

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเอทานอลและเอโนไซม์เฝ้าระวังโรคดีคาร์บอกซิเลสจากลำไยอบแห้ง



ธงไชย สุคาร์รัตน์ โรจนวิชยากร นุชยงค์

รฟ.
ช 1217
2550

เลขที่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

83994

23 ก.ย. 2551

b. 119 75290
i.....

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการพิเศษ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Production of Ethanol and Pyruvate Decarboxylase from Dried Longan



A special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง การผลิตเอทานอลและเอโนไซม์ไฟรูเวตดีคาร์บอกซิเลสจากลำไยอบแห้ง

นักศึกษา ธงไชย โจนวนิชยากร รหัสนักศึกษา 47050127

สุดารัตน์ นุชขงค์ รหัสนักศึกษา 47050170

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร

ลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์

บันทึก

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ	
กรรมการ อ. คณิงกานต์ กลั่นบุศย์	
กรรมการ ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์	

..... นวต นนท

(รศ.ดร. นวตพรณ ฒ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการพิเศษตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ของคณะ วิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยโครงการสามารถ ประสบความสำเร็จได้ เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ของ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ผู้เป็น อาจารย์ที่ปรึกษา จึงขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาให้ความรู้ และให้ คำปรึกษาตลอดการดำเนินงานโครงการพิเศษนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ และ อ. หนึ่งกานต์ กลั่นบุศย์ ที่เสียสละเวลามา เป็นประธานกรรมการ และกรรมการในการสอบโครงการพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. นพพล เล็กสวัสดิ์ ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะอุตสาหกรรม การเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่วิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟรูเวตตีคาร์บอกซิเลส ค่า ปริมาณน้ำตาลต่างๆ และปริมาณของเอทานอล ให้มา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษา และเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ ระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบคุณ พี่ประสิทธิ์ พี่เอก พี่วิทยา และเพื่อนๆทุกคน ที่ได้ช่วยเหลือทุกอย่างอย่างจนทำให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ธงไชย โรจนวิชยากร

สุคาร์ตัน นุชยงค์

โครงการพิเศษเรื่อง	การผลิตเอทานอลและเอนไซม์ไพรูเวตคีคาร์บอกซิเลสจากลำไยอบแห้ง
นักศึกษา	ธงไชย โธณวนิชยากร รหัสนักศึกษา 47050127 สุภารัตน์ นุชขงค์ รหัสนักศึกษา 47050170
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	พ.ศ. 2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

บทคัดย่อ

ลำไยอบแห้งเป็นผลไม้ที่มีผลผลิตออกมามาก จึงทำให้ราคาตกต่ำ และเหลือค้างในคลังสินค้าตั้งแต่ปีพ.ศ. 2546-2547 ได้ถูกนำมาทำให้เกิดประโยชน์และเพิ่มมูลค่าขึ้น โดยการนำมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตเอทานอลและเอนไซม์ไพรูเวตคีคาร์บอกซิเลสจากเชื้อยีสต์ *Candida utilis* ที่มีอยู่ในประเทศไทย การผลิตจะเริ่มจากการคัดเลือกเชื้อ *C. utilis* ทั้ง 6 สายพันธุ์มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด คือ YM medium น้ำลำไยอบแห้ง และน้ำลำไยอบแห้งพร้อมกาก มาทำการเพาะเลี้ยง จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสม คือสายพันธุ์ 5001 ซึ่งให้เอทานอลร้อยละ 3.4 และเอนไซม์ไพรูเวตคีคาร์บอกซิเลส 1.229 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มาทำการทดลองเพาะเลี้ยงในถังหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื่อน้ำลำไยอบแห้ง และทำการวิเคราะห์ค่าปริมาณสารต่างๆ ซึ่ง *C. utilis* TISTR 5001 เมื่อเริ่มการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมงที่ 0) จนถึงชั่วโมงที่ 24 จะสามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณร้อยละ 1.0 ค่า pH เริ่มต้นจาก 6 ลดลงเหลือ 4.48 ค่ามวลชีวภาพแห้งเพิ่มขึ้นจากจุดเริ่มต้น 6.27 กรัมต่อลิตร โดยที่ยีสต์ใช้น้ำตาลทั้งหมด 194.0 กรัมต่อลิตร และมีค่าโปรตีนละลายน้ำเพิ่มขึ้น 90.769 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่พบค่ากิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ไพรูเวตคีคาร์บอกซิเลส

Special Project Title	Production of Ethanol and Pyruvate decarboxylase from Dried Longan
Name	Thongchai Rojanawanitchayakorn Sudarat Nootyong
Program	Biotechnology
Academic Year	2007
Seminar Advisor	Vorapat Sanguanchaipaiwong

ABSTRACT

A lot of dried longans were over-stock since 2003-2004. Because of its high sugar content, this fruit product was utilized as a medium for ethanol and pyruvate decarboxylase (PDC) production of Thai *Candida utilis* isolates. This study included the screening of 6 stains to culture in 3 media; YM medium, dried longan extract juice and dried longan fruit extract juice with the addition of pulp. Subsequently, the suitable stain was *C. utilis* TISTR 5001 resulting 3.4% of ethanol and 1.229 U/mg of protein in dried longan extract juice. To investigated ethanol and PDC production of *C. utilis* TISTR 5001 in 5-L fermenter, quantity analysis had been carried on. The two cultivation periods continued for 24 hours. The final ethanol concentration was approximately 1.0% and pH decreased from 6 to 4.48. Dry cell mass concentration increased to 6.27 g/L and total sugars utilized by yeast were 194 g/L. and soluble protein increased to 90.769 mg/L. Nonetheless, the activity of PDC could not found in these conditions.

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฉ
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ/ที่มาของ โครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	3
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2. ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 เอทานอล	4
2.1.1 กระบวนการผลิตเอทานอล	6
2.1.2 การหมักเอทานอล	7
2.2 <i>Candida</i>	9
2.3 Pyruvate decarboxylase (PDC)	11
2.4 ลำไย	14
2.4.1 ประโยชน์ของลำไย	15
2.4.2 พันธุ์ลำไย	15
2.4.3 เครื่องอบแห้ง	15
2.4.4 ขั้นตอนการอบเนื้อลำไย	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

2.4.5	คุณค่าทางอาหารของลำไย	18
3.	วิธีการทดลอง	19
3.1	เชื้อจุลินทรีย์	19
3.2	สารเคมี	19
3.3	อุปกรณ์	20
3.4	อาหารเลี้ยงเชื้อ	21
3.4.1	อาหารเลี้ยงเชื้อ YM	21
3.4.2	อาหารเลี้ยงเชื้อลำไยอบแห้ง	21
3.5	การเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์	21
3.5.1	อาหารเลี้ยงเชื้อ YM	22
3.5.2	การเพาะเลี้ยงในถังหมัก	22
3.6	การวิเคราะห์ปริมาณสารทางเคมี	23
3.6.1	น้ำหนักแห้งของเซลล์	23
3.6.2	ความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายน้ำได้	23
3.6.3	ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด	24
3.6.4	ค่าความเข้มข้นของเอทานอลและน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส	24
3.6.5	ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โพวเวคตีคาร์บอกซิเลส	24
4.	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	26
4.1	การเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่	26
4.1.1	อาหารเลี้ยงเชื้อ YM	26
4.1.2	อาหารเลี้ยงเชื้อลำไยอบแห้ง	29
4.1.3	อาหารเลี้ยงเชื้อลำไยอบแห้งพร้อมกาก	32
4.2	การเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

5. สรุปผลการทดลอง	41
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก ก	47
ภาคผนวก ข	48
ภาคผนวก ค	50



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตาราง 2.1 องค์ประกอบของกรดอะมิโนที่มีใน <i>Candida utilis</i>	10
ตาราง 2.2 องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติของลำไยสดและลำไยอบแห้ง.....	18
ตาราง 4.1 ค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ชั่วโมงที่ 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเร็วของเครื่องเขย่าเท่ากับ 160รอบต่อ นาที.....	27
ตาราง 4.2 ค่าความเข้มข้นโดยเฉลี่ยของน้ำตาลซูโครส กลูโคส และ ฟรุกโตส ที่ ชั่วโมงที่ 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM และ <i>C. utilis</i> สายพันธุ์ต่างๆ.....	29
ตาราง 4.3 ค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ชั่วโมงที่ 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อลำไย อบแห้ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเร็วของเครื่องเขย่าเท่ากับ 160รอบต่อนาที.....	30
ตาราง 4.4 ค่าความเข้มข้นโดยเฉลี่ยของน้ำตาลซูโครส กลูโคส และ ฟรุกโตสที่ชั่วโมง ที่ 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อลำไยอบแห้ง และ <i>C. utilis</i> สายพันธุ์ต่างๆ.....	31
ตาราง 4.5 ค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ชั่วโมงที่ 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อลำไย อบแห้งพร้อมกาก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเร็วของเครื่อง เขย่าเท่ากับ 160รอบต่อนาที.....	32
ตาราง 4.6 ค่าความเข้มข้นโดยเฉลี่ยของน้ำตาลซูโครส กลูโคส และ ฟรุกโตส ที่ ชั่วโมงที่ 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อลำไยอบแห้งพร้อมกาก และ <i>C. utilis</i> สาย พันธุ์ต่างๆ.....	34
ตาราง 4.7 ค่าความเข้มข้นโดยเฉลี่ยของน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส จาก อาหารเลี้ยงเชื้อลำไยอบแห้ง และ <i>C. utilis</i> สายพันธุ์ TISTR 5001 ในถัง หมัก.....	40
ตาราง 5.1 ค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่างๆ จากการเก็บตัวอย่างทุก 4ชั่วโมง จากถังหมัก ขนาด 5 ลิตรที่เพาะเลี้ยง <i>C. utilis</i> TISTR 5001 โดยอาหารลำไยอบแห้ง.....	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง ก.1 ข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองเพาะเลี้ยง <i>Candida utilis</i> สายพันธุ์ต่างๆ ใน ขบวนการหมักและอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่ชั่วโมง 0	50
ตาราง ก.2 ข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองเพาะเลี้ยง <i>Candida utilis</i> สายพันธุ์ต่างๆ ใน ขบวนการหมักและอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่ชั่วโมง 24	51
ตาราง ก.3 ข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองเพาะเลี้ยง <i>Candida utilis</i> สายพันธุ์ต่างๆ ใน ขบวนการหมักและอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไอบอบแห้ง ที่ชั่วโมง 0	52
ตาราง ก.4 ข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองเพาะเลี้ยง <i>Candida utilis</i> สายพันธุ์ต่างๆ ใน ขบวนการหมักและอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไอบอบแห้ง ที่ชั่วโมง 24	53
ตาราง ก.5 ข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองเพาะเลี้ยง <i>Candida utilis</i> สายพันธุ์ต่างๆ ใน ขบวนการหมักและอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไอบอบแห้งพร้อมกาก ที่ชั่วโมง 0	54
ตาราง ก.6 ข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองเพาะเลี้ยง <i>Candida utilis</i> สายพันธุ์ต่างๆ ใน ขบวนการหมักและอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไอบอบแห้งพร้อมกาก ที่ชั่วโมง 24	55
ตาราง ก.7 ข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองเพาะเลี้ยง <i>Candida utilis</i> สายพันธุ์ 5001 ใน ถังหมักขนาด 5 ลิตรและอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไอบอบแห้งที่ชั่วโมงต่างๆ	56

สารบัญรูป

รูป 2.1 โครงสร้างเคมีของเอทานอล)Wikipedia®(2008 ,.....	4
รูป 2.2 การเตรียมวัตถุดิบและการหมักเอทานอล	6
รูป 2.3 การกลั่นและการแยกน้ำเพื่อผลิตเอทานอล	7
รูป 2.4 ก) (ลักษณะเซลล์และ) ข) (ลักษณะ โกลินีของ <i>Candida utilis</i> (Kojin Co. Ltd., 2008)	9
รูป 2.5 แผนภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีที่เร่ง โดยเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส ทั้งปฏิกิริยาจัดการบ่อนไดออกไซด์และปฏิกิริยาเชื่อมต่อบ่อนอะตอม) พุนศิริและคณะ(2551 ,	12
รูป 2.6 โครงสร้างของกรดไพรูวิก)Wikipedia®(2008 ,.....	12
รูป 2.7 โครงสร้างของAcetaldehyde (Wikipedia®2008 ,).....	13
รูป 2.8 ลักษณะทั่วไปของต้นและผลลำไยที่ปลูกในไทย) นงลักษณ์2542 , และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(2550 ,.....	13
รูป 2.9 กรรมวิธีการอบแห้งลำไยเนื้อ	17
รูป 4.1 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงยีสต์ <i>C. utilis</i> TISTR 5001 ในอาหารน้ำลำไยอบแห้ง ภาพ) ก) (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660นาโนเมตร ภาพ) ข) (ค่า pH	38
รูป) 4.1ต่อ (ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงยีสต์ <i>C. utilis</i> TISTR 5001 ในอาหารน้ำลำไยอบแห้ง ภาพ) ค) (ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ภาพ) ง) (ค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ภาพ) จ) (ค่าปริมาณ โปรตีนที่ละลายน้ำได้ และภาพ) ฉ) (ค่าความเข้มข้นเอทานอล.....	39
รูป ข.1 เส้นมาตรฐานของค่าความเข้มข้นน้ำตาลที่วัดจากวิธีฟินอล-ซัลฟูริก.....	48
รูป ข.2 เส้นมาตรฐานของค่าความเข้มข้น โปรตีนที่ละลายน้ำ โดยวิธีของ Bradford.....	48
รูป ข.3 เส้นมาตรฐานสำหรับน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส.....	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูป ข.4 ตัวอย่างโครมาโตแกรมเครื่อง HPLC ในการวัดน้ำตาลและเอทานอลใน
 อาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาล้าโยบแห้ง ซึ่งเพาะเลี้ยง *Candida utilis* TISTR 5198
 ชั่วโมงที่ 24.....49



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงการ

ลำไยเป็นไม้ผลเศรษฐกิจสำคัญที่รัฐบาลจัดให้อยู่ในกลุ่มสินค้าเพื่อการส่งออก มูลค่าการส่งออกสูงปีละหลายพันล้านบาท ทั้งในรูปลำไยสด อบแห้ง แช่แข็ง และลำไยกระป๋อง องค์ประกอบหลักของเนื้อลำไยคือ สารที่ละลายน้ำได้ (Soluble Substances) 79-77% ซึ่งประกอบด้วย กลูโคสร้อยละ 26.91 ซูโครสร้อยละ 0.22 กรดทาทาริคร้อยละ 1.26 สารประกอบไนโตรเจนร้อยละ 6.31 โปรตีนร้อยละ 5.6 ไขมันร้อยละ 0.5 และธาตุอาหารอื่นๆ เช่น แคลเซียม, เหล็ก, ฟอสฟอรัส, โซเดียม, โพแทสเซียมและวิตามิน (กรมวิชาการเกษตร, 2551)

พื้นที่ปลูกลำไยส่วนใหญ่อยู่ภาคเหนือ ซึ่งมีภูมิประเทศและภูมิอากาศเหมาะสำหรับการปลูกลำไยเป็นอันมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดลำพูน สามารถสร้างรายได้แก่เกษตรกรได้อย่างดีเยี่ยม และด้านเทคโนโลยีการปลูกและผลิตเข้าเสริมและพัฒนาไปสู่การผลิตอย่างจริงจัง จึงได้มีการขยายผลการส่งเสริมการปลูกและผลิตไปสู่พื้นที่ในจังหวัดอื่นๆ ด้วยรวม 36 จังหวัดของประเทศไทย พื้นที่รวม 423,618 ไร่และมีแนวโน้มเพิ่มพื้นที่มากยิ่งขึ้น ทั้งนี้ลำไยยังสามารถปลูกได้ตลอดปีแต่ในช่วงที่เหมาะสมคือ ปลายฤดูฝน (กันยายนถึงตุลาคม) ซึ่งมีความชื้นในดินและอากาศพอเหมาะ โดยทั่วไปลำไยจะออกดอกประมาณปลายเดือนธันวาคมถึงต้นเดือนกุมภาพันธ์ และจะเก็บเกี่ยวผลผลิตปลายเดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน ผลผลิตออกมากที่สุดประมาณเดือนสิงหาคม ใช้เวลาดังแต่ดอกบานจนกระทั่งแก่ประมาณ 5 เดือน แต่เนื่องจากในช่วง พ.ศ. 2546-2547 เป็นต้นมาจนถึงปัจจุบัน ได้เกิดภาวะราคาลำไยตกต่ำเนื่องจากมีผลผลิตมากเกินไป ความต้องการของตลาดจึงส่งผลให้เกิดภาวะของราคาลำไยตกต่ำขึ้น (สำนักส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร, 2550 และฐานเศรษฐกิจ, 2550)

จึงได้มีการคิดริเริ่มนำลำไยอบแห้งที่ค้างสต็อกอยู่มาผลิตเอทานอลและเอนไซม์โปรเวคตีคาร์บอกซิเลส จะช่วยสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับลำไยที่ใกล้เสื่อมคุณภาพ และมีปริมาณความเสียหายเฉลี่ยวันละกว่าร้อยละ 1 ขณะที่ปัจจุบันเอทานอลมีราคาซื้อขายราว 20 บาทต่อลิตร

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. คัดเลือกเชื้อ *Candida utilis* สายพันธุ์ที่เหมาะสมในประเทศไทย เพื่อผลิตเอทานอลและเอนไซม์ไฟรูเวคตีคาร์บอกซิเลสจากลำไยอบแห้ง
2. นำวัตถุดิบที่ราคาตกต่ำและล้นตลาดมาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตสารที่ต้องการ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ลำไยอบแห้งมาเป็นแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1. เปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อ *Candida utilis* จำนวน 6 สายพันธุ์ กับอาหาร 3 ชนิด คือ YM medium น้ำลำไยอบแห้ง และน้ำลำไยอบแห้งพร้อมกาก เพื่อการผลิตเอทานอลและเอนไซม์ไฟรูเวคตีคาร์บอกซิเลส
2. ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุดของเชื้อ *Candida utilis* มาทำการทดลองเพาะเลี้ยงในถังหมัก

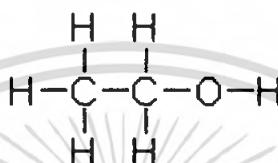
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำลำไยอบแห้งที่ราคาตกต่ำ และมีปริมาณมากในตลาด มาใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อผลิตเอทานอลและเอนไซม์ไฟรูเวคตีคาร์บอกซิเลส ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่า
2. ได้เอทานอลและเอนไซม์ไฟรูเวคตีคาร์บอกซิเลสเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 เอทานอล



รูป 2.1 โครงสร้างเคมีของเอทานอล (Wikipedia®, 2008)

เอทานอล หรือเอทิลแอลกอฮอล์ เป็นเชื้อเพลิงเหลวที่ได้จากการย่อยสลายแป้งและน้ำตาลด้วยเอนไซม์หรือเชื้อจุลินทรีย์ สูตรเคมีของเอทานอลคือ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ซึ่งมีสูตรโครงสร้างตามรูปที่ 2.1 วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอล สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ (คณะกรรมการพลังงาน, 2545) ดังนี้

1. วัตถุดิบประเภทแห้ง ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรพวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และ พวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น
2. วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล บีทรูท ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น
3. วัตถุดิบประเภทเส้นใย ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น

แม้จะมีวัตถุดิบอยู่หลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ แต่จะมีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีความเหมาะสมในการผลิตเป็นเอทานอล โดยมีหลักเกณฑ์ที่ควรพิจารณาคือ

- วัตถุดิบมีปริมาณเพียงพอสำหรับป้อนสู่โรงงานได้ตลอดปี หาได้ง่าย ราคาถูก
- สามารถผลิตเอทานอลต่อหน่วยของวัตถุดิบและต่อหน่วยของพื้นที่เพาะปลูกได้ในปริมาณสูง
- วัตถุดิบนั้นจะต้องไม่เป็นอาหารของมนุษย์โดยตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอทานอล ถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย เช่น ใช้เป็นเครื่องดื่มแอกฮอลล์ เช่น เหล้า ไวน์ และเบียร์ ใช้ในอุตสาหกรรมยา ใช้เป็นตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม เช่น สี แล็กเกอร์ ยาเคลือบน้ำมัน และขี้ผึ้ง (ครีมขจัดรองเท้า) เป็นเรซิน ใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์ สารเคมีและชีวเคมี ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซินที่เรียกว่าแก๊สโซฮอล์ ใช้เป็นอาหาร เช่น น้ำส้มสายชู เกลาติน ใช้ทางด้านการแพทย์ เช่น ใช้เช็ดแผล ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ใช้เป็นตัวรีเอเจนต์ในห้องปฏิบัติการและอื่นๆ เป็นต้น

เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจในขณะนี้พบว่า ร้อยละ 90 ได้มาจากรกระบวนการหมัก ที่เหลือได้จากการสังเคราะห์ขึ้นมา ในกระบวนการผลิตเอทานอลกระบวนการหมักเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่จุลินทรีย์จะเป็นตัวไปเปลี่ยนวัตถุดิบให้กลายเป็นเอทานอล

วัตถุดิบทางการเกษตรที่นำมาผลิตเอทานอลโดยการหมักสามารถ แบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. วัตถุดิบประเภทแป้ง
2. วัตถุดิบประเภทน้ำตาล
3. เศษวัสดุที่เป็นเซลลูโลส

โดยที่วัตถุดิบประเภทแป้งและเซลลูโลสจะถูกย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลก่อน แต่วัตถุดิบประเภทที่เป็นน้ำตาลอยู่แล้วสามารถนำไปใช้หมักได้เลย ระยะเวลาในการหมักเพื่อให้ได้เอทานอลจะประมาณ 48 ชั่วโมงจะได้เอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 8-12 โดยปริมาตร

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิด แต่ยีสต์ก็ถูกนำมาใช้ผลิตเอทานอลอย่างแพร่หลายเพราะสามารถเจริญเติบโตได้เร็วและมีปริมาณมาก แต่ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ (Rogers และคณะ, 1979) เช่น ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่า 3-4 เท่าเมื่อใช้น้ำตาลเท่ากัน ให้ผลเอทานอลใกล้เคียงกับยีสต์ แต่ข้อดีของยีสต์ก็มีคือแบคทีเรียชนิดนี้ใช้น้ำตาลได้จำกัดคือใช้ได้ 3 ชนิดคือ กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส

2.1.1 กระบวนการผลิตเอทานอล

ประกอบด้วย กระบวนการเตรียมวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล กระบวนการหมัก และการแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบนั้น ถ้าเป็นประเภทแป้งหรือเมล็ดธัญพืช เช่นมันสำปะหลังและธัญพืช จะต้องนำไปผ่านกระบวนการย่อยแป้งหรือเมล็ดธัญพืชให้เป็นน้ำตาลก่อน ด้วยการใช้กรดหรือเอนไซม์ตามแผนผังรูปที่ 2.2 ส่วนวัตถุดิบประเภทน้ำตาลเช่นกากน้ำตาลหรือน้ำอ้อย เมื่อปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมแล้วสามารถนำไปหมักได้ (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2551)

ในกระบวนการหมัก จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ยีสต์ การเลือกใช้ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับวัตถุดิบที่นำมาหมัก จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหมัก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักคือ เอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอลที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8-12 โดยปริมาตร

น้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมัก จะนำมาแยกเอทานอลออก ตามแผนผังในรูปที่ 2.3 โดยใช้กระบวนการกลั่นลำดับส่วน ซึ่งสามารถแยกเอทานอลให้ได้ความบริสุทธิ์ประมาณร้อยละ 95 โดยปริมาตร จากนั้นจึงเข้าสู่กรรมวิธีในการแยกน้ำออกโดยการใช้โมเลกุลาร์ซีฟ (molecular sieve separation) เอทานอลที่ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 จะผ่านเข้าไปในหอคอยดูดซับที่บรรจุตัวดูดซับประเภทซีโอไลต์ โมเลกุลของเอทานอลจะไหลผ่านช่องว่างของซีโอไลต์ออกไปได้ แต่โมเลกุลของน้ำจะถูกดูดซับไว้ ทำให้เอทานอลที่ไหลออกไปมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 ส่วนซีโอไลต์ที่ดูดซับน้ำไว้จะถูกรีเจนเนอเรตโดยการไล่่น้ำออก เอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 สามารถนำไปผสมกับน้ำมันเบนซินเพื่อใช้ในรถยนต์เครื่องยนต์เบนซินได้ เพื่อเป็นแก๊สโซฮอล์นั่นเอง (ทะนงศักดิ์, 2548)



รูป 2.2 การเตรียมวัตถุดิบและการหมักเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการกลั่น (Distillation)



กระบวนการกำจัดน้ำ (Dehydration)



เอทานอล 99.5%

รูป 2.3 การกลั่นและการแยกน้ำเพื่อผลิตเอทานอล

การแยกน้ำออกจากแอลกอฮอล์นั้นทำเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการกัดกร่อนที่เกิดขึ้นกับเครื่องชนิด และวิธีแยกน้ำออกจากแอลกอฮอล์ทำได้โดย การเติมสารเคมีบางชนิด เช่น เบนซีนลงไปจึงจะทำให้แยกน้ำออกจากแอลกอฮอล์ทั้งหมด

ลักษณะของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอทานอล

1. ให้ความเข้มข้นของเอทานอลและมีอัตราการหมักเอทานอลสูง
2. มีความทนต่อเอทานอล เนื่องจากถ้าเชื้อมีความไวต่อเอทานอล จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายต่ำ
3. ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายในสภาวะที่ใช้ของการหมักและทนต่อสภาวะที่เอซต่ำหรือทนกรด
4. มีความสามารถในการตกตะกอน เมื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักได้ง่าย
5. มีพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย
6. ทนต่อแรงดันออสโมซิสที่เปลี่ยนไปได้

2.1.2 การหมักเอทานอล

มีได้ทั้งระบบต่อเนื่อง และแบบ batch แต่ส่วนใหญ่นิยมคงใช้แบบ batch เพราะมีต้นทุนไม่มากและง่ายต่อการดูแลรักษา อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส ในการที่ใช้ อุณหภูมิสูงเพราะว่าต้องการเฉพาะเอทานอล จึงไม่จำเป็นต้องคำนึงถึงสารให้กลิ่นรส ซึ่งจะเกิดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้อยและระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นลง ช่วยลดต้นทุนการผลิต (Hacking และคณะ, 1984)

ขั้นตอนคร่าวๆ ในการผลิตเอทานอล มี 4 ขั้นตอน (บัญชา, 2003) ดังนี้

1. การเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมัก
2. การเตรียม หัวเชื้อและการหมัก
3. การแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์
4. การใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์รองและของเสีย

ในขั้นเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมักนั้น ถ้าใช้กากน้ำตาลก็จะทำการเจือจางด้วยน้ำเพื่อปรับความเข้มข้นให้เหมาะสม จึงสามารถนำไปหมักได้ แต่ถ้าใช้หัวมันสำปะหลัง หรือวัตถุดิบประเภทเส้นใย ก็ต้องย่อยให้กลายเป็นน้ำตาลก่อน โดยใช้กรดหรือเอนไซม์ ทั่วไปนิยมใช้เอนไซม์มากกว่า เพราะสะดวก และไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม หลังจากนั้นก็เตรียมหัวเชื้อยีสต์และเริ่มทำการหมัก โดยปฏิกิริยาการหมักมักจะเกิดภายใต้สภาพที่ปราศจากออกซิเจน หรือมีออกซิเจนน้อย และใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน จนได้น้ำหมัก ในทางปฏิบัติ ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เท่านั้น

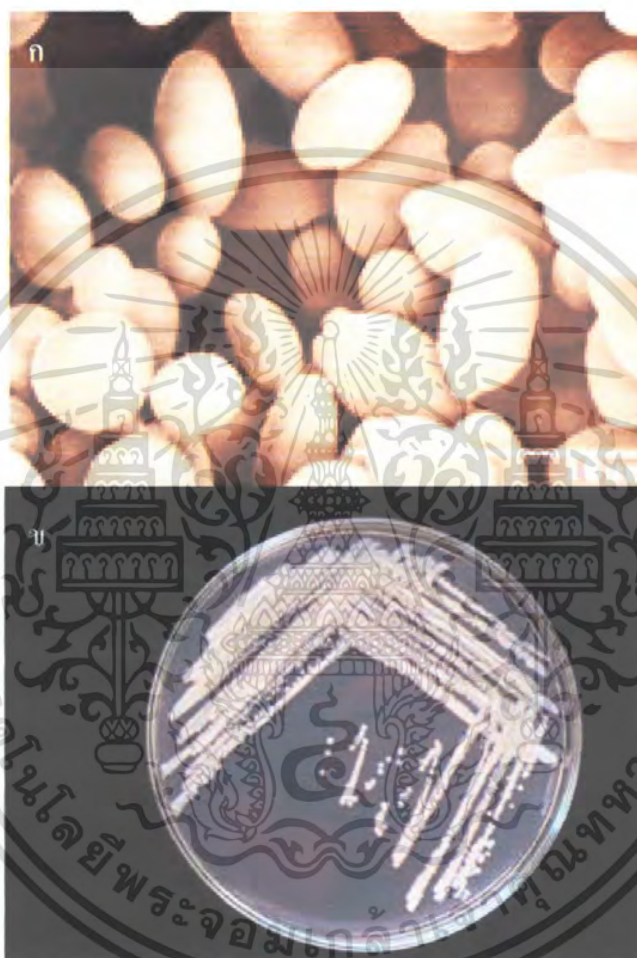
ส่วนน้ำตาลที่เหลือยีสต์จะใช้สำหรับการเจริญเติบโตของตัวเอง และจะเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นผลพลอยได้อีกอย่างอื่น เช่น ฟิวเซลอยล์ (fusel oil) กรดแลกติก กลีเซอริน และอะซีทัลดีไฮด์ เป็นต้น

น้ำหมักที่ได้จะนำมาผ่านการกลั่นลำดับส่วน ซึ่งจะได้เอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.6 แต่ปกติในทางปฏิบัติจะเรียกเอทานอลร้อยละ 95 ซึ่งยังใช้ผสมกับน้ำมันเบนซินไม่ได้ เพราะจะเกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำมันซึ่งอยู่ด้านบน กับน้ำที่ผสมอยู่กับเอทานอลซึ่งอยู่ด้านล่าง จึงต้องใช้เทคโนโลยีเพื่อแยกน้ำออกจากเอทานอลให้ได้ เอทานอลไร้น้ำ (anhydrous ethanol หรือ absolute ethanol) ซึ่งต้องมีความบริสุทธิ์ถึง 99.5% (บัญชา, 2003)

เมื่อแอลกอฮอล์หรือเอทานอลถูกผลิตขึ้นมา และทำให้บริสุทธิ์จนมีปริมาณร้อยละ 99.5 แล้ว เราสามารถนำมาผสมกับเบนซิน เป็นน้ำมันแก๊สโซลีนได้ โดยมีขั้นตอนคือ นำเอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร อัตราส่วน 10% ใสลงในถังผสม แล้วเติมสารป้องกันการกัดกร่อนลงไป (corrosion inhibitor) จากนั้นเติมน้ำมันเบนซิน 91 หรือ น้ำมันเบนซิน 95 ลงไป

อัตราส่วน 90% เติมน้ำร้อนประมาณ 30-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไขมันและส่วนผสมเข้ากัน ใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที จะได้แก๊ส โซซอลต์ (ทะนงศักดิ์, 2548)

2.2 *Candida*



รูป 2.4 (ก) ลักษณะเซลล์และ (ข) ลักษณะ โคลินีของ *Candida utilis* (Kojin Co. Ltd., 2008)

Candida utilis เป็นจีโนมที่ใหญ่ที่สุดของแฟมิลี Cryptococcaceae มีประมาณ 200 สปีชีส์ ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็น Ascomycetous yeast ยีสต์กลุ่มนี้มีทั้งเส้นใยและไม่มีเส้นใย มีการสร้างเส้นใยเทียม อยู่ในคลาส Funji Imperfecti อยู่ในกลุ่มของ Funji (สันทัด, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 2.1 องค์ประกอบของกรดอะมิโนที่มีใน *Candida utilis*

กรดอะมิโน	ร้อยละ
Lysine	7.7
Methionine	1.1
Tryptophane	ไม่มี
Valine	3.5
Threonine	7.6
Leucine	4.4
Isoleucine	4.4
Histidine	2.0
Arginine	4.7
Glutamic acid	19.9
Aspartic acid	11.6
Glycine	5.6
Proline	3.3
Serine	8.1
Tyrosine	3.7
Phenylalanine	4.1

ที่มา: สันทัด, 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีสต์ในกลุ่มนี้สามารถพบได้ในสถานที่ต่าง ๆ กัน บางชนิดมีประโยชน์ บางชนิดก็มีสาเหตุทำให้เกิดโรคและบางชนิดอาจเป็นอันตรายถึงมนุษย์ได้ เช่น โรค Candidiasis ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Candida albican* ส่วนใน *Candida utilis* ซึ่งมีลักษณะเซลล์ตามรูปที่ 2.4 มีคุณสมบัติหลากหลายในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ และเป็นยีสต์ชนิดหนึ่งที่เจริญได้ในสับสเตรทชนิดต่างๆ โดยที่ *Candida* สามารถใช้เซลลูโลสได้ และเป็นแบบไม่ใช้ออกซิเจน สามารถใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียวได้ โดยมีกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบในเซลล์ตามตารางที่ 2.1

ตัวอย่างของยีสต์สายพันธุ์นี้ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ เช่น *Candida utilis* TISTR 5001 สามารถนำมาใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้ โดยใช้เน้าเว้ค้ำหู้เป็นแหล่งอาหาร (จารูวรรณและคณะ, 2549) *Candida utilis* CBS 1517 สามารถนำมาใช้บำบัดค่าซีไอดีของน้ำเสียจากโรงงานผลไม้กระป๋องและนำ *Candida utilis* TISTR 5046 มาใช้เพื่อการผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสจากยีสต์โดยใช้กากน้ำตาลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (พันธุ์ณรงค์และคณะ, 2547)

2.3 Pyruvate decarboxylase (PDC)

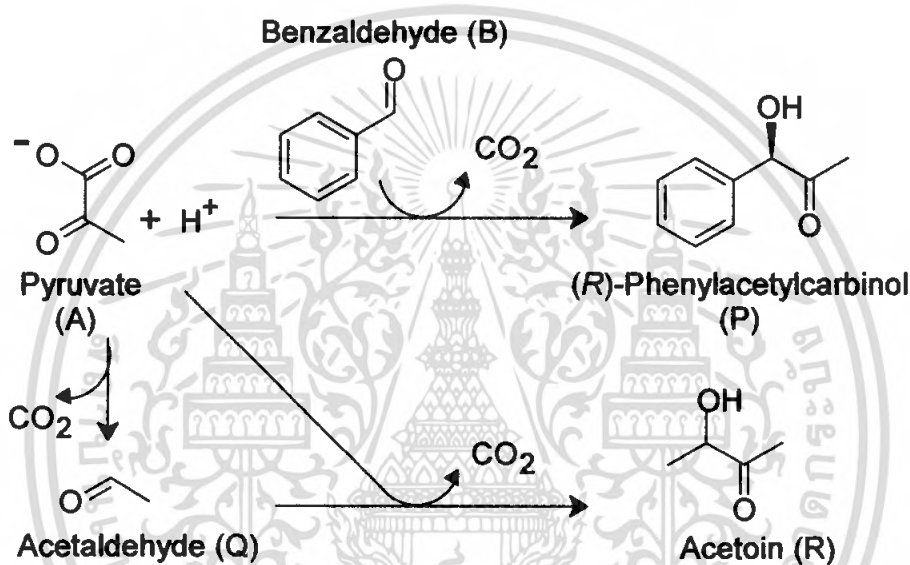
เป็นเอนไซม์ตัวสำคัญในการทำการหมักแอลกอฮอล์ในยีสต์ ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไกลโคไลซิส เป็นเอนไซม์แบบ homotetrameric enzyme มีหน้าที่เปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นอะเซทาลดีไฮด์ (acetaldehyde) และมีคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา 1 ตัว ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ โดยที่หลังจากเปลี่ยนเป็น acetaldehyde แล้ว ก็จะเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ต่อไป โดยที่เอนไซม์ pyruvate decarboxylase นั้นต้องการ thiamine diphosphate เป็นโคแฟกเตอร์ในการช่วยทำปฏิกิริยา

เอนไซม์ pyruvate decarboxylase พบได้ในยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* , *S. uvarum*, *S. carlsbergensis*, *Candida utilis* เชื้อรา เช่น *Rhizopus javanicus* แบคทีเรีย เช่น *Zymomonas mobilis* และเมล็ดพืช *Pisum sativum* (พูนศิริและคณะ, 2551) โดยเอนไซม์นี้ค่อนข้างจะเสถียร และสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย โครงสร้างของเอนไซม์ pyruvate decarboxylase โดยทั่วไป มีบริเวณเร่ง 2 บริเวณประกอบด้วยโปรตีนของกลุ่มไทมินไพโรฟอสเฟต และกรดอะมิโน 20 ตัว (พูนศิริและคณะ, 2551)

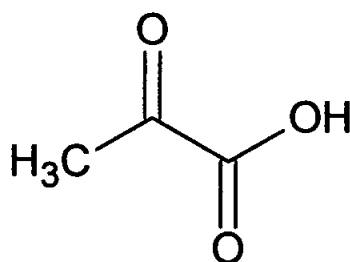
นอกจากนี้ เอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์-บอซซิเลสยังเป็นเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาเคมีซึ่งสามารถผลิตสาร (*R*)-phenylacetylcarbinol (*R*-PAC) ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยา (*1R,2S*) - ephedrine และ (*1S,2S*) - pseudoephedrine ที่ใช้ในการรักษาโรคหืด, ไซ้หวัด และ ไซ้หวัดใหญ่อีกด้วย

เอนไซม์ไพรวูเวต คีคาร์บอกซิเลส สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สองชนิดตามแผนภาพในรูปที่ 2.5 (Gunawan, 2007) คือ

- 1) ปฏิกิริยาขจัดคาร์บอนไดออกไซด์ (decarboxylation reaction) เปลี่ยนกรดไพรวูวิก (รูปที่ 2.6) ให้เป็นอะเซตาลดีไฮด์ (รูปที่ 2.7) และคาร์บอนไดออกไซด์
- 2) ปฏิกิริยาเชื่อมคาร์บอนอะตอม (carboligation reaction) เปลี่ยนกรดไพรวูวิกสองโมเลกุลให้เป็นอะเซโตอิน (acetoin) หรือ เปลี่ยนกรดไพรวูวิกและเบนซาลดีไฮด์ให้เป็น PAC

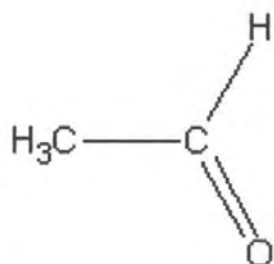


รูป 2.5 แผนภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีที่เร่งโดยเอนไซม์ไพรวูเวตคีคาร์บอกซิเลส ทั้งปฏิกิริยาขจัดคาร์บอนไดออกไซด์และปฏิกิริยาเชื่อมคาร์บอนอะตอม (พูนศิริและคณะ, 2551)



รูป 2.6 โครงสร้างของกรดไพรวูวิก (Wikipedia®, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับว่าผิดกฎหมายไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูป 2.7 โครงสร้างของAcetaldehyde (Wikipedia®, 2008)



รูป 2.8 ลักษณะทั่วไปของต้นและผลลำไยที่ปลูกในไทย (นงลักษณ์, 2542 และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ลำไย

เป็นพันธุ์ไม้ไม่ผลัดใบ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่ทางใต้ของจีนจนถึงอินโดนีเซีย ผลลำไยใช้รับประทานได้ และมักจะใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ทั้งอาหารคาวและอาหารหวาน (Wikipedia®, 2551)

ผลมีลักษณะกลม มีเปลือกบางสีน้ำตาลห่อหุ้ม เนื้อในผลมีสีขาวฉ่ำน้ำและอ่อนนุ่ม ส่วนในสุดเป็นเมล็ดขนาดใหญ่สีดำ ตามรูปที่ 2.8 ผลลำไยแห้งมักใช้ในอาหารและยาสมุนไพรของจีน เพราะเชื่อว่ามีคุณสมบัติช่วยบำรุงกำลัง

ลำไยเป็นไม้ผลกิ่งเมืองร้อน ลำต้นเจริญเต็มที่สูงประมาณ 10-12 เมตร ทรงพุ่มแผ่กว้างประมาณ 6-8 เมตร เจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีหน้าดินลึก มีอินทรีวัตถุมาก มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างระหว่าง 5-6 และมีการระบายน้ำดี อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโต อยู่ระหว่าง 20-25 องศาเซลเซียส และในช่วงก่อนออกดอกต้องการอุณหภูมิระหว่าง 10-12 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนที่เหมาะสม อยู่ระหว่าง 1,200-1,400 มิลลิเมตรต่อปี ความชื้นสัมพัทธ์ในระยะก่อนออกดอกควรต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นสัมพัทธ์ในระยะติดผลอยู่ระหว่าง 80-100 เปอร์เซ็นต์

ลำไยอายุตั้งแต่ 3 ปี จะเริ่มให้ผลผลิต และจะให้ผลเต็มที่เมื่ออายุ 7 ปีขึ้นไป ลำไยสามารถให้ผลผลิตได้มากกว่า 30 ปี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ การดูแลรักษา การตัดแต่งกิ่ง ระยะเวลาตั้งแต่ออกดอกถึงเก็บเกี่ยวผลผลิตประมาณ 6 เดือน ผลผลิตเฉลี่ยของลำไยที่โตเต็มที่ประมาณ 200 กิโลกรัมต่อต้น ปริมาณของผลผลิตอยู่ระหว่าง 60 - 90 ผลต่อกิโลกรัม และฤดูกาลเก็บเกี่ยว ผลผลิตอยู่ระหว่างเดือนกรกฎาคม -เดือนสิงหาคม

การนำลำไยอบแห้งที่ค้างสต็อกอยู่มาผลิตเอทานอล จะช่วยสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับลำไยที่ใกล้เสื่อมคุณภาพ และมีปริมาณความเสียหายเฉลี่ยวันละกว่าร้อยละ 1 (สำนักส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร, 2550 และฐานเศรษฐกิจ, 2550) ปัจจุบันลำไยอบแห้งที่ค้างสต็อกอยู่ 70,000 ตัน มีการคัดแยกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่หนึ่ง ยังสามารถนำมาบริโภคได้ ส่วนที่สอง เป็นลำไยอบแห้งที่เปลือกนูนหรือแตก สามารถแกะเอาเนื้อไปอัดแท่งและส่งขายให้กับประเทศจีน ซึ่งจีนจะนำไปผลิตเป็นยา และส่วนที่สาม เป็นลำไยอบแห้งที่มีเชื้อรา ไม่สามารถบริโภคได้ จึงเหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นเอทานอล

2.4.1 ประโยชน์ของลำไย

เปลือกของลำไยมีสีน้ำตาลอ่อนหรือเทาและมีรสฝาดใช้ดื่มเป็นยาหม้อแก้ท้องร่วง ลำไยมีขนาดใหญ่ สูงประมาณ ๓๐-๔๐ ฟุต เนื้อไม้มีสีแดงและแข็งสามารถใช้ทำเครื่องใช้ประดับบ้านได้ ผลลำไยมีเปลือกสีน้ำตาลอมเขียว ภายในมีเนื้อขาวอมชมพูขาวอมเหลืองแล้วแต่สายพันธุ์เนื้อลำไยสามารถบริโภคสด บรรจุกระป๋อง ตากแห้งสามารถทำเป็นชาชงใช้ดื่ม เป็นยารักษาอาการช่วยให้อาเจียน (นงลักษณ์และคณะ, 2542)

2.4.2 พันธุ์ลำไย

ลำไยปลูกในหลายประเทศที่สำคัญคือประเทศจีน มีการปลูกถึง 26 สายพันธุ์ ที่สหรัฐอเมริกา 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์โคฮาลา พันธุ์ลำไยในประเทศไทย จำแนกออกตามลักษณะผลเนื้อเมล็ดและรสชาติแบ่งได้ 5 พวก (นงลักษณ์และคณะ, 2542) คือ

1. ลำไยกะโหลก เป็นพันธุ์ลำไยที่ให้ผลขนาดใหญ่มีเนื้อหนารสหวาน
2. ลำไยกระดุก เป็นพันธุ์พื้นเมือง ทรงพุ่มกว้างใบหนาทึบ ผลเล็กมีน้ำมาก เนื้อน้อยไม่หวาน มีน้ำตาลร้อยละ 13.75 ขึ้นได้ทั่วไปปลูกง่าย เหลือให้เห็นน้อย เพราะไม่นิยมปลูก ไม่มีราคา
3. ลำไยธรรมชาติ ผลปานกลาง เนื้อหนากว่าลำไยพันธุ์กระดุก เนื้อกรอบบางมีน้ำมาก ให้ผลดก
4. ลำไยสายน้ำผึ้ง ลักษณะคล้ายลำไยธรรมชาติ แต่เนื้อมีสีเหลืองอ่อน เนื้อมีรสดี หอมกรอบเมล็ดเล็ก
5. ลำไยเถาหรือลำไยเครือ มีลำต้นเลื้อยคล้ายเถาวัลย์ นิยมปลูกไว้ประดับมากกว่าปลูกไว้รับประทาน ชอบขึ้นตามป่าแถบภูเขาบรรทัด ภูเขาต่งเล็ก ลำต้นไม่มีแก่นจึงพันเข้ากับรั้วหรือหลัก

2.4.3 เครื่องอบแห้ง

เนื่องจากผลลำไยสดมีอายุการเก็บรักษาสั้น จึงได้มีการอบแห้งลำไยเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา โดยเครื่องอบแห้งเนื้อลำไยจะต้องมีลักษณะเป็นตู้ที่แข็งแรงไม่มีลมร้อนรั่วไหล วัสดุภายในตู้อบและตะแกรงรับเนื้อลำไยต้องไม่เป็นสนิม พัดลมต้องสามารถกระจายความร้อนภายในตู้อบอย่างสม่ำเสมอทุก ๆ ชั้น อุปกรณ์กำเนิดลมร้อนมีทั้งใช้ไฟฟ้า และแก๊สหุงต้มเป็นเชื้อเพลิง ไฟฟ้าดีกว่าแก๊สตรงที่มีความสะอาดกว่า แต่ค่าใช้จ่ายด้านพลังงานสูงกว่าแก๊สหุงต้ม มีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ โดยใช้เทอร์โมสตัท ซึ่งเทอร์โมสตัทที่มีคุณภาพดี ราคาจะแพง สามารถควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ได้ เช่น ± 0.5 หรือ ± 1 องศาเซลเซียส เทอร์โมสตัทที่มีราคาถูกจะมีช่วงการตัดต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิในช่วงกว้าง เช่น ± 5 องศาเซลเซียส อุปกรณ์วัดอุณหภูมิควรอยู่ภายในตู้อบใกล้ทางออกของลมร้อน (ฐานความรู้ด้านพืช กรมวิชาการเกษตร)

2.4.4 ขั้นตอนการอบเนื้อลำไย

การอบเนื้อลำไยให้มีคุณภาพ (ไมตรีและวิจิตร, 2551) มีขั้นตอนตามรูปที่ 2.9 ดังนี้

1. การคัดเลือกลำไย ลำไยที่เหมาะสมควรมีเนื้อหนา สีขาวใส คุณภาพดีไม่เน่า ใช้ได้ทุกสายพันธุ์พันธุ์ที่เหมาะสมที่สุดคือพันธุ์อีดอ (เป็นสายพันธุ์ที่มีผลขนาดปานกลาง เมล็ดเล็ก รสหวาน)
2. นำลำไยสดทำการคว้านเมล็ดและแกะเปลือกออกด้วยค้อนชั้นแครงหรือค้อนคู่ อย่าให้หัวสีน้ำตาลเหลืองติดกับเนื้อลำไย และล้างน้ำให้สะอาด
3. นำเนื้อลำไยที่แกะแล้วแช่ในสารละลายโปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟด์ โดยละลายสารเคมี 30-50 กรัม ต่อน้ำ 10 ลิตร แช่เนื้อลำไย 10-15 กิโลกรัม นาน 5-10 นาที เพื่อให้เนื้อลำไยมีสีเหลืองทอง ไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เก็บรักษาไว้ได้นาน และเพื่อป้องกันการเกิดราหลังการอบแห้ง
4. การลำเลียงเนื้อลำไยเข้าเครื่องอบ ให้จัดเรียงผลลำไยบนตะแกรงวางให้เป็นชั้นเดียวอย่าให้ซ้อนกัน ผึ่งให้แห้งหมาดหรือใช้พัดลมเป่าก่อนนำเข้าเครื่องอบ
5. การอบเนื้อลำไย ทำการอบที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส จนเนื้อลำไยมีความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 18
6. นำเนื้อลำไยบรรจุถึงพลาสติกหาวรรคปากถุงให้แน่น บรรจุกล่องกระดาษ เก็บไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส จะสามารถเก็บไว้ได้นาน 6-9 เดือน



รูป 2.9 กรรมวิธีการอบแห้งลำไยเนื้อ

ผลลำไย 1 กิโลกรัม ได้เนื้อลำไย 681 กรัม อบแห้งเหลือเนื้อลำไยแห้ง 100 กรัม คิดเป็น สัดส่วนผลลำไยต่อลำไยแห้งประมาณ 10 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก ใช้ระยะเวลาในการอบแห้งประมาณ 12-15 ชั่วโมงติดต่อกัน การอบแห้งไม่ควรใช้อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส เพราะจะทำให้ เนื้อลำไยมีสีเข้มหรือสีดำ เครื่องอบแห้งที่มีการกระจายลมร้อนไม่ทั่วถึงจะต้องหมั่นพลิกสลับ ถาดเพื่อให้เนื้อลำไยมีความแห้งใกล้เคียงกัน ถ้าเป็นเครื่องอบที่ไม่มีพัดลมเป่าควรอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลา 16 – 20 ชั่วโมงติดต่อกัน เมื่ออบแห้งครบตามกำหนดเวลาแล้วควร ตรวจสอบความแห้ง โดยการสัมผัสไม่เหนียวติดมือ และตรวจสอบภายในเนื้อลำไยว่าแห้งสนิทดี เมื่ออบแห้งได้ที่แล้วควรเป่าลมเย็นให้เนื้อลำไยเย็นตัวลงหรือทิ้งไว้ให้เย็น ลำเลียงเนื้อลำไยแห้งออกจากตะแกรงเครื่องอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลง 83994 ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.5 คุณค่าทางอาหารของลำไย

คุณค่าทางอาหารของลำไยของวิทยาศาสตร์กรมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยได้ทำการวิเคราะห์ส่วนประกอบของลำไย (สุวรรณ, 2551) ปรากฏผลตามตารางที่ 2.2

ตาราง 2.2 องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติของลำไยสดและลำไยอบแห้ง

องค์ประกอบ	ปริมาณ	
	ลำไยสด	ลำไยอบแห้ง
ความชื้น (ร้อยละ)	81.1	21.27
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)	16.98	69.06
โปรตีน (ร้อยละ)	0.97	4.61
ไขมัน (ร้อยละ)	0.11	0.171
ใยอาหาร (ร้อยละ)	0.28	1.50
เถ้า (ร้อยละ)	0.56	3.33
พลังงาน (แคลอรี)	72.8	296.1
วิตามิน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)	69.2	1.80
แคลเซียม (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)	57	32.05
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)	35.17	150.5
เหล็ก (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)	0.35	2.85
โซเดียม (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)	ไม่มีรายงาน	4.78
โพแทสเซียม (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)	ไม่มีรายงาน	1390.3

ที่มา: (สุวรรณ, 2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการวิจัยมาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยมีรายชื่อดังต่อไปนี้ *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5032, *Candida utilis* TISTR 5043, *Candida utilis* TISTR 5046, *Candida utilis* TISTR 5198 และ *Candida utilis* TISTR 5352

นำมาบ่มในอาหารแข็ง YM Media (ดูรายละเอียดในหัวข้อ 3.3) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุก 4 สัปดาห์

3.2 สารเคมี

Bradford reagent

สารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) มาตรฐาน

สารละลายฟีนอล

กรดซัลฟูริก

สารละลายซูโครสมาตรฐาน

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

สารละลายฟรุกโตสมาตรฐาน

เอทานอล

ยีสต์สกัด (Yeast extract)

มอลต์สกัด (Malt extract)

เปปโตน (Peptone)

วุ้น (Agar)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์

ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

บีกเกอร์ ขนาด 1 ลิตร (Beaker) ของบริษัท PYREX®

กระบอกตวง ขนาด 1 ลิตร (cylinder) ของบริษัท VIT LAB

หลอดทดลองแก้ว

ห้วงเขี่ยเชื้อ

ปิเปต ขนาด 5 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร

จานเพาะเชื้อ

ตะเกียงแอลกอฮอล์

เข็มฉีดยา

ออโต้ปิเปตต์

กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1

กระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร

vortex mixer รุ่น Genie 2

ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

HPLC ของบริษัท PerkinElmer Model No. Lambda 25 UV/VIS Spectrometer

เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) บริษัท Scientific promotion รุ่น Heto

Lyolab 3000

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท Mettler – Toledo (Thailand) Ltd. รุ่น PG5002

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Mettler – Toledo (Thailand) Ltd. รุ่น AG204

Blender ของบริษัท National รุ่น MX-795N

Shaker ของบริษัท ไทยโพลีเมติก รุ่น Gallenkamp

Fermenter ขนาด 5 ลิตร บริษัท B.Brun Biotech International

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท BEC THAI รุ่น cyberscan 2000

Spectrophotometer ของบริษัท SHIMADZU รุ่น UV-1601

เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HV – 50

ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 8 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ YM

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ต่อลิตรของน้ำกลั่นมีดังนี้

- ยีสต์สกัด (Yeast extract)	3	กรัม
- เปปโตน (Peptone)	5	กรัม
- มอลต์สกัด (Malt extract)	5	กรัม
- ฐัน (Agar)	20	กรัม
- กลูโคส (Glucose)	10	กรัม

ถ้าหากใช้เป็นอาหารเหลว จะไม่มีการเติมฐันลงไป

3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อลำไยอบแห้ง

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อลำไยอบแห้งมีดังนี้ (พูนศิริและคณะ, 2551)

ต้มน้ำลำไยอบแห้ง 30 กรัมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จนเดือด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการกรองผลลำไยออกด้วยผ้าขาวบาง จนกระทั่งได้สารละลายที่ไม่มีกากตะกอนลำไยเจือปน และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อลำไยอบแห้งชนิดที่ 1

ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมกาก จะกรองแยกกากลำไยและนำมาใส่ลงในเครื่องปั่น (blender) ทำการบดที่ระดับความเร็วสูงสุดจำนวน 3 รอบ รอบละ 3 นาที จากนั้นใส่น้ำลำไยอบแห้งลงไป 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้น นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อลำไยอบแห้งชนิดที่ 2

3.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์

จะทำการเพาะเลี้ยงใน 2 ลำดับขั้น คือ การเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ *Candida utilis* ที่เหมาะสมจาก 6 สายพันธุ์ และการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำลำไยอบแห้งกับดั่งหมักขนาด 5 ลิตร

3.5.1 การเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่

นำ *Candida utilis* จำนวน 6 สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงโดยเปรียบเทียบในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ YM medium, น้ำถั่วโยบแห้ง และน้ำถั่วโยบแห้งพร้อมกาก โดยทำการเพาะเลี้ยง *C. utilis* ทั้ง 6 สายพันธุ์ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กำหนดระดับการหมุนของเครื่องเขย่าเท่ากับ 160 รอบต่อนาที (Gurawan และคณะ, 2007) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สารที่เวลาเริ่มต้น

หลังการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์สารที่เวลา 24 ชั่วโมง และแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ 50 มิลลิลิตร มากรองเอามวลชีวภาพด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และนำมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วเก็บไว้เพื่อวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟรูเวคติคาร์บอกซิเลส จากนั้นแบ่งตัวอย่าง 30 มิลลิลิตร มาใส่หลอดปั่นเหวี่ยงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนใส่ออกเพื่อนำไปวัดค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายในน้ำ ค่า pH และค่าความเข้มข้นของเอทานอล ส่วนเซลล์ที่ได้นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.5.2 การเพาะเลี้ยงในถังหมัก

ทำการคัดเลือก *C. utilis* ที่เหมาะสมจากระดับการผลิตเอทานอล คือ สายพันธุ์ 5001 ไปทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อน้ำถั่วโยบแห้งเพื่อสะดวกต่อการเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้น จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็น 2 ช่วง (Chen และคณะ, 2005)

ช่วงแรก ทำการผลิตในสภาวะที่มีออกซิเจนสูงเพื่อเพิ่มมวลชีวภาพซึ่งใช้สภาวะต่อไปนี้ ความเร็วของใบพัด 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm จนเชื้อเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่

ช่วงที่สอง ทำการผลิตในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำเพื่อกระตุ้นให้เซลล์ผลิตเอนไซม์ไฟรูเวคติคาร์บอกซิเลสและเอทานอล โดยใช้สภาวะต่อไปนี้ ปรับอัตราการให้อากาศให้เหลือ 0.25 vvm และความเร็วของใบพัดให้เหลือ 100 รอบต่อนาที

ในการเก็บตัวอย่าง จะเก็บมา 100 มิลลิลิตร และทำวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter และค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer จากนั้นทำการหาค่ามวลชีวภาพแห้ง (biomass) โดยใช้ตัวอย่าง 30 มิลลิลิตรมาหมุนเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสออกเพื่อนำไปทำการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายในน้ำ และค่าความเข้มข้นของเอทานอล ดังตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น และทำการหมุนเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง และนำตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามหัวข้อที่ 3.6.1

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารทางเคมี

3.6.1 น้ำหนักแห้งของเซลล์

นำตัวอย่างเซลล์ที่ถูกปั่นเหวี่ยงแล้ว ไปอบแห้งในตู้ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยที่ทำการชั่งน้ำหนักแห้งของหลอดปั่นเหวี่ยง (m_1) นี้ไว้ก่อนแล้ว ชั่งน้ำหนัก (m_2) และทำการคำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(m_2 - m_1)}{30} \times 1000$$

3.6.2 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายน้ำได้

ปรับปรุงวิธีการของ Bradford (1976) โดยใช้สารละลายเบรคฟอร์ด (0.01% Coomassie® Brilliant Blue G-250) เข้มข้นในสารละลายกรดฟอสฟอริกและเมทานอล (4.7% ethanol-8.5% phosphoric acid) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 4 เพื่อทำปฏิกิริยาที่ 25 °C กับโปรตีนในสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) หรือตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน ทั้งนี้ใช้สารละลาย Coomassie ที่เจือจางแล้ว 1,250 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร (สัดส่วนโดยปริมาตรของตัวอย่าง:Coomassie = 1:50) ในหลอดทดลอง หลังจากดำเนินการปฏิกิริยาไปได้ 5 นาที (สีฟ้าที่เกิดขึ้นจะคงตัวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง) จึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Spectrophotometer แล้ว คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างโดยเทียบกับเส้นมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 200-1000 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร (ภาพ ข.2 ภาคผนวก ข)

3.6.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด

การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ในการศึกษานี้ ใช้วิธีฟีนอล-ซัลฟูริก โดยปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดของ Dubois และคณะ (1956) ที่ NSF (2007) อ้างถึง ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ใช้สารละลายฟีนอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จึงเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร จะได้ค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกลูโคสที่อยู่ในช่วง 20-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพ ข.1 ภาคผนวก ข)

3.6.4 ค่าความเข้มข้นของเอทานอลและน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส และเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC ทำโดยใช้คอลัมน์ Aminex® HPX-87H Ion Exclusion และ 9 μm particle size เส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 30 เซนติเมตร เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้คือสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.005 โมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน column oven ทำงานที่ 37 °C โดยวัดค่า refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสง ใช้ run time 20 นาที และฉีดตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางด้วย dilution factor ที่เหมาะสมแล้ว (5 เท่า) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สารละลายมาตรฐานซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส และเอทานอลที่ใช้มี retention time (นาที) ดังต่อไปนี้ ซูโครส (6.02–6.16) กลูโคส (7.07–7.28) ฟรุกโตส (7.73–8.05) และเอทานอล (16.27-16.56) (ทำการวิเคราะห์โดยภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

3.6.5 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โพวเวคตีคาร์บอกซิเลส

ปรับปรุงจากวิธีของ Rosche และคณะ (2002) มี 2 ขั้นตอน คือ การทำให้ผนังเซลล์จุลินทรีย์เกิดรูรั่วและการวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โพวเวคตีคาร์บอกซิเลส (PDC)

3.6.5.1 การทำให้ผนังเซลล์จุลินทรีย์เกิดรูรั่ว

ทำการดวงเม็ดแก้ว (glass bead) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติมลงในหลอดปั่นเหวี่ยง 15 มิลลิลิตร ที่มีตะกอนเซลล์สำหรับวัดความเข้มข้น โปรตีนและค่ากิจกรรมการทำงานของ PDC ตามด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ (pH 6.0 ในโพแทสเซียมความเข้มข้น 4.5 โมลาร์) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นนำหลอดปั่นเหวี่ยงไป vortex 1 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งเกล็ด 1 นาที ทำซ้ำ 3 รอบ รินของเหลวบนด้านบนในหลอดปั่นเหวี่ยง 15 มิลลิลิตร ลง

ในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดที่ 13,400 รอบต่อ นาที ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงของบริษัท Eppendorf เป็นเวลา 2 นาที แยกเก็บส่วนของเหลวใสที่ได้ สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีน และค่ากิจกรรมการทำงานของ PDC ในขั้นตอนต่อไป

3.6.5.2 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไฟรูเวตดีคาร์บอกซิเลส (PDC)

ทำการวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ PDC ในตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน (จากสารละลายเอนไซม์บริสุทธิ์และจากยีสต์แห้ง) ด้วยวิธีการวัดค่ากิจกรรมการทำงานแบบดีคาร์บอกซิเลส ที่มีหลักการทำปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลสจับควบคู่ไปกับปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นเอนไซม์ ADH ตามวิธีที่แนะนำโดย Bergmeyer และ Grabl (1983) ซึ่งยังสอดคล้องกับวิธีวิเคราะห์ที่บริษัท Sigma-Aldrich ได้ระบุไว้ด้วย ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาออกซิเดชันของ $\text{NADH} + \text{H}^+$ ไปเป็น NAD^+ ในปฏิกิริยาควบคุมด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบ double-beam ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ใน UV cuvette ขนาด 4.5 มิลลิลิตร ทั้งนี้นิยามค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฟรูเวตดีคาร์บอกซิเลส 1 U หรือ 1 หน่วย หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนไฟรูเวต 1 ไมโครโมลให้เป็นอะเซตาสลไฮด์ได้ต่อนาที ที่ pH 6.0 ณ 25 องศาเซลเซียส (Rosche และคณะ, 2002) โดยควบคุมค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ระหว่างการวิเคราะห์ให้อยู่ในช่วงเส้นตรง 0.3–0.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่

ทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Candida utilis* ทั้ง 6 สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยและมีจำหน่ายจาก ศูนย์จุลชีววิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย คือ สายพันธุ์ดังต่อไปนี้ *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5032, *Candida utilis* TISTR 5043, *Candida utilis* TISTR 5046, *Candida utilis* TISTR 5198 และ *Candida utilis* TISTR 5352 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ YM อาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไธยอนแห้ง และอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไธยอนแห้งพร้อมกาก โดยทำการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กำหนดระดับความเร็วในการหมุนของเครื่องเขย่าเท่ากับ 160 รอบต่อนาที และทำการวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเมื่อเริ่มทำการเพาะเลี้ยง และเมื่อครบ 24 ชั่วโมง

4.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ YM

เมื่อเริ่มทำการเพาะเลี้ยงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ YM พบว่ามีค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเฉลี่ย 5.95 มีน้ำหนักเซลล์แห้งโดยเฉลี่ย 1.21 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 5.12 กรัมต่อลิตร และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ 31.28 มิลลิกรัมต่อลิตร เทียบกับค่าพารามิเตอร์ที่ได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในระดับขวดรูปชมพู่ครบ 24 ชั่วโมง ตามตารางที่ 4.1

ตาราง 4.1 ค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ชั่วโมงที่ 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเร็วของเครื่องเขย่าเท่ากับ 160 รอบต่อนาที

สายพันธุ์ <i>Candida utilis</i>	pH	น้ำหนักเซลล์ แห้งที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาล ทั้งหมดที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ปริมาณ เอทานอล (ร้อยละ)	PDC (หน่วยต่อ มิลลิกรัมโปรตีน)
5001	5.00 ^c	2.58 ^f	3.74 ^a	54.62 ^a	0.74 ^c	N/a ^a
5032	5.22 ^a	2.67 ^e	4.14 ^a	45.13 ^a	1.04 ^b	N/a ^a
5043	4.86 ^b	3.21 ^b	4.48 ^a	57.69 ^a	0.73 ^c	N/a ^a
5046	5.15 ^c	3.39 ^c	3.71 ^a	42.05 ^a	0.79 ^c	N/a ^a
5198	4.93 ^d	2.97 ^d	1.96 ^a	49.23 ^a	0.53 ^d	N/a ^a
5352	5.03 ^c	6.31 ^a	1.40 ^a	60.77 ^a	1.86 ^a	N/a ^a

หมายเหตุ N/a แสดงถึงการที่ไม่สามารถหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ได้

a,b,c,d,e,f แสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

จะเห็นได้ว่าค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ลดลงจากเดิมประมาณ 1.00 โดยเฉลี่ยใน 6 สายพันธุ์ของ *C. utilis* แต่สายพันธุ์ TISTR 5352 จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น คือ มีค่าร้อยละ 1.86 แต่ ในสายพันธุ์ 5001 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นน้อยที่สุด (2.58 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้้น้อยมาก (ร้อยละ 0.74) นั่นก็หมายถึง สายพันธุ์ 5001 มีการสร้างจำนวนเซลล์น้อยส่งผลต่อปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น และการที่ pH มีค่าต่ำลงนั้น เนื่องมาจากมีการผลิตกรดอินทรีย์เกิดขึ้น โดยพบกรดอะซิติก กรดไพรูวาโนอิก และกรดซัคซินิก เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย (ไม่ได้แสดงผลในที่นี้)

ส่วนในค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้จากตาราง ในสายพันธุ์ 5352 มีการใช้น้ำตาลน้อยที่สุด คือ มีค่า 1.40 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นมากที่สุด คือ มีค่าร้อยละ 1.86 แต่ในสายพันธุ์ 5043 มีค่าปริมาณน้ำตาลที่ใช้มากถึง 4.48 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น มีค่าน้อยมาก คือร้อยละ 0.73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นในสายพันธุ์ 5352 มีค่ามากที่สุด (6.31 กรัมต่อลิตร) แต่ปริมาณน้ำตาลที่ใช้จะมีค่าน้อยที่สุด (1.40 กรัมต่อลิตร) และในสายพันธุ์ 5001 นั้นมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่เกิดขึ้นน้อยที่สุด (2.58 กรัมต่อลิตร) ซึ่งจะขัดแย้งกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้มากที่สุด (3.74 กรัมต่อลิตร) อาจจะเป็นเพราะว่าสายพันธุ์ 5001 ต้องการน้ำตาลไปเป็นแหล่งพลังงานเพื่อรักษาสภาพเซลล์

ในค่าปริมาณโปรตีน ในสายพันธุ์ 5352 จะมีค่าปริมาณโปรตีนมากที่สุด คือ มีค่า 60.76 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นที่มีค่ามากที่สุด คือ 6.31 กรัมต่อลิตร และยังสอดคล้องกับการผลิตเอทานอลได้มากที่สุด เพราะว่าถ้ามีน้ำหนักเซลล์แห้งมากๆ ก็จะทำให้ค่าปริมาณโปรตีนมากไปด้วยและยังส่งผลต่อการผลิตเอทานอลที่เพิ่มขึ้นมากไปด้วย

ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่เชื้อยีสต์ *Candida utilis* สามารถผลิตเอทานอลได้น้อย และผลิตเอนไซม์ไฟรูเวคติกคาร์บอกซิเลสไม่ได้เลยนั้น เนื่องมาจากกรณีแหล่งอาหารที่จำเป็นในการเจริญเติบโต เช่น คาร์โบไฮเดรต และโปรตีนน้อย และอาจมีสถานะที่ไม่เหมาะสมแก่การผลิตสารของยีสต์ชนิดนี้

จากตารางค่าความเข้มข้นของน้ำตาล (ตาราง 4.2) จะเห็นได้ว่า สายพันธุ์ 5352 จะมีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเหลือมากที่สุด คือ มีค่าร้อยละ 0.1443 และยังคงมีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสถึงร้อยละ 0.0318 แต่กลับไม่มีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสเลย อาจจะเนื่องจากว่าสายพันธุ์ 5352 นั้นเลือกที่จะใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นอาหารในการเจริญเติบโต

นอกจากนี้ พบว่าสายพันธุ์ 5001 ยังมีน้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตสเหลืออยู่มาก คือร้อยละ 0.1303 และร้อยละ 0.1668 ตามลำดับ ในขณะที่มีน้ำตาลซูโครสเหลืออยู่เพียงร้อยละ 0.0338 เท่านั้น แสดงว่ายีสต์สายพันธุ์นี้อาจใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีกว่าน้ำตาลฟรุกโตส

ดังนั้นจากตารางที่ 4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ YM จะได้ว่า *C. utilis* สายพันธุ์ 5352 มีการผลิตเอทานอลได้มากที่สุด คือ มีค่าร้อยละ 1.86 และในสายพันธุ์ 5198 มีการผลิตเอทานอลได้น้อยที่สุด คือ มีค่าร้อยละ 0.53

ตาราง 4.2 ค่าความเข้มข้น โดยเฉลี่ยของน้ำตาลซูโครส กลูโคส และ ฟรุกโตส ที่ชั่วโมงที่ 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM และ *C. utilis* สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์ <i>Candida utilis</i>	ค่าความเข้มข้น (ร้อยละ)		
	ซูโครส	กลูโคส	ฟรุกโตส
5001	0.0338 ^c	0.1303 ^a	0.1668 ^a
5032	0.0200 ^d	0.0100 ^f	0.0150 ^c
5043	0.0015 ^e	0.0718 ^c	0.0006 ^b
5046	0.0175 ^f	0.0342 ^b	0.0270 ^c
5198	0.0993 ^b	0.0128 ^e	0.0032 ^d
5352	0.1443 ^a	0.0318 ^d	N/a ^f

หมายเหตุ N/a แสดงถึงการที่ไม่สามารถหาค่าจากโครมาโตแกรมของ HPLC ได้
a,b,c,d,e,f แสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

4.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไยอบแห้ง

ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไยอบแห้งเฉลี่ยคือ 5.65 มีน้ำหนักเซลล์แห้งโดยเฉลี่ย 3.50 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 295.20 กรัมต่อลิตร และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ 93.8462 มิลลิกรัมต่อลิตร เทียบกับค่าพารามิเตอร์ที่ได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในระดับขวดปชมพุ่มครบ 24 ชั่วโมง ตามตารางที่ 4.3

จากตาราง เมื่อเปรียบเทียบกับชั่วโมงที่ 0 จะได้ว่าค่า pH จะลดลงจากเดิมมากกว่า 1.1 ซึ่งมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เป็นเพราะความเข้มข้นน้ำตาลในน้ำตาลไยมีค่ามากกว่ามาก ทำให้เกิดกรดอินทรีย์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงยีสต์นี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM โดยพบกรดอะซิติก กรดไพรูวาโนอิก และกรดซัคซินิก (ไม่ได้แสดงผลในที่นี้)

ตาราง 4.3 ค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ชั่วโมงที่ 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำลำไยอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเร็วของเครื่องเขย่าเท่ากับ 160 รอบต่อนาที

สายพันธุ์ <i>Candida utilis</i>	pH	น้ำหนักเซลล์ แห้งที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาล ทั้งหมดที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ปริมาณ เอทานอล (ร้อยละ)	PDC (หน่วยต่อ กรัม)
5001	4.51 ^a	3.04 ^b	101.33 ^b	177.95 ^a	3.40 ^a	1.229 ^b
5032	4.30 ^b	3.03 ^c	62.00 ^b	163.08 ^a	2.54 ^c	1.106 ^d
5043	4.24 ^b	2.86 ^c	14.53 ^a	190.26 ^a	2.60 ^b	1.240 ^c
5046	4.27 ^c	2.21 ^d	15.60 ^a	176.15 ^a	2.70 ^c	1.120 ^a
5198	3.87 ^d	3.50 ^a	100.80 ^b	157.95 ^a	2.36 ^d	0.354 ^c
5352	4.49 ^a	1.86 ^f	4.13 ^a	177.18 ^a	2.60 ^{b,c}	0.101 ^f

หมายเหตุ N/a แสดงถึงการที่ไม่สามารถหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ได้

a,b,c,d,e,f แสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

สายพันธุ์ 5001 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นมาก (3.04 กรัมต่อลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น คือ มีค่าร้อยละ 3.40 แต่ ในสายพันธุ์ 5198 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นมากที่สุด คือ 3.50 กรัมต่อลิตร แต่มีปริมาณเอทานอลเกิดขึ้นน้อยที่สุด คือร้อยละ 2.36 ส่วนในสายพันธุ์ 5352 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นน้อยที่สุด (1.86 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้น้อยไปด้วย (ร้อยละ 2.60) นั่นก็หมายถึง สายพันธุ์ 5001 มีการสร้างจำนวนเซลล์มากพอสมควรจึงส่งผลต่อปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นทำให้ได้ปริมาณเอทานอลมากไปด้วย

ส่วนค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้จากรายที่ 4.3 ในสายพันธุ์ 5352 มีการใช้น้ำตาลน้อยที่สุด โดยใช้น้ำตาลทั้งหมดไปเพียง 4.13 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นน้อย คือมีค่าเพียงร้อยละ 2.60 แต่ในสายพันธุ์ 5001 มีค่าความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้มากที่สุดไปถึง 101.33 กรัมต่อลิตร ทำให้ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นมีค่ามากถึงร้อยละ 3.40

ตาราง 4.4 ค่าความเข้มข้นโดยเฉลี่ยของน้ำตาลซูโครส กลูโคส และ ฟรุกโตสที่ชั่วโมงที่ 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไยอบแห้ง และ *C. utilis* สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์ <i>Candida utilis</i>	ค่าความเข้มข้น (ร้อยละ)		
	ซูโครส	กลูโคส	ฟรุกโตส
5001	2.1329 ^f	N/a ^b	6.5775 ^a
5032	2.6226 ^c	N/a ^b	5.8668 ^d
5043	2.3195 ^e	N/a ^b	6.2728 ^e
5046	2.2104 ^d	N/a ^b	5.5725 ^b
5198	2.7017 ^b	1.265 ^a	3.0821 ^f
5352	2.9707 ^a	N/a ^b	6.0932 ^c

หมายเหตุ N/a แสดงถึงการที่ไม่สามารถหาค่าจากโครมาโตแกรมของ HPLC ได้
a,b,c,d,e,f แสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

ในค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้น สายพันธุ์ 5198 มีค่าเพิ่มขึ้นมากที่สุด (3.50 กรัมต่อลิตร) จึงส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้จะมีค่ามากไปด้วย (100.80 กรัมต่อลิตร) และในสายพันธุ์ 5352 นั้นมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่เกิดขึ้นน้อยที่สุด (1.86 กรัมต่อลิตร) ทำให้มีค่าปริมาณน้ำตาลที่ใช้ น้อยที่สุด (4.13 กรัมต่อลิตร) ไปด้วย

ในค่าปริมาณโปรตีน ในสายพันธุ์ 5043 จะมีค่าปริมาณโปรตีนมากที่สุด คือ มีค่า 190.26 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นที่มีค่ามาก คือ 2.86 กรัมต่อลิตร และยัง สอดคล้องกับการผลิตเอทานอลอีกด้วย (ร้อยละ 2.60) เพราะว่าถ้ามีน้ำหนักเซลล์แห้งมาก ก็จะทำให้ค่าปริมาณโปรตีนมากไปด้วยและยังส่งผลต่อการผลิตเอทานอลที่เพิ่มขึ้นมากไปด้วย

ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไยอบแห้ง ที่เชื้อยีสต์ *Candida utilis* ผลิตเอนไซม์ไฟรูเวคคิ คาร์บอกซิเลสได้มากที่สุดได้แก่ สายพันธุ์ 5001 สามารถผลิตเอนไซม์ไฟรูเวคคิ คาร์บอกซิเลสได้ 1.229 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน สอดคล้องต่อการผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดอีกด้วย และสายพันธุ์

5352 สามารถผลิตเอนไซม์ไฟรูเวคตีคาร์บอกซิเลสได้น้อยสุด คือ 0.101 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งอาจมีสถานะที่ไม่เหมาะสมแก่การผลิตเอนไซม์ไฟรูเวคตีคาร์บอกซิเลสของยีสต์สายพันธุ์ 5352

จากตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่า ใน *C. utilis* ทั้ง 6 สายพันธุ์นั้น มีน้ำตาลซูโครสเหลือพอๆกัน ส่วนน้ำตาลฟรุกโตสก็มีค่าเหลือภายในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจาก 24 ชั่วโมงแล้วพอๆกัน ยกเว้นสายพันธุ์ 5198 ซึ่งคล้ายกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส จะเห็นได้ว่า ใน 6 สายพันธุ์มีการใช้น้ำตาลกลูโคสหมดไปถึง 5 สายพันธุ์ มีเพียงสายพันธุ์ 5198 ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสไม่หมด เราจะเห็นได้ว่า *C. utilis* เกือบทุกสายพันธุ์นั้น สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีมาก

4.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาล้าโยบแห้งพร้อมกาก

ตาราง 4.5 ค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ชั่วโมงที่ 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาล้าโยบแห้งพร้อมกาก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเร็วของเครื่องเขย่าเท่ากับ 160 รอบต่อนาที

สายพันธุ์ <i>Candida utilis</i>	pH	น้ำหนักเซลด์ แห้งที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาล ทั้งหมดที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ปริมาณ เอทานอล (ร้อยละ)	PDC (หน่วยต่อ กรัม)
5001	4.45 ^a	3.86 ^c	168.53 ^a	110.26 ^a	2.00 ^f	0.215 ^d
5032	4.23 ^c	4.80 ^c	194.13 ^a	88.46 ^b	2.55 ^d	N/a ^c
5043	4.19 ^d	3.49 ^d	200.93 ^a	78.46 ^b	2.60 ^b	0.733 ^c
5046	4.17 ^d	3.90 ^f	164.40 ^a	80.77 ^a	2.70 ^c	0.715 ^b
5198	3.96 ^e	6.25 ^b	146.13 ^a	74.10 ^a	2.36 ^e	0.962 ^a
5352	4.33 ^b	10.28 ^a	174.80 ^a	92.05 ^a	3.82 ^a	N/a ^c

หมายเหตุ N/a แสดงถึงการที่ไม่สามารถหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ได้

a,b,c,d,e,f แสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเริ่มทำการเพาะเลี้ยงกับอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไธบอแห้งพร้อมกาก พบว่ามีค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเฉลี่ย 5.58 มีน้ำหนักเซลล์แห้งโดยเฉลี่ย 6.62 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นมีความเข้มข้นมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นๆ เพราะมีกากน้ำตาลไธบออยู่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 231.20 กรัมต่อลิตร และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ 68.21 มิลลิกรัมต่อลิตร เทียบกับค่าพารามิเตอร์ที่ได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในระดับขวดรูปชมพู่ครบ 24 ชั่วโมง ตามตารางที่ 4.5

จากการทดลองข้างต้นเมื่อเปรียบเทียบกับชั่วโมงที่ 0 จะพบว่าค่า pH จะลดลงจากเดิมมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทอื่นๆ แต่สายพันธุ์ TISTR 5352 จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นมากที่สุด (10.32 กรัมต่อลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น คือมีค่าร้อยละ 3.82 ในสายพันธุ์ 5043 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นน้อยที่สุด (3.49 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้น้อยมาก (ร้อยละ 2.60) หมายถึง สายพันธุ์ 5043 มีการสร้างจำนวนเซลล์น้อยซึ่งส่งผลต่อปริมาณเอทานอลที่ผลิตขึ้น และการที่ pH มีค่าต่ำลงนั้น เนื่องมาจากมีการผลิตกรดอินทรีย์เกิดขึ้น โดยพบกรดอะซิติก กรด โพรพาโนอิก และกรดซัคซินิก เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย (ไม่มีผลแสดง ณ ที่นี้)

ส่วนในค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้จากตาราง ในสายพันธุ์ 5352 มีการใช้น้ำตาลมาก คือมีค่า 174.80 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นมากที่สุด คือ มีค่าร้อยละ 3.82 แต่ในสายพันธุ์ 5043 มีค่าปริมาณน้ำตาลที่ใช้มากที่สุดถึง 200.93 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น (ร้อยละ 2.60) มีค่าน้อยกว่าสายพันธุ์ 5352 อาจจะเนื่องมาจากว่า แต่ละสายพันธุ์นั้นมีการใช้ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดแตกต่างกัน และมีการใช้ปริมาณน้ำตาลในการเจริญเติบโตมากน้อยต่างกัน

ในค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นในสายพันธุ์ 5352 มีค่ามากที่สุด (10.32 กรัมต่อลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้จะมีค่ามากที่สุด (174.80 กรัมต่อลิตร) และในสายพันธุ์ 5043 นั้นมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่เกิดขึ้นน้อยที่สุด (3.49 กรัมต่อลิตร) แต่มีปริมาณน้ำตาลที่ใช้มากที่สุด (200.93 กรัมต่อลิตร) ส่วนค่าปริมาณโปรตีน ในสายพันธุ์ 5352 จะมีค่าปริมาณโปรตีนมาก คือ มีค่า 92.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นที่มีค่ามากที่สุด คือ 10.28 กรัมต่อลิตร และยังคงสอดคล้องกับการผลิตเอทานอลได้มากที่สุด (ร้อยละ 3.82) เพราะว่าถ้ามีน้ำหนักเซลล์แห้งมากๆ ก็จะทำให้ค่าปริมาณโปรตีนมากไปด้วยและยังส่งผลต่อการผลิตเอทานอลที่เพิ่มขึ้นมากไปด้วย

ส่วนการผลิตเอนไซม์โพวเวคตีคาร์บอกซิเลส นั้นจากตารางจะเห็นได้ว่า *Candida utilis* เกือบทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์โพวเวคตีคาร์บอกซิเลสได้ยกเว้นสายพันธุ์ 5032 และสายพันธุ์ 5352 ที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์โพวเวคตีคาร์บอกซิเลสได้เลย อาจเนื่องมาจากสถานะต่างๆ ไม่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสมต่อการใช้ในการผลิตเอนไซม์ไฟรูเวคตีคาร์บอกซิเลส ถึงแม้ว่าในสายพันธุ์ 5352 จะเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุด อาจจะมาจกช่วงที่ทำให้ผนังเซลล์เกิดรูรั่วอาจไม่มีประสิทธิภาพดีพอ หรืออีกสาเหตุหนึ่งก็คือเอนไซม์ไฟรูเวคตีคาร์บอกซิเลสมีปริมาณน้อยมากทำให้ไม่สามารถหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไฟรูเวคตีคาร์บอกซิเลสได้ ส่วนสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไฟรูเวคตีคาร์บอกซิเลสได้มากที่สุดได้แก่ สายพันธุ์ 5198 สามารถผลิตได้ 0.962 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

จกตารางที่ 4.6 ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลต่างๆ จะได้ว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไยอบแห้งพร้อมกาก ทุกสายพันธุ์ยังมีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเหลืออยู่หลังจากถูกเพาะเลี้ยงแล้ว 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมากที่สุดในสายพันธุ์ 5032 คือ มีค่าร้อยละ 4.6295 และสายพันธุ์ 5352 มีค่าน้ำตาลซูโครสเหลือน้อยที่สุด ส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมีเหลืออยู่เพียง 3 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ TISTR 5032, TISTR 5043 และ TISTR 5046 ก็จะหมายถึงว่าอีก 3 สายพันธุ์มีการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโต ส่วนในความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสมีเหลืออยู่ทุกสายพันธุ์

ตาราง 4.6 ค่าความเข้มข้นโดยเฉลี่ยของน้ำตาลซูโครส กลูโคส และ ฟรุกโตส ที่ชั่วโมงที่ 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไยอบแห้งพร้อมกาก และ *C. utilis* สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์ <i>Candida utilis</i>	ค่าความเข้มข้น (ร้อยละ)		
	ซูโครส	กลูโคส	ฟรุกโตส
5001	3.8496 ^b	N/a ^d	7.2134 ^d
5032	4.6295 ^a	0.6712 ^c	7.8132 ^c
5043	3.7484 ^c	N/a ^d	7.9898 ^a
5046	3.7770 ^d	N/a ^d	8.0018 ^b
5198	2.5532 ^e	1.9985 ^b	5.0274 ^c
5352	0.4068 ^f	9.8405 ^a	0.4300 ^f

หมายเหตุ N/a แสดงถึงการที่ไม่สามารถหาค่าจากโครมาโตแกรมของ HPLC ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือมีข้อจำกัดการใช้งาน ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์
 a,b,c,d,e,f แสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทำการทดลองทั้ง 3 อาหาร ปรากฏว่า สายพันธุ์ 5001 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM นั้นให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งน้อย และมีค่าปริมาณน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมากสมควร แสดงว่า สายพันธุ์นี้เจริญได้ไม่ดี ในอาหารชนิดนี้ ส่งผลให้ผลิตเอทานอลได้น้อยอีกด้วย ซึ่งคล้ายกับการเลี้ยงในอาหารลำไยพร้อมกาก แต่จะต่างกับกับอาหารน้ำลำไยอบแห้งซึ่ง ในอาหารน้ำลำไยอบแห้งซึ่งจะสามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุด

ส่วนสายพันธุ์ 5032 ในอาหารทั้ง 3 อาหารนั้นมีค่าต่างๆใกล้เคียงกันมากเมื่อเทียบกันแล้ว ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าน้อยมากทั้งสามอาหาร เช่นเดียวกับสายพันธุ์ 5046 ในขณะที่สายพันธุ์ 5043 ในอาหารทั้ง 3 อาหารนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM และอาหารลำไยพร้อมกากนั้นมีการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนมาก แต่ในอาหารลำไยอบแห้งมีการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนน้อย ส่วนค่าอื่นๆนั้นมีค่าใกล้เคียงกันมากส่งผลให้การผลิตเอทานอลได้น้อย ตรงกันข้ามกับสายพันธุ์ 5198 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM และอาหารลำไยพร้อมกากมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ใกล้เคียงกัน แต่ในอาหารลำไยอบแห้งนั้น มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้มาก อย่างไรก็ตาม เอทานอลที่ผลิตได้นั้นมีปริมาณใกล้เคียงกันมาก

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM และอาหารน้ำลำไยอบแห้งพร้อมกาก สายพันธุ์ 5352 สามารถเจริญเติบโตและสร้างเอทานอลได้ค่ามากที่สุด ในอาหารทั้งสองชนิดนี้ แต่กลับมีน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความเข้มข้นเอทานอลน้อยที่สุด เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อน้ำลำไยอบแห้ง อาจเป็นเพราะว่าในอาหารลำไยพร้อมกากนั้น ไม่มีแหล่งอาหารที่เหมาะสมคือสายพันธุ์ 5352 ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อน้ำลำไยอบแห้งทำให้สายพันธุ์ 5001 มีปริมาณเอทานอลมากที่สุด

เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำลำไยอบแห้งและเชื้อ *C. utilis* TISTR 5001 มีผลความเข้มข้นของเอทานอลและเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสเป็นที่น่าพอใจ จึงถูกเลือกมาเพื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร

4.2 การเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ในการศึกษานี้ ได้เลือก *Candida utilis* TISTR 5001 และอาหารเลี้ยงเชื้อลำไยอบแห้งเพื่อทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 และแบ่งการเพาะเลี้ยงออกเป็น 2 ช่วง คือ

ช่วงแรก ใช้ความเร็วของใบพัด 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm จนเชื้อเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ โดยดูจากค่าการดูดกลืนคลิ่นแสงที่ 660 นาโนเมตร

ช่วงที่สอง ปรับอัตราการให้อากาศเหลือ 0.25 vvm และความเร็วของใบพัด 100 รอบต่อนาที

ในระหว่างการเพาะเลี้ยง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง โดยในชั่วโมงที่ 0 มีการปรับค่า pH เท่ากับ 6 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.0267 กรัมต่อลิตร ค่าน้ำตาลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 237.2 กรัมต่อลิตร ค่าปริมาณ โปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 90.769 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.7)

ต่อมาในชั่วโมงที่ 4 จะเห็นได้ว่า ค่า pH ลดลงจากเดิมมากจนมีค่าเท่ากับ 5.25 เนื่องมาจากการผลิตกรดอินทรีย์เกิดขึ้น โดยพบกรดอะซิติก กรดโพรพาโนอิก และกรดซัคซินิก เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย (ไม่ได้แสดงผล) และมีค่าดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นจากเดิม เนื่องจากมีการเจริญของเชื้อ *C. utilis* ทำให้มีความขุ่นของเซลล์เกิดขึ้น และทำให้ค่าดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น และมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเป็น 3.3133 กรัมต่อลิตร ส่วนค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดลดลงเหลือ 172.8 กรัมต่อลิตร เนื่องจากว่า *C. utilis* มีการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนจึงมีค่าน้ำตาลลดลง และในค่าโปรตีนมีค่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากการจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจึงมีค่าโปรตีนที่ละลายน้ำเพิ่มขึ้นด้วย และมีเอทานอลเกิดขึ้นจากกระบวนการมีค่าเท่ากับ 0.12791 กรัมต่อลิตร

ในชั่วโมงที่ 8 จากรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่า ค่า pH มีค่าลดลงอีกเล็กน้อย (5.03) เนื่องมาจากการผลิตกรดอินทรีย์เพิ่มอีกเพียงเล็กน้อย โดยพบกรดอะซิติก กรดโพรพาโนอิก และกรดซัคซินิก เกิดขึ้นอีกเพียงเล็กน้อย และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจากเดิมเป็น 5.2967 กรัมต่อลิตร จึงทำให้ค่าดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.374 เชื้อ *C. utilis* มีการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตมากขึ้น (มีค่าเหลือ 149.6 กรัมต่อลิตร) และค่าโปรตีนที่ละลายน้ำก็สูงขึ้นด้วย (117.692 มิลลิกรัมต่อลิตร) และมีเอทานอลเกิดขึ้นมีค่าเท่ากับ 0.47456 กรัมต่อลิตร

ที่การเพาะเลี้ยงชั่วโมงที่ 12 จะเห็นได้ว่า ค่า pH มีค่าลดลงไม่มากอย่างต่อเนื่อง (4.9) เนื่องมาจากการผลิตกรดอินทรีย์เกิดขึ้น โดยยังคงพบกรดอะซิติก กรดโพรพาโนอิก และกรดซัคซินิก เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจากเดิม (6.0867 กรัมต่อลิตร) จึงทำให้ค่าดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น (1.634) โดยที่ *C. utilis* มีการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตมากขึ้น (87.6 กรัมต่อลิตร) และค่าโปรตีนที่ละลายน้ำก็สูงขึ้นด้วย (133.846 มิลลิกรัมต่อลิตร) และมีเอทานอลเกิดขึ้นมีค่าเท่ากับ 0.50542 กรัมต่อลิตร

ส่วนในชั่วโมงที่ 16 จากรูปที่ 4.1 พบว่า ค่า pH มีค่าลดลงอีกเป็น 4.73 เนื่องมาจากการผลิตกรดอินทรีย์เกิดขึ้น โดยพบกรดอะซิติก กรดโพรพาโนอิก และกรดซัคซินิก เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจากเดิม (7.2000 กรัมต่อลิตร) จึงทำให้ค่าดูดกลืนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้นเป็น 1.708 และเชื้อ *C. utilis* มีการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งอาหารอย่างค่อนเนื่อง โดยมีความเข้มข้นเหลือ 58.4 กรัมต่อลิตร และค่าโปรตีนที่ละลายก็มีค่าสูงขึ้น (148.462 มิลลิกรัมต่อลิตร) และมีเอทานอลเกิดขึ้นมีค่าเท่ากับ 0.64301 กรัมต่อลิตร

ณ ชั่วโมงที่ 20 ค่า pH ลดลงเหลือ 4.55 โดยยังคงพบกรดอะซิติก กรดโพรพาโนอิก และกรดซัคซินิก เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย ค่าความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดลดลงเป็น 48.4 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายน้ำมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 161.538 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ช่วงเวลานี้ มีน้ำหนักรวมเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจากเดิมเล็กน้อยเป็น 7.4933 กรัมต่อลิตร เนื่องมาจากว่าในค่าความขุ่นเซลล์เริ่มมีค่าคงที่ (1.7988) จึงทำการเปลี่ยนค่าความเร็วของใบพัดและอัตราการให้อากาศให้มีค่าลดลงเหลือ 100 รอบต่อนาทีและ 0.25 vvm ตามลำดับ เพื่อให้มีการผลิตเอโนไซม์ไฟรูเวติคาร์บอนิกซิเลสและเอทานอลเพิ่มขึ้น โดยดูได้จากรูปที่ 4.1 และมีเอทานอลเกิดขึ้นมีค่าเท่ากับ 0.94551 กรัมต่อลิตร

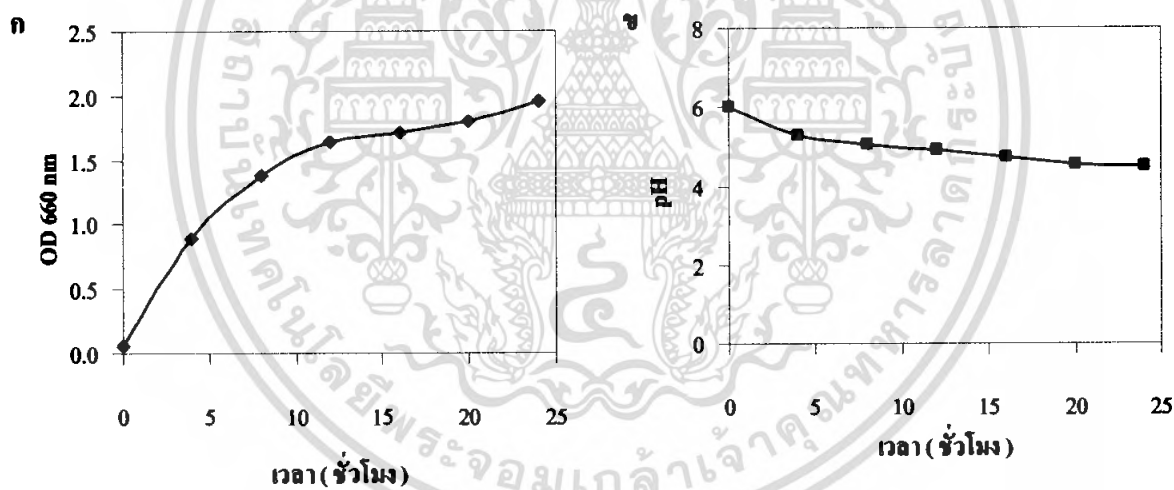
ในการเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 จากรูป 4.1 จะเห็นได้ว่าค่า pH มีค่าลดลงเป็น 4.48 โดยพบกรดอะซิติก กรดโพรพาโนอิก และกรดซัคซินิก เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย (ไม่ได้แสดงผล) และมีน้ำหนักรวมเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจากเดิมมาก เป็น 9.3000 กรัมต่อลิตร จึงทำให้ค่าดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น (1.955) เชื้อ *C. utilis* มีการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตและการผลิตสารต่างๆ อย่างค่อนเนื่อง มีค่าเป็น 43.2 กรัมต่อลิตร และค่าโปรตีนที่ละลายน้ำก็สูงขึ้นด้วย (181.538 มิลลิกรัมต่อลิตร) และมีเอทานอลเกิดขึ้นมีค่าเท่ากับ 0.96973 กรัมต่อลิตร

จากตารางที่ 4.7 ตั้งแต่เริ่มต้นชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 24 นั้นค่าน้ำตาลที่วัดได้ จะมีทั้งกลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส ส่วนมาก *C. utilis* จะใช้น้ำตาลกลูโคสได้มากตั้งแต่ช่วงแรก ส่วนน้ำตาลซูโครสจะมีการนำไปใช้มากในช่วงท้ายตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 จึงทำให้ค่าของน้ำตาลซูโครสมีค่าลดลงกว่า 0.7548 กรัมต่อลิตร ในขณะที่น้ำตาลฟรุคโตสมีความเข้มข้นลดลงไม่มากนัก *C. utilis* ต้องการน้ำตาลไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต และยังสามารถผลิตเอทานอลได้มากขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นทุกๆ 4 ชั่วโมง แต่สายพันธุ์ 5001 มีการใช้น้ำตาลฟรุคโตสน้อย

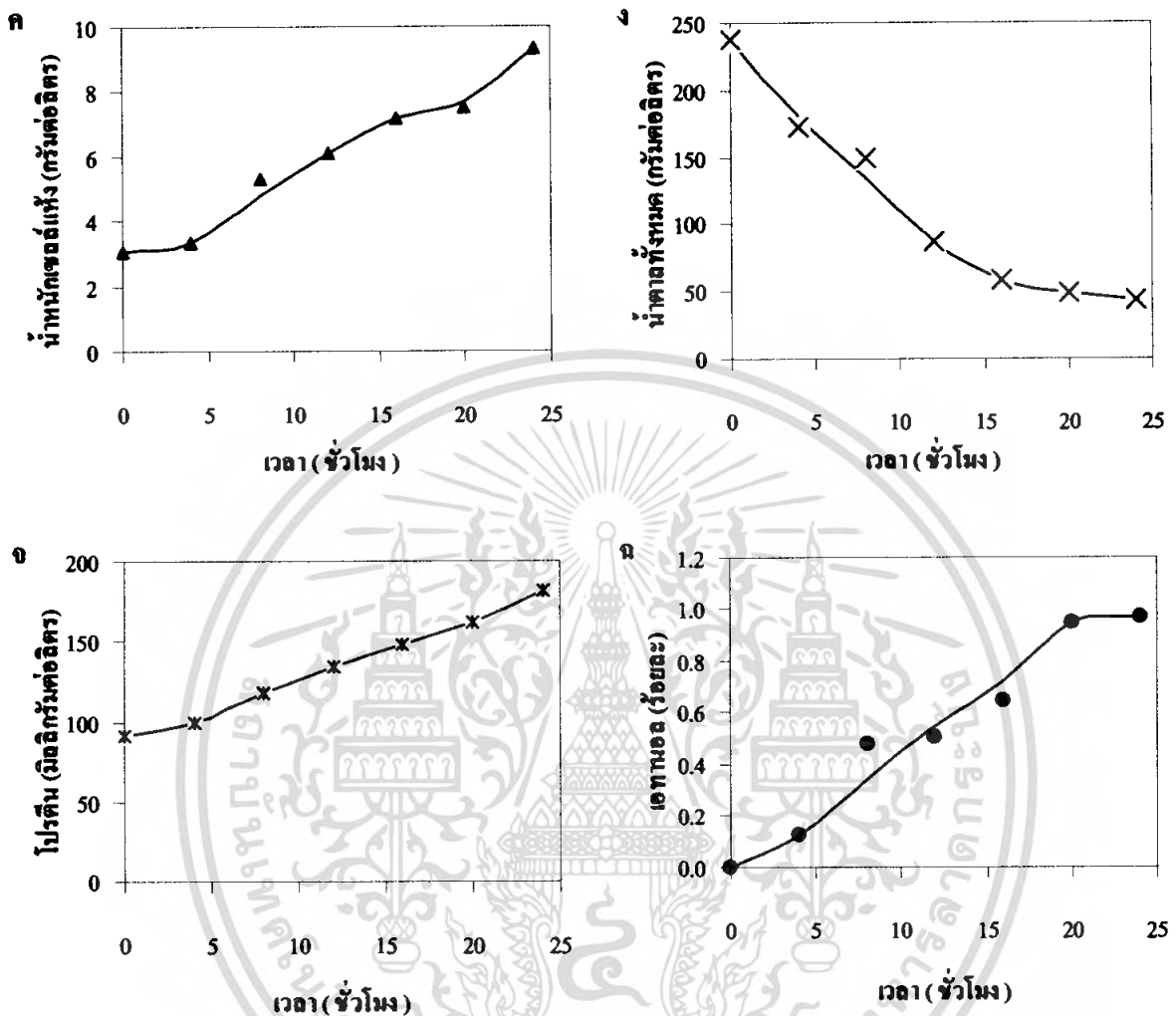
จะเห็นได้ว่า เมื่อเทียบค่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้ในถังหมักขนาด 5 ลิตรกับการเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตรนั้น ความเข้มข้นของเอทานอลในถังหมักจะน้อยกว่าเนื่องจากว่าสภาวะการให้ออกซิเจนในถังหมักไม่เพียงพอแก่เชื้อ *Candida utilis* และเชื้อ *C. utilis* มีความต้องการอากาศในการผลิตเอทานอล ไม่เหมือน *Saccharomyces cerevisiae*

โดยที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคสและปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลเป็นอย่างมากต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์แต่ละชนิด ในสภาวะที่มีออกซิเจน ประสิทธิภาพการเอกลำนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักของยีสต์จะลดลง เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Pasteur effect แต่ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีกลูโคสความเข้มข้นสูง อาจเกิดการยับยั้งกระบวนการหมักที่เรียกว่า Crabtree effect ทั้งนี้ยีสต์กว่าครึ่งที่รู้จักในวงการวิทยาศาสตร์ไม่มีความสามารถในการหมัก หรือจัดอยู่ในกลุ่มของ nonfermentative หรือ strictly aerobic yeasts ส่วนยีสต์ชนิดที่เหลือสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultatively fermentative yeasts) ทั้งยีสต์ *S. cerevisiae* และ *C. utilis* ต่างก็จัดอยู่ในกลุ่มหลังนี้ แต่มีความแตกต่างกันคือ ในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงถึงระดับหนึ่ง กระบวนการหมักของ *S. cerevisiae* (Crabtree positive yeast) จะถูกยับยั้ง ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลในระดับเดียวกันจะไม่มีผลต่อกระบวนการหมักของ *C. utilis* (Crabtree negative yeast) ส่วนการที่จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ไม่สามารถนำน้ำตาล โมเลกุลคู่อย่างซูโครสไปใช้ในระหว่างกระบวนการหมักได้ อาจเป็นผลเนื่องมาจาก Kluver effect ที่ต้องพิจารณาด้วยว่าในสภาวะที่มีออกซิเจนจุลินทรีย์ใช้น้ำตาลชนิดดังกล่าวได้หรือไม่ (Deak และ Beuchat, 1996)



รูป 4.1 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงยีสต์ *C. utilis* TISTR 5001 ในอาหารน้ำตาลไอซอบแห้ง ภาพ (ก) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ภาพ (ข) ค่า pH



รูป 4.1 (ต่อ) ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงยีสต์ *C. utilis* TISTR 5001 ในอาหารน้ำ
 ล้าโยบแห้ง ภาพ (ค) ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ภาพ (ง) ค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ภาพ (จ)
 ค่าปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ และภาพ (ฉ) ค่าความเข้มข้นเอทานอล

ตาราง 4.7 ค่าความเข้มข้นโดยเฉลี่ยของน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส จากอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำ
 ลำไยอบแห้ง และ *C. utilis* สายพันธุ์ TISTR 5001 ในถังหมัก

ชั่วโมงที่	ค่าความเข้มข้น (ร้อยละ)		
	กลูโคส	ซูโครส	ฟรุกโตส
4	0.1314	1.8113	2.7992
8	0.1846	1.8462	3.0528
12	0.0767	1.5528	2.7242
16	0.0898	1.3195	2.8109
20	0.0714	0.5647	2.0831
24	0.0686	0.6011	2.1153

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการเพาะเลี้ยง *Candida utilis* ทั้ง 6 สายพันธุ์ในขบวนการหมักขนาด 500 มิลลิลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM พบว่า *C. utilis* TISTR 5032 มีค่า pH มากสุด คือ 5.22 และ *C. utilis* TISTR 5043 มีค่า pH น้อยสุด คือ 4.86 ในขณะที่ *C. utilis* TISTR 5352 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด คือ 7.5167 กรัมต่อลิตร และ *C. utilis* TISTR 5001 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยสุด คือ 3.7900 กรัมต่อลิตร ส่วน *C. utilis* TISTR 5352 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือมากที่สุด คือ 3.7244 กรัมต่อลิตร และ *C. utilis* TISTR 5046 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือน้อยที่สุด คือ 0.6400 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ *C. utilis* TISTR 5352 มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำมากที่สุด คือ 60.7692 มิลลิกรัมต่อลิตร และ *C. utilis* TISTR 5046 มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำน้อยสุด คือ 49.2308 มิลลิกรัมต่อลิตร *C. utilis* TISTR 5352 สามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุดคือ ร้อยละ 1.86 และ *C. utilis* TISTR 5198 ผลิตเอทานอลได้น้อยสุด คือ ร้อยละ 0.53 ส่วนการผลิตเอนไซม์ไพรูเวตติคาร์บอกซิเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้พบว่าไม่มี *C. utilis* สายพันธุ์ใดเลยที่สามารถผลิตเอนไซม์ไพรูเวตติคาร์บอกซิเลสได้

ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไยอบแห้ง *C. utilis* TISTR 5001 มีค่า pH มากสุด คือ 4.51 และ *C. utilis* TISTR 5198 มีค่า pH น้อยสุด คือ 3.87 ส่วน *C. utilis* TISTR 5198 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด คือ 7.0000 กรัมต่อลิตร และ *C. utilis* TISTR 5352 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยสุด คือ 5.3633 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ *C. utilis* TISTR 5046 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือมากที่สุด คือ 310.8000 กรัมต่อลิตร และ *C. utilis* TISTR 5001 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือน้อยสุด คือ 193.8667 กรัมต่อลิตร *C. utilis* TISTR 5043 มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำมากที่สุด คือ 190.2564 มิลลิกรัมต่อลิตร และ *C. utilis* TISTR 5198 มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำน้อยสุด คือ 157.9487 มิลลิกรัมต่อลิตร *C. utilis* TISTR 5001 สามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุดคือ 3.40 เปอร์เซ็นต์ และ *C. utilis* TISTR 5198 ผลิตเอทานอลได้น้อยสุด คือ 2.36 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในการผลิตเอนไซม์ไพรูเวตติคาร์บอกซิเลสสายพันธุ์ที่สามารถได้มากที่สุดได้แก่ *C. utilis* TISTR 5001 ผลิตได้ 1.229 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ *C. utilis* TISTR 5352 ผลิตเอนไซม์ไพรูเวตติคาร์บอกซิเลสได้น้อยสุด คือ 0.101 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไธพร้อมกาก *C. utilis* TISTR 5001 มีค่า pH มากสุด คือ 4.45 และ *C. utilis* TISTR 5198 มีค่า pH น้อยสุด คือ 3.96 ในขณะที่ *C. utilis* TISTR 5352 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด คือ 16.9033 กรัมต่อลิตร และ *C. utilis* TISTR 5043 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยสุด คือ 10.1067 กรัมต่อลิตร *C. utilis* TISTR 5198 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือมากที่สุด คือ 85.0667 กรัมต่อลิตร และ *C. utilis* TISTR 5043 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือน้อยสุด คือ 30.2667 กรัมต่อลิตร ส่วน *C. utilis* TISTR 5001 มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำมากที่สุด คือ 110.2564 มิลลิกรัมต่อลิตร และ *C. utilis* TISTR 5198 มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำน้อยสุด คือ 74.1026 มิลลิกรัมต่อลิตร *C. utilis* TISTR 5352 สามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุดคือ 3.82 เปอร์เซ็นต์ และ *C. utilis* TISTR 5001 ผลิตเอทานอลได้น้อยสุด คือ 2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในการผลิตเอนไซม์ไพรูเวตคีคาร์บอกซิเลสสายพันธุ์ที่สามารถได้มากที่สุดได้แก่ *C. utilis* TISTR 5198 ผลิตได้ 0.96 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วน *C. utilis* TISTR 5032 และ *C. utilis* TISTR 5352 ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไพรูเวตคีคาร์บอกซิเลสได้เลย

ส่วนการเพาะเลี้ยง *C. utilis* TISTR 5001 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเลือกใช้น้ำตาลไธอบแห้งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่า pH จะมีค่าลดลงจากชั่วโมงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงจนถึงชั่วโมงที่ 24 จาก ค่า pH 6 เป็น 4.48 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากชั่วโมงที่ 0 มีค่า 237.2 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 43.2 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำจากชั่วโมงที่ 0 มีค่า 90.769 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มขึ้นเป็น 181.538 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่มีค่าความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับร้อยละ 0.97 ส่วนการผลิตเอนไซม์ไพรูเวตคีคาร์บอกซิเลสในถังหมักนั้น พบว่าไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไพรูเวตคีคาร์บอกซิเลสได้เลยถึงแม้ว่าในการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร *C. utilis* TISTR 5001 จะเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไพรูเวตคีคาร์บอกซิเลสได้มากที่สุดก็ตาม ซึ่งอาจเนื่องมาจากสภาวะต่างๆในการเพาะเลี้ยงรวมถึงสารอาหารต่างๆที่ยีสต์ต้องการนำไปใช้ผลิตเอนไซม์ไพรูเวตคีคาร์บอกซิเลสไม่เหมาะสมในการผลิตทำให้ *C. utilis* TISTR 5001 ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไพรูเวตคีคาร์บอกซิเลสได้

ตาราง 5.1 ค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่างๆ จากการเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง จากถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่เพาะเลี้ยง *C. utilis* TISTR 5001 โดยอาหารน้ำลำไยอบแห้ง

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเชลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาล ทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	เอทานอล (ร้อยละ)	PDC (หน่วย ต่อ มิลลิกรัม โปรตีน)
0	6.00	3.0267	237.2	90.769	N/a	N/a
4	5.25	3.3133	172.8	99.231	0.13	N/a
8	5.03	5.2967	149.6	117.692	0.47	N/a
12	4.90	6.0867	87.6	133.846	0.51	N/a
16	4.73	7.2000	58.4	148.462	0.64	N/a
20	4.55	7.4933	48.4	161.538	0.95	N/a
24	4.48	9.3000	43.2	181.538	0.97	N/a

หมายเหตุ N/a แสดงถึงการที่ไม่สามารถหาค่าจากโครมาโตแกรมของ HPLC ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2551. การเปิดเสรีอุตสาหกรรมเอทานอล.
<http://www.dede.go.th/dede/index.php?id=518>.
- คณะกรรมการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. หนังสือพลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล. ธันวาคม 2545.
ฐานข้อมูลพืช. 2551. ลำไย. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
http://www.doa.go.th/pl_data/LONGAN/1stat/st01.html.
- ฐานเศรษฐกิจ. 2550. จีรัฐรับมือราคาลำไยตกต่ำ ชี้อากาศหนาวผลผลิตเพิ่ม. หนังสือพิมพ์ฐานเศรษฐกิจ ฉบับที่ 2182. 11 ม.ค.-13 ม.ค. 2550.
- บัญชา ชนบุญสมบัติ. 2546. พลังงานทดแทนเอทานอลและไบโอดีเซล.
<http://www.bangkoknews.com/scitech/2003/0501/index.php?news=pis>
- ทะนงศักดิ์ วงษ์ลา. 2548. น้ำมันแก๊สโซฮอล์ พลังงานเพื่ออนาคต. วารสารนโยบายพลังงาน ฉบับที่ 69 :32-37.
- นงลักษณ์ ตรีโรจนานนท์. 2542. ถิ่นกำเนิดลำไย.
http://sps.lpru.ac.th/script/show_article.pl?mag_id=2&group_id=6&article_id=63
- จรรูวรรณ กันทะใหม่, นาดยา ประภาสิทธิ์ และอภิญา พลโกมล. 2549. การขยายขนาดการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวและการลดค่าบีโอดีจากน้ำเวย์เต้าหู้โดยยีสต์. โครงการพิเศษ สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พันธ์ณรงค์ จันท์แสงศรี, ธนรรุ ชินประภาพ, นครินทร์ สุภา, ชัยวัฒน์ เทือกมัน, และวิรัชรอง รามบุตร. 2547 การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสจากยีสต์ *Candida utilis* TISTR 5046 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นสับสเตรต. การประชุมทางวิชาการประจำปี พ.ศ. 2547 ของสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย, 12-15 ธันวาคม 2547.
- พูนศิริ พระทอง, กิตติยา แลวงค์นิต, อุทุมพร อภิวงศ์งาม และนพพล เล็กสวัสดิ์. 2551. การผลิต R-phenylacetylcarbinol และสารผลิตภัณฑ์ข้างเคียงด้วยลำไยอบแห้งในระบบเบนซาลดีไฮด์อิมัลชัน. โครงการ IRPUS ปีพ.ศ. 2550 ประชุมที่สยามพารากอน 28-30 มีนาคม 255

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สันทัก ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2544. ยีสต์.

http://www.tistr.or.th/t/publication/page_area_show_bc.asp?i1=81&i2=8

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 2550. ลดต้นทุน เพิ่มผลผลิตลำไยด้วยการควบคุมทรงพุ่ม.

http://www.trf.or.th/RE/x.asp?Art_ID=210.

สำนักส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร กรมการค้าภายใน. 2551. สรุปสถานการณ์สินค้าเกษตร เดือนมกราคม และแนวโน้มเดือนกุมภาพันธ์ 2551.

ไมตรี เขาวรัตน์ และวิจิตร เจริญธง. 2551. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

<http://www.doa.go.th/th/ShowArticles.aspx?id=1375>

สุวรรณ หาญวิริยะพันธุ์. 2551. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

<http://www.doa.go.th/th/ShowArticles.aspx?id=1231>

Bergmeyer, H. U. and Grabl, M. 1983. Pyruvate Decarboxylase from Yeast. In: Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 2, 3rd ed. (H.U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, M. Grabl, eds.) Verlag Chemie: Florida, pp. 302-303.

Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-dye Binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Chen, A. K. L., Breuer, M., Hauer, B., Rogers, P. L. and Rosche, B. 2005. pH Shift Enhancement of *Candida utilis* Pyruvate Decarboxylase Production. Biotechnology and Bioengineering 92(2):183-188.

Deak, T. and Beuchat, L.R. 1996. Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press: New York. pp. 39-40.

Dubois, M., Gilles, D.A., Hamilton, J.K., Rebers P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric Method for The Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry 28: 350-356.

Gunawan, C., Satianegara, G., Chen, A. K., Breuer, M., Hauer, B., Rogers, P. L. and Rosche, B. 2007. Yeast Pyruvate Decarboxylases: Variation in Biocatalytic Characteristics for (R)-Phenylacetylcarbinol Production. FEMS Yeast Research 7: 33-39.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hacking, A. J., Taylor, I. W. F. and Hanas, C. M. 1984. Selection of Yeast Able to Produce Ethanol from Glucose at 40 °C. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 19: 361-163.

Kojin Co. Ltd. 2008. Feedstuffs. <http://www.kohjin.co.jp/english/ferment/feed.html>.

NSF (National Science Foundation). 2007. Techniques in Cell Wall Biology. <http://cellwall.genomics.purdue.edu/techniques/2.html> (accessed 31/08/07).

Rogers, P. L., Lee, K. J. and Tribe, D. E. 1979 Kinetics of Alcohol Production by *Zymomonas mobilis* at High Sugar Concentrations. *Biotechnology Letters*. 1(4): 165-170.

Wikipedia®. 2008. Acetaldehyde. www.chemistrydaily.com/chemistry/Acetaldehyde.

Wikipedia®. 2008. Ethanol. <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Ethanol.svg>.

Wikipedia®. 2008. Pyruvic Acid. http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Pyruvic_acid.svg.

http://my.dek-d.com/Jung_wA/story/view.php?id=375840

Wikipedia®. 2551. ถั่ว. <http://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%A5%E0%B8%B3%E0%B9%84%E0%B8%A>

<http://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%A5%E0%B8%B3%E0%B9%84%E0%B8%A>

สารน่ารู้ถั่ว. 2007. <http://pioneer.netserv.chula.ac.th>

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Yeast Malt Media

ยีสต์สกัด (Yeast extract)	3	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (Peptone)	5	กรัมต่อลิตร
มอลต์สกัด (Malt extract)	5	กรัมต่อลิตร
กลูโคส (Glucose)	10	กรัมต่อลิตร

หากเป็นแบบอาหารแข็งจะใส่วุ้น (Agar) ลงไป 20 กรัมต่อลิตร

2. อาหารน้ำลำไยอบแห้ง

ต้มลำไยอบแห้ง 30 กรัมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จนเดือด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการกรองผลลำไยออกด้วยผ้าขาวบาง จนกระทั่งได้สารละลายที่ไม่มีกากตะกอนลำไยเจือปน และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อลำไยอบแห้งชนิดที่ 1

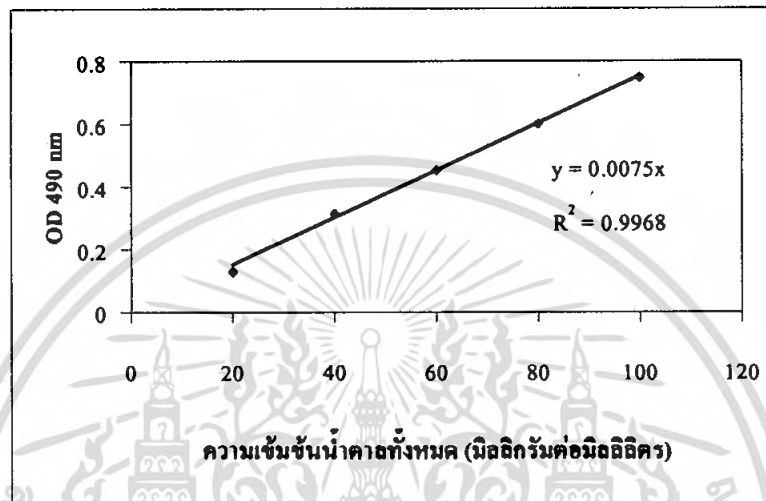
3. อาหารน้ำลำไยอบแห้งพร้อมกาก

ต้มลำไยอบแห้ง 30 กรัมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จนเดือด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการแยกกากลำไยและนำมาใส่ลงในเครื่องปั่น (blender) จากนั้นใส่น้ำลำไยอบแห้งที่ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ณ อุณหภูมิห้องแล้วลงไป ทำการบดที่ระดับความเร็วสูงสุดจำนวน 3 รอบ รอบละ 3 นาที หลังจากการบดจะได้อาหารเลี้ยงเชื้อลำไยอบแห้งชนิดที่ 2

ภาคผนวก ข

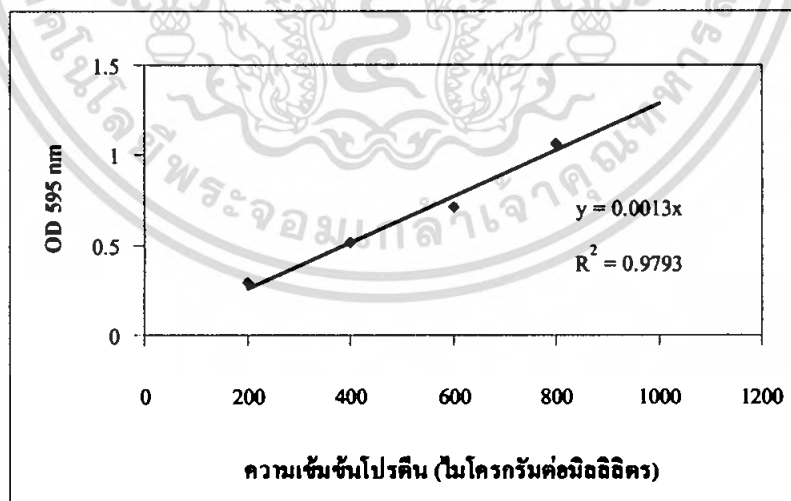
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานกลูโคส



รูป ข.1 เส้นมาตรฐานของค่าความเข้มข้นน้ำตาลที่วัดจากวิธีฟินอล-ซัลฟูริก

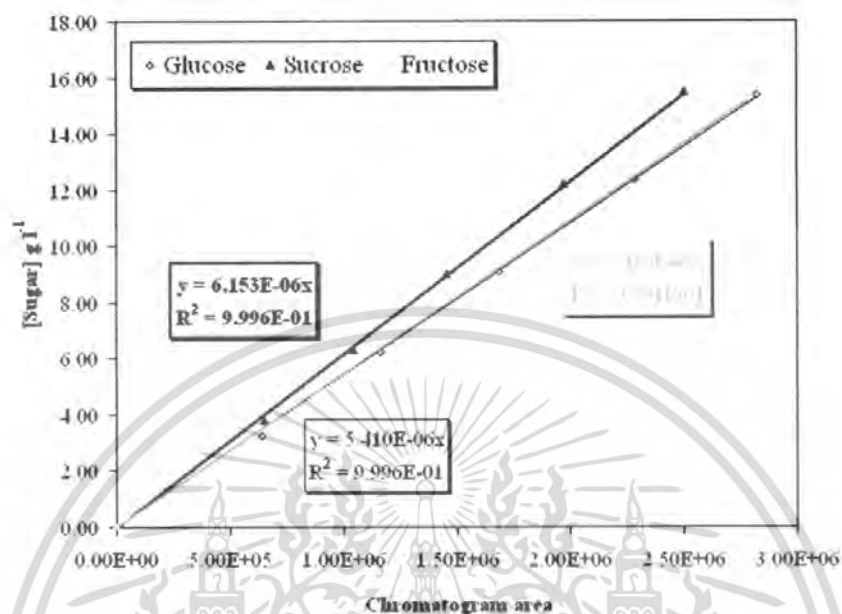
2. กราฟมาตรฐานโปรตีน



รูป ข.2 เส้นมาตรฐานของค่าความเข้มข้น โปรตีนที่ละลายน้ำ โดยวิธีของ Bradford

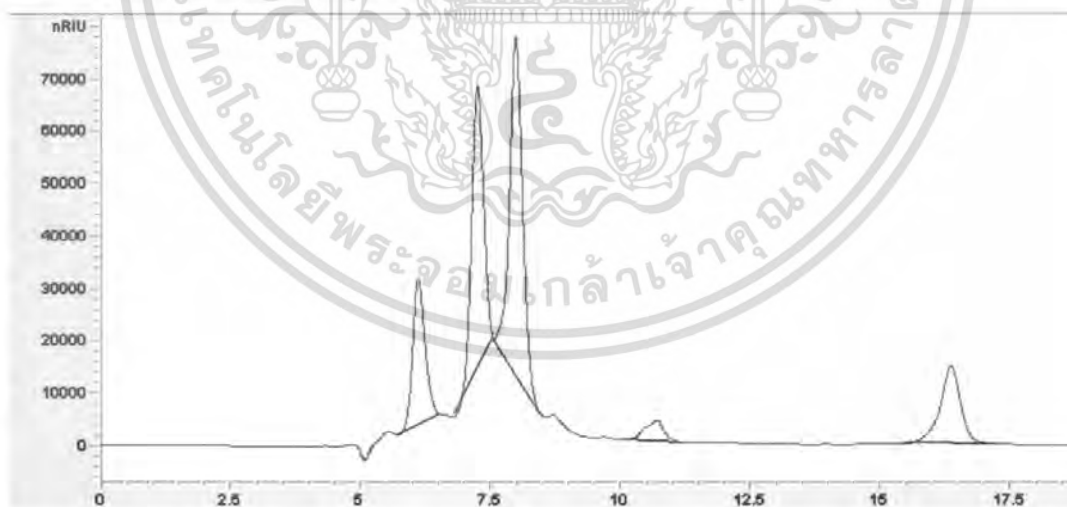
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. กราฟมาตรฐานเอทานอลและน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส



รูป ข.3 เส้นมาตรฐานสำหรับน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส

4. ตัวอย่างโครมาโตแกรม HPLC



รูป ข.4 ตัวอย่าง โครมา โตรแกรมเครื่อง HPLC ในการวัดน้ำตาลและเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำ
ลำไยอบแห้ง ซึ่งเพาะเลี้ยง *Candida utilis* TISTR 5198 ชั่วโมงที่ 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลองเบื้องต้น

1. ค่าจากการทดลองหัวข้อที่ 4.1

ตาราง ค.1 ข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองเพาะเลี้ยง *Candida utilis* สายพันธุ์ต่างๆ ในขบวนการหมักและอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่ชั่วโมง 0

stain	pH	dry cell	dry cell (g/l)	OD sugar	total sugar	g/l	OD protein	protein	mg/l
5001	5.93	0.0389	1.2967	0.574	15306.67	14.5156	0.0280	21.538	31.28205
				0.541	14426.67		0.033	25.385	
				0.518	13813.33		0.061	46.923	
5032	6.02	0.0305	1.0167	0.177	4720	5.1200	0.028	21.538	31.28205
				0.198	5280		0.033	25.385	
				0.201	5360		0.061	46.923	
5043	5.87	0.0393	1.3100	0.177	4720	5.1200	0.028	21.538	31.28205
				0.198	5280		0.033	25.385	
				0.201	5360		0.061	46.923	
5046	6.13	0.0383	1.2767	0.177	4720	5.1200	0.028	21.538	31.28205
				0.198	5280		0.033	25.385	
				0.201	5360		0.061	46.923	
5198	5.75	0.0311	1.0367	0.177	4720	5.1200	0.028	21.538	31.28205
				0.198	5280		0.033	25.385	
				0.201	5360		0.061	46.923	
5352	5.98	0.0397	1.3233	0.177	4720	5.1200	0.028	21.538	31.28205
				0.198	5280		0.033	25.385	
				0.201	5360		0.061	46.923	

ตาราง ค.2 ข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองเพาะเลี้ยง *Candida utilis* สายพันธุ์ต่างๆ ในขบวนการหมักและอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่ชั่วโมง 24

stain	pH	cell dry wt.	g/l	dry cell (g/l)	OD sugar	total sugar	g/l	OD protein	protein	mg/l	alcohol(%)
5001	5.00	0.1526	5.0867	3.7900	0.045	1200	1.3778	0.0450	34.615	54.61538	0.7361
	5.05			3.7879	0.022	586.6666667		0.066	50.769		0.7341
	5.04			3.7890	0.088	2346.666667		0.102	78.462		0.7411
5032	5.22	0.1468	4.8933	3.8767	0.069	1840	0.9778	0.062	47.692	45.12821	1.0391
	5.23			3.8777	0.034	906.6666667		0.068	52.308		1.0378
	5.35			3.8790	0.007	186.6666667		0.046	35.385		1.0388
5043	4.86	0.1719	5.7300	4.4200	0.062	1653.333333	0.6400	0.032	24.615	57.69231	0.7328
	4.89			4.4279	0.003	80		0.098	75.385		0.7350
	4.90			4.4265	0.007	186.6666667		0.095	73.077		0.7322
5046	5.15	0.1764	5.8800	4.6033	0.003	80	1.4133	0.035	26.923	42.05128	0.7883
	5.17			4.6055	0.011	293.3333333		0.074	56.923		0.7879
	5.14			4.6100	0.145	3866.666667		0.055	42.308		0.7890
5198	4.93	0.1564	5.2133	4.1767	0.117	3120	3.1556	0.031	23.846	49.23077	0.5273
	4.92			4.1780	0.059	1573.333333		0.058	44.615		0.5300
	4.94			4.1768	0.179	4773.333333		0.103	79.231		0.5280
5352	5.03	0.2652	8.8400	7.5167	0.125	3333.333333	3.7244	0.085	65.385	60.76923	1.86
	5.04			7.5170	0.218	5813.333333		0.057	43.846		1.84
	5.05			7.5199	0.076	2026.666667		0.095	73.077		1.85

2. ค่าจากการทดลองหัวข้อที่ 4.2

ตาราง ค.3 ข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองเพาะเลี้ยง *Candida utilis* สายพันธุ์ต่างๆ ในขบวนการหมักและอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำลำไยอบแห้ง ที่ชั่วโมง 0

stain	pH	dry cell	dry cell (g/l)	OD sugar	total sugar	g/l	OD protein	protein	Mg/l
5001	5.74	0.0934	3.1133	0.714	285600	295.2000	0.118	90.769	93.84615
				0.742	296800		0.122	93.846	
				0.758	303200		0.126	96.923	
5032	5.68	0.0793	2.6433	0.714	285600	295.2000	0.118	90.769	93.84615
				0.742	296800		0.122	93.846	
				0.758	303200		0.126	96.923	
5043	5.63	0.0957	3.1900	0.714	285600	295.2000	0.118	90.769	93.84615
				0.742	296800		0.122	93.846	
				0.758	303200		0.126	96.923	
5046	5.68	0.1336	4.4533	0.714	285600	295.2000	0.118	90.769	93.84615
				0.742	296800		0.122	93.846	
				0.758	303200		0.126	96.923	
5198	5.37	0.0745	2.4833	0.714	285600	295.2000	0.118	90.769	93.84615
				0.742	296800		0.122	93.846	
				0.758	303200		0.126	96.923	
5352	5.77	0.1531	5.1033	0.714	285600	295.2000	0.118	90.769	93.84615
				0.742	296800		0.126	96.923	
				0.758	303200		0.122	93.846	

ตาราง ค.4 ข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองเพาะเลี้ยง *Candida utilis* สายพันธุ์ต่างๆ ในขบวนการหมักและอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไธยอบแห้ง ที่ชั่วโมง 24

strain	pH	cell dry wt.	g/l	dry cell (g/l)	OD sugar	total sugar	g/l	OD protein	protein	Mg/l	Alcohol (%)
5001	4.51	0.2895	9.6500	6.5367	0.478	191200	193.8667	0.171	131.538	177.9487	3.4
	4.53			6.5400	0.483	193200		0.267	205.385		
	4.54			6.4980	0.493	197200		0.256	196.923		
5032	4.30	0.2751	9.1700	6.5267	0.513	205200	233.2000	0.208	160.000	163.0769	2.54
	4.26			6.5298	0.79	316000		0.243	186.923		
	4.28			6.5287	0.446	178400		0.185	142.308		
5046	4.24	0.2864	9.5467	6.3567	0.781	312400	309.7333	0.162	124.615	190.2564	2.6
	4.25			6.3578	0.738	295200		0.286	220.000		
	4.26			6.3580	0.804	321600		0.294	226.154		
5043	4.27	0.305	10.1667	5.7133	0.749	299600	310.8000	0.186	143.077	176.1538	2.7
	4.28			5.7188	0.767	306800		0.264	203.077		
	4.25			5.7187	0.815	326000		0.237	182.308		
5198	3.87	0.2845	9.4833	7.0000	0.597	238800	194.4000	0.188	144.615	157.9487	2.36
	3.88			7.0145	0.593	237200		0.266	204.615		
	3.86			7.0111	0.268	107200		0.162	124.615		
5352	4.49	0.314	10.4667	5.3633	0.807	322800	291.0667	0.229	176.154	177.1795	2.6
					0.805	322000		0.239	183.846		
					0.571	228400		0.223	171.538		

3. ค่าจากการทดลองหัวข้อที่ 4.3

ตาราง ค.5 ข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองเพาะเลี้ยง *Candida utilis* สายพันธุ์ต่างๆ ในขบวนการหมักและอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไธบอบแห้งพร้อมกาก ที่ชั่วโมง 0

staln	pH	dry cell	dry cell (g/l)	OD		g/l	OD protein	protein	Mg/l
				sugar	total sugar				
5001	5.73	0.1987	6.6233	0.614	245600	231.2000	0.083	63.846	68.20513
				0.517	206800		0.098	75.385	
				0.603	241200		0.085	65.385	
5032	5.67	0.1854	6.1800	0.614	245600	231.2000	0.083	63.846	68.20513
				0.517	206800		0.098	75.385	
				0.603	241200		0.085	65.385	
5043	5.45	0.1932	6.4400	0.614	245600	231.2000	0.083	63.846	68.20513
				0.517	206800		0.098	75.385	
				0.603	241200		0.085	65.385	
5046	5.53	0.1849	6.1633	0.614	245600	231.2000	0.083	63.846	68.20513
				0.517	206800		0.098	75.385	
				0.603	241200		0.085	65.385	
5198	5.3	0.1706	5.6867	0.614	245600	231.2000	0.083	63.846	68.20513
				0.517	206800		0.098	75.385	
				0.603	241200		0.085	65.385	
5352	5.79	0.2583	8.6100	0.614	245600	231.2000	0.083	63.846	68.20513
				0.517	206800		0.098	75.385	
				0.603	241200		0.085	65.385	

ตาราง ค.6 ข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองเพาะเลี้ยง *Candida utilis* สายพันธุ์ต่างๆ ในขบวนการหมักและอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไธบอบแห้งพร้อมกาก ที่ชั่วโมง 24

strain	pH	cell dry wt.	OD sugar	dry cell (g/l)	OD sugar	total sugar	g/l	OD protein	protein	Mg/l	alcohol (%)
5001	4.45	0.5131	17.1033	10.4800	0.279	111600	62.6667	0.166	127.692	110.2564	2
	4.47			10.4812	0.103	41200		0.13	100.000		
	4.46			10.4834	0.088	35200		0.134	103.077		
5032	4.23	0.5281	17.6033	11.4233	0.153	61200	37.0667	0.141	108.462	88.46154	2.55
	2.25			11.4278	0.079	31600		0.115	88.462		
	4.21			11.4255	0.046	18400		0.089	68.462		
5046	4.19	0.4964	16.5467	10.1067	0.024	9600	30.2667	0.134	103.077	78.46154	2.6
	4.20			10.1045	0.12	48000		0.094	72.308		
	4.17			10.1056	0.083	33200		0.078	60.000		
5043	4.17	0.5004	16.6800	10.5167	0.189	75600	66.8000	0.148	113.846	80.76923	2.7
	4.18			10.5178	0.192	76800		0.088	67.692		
	4.19			10.5145	0.12	48000		0.079	60.769		
5198	3.96	0.5567	18.5567	12.8700	0.256	102400	85.0667	0.127	97.692	74.10256	2.36
	3.97			12.8676	0.145	58000		0.065	50.000		
	3.95			12.8688	0.237	94800		0.097	74.615		
5352	4.33	0.7654	25.5133	16.9033	0.047	18800	56.4000	0.143	110.000	92.05128	3.82
	4.34			16.9056	0.294	117600		0.13	100.000		
	4.32			16.9077	0.082	32800		0.086	66.154		

4. ค่าจากการทดลองหัวข้อที่ 4.4

ตาราง ค.7 ข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองเพาะเลี้ยง *Candida utilis* สายพันธุ์ 5001 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรและอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลไอบอบแห้งที่ชั่วโมงต่างๆ

เวลา (ชม.)	pH	OD 660 nm	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (กรัมต่อ 30 มิลลิลิตร)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (กรัมต่อ ลิตร)	OD 490 nm	น้ำตาล ทั้งหมด (กรัมต่อ ลิตร)	น้ำตาล ทั้งหมด (กรัมต่อ ลิตร)	OD 595 nm	โปรตีนที่ ละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	เอทานอล (ร้อยละ)
0	6	0.063	0.0908	3.0267	0.593	237200	237.2	0.118	90.769	0.00
4	5.25	0.884	0.0994	3.3133	0.432	172800	172.8	0.129	99.231	0.13
8	5.03	1.374	0.1589	5.2967	0.374	149600	149.6	0.153	117.692	0.47
12	4.9	1.634	0.1826	6.0867	0.219	87600	87.6	0.174	133.846	0.51
16	4.73	1.708	0.216	7.2000	0.146	58400	58.4	0.193	148.462	0.64
20	4.55	1.7988	0.2248	7.4933	0.121	48400	48.4	0.21	161.538	0.95
24	4.48	1.955	0.279	9.3000	0.108	43200	43.2	0.236	181.538	0.97