชน์ต่อสัตว์ได้ เพราะสัตว์กระเพาะเดี่ยวไม่มีน้ำย่อยหรือเอนไซม์ไฟเตส (phytase) เพื่อย่อยสลายสารดังกล่าว ซึ่งต้องอาศัยจุลินทรีย์ จะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยและดูดซึมสารอาหารของสัตว์ดีขึ้น จึงทำให้สัตว์กินอาหารเท่าเดิมแต่สามารถได้คุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้น รวมถึงกรดอะมิโนที่จำเป็นที่ต้องอาศัยจากจุลินทรีย์ ซึ่งไม่สามารถผลิตได้จากธรรมชาติ อันจะช่วยให้เกษตรกรลดต้นทุนในการผลิตสัตว์ได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2543. เทคโนโลยีแป้ง. พิมพ์ครั้งที่ 2.

จุพี ทิพยรักษ์. 2553. โครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวฟ่างสำหรับปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. กรุงเทพมหานคร : สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร : เท็กซ์ แอน เจอร์นัล พับลิเคชัน.

บทบรรณาธิการ. 2550. พลังงานทดแทน.วารสารพลังงานทดแทน 2(5):4.

ประคอง พันธ์ไชย. 2542. การเปรียบเทียบผลผลิตและคุณภาพของสายพันธุ์ข้าวฟ่างหวานจากสถาบันวิจัยพืชเขตร้อนชื้นกึ่งแห้งแล้งนานาชาติ. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ประสิทธิ์ ใจศีล. 2529. ข้าวฟ่าง ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พรเทพ ถนนแก้ว, คณิต วิชิตพันธุ์, พัฒนา เหล่าไพบูลย์และไวกูณฐ์ ฤทธิรุฒม์. รายงานการวิจัยและพัฒนาการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวไปเป็นอาหารสัตว์. ขอนแก่น: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2541.

รณชัย ช่างศรี. 2541. การแข่งขันของข้าวฟ่างหวานและวัชพืชในปลายฤดูฝน.ปัญหาพิเศษ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

รัฐพงศ์ ปกแก้ว. 2545. การเปรียบเทียบกระบวนการหมักแบบ SHF และ SSF เพื่อการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากแป้งมัน สำปะหลังโดยเชื้อ *Aspergiillus niger* และ *Saccharomyces cerevisiae* วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เทพปัญญา เจริญรัตน์. 2545. การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังแบบครั้งคราวโดยการเติมสับสเตรตขึ้นกับพีเอช, วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 163 หน้า.

วราวุฒิ บุญสง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม. เทคโนโลยีการหมัก ในอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, หน้า 1-24.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. ยีสต์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. 1000 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ. ยีสต์: คุณประโยชน์ในอุตสาหกรรม. 2000 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : งานส่งเสริมภาพลักษณ์องค์กร สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก.กรุงเทพมหานคร: สหมิตรออฟเซท, 250 หน้า.

อนุสรณ์ แสงนิ่มนวล. 2550. วิเคราะห์ทิศทางสถานการณ์น้ำมันปี 2550. วารสารพลังงานทดแทน 2(5): 11-14.

ภาษาอังกฤษ

American Association of Cereal Chemist. (A. A. C. C.). 1995. Cereal laboratory method. 9th ed. St. Paul: Am. Assoc. Cereal Chemist.

Association of Official Analytical Chemist. (A. O. A. C.). 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Washington D.C.

Ballesteros M., Oliva J.M., Negro M.J., and Ballesteros. I. 2003. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. Process Biochemistry. 39: 1843-1848.

Barnett, J.A., Payne, R. W. and Yarrow, D. 2000. Yeasts : Characteristics and Identification. 3th ed. United Kinddom : Unites Kingdom at The University Press.

BeMiller, J.N., and Low, N.H. 1998. Carbohydrate Analysis. 167-187. In S.S. Nielsen (ed.).Food analysis. 2nd ed. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.

Berg. C. 1999. World Ethanol Production and Trade to 2000 and Beyond. World Ethanol Report.

Berry, D.R. and Brown, C. 1987. Growth of yeast. In Berry, D.R., Russel, I. and Stewart, G.G.Stewart (eds). Biotechnology. Alen and Unwin, London. pp. 157-199.

Beynum, and Roels. 1985. G.M.A. Beynum and J.A. Roels, Starch conversion technology, Marcel-Dekker, New York, USA. pp. 980.

Beynum, and Roels. 1985. Starch conversion technology. Marcel Dekker, Inc, pp. 361.

Chi, Z.M., Liu, J., and Zhang. W. 2001. Trehalose accumulation from soluble starch by *Saccharomycopsis fibuligera* sdu, Enzyme Microbial Technology. 38 : 240–246.

Chi, Z.M., Liu, J., and Zhang. W. 2009. Inulinase expressing microorganisms and applications of insulinases, Applied Microbiol. Biotechnology. 82 : 211–220.

Cooper, T.G. 1982. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In J.N. Strathurn, E.W.

Jones and J.R. Broach (eds.). The Molecular Biology of The Yeast *Saccharomyces*. Cold Sprind Habor Monograph Series. Cold Spring Habor Laboratories, Cold Spring. pp. 39-99.

De mot. R. 1990. Conversion of Starch by Yeasts. In Yeast Biotechnology and Biocatalysis. New York : Marcel Dekker. pp. 173-175.

De mot, R. and Verachtert. H. 1985. Purification and Characterization of Extracellular Amylolytic Enzyme from the Yeast *Filobasidium capsuligenum*. Applied and Environmental Microbiology. 50(6) : 1474-1482.

Dostalek. M. 1986. Production of lipid from starch by a nitrogen-controlled mixed culture of *S. fibuligera* and *Rhodosporidium toruloides*. Applied Microbiology and Biotechnology. 24: 19-23.

Edgardo, A., Carolina, P., Manue, R., Juanita, F., and Jaime. B. 2008. Selection of Thermotolerant Yeast Strains *Saccharomyces cerevisiae* for Bioethanol Production. Enzyme and Microbial Technology. 2008 : 120–123.

Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P. and Srinivasulu, B. 2002. Optimization of Process Parameters for Glucoamylase Production Under Solid State Fermentation by A Newly Isolated *Aspergillus* species. Process Biochemistry. 38: 615-620.

Galliard, T., and Bowler, P. 1987. Morphology and composition of starch. In Gailliard, T. (Ed.). Starch : Properties and Potential, New York : John Wiley and Sons.

Ghose, T.K. and R.D. Tyagi. 1979. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. Biotechnology. Bioeng. 21
(8): 140 -1420.

Gogoi, B. K., Bezbaruah, R.L., Pillai, K.R. and Baruah, J.N. 1987. Production Purification and Characterization of an α-amylase Produced by *Saccharomycopsis fibuligera*. Journal of Applied Bacteriology. 63: 373-379.

Gonzalez, C. F., Farina. J. I., and De Figueroa L.I.C. 2008. Optimize amylolytic enzymes production in *Saccharomycopsis fibuligera* DSM – 70554 An approach to efficient cassava starch utilization. Enzyme and Microbial Technology. pp. 272-277.

Halasz, A. and Lasztity, R. 1991. Use of yeast biomass in food production. CRC Press, Boca Raton.

Hall, H. H., Hubbard, J., and Eand, F. R. 1950. Composition of the component parts of the sorghum kernel. Cereal Chemistry. 27: 415-420.

Harder, W. and Venhuis, M. 1989. Metabolism of one-carbon compounds. The Yeast: Metabolism
and Physiology of Yeast. In Rose, A.H. and Harrison, J.S. (eds). Vol.3. 2nd ed. Academic Press, SanDiega. pp. 289-316.

Hubbard, J.E., Hall, H.H., and Earle, F.R. 1950. Composition of the component parts of the sorghum kernel. Cereal Chemistry. 27: 415-420.

Horn, C. H., Du Preez, J. C., and Kihan, S. G. 1992. Fermentation of grain sorghum starch by co-cultivation of *Schwanniomyces occidentalis* and *Saccharomyces cerevisiae.* Bioresource Technology. 42: 27-31.

Horn, C. H., Du Preez, J. C., and Kihan. S. G. 1992. Protein enrichment of grain sorghum by submerged culture of the amylolytic yeasts *Schwanniomyces occidentalis* and *Lipomyces kononenkoae.* World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8: 416-422.

Hoseney, R.C. 1994. Principles of cereal science and technology. 2nd ed. Minnesota American Association of Cereal Chemists.

Joseph, S.W., and Charles, W.B. 1970. Composition of sorghum grain and plant. In J.S. Wall and W.M. Roes (ed.), Sorghum production and utilization. USA. Pp. 118-166.

Joseph, S.W. and Jerrold, W.P. 1978. Sorghum dry milling. In Pomeranz, Y. (ed.). Anvances in cereal science and technology. Vol. 2. 199-200. Minnesota : American Association of Cereal Chemists.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry. 31: 426–428.

Montesinos, T. and Navarro, J.M. 2000. Production of alcohol from raw wheat flour by amyloglusidase and *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microbial Technol. 27: 362-370.

Moo-young, M., Lamptey, J., and Girard, P. 1984. Paper pulp mill sludge utilization technology- economic potential for fuel ethanol, methane and SCP production. Biotechnology Advance. 2: 253-272.

Oboh, O. 2006. Nutrient enrichment of cassava peels using a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* spp. solid media fermentation techniques. Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458.

Okamura-Matsui, T., et al. 2003. Discovery of alcoholdehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverage. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 23: 133-144.

Okamura, T., Ogata, T., Minarmimoto, N., Takeno, T., Noda, H., Fukuda, S. and Ohsugi, M. 2001. Characteristics of wine produced by mushroom fermentation. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 65(7): 1596-1600.

Palnitkar, S. and Lachke, A. H. 1990. Efficient simultaneous saccharification and fermentation of agricultural residues by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 26(2): 151-158.

Paturau, J. M. 1989. Sugar series. By-Product of the cane sugar: Introduction to their industrial utilization. 3 rd ed. Amsterdam: Elsevier.

Philppe, S., Kevin, J., and Benjamin. N. 2004. Hydrodynamic Separation of Grain and Stover Components in Corn Silage. Biochemistry and Biotechnology Vol. 113–116.

Lyons, T. P. 1999. Thinking outside the box ethanol production in the next millennium : processor of raw materials, not just ethanol producers, *In* K. Jacques and T.P. Lyons (eds.). The Alcohol Textbook. Alltech Inc., Nicholasville, Kentucky. USA. pp. 1-5.

Reed, G. and Nagodawithana, T.W. 1991. Yeast Technology : Yeast derived products. 2nd ed. New York : Van Nustrand Reinhold.

Rose, A.H. and J.S. Harison. 1970. Yeast Technology : vol. 3. Academic Press Inc., New York. pp. 264.

Saha, B.C. and Ueda, S. 1979. Raw starch adsorption elution and digestion behavior of glucoamylase of *Rhizopus niveus*. Journal of Fermentation Technology. 61(1): 67-72.

Schaffert, R. E. and Gourley, L. M. 1982. Sorghum as and energy source. In sorghum in the eighties. Proceedings of the international symposium on sorghum volume 2. 2-7 November 1981, ICRISAT Center, Patancheru, Andhra Pradsh. India. pp. 605-623.

Shigechi H, et al. 2002. Efficent ethanol production from through development of novel flocculent yeast strains displaying glucoamylase and co-displying of secreting α-amylase. J Mol Cat B. 17: 179–187.

Subramaniam, A.R. 1986. Drought and desertification studies in agriculture in India. Proceedings of the WMO Workshop on Drought and Desertification (RA II and RA V), December 1986, Pune, India.

Sukhumavasi, E. and Doelle. H.W. 1989. A one-step process for the production of single-cell protein and amyloglucosidase. Applied Microbiology and Biotechnology. 30: 135-140.

Suresh, K et al., 1999,Utilization of damage sorghum and rice grains for ethanal production by simultaneous saccharification and fermentation, Bioresource Technilogy. 68(3): 301-304.

Thierry, M. and N. Jean-Marie. 2000. Production of alcohol from raw wheat flour by amyloglucosidase and *S.cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technol. 27: 362-370.

Van der Vaart JM, Caro LHP, Chapman JW, Klis FM, Verrips. CT. 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol. 177: 3104–3110.

Vanderlip, R.L. 1979. How a sorghum plant develops. Coop. Extension Sew., Kansas State Univ., Manhattan. Venkatesh, K. V. 1997. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose to Lactic Acid. Bioresource Technology. 62: 91-98

Verma, G., P. Nigam, D. Singh and K. Chaudhary. 2000. Bioconversion of Starch to Ethanol in a Single-step Process by Coculture of Amylolytic Yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* 21. Bioresource Technology. 72: 261-266.

Waller, G.M. 1998. Yeast Physiology and Biotechnology. John Wiley and Sons, Chichester.

Watson, S.A. and P.E. Ramstad. 1987. Corn Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN. pp. 357.

Watson, S.A., Sander, E.H., Wakely, R.D., and William, C.B. 1955. Peripheral Cells of the endosperms of grain sorghums and their influence on starch purification. Cereal Chemistry 32: 165-182.

Whistler, R, L., and Paschall, E. F. 1965. Enzyme in synthesis and hydrolysis of starch. Chemistry and technology. Vol 1, (pp. 136), New York : Academic Press Inc.

Whistler, R, L. and Deniel, J. R. 1984. Molecular structure of starch. In Whistler, R. L., BeMiller, J. N., and Paschall, E. F. (Eds.), Starch : Chemistry and Technology. 2nd Ed. 153–178. Florida : Academic Press, Inc.

Yang, S.S. and Wang, J.Y. 1999. Protease and Amylase Production of *Streptomyces rimosus* Amylolytic Enzyme. Applied and Environmental Microbiology. 44(2): 301-307.

Vijaya Sarathi Reddy, O. and Basappa, S. C. 1996. Direct fermentation of cassava starch to ethanol by mixed cultures of *Endomycopsis fibuligera* and *Zymomonas mobilis* synergism and limitation. Biotechnology letters. 11: 1315-1318.

Zhenming, C., Zhe C., Guanglei, L., Fang W., Liang J., and Tong, Z. 2009. *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. Biotechnology Advances. 27: 423-431.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. yeast extract peptone dextrose (YPD) medium

yeast extract	1.0	เปอร์เซ็นต์
peptone	1.0	เปอร์เซ็นต์
D-glucose หรือ dextrose	2.0	เปอร์เซ็นต์

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน (ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 1

Soluble starch	2.0	เปอร์เซ็นต์
peptone	1.0	เปอร์เซ็นต์
yeast extract	0.5	เปอร์เซ็นต์
$(NH_4)_2SO_4$	0.1	เปอร์เซ็นต์
$MgSO_4 .7H_2O$	0.01	เปอร์เซ็นต์

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 2 (Jatinder, 2006)

Soluble starch	3	เปอร์เซ็นต์
$(NH_4)_2SO_4$	0.5	เปอร์เซ็นต์
KH_2PO_4	0.1	เปอร์เซ็นต์
$MgSO_4 .7H_2O$	0.1	เปอร์เซ็นต์
NaCl	0.01	เปอร์เซ็นต์
$CaCl_2$	0.01	เปอร์เซ็นต์

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรที่ 3 (Mohames, 2007)

Soluble starch	0.5	เปอร์เซ็นต์
yeast extract	0.4	เปอร์เซ็นต์

KH_2PO_4	0.3 เปอร์เซ็นต์
$MgSO_4 .7H_2O$	0.05 เปอร์เซ็นต์

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

5. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรที่ 4 (Suresh, 1999)

Soluble starch	2 เปอร์เซ็นต์
peptone	2 เปอร์เซ็นต์
yeast extract	1 เปอร์เซ็นต์

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

6. อาหารใช้สำหรับผลิตเอทานอลสูตรดัดแปลง

เมล็ดข้าวฟ่าง	10 เปอร์เซ็นต์
$(NH_4)_2SO_4$	0.5 เปอร์เซ็นต์
KH_2PO_4	0.1 เปอร์เซ็นต์
$MgSO_4 .7H_2O$	0.1 เปอร์เซ็นต์
NaCl	0.01 เปอร์เซ็นต์
$CaCl_2$	0.01 เปอร์เซ็นต์

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

ภาคผนวก ข

1. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

นำตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร เติม 1.2 N H_2SO_4 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที รอให้เย็น นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (reducing sugar) โดยวิธี DNSA (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

2. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (reducing sugar) โดยวิธี DNSA (Bernfeld, 1955)

สารเคมี

1. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำขจัดไอออน 50 มิลลิลิตร และเติมโพแทสเซียมทาร์เทรต 30 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำขจัดไอออน เก็บในขวดสีชา

วิธีการทดลอง

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน ปิดปากหลอดทดลอง นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็น

3. เติมน้ำขจัดไอออน 10 มิลลิลิตร ลงในสารละลายผสมในข้อ 2 ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

4. ทำ blank โดยใช้น้ำขจัดไอออนแทนสารละลายตัวอย่าง แล้วนำไปทำการทดลองเช่นเดียวกันกับสารละลายตัวอย่าง

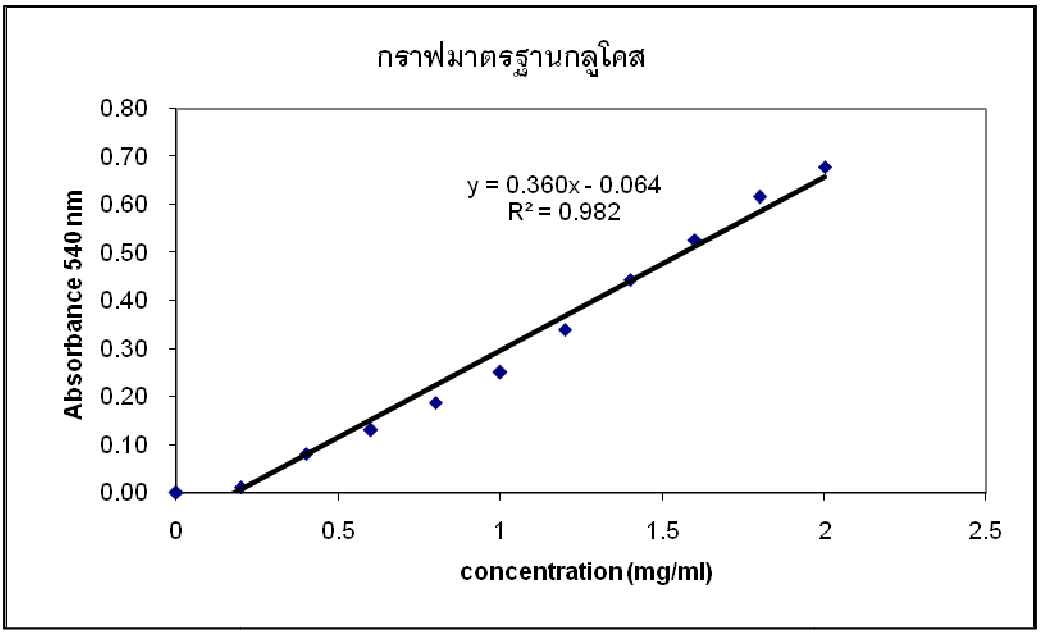
5. เทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0 -0.1 กรัมต่อลิตร

การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 1 กรัมต่อลิตร

2. เจือจางให้ได้ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร

3. นำไปทำการทดลองเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่าง แล้วนำไปเขียนกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส แสดงในรูปที่ ก.1



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

3. **การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีเจลดาห์ล** (Kjeldahl protein, A.O.A.C., 1975)

ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม สำหรับเซลล์ หรือดูดปริมาตร 1 มิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างน้ำหมัก ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วยโปรแตสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟตอัตราส่วน 95:5 ลงไปจำนวน 7 กรัม จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมจนสารละลายใส เป็นเวลา 45 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปประกอบเข้ากับเครื่องกลั่นไนโตรเจน และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50-60 มิลลิลิตร หรือจนสารละลายเป็นสีดำ แล้วกลั่นจับก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติมอินดิเคเตอร์ 3 หยด ซึ่งเป็นเมทิลเรดเมทิลลีนบลู (methyl red methylene blue) กลั่นจนสารละลายบอริกมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่กลั่นได้มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรตแล้วคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน หรือปริมาณโปรตีน

เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน = (ปริมาตรกรดเกลือ x ความเข้มข้นกรดเกลือ x 1.4)/ น้ำหนักแห้ง

เปอร์เซ็นโปรตีน = เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน x 6.25

4. การหาปริมาณร้อยละของความชื้น (% Moisture)

วิธีการทดลอง

1. นำ Aluminium dish ไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่ 100±5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator

เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

2. ชั่งตัวอย่าง 2 – 5 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ใน Aluminium dish

3. นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100±5°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4. นำ Aluminium dish กับตัวอย่างที่ผ่านการอบไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่ง แล้วนำไปอบจนได้น้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\%\ \text{Moisture} = \frac{(\text{Wt. sample} - \text{Wt. sample หลังอบ})}{\text{Wt. sample}} \times 100$$

5. การหาปริมาณร้อยละของไขมัน (% Fat)

สารเคมี

Petroleum ether

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างที่แห้ง 2 – 3 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในกระดาษกรอง แล้วนำไปใส่ใน Thimble ใน Extraction tube ของ Soxhlet apparatus

2. ใส่ 250 มล. Petroleum ether ลงในขวดก้นกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

3. นำไป Reflux บน Heating mantle (โดยใช้ Water bath แทน) ใช้อุณหภูมิปานกลาง โดยให้อัตราการกลั่นตัวของ Petroleum ether 2 – 3 หยด / วินาที ใช้เวลาในการ Reflux ≃ 10 ชั่วโมง

4. ระเหยเอา Petroleum ether ออกจากขวดก้นกลม (Round bottom flask) ที่สกัดไขมัน

5. จากนั้นนำไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่ 100±5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Fat} = \frac{(\text{Wt. ขวดก้นกลมกับน้ำมัน} - \text{Wt. ขวดก้นกลม})}{\text{Wt. sample}} \times 100$$

6. การหาปริมาณร้อยละของเส้นใยหยาบ (% Fiber)

สารเคมี

1. Sulfuric acid
2. Sodium hydroxide
3. DI Water
4. Ethyl alcohol

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างแห้งที่สกัดไขมันออกแล้ว (ยกเว้นกรณีที่ไขมันน้อยกว่า 1%) 2 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask 500 มล.
2. เติม 50 มล. 5% H_2SO_4 และเติม 200 มล. DI Water
3. ต้มให้เดือดนาน 30 นาที บน Hot plate (ขณะต้มให้หมุน Erlenmeyer flask เป็นครั้งคราวเพื่อไม่ให้มีส่วนแข็งติด)
4. นำมากรองในชุดกรองผ่านกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) โดยใช้ Suction pump ล้าง Erlenmeyer flask ด้วยน้ำร้อน 50 – 70 มล. แล้วเทลงผ่านกระดาษกรอง
5. ใช้น้ำร้อน 50 มล. ล้างซ้ำอีก 2 – 3 ครั้ง
6. นำกากที่ได้ใส่ใน Erlenmeyer flask เติม 50 มล. 5% NaOH เติม 200 มล. DI Water
7. ต้มให้เดือดนาน 30 นาที บน Hot plate (ขณะต้มให้หมุน Erlenmeyer flask เป็นครั้งคราวเพื่อไม่ให้มีส่วนแข็งติด)
8. กรองโดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 4 และ 5

9. ล้างด้วย 25 มล. 1.25% H_2SO_4 ล้างตามด้วยน้ำร้อน 50 มล. และ 25 มล. Alcohol ตามลำดับ นำกระดาษกรองพร้อมกากเส้นใยใส่ใน Crucible ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

10. นำไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่ 100±5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

11 นำไปเผาที่อุณหภูมิ 600±5°C เป็นเวลานาน 30 นาที ทำให้เย็นใน Desiccator ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง และนำไปเผาจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Fiber} = \frac{\text{(Wt. sample หลังอบ – Wt.กระดาษกรอง) – Wt. sample หลังเผา}}{\text{Wt. sample}} \times 100$$

7. การหาปริมาณร้อยละของเถ้า (% Ash)

วิธีการทดลอง

1. นำ Crucible ไปเผาที่เตาเผา ที่ 550±5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

2. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ใน Crucible

3. นำไปเผาบน Hot plate ในตู้ดูดควัน (Hood) จนหมดควันสีดำ

4. นำไปเผาในเตาเผาที่ 550±5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก และนำไปเผาจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Ash} = \frac{\text{Wt. sample หลังเผา}}{\text{Wt. sample}} \times 100$$

8. การหาปริมาณร้อยละของคาร์โบไฮเดรต (% Carbohydrate)

% Carbohydrate = 100 – %Protein – %Fat – %Fiber - %Ash

(A.O.A.C. 1995. **Official Methods of Analysis of AOAC International 16th ed.**, Virginia : Association of Official. Analytical Chemists International.)

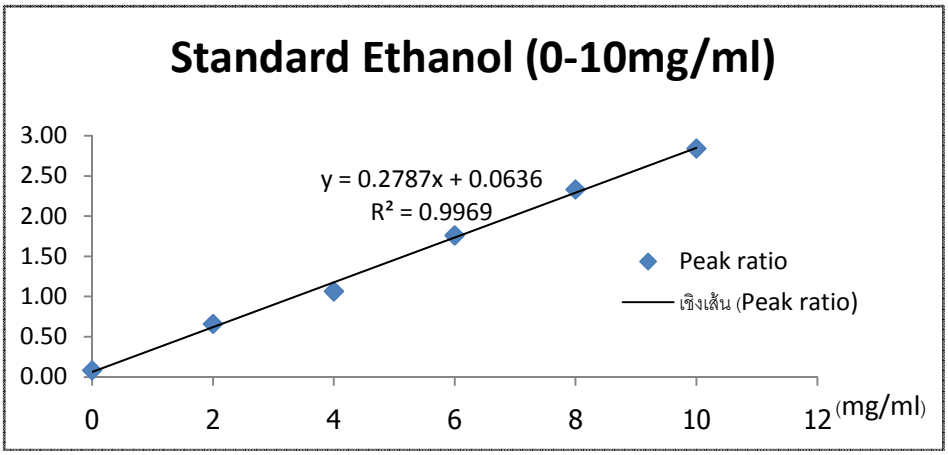
9. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

วิธีการ

1. ทำ standard curve ของ ethanol โดยเตรียม 0 – 10.0 mg/ml
2. ผสมตัวอย่าง std ethanol 1 มิลลิลิตร กับ 3 g/l propanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (inter Std)
3. ฉีด GC 1ไมโครลิตร ตัวอย่างที่ใช้ฉีด GC ต้อง centrifuge ก่อนที่ 10000 rpm นำไปกรองแยกส่วนใสและส่วนแข็ง จากนั้นทำแบบเดียวกับข้อ 2และ3

วิธีการคำนวณ

ค่า Peak area ได้จากการวัดด้วยเครื่อง Gas Liquid Chromatography ในการคำนวณนำค่า Peak area ของเอทานอลมาตรฐานหารด้วย area ของ propanol จะได้ค่าเป็น ratio ไป plot กราฟมาตรฐานของเอทานอล จากนั้นค่า area ของตัวอย่างหารด้วย area ของ propanol ได้ ratio จากนั้นนำไปหาค่าปริมาณเอทานอลจากกราฟมาตรฐาน ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร (g/l)



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานเอทานอล

10. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายน้ำแป้งสุก 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย acetate buffer 0.1 M pH 5.8
2. สารละลาย 0.1 M acetate buffer pH 5.8
3. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS)

วิธีในการวิเคราะห์

1. เตรียมสับสเตรท โดยใช้สารละลายน้ำแป้งสุกปริมาตร 2 มิลลิลิตร สารละลาย acetate buffer 0.1 M pH 5.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. เติมเอนไซม์ความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปในข้อ 1 นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 10 นาที
3. เติม DNS resgent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาทีและทิ้งไว้ให้เย็น
4. เติมน้ำกลั้นหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.1 M acetate buffer แทนเอนไซม์เป็น blank

วิธีการคำนวณค่า Unit of enzyme

1 หน่วยเอนไซม์ = 1 µmole ของ substrate ที่ถูกย่อยใน 1 นาที
= 1 µmole ของ glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที
= 0.18 มิลลิกรัม ของ glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

ถ้า 0.18 mg glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า 1 หน่วย

1 mg glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 10 นาที มีค่า $\frac{1}{0.18 \times 10}$ หน่วย

$= 0.556$ นาที

เมื่อใช้เอนไซม์ 0.5 ml สามารถปล่อย glucose B mg ใน 10 นาที มีค่า

$= B \times 0.556$ หน่วย

เมื่อใช้เอนไซม์ 1 ml สามารถปล่อย glucose B mg ใน 10 นาที มีค่า

$= (B \times 0.556)/0.5$ หน่วย

ภาคผนวก ค

ตารางสถิติ

1. การปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างด้วยวิธีทางกายภาพ

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: total_sugar

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1266.270(a)	27	46.899	17.477	.000
Intercept	2892.753	1	2892.753	1078.001	.000
condition	400.815	6	66.803	24.894	.000
Style	265.764	1	265.764	99.038	.000
weight	359.276	1	359.276	133.886	.000
condition * Style	33.565	6	5.594	2.085	.087
condition * weight	70.285	6	11.714	4.365	.003
Style * weight	104.442	1	104.442	38.921	.000
condition * Style * weight	32.123	6	5.354	1.995	.100
Error	75.136	28	2.683		
Total	4234.160	56			
Corrected Total	1341.407	55			

a. R Squared = .944 (Adjusted R Squared = .890)

Homogeneous Subsets

total_sugar

	condition	N	Subset			
		1	2	3	4	1
Tukey HSD(a,b)	Raw	8	2.3931			
	Autoclaved 121oc 10 Min	8	4.6100	4.6100		
	Soaked 2 Hr and Autoclaved 121oc 10 Min	8		6.3638	6.3638	
	Autoclaved 121oc 20 Min	8			8.5238	8.5238
	Autoclaved 121oc 30 Min	8				9.5650
	Soaked 2 Hr and Autoclaved 121oc 20 Min	8				9.7513
	Soaked 2 Hr and Autoclaved 121oc 30 Min	8				9.8813
	Sig.		.249	.514	.276	.771
Duncan(a, b)	Raw	8	2.3931			
	Autoclaved 121oc 10 Min	8		4.6100		
	Soaked 2 Hr and Autoclaved 121oc 10 Min	8		6.3638		
	Autoclaved 121oc 20 Min	8			8.5238	
	Autoclaved 121oc 30 Min	8			9.5650	

Soaked 2 Hr and Autoclaved 121oc 20 Min	8			9.7513	
Soaked 2 Hr and Autoclaved 121oc 30 Min	8			9.8813	
Sig.		1.000	.072	.196	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 3.508.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.

b. Alpha = .05.

2. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้วโดยใช้เชื้อโดยตรงระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*

2.1 ศึกษาการกระบวนการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เชื้อชนิดเดียวและใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: EtOH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	228.545(a)	5	45.709	25.239	.000
Intercept	205.234	1	205.234	113.322	.000
sample	168.168	2	84.084	46.428	.000
cultivation_time	39.546	1	39.546	21.836	.001
sample * cultivation_time	20.831	2	10.416	5.751	.018
Error	21.733	12	1.811		
Total	455.512	18			
Corrected Total	250.278	17			

a. R Squared = .913 (Adjusted R Squared = .877)

Homogeneous Subsets

EtOH

sample		N	Subset		
		1	2	3	1
Tukey HSD(a,b)	*Saccharomyces cerevisiae*	6	.1067		
	Saccharomyrocopsis fibuligera	6		2.5633	
	S.F+S.C	6			7.4600
	Sig.		1.000	1.000	1.000
Duncan(a, b)	*Saccharomyces cerevisiae*	6	.1067		
	Saccharomyrocopsis fibuligera	6		2.5633	
	S.F+S.C	6			7.4600
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1.811.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b. Alpha = .05.

2.2 ศึกษาอัตราส่วนของกล้าเชื้อในการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: EtOH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	243.104(a)	7	34.729	18.749	.000
Intercept	615.701	1	615.701	332.397	.000
Inoculum_time	148.105	3	49.368	26.652	.000
cultivation_time	83.179	1	83.179	44.906	.000
Inoculum_time * cultivation_time	11.820	3	3.940	2.127	.137
Error	29.637	16	1.852		
Total	888.443	24			
Corrected Total	272.741	23			

a. R Squared = .891 (Adjusted R Squared = .844)

Homogeneous Subsets

EtOH

		N	Subset		
	Inoculum_time	1	2	3	1
Tukey HSD(a,b)	S.F0+S.C0_non	6	.9117		
	S.F0+S.C6	6		5.6683	
	S.F0+S.C12	6		6.2200	
	S.F0+S.C0	6		7.4600	
	Sig.		1.000	.144	
Duncan(a,b)	S.F0+S.C0_non	6	.9117		
	S.F0+S.C6	6		5.6683	
	S.F0+S.C12	6		6.2200	6.2200
	S.F0+S.C0	6			7.4600
	Sig.		1.000	.493	.134

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1.852.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b. Alpha = .05.

2.3 ศึกษาเวลาในการลงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ระหว่างกระบวนการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: EtOH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	243.104(a)	7	34.729	18.749	.000
Intercept	615.701	1	615.701	332.397	.000
Inoculum_time	148.105	3	49.368	26.652	.000
cultivation_time	83.179	1	83.179	44.906	.000
Inoculum_time * cultivation_time	11.820	3	3.940	2.127	.137
Error	29.637	16	1.852		
Total	888.443	24			
Corrected Total	272.741	23			

a. R Squared = .891 (Adjusted R Squared = .844)

Homogeneous Subsets

EtOH

		N	Subset		
	Inoculum_time	1	2	3	1
Tukey HSD(a,b)	S.F0+S.C0_non	6	.9117		
	S.F0+S.C6	6		5.6683	
	S.F0+S.C12	6		6.2200	
	S.F0+S.C0	6		7.4600	
	Sig.		1.000	.144	
Duncan(a, b)	S.F0+S.C0_non	6	.9117		
	S.F0+S.C6	6		5.6683	
	S.F0+S.C12	6		6.2200	6.2200
	S.F0+S.C0	6			7.4600
	Sig.		1.000	.493	.134

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1.852.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b. Alpha = .05.

2.4 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: EtOH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	209.733(a)	7	29.962	36.546	.000
Intercept	303.953	1	303.953	370.746	.000
nitrogen_source	102.979	3	34.326	41.869	.000
cultivation_time	48.025	1	48.025	58.579	.000
nitrogen_source * cultivation_time	58.729	3	19.576	23.878	.000
Error	13.117	16	.820		
Total	526.803	24			
Corrected Total	222.850	23			

a. R Squared = .941 (Adjusted R Squared = .915)

Homogeneous Subsets

EtOH

	nitrogen_source	N	Subset		
		1	2	3	1
Tukey HSD(a,b)	20% carbon	6	1.6133		
	5% carbon	6	1.7950		
	15% carbon	6		4.1117	
	10% carbon	6			6.7150
	Sig.		.985	1.000	1.000
Duncan(a, b)	20% carbon	6	1.6133		
	5% carbon	6	1.7950		
	15% carbon	6		4.1117	
	10% carbon	6			6.7150
	Sig.		.733	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .820.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b. Alpha = .05.

2.5 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: EtOH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	301.460(a)	7	43.066	15.236	.000
Intercept	715.697	1	715.697	253.208	.000
nitrogen_source	103.788	3	34.596	12.240	.000
cultivation_time	59.535	1	59.535	21.063	.000
nitrogen_source * cultivation_time	138.136	3	46.045	16.290	.000
Error	45.224	16	2.827		
Total	1062.381	24			
Corrected Total	346.684	23			

a. R Squared = .870 (Adjusted R Squared = .812)

Homogeneous Subsets

EtOH

		N	Subset		
	nitrogen_source	1	2	3	1
Tukey HSD(a,b)	ammonium di hydrogen phosphate	6	2.4483		
	ammonium choride	6	4.6050	4.6050	
	urea	6		7.3300	7.3300
	ammonium sulphase	6			7.4600
	Sig.		.159	.055	.999
Duncan(a, b)	ammonium di hydrogen phosphate	6	2.4483		
	ammonium choride	6		4.6050	
	urea	6			7.3300
	ammonium sulphase	6			7.4600
	Sig.		1.000	1.000	.895

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 2.827.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b. Alpha = .05.

2.6 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอทานอลและโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: EtOH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	76.744(a)	7	10.963	1.641	.195
Intercept	995.289	1	995.289	148.958	.000
nitrogen_source	71.942	3	23.981	3.589	.037
cultivation_time	.018	1	.018	.003	.959
nitrogen_source * cultivation_time	4.783	3	1.594	.239	.868
Error	106.907	16	6.682		
Total	1178.940	24			
Corrected Total	183.651	23			

a. R Squared = .418 (Adjusted R Squared = .163)

Homogeneous Subsets

EtOH

	nitrogen_source	N	Subset	
		1	2	1
Tukey HSD(a,b)	0.1% Urea	6	3.6617	
	0.3% Urea	6	6.3907	6.3907
	0.7% Urea	6	7.4833	7.4833
	0.5% Urea	6		8.2233
	Sig.		.088	.619
Duncan(a, b)	0.1% Urea	6	3.6617	
	0.3% Urea	6	6.3907	6.3907
	0.7% Urea	6		7.4833
	0.5% Urea	6		8.2233
	Sig.		.086	.261

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 6.682.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b. Alpha = .05.

3. หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะมิไลติค

3.1 คัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคในกระบวนการหมักโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Activity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2.156[a]	19	.113	3.069	.001
Intercept	14.178	1	14.178	383.381	.000
source	.240	3	.080	2.160	.108
cultivation_time	1.494	4	.373	10.098	.000
source * cultivation_time	.423	12	.035	.953	.507
Error	1.479	40	.037		
Total	17.813	60			
Corrected Total	3.636	59			

a. R Squared = .593 (Adjusted R Squared = .400)

Homogeneous Subsets

Activity

	source	N	Subset 1	Subset 2
Tukey HSD[a]	สูตรที่ 3	15	.4141	
	สูตรที่ 4	15	.4547	
	สูตรที่ 1	15	.4906	
	สูตรที่ 2	15	.5850	
	Sig.		.087	
Duncan[a]	สูตรที่ 3	15	.4141	
	สูตรที่ 4	15	.4547	.4547
	สูตรที่ 1	15	.4906	.4906
	สูตรที่ 2	15		.5850
	Sig.		.312	.086

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .037.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

cultivation_time

Homogeneous Subsets

Activity

	cultivation_time	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
Tukey HSD[a]	0 h	12	.2044		
	120 h	12		.4409	
	72 h	12		.5274	
	48 h	12		.6116	
	24 h	12		.6461	
	Sig.		1.000	.087	
Duncan[a]	0 h	12	.2044		
	120 h	12		.4409	
	72 h	12		.5274	.5274
	48 h	12			.6116
	24 h	12			.6461
	Sig.		1.000	.277	.161

3.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคในกระบวนการหมักโดยเชื้อยีสต์ ***Saccharomycopsis fibuligera***

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Activity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5.661[a]	19	.298	9.495	.000
Intercept	34.274	1	34.274	1092.240	.000
source	.803	3	.268	8.528	.000
cultivation_time	4.371	4	1.093	34.825	.000
source * cultivation_time	.487	12	.041	1.294	.260
Error	1.255	40	.031		
Total	41.190	60			
Corrected Total	6.916	59			

a. R Squared = .819 (Adjusted R Squared = .732)

Homogeneous Subsets

Activity

	source	N	Subset 1	Subset 2
Tukey HSD[a]	1%carbon	15	.5618	
	5%carbon	15		.7784
	3%carbon	15		.8233
	7%carbon	15		.8597
	Sig.		1.000	.595
Duncan[a]	1%carbon	15	.5618	
	5%carbon	15		.7784
	3%carbon	15		.8233
	7%carbon	15		.8597
	Sig.		1.000	.243

cultivation_time

Activity

	cultivation_time	N	Subset 1	Subset 2
Tukey HSD[a]	0 h	12	.2178	
	48 h	12		.8567
	120 h	12		.8839
	24 h	12		.8955
	72 h	12		.9251
	Sig.		1.000	.877
Duncan[a]	0 h	12	.2178	
	48 h	12		.8567
	120 h	12		.8839
	24 h	12		.8955
	72 h	12		.9251
	Sig.		1.000	.396

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .031.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

3.3 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคในกระบวนการหมักโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Activity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.153(a)	3	.051	8.320	.008
Intercept	7.435	1	7.435	1215.252	.000
source	.153	3	.051	8.320	.008
cultivation_time	.000	0	.	.	.
source * cultivation_time	.000	0	.	.	.
Error	.049	8	.006		
Total	7.637	12			
Corrected Total	.202	11			

a. R Squared = .757 (Adjusted R Squared = .666)

Homogeneous Subsets

Activity

	source	N	Subset	
		1	2	1
Tukey HSD(a,b)	peptone	3	.6579	
	yeast extracrt	3	.7393	
	Ammonium sulfate	3	.7856	.7856
	Urea	3		.9658
	Sig.		.264	.086
Duncan(a, b)	peptone	3	.6579	
	yeast extracrt	3	.7393	
	Ammonium sulfate	3	.7856	
	Urea	3		.9658
	Sig.		.091	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .006.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

3.4 ศึกษาความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะมิโลไลติคในกระบวนการหมักโดยเชื้อยีสต์ ***Saccharomycopsis fibuligera***

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Activity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.149(a)	3	.050	10.959	.003
Intercept	11.361	1	11.361	2500.157	.000
source	.149	3	.050	10.959	.003
cultivation_time	.000	0	.	.	.
source * cultivation_time	.000	0	.	.	.
Error	.036	8	.005		
Total	11.546	12			
Corrected Total	.186	11			

a. R Squared = .804 (Adjusted R Squared = .731)

Homogeneous Subsets

Activity

	source	N	Subset	
		1	2	1
Tukey HSD(a,b)	0.1%Urea	3	.8134	
	0.5%Urea	3	.9236	.9236
	0.3%Urea	3		1.0729
	0.7%Urea	3		1.0821
	Sig.		.263	.079
Duncan(a, b)	0.1%Urea	3	.8134	
	0.5%Urea	3	.9236	
	0.3%Urea	3		1.0729
	0.7%Urea	3		1.0821
	Sig.		.080	.870

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .005.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายภูมิมาศ สนั่นเสียง เกิดวันที่ 11 มกราคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดสระบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เมื่อปีการศึกษา 2550 ต่อมาได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551

การเสนอผลงานวิจัย

Pumimas Sanunsieng. and Siriluk, Teeradakorn., Ethanol production from grain sorghum using a mixed culture of amylolytic yeast and *Saccharomyces cerevisiae*. The 22nd Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology TSB2010 : Biotechnology for Healthy Living, 20-22 October, 2010, Songkla University, Trang, Thailand.