บทที่ 3
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่าง

เนื่องจากปัจจุบันรัฐบาลได้ออกพระราชบัญญัติสุรา พ.ศ. 2493 ซึ่งเป็นบทบัญญัติที่กำหนดขึ้นเพื่อกำหนดวิธีการทำหรือขายหรือครอบครองเชื้อสุรา โดยห้ามมิให้ผู้ใดทำหรือขายเชื้อสุรา หรือมีไว้ในครอบครอง เว้นแต่ได้รับอนุญาตจากเจ้าพนักงานสรรพสามิต ลูกแป้งที่ผลิตในปัจจุบันมักไม่ถูกต้องตามกฎหมาย ทำให้ผู้จำหน่ายไม่ยอมจำหน่ายลูกแป้งให้กับบุคคลที่ไม่รู้จักคุ้นเคย อีกทั้งในบางแหล่งที่ผลิตลูกแป้งแต่เดิมได้ปิดกิจการลง เพราะไม่มีผู้ที่ได้รับการถ่ายทอดความรู้ในการผลิตลูกแป้ง ทำให้เป็นอุปสรรคอย่างยิ่งในการเก็บรวบรวมตัวอย่าง ลูกแป้งส่วนใหญ่จึงได้มาจากการซื้อจากผู้รู้จักคุ้นเคยกับผู้ผลิต และบางส่วนได้จากการซื้อจากร้านขายยาแผนโบราณ จากการเก็บตัวอย่างลูกแป้งในท้องที่จังหวัดภาคใต้ได้ตัวอย่างลูกแป้งทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง แสดงดังภาพที่ 9 จากภาพจะเห็นได้ว่าตัวอย่างลูกแป้งที่ได้มีลักษณะแตกต่างกัน เช่น ขนาด รูปร่าง และสีของลูกแป้ง เป็นต้น ปัจจัยที่มีผลทำให้ลูกแป้งมีลักษณะที่แตกต่างกัน คือ กรรมวิธีการผลิต และส่วนผสมของลูกแป้งในแต่ละพื้นที่ ซึ่งสิ่งเหล่านี้ล้วนมีผลต่อคุณลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในลูกแป้ง

ภาพที่ 9 ลูกแป้งที่ใช้ในการทดลอง

Figure 9. Samples of Loog-Pang in this experiment.

2. การศึกษาสมบัติบางประการของเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง

เมื่อนำลูกแป้งทั้ง 10 ตัวอย่างไปทำการคัดแยกเชื้อยีสต์ในอาหาร YPC agar ซึ่งมีแป้งมันสำปะหลัง 3 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสามารถแยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมด 74 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่า ตัวอย่างลูกแป้งที่ได้จาก อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา I สามารถแยกเชื้อได้จำนวนมากที่สุด คือ 13 ไอโซเลต ส่วนตัวอย่างลูกแป้งที่ได้จาก อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี II สามารถแยกเชื้อได้จำนวนน้อยที่สุด คือ 1 ไอโซเลต

ตารางที่ 9 แหล่งที่มาของเชื้อยีสต์ที่แยกจากลูกแป้งในท้องที่จังหวัดทางภาคใต้ และรหัสของเชื้อ

Table 9. Sources and codes of isolated yeast from Loog-Pang in the south of Thailand.

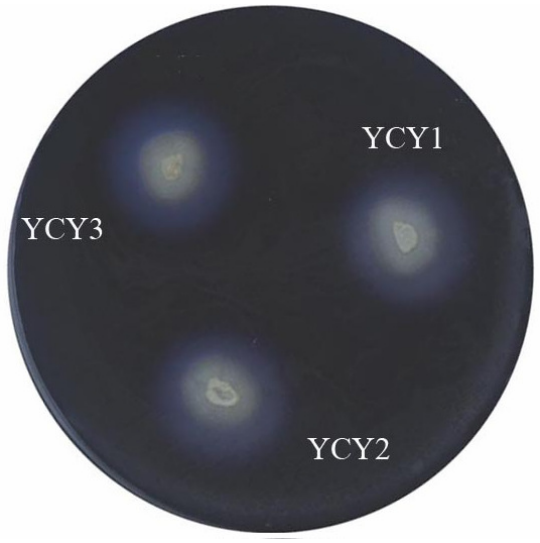
Source	Isolated yeasts
1. Amphoe Hat Yai, Songkhla I	YHT1, YHT2, YHT3, YHT4, YHT5, YHT6, YHT7, YHT8, YHT9, YHT10, YHT11, YHT12, YHT13
2. Amphoe Hat Yai, Songkhla II	YNN1, YNN2, YNN3, YNN4, YNN5, YNN6, YNN7, YNN8, YNN9, YNN10, YNN11, YNN12
3. Amphoe Sadao, Songkhla III	YSD1, YSD2, YSD3, YSD4
4. Amphoe Muang, Pattani I	YPT1, YPT2, YPT3, YPT4, YPT5
5. Amphoe Muang, Pattani II	YPS1
6. Amphoe Tak Bai, Narathiwat	YTB1, YTB2, YTB3, YTB4, YTB5, YTB6, YTB7, YTB8, YTB9, YTB10, YTB11, YTB12
7. Amphoe Tha Sala, Nakhon Sri Thammarat	YNS1, YNS2, YNS3, YNS4, YNS5, YNS6, YNS7, YNS8, YNS9, YNS10, YNS11
8. Amphoe Chian Yai, Nakhon Sri Thammarat	YCY1, YCY2, YCY3
9. Amphoe Muang, Narathiwat	YNT1, YNT2, YNT3, YNT4, YNT5, YNT6, YNT7
10. Amphoe Muang, Satun	YST1, YST2, YST3, YST4, YST5, YST6

2.1 การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งในอาหารแข็ง

หลังจากแยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมด 74 ไอโซเลต เมื่อนำมาคัดเลือกในอาหาร YPC agar ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 3 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง และทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังบนอาหารแข็ง คือ การเกิดบริเวณวงใส (clear zone) เมื่อทำการหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหาร YPC agar โดยสีของอาหารจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีน้ำเงินเข้ม ซึ่งเกิดจากโมโมเลกุลของไอโอดีนจะเข้าไปแทรกตัวอยู่ภายในเกลียวของแป้ง ทำให้เกิด

สีน้ำเงินเข้ม (มนตรี จุฬาวัฒนทล และคณะ, 2542) จากการคัดเลือกพบว่า มีเพียงเชื้อยีสต์ซึ่งแยกได้จากอำเภอเชียรใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช ทั้ง 3 ไอโซเลต จากทั้งหมด 74 ไอโซเลต คือ YCY1, YCY2 และ YCY3 มีความสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ แสดงดังภาพที่ 10 โดยให้อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 1.83, 1.71 และ 1.83 ตามลำดับ

Before treat by iodine solution



After treat by iodine solution

ภาพที่ 10 ความสามารถในย่อยแป้งของเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งเมื่อเลี้ยงบนอาหาร YPC agar

Figure 10. Hydrolysis of cassava starch by yeasts isolated from Loog-Pang grown on YPC agar.

2.2 การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งในอาหารเหลว

นำเชื้อยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลตที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งมันสำปะหลังบนอาหารแข็ง มาศึกษาต่อ โดยนำเชื้อยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลต ไปเลี้ยงในอาหารเหลว YPC ซึ่งมีแป้งมันสำปะหลัง 3 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที และทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น ภายหลังการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เชื้อยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลตมีคุณสมบัติในการย่อยแป้งมันสำปะหลังในอาหารเหลวไม่แตกต่างกัน กล่าวคือ ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์ผลด้วย One-way ANOVA ที่ความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 10

จากการทดลองนี้คาดว่าเชื้อยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลตที่แยกได้ น่าจะเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน เนื่องจากให้มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งมันสำปะหลังบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลวไม่แตกต่างกัน อีกทั้งเชื้อยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลตแยกได้มาจากลูกแป้งแหล่งเดียวกัน ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกใช้เชื้อยีสต์สายพันธุ์ YCY1

ตารางที่ 10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อยีสต์ที่แยกจากลูกแป้งในอาหารเหลว YPC ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

Table 10. The amount of reducing sugar produced from hydrolysis of cassava starch by yeast isolated from Loog-Pang in YPC broth for 72 h.

isolate	Reducing sugar concentration (g/l)
YCY1	3.53 ± 0.06^{a}
YCY2	3.45 ± 0.04^{a}
YCY3	3.49 ± 0.06^{a}

Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

[a] Means with different superscripts in the same column are significantly different at $P<0.05$.

2.3 การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอล

เนื่องจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์ YCY1 ที่แยกได้จากลูกแป้งที่มีประสิทธิภาพย่อยแป้งได้ดี แต่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่ต่ำ คือ ได้ปริมาณเอทานอล 0.35 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ซึ่งสอดคล้องกับคำกล่าวของ Reddy และคณะ (1996) ที่ว่าเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง (amylolytic yeast) มีความสามารถในการหมักเอทานอลจากแป้งได้โดยตรง แต่จะได้ปริมาณเอทานอลที่ต่ำ การทดลองในครั้งนี้จึงจำเป็นที่จะต้องหาเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่สูง เพื่อจะนำไปเลี้ยงร่วมกันในภายหลัง

เมื่อนำเชื้อยีสต์ทั้ง 74 ไอโซเลตที่แยกได้จากลูกแป้งในขั้นต้น มาหาประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส 11 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 11 พบว่า เชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่การผลิตเอทานอลได้ประสิทธิภาพมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี มีเพียง 4 ไอโซเลต คือ เชื้อยีสต์สายพันธุ์ YNN8, YPT1, YPT2 และ YTB3 และพบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ YHT10, YHT11, YNN6, YNN12, YPS1, YNS4, YNT1 และ YNT2 ไม่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล โดยพบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ YTB3 ให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 67.73 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี รองลงมาคือ YNN8, YPT1 และ YPT2 ให้ค่าประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลเท่ากับ 65.51, 64.12 และ 63.84 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์ที่แยกจากลูกแป้งในอาหารเหลว YM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 11 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

Table 11. Ethanol production by yeast isolated from Loog-Pang in YM broth containing 11% (w/v) glucose at 72 h.

isolate	Ethanol concentration (% v/v)	Fermentation efficiency* (%)
YTB3	4.88[a**]	68.50
YNN8	4.72[b]	66.25
YPT1	4.62[c]	64.85
YPT2	4.60[d]	64.57
YCY3	0.36[e]	5.05
YCY1	0.35[e]	4.91
YCY2	0.34[e]	4.77

* Fermentation efficiency 100% = concentration of ethanol 7.124% v/v

** Means with different superscripts in the same column are significantly different at P< 0.05

2.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อยีสต์

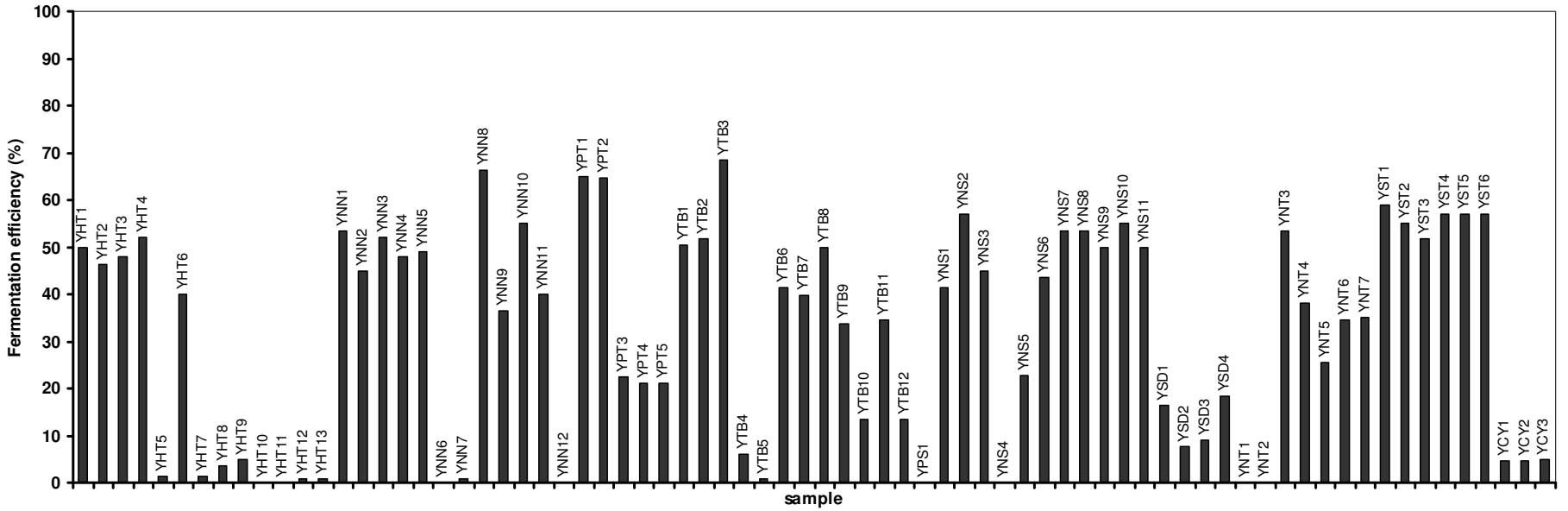
จากการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดีจากข้อ 2.2 และเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอทานอลได้ดีจากข้อ 2.3 พบว่า เชื้อยีสต์สายพันธุ์ YCY1 สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดีที่สุด และเชื้อยีสต์สายพันธุ์ YTB3 สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด จากนั้นนำเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ดังกล่าวมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยสังเกตลักษณะของสี ผิวหน้า และขอบของโคโลนีบนอาหารแข็ง

YM สังเกตรูปร่าง การเรียงตัว และการแตกหน่อของเซลล์ในอาหารเหลว YM ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่า เชื้อยีสต์สายพันธุ์ YCY1 มีลักษณะโคโลนีสีขาว ผิวหน้าหยาบ ทึบแสง ขอบมีเส้นใย ลักษณะเซลล์รูปไข่จนถึงยาว มีลักษณะเป็นเส้นใยต่อกัน การแตกหน่อเป็นแบบ multilateral budding แสดงดังภาพที่ 12 (A) และเชื้อยีสต์สายพันธุ์ YTB3 มีลักษณะโคโลนีสีขาว มันวาว ทึบแสง ขอบเรียบ ลักษณะเซลล์รูปร่างกลม การแตกหน่อเป็นแบบ multilateral budding เมื่อเลี้ยงในอาหาร 5% malt extract agar สามารถสร้างแอสโคสปอร์รูปหมวก มี 1-4 แอสโคสปอร์ต่อแอสคัส แสดงดังภาพที่ 12 (B)

การทดสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ โดยการทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน โดยส่งวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยใช้ชุดทดสอบ API 20C AUX โดยนำเซลล์เชื้อยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็ง YM 1-2 วัน มาถ่ายลงอาหารเหลวในชุดทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิห้อง หลังจาก 2-3 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อยีสต์ จากความขุ่นที่บังเส้นดำที่อยู่ใต้อาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จากผลทดสอบความสามรถในการใช้แหล่งคาร์บอนดังตารางที่12 พบว่าเชื้อสายพันธุ์ YCY1 เป็นเชื้อยีสต์ *Candida utilis* และ YTB3 เป็นเชื้อยีสต์ *Candida pelliculosa* แต่เมื่อนำผลที่ได้มาเทียบเคียงกับอนุกรมวิธานของยีสต์ตามหนังสือ Yeasts: Characteristics and Identification 3rd (Barnett, *et al*., 2000) พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ YTB3 มีลักษณะสัณฐานวิทยาไม่ตรงกับเชื้อยีสต์ *Candida pelliculosa* คือ เชื้อสายพันธ์ YTB3 การสร้างแอสโคสปอร์รูปหมวก มี 1-4 แอสโคสปอร์ต่อแอสคัส (จากภาพที่ 12A) ในขณะที่เชื้อยีสต์ในกลุ่ม *Candida* จะไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์รูปหมวก

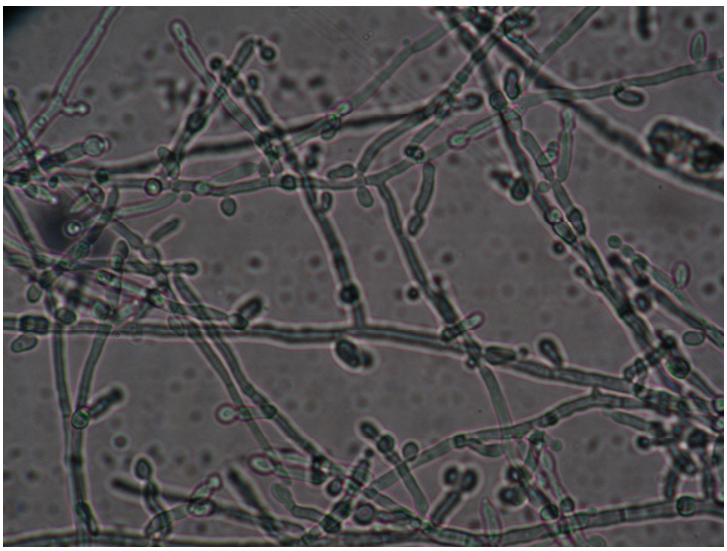
เนื่องจากการจัดจำแนกโดยวิธีศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี เป็นการตรวจฟีโนไทป์ของเชื้อ เป็นวิธีการที่ใช้แรงงานมาก ใช้เวลานาน ไม่แม่นยำ และขาดความสามารถในการแยกที่ชัดเจน (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) ดังนั้นเพื่อความความถูกต้องและแม่นยำในการจัดจำแนกเชื้อยีสต์ จึงทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีสต์ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 26S rDNA โดยส่งวิเคราะห์ผลที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ YCY1 คือเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligara* มีความเหมือน (identities) เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อยีสต์สายพันธุ์ YTB3 คือเชื้อยีสต์ *Pichia anomala* มีความเหมือน (identities) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก จ) เมื่อนำผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 26S rDNA ไปเทียบเคียงกับการศึกษาทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีตามหนังสือ Yeasts: Characteristics and Identification 3rd (Barnett *et al*., 2000) พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ YCY1 และ YTB3 มีลักษณะคล้ายเคียงกับเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligara* และ *Pichia anomala* ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 12

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี รวมถึงการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 26S rDNA ได้ว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ YCY1 คือเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. และเชื้อยีสต์สายพันธุ์ YTB3 คือเชื้อยีสต์ *Pichia anomala*

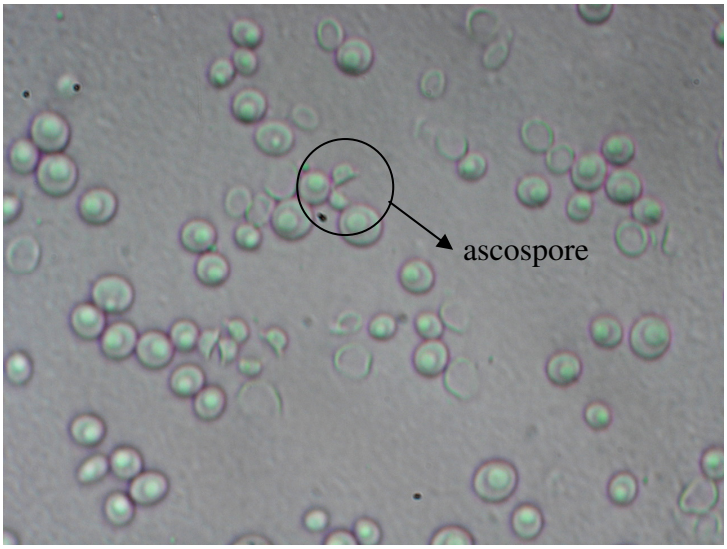


ภาพที่ 11 ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง

Figure 11. Fermentation efficiency (%) by yeast isolated from Loog-Pang.



(A)



(B)

ภาพที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ของเชื้อ YCY1 (A) และ YTB3 (B)

Figure 12. Morphology characteristics of the yeast strain YCY1 (A) and YTB3 (B).

ตารางที่ 12 ลักษณะทางสรีระวิทยาของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ YCY1 และ YTB3

Table 12. The physiological characteristics of the yeast strain YCY1 and YTB3.

	YCY1	YTB3	*S. fibuligera*[*]	*P. anomala*[*]
Urease	-	-	-	-
Assimilation of carbon compounds				
D-Glucose	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+,-
D-Maltose	+	+	+	+,-
D-Saccharose (Sucrose)	+	+	+,-	+
Calcium 2-Keto-Gluconate	-	-	+,-	+,-
D-Xylose	-	-	-	+,-
D-Galactose	-	-	-	+,-
Xylitol	-	-	-	+,-
Inositol	-	-	+,-	-
D-Melezitose	-	+	-	+,-
Methyl-D-Glucopyranoside	-	+	?	?
N-Acetyl-Glucosamine	-	-	-	-
D-Lactose	-	-	-	-
D-Trehalose	-	+	+,D	+,D
D-Raffinose	-	-	+,-	+,-
L-Arabinose	-	-	-	-
Adonitol	-	-	?	?
D-Sorbitol	-	-	?	?

+ = positive

- = negative

D = positive response delayed > 7 days

? = not know

[*] From Yeast characteristics and identification (Barnett, *et al*., 2000)

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันสำปะหลังจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1

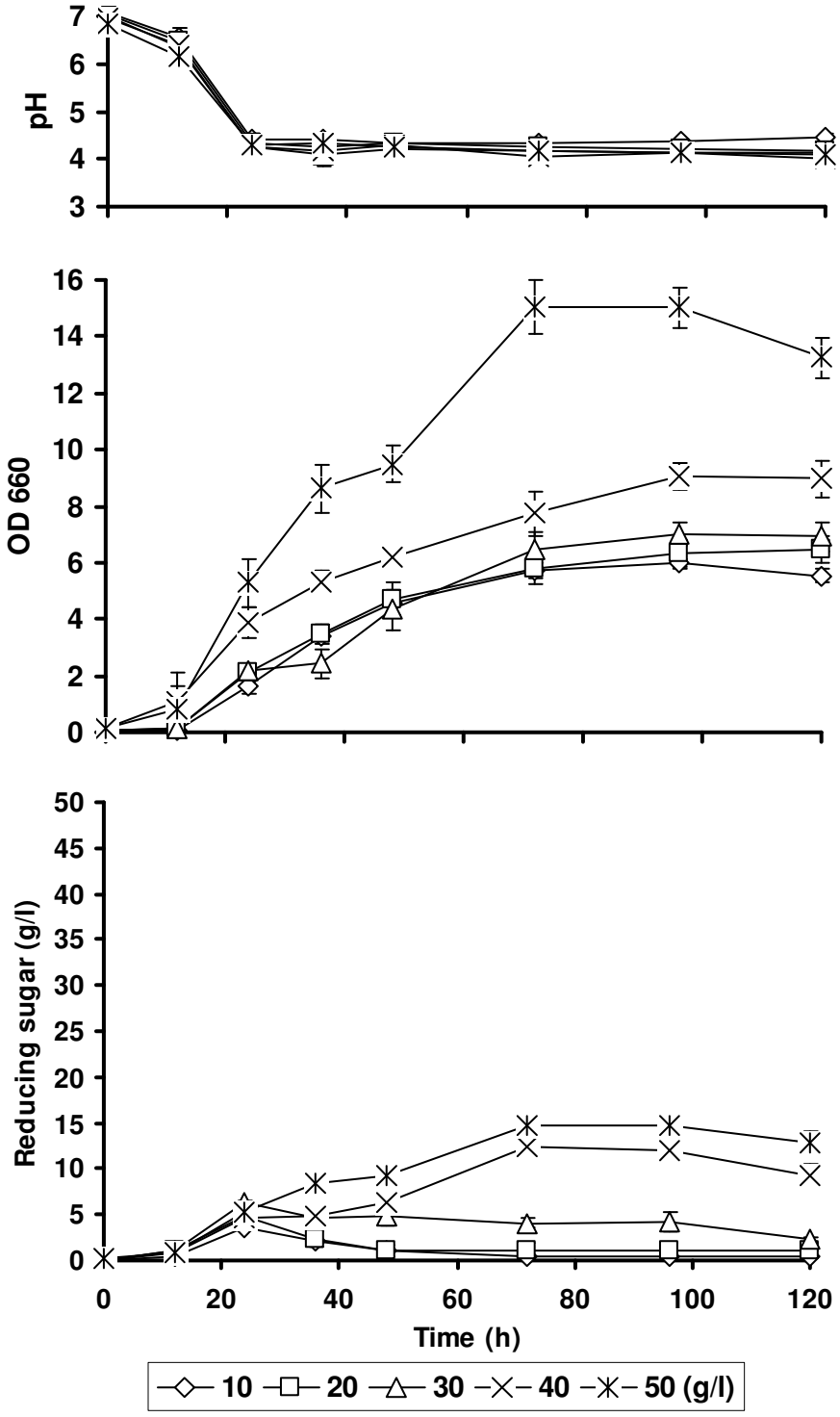
3.1 ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น

การศึกษาผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นต่อการเจริญ และการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 ดังแสดงในภาพที่ 13 จะเห็นว่า การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ และปริมาณความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น กล่าวคือ เมื่อให้ปริมาณความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังสูงขึ้น การเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 และการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย ในการเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังจาก 10 กรัมต่อลิตร เป็น 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร จะให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจาก 3.57 กรัมต่อลิตร เป็น 4.91, 6.36, 12.40 และ 14.73 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เนื่องจากที่ปริมาณความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นที่ 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงหลังทำการหมักเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 สามารถย่อยแป้งได้อย่างรวดเร็วในระยะ 24 ชั่วโมงแรก ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด ซึ่งแป้งจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมด จากนั้นน้ำตาลรีดิวซ์ก็จะถูกใช้ในการเจริญเติบโตโดยเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเรื่อยๆ หลังจาก 24 ชั่วโมง ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการทดลองของคณิต วิชิตพันธุ์ และคณะ (2537) ที่ศึกษาการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Schwanniomyces occidentalis* TISTR5555 โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คือ 21.02 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งแป้งจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลหมด หลังจาก 12 ชั่วโมงแรก ปริมาณน้ำตาลจะค่อยๆ ลดลง จนถึงชั่วโมงที่ 36 น้ำตาลเหลือน้อยมาก ทั้งนี้เป็นเพราะน้ำตาลถูกใช้ไปกับการเจริญและเพิ่มจำนวนของเซลล์

อนันตภัทร บุญะกลม (2546) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Schwanniomyces occidentalis* TISTR5555 โดยแปรผันการใช้กากมันสำปะหลังที่ระดับความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณแป้งที่วัดได้จากกากมันสำปะหลังที่ระดับต่างๆ เท่ากับ 9.09, 17.25, 23.38 และ 29.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณแป้งจะลดลงอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการเจริญ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ โดยจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.55, 8.72, 8.78 และ 8.96 กรัมต่อลิตร

Chi และคณะ (2001) ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* sdu ในอาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า ปริมาณความเข้มข้นของแป้งมีผลต่อการเจริญ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ กล่าวคือเมื่อให้ปริมาณความเข้มข้นของแป้งจาก 10 กรัมต่อลิตร ถึง 5 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น คือ 10.4 เป็น 27.2 กรัมต่อลิตร และ 1.96 เป็น 5.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดจากการทดลอง คือ ใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร หลังจาก 96 ชั่วโมง จะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือสูงสุด คือ 14.72 ± 0.98 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 13 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลังต่อการเจริญและการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

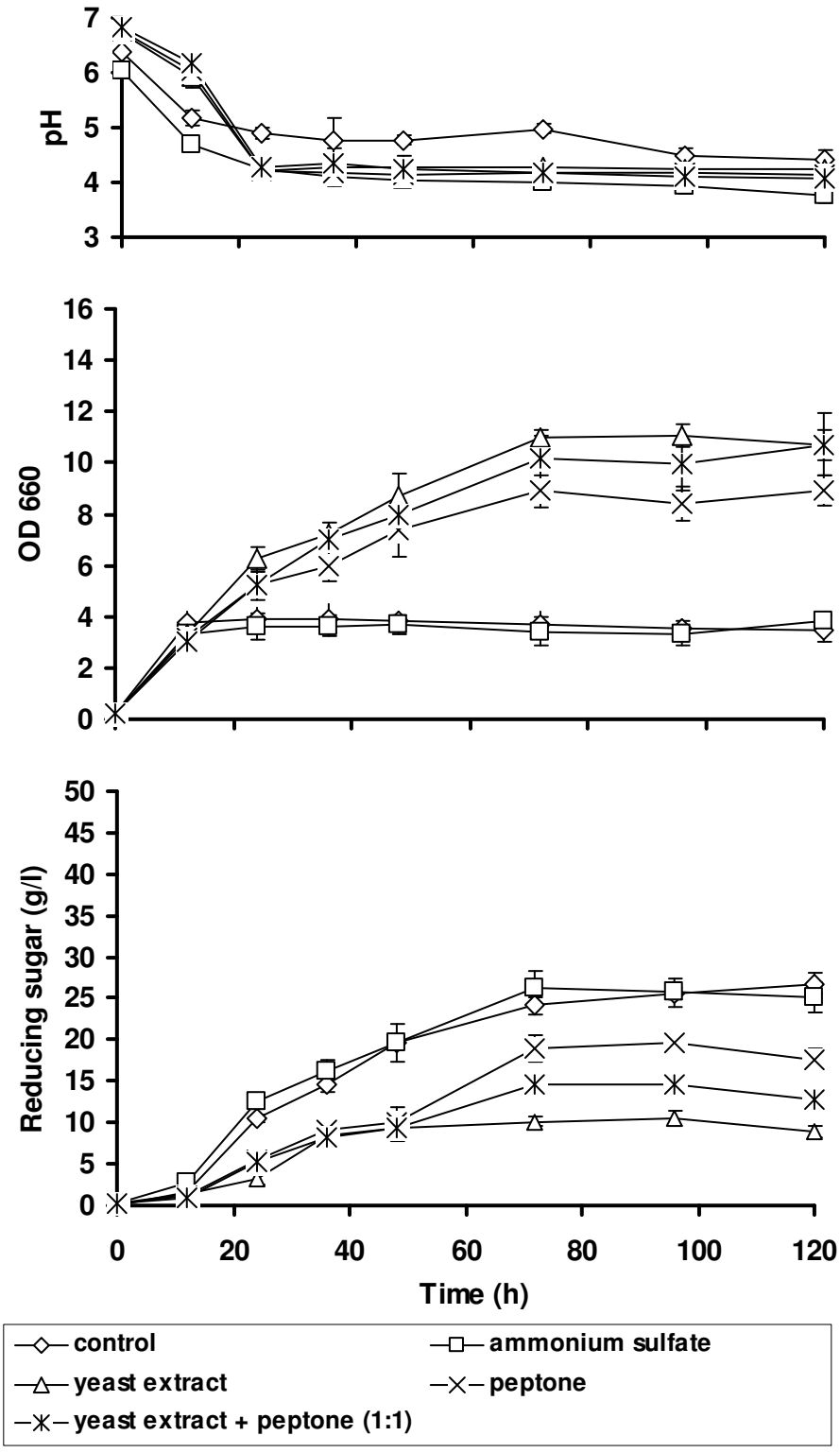
Figure 13. Effect of initial cassava starch concentration on growth and reducing sugar production from cassava starch by *Saccharomycopsis* sp. YCY1 grown at 30 °C on a rotary shaker at 150 rpm.

3.2 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญ และการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 พบว่า ชนิดของแหล่งไนโตรเจนลงไปในอาหาร มีผลต่อการเจริญ และการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ กล่าวคือ เชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัด (yeast extract) เปปโตน (peptone) และยีสต์สกัดผสมกับเปปโตน ให้การเจริญสูงกว่าเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต และชุดควบคุม โดยอาหารที่เติมยีสต์สกัดจะให้ค่าการเจริญของเชื้อสูงสุด แต่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือต่ำสุด รองลงมาคือ อาหารที่เติมยีสต์สกัดผสมกับเปปโตน เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต และชุดควบคุม ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์แปรผกผันกับการเจริญของเชื้อ กล่าวคือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลง เมื่อเชื้อมีการเจริญสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากน้ำตาลถูกใช้ไปกับการเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเติมแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต กับชุดควบคุม พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไม่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ จึงเลือกอาหารที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน ในการศึกษาต่อไป ซึ่งจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด เท่ากับ 26.73 ± 1.23 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการบ่ม 120 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 14

โดยทั่วไปการย่อยแป้งเกิดขึ้นจากเชื้อจุลินทรีย์สร้างเอนไซม์อะไมเลส ออกมาย่อยสลายแป้ง (Nigam and Singh, 1995) โดยปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ก็คือชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไป โดยแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ยีสสกัด เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต มอลท์สกัด แป้งถั่วเหลือง เนื้อสกัด และแอมโมเนียมไนเตรต เป็นต้น (Gupta, *et al*., 2003) แต่จากการทดลองในครั้งนี้ในชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแหล่งไนโตรเจนให้ผลการย่อยแป้งได้ดี ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหลือในอาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นหัวเชื้อ นอกจากนี้อาจเป็นผลมาจากองค์ประกอบในแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งพบว่าในแป้งมันสำปะหลังจะประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 80.40% ไขมัน 0.1% และโปรตีน 0.3% (The Thai Tapioca trade association, 1990)



ภาพที่ 14 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจน (0.1%) ต่อการเจริญและการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (5%) โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp.YCY1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

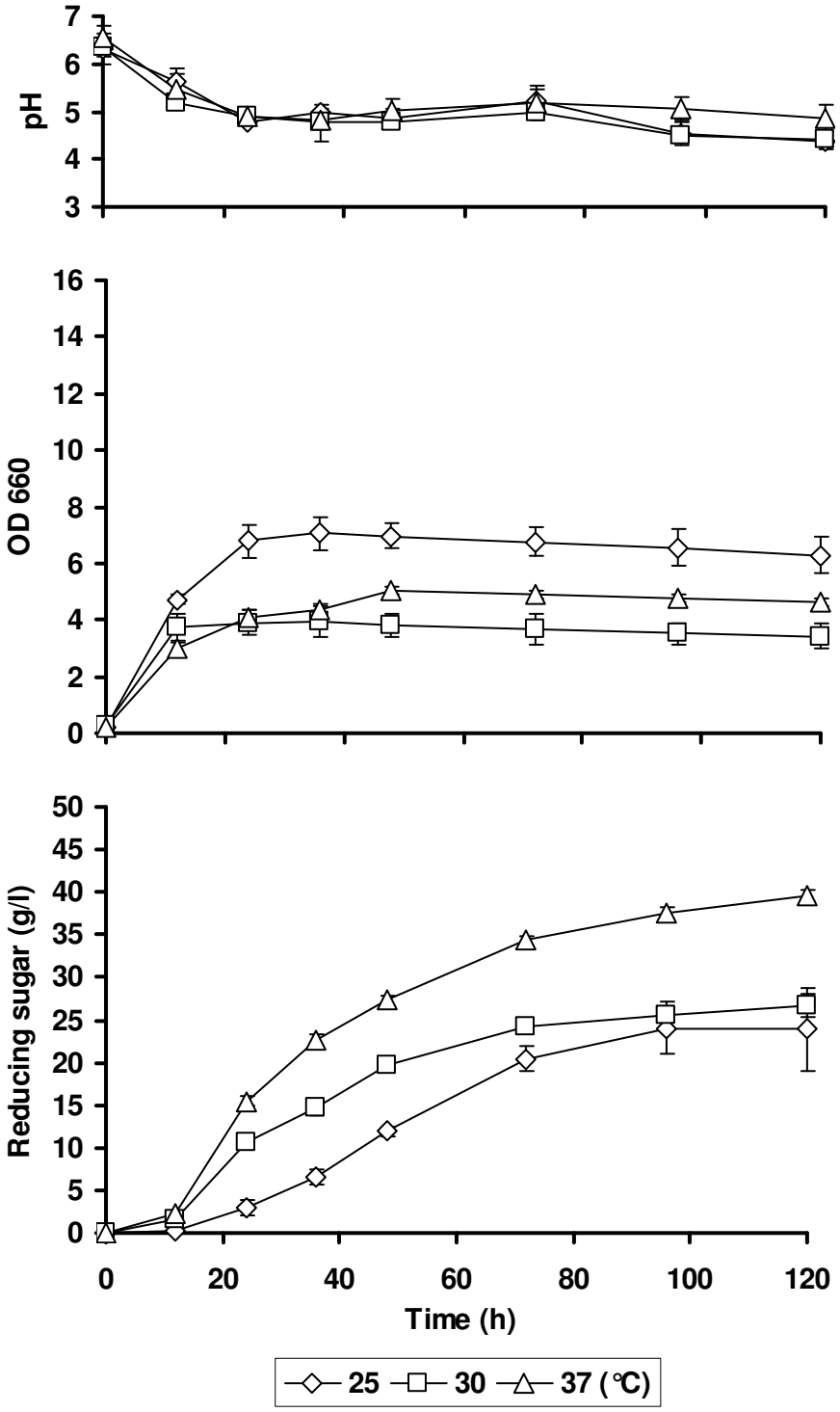
Figure 14. Effect of nitrogen source (0.1%) on growth and reducing sugar production from cassava starch (5%) by *Saccharomycopsis* sp. YCY1 grown at 30 °C on a rotary shaker at 150 rpm.

3.3 ผลของอุณหภูมิ

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ผลดังแสดงในภาพที่ 15 พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญ และการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ กล่าวคือ เชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 สามารถเจริญได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุด คือ 24.08 ± 3.00 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในปริมาณ 39.55 ± 0.66 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 15 ทั้งนี้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้การเจริญที่ต่ำการการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด เป็นผลมาจากกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *S. fibuligera* อยู่ในช่วง 40-50 องศาเซลเซียส (Hostinová, 2002) ซึ่งการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานมากที่สุด จึงทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด

Brimer และคณะ (1998) ซึ่งพบว่าเชื้อยีสต์ *Endomyces fibuliger* LU677 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส จะทำให้การเจริญลดลง

รัฐพงศ์ ปกแก้ว (2545) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์โดยเชื้อ *A. niger* ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *A. niger* จะผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ในปริมาณสูงสุดคือ 10.68 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการหมักที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เชื้อจะมีความสามารถในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ต่ำที่สุดคือ 4.22 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (5%) โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1

Figure 15. Effect of temperature on growth and reducing sugar production from cassava starch (5%) by *Saccharomycopsis* sp. YCY1

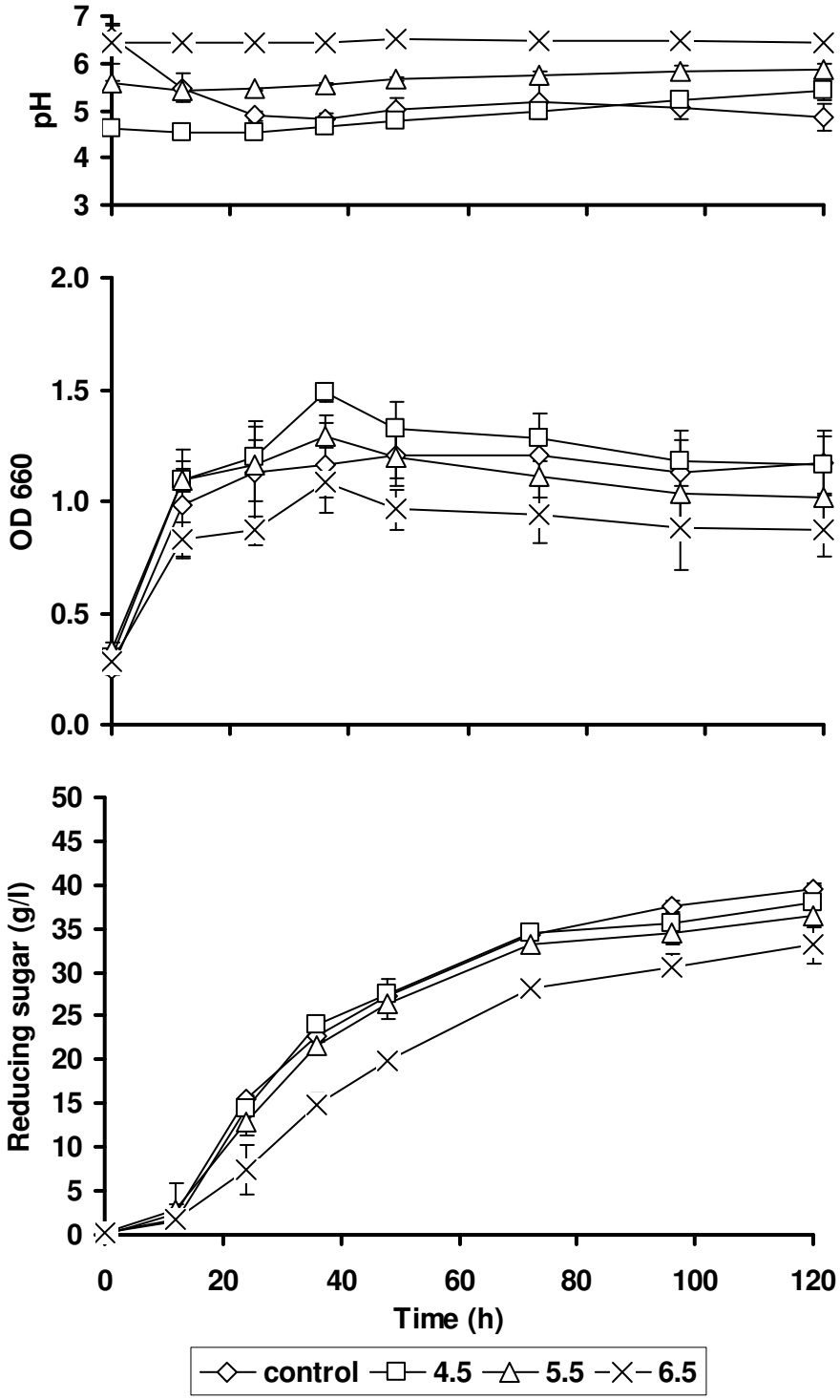
3.4 ผลของพีเอช

การศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญ และการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ อาหารที่ใช้ในการศึกษาเตรียมได้โดยเติมแป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์ลงไปในสารละลายซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ระดับพีเอชแตกต่างกัน คือ 4.5, 5.5 และ 6.5 โดยเปรียบเทียบการเจริญ และการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์กับชุดควบคุมที่ไม่มีการปรับค่าพีเอช (พีเอชเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 6.60) พบว่า การเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 ในอาหารที่ปรับค่าพีเอช 4.5 จะให้ค่าการเจริญสูงสุด ส่วนเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 ที่เลี้ยงในอาหารที่ปรับพีเอช 6.5 จะให้ค่าการเจริญต่ำสุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ กล่าวคือในอาหารที่ปรับค่าพีเอช 4.5, 5.5 และในชุดควบคุมที่ไม่มีการปรับค่าพีเอช จะให้ค่าการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด ส่วนเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 ที่เลี้ยงในอาหารที่ปรับพีเอช 6.5 จะให้ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุด โดยในอาหารที่ปรับค่าพีเอช 4.5, 5.5 และในชุดควบคุมที่ไม่มีการปรับค่าพีเอช จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 16

ทั้งนี้ในการเปลี่ยนแปลงของค่าที่ระดับพีเอช 5.5 และ 6.5 พบว่าหลังจากหมักเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ทั้งนี้เนื่องมาจากระบบบัฟเฟอร์ของอาหารช่วยควบคุมค่าพีเอชให้คงที่ในระหว่างการหมัก ส่วนในอาหารที่มีพีเอช 4.5 พบว่าหลังจากหมักเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง พีเอชของอาหารสูงขึ้นเป็น 5.42 และในอาหารชุดควบคุมที่ไม่มีการปรับค่าพีเอช พบว่า พีเอชเริ่มต้นของอาหารอยู่ที่ 6.60 และเมื่อเลี้ยงจนครบ 120 ชั่วโมง พีเอชจะลดลงเหลือเพียง 5.25 ซึ่งการลดลงของพีเอชอาจเนื่องจากผลผลิตที่เชื้อยีสต์สร้างขึ้นมาในระหว่างกระบวนเจริญเติบโต ซึ่งสอดคล้องกับ Choi และคณะ (1997) ซึ่งเลี้ยงเชื้อ *Saccharomycopsis* เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าพีเอชของอาหารเลี้ยง มีค่าลดลงจาก 5.0 เหลือ 4.0

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในระหว่างกระบวนการหมักกับการย่อยสลาย พบว่า การย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังจะเกิดขึ้นได้ดีที่พีเอชของอาหารในช่วง 4.5-5.5 ทั้งนี้เนื่องมาจากคุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งพบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *S. fibuligera* อยู่ในช่วง 5.0-6.2 ส่วนเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *S. fibuligera* อยู่ในช่วง 5-6 (Hostinová, 2002)

Garg และ Doelle (1989) ศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตน้ำตาลกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Rhizopus oligosporus* UQM 145F พบว่าที่พีเอชเริ่มต้น 3.5 จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด เท่ากับ 16.0 กรัมต่อลิตร แต่จะได้ปริมาณเซลล์ต่ำสุด เท่ากับ 2.7 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 16 ผลของพีเอชต่อการเจริญและการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (5%) โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

Figure 16. Effect of pH on growth and reducing sugar production from cassava starch (5%) by *Saccharomycopsis* sp. YCY1 grown at 37 °C on a rotary shaker at 150 rpm.

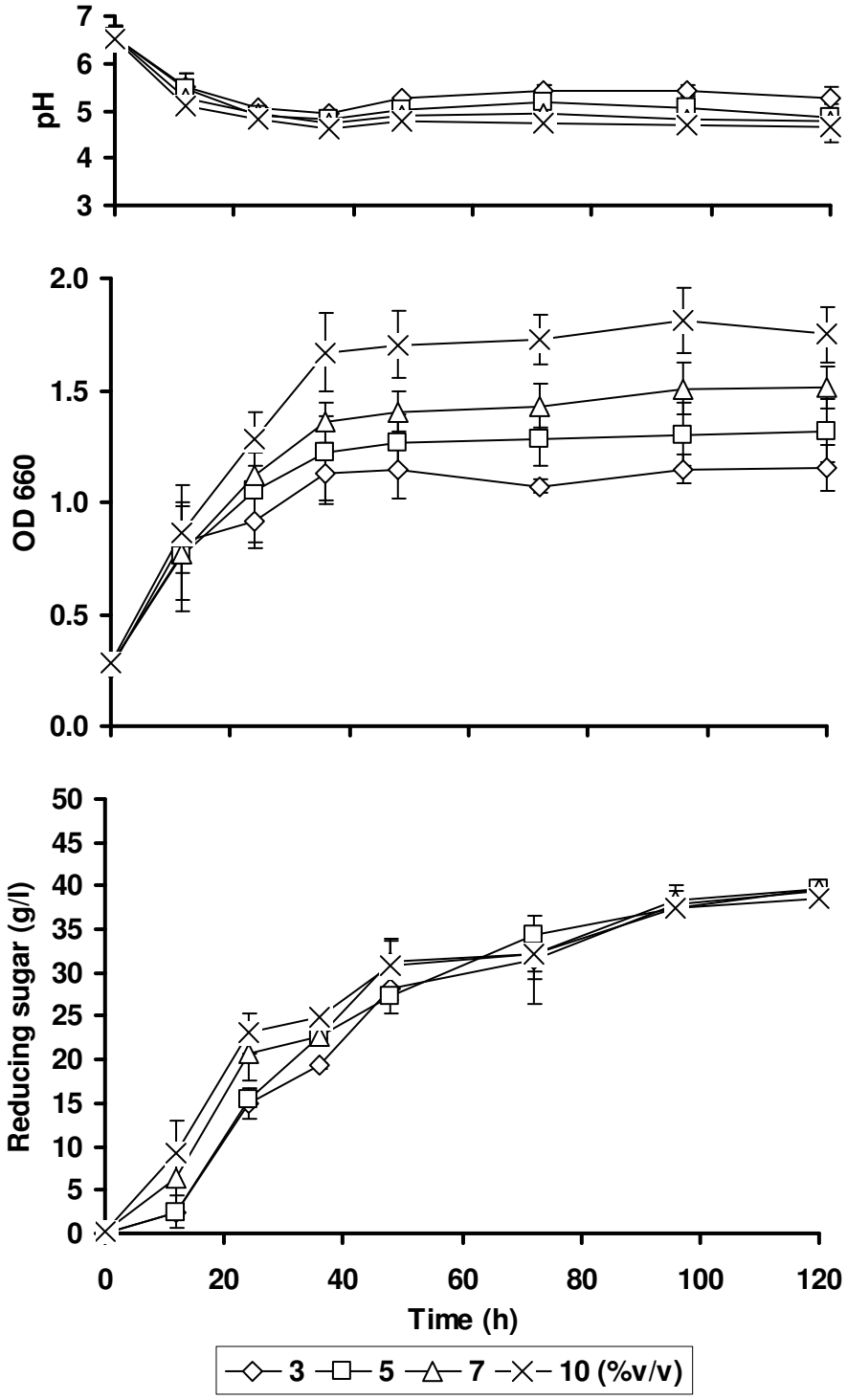
3.5 ผลของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น

ศึกษาผลของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยปรับปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นให้ได้ 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นใส่ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน คือ 3, 5, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบว่า ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 แต่ไม่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ กล่าวคือ เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นสูงขึ้น จะทำให้อัตราการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 สูงขึ้นตามไปด้วย ในขณะที่ไม่มีความแตกต่างกันของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เชื้อผลิตได้ ดังแสดงในภาพที่ 17 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นการลดปัญหาที่เกิดจากการใช้อาหารเก่า ซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญของยีสต์ต่อไป และเป็นการลดต้นทุนในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1

3.6 ผลของความเร็วรอบของการเขย่า

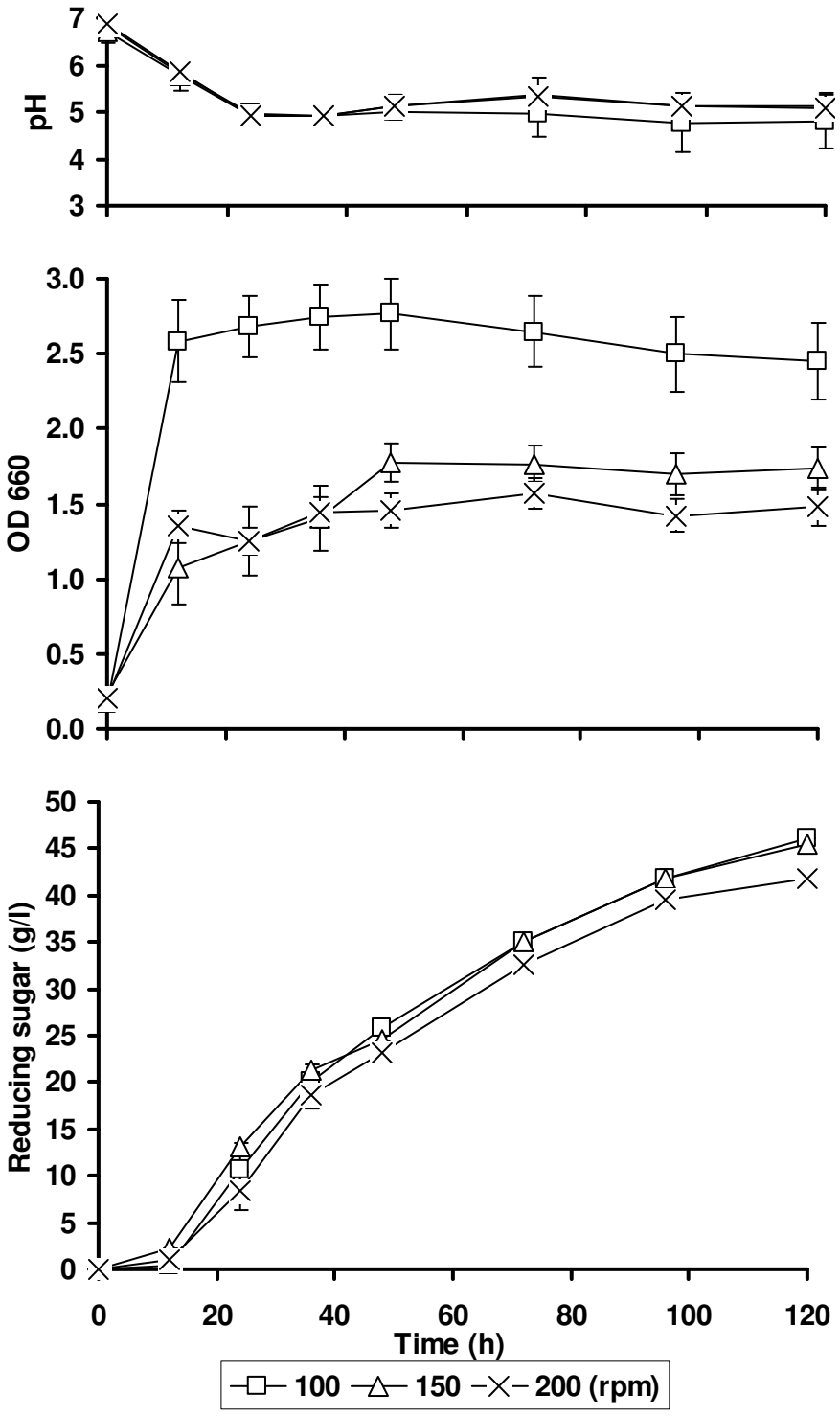
ศึกษาผลของความเร็วรอบของการเขย่าต่อการเจริญ และการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 โดยเลี้ยงในอาหาร YPC ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบแตกต่างกัน คือ 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที จากภาพที่ 18 เห็นได้ว่า ความเร็วรอบของการเขย่ามีผลต่อการเจริญ และการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยการเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที การเจริญของเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 สูงสุด ส่วนการเขย่าที่ความเร็ว 150 และ 200 รอบต่อนาที จะมีการเจริญของเชื้อน้อยกว่าการเขย่าที่ 100 และพบว่าปริมาณน้ำตาลที่เชื้อผลิตได้จากการเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 และ 150 รอบต่อนาที ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ คือ 100 รอบต่อนาที เนื่องจากจะช่วยลดต้นทุนในการผลิต

Dostálek และ Häggström (1983) ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* ในถังหมักที่อัตราการกวนที่แตกต่างกันคือ 200, 350 และ 500 รอบต่อนาที พบว่าการให้อัตราการกวนที่ 500 รอบต่อนาที จะทำให้ได้ปริมาณเซลล์สูงสุดคือ 15 กรัมต่อลิตร และการให้อัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสูดคือ 5.4 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 17 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญและการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (5%) โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

Figure 17. Effect of inoculums size on growth and reducing sugar production from cassava starch (5%) by *Saccharomycopsis* sp. YCY1 grown at 37 °C on a rotary shaker at 150 rpm.



ภาพที่ 18 ผลของอัตราการเขย่าต่อการเจริญและการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (5%) โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

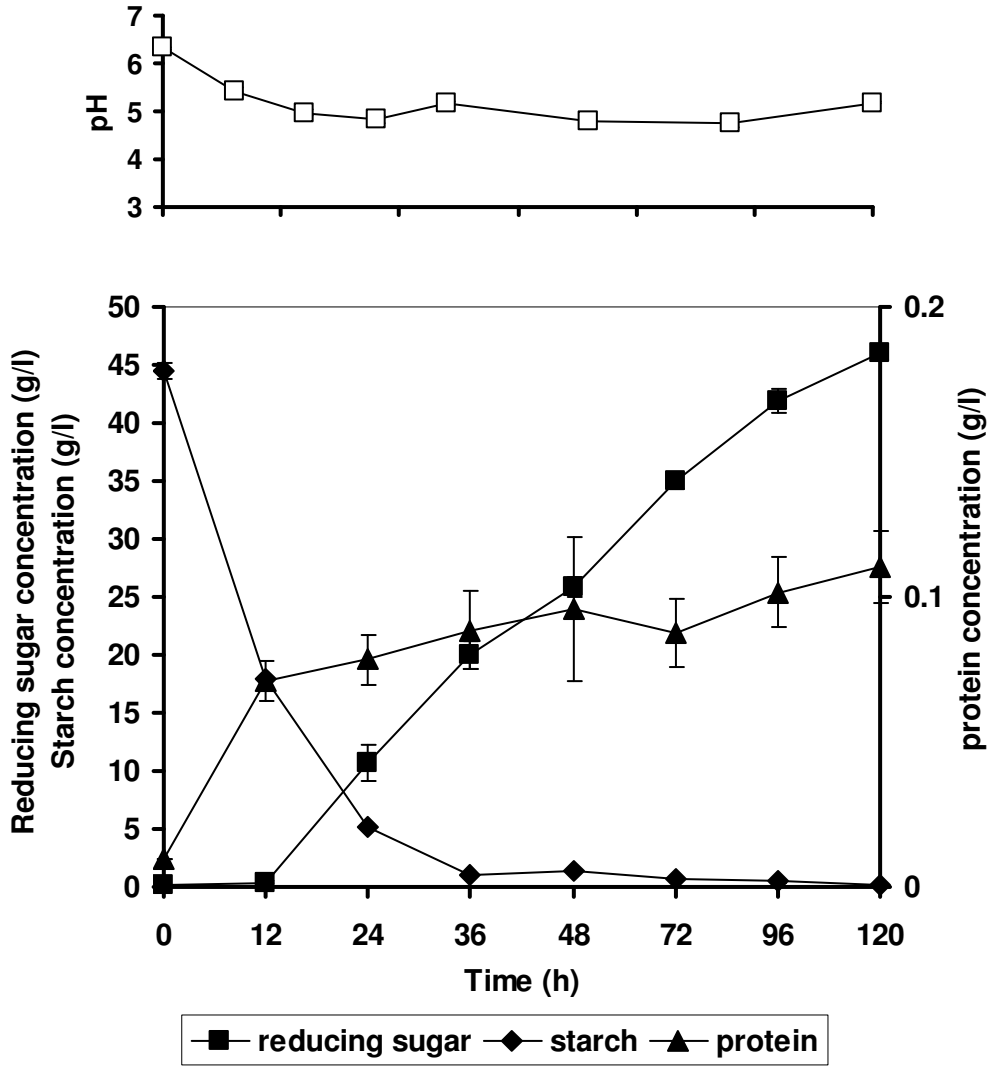
Figure 18. Effect of shaking speed on growth and reducing sugar production from cassava starch (5%) by *Saccharomycopsis* sp. YCY1 grown at 37 °C.

3.7 การศึกษาการเจริญ และการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากแป้งมันสำปะหลัง

การศึกษาการเจริญ และการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 19 พบว่า เชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นการเจริญจะเริ่มช้าลง และเข้าสู่ระยะคงที่ โดยเชื้อจะมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 120 ชั่วโมง และมีปริมาณโปรตีน 0.11 กรัมต่อลิตร และพบว่าการเปลี่ยนแปลงพีเอชมีความสัมพันธ์ในทางผกผันกับการเจริญของเชื้อ กล่าวคือ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญ โดยพีเอชมีค่าลดลงจาก 6.32 เป็น 4.97 หลังจากการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ พบว่า พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเริ่มคงที่จนสิ้นสุดการทดลองที่ 120 ชั่วโมง พีเอชมีค่าเท่ากับ 5.18

การย่อยแป้ง และการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 มีความสัมพันธ์กับการเจริญ เมื่อเชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรก จะทำให้ปริมาณแป้งลดลงอย่างรวดเร็วตามไปด้วย โดยปริมาณแป้งลดลงจาก 44.47 เป็น 5.24 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการย่อยสลายแป้งเท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะคงที่ พบว่า อัตราการย่อยแป้งเริ่มลดลงอย่างช้าๆ จนปริมาณแป้งต่ำสุดเท่ากับ 0.24 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมง และพบว่าการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างช้าๆ ใน 12 ชั่วโมงแรกของการเจริญ และจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากหมักไป 12 ชั่วโมง การที่เชื้อย่อยแป้งได้อย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก แต่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำนั้นเป็นผลมาจากเชื้อใช้น้ำตาลในการเจริญ และการย่อยแป้งของเอนไซม์กลุ่มอะไมเลส โดยเฉพาะเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เชื้อผลิต ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายแป้ง โดยจะจำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่แอลฟา 1,4 ในลักษณะตัดภายในสายของแป้งได้เป็นกลูแคน (glucan) และลิมิตเดกซ์ทริน (limit dextrin) ที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย เป็นผลทำให้ความหนืดของแป้งลดลงอย่างรวดเร็ว (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) ส่วนในระยะคงที่ของการเจริญ การที่แป้งมีอัตราการย่อยสลายน้อยเป็นผลมาจากการเจริญของเชื้อลดลงทำให้การใช้น้ำตาลในการเจริญลดลงตามไปด้วย ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากเอนไซม์ที่เชื้อผลิตในระยะต้นยังคงมีแอคติวิตีที่สามารถทำงานได้ต่อ

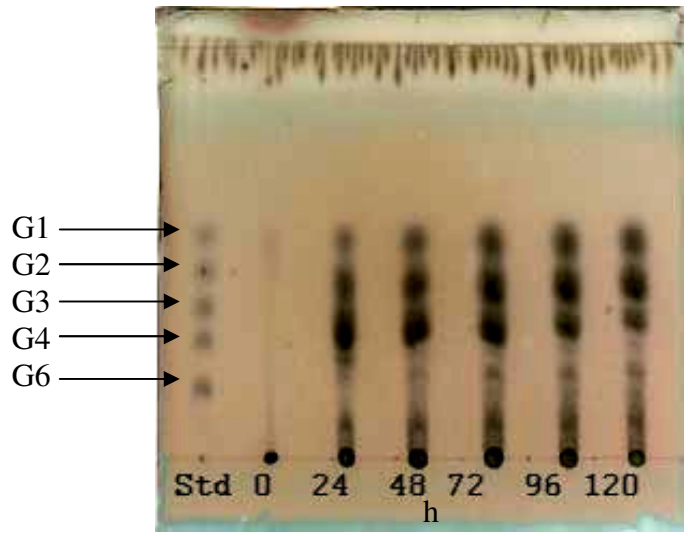
การวิเคราะห์ผลผลิตจากการย่อยแป้งโดยเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 โดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี พบว่า เชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 สามารถย่อยแป้งได้ผลผลิตเป็นกลูโคส และอนุพันธ์ของน้ำตาลมอลโตส ดังแสดงในภาพที่ 20 โดยผลผลิตในการย่อยแป้งในระยะ 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญ ส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มของน้ำตาลมอลโตเตตตราโอส และมอลโตส และมีน้ำตาลกลูโคสในปริมาณที่เล็กน้อย หลังจากหมักไป 24 ถึง 120 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้น โดยที่น้ำตาลมอลโตเตตตราโอสมีปริมาณลดลง ทั้งนี้เป็นผลจากการย่อยด้วยเอนไซม์



ภาพที่ 19 การเจริญและการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (5%) ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

Figure 19. The time course of cell growth and cassava starch hydrolysis by *Saccharomycopsis* sp. YCY1 grown at 37 °C on a rotary shaker at 100 rpm.

.



ภาพที่ 20 ผลผลิตที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ระยะเวลาต่างๆ โดยเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี สารละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย ไอโซโพรอิลแอลกอฮอล์ : เอตทิลอะซิเตต : น้ำกลั่น อัตราส่วน 3 : 1 : 1 และสารละลายที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ประกอบด้วย *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine มา 0.3 กรัม ละลายในสารละลายกรดซัลฟูริก 5 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำตาลกลูโคสและอนุพันธ์ของน้ำตาลมอลโตสเป็นน้ำตาลมาตราฐาน (น้ำตาลกลูโคส : G1, น้ำตาลมอลโตส : G2, น้ำตาลมอลโตไตรโอส : G3, น้ำตาลมอลโตเตตตราโอส : G4 และน้ำตาลมอลโตเฮกซาโอส : G6)

Figure 20. Thin-layer chromatographic analysis of the products from the hydrolysis of cassava starch by *Saccharomycopsis* sp. YCY1. The solvent system contained isopropyl alcohol-ethyl acetate-water (3:1:1, vol/vol/vol) and dipping reagent contained 0.3% (wt/vol) *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 5% (vol/vol) H_2SO_4 in methanol. A mixture of glucose and maltooligosaccharides was used as standards: glucose (G1), maltose (G2), maltotriose (G3), maltotetraose (G4) and maltohexaose (G6).

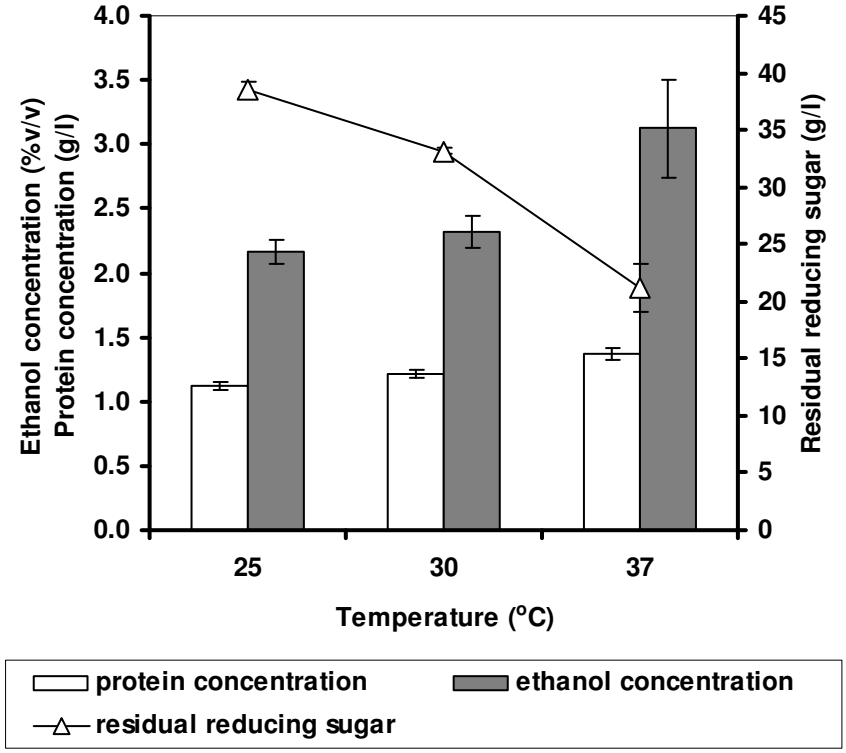
4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์ *Pichia anomala* YTB3

4.1 ผลของอุณหภูมิ

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *P. anomala* YTB3 ในอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 11 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ บ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 21 พบว่า การเจริญ และการผลิตเอทานอลแปรผันโดยตรงกับอุณหภูมิของการเลี้ยง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น อัตราการเจริญ และการผลิตเอทานอลก็สูงขึ้นด้วย โดยเชื้อยีสต์ *P. anomala* YTB3 มีการเจริญ และผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คือ ได้ค่าปริมาณโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 1.37 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 3.12 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ในทางตรงกันข้ามเชื้อยีสต์ *P. anomala* YTB3 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะให้อัตราการเจริญ และการผลิตเอทานอลต่ำสุด คือ ได้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.12 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณเอทานอล 2.16 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร และพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือมีความสัมพันธ์กับการเจริญ และการผลิตเอทานอล กล่าวคือ เชื้อมีการเจริญ และการผลิตเอทานอลมากขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลที่เหลือน้อยลง เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสเป็นวัตถุดิบที่เชื้อยีสต์นำไปใช้ในการเจริญเติบโต และการผลิตเอทานอล

Torija และคณะ (2003) ศึกษาการเจริญและหมักที่อุณหภูมิ 15, 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียสโดยกลุ่มเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าปริมาณเอทานอลจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยปริมาณเอทานอลที่กลุ่มเชื้อผลิตได้คือ 93.60, 93.04, 90.00, 89.60 และ 79.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อจะผลิตกรดอะซิติก และกลีเซอรอลได้สูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

Bandaru และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้งสาคูโดยเชื้อ *Zymomonas mobilis* MTCC 92 พบว่าเมื่อให้อุณหภูมิสูงขึ้นการผลิตเอทานอลจะสูงขึ้น โดยเอทานอลจะสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอุณหภูมิ 32.4 องศาเซลเซียส คือ 55.3 กรัมต่อลิตร และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 32.4 องศาเซลเซียส ปริมาณเอทานอลที่ได้จะลดลง



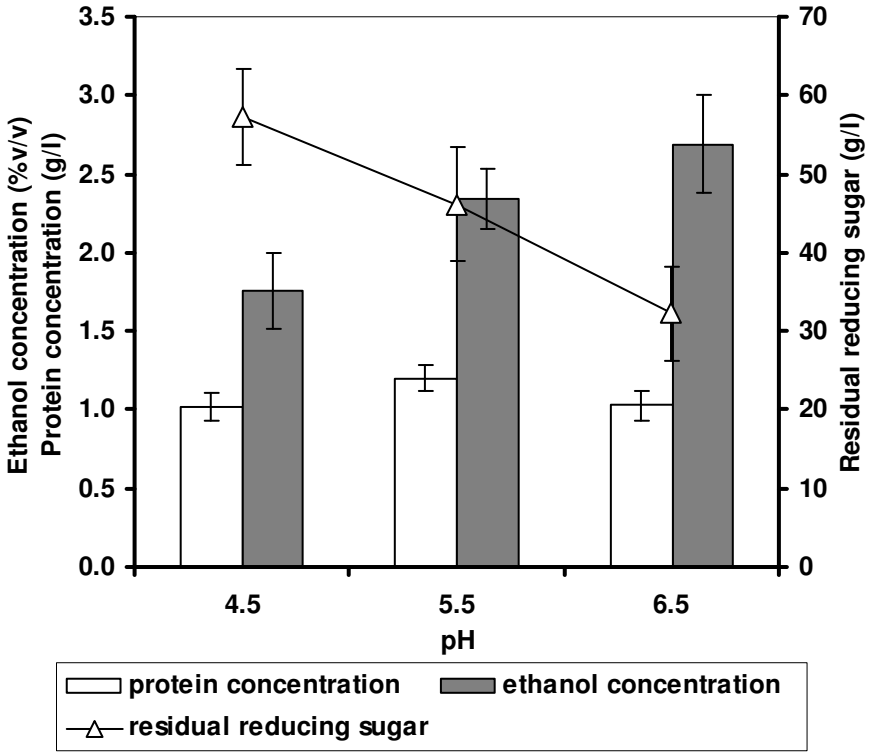
ภาพที่ 21 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลจากเชื้อ *Pichia anomala* YTB3 ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

Figure 21. Effect of temperature on growth and ethanol production by *Pichia anomala* YTB3 grown for 72 h.

.

4.2 ผลของพีเอชเริ่มต้น

ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *P. anomala* YTB3 ในอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 11 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ โดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.5, 5.5 และ 6.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 22 พบว่าพีเอชมีผลต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอล โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *P. anomala* YTB3 เท่ากับ 5.5 จะมีปริมาณโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 1.2 กรัมต่อลิตร และพบว่าเมื่อพีเอชลดลงอัตราการผลิตเอทานอลก็จะลดลง โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *P. anomala* YTB3 มีค่าเท่ากับ 6.5 จะได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 2.69 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร



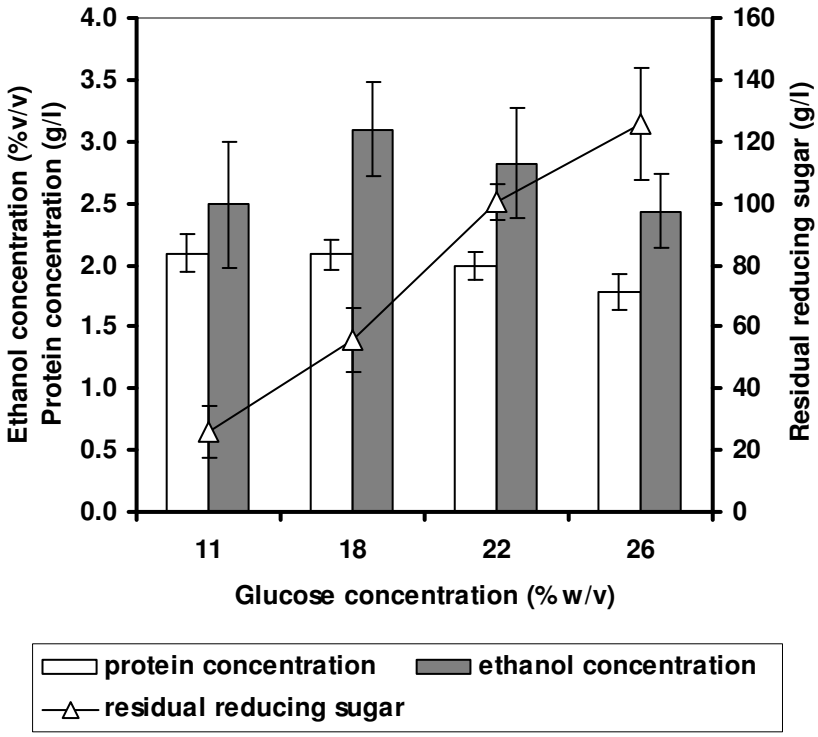
ภาพที่ 22 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลจากเชื้อ *Pichia anomala* YTB3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

Figure 22. Effect of pH on growth and ethanol production by *Pichia anomala* YTB3 grown for 72 h at 37 °C.

4.3 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น

การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *P. anomala* YTB3 ในอาหาร YM ที่มีปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่แตกต่างกัน คือ 11, 18, 22 และ 26 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 23 พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *P. anomala* YTB3 โดยความเข้มข้นของน้ำตาลจะแปรผกผันกับการเจริญของเชื้อ กล่าวคือ เมื่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้นอัตราการเจริญก็จะลดลง นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลยังมีผลต่อการผลิตเอทานอล พบว่า เมื่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้นอัตราการผลิตเอทานอลก็สูงขึ้น แต่เมื่อปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมีค่าสูงกว่า 18 กรัมต่อลิตร การผลิตเอทานอลจะลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากผลของปริมาณน้ำตาลที่ไปกดดันการเจริญของเชื้อ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) เมื่อเชื้อมีอัตราการเจริญที่ต่ำ การผลิตเอทานอลก็จะลดลง ซึ่งจากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 18 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 3.10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร และปริมาณโปรตีนเท่ากับ 2.09 กรัมต่อลิตร

Roukas (1996) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยตรึงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* และเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ (fed-bathch cultivation) โดยให้ปริมาณน้ำตาลต่างๆ คือ 150, 200, 250 และ 300 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลที่ทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด คือ 200 กรัมต่อลิตร โดยให้ผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 37 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 23 ผลของปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลจากเชื้อ *Pichia anomala* YTB3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

Figure 23. Effect of initial glucose concentration on growth and ethanol production by *Pichia anomala* YTB3 grown for 72 h at 37 °C.

4.4 ผลของปริมาณความเข้มข้นของยีสต์สกัดเริ่มต้น

การศึกษาผลของความเข้มข้นของยีสต์สกัดเริ่มต้นต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *P. anomala* YTB3 ในอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 18 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมปริมาณยีสต์สกัดที่แตกต่างกัน คือ 0.3, 0.7, 1.0 และ 1.4 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง นำไปหาอัตราการเจริญโดยวัดค่าปริมาณโปรตีน ปริมาณเอทานอลที่ได้ด้วยเครื่อง ebulliometer และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ

จากการทดลองพบว่าปริมาณยีสต์สกัดมีผลต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *P. anomala* YTB3 โดยปริมาณยีสต์สกัดจะแปรผันโดยตรงกับการเจริญของเชื้อยีสต์ *P. anomala* YTB3 แต่จะแปรผักผันกับการผลิตเอทานอล กล่าวคือ เมื่อให้ปริมาณยีสต์สกัดสูงขึ้นจะทำให้อัตราการเจริญ

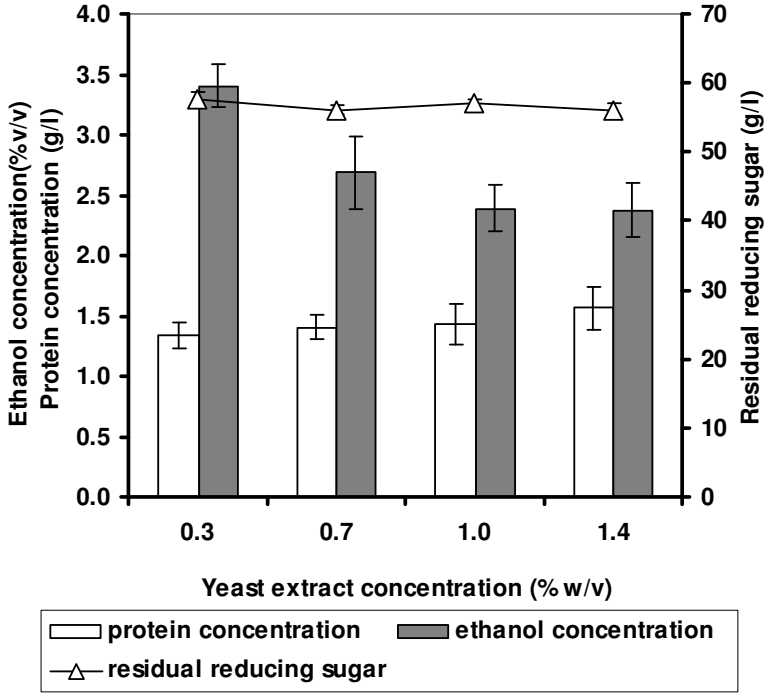
สูงขึ้นตามไปด้วย แต่การผลิตเอทานอลจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากไนโตเจนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการสร้างโปรตีนของเซลล์ (Walker, 1998) ดังนั้นการให้ปริมาณยีสต์สกัดเพิ่มขึ้นจึงส่งผลทำให้ได้ปริมาณเซลล์ที่สูงขึ้นตามไปด้วย อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณยีสต์สกัดจะไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอล ทั้งนี้เนื่องมาจากน้ำตาลถูกใช้ไปกับการเจริญของเชื้อได้เป็นส่วนใหญ่ ดังแสดงในภาพที่ 24 จากการทดลอง Sato และคณะ (1992) พบว่าการให้ปริมาณยีสต์สกัดสูงขึ้นนอกจากจะทำให้ได้ปริมาณเซลล์ที่สูงขึ้น ยังส่งผลทำให้ได้ปริมาณกรดอะซิติก และกรดแลกติกสูงตามไปด้วย

ซึ่งจากการทดลองนี้ให้ผลที่แตกต่างจาก สมศรี ศิริพิทยางกูร (2524) ซึ่งพบว่าการให้เพิ่มปริมาณยีสต์สกัดในปริมาณ 0.2, 0.4, 0.5 และ 0.6 กรัมต่อลิตร ลงในน้ำอ้อย ไม่มีผลทำให้ปริมาณเอทานอลสูงขึ้น

D'Amore และคณะ (1989) พบว่าการให้ความเข้มข้นของสารอาหารเพิ่มขึ้นสองเท่า (จากอาหาร YPN เป็น 2xYPN) จะมีผลทำให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นในเชื้อยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน ได้แก่ *Saccharomyces diastatcus* 62, *Saccharomyces cerevisiae* 67, *Kluyveromyces marxianus* 1510, *Saccharomyces* fusion product 1400, *Kluyveromyces lactis* 177 และ *Saccharomyces cerevisiae* 130

Yu และ Zhang (2003) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำหมักที่ได้จากการย่อยฝ้าย ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 31.6 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* 2.399 พบว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัดผสมกับแอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย และยูเรียผสมกับแอมโมเนียมซัลเฟต จะได้ปริมาณเอทานอลต่างกัน โดยการเติมยูเรียเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนจะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 15.1 กรัมต่อลิตร

จากการทดลองพบว่าปริมาณยีสต์สกัดที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.3 กรัมต่อลิตร โดยจะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 3.40 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ได้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.32 กรัมต่อลิตร



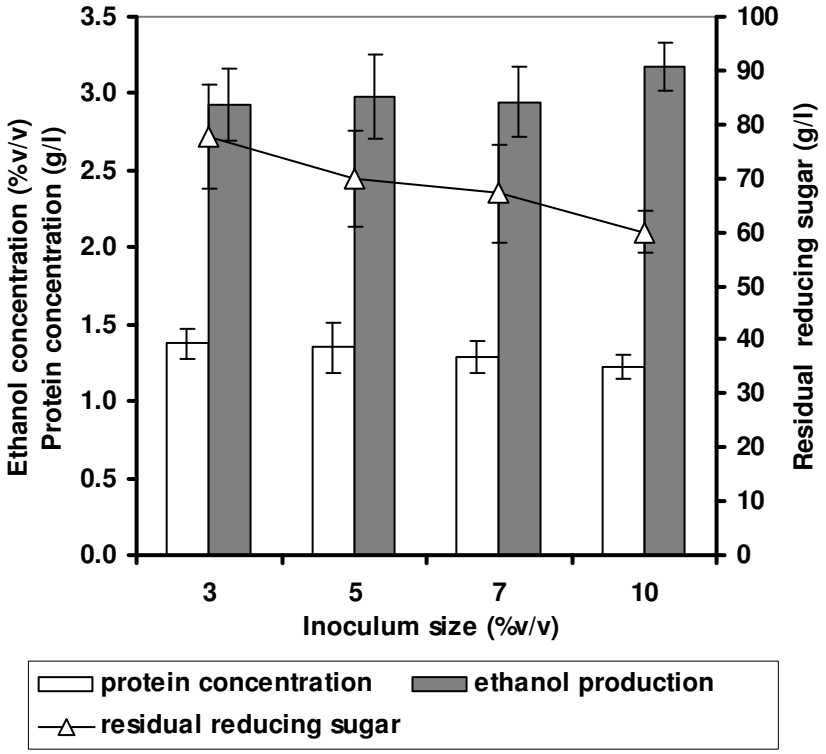
ภาพที่ 24 ผลของปริมาณความเข้มข้นของยีสต์สกัดเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลจากเชื้อ *Pichia anomala* YTB3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

Figure 24. Effect of initial yeast extract concentration on growth and ethanol production by *Pichia anomala* YTB3 grown for 72 h at 37 °C.

4.5 ผลของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น

การศึกษาผลของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *P. anomala* YTB3 โดยปรับปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นให้ได้ 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นใส่ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน คือ 3, 5, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 18 เปอร์เซ็นต์ ที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเท่ากับ 6.5 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 25 พบว่า ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นไม่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *P. anomala* YTB3 กล่าวคือ เมื่อให้ปริมาณหัวเชื้อสูงขึ้น จะได้ปริมาณโปรตีน และปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปเลือกใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อลดต้นทุนในการผลิต

Jemec และ Raspor (2005) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยเปรียบเทียบการให้ปริมาณเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* เริ่มต้นในปริมาณต่างๆ คือ 5, 50 และ 400 cfu/ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส พบว่าการให้ปริมาณเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* เริ่มต้นสูงขึ้นจะได้ปริมาณเอทานอลสูงขึ้น คือ 13.2, 13.7 และ 14.4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร



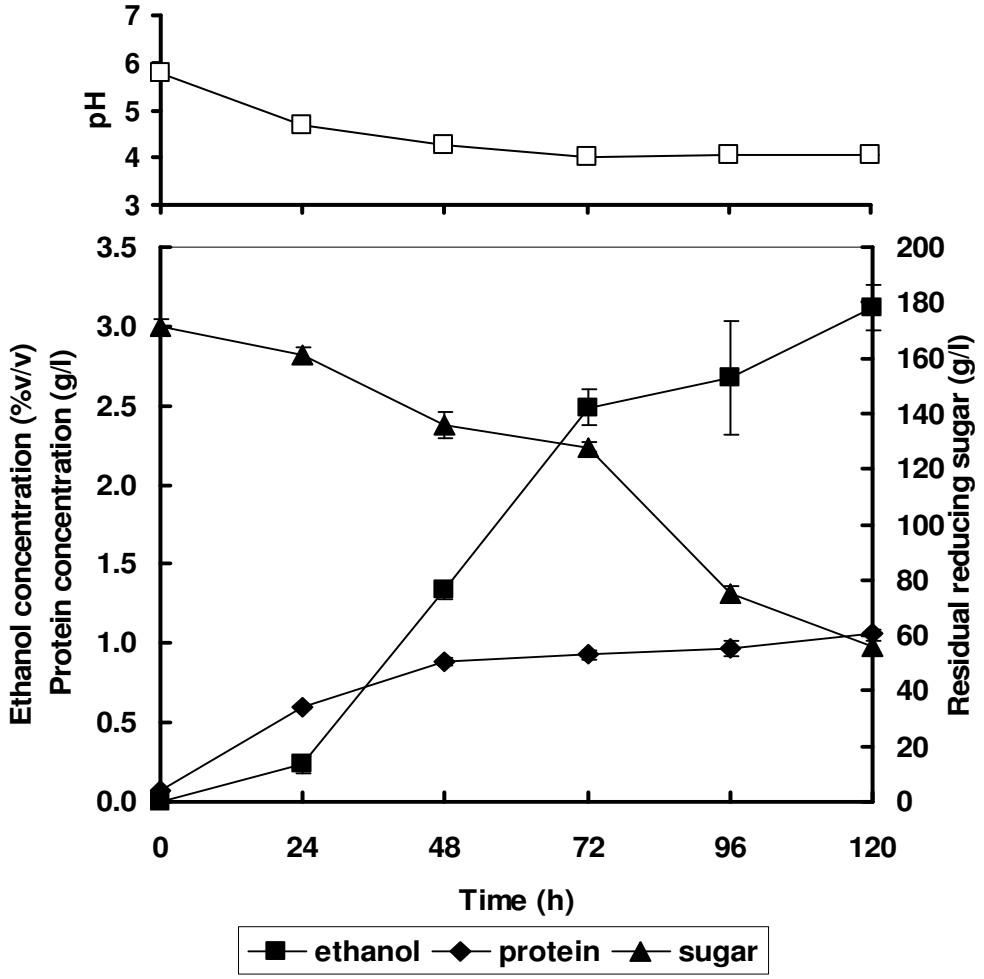
ภาพที่ 25 ผลของปริมาณหัวเชื้อที่ใช้เริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลจากเชื้อ *Pichia anomala* YTB3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

Figure 25. Effect of inoculums size on growth and ethanol production by *Pichia anomala* YTB3 grown for 72 h at 37 °C.

4.6 การเจริญและการผลิตเอทานอล

ในการศึกษาการเจริญ และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *P. anomala* YTB3 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 18 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอช 6.5 เติมปริมาณหัวเชื้อ 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพที่ 26 พบว่า เชื้อยีสต์ *P. anomala* YTB3 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นจะเริ่มช้าลง และเข้าสู่ระยะคงที่ โดยเชื้อมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 120 ชั่วโมง จะได้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.06 กรัมต่อลิตร และพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ กล่าวคือ เมื่อเชื้อมีการเจริญขึ้นจะทำให้ค่าพีเอชลดลง โดยค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วจาก 5.80 เป็น 4.27 ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญ และจะลดลงอย่างช้าๆ เมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่เวลา 120 ชั่วโมง พบว่า ค่าพีเอชเท่ากับ 4.05

นอกจากนี้ยังพบว่า การผลิตเอทานอลมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ กล่าวคือ การผลิตเอทานอลจะเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 120 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 3.11 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร



ภาพที่ 26 การเจริญและการผลิตเอทานอลที่ระยะเวลาต่างๆ โดยเชื้อยีสต์ *Pichia anomala* YTB3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

Figure 26. The time course of cell growth and ethanol production by *Pichia anomala* YTB3 grown for 72 h at 37 °C.

5. การศึกษาหากระบวนการที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง

ในการศึกษาหากระบวนการหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง จะเปรียบเทียบกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่างๆ คือ

ชุดทดลอง A เป็นน้ำแป้งหมักที่ผ่านการย่อยแป้งโดยเชื้อ *Saccharomycopsis* sp.YCY1

ชุดทดลอง B เป็นการหมักแบบใช้เชื้อเดี่ยวโดยเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 (ปิดจุกด้วย air lock)

ชุดทดลอง C เป็นการหมักแบบใช้เชื้อเดี่ยวโดยเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 (ปิดจุกด้วยสำลี)

ชุดทดลอง D เป็นการหมักแบบใช้เชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 กับ *P. anomala* YTB3 (ปิดจุกด้วย air lock)

ชุดทดลอง E เป็นการหมักแบบใช้เชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 กับ *P. anomala* YTB3 (ปิดจุกด้วย สำลี)

ชุดทดลอง F เป็นการหมักแบบใช้เชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 กับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5088 (ปิดจุกด้วย air lock)

ชุดทดลอง G เป็นการหมักแบบใช้เชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 กับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5088 (ปิดจุกด้วยสำลี)

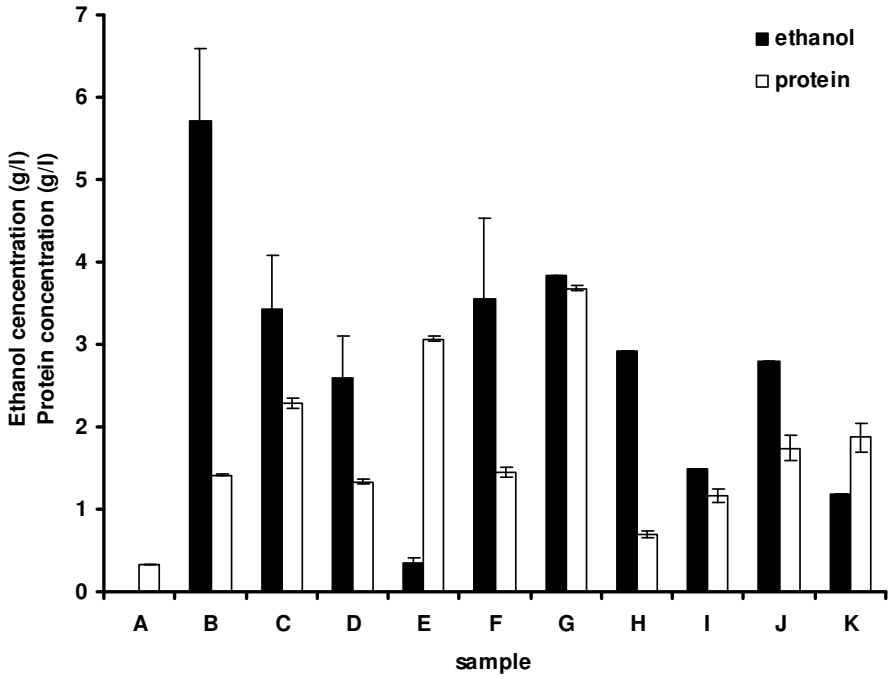
ชุดทดลอง H เป็นการหมักแบบแยกกระบวนการหมัก ระยะแรกใช้เชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 แล้วหมุนเหวี่ยงเอาเซลล์ออก ระยะที่สองใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5088 (ปิดจุกด้วยสำลี)

ชุดทดลอง I เป็นการหมักแบบแยกกระบวนการหมัก ระยะแรกใช้เชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 แล้วหมุนเหวี่ยงเอาเซลล์ออก ระยะที่สองใช้เชื้อ *P. anomala* YTB3 (ปิดจุกด้วยสำลี)

ชุดทดลอง J เป็นการหมักแบบแยกกระบวนการหมัก ระยะแรกใช้เชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 แล้วไม่ได้หมุนเหวี่ยงเอาเซลล์ออก ระยะที่สองใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5088 (ปิดจุกด้วยสำลี)

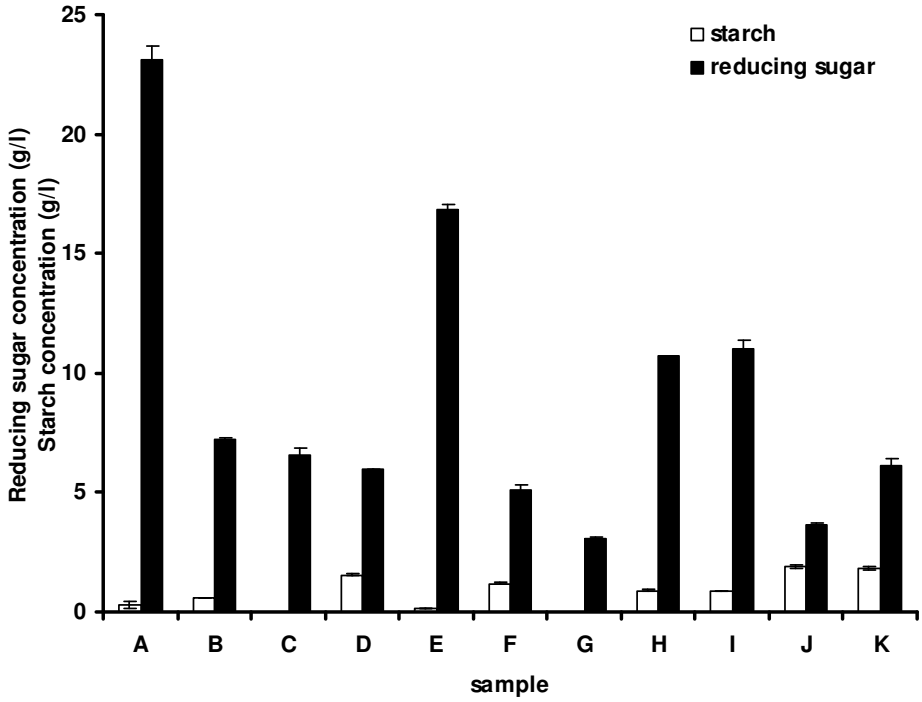
ชุดทดลอง K เป็นการหมักแบบแยกกระบวนการหมัก ระยะแรกใช้เชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 แล้วไม่ได้หมุนเหวี่ยงเอาเซลล์ออก ระยะที่สองใช้เชื้อ *P. anomala* YTB3 (ปิดจุกด้วยสำลี)

จากชุดทดลองสามารถแบ่งกระบวนการหมักออกเป็น 3 กระบวนการหมักคือ ในชุดทดลอง B และ C เป็นการหมักแบบใช้เชื้อเดี่ยว ชุดการทดลอง D, E, F และ G เป็นการหมักแบบใช้เชื้อร่วม และในชุดการทดลอง H, I, J และ K เป็นการหมักแบบแยกกระบวนการหมัก แสดงผลดังภาพที่ 27 และ 28



ภาพที่ 27 ปริมาณเอทานอล และปริมาณโปรตีนของกระบวนการหมักแบบต่างๆ

Figure 27. Ethanol and protein concentration of various process for starch conversion into ethanol.



ภาพที่ 28 ปริมาณแป้ง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือของกระบวนการหมักแบบต่างๆ

Figure 28. Residual starch and reducing concentration of various process for starch conversion into ethanol.

5.1 ผลของอากาศต่อการผลิตเอทานอล

การศึกษาผลของอากาศต่อการผลิตเอทานอลโดยการปิดจุกฟลาสต์ด้วยวัสดุที่แตกต่างกัน คือ ปิดจุกฟลาสต์ด้วยสำลีหุ้ม foil และปิดจุกฟลาสต์ด้วย air lock โดยศึกษาการหมักเอทานอลแบบการใช้เชื้อเดี่ยวโดยเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 และการเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 กับ *P. anomala* YTB3 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณยีสต์สกัด 0.3 เปอร์เซ็นต์ มอลสกัด 0.3 เปอร์เซ็นต์ และเปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลดังตารางที่ 13 พบว่า การปิดจุกฟลาสต์ด้วย air lock จะได้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการปิดจุกฟลาสต์ด้วยสำลีหุ้ม foil ทั้งในกระบวนการหมักแบบใช้เชื้อเดี่ยวและการหมักแบบใช้เชื้อร่วม ทั้งนี้เนื่องจากการปิดจุกด้วยสำลีหุ้ม foil อากาศจะซึมเข้าออกได้ดีกว่าการการปิดจุกฟลาสต์ด้วย air lock ทำให้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้น้อยลง แต่จะถูกใช้ไปกับการเจริญของเซลล์เป็นส่วนใหญ่ ดังแสดงในภาพที่ 29 ส่วนการใช้การปิดจุกฟลาสต์ด้วย air lock เป็นระบบที่จำกัดปริมาณอากาศ (limited aerobic) เป็นระบบที่ไม่ยอมให้อากาศจากภายนอกไหลผ่านเข้าไปในฟลาสต์ได้ แต่ยอมให้อากาศที่อยู่ภายในออกได้โดยอาศัยแรงดันที่เกิดขึ้นภายในฟลาสต์เป็นตัวช่วย โดยการเจริญของเชื้อในฟลาสต์ที่ปิดจุกด้วย air lock ในระยะต้นจะเป็นการเจริญแบบใช้อากาศ (arerobic) หลังจากเชื้อใช้อากาศภายในหมดการเจริญของเชื้อจะเป็นแบบการเจริญแบบในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic) หรือเข้าสู่กระบวนการหมัก (fermentation)

สมศรี ศิริพิทยางกูร (2524) ศึกษาผลของการการปิดจุกฟลาสต์ต่อการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ S_{90} พบว่าการการปิดจุกฟลาสต์ด้วยสำลีหุ้มด้วย foil เชื้อจะผลิตเอทานอลได้สูงสุดคือร้อยละ 8.53 ในขณะที่การการปิดจุกฟลาสต์ด้วยสำลีอย่างเดียวหรือการปิดจุกฟลาสต์ด้วย foil และการปิดจุกฟลาสต์ด้วยพาราฟิล์ม สามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 8.49, 7.71 และ 4.33 ตามลำดับ

ตารางที่ 13 ผลของอากาศต่อการผลิตเอทานอลโดยการหมักแบบใช้เชื้อเดี่ยว (*Saccharomycopsis* sp. YCY1) และการหมักแบบใช้เชื้อร่วม (*Saccharomycopsis* sp. YCY1 กับ *P. anomala* YTB3)

Table 13. Effect of aeration condition on ethanol production by monoculture (*Saccharomycopsis* sp. YCY1) and coculture (*Saccharomycopsis* sp. YCY1 and *P. anomala* YTB3).

			Ethanol (g/l)	Protein (g/l)	Residual starch (g/l)	Reducing sugar (g/l)
momoculture	air lock	B	5.72±0.89	1.41±0.01	0.57±0.02	7.22±0.10
	cotton wool	C	3.42±0.67	2.28±0.06	0.03±0.00	6.56±0.26
coculture	air lock	D	2.56±0.51	1.33±0.02	1.56±0.02	5.99±0.03
	cotton wool	E	0.35±0.05	3.06±0.03	0.15±0.02	16.82±0.23

5.2 ผลของกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน

การศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้กระบวนการหมักที่ต่างกันคือ การหมักแบบใช้เชื้อเดี่ยว โดยเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 การหมักแบบใช้เชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 กับ *P. anomala* YTB3 และการหมักแบบแยกกระบวนการผลิตโดยระยะแรกใช้เชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 และระยะที่สองใช้เชื้อ *P. anomala* YTB3 แสดงผลดังตารางที่ 14 พบว่าการหมักแบบใช้เชื้อเดี่ยวจะผลิตเอทานอลได้ดีกว่าการหมักแบบใช้เชื้อร่วม และการหมักแบบแยกกระบวนการผลิต ทั้งนี้เนื่องการหมักแบบใช้เชื้อร่วมเป็นการเลี้ยงเชื้อร่วมกันถึงสองชนิดคือ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 กับเชื้อ *P. anomala* YTB3 ในอาหารที่มีอยู่ในจำนวนจำกัด ซึ่งในระหว่างการย่อยสลายแป้งโดยเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 จะได้ผลผลิตคือน้ำตาลกลูโคส ซึ่งน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อทั้งสองชนิดใช้ได้เพื่อการเจริญ จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลน้อยลง ผลที่ได้จึงแสดงให้เห็นว่าปริมาณเอทานอลที่ได้จะน้อย ส่วนปริมาณโปรตีนที่ได้จะสูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลของการผลิตเอทานอลโดยการหมักแบบต่างๆ

Table 14. Effect of various process on ethanol production.

		Ethanol (g/l)	Protein (g/l)	Residual starch (g/l)	Reducing sugar (g/l)
momoculture	B	5.72±0.89	1.41±0.01	0.57±0.02	7.22±0.10
coculture	D	2.56±0.51	1.33±0.02	1.56±0.02	5.99±0.03
two-stage	K	1.18±0.00	1.87±0.17	1.83±0.08	6.10±0.33

5.3 ผลของชนิดเชื้อยีสต์

การผลิตเอทานอลระหว่างการใช้เชื้อ *P. anomala* YTB3 หรือเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5088 ในการหมักแบบใช้เชื้อร่วม และแบบแยกกระบวนการผลิตในระบบจำกัดการให้ปริมาณอากาศหรือปิดจุกด้วย air lock ดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่าการหมักแบบใช้เชื้อร่วมระหว่าง *Saccharomycopsis* sp. YCY1 กับเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR5088 จะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการหมักแบบใช้เชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 กับเชื้อ *P. anomala* YTB3 ซึ่งได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 3.54 และ 2.59 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการหมักแบบแยกกระบวนการผลิตพบว่าการหมักโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR5088 ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการหมักโดยใช้เชื้อ *P. anomala* YTB3 และเมื่อเปรียบการหมักแบบแยกกระบวนการผลิตแบบมีการหมุนเหวี่ยงเอาเชื้อ

Saccharomycopsis sp. YCY1 ออกกับแบบไม่หมุนเหวี่ยงเอาเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 ออก พบว่าการหมุนเหวี่ยงเอา *Saccharomycopsis* sp. YCY1 ออกจะได้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการไม่หมุนเหวี่ยงเอา *Saccharomycopsis* sp. YCY1 ออก เนื่องจากการไม่หมุนเหวี่ยงเอา *Saccharomycopsis* sp. YCY1 ออก พบว่าเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 จะไปแย่งใช้น้ำตาลเพื่อใช้ในการเจริญร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR5088 ทำให้ในชุดที่ไม่หมุนเหวี่ยงเอา *Saccharomycopsis* sp. YCY1 ออกจะได้ปริมาณโปรตีนสูงกว่าชุดที่เอาเชื้อ *Saccharomycopsis* sp. YCY1 ออก จึงน้ำตาลถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้น้อยลง ดังแสดงในภาพที่ 27

Abouzied และ Reddy (1986) เปรียบเทียบกระบวนการหมักเอทานอลแบบการใช้เชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *Aspergillus niger* กับ *Saccharomyces cerevisiae* โดยเปรียบเทียบการหมักในสภาวะที่ให้อากาศ สภาวะที่จำกัดปริมาณอากาศ และสภาวะไร้อากาศ พบว่าการผลิตเอทานอลแบบใช้เชื้อร่วมในระบบไร้อากาศจะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดคือ 1.59 กรัมต่อ100 มิลลิลิตรของอาหาร รองลงมาคือการเลี้ยงในระบบจำกัดปริมาณอากาศ และระบบให้อากาศ ซึ่งได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 1.34 และ 0.78 กรัมต่อ100 มิลลิลิตรของอาหาร ตามลำดับ

Abouzied และ Reddy (1987) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยเปรียบเทียบกระบวนการแบบใช้เชื้อเดี่ยวกับแบบใช้เชื้อร่วม โดยการปิดจุดฟลาสต์ด้วย air lock พบว่า การหมักแบบใช้เชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *S. fibuligera* กับเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* จะให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 17.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการหมักแบบใช้เดี่ยว ซึ่งได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 4.5 กรัมต่อลิตร

Verma และคณะ.(2000) ทำการผลิตเอทานอลจากแป้งโดยการเลี้ยงเชื้อยีสต์แบบ coculture ใช้เชื้อผสมระหว่างยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces diastaticus* กับ *Saccharomyces cerevisiae* 21 และเชื้อผสมระหว่าง *Endomycopsis capsularis* กับ *S. cerevisiae* 21 เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อแบบใช้เชื้อเดี่ยวในอาหารที่ประกอบด้วยแป้ง 60 กรัมต่อลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเลี้ยงเชื้อแบบใช้เชื้อร่วมให้ปริมาณเอทานอลสูงว่าแบบใช้เชื้อเดี่ยว และพบว่าการเลี้ยงเชื้อยีสต์ผสมระหว่างสายพันธุ์ *S. diastaticus* กับ *S. cerevisiae* 21 ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อยีสต์ผสมระหว่างสายพันธุ์ *E. capsularis* กับ *S. cerevisiae* 21 โดยให้ปริมาณเอทนอลสูงถึง 21.8 กรัมต่อลิตร และ 14.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 15 การผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยการหมักแบบใช้เชื้อร่วมและแบบแยกกระบวนการผลิต

Table 15. Ethanol production from cassava starch by coculture and two-stage of yeast.

			Ethanol (g/l)	Protein (g/l)	Residual starch (g/l)	Reducing sugar (g/l)
coculture	*Saccharomycopsis* sp. YCY1 + *P. anomala* YTB3	D	2.56±0.51	1.33±0.02	1.56±0.02	5.99±0.03
	Saccharomycopsis sp. YCY1 + *S. cerevisiae* TISTR5088	F	3.54±0.98	1.45±0.06	1.18±0.03	5.14±0.20
two-stage	*P. anomala* YTB3	K	1.18±0.00	1.87±0.17	1.83±0.08	6.10±0.33
	S. cerevisiae TISTR5088	J	2.80±0.00	1.74±0.15	1.91±0.05	3.66±0.26