

การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยการเพาะเลี้ยงร่วมระหว่าง  
จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกและเอทานอล



นายชยุตม์ อินตะยะ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ETHANOL PRODUCTION FROM GRAIN SORGHUM BY CO-CULTIVATION  
BETWEEN AMYLOLYTIC AND ETHANOL PRODUCING MICROORGANISM

Mr. Chayut Intaya



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยการเพาะเลี้ยงร่วม  
ระหว่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกและเอทานอล

โดย

นายชยุตม์ อินตะยะ

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ ธีระดากร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช)

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

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สาวิตร ตระกูลนำเลื่อมใส)

ชยุตม์ อินตะยะ : การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยการเพาะเลี้ยงร่วมระหว่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกและเอทานอล (ETHANOL PRODUCTION FROM GRAIN SORGHUM BY CO-CULTIVATION BETWEEN AMYLOLYTIC AND ETHANOL PRODUCING MICROORGANISM) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.ศิริลักษณ์ ธีระดากร, 134 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยการเพาะเลี้ยงร่วมระหว่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกและเอทานอล โดยใช้เมล็ดข้าวฟ่างเป็นวัตถุดิบในการผลิตเนื่องจากเป็นพืชทางเลือกที่สามารถทนทานต่อความแห้งแล้ง ให้ผลผลิตสูงถึง 3-4 ครั้งต่อปี และเป็นธัญพืชที่มีปริมาณแป้งสูง ศึกษาการเปลี่ยนแปลงในเมล็ดข้าวฟ่างที่ปรับสภาพด้วยความร้อนให้เป็นน้ำตาลโดยเปรียบเทียบจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก 3 สายพันธุ์ พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ของ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Basillus amyloliquefaciens* TISTR 1045 สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมงคือ 14.363 U/ml และ 7.475 U/ml ในขณะที่ *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033 คือ 1.688 U/ml การศึกษาหาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกด้วยวิธี Random block design (RBD) พบว่าการแปรผันปริมาณเมล็ดข้าวฟ่าง 15 เปอร์เซ็นต์กับแหล่งไนโตรเจน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) พบว่า *A. oryzae* TISTR 3086 และ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติกสูงสุด 18.003 และ 12.548 U/ml ตามลำดับ การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งแร่ธาตุด้วยวิธี Plakett-Burman และ Response surface method (RSM) พบว่าแร่ธาตุที่เหมาะสมของ *A. oryzae* TISTR 3086 คือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5.97 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.33 g/l,  $\text{CaCl}_2$  1.97 g/l และ  $\text{FeSO}_4$  0.14 g/l สำหรับ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 คือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  6.57 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.00 g/l,  $\text{MgSO}_4$  1.02 g/l และ  $\text{NaCl}$  2.53 g/l โดยที่จุดสมมูลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ 21.6304 และ 15.4807 U/ml ตามลำดับ จากนั้นใช้ภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลพบว่า *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 14.3244 g/l ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยการเพาะเลี้ยงร่วมกันด้วยวิธี Plakett-Burman และ RSM พบว่าจากการวิเคราะห์ทางสถิติ เวลาที่ลงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เวลา 23.8298 ชั่วโมงและปริมาณกล้าเชื้อ 15.1914 เปอร์เซ็นต์ จะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 16.1317 g/l ที่ชั่วโมงที่ 48 และเมื่อทำการทดลองทดสอบค่าที่จุดสมมูล พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด 16.6762 g/l คิดเป็นค่าผลผลิตต่อชั่วโมงได้ 0.3474 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

# # 5472204323 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: ETHANOL / FERMENTATION / CO-CULTIVATION / AMYLOLYTIC

CHAYUT INTAYA: ETHANOL PRODUCTION FROM GRAIN SORGHUM BY CO-CULTIVATION BETWEEN AMYLOLYTIC AND ETHANOL PRODUCING MICROORGANISM.

ADVISOR: SIRILUK TEERADAKORN, Ph.D., 134 pp.

This research was to study the production of ethanol by co-cultivation between amylolytic and ethanol producing microorganism. The grain sorghum used as a raw material in this study is an alternative crop that can withstand drought, yield up to 3-4 times a year and is a cereal with high starch content. The conversion of starch in the heat pretreated grain sorghum to sugar by 3 strains of amylolytic microorganisms was compared. The results showed that the optimal enzyme activity of *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 and *Bacillus amyloliquefaciens* TISTR 1045 at 24 hours were 14.363 U/ml and 7.475 U/ml, respectively, while *Saccharomyces fibuligera* TISTR 5033 was 1.688 U/ml. Study the optimal conditions for amylolytic production with Random block design (RBD), the amount of grain sorghum was 15 percent with a nitrogen source  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 percent for *A. oryzae* TISTR 3086 and *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045. The highest enzyme activity was 18.003 and 12.548 U/ml, respectively. Then Plakett-Burman method and Response surface method (RSM) were used for optimizing the type and quantity of mineral sources. The results showed that for *A. oryzae* TISTR 3086 was  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5.97 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.33 g/l,  $\text{CaCl}_2$  1.97 g/l and  $\text{FeSO}_4$  0.14 g/l, while for *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 was  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  6.57 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.00 g/l,  $\text{MgSO}_4$  1.02 g/l and  $\text{NaCl}$  2.53 g/l. The equivalent point represented the highest enzyme activity was 21.6304 and 15.4807 U/ml. respectively. Further study, the potential amylolytic producing strain was co-cultivation with ethanol producing microorganism. The result showed that at 48 hours, 14.3244 g/l of ethanol was obtained from co-cultivation between *A. oryzae* TISTR 3086 and *Saccharomyces cerevisiae*. The optimal co-cultivation condition was studied using Plakett-Burman method and RSM method. From the statistical analysis, the equivalent points; the time to inoculate *S. cerevisiae* at 23.8298 hour and the amount of inoculum of 15.1914 percent gave 16.1317 g/l of ethanol at 48 hours. The experiment was carried out for validation at the equivalent points the actual 16.6762 g/l ethanol and the 0.3474 grams per liter per hour of productivity were obtained.

Field of Study: Biotechnology

Student's Signature .....

Academic Year: 2014

Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาในหลักสูตรปริญญาโทบริหารธุรกิจ สาขาบริหารธุรกิจ ซึ่งสำเร็จ  
ลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์อย่างยิ่งจาก อาจารย์ ดร. ศิริลักษณ์ ธีระดากร ที่กรุณาได้รับเป็น  
อาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งได้ให้แนวความคิด คำแนะนำและ ข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการทำ  
วิจัยรวมทั้งตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์จึงขอขอบคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ รศ. ดร. พลกฤษณ์ แสงวงษ์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์  
ผศ. ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร และ ผศ. ดร. สาวิตร์ ตระกูลนำเลื่อมใส ที่กรุณาเป็น  
กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบคุณผู้บริหารสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ นักวิจัย  
เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่  
อุปกรณ์ สารเคมี ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆ ในการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณสุกัญญา พึ่งจะแย้ม สำหรับความช่วยเหลือและคำปรึกษาใน  
ห้องปฏิบัติการและ คุณการ์นต์ ตะระกาสำหรับการแนะนำปรึกษาการวิเคราะห์และออกแบบการ  
ทดลองทางด้านสถิติ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณพ่อและคุณแม่ที่คอยสนับสนุนและให้โอกาสทางการศึกษา  
ตลอดจนเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญรูปภาพ.....	4
อักษรย่อ.....	7
บทที่ 1 บทนำ .....	8
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา .....	8
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	9
1.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	10
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	10
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	11
2.1. เอทานอล.....	11
2.2 ข้าวฟ่าง.....	12
2.2.1 ประวัติและความสำคัญ .....	12
2.2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.....	13
2.2.3 องค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่าง.....	15
2.2.4 แป้งในเมล็ดข้าวฟ่าง .....	16
2.3 กระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล .....	18
2.4 การเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล .....	20
2.5 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก.....	21

2.5.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	21
2.5.2 <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> .....	22
2.5.3 <i>Aspergillus oryzae</i> .....	24
2.6 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล .....	26
2.6.1 <i>Zymomonas mobilis</i> .....	26
2.6.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	27
2.7 การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่าง .....	29
2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกและผลิตเอทานอล .....	30
2.9 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกและผลิตเอทานอล .....	33
2.9.1 การออกแบบการทดลองแบบสุ่มภายในบล็อก Random block design (RBD) .	33
2.9.2 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman .....	35
2.9.3 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Response surface methodology (RSM) ....	38
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	45
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	45
3.2 เคมีภัณฑ์.....	46
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	47
3.3.1 ปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างโดยวิธีการทางกายภาพ.....	47
3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ .....	47
3.3.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก .....	47
3.3.2.2 การเตรียมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตเอทานอล.....	48
3.3.3 สูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก .....	48
3.3.4 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์โดยการออกแบบการ ทดลองด้วยวิธีทางสถิติ.....	49



3.3.4.1	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์โดยการ ออกแบบการทดลองด้วยวิธี Random block design (RBD).....	49
3.3.4.2	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์ด้วยการแปร ผันแหล่งแร่ธาตุโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett- Burman .....	50
3.3.5	ผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก เพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล.....	52
3.3.6	ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก เพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทาง สถิติ .....	53
3.3.6.1	ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะ ไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการ ทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman.....	53
3.3.6.2	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดย การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Response surface methodology (RSM) .....	54
3.3.7	ทดสอบภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล.....	55
3.4	วิธีวิเคราะห์ต่างๆ .....	55
3.4.1	การวัดปริมาณน้ำตาลโดยใช้วิธี DNSA.....	55
3.4.2	การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมโลไลติก.....	55
3.4.3	การวิเคราะห์เอทานอล .....	56
3.4.4	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน .....	56
3.4.5	การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลทางสถิติ .....	56
บทที่ 4	ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล .....	57

4.1	ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกจากจุลินทรีย์ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา .....	57
4.2	ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์ด้วยวิธีทางสถิติ.....	58
4.2.1	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดยการออกแบบการทดลองแบบ ด้วยวิธี Random block design (RBD) .....	58
4.2.1.1	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ <u>A. oryzae</u> TISTR 3086 ด้วยวิธี RBD.....	58
4.2.1.2	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ <u>B. amyloliquefaciens</u> TISTR 1045 ด้วยวิธี RBD .....	61
4.2.2	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์โดยการออกแบบการ ทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman .....	63
4.2.2.1	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ <u>A. oryzae</u> TISTR 3086 ด้วยวิธี Plackett-Burman.....	63
4.2.2.2	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ <u>B. amyloliquefaciens</u> TISTR 1045 ด้วยวิธี Plackett-Burman .....	66
4.2.3	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Response surface methodology (RSM) .....	70
4.2.3.1	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ <u>A. oryzae</u> TISTR 3086 ด้วยวิธี RSM .....	70
4.2.3.2	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ <u>B. amyloliquefaciens</u> TISTR 1045 ด้วยวิธี RSM.....	74
4.3	ผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยง ร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล.....	78
4.3.1	ผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ <u>A. oryzae</u> TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <u>S. cerevisiae</u> .....	78

4.3.2	ผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Z. mobilis</i> TISTR 551 .....	79
4.3.3	ผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ <i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>S. cerevisiae</i> .....	80
4.3.4	ผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ <i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Z. mobilis</i> TISTR 551 .....	81
4.4	ศึกษาภาวะเหมาะสมการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีสถิติ.....	83
4.4.1	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman.....	83
4.4.2	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM.....	86
4.5	ทดสอบภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล .....	89
บทที่ 5	สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ .....	92
5.1	การผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา .....	92
5.2	ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ .....	92
5.2.1	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Random block designs (RBD).....	92
5.2.2	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman.....	93

5.2.3 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์ด้วยโดยการออกแบบ การทดลองด้วยวิธี RSM.....	93
5.3 ผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยง ร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล.....	94
5.4 ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิต เอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการ ทดลองด้วยวิธีทางสถิติ .....	94
5.5 ทดสอบภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิต เอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล .....	95
รายการอ้างอิง .....	98
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม .....	104
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ .....	106
ภาคผนวก ค ตารางสถิติ.....	110
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	134

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีในส่วนต่างๆของเมล็ดข้าวฟ่าง .....	16
ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างตารางการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ RBD.....	34
ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman .....	37
ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างการออกแบบการทดลองแบบ RSM .....	38
ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างการออกแบบการทดลองแบบ RSM .....	39
ตารางที่ 2.6 ตัวแปรที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ผลทางสถิติของกระบวนการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกจากจุลินทรีย์ .....	42
ตารางที่ 2.7 ตัวแปรที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ผลทางสถิติของกระบวนการผลิตเอทานอลจากจุลินทรีย์.....	44
ตารางที่ 3.1 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Random block design (RBD) โดยการแปรผันปริมาณแหล่งของคาร์บอนและชนิดของไนโตรเจนสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์.....	49
ตารางที่ 3.2 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman โดยการแปรผันชนิดของแร่ธาตุและระดับความเข้มข้นสำหรับผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์ .....	50
ตารางที่ 3.3 การออกแบบการทดลองแบบด้วยวิธี RSM โดยการแปรผันระดับความเข้มข้นของแร่ธาตุแต่ละชนิดสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์ .....	52
ตารางที่ 3.4 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman โดยการแปรผันชนิดของแร่ธาตุเวลาที่ทำการลงกล้าเชื้อ และปริมาณกล้าเชื้อ สำหรับภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล ..	53
ตารางที่ 3.5 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM โดยการแปรผันระดับความเข้มข้นของแต่ละตัวแปรสำหรับภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล.....	55

ตารางที่ 4.1 การผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดย <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 ด้วยการแปรผันปริมาณ แหล่งคาร์บอนและชนิดของแหล่งไนโตรเจน ที่เวลา 24 ชั่วโมง .....	60
ตารางที่ 4.2 การผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดย <i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045 ด้วยการแปร ผันปริมาณแหล่งคาร์บอนและชนิดของแหล่งไนโตรเจน ที่เวลา 24 ชั่วโมง .....	62
ตารางที่ 4.3 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman สำหรับภาวะเหมาะสมในการผลิต เอนไซม์อะไมโลไลติกของ <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 .....	63
ตารางที่ 4.4 ผลการทดลองการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman สำหรับภาวะ เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 .....	64
ตารางที่ 4.5 การออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี Plackett-Burman สำหรับภาวะเหมาะสมในการ ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ <i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045 .....	66
ตารางที่ 4.6 ผลการทดลองการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้วิธี Plackett-Burman สำหรับภาวะ เหมาะสมที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ <i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045.....	67
ตารางที่ 4.7 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM สำหรับภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ อะไมโลไลติกของ <i>A. oryzae</i> TISTR 3086.....	70
ตารางที่ 4.8 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 ด้วยการ วิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี RSM .....	71
ตารางที่ 4.9 ค่าระดับความเข้มข้นที่จุดสมมูลของภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก ของ <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 .....	72
ตารางที่ 4.10 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM สำหรับภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ อะไมโลไลติกของ <i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045.....	74
ตารางที่ 4.11 ภาวะที่เหมาะสมการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ <i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045 ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี RSM.....	75
ตารางที่ 4.12 ค่าระดับความเข้มข้นที่จุดสมมูลของภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก ของ <i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045 .....	76

ตารางที่ 4.13	สรุปการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก เพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลที่เวลาเริ่มลงเลี้ยงเชื้อที่ 0 ชั่วโมงและที่ 24 ชั่วโมง.....	82
ตารางที่ 4.14	การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman สำหรับภาวะเหมาะสมในการผลิต เอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> .....	83
ตารางที่ 4.15	ผลการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman สำหรับภาวะเหมาะสมในการ ผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> .....	84
ตารางที่ 4.16	การออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM สำหรับภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจาก เมล็ดข้าวฟ่างโดย <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>S. cerevisiae</i> .....	87
ตารางที่ 4.17	ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>S. cerevisiae</i> ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี RSM.....	87
ตารางที่ 4.18	ค่าระดับความเข้มข้นที่จุดสมมูลของภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าว ฟ่างโดย <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>S. cerevisiae</i> .....	88
ตารางที่ 4.19	การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>S. cerevisiae</i> เวลาที่ลงกล้าเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> ที่เวลา 23.8298 ชั่วโมง และปริมาณกล้า เชื้อ 15.1914 เปอร์เซ็นต์ .....	89

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างเอทานอล .....	11
รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบต่างๆของข้าวฟ่าง .....	15
รูปที่ 2.3 ส่วนประกอบต่างๆของเมล็ดข้าวฟ่าง.....	15
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของอะไมโลส .....	17
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของอะไมโลเพกติน .....	17
รูปที่ 2.6 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมโลไลติกชนิดต่างๆในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล .....	19
รูปที่ 2.7 กระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล .....	20
รูปที่ 2.8 รูปร่างลักษณะของแบคทีเรีย <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	21
รูปที่ 2.9 รูปร่างลักษณะของยีสต์ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> .....	22
รูปที่ 2.10 รูปร่างลักษณะของรา <i>Aspergillus oryzae</i> .....	24
รูปที่ 2.11 รูปร่างลักษณะของแบคทีเรีย <i>Zymomonas mobilis</i> .....	26
รูปที่ 2.12 ลักษณะเซลล์ของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	27
รูปที่ 2.13 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่าง .....	29
รูปที่ 2.14 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman.....	36
รูปที่ 2.15 กราฟ Contour plot แบบ 3 มิติของตัวแปร .....	40
รูปที่ 2.16 การวิเคราะห์ผลแบบ Central composite design (CCD) และ Box-Behnken design .....	41
รูปที่ 4.1 การผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกที่ระยะเวลาต่างๆโดย <i>A. oryzae</i> TISTR 3086, <i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045 และ <i>S. fibuligera</i> TISTR 5033.....	57
รูปที่ 4.2 การผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกที่ระยะเวลาต่างๆโดย <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 ด้วยการแปรผันปริมาณของแหล่งคาร์บอน (C) 5 (ก), 10 (ข) และ 15 (ค) เปอร์เซ็นต์ และชนิดแหล่งไนโตรเจน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ยูเรีย (U), (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (N), สารสกัดจากยีสต์ (Y) และ เปปโตน (P).....	59



รูปที่ 4.3 การผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกที่ระยะเวลาต่างๆโดย <i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045 ด้วยการแปรผันปริมาณของแหล่งคาร์บอน (C) 5 (ก), 10 (ข) และ 15 (ค) เปอร์เซ็นต์ และชนิดของแหล่งไนโตรเจน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ยูเรีย (U), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (N), สารสกัดจากยีสต์ (Y) และเปปโตน (P).....	61
รูปที่ 4.4 กราฟ Pareto ของ standardized effect กับตัวแปรต่างๆในภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดย <i>A. oryzae</i> TISTR 3086.....	65
รูปที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ ( $R^2$ ) ระหว่างผลที่ได้จากการทดลอง (Exp.) และผลที่ได้จากการทำนายของสมการ (Pred.) ของภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดย <i>A. oryzae</i> TISTR 3086.....	65
รูปที่ 4.6 กราฟ Pareto ของ standardized effect กับตัวแปรต่างๆในภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดย <i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045.....	68
รูปที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ ( $R^2$ ) ระหว่างผลที่ได้จากการทดลอง (Exp.) และผลที่ได้จากการทำนายของสมการ (Pred.) ของภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดย <i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045.....	68
รูปที่ 4.8 การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>S. cerevisiae</i> ที่เวลาเริ่มลงเลี้ยงเชื้อที่ 0 ชั่วโมงและที่ 24 ชั่วโมง.....	78
รูปที่ 4.9 การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Z. mobilis</i> TISTR 551 ที่เวลาเริ่มลงเลี้ยงเชื้อที่ 0 ชั่วโมงและที่ 24 ชั่วโมง.....	79
รูปที่ 4.10 การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ <i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>S. cerevisiae</i> ที่เวลาเริ่มลงเลี้ยงเชื้อที่ 0 ชั่วโมงและที่ 24 ชั่วโมง.....	80
รูปที่ 4.11 การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ <i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Z. mobilis</i> TISTR 551 ที่เวลาเริ่มลงเลี้ยงเชื้อที่ 0 ชั่วโมง และที่ 24 ชั่วโมง.....	81
รูปที่ 4.12 กราฟ Pareto ของ standardized effect กับตัวแปรต่างๆในภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>S. cerevisiae</i> .....	85

รูปที่ 4.13 แสดงความสัมพันธ์ ( $R^2$ ) ระหว่างผลที่ได้จากการทดลอง (Exp.) และผลที่ได้จากการทำนายของสมการ (Pred.) ของภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย <i>A. oryzae</i> TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>S. cerevisiae</i> .....	85
--	----



## อักษรย่อ

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



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

พลังงานเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อต้นทุนในการพัฒนาทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และ วัฒนธรรมของประเทศไทยในทุกด้าน เพราะทุกสิ่งล้วนแล้วแต่เกี่ยวข้องกับพลังงานแทบทั้งสิ้นไม่ว่าจะเป็นการดำเนินชีวิตประจำวัน การผลิตและขนส่งสินค้า เป็นต้น แต่ปัจจุบันประเทศไทยต้องพึ่งพาพลังงานจากฟอสซิลเป็นพลังงานหลักในการขับเคลื่อนระบบต่างๆ ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในแต่ละปี แต่ในทางกลับกันประเทศไทยผลิตพลังงานจากฟอสซิลได้เพียงร้อยละ 10 ของความต้องการใช้พลังงานในประเทศเท่านั้น ปัญหาการขาดแคลนพลังงานส่งผลให้ประเทศไทยมีต้นทุนทางด้านพลังงานที่สูงกว่าประเทศคู่แข่งทางการค้าเป็นจุดอ่อนของประเทศไทยในเวทีการค้าระหว่างประเทศ แม้ว่าในทุกวันนี้กระแสโลกจะมองว่าพลังงานฟอสซิลคือตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะโลกร้อน แต่ก็ไม่มีทางเลือกการใช้พลังงานจากฟอสซิลได้ ดังนั้นพลังงานทดแทนหรือพลังงานทางเลือกจึงมีการศึกษาและพัฒนาค้นคว้าเพื่อใช้เป็นพลังงานที่สะอาด ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมหรือมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุด เช่น พลังงานลม พลังแสงอาทิตย์ พลังงานน้ำ พลังงานความร้อนใต้พิภพ พลังงานจากชีวมวล เป็นต้น ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศที่มีผลผลิตทางการเกษตรต่อปีมาก ดังนั้นพลังงานจากชีวมวลจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถลดต้นทุนการผลิตได้เป็นอย่างดี

เอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่เกิดจากหมักชีวมวล เช่น การหมักพืช เศษซากพืช โดยเปลี่ยนแป้งจากพืชให้เป็นน้ำตาลแล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์อีกครั้ง โดยในการบวนการหมักนิยมใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตที่สูงและสามารถทนทานต่อเอทานอลได้ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* และ *Zymomonas mobilis* เป็นต้น แอลกอฮอล์ที่ทำให้บริสุทธิ์จะเรียกว่าเอทานอล เมื่อนำไปใช้ผสมกับน้ำมันเบนซินเรียกว่าแก๊สโซฮอล์ ถ้าผสมกับน้ำมันดีเซลเรียกว่าดีเซลโซฮอล์และสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้

ข้าวฟ่างเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของคนและสัตว์ เมล็ดข้าวฟ่างเป็นธัญพืชที่สำคัญรองจากข้าว ข้าวสาลีและข้าวโพด ข้าวฟ่างเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในดินแทบทุกชนิดในเขตร้อนชื้น ใช้น้ำในการเพาะปลูกน้อยและมีความต้านทานชีวภาพสูง ข้าวฟ่างจึงเป็นวัตถุดิบทางการเกษตรที่น่าสนใจสำหรับการผลิตเอทานอลเพราะมีปริมาณแป้งในเมล็ดสูง เป็นพืชที่สามารถทนความแห้งแล้งมากกว่าธัญพืชอื่นๆ การผลิตเอทานอลจะเริ่มโดยกระบวนการเปลี่ยนแป้งในเมล็ดข้าวฟ่างให้เป็นน้ำตาล โดย

การปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างด้วยการบด ให้มีขนาดเล็ก เติมน้ำหรือสารเคมี และให้ความร้อนจนทำให้แป้งมีพันธะไฮโดรเจนลดลง จากนั้นสารละลายแป้งจะถูกย่อยต่อโดยอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส จนได้เป็นน้ำตาลกลูโคส (1) โดยกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลสามารถใช้เอนไซม์ทางการค้า และเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะเรียกว่า เอนไซม์อะไมโลไลติก มีชื่อทางการค้าที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม เช่น Termamyl120L™, Alpha-amylase, G-zyme G995, Thermalase™ เป็นต้น มีราคาค่อนข้างสูง (2)

จุลินทรีย์หลายกลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกได้แก่ กลุ่มของแบคทีเรียเช่น *Bacillus amyloliquefaciens* และ *B. licheniformis* เป็นต้น กลุ่มของยีสต์เช่น *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Schwanniomyces occidentalis* เป็นต้น และ กลุ่มของรา เช่น *Aspergillus niger* และ *A. oryzae* เป็นต้น โดยมีการศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก ได้แก่ แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนและแร่ธาตุต่างๆ เช่น เหล็ก คอปเปอร์ แมกนีเซียม โซเดียม แคลเซียม โพแทสเซียม เป็นต้น (3) ขั้นตอนต่อไปคือการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล การหมักเกิดขึ้นโดยกระบวนการหมักแบบอโรซิซึมในยีสต์และแบคทีเรียบางชนิด จุลินทรีย์เหล่านี้เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทั่วไปกระบวนการหมักเอทานอลโดยจุลินทรีย์ ได้แก่ พวกยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้กันทั่วไป สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูง ง่ายต่อการเพาะเลี้ยง และยังเป็นแหล่งของโปรตีนเซลล์เดี่ยวด้วย และกลุ่มของพวกแบคทีเรีย เช่น *Zymomonas mobilis* ซึ่งมีข้อดีคือเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่สูง (4)

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลมีหลายชนิดเช่น กากน้ำตาล มันสัมปะหลัง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง อ้อย หัวบีท หรือพวกชีวมวลต่างๆจากผลผลิตทางการเกษตร กระบวนการผลิตเอทานอลแบ่งได้เป็น 2 แบบได้แก่ กระบวนการหมักที่แยกกันระหว่างกระบวนการย่อยวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลและการหมักเอทานอล (Separate hydrolysis and fermentation ; (SHF)) หรือกระบวนการหมักที่มีการย่อยวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลร่วมกับการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; (SSF)) เพื่อลดต้นทุนการผลิตการเลือกใช้วัตถุดิบ จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกและจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล รวมถึงภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยการเพาะเลี้ยงร่วมระหว่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกและเอทานอล

### 1.3 วิธีดำเนินการวิจัย

1.3.1 ศึกษาในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา

1.3.2 ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์ด้วยวิธีทางสถิติ

1.3.2.1 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Random block designs (RBD)

1.3.2.2 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman

1.3.2.3 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์ด้วยโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Response surface methodology (RSM)

1.3.3 ผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

1.3.4 ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

1.3.4.1 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman

1.3.4.2 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM

1.3.5 ทดสอบภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

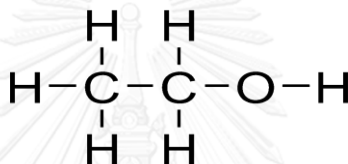
ภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงร่วมระหว่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกและเอทานอล

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1. เอทานอล

เอทานอล หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) มีสูตรโครงสร้างคือ  $C_2H_5OH$  ดังแสดงในรูปที่ 2.1 เป็นสารประกอบอินทรีย์มีคุณสมบัติเป็นของเหลวไม่มีสี จุดไฟติด ระเหยได้ง่าย มีจุดเดือดที่ 78 องศาเซลเซียส มวลโมเลกุล 46.07 กรัมต่อโมล ความหนาแน่น 0.789 กรัมต่อลูกบาศก์เมตร เอทานอลบริสุทธิ์มีแอลกอฮอล์ประมาณ 99.5 เปอร์เซ็นต์ หรือมีน้ำเจือปนได้ไม่เกิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายน้ำได้ดี ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ได้เช่น เมทิลแอลกอฮอล์ อีเทอร์ คาร์บอนเตตระคลอไรด์ คลอโรฟอร์ม เป็นต้น



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างเอทานอล

กระบวนการผลิตการผลิตเอทานอลแบ่งได้ 2 วิธี คือ

1. การใช้กระบวนการทางเคมี เป็นการสังเคราะห์เอทานอล (Chemical synthesis) โดยใช้เอทิลีน (Ethylene) ที่เป้นผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเลียมเป็นวัตถุดิบ โดยการย่อยสลายพันธะคู่ด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาและอุณหภูมิสูง เอทานอลที่ผลิตโดยวิธีนี้ไม่สามารถนำมาบริโภคได้

2. การใช้วิธีการทางชีวเคมีเพื่อผลิตเอทานอล หรือที่เรียกว่า ไบโอเอทานอล (Bioethanol) โดยใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบคือ

วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ธัญพืช ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น

วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล ปิตรูต ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น

วัตถุดิบประเภทเส้นใย ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น

## 2.2 ข้าวฟ่าง

### 2.2.1 ประวัติและความสำคัญ

จากหลักฐานทางโบราณคดีที่ค้นพบข้าวฟ่างน่าจะมีถิ่นกำเนิดทางตะวันออกเฉียงเหนือในทวีปแอฟริกา มนุษย์รู้จักข้าวฟ่างมาไม่น้อยกว่า 5,000 ปี เพราะมีรายงานจากหลักฐานว่า มีผู้นำข้าวฟ่างจากภาคตะวันออกของทวีปแอฟริกาไปปลูกในอินเดีย เมื่อประมาณ 1725 ปีก่อนคริสต์ศักราช แต่แหล่งกำเนิดของข้าวฟ่างจากพันธุ์ป่าดั้งเดิมมาเป็นพันธุ์เพาะปลูกนั้นสันนิษฐานว่า คงจะเริ่มมาจากแถบประเทศเอธิโอเปีย เพราะในแถบนั้นมีพืชจำพวกข้าวฟ่างกระจายตัวอยู่อย่างมากมายหลายชนิด การแพร่กระจายของข้าวฟ่างจากถิ่นเดิมในทวีปแอฟริกาไปยังส่วนต่างๆของโลกนั้น เกิดจากชาวเรือที่เดินทางระหว่างทวีปแอฟริกา ตะวันออกกลาง และอินเดีย การนำข้าวฟ่างพวกนี้เข้าสู่ประเทศไทยนั้นไม่ทราบแน่ชัดว่า แต่สันนิษฐานว่า เป็นข้าวฟ่างคั่ว พวกข้าวฟ่างทางข้าง ซึ่งส่วนใหญ่จะปลูกกันตามครัวเรือนของพวกชาวเขาเป็นผู้นำเข้ามา เพื่อใช้คั่วรับประทาน ปัจจุบันพบว่า ข้าวฟ่างใช้เป็นอาหารนก ใช้คั่วและเปียกเป็นขนมรับประทานในหมู่คนไทยในชนบททั่วไป ใช้คั่วขงน้ำรับประทาน เช่นเดียวกับลูกเดือย แต่ข้าวฟ่างที่เห็นทั่วไปในปัจจุบันโดยปลูกกันมากกว่าข้าวฟ่างชนิดอื่นๆนำเข้ามาจากสหรัฐอเมริกา เพื่อปลูกในประเทศไทยครั้งแรกเมื่อประมาณ พ.ศ. 2494 เพื่อนำส่วนต้นมาใช้เลี้ยงสัตว์เป็นพวกข้าวฟ่างเฮกการ์ตันเตี้ย แต่เมื่อปลูกแล้วปรากฏว่าให้ผลผลิตเมล็ดดี และเมล็ดใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ดีด้วยจึงคัดพันธุ์ไว้เพื่อปลูกเป็นข้าวฟ่างเมล็ด และแพร่หลายโดยเกษตรกรในชื่อพันธุ์ทับทรวงต้นเตี้ย

การใช้ประโยชน์จากข้าวฟ่าง เมล็ดข้าวฟ่างเป็นแหล่งอาหารโดยตรงที่สำคัญของมนุษย์ในหลายประเทศโดยเช่น ประเทศในทวีปแอฟริกา ประเทศอินเดีย และจีน การบริโภคข้าวฟ่างโดยตรงเป็นอาหารหลักทำโดยหุงต้มคล้ายข้าว หรือบริโภคผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ทำจากแป้งข้าวฟ่าง นอกจากนี้ ยังใช้ทำเป็นอาหารสัตว์ได้ดีอีกด้วยเพราะเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวโพด ข้าวฟ่างมีข้อได้เปรียบที่ราคาถูกกว่า แม้ว่าข้าวฟ่างจะมีไขมันน้อยกว่าข้าวโพดเล็กน้อย แต่ถ้าเป็นพันธุ์ข้าวฟ่างที่ดีมีคุณค่าอาหารใกล้เคียงกับข้าวโพดจะมีความคุ้มค่าทางด้านต้นทุนการผลิตมากกว่า ต้นและใบของข้าวฟ่างบางชนิด ใช้ทำหญ้าแห้งเลี้ยงสัตว์ และหญ้าหมักได้เป็นอย่างดีเช่น หญ้าอัลมัม หญ้าชูแดกซ์ เป็นต้น ข้าวฟ่างหวาน หรือซอร์โก มีน้ำตาลในลำต้นมากสามารถหีบเอาน้ำหวานไปทำน้ำตาล ทำน้ำเชื่อม หรือนำไปหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ ข้าวฟ่างไม้กวาด ใช้ประโยชน์จากช่อดอกโดยการนำเอาก้านช่อดอกมาทำไม้กวาด และแปรงทาสีได้ นอกจากนี้แล้วข้าวฟ่างยังใช้ในอุตสาหกรรมต่อเนื่องอีกหลายชนิด เช่น แป้งข้าวฟ่าง ใช้ในอุตสาหกรรมทำไม้อัด ทำกาบ ทำกระดาษ ทำผ้า และทำแอลกอฮอล์ ข้าวฟ่างบางพันธุ์ เมล็ดมีรสขมฝาด ก็สามารถนำมาหมักเป็นเบียร์และเหล้าได้



## 2.2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ข้าวฟ่างมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sorghum bicolor* (L.) Moench จัดเป็นพืชตระกูลหญ้า ลำต้นเดี่ยว แต่อาจจะแตกกอหรือหน่อได้ขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์ของข้าวฟ่าง โดยทั่วไปข้าวฟ่างพันธุ์ที่ใช้ประโยชน์จากเมล็ดจะไม่มีแตกหน่อ เว้นแต่ต้นเดิมหรือยอดถูกทำลายไปก็จะมีการแตกหน่อขึ้นมาใหม่ทดแทน ข้าวฟ่างส่วนมากเป็นพืชฤดูเดียวหรือล้มลุกคือ ออกดอกให้เมล็ดแล้วจะก็ตายไป แต่มีข้าวฟ่างหลายพันธุ์ที่สามารถอยู่ข้ามปีได้ โดยการแตกกอจากต้นเดิม ข้าวฟ่างเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนและในดินแทบทุกชนิด ตั้งแต่ดินทราย ดินร่วนปนทราย จนถึงดินเหนียว แต่ดินที่เหมาะสมสำหรับปลูกข้าวฟ่างให้ได้ผลผลิตสูง ควรเป็นดินร่วนเหนียวที่มีการระบายน้ำดี มีความเป็นกรดต่ำ อยู่ระหว่าง 5.0 ถึง 7.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและสร้างเมล็ดของข้าวฟ่างจะอยู่ระหว่าง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส ต้องการปริมาณน้ำฝนตลอดฤดูปลูกประมาณ 320 ถึง 800 มิลลิเมตร ส่วนประกอบที่สำคัญของข้าวฟ่างมีดังรูปที่ 2.2 คือ

รากข้าวฟ่างมีระบบรากฝอย (Fibrous root system) รากที่เกิดจากเมล็ดโดยตรงมีรากเดี่ยว และจะมีรากเล็กๆ แตกออกมาจากรากนี้ เรียกว่ารากแขนง เมื่อต้นอ่อนของข้าวฟ่างใช้อาหารจากคัพภะ หรือเอ็มบริโอ (Embryo) จนหมดจะเริ่มมีรากเป็นจำนวนมาก แตกออกจากข้อของลำต้นที่อยู่ใต้ดิน ซึ่งจะแผ่ออกไปอย่างกว้างขวางทั้งแนวราบ และแนวลึก รากของข้าวฟ่างนี้มีปริมาณมากกว่ารากข้าวโพดประมาณสองเท่า นอกจากนี้แล้วตรงปลายรากชั้นในยังมีสารประกอบพวกซิลิกาอยู่ด้วย ทำให้รากข้าวฟ่างแข็งแรงสามารถชอนไชไปในดินได้ดีกว่ารากข้าวโพด จึงทนทานต่อความแห้งแล้งได้ดีกว่า ตรงข้อเหนือดินอาจมีรากแตก ออกมา รากพวกนี้เป็นรากที่ช่วยในการค้ำจุนลำต้นไม่ให้ล้มง่าย

ลำต้นข้าวฟ่างมีความสูงแตกต่างกัน ตั้งแต่ 45 เซนติเมตร ถึงกว่า 4 เมตร แต่ข้าวฟ่างที่นิยมปลูกกันทั่วไป จะมีลำต้นสูงประมาณ 1 ถึง 2 เมตร มีเส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้นอยู่ระหว่าง 5 มิลลิเมตร ถึง 3 เซนติเมตร ลำต้นจะเจริญเติบโตตั้งตรงเหมือนพืชทั่วไป ลำต้นจะมีข้อ ปล้อง ใบ และกาบใบ ห่อหุ้มอยู่ ทุกๆ ข้อของต้นจะมีตา แต่จะไม่มีมีการเจริญ ยกเว้นตาตรงข้อต่ำสุด ที่จะเจริญเป็นหน่อหรือกอ และกิ่งก้าน ซึ่งจะกลายเป็นต้นใหม่ได้ ลำต้นของข้าวฟ่างค่อนข้างแข็ง ภายในลำต้น จะมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ มีรูอยู่ตรงแกนกลาง บางพันธุ์มีน้ำ ซึ่งอาจมีรสหวานหรือไม่มีรสเลย และบางพันธุ์อาจแห้ง

ใบ ข้าวฟ่างที่ปลูกอยู่ทั่วไป มีใบอยู่ระหว่าง 7 ถึง 24 ใบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อม ใบอ่อนของข้าวฟ่างตั้งตรง ขณะที่ใบแก่โค้งลง ใบจะเกิดตามข้อ และสลับด้านกันไปตลอดลำต้น ใบแก่มีความยาวของใบตั้งแต่ 30 ถึง 135 เซนติเมตร ความกว้างของใบอยู่ระหว่าง 1.5 ถึง 15 เซนติเมตร ใบมีลักษณะเป็นรูปใบหอก หรือใบหอกเรียวๆ ขอบใบอาจมีลักษณะเรียบ

ตลอด หรือเป็นคลื่น ใบอ่อนขอบใบจะสามมือ และใบแก่จะเรียบสั้น บนเส้นกลางใบใกล้กับฐานใบ จะมีขนสั้นๆ ส่วนที่ผลิตซีฟิ่ง จะอยู่ตรงบริเวณข้อต่อของเส้นกลางใบกับกาบใบ

กาบใบจะหุ้มอยู่รอบต้นโดยซ้อนวน เริ่มจากขวาทับซ้าย แล้วซ้ายทับขวา กาบใบอาจมีความยาวตั้งแต่ 15 ถึง 35 เซนติเมตร ด้านหน้าของกาบใบ อาจมีซีฟิ่งปกคลุมอยู่ตรงฐานหรือโคนของกาบใบ ส่วนที่ติดกับข้อจะมีแถบขนสั้นๆ สีขาวติดอยู่ด้วย

ช่อดอกข้าวฟ่างเกิดจากปล้องบนสุดของต้น ซึ่งจะเป็นปล้องที่ยาวที่สุดด้วย ช่อดอกประกอบด้วย ก้านช่อดอก แกนกลางของช่อดอก กิ่งแขนง และกิ่งย่อยช่อดอก ซึ่งเป็นที่เกิดของดอกและเมล็ด ดอกของข้าวฟ่างมีอยู่ 2 ชนิด ชนิดแรกเป็นดอกที่ไม่มีก้าน ซึ่งเป็นดอกสมบูรณ์เพศ และจะพัฒนาไปเป็นเมล็ด ดอกอีกชนิดหนึ่ง เป็นดอกที่มีก้านดอก ดอกชนิดนี้จะเป็นหมัน มีแต่เกสรตัวผู้เท่านั้น ช่อดอกของข้าวฟ่างจะมีลักษณะหลวมหรือแน่น สั้นหรือยาว และอาจตั้งตรงหรือโค้ง ขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์ ของข้าวฟ่าง พวกข้าวฟ่างไม้กวาด หญ้าชูดาน และข้าวฟ่างหวานบางพันธุ์ มักจะมีช่อดอกหลวมมาก ส่วนข้าวฟ่างเมล็ด โดยทั่วไป มักจะมีช่อดอกแน่น และมีจำนวนเมล็ดมากกว่า จำนวนดอกสมบูรณ์ในแต่ละช่อดอก อาจมีถึง 6,000 ดอก ปกติแล้ว การบานของดอกข้าวฟ่างตลอดทั้งช่อดอก ใช้เวลาประมาณ 6 ถึง 9 วัน ในท้องถิ่นที่มีอากาศเย็นอาจใช้เวลานานกว่านั้น โดยธรรมชาติข้าวฟ่างเป็นพืชผสมตัวเอง คือ เกสรตัวผู้ผสมกับเกสรตัวเมียภายในต้นเดียวกัน แต่อาจจะมีการผสมข้ามโดยเกสรตัวผู้จากต้นหนึ่ง ไปผสมกับเกสรตัวเมียของอีกต้นหนึ่ง โดยลมหรือแมลง

ผลและเมล็ดเป็นแบบที่มีเยื่อหุ้มผล (Pericarp) ติดอยู่กับส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด มีเปลือกหุ้มผลหรือเมล็ด เมล็ดประกอบด้วยคัพภะ (Embryo) และเอนโดสเปิร์ม (endosperm) คัพภะประกอบด้วยส่วนของแรติเคิล พลูมูล ใบเลี้ยงที่ไม่มีการพัฒนา และเนื้อเยื่อที่กั้นระหว่างคัพภะกับเอนโดสเปิร์ม บริเวณรอบนอกของเอนโดสเปิร์มมีชั้นของเนื้อเยื่อห่อหุ้มโดยรอบเรียกว่า aleurone layer เมล็ดเกิดจากเกสรตัวผู้และตัวเมียพัฒนาเป็นผลแบบผลธัญพืช ผลมีขนาดเล็ก ค่อนข้างกลม ยาวประมาณ 1.ถึง.2 มิลลิเมตร

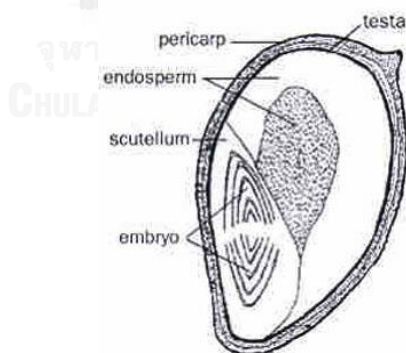


รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบต่างๆของข้าวฟ่าง

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

### 2.2.3 องค์ประกอบของเมล็ดข้าวฟ่าง

องค์ประกอบทางเคมีในส่วนของเมล็ดข้าวฟ่างมีลักษณะคล้ายกับเมล็ดธัญพืชทั่วไป ส่วนเมล็ด (Whole grain) ประกอบไปด้วย รำ (Bran) ส่วนเนื้อเมล็ด (Horny) และเอนโดสเปิร์ม (Endosperm) (5) แสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ส่วนประกอบต่างๆของเมล็ดข้าวฟ่าง

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีในส่วนต่างๆของเมล็ดข้าวฟ่าง

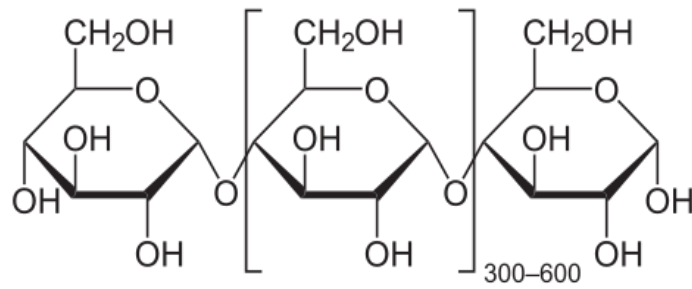
Component Part of sorghum	Whole Grain	Bran	Horny	Endosperm Starch	Endosperm Germ
%Proportion of sorghum	100	5.5	54.7	28.7	11.1
%Starch	68.52	1.6	72.24	82.5	1.53
% Protein	13.99	7.08	15.11	8.91	20.84
%Nitrogen free Extract	78.72	70.16	83.49	89.29	40.67
% Ash	1.89	3.07	0.56	0.71	9.46
% Fiber (crude)	1.93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

## 2.2.4 แป้งในเมล็ดข้าวฟ่าง

เมล็ดข้าวฟ่างมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแป้ง 60 ถึง 75 เปอร์เซ็นต์และโปรตีนร้อยละ 8 ถึง 16 เปอร์เซ็นต์ (ตามตารางที่ 2.1) โดยปริมาณองค์ประกอบทางเคมีจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ และสภาพการเพาะปลูก (6) แป้งในเมล็ดข้าวฟ่างเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีกลูโคสเป็นพอลิเมอร์ โดยที่แต่ละโมโนเมอร์ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic bond) ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 1 กับด้านปลายของหมู่แอลดีไฮด์ (Aldehyde group) ที่เรียกว่า reducing end ประกอบไปด้วย คาร์บอน ไฮดรเจน และออกซิเจนที่มีสูตรทางเคมี คือ  $(C_6H_{10}O_5)_n$  แป้งโดยทั่วไปที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคสจะมีโครงสร้าง 2 แบบ คือ พอลิเมอร์สายตรง (Amylose) และพอลิเมอร์สายกึ่ง (Amylopectin)

### อะไมโลส

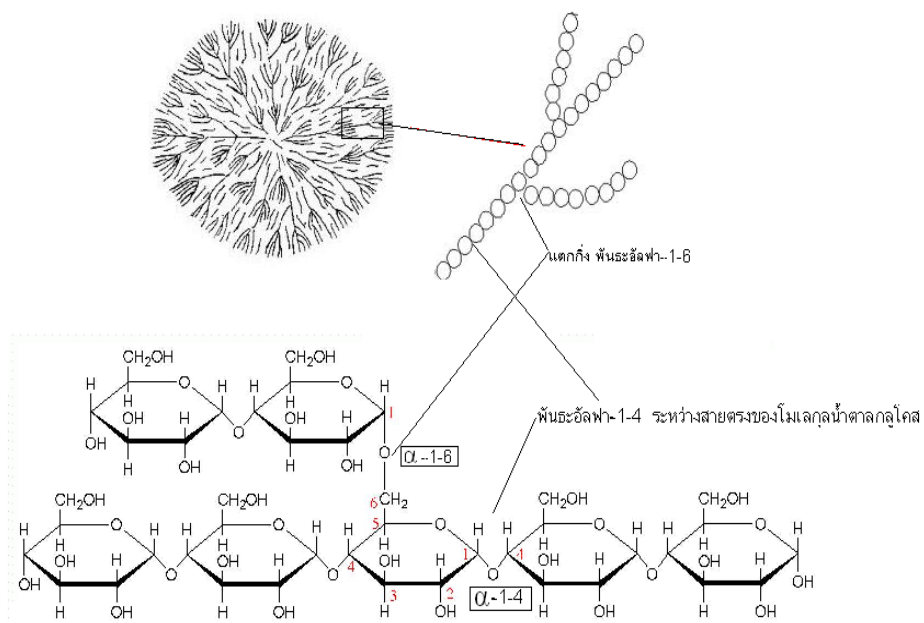
อะไมโลส โมเลกุลเป็นพอลิเมอร์สายตรงของน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic bond) ชนิด แอลฟา-1,4 ประมาณ 200-2,000 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ  $10^5$  ถึง  $10^6$  ดาลตัน ขนาดและน้ำหนักโมเลกุลของอะไมโลส มีผลมาจาก Degree of Polymerization (DP) ของอะไมโลสที่แตกต่างกันแปรผันตามแหล่งชนิดของแป้ง พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) ชนิดนี้มีอยู่ในโครงสร้างแป้งทั้งหมดประมาณ 20 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ (7) ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของอะไมโลส

### อะไมโลเพกติน

อะไมโลเพกติน เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทโฮมโพลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharide) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเม็ดแป้ง (Starch granule) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส (Glucose) ที่จัดเรียงตัวเป็นสายตรงและสายกิ่ง โดยพันธะไกลโคซิดิกสองแบบ คือส่วนที่เป็นพันธะสายตรง เป็นพันธะชนิดแอลฟา-1-4 เหมือนกับอะไมโลส และส่วนที่เป็นสายแขนงจะเชื่อมต่อด้วยพันธะแอลฟา-1-6 อะไมโลเพกตินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,000 เท่าของอะไมโลส คือ ประมาณ  $10^7$  ถึง  $10^9$  ดาลตัน (8) ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของอะไมโลเพกติน

## 2.3 กระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล

กระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์ โดยเรียกเอนไซม์ในกลุ่มนี้ว่า เอนไซม์อะไมโลไลติก ประกอบไปด้วยการย่อย 2 ขั้นตอน คือ การทำแป้งให้เหลว (Liquefaction) และ การย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (Saccharification) ดังรูป 2.6

### การทำแป้งให้เหลว (Liquefaction)

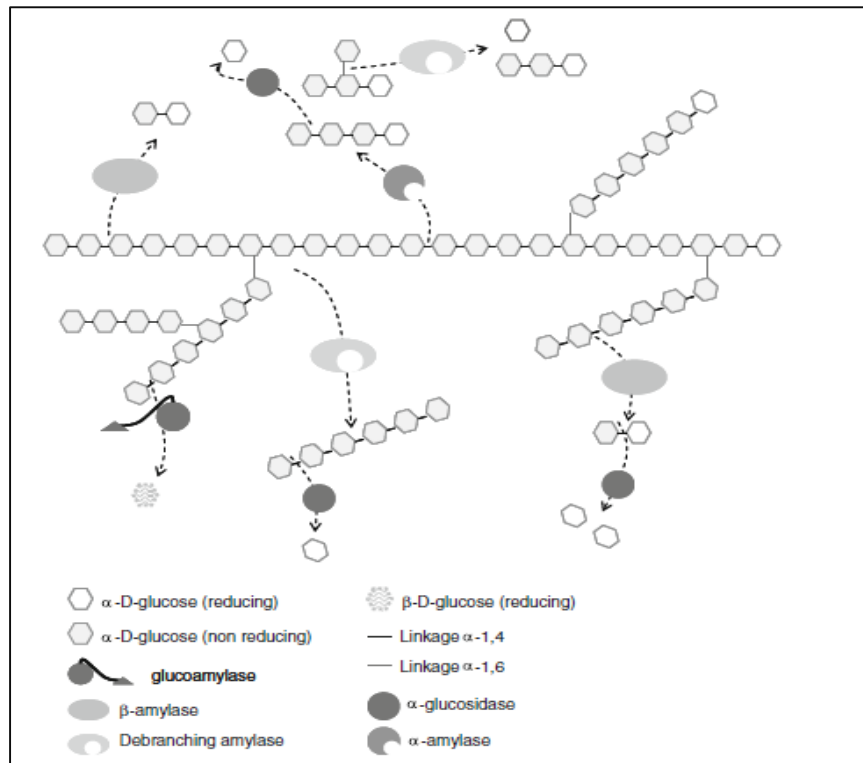
การทำแป้งให้เหลวต้องให้ความร้อนเพื่อให้พันธะไฮโดรเจนในแป้งลดลง น้ำถูกดูดซึม เม็ดแป้งเกิดการพองตัว ความหนืดสูงขึ้น (Gelatinization) จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์ในกลุ่มแรกคือ เอนโดอะไมเลส (Endo-amylase) จะกระตุ้นให้เกิดการสลายในพันธะแอลฟา-1,4 ในอะไมโลส อะไมโลเพกทินและโอลิโกเต็กทิน ที่อุณหภูมิเหมาะสมประมาณ 60 ถึง 90 องศาเซลเซียส pH 6.7 ถึง 7.0 ทำให้พอลิแซ็กคาไรด์สายยาวเป็นสายที่สั้นขึ้นเรียกว่า เด็กซ์ทิน (Dextrin) เอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส ( $\alpha$ -amylase) (9) มีโครงสร้างดังรูป 2.7

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มนี้ส่วนมากเป็นพวกแบคทีเรีย เช่น *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. Licheniformis*, *B. stearothermophilus* และ *B. subtilis* เป็นต้น (10)

### การย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (Saccharification)

การเปลี่ยนเด็กซ์ทินหรือพอลิแซ็กคาไรด์สายสั้นให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โดยเอนไซม์ในกลุ่มที่สองคือ เอ็กโซอะไมเลส (Exo-amylase) ได้แก่ เบต้าอะไมเลส ( $\beta$ -amylase) (รูปที่ 2.8) แอลฟาไกลูโคอะไมเลส ( $\alpha$ -glucoamylase) กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) และเบต้ากาแล็กโตซิเดส ( $\beta$ -galactosidase) โดยเอนไซม์เหล่านี้จะสลายพันธะแอลฟา-1,4 และแอลฟา-1,6 ที่อุณหภูมิเหมาะสมประมาณ 60 องศาเซลเซียส pH 4.0 ถึง 5.0 และกลุ่มเอนไซม์กลุ่มสุดท้าย ดีบรานชิ่งอะไมเลส (Debranching amylase) ได้แก่ พุลูลาเนส (Pullulanase) ไอโซอะไมเลส (Iso-amylase) จะการสลายพันธะแอลฟา-1,6 ของพอลิแซ็กคาไรด์สายที่เป็นกิ่ง ที่อุณหภูมิเหมาะสมต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียสที่ pH 3.0 ถึง 4.0

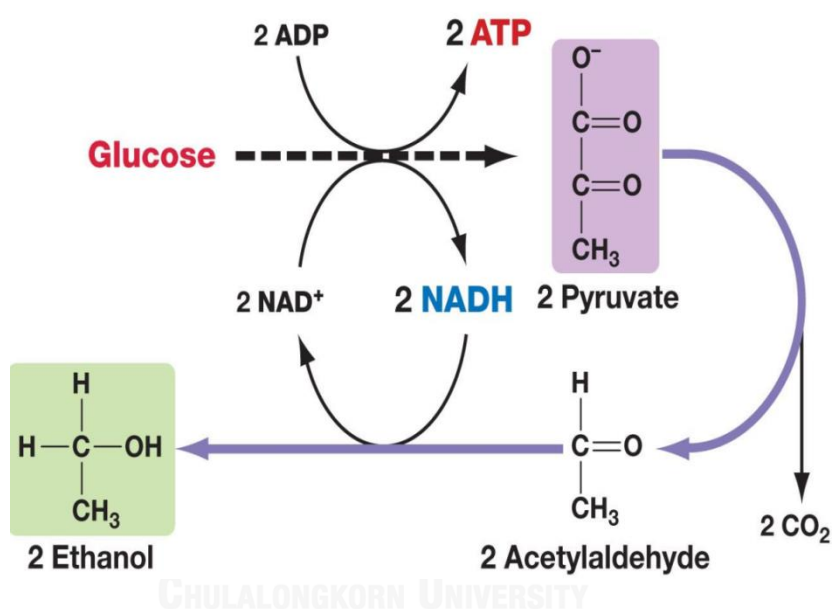
จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่พวกยีสต์ เช่น *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Schwanniomyces occidentalis* พวกรา เช่น *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Rhizopus sp.*, *R. niveus* และ *R. oryzae*. (11)



รูปที่ 2.6 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมโลไลติคชนิดต่างๆในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (12)

## 2.4 การเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล

เป็นกระบวนการสลายกลูโคสซึ่งมีคาร์บอน 6 อะตอมให้อยู่ในรูปของกรดไพรูวิก (Pyruvic acid) ซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม จำนวน 2 โมเลกุล กระบวนการไกลโคลิซิสเกิดขึ้นบริเวณไซโทซอลมีหลายขั้นตอน แต่ละขั้นตอนมีเอนไซม์ต่างชนิดกันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เริ่มด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กลูโคส โดยใช้ ATP 2 โมเลกุล ผลของปฏิกิริยาที่ได้จากการสลายกลูโคส 1 โมเลกุล ในกระบวนการไกลโคลิซิสจะทำให้มีการปลดปล่อย ATP ออกมา 4 โมเลกุล และมีการสร้าง NADH อีก 2 โมเลกุล ด้วย ผลลัพธ์สุทธิของ ATP ที่ได้จากการกระบวนการไกลโคลิซิสจึงเท่ากับ 2 โมเลกุล (13) ดังภาพที่ 2.7



รูปที่ 2.7 กระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล (14)

น้ำตาลกลูโคส 100 กรัม จุลินทรีย์จะหมักกลูโคสให้เปลี่ยนไปเป็นเอทานอล 51.1 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 กรัม โดยประมาณ แต่ในทางทฤษฎีน้ำตาลสามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้จริงเพียง 95 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นและน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ จะเหลือให้จุลินทรีย์ได้ใช้ในการเจริญเติบโต (15)

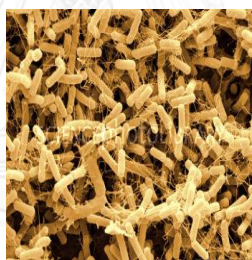


## 2.5 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก

2.5.1 *Bacillus amyloliquefaciens* เป็นจุลินทรีย์พวก prokaryote ในกลุ่ม bacteria ดำรงชีวิตในลักษณะเซลล์เดี่ยว (Unicellular organism) การสืบพันธุ์โดยการแบ่งตัว (Binary fission) และมีการสร้าง สปอร์ด้วย (16)

อนุกรมวิธานของ *Bacillus amyloliquefaciens*

Kingdom	:	Bateria
Phylum	:	Firmictes
Class	:	Bacilli
Order	:	Bacillales
Family	:	Bacillsceae
Genus	:	<i>Bacillus</i>
Species	:	<i>amyloquefaciens</i>



รูปที่ 2.8 รูปร่างลักษณะของแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens*

ลักษณะทางกายภาพและสรีรวิทยาของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens*

ลักษณะเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์มีลักษณะเป็น โข้ยาว มี peritrichous flagella ช่วยในการเคลื่อนที่แตกต่างจาก *Bacillus* สายพันธุ์อื่น ๆ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ ที่อยู่ระหว่าง 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส สามารถสร้างสปอร์ได้ การสร้างสปอร์ช่วยให้อยู่รอดได้เป็นเวลานาน *B. amyloliquefaciens* เป็นแบคทีเรียในดิน ที่ไม่ทำให้เกิดโรค มีคุณสมบัติต้านเชื้อรา ซึ่งได้รับอิทธิพลจากปริมาณไนโตรเจนในสิ่งแวดล้อม (17)

ลักษณะทางชีวเคมีและคุณสมบัติของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens*

ถูกค้นพบในดินโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น โดยการตั้งชื่อแบคทีเรียจากการผลิตแอลฟาอะไมเลสที่เป็นของเหลว อะไมเลสอัลฟาอะไมเลสจาก *B. amyloliquefaciens* มักจะใช้ในการย่อยสลายแป้ง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ช่วยย่อยทางการค้า นอกจากนี้ยังเป็น ผลิตโปรตีน subtilisin ซึ่งเป็นโปรตีนที่กระตุ้นในกระบวนการสลายของโปรตีนในทำนองเดียวกันกับ trypsin ด้วย

2.5.2 *Saccharomycopsis fibuligera* เป็นหนึ่งในสปิซีเทเลโอเมอร์ฟิกแอสโคไมซีตีส (Teleomorphic ascomycetes) ซึ่งเป็นชนิดที่สร้างสปอร์ และเป็นสายพันธุ์หนึ่งที่ดีที่สุดสายพันธุ์หนึ่งที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก บางสายพันธุ์สามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ใช้ย่อยแป้งในกระบวนการหมักอาหารและผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่เป็นแป้งหรือใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (18)

อนุกรมวิธานของ *Saccharomycopsis fibuligera*

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



รูปที่ 2.9 รูปร่างลักษณะของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*

### ลักษณะทางกายภาพและสรีรวิทยาของยีสต์ *S. fibuligera*

ยีสต์ *S. fibuligera* พบในขนมปัง มักกะโรนี ราจิจ (Ragi) ฟางข้าว หรือ หญ้าแห้ง ลักษณะเป็นแผ่นสีขาวครีม มีการสืบพันธุ์แบบแตกหน่อ (Budding) การสร้างเส้นใยที่มีผนังกัน (Septate hyphae) หรือสร้างแอสคัย (Asci) ประกอบด้วย 4 แอสโคสปอร์ (Ascospores) ที่มีรูปร่างคล้ายหมวก เชื้อยีสต์ในตระกูลนี้มีคุณสมบัติสำคัญคือสร้างทาลัส (Thallus) ที่เป็นแบบเซลล์เดี่ยว (Unicellular) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อให้อาหารมอลต์ ร้อยละ 5 แต่บางครั้งก็พบว่ามี การสร้างซูโดมัยซีเลียม (Pseudomycelium) ซึ่งก็คือเซลล์ของยีสต์ที่มีลักษณะยาวต่อเรียงกันเป็นแถว เกิดจากการแตกหน่อของเซลล์นั่นเอง ทำให้ดูคล้ายกับว่าเป็นเส้นใยโดยปกติแล้วหลังการแตกหน่อ เซลล์ที่เกิดใหม่ มักแยกหลุดออกจากเซลล์ที่ให้กำเนิด แต่ในบางครั้งก็พบว่าเซลล์ที่แตกออกมายังคงติดอยู่ไม่แยกออกจากกันและแตกหน่อต่อไปอีก จึงทำให้ได้ลักษณะที่เป็น ซูโดมัยซีเลียม ข้อแตกต่างระหว่าง ซูโดมัยซีเลียม และ ไมซีเลียม ที่แท้จริงคือ เซลล์ปลายสุดของซูโดมัยซีเลียม เป็นเซลล์ที่สั้นกว่าเซลล์อื่น ในขณะที่เซลล์ปลายสุดของไมซีเลียม ที่แท้จริงนั้นจะยาวกว่าเซลล์อื่นๆ

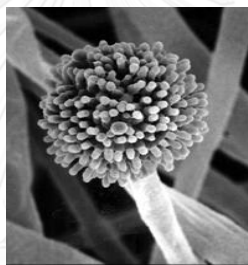
### ลักษณะทางชีวเคมีและคุณสมบัติของยีสต์ *S. fibuligera*

การสร้างเอนไซม์อะไมเลสของ *S. fibuligera* จะเริ่มสร้างเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะตอนปลายของช่วงการเจริญ (Log phase) แต่ยังคงสร้างในปริมาณที่น้อยมาก การสร้างเอนไซม์จะเกิดสูงสุดเมื่อเซลล์อยู่ในระยะการเจริญคงที่ (Stationary phase) (19) นอกจากเอนไซม์อะไมเลสแล้ว *S. fibuligera* ยังปลดปล่อยเอนไซม์ glucoamylase ออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งมีแอกติวิตีสูงในการย่อยโมเลกุลแป้งตรงส่วนปลายบริเวณนอนรีดิวิซ (Non-reducing ends) ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสออกมา (20)

2.5.3 *Aspergillus oryzae* เป็นจุลินทรีย์พวก Eukaryote จัดเป็นราในกลุ่ม Ascomycetes เป็นเชื้อราที่พบได้ทั้งในรูปของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและแบบอาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เรียกว่า Conidia

อนุกรมวิธานของ *Aspergillus oryzae*

Kingdom : Fungi  
 Phylum : Ascomycota  
 Class : Eurotiomycetes  
 Order : Eurotiales  
 Family : Thichocomaceae  
 Genus : *Aspergillus*  
 Species : *oryzae*



รูปที่ 2.10 รูปร่างลักษณะของรา *Aspergillus oryzae*

ลักษณะทางกายภาพและสรีรวิทยาของรา *A. oryzae*

ไฮฟา (Hyphae) เป็นแบบไม่ผนังกัน มีเส้นใยที่แตกแขนง เส้นใยของเชื้อราไม่มีสี แต่ละส่วนที่กันแล้วมีนิวเคลียสหลายอัน ก้านชูสปอร์ (Conidiophore) เกิดจาก foot cell ก้านชูสปอร์ อาจมีผนังกันหรือไม่ก็ได้ ที่ส่วนปลายของก้านชูสปอร์จะโป่งออกเป็นเวสซิเคิล (Vesicle) และมีส่วนที่ยื่นออกมาเป็น สเตอริกมา (Sterigma) ซึ่งอาจมีชั้นเดียวหรือสองชั้นก็ได้โคนิเดีย (Conidia) ถูกสร้างขึ้นภายในสเตอริกมา โคนิเดียที่สร้างขึ้นภายหลังจะดันโคนิเดียอันแรกๆออกมา และยังคงติดต่อกันอยู่ จึงเกิดเป็นสายของโคนิเดีย มีรูปร่างทรงกลมมีหลายสีเช่น ดำ เขียว น้ำตาล (21)

### ลักษณะทางชีวเคมีและคุณสมบัติของรา *A. oryzae*

มีความหลากหลายทางสายพันธุ์มากกว่า 100 สายพันธุ์ พบทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เป็นสาเหตุให้อาหารเสื่อมเสีย (Microbial spoilage) ในเนื้อสัตว์ น้านม และผักผลไม้ สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) และ กลูโคอะไมเลส ย่อยโมเลกุลของแป้งให้เป็นน้ำตาล เอนไซม์โปรตีเอส (Protease) ย่อยโมเลกุลของโปรตีนให้เป็นกรดแอมิโน เอนไซม์เพกทิเนส (Pecinase) ย่อยสลายเพกทิน (Pectin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช และบางสายพันธุ์ยังสร้างสารพิษ (Mycotoxin) เช่น aflatoxin และ ochratoxin ซึ่งเป็นอันตรายในอาหาร (22)

เชื้อรา *A. oryzae* ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการหมักอาหาร (Fermentation) อย่างกว้างขวางในแถบเอเชีย ได้แก่ ประเทศจีน ญี่ปุ่น ไทย และอินโดนีเซีย การผลิตอาหารหมักจากถั่วเหลือง (Soybean) และเมล็ดธัญพืช (Cereal grain) เช่น ซีอิ้ว (Fermented soy sauce) มิโซ (Miso) เต้าเจี้ยว และสาเก (Sake) เป็นต้น การหมักเพื่อผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริก (Citric acid) และเป็นผู้ย่อยสลายสารต่างๆในระบบนิเวศ โดยมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดเพื่อสร้างออกมาย่อยเซลล์ของพืชในธรรมชาติได้

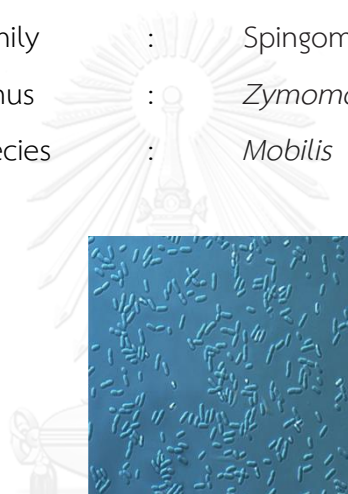


## 2.6 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

2.6.1 *Zymomonas mobilis* เป็นจุลินทรีย์พวก prokaryote ในกลุ่ม bacteria ดำรงชีวิตในลักษณะเซลล์เดี่ยว (Unicellular organism) การสืบพันธุ์โดยการแบ่งตัว (Binary fission) และมีการสร้าง สปอร์ด้วย

อนุกรมวิธานของ *Zymomonas mobilis*

Kingdom	:	Bateria
Phylum	:	Proteobacteria
Class	:	Alpha Proteobacteria
Order	:	Spingomonadales
Family	:	Spingomonadaceae
Genus	:	<i>Zymomonas</i>
Species	:	<i>Mobilis</i>



รูปที่ 2.11 รูปร่างลักษณะของแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis*

ลักษณะทางกายภาพและสรีรวิทยาของแบคทีเรีย *Z. Mobilis*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบแบบไม่ใช้ออกซิเจน รูปทรงแบบ sporulating และมี polarly flagellated โดยรูปแท่งจะพบเพียงสายพันธุ์ที่อยู่ในพืชและสัตว์ ไม่มีการสร้างสปอร์ เจริญเติบโตได้เร็ว (23)

ลักษณะทางชีวเคมีและคุณสมบัติของแบคทีเรีย *Z. Mobilis*

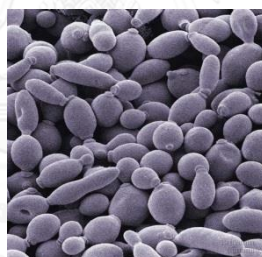
เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอทานอลจึงใช้ประโยชน์ในการหมักเช่น เบียร์ สามารถให้รสชาติที่เรียกว่า estery sulfury โดยเกิดจากการผลิตของแอลกอฮอล์และไฮโดรเจนซัลไฟด์ มีกลิ่นคล้ายกับกลิ่นแอปเปิ้ลเน่าเสียหรือกลิ่นผลไม้ *Z. Mobilis* มีความต้องการคาร์โบไฮเดรตที่สูงจึงสามารถใช้ซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส การเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 25 ถึง 37 องศาเซลเซียสขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (24)

ข้อได้เปรียบของ *Z. Mobilis* ที่ดีกว่ายีสต์คือ มีความสามารถดูดซึมน้ำตาลที่สูง ทำให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่ายีสต์ได้ถึง 2.5 เท่า อดทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้ถึง 16 เปอร์เซ็นต์ (25)

2.6.2 *Saccharomyces cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์พวก eukaryote ดำรงชีวิตในลักษณะเซลล์เดี่ยว (Unicellular organism) สืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (Budding) หรือการแบ่งตัว (Binary fission) และมีการสร้างแอสโคสปอร์ในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

อนุกรมวิธานของ *Saccharomyces cerevisiae*

Phylum	:	Ascomycota
Order	:	Saccharomycetales
Family	:	Saccharomycetaceae
Subfamily	:	Saccharomycetoideae
Genus	:	<i>Saccharomyces</i>
Species	:	<i>cerevisiae</i>



รูปที่ 2.12 ลักษณะเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ลักษณะทางกายภาพและสรีรวิทยาของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae*

เมื่อศึกษาลักษณะของยีสต์ *S. cerevisiae* ผ่านกล้องจุลทรรศน์จะพบส่วนประกอบของเซลล์แบ่งเป็นส่วนๆ ดังนี้คือ ผนังเซลล์ ไซโทพลาสซึมและนิวเคลียส ในไซโทพลาสซึมพบออร์แกเนลล์อื่นๆ เช่น ไมโทคอนเดรียและแวคคิวโอ เซลล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* มีลักษณะกลมไปถึงรูปไข่ (Round or ovule shape) อยู่ในลักษณะเซลล์เดี่ยว ยีสต์ขนาดมping 1 เซลล์มีปริมาตรประมาณ 40 ลูกบาศก์ไมครอนและน้ำหนักแห้งของยีสต์ขนาดมping 1 เซลล์หนักประมาณ  $10^{-11}$  กรัม (26)

ผนังเซลล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นสารชีวภาพพวกโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูแคน แมนแนนและไคติน ผนังเซลล์มีลักษณะเป็นชั้นๆ (layer structure) ไคตินที่พบในผนังเซลล์มีใน

ปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น อาจพบในรูปของ killer toxin receptor และมีหน้าที่รักษาแรงดันออสโมติกของเซลล์ นอกจากนี้พบโคตินมากบริเวณ bud scar ซึ่งเป็นรอยที่เกิดจากการแตกหน่อของเซลล์

เยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ขนมปังมีลักษณะเหมือนเยื่อชีวภาพทั่วไปคือมีลักษณะเป็น lipid bilayer ที่มี globular protein เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างทำให้มีลักษณะเป็น fluid mosaic นอกจากนี้เมื่อศึกษาทางองค์ประกอบในเยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ขนมปังแต่ละสายพันธุ์พบว่ามีความแตกต่างกันในยีสต์แต่ละสายพันธุ์ เช่น จะพบ phosphodicholine ใน brewing yeast มากกว่าใน baking yeast ซึ่งสามารถแตกหน่อได้รอบเซลล์ (27)

ในบางสภาวะที่มีการควบคุมการให้สารอาหารในการเพาะเลี้ยง พบว่ายีสต์มีการแตกหน่อแบบ synchronous budding คือ การที่เซลล์ทุกเซลล์ในการเพาะเลี้ยงมีอายุในการแตกหน่อพร้อมกัน การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์จะพบในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเจริญ เช่น ในสภาวะขาดแคลนอาหาร โดยที่ยีสต์ที่มีนิวเคลียสเป็นดิพลอยด์จะเข้าคู่กันโดยการชักนำของ mating pheromone เรียกว่าการ conjugation ของเซลล์ที่มี mating type แตกต่างกันคือนิวเคลียสชนิด a และชนิด  $\alpha$  เซลล์ที่เข้าคู่กันนี้จะมีสร้างแอสโคสปอร์ 4 แอสโคสปอร์ที่ได้ก็จะสามารถเจริญไปเป็นเซลล์ใหม่ได้ (28)

#### ลักษณะทางชีวเคมีและคุณสมบัติของยีสต์ *S. Cerevisiae*

เป็นยีสต์ที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ ซึ่งกระบวนการผลิตพลังงานและผลผลิตที่ได้ทั้งสองก็แตกต่างกัน ตัวแปรสำคัญในการที่ยีสต์จะใช้กระบวนการใดในการใช้สารอาหารในการผลิตพลังงานและได้ผลผลิตออกมานั้นขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจนและความเข้มข้นของน้ำตาลในสภาวะแวดล้อมที่ยีสต์เจริญอยู่

การใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการสร้างพลังงานของยีสต์ในสภาวะไม่มีอากาศ (Anaerobic condition) โดยทั่วไปเรียกว่าการหมัก (Fermentation) พลังงานในรูป ATP ได้มาจากการใช้สับสเตรทผ่านกระบวนการ Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP pathway)

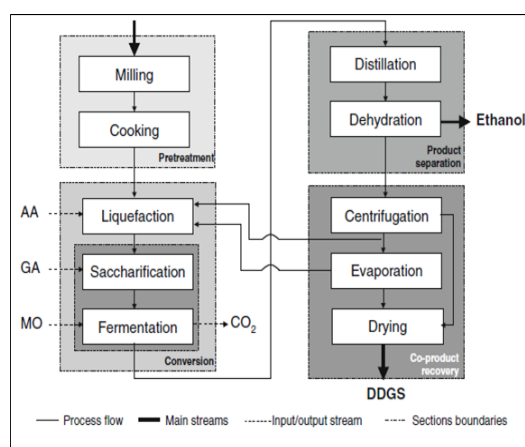
การเพาะเลี้ยงยีสต์ในระบบกะธรรมาดา (Batch fermentation) พบว่าในช่วงแรกของการเจริญปริมาณเซลล์ (Biomass) และแอลกอฮอล์จะเพิ่มขึ้นพร้อมๆกันแบบ exponential แต่เมื่อการเจริญมาถึงจุดที่มีการจำกัดออกซิเจนการเปลี่ยนน้ำตาลจะหยุด ส่วนการผลิตแอลกอฮอล์จะดำเนินต่อไปและเพิ่มแบบเส้นตรง (Linear) พบว่าในกระบวนการสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์นั้นจะมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับสารตัวกลาง intermediate ที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยา และ intermediate ที่เกิดจะเข้าไปใน tricarboxylic acid cycle และ glyoxylate cycle นอกจากนี้พบว่าในระหว่างการเจริญของยีสต์ในสภาวะไม่มีอากาศ การทำงานของไมโทคอนเดรียถูกกดเอาไว้ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยา aerobic respiration (29)



## 2.7 การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่าง

ในการผลิตเอทานอลทางชีวภาพจะใช้วัตถุดิบที่ต่างกันไปในแต่ละที่ เช่น ในสหรัฐอเมริกาใช้ข้าวโพด ในประเทศไทย นิยมใช้กากน้ำตาลหรือโมลาส แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น กระบวนการผลิตเอทานอลแบ่งได้เป็น 2 แบบได้แก่ กระบวนการหมักที่แยกกันระหว่างกระบวนการย่อยวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลและการหมักเอทานอล (Separate hydrolysis and fermentation ; (SHF)) และกระบวนการหมักที่มีการย่อยวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลร่วมกับการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; (SSF)) การใช้เอนไซม์อะไมโลไลติกทางการค้าในกระบวนการย่อยแป้งนั้นจะมีค่าใช้จ่ายที่สูง ดังนั้นกระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลสามารถใช้จุลินทรีย์บางกลุ่มที่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยให้มีกระบวนการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อน และกระบวนการหมักเอทานอลสามารถดำเนินการพร้อมกันได้โดยใช้เชื้อร่วมเพื่อลดต้นทุนการผลิต เช่น แบคทีเรีย *Bacillus* sp. (30) ยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*, *Schwanniomyces occidentalis* (31) หรือรา *A. oryzae* (32) *A. niger* (33) ซึ่งมีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์อะไมโลติกได้ในปริมาณที่สูงแล้วนำมาหมักร่วมกับ *S. cerevisiae* หรือ *Z. mobilis*

จากรูปที่ 2.13 แสดงการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยการปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างด้วยการบดให้ละเอียด จากนั้นให้ความร้อนโดยใช้น้ำเพื่อให้เกิดความหนืด (Gelatinization) จากนั้นเอนไซม์อะไมโลไลติกที่ผลิตจากจุลินทรีย์ คือแอลฟาอะไมเลส (AA) และ กลูโคอะไมเลส (GA) จะย่อยแป้งเป็นน้ำตาล ต่อมาเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลโดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล และเข้าสู่กระบวนการแยกเอทานอลออกไปจนเหลือกากชีวมวลของเมล็ดข้าวฟ่าง หรือ Distiller dried grain sorghum (DDGS) (34)



รูปที่ 2.13 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่าง

## 2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกและผลิตเอทานอล

### แหล่งคาร์บอน (Carbon source)

สารประกอบอินทรีย์ต่างๆในจุลินทรีย์ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นธาตุหลักๆที่พบสำหรับคาร์โบไฮเดรตได้ชื่อว่าเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญเพื่อนำมาผลิตเป็นพลังงานสำหรับการดำรงชีวิตด้วยการย่อยแบ่งให้เป็นน้ำตาลแล้วเพื่อนำเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นการเตรียมแหล่งคาร์บอน เช่น ชนิดของแป้ง ชนิดของน้ำตาล ความเข้มข้น ให้เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์เติบโตได้ดีและปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไปจะส่งผลต่อเซลล์ในการรักษาสมดุลต่างๆ

ความเข้มข้นของเอทานอลในสภาพที่มีเอทานอลสูง การเจริญของจุลินทรีย์และการหมักยีสต์จะถูกยับยั้ง เพราะเอทานอลจะไปมีผลต่อเอนไซม์และสรีระวิทยาของจุลินทรีย์ ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลจะเริ่มจากการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จนกระทั่งฆ่าจุลินทรีย์นั้น เมื่อเอทานอลมากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรจะส่งผลทำให้การเจริญลดลงและจะหยุดลงเมื่อมีเอทานอล 4.7 ถึง 7.8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร การหมักจนเอทานอลมีความเข้มข้นประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรได้นั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสายพันธุ์ แต่มียีสต์บางสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นเอทานอล ประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยทั่วไปกระบวนการหมักเอทานอลโดยจุลินทรีย์ได้แก่ พวกยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้กันทั่วไป สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูง ง่ายต่อการเพาะเลี้ยง และยังเป็นแหล่งของโปรตีนเซลล์เดี่ยวด้วย และกลุ่มของพวกแบคทีเรีย เช่น *Zymomonas mobilis* ซึ่งมีข้อดีคือเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่สูง (35)

### แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source)

เป็นไนโตรเจนที่ได้จากโปรตีนหรือกรดอะมิโน ยูเรีย และสารประกอบอื่นๆ ที่มีไนโตรเจน ไนโตรเจนเป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนที่มีบทบาทในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม การใช้สารประกอบไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตได้แตกต่างกัน จุลินทรีย์หลายชนิดใช้ไนโตรเจนในรูปของโปรตีนไม่ได้ เนื่องจากไม่มีเอนไซม์สำหรับย่อยสลายโปรตีน แต่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารโปรตีนได้ถ้ามีการช่วยเหลือจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ ซึ่งโปรตีนแต่ละชนิดก็จะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีแตกต่างกัน เนื่องจากเมื่อโปรตีนถูกย่อยสลายแล้วองค์ประกอบต่างๆของโปรตีน เช่น สารเปปไทด์ กรดอะมิโน แอมโมเนีย และสารประกอบอื่นๆ มีปริมาณที่แตกต่างกันซึ่งสารดังกล่าวบางชนิดจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ บางชนิดเอาไปใช้ประโยชน์ไม่ได้ หรือบางครั้งจุลินทรีย์สามารถใช้

เป็นสารอาหารได้เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมอย่างหนึ่ง แต่เมื่อสภาพแวดล้อมที่เชื้อเจริญเปลี่ยนแปลงไป เชื้อจะไม่ย่อยสลายสารอาหารนั้น เป็นต้น

แหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ เช่น กรดอะมิโนที่เพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังมีสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ ซึ่งมีปริมาณมาก ได้แก่ นิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนอิสระที่จุลินทรีย์บางชนิดสามารถนำไปใช้ได้ เชื้อราส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ รองลงมาคือแบคทีเรีย ส่วนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้น้อยที่สุดคือยีสต์ ซึ่งแบคทีเรียสามารถย่อยสลายโปรตีนได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกลาง โดยเชื้อจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตในสภาวะที่เป็นกรด ยกเว้นแบคทีเรียบางชนิดเช่นในกลุ่มของ acid proteolytic bacteria เป็นเชื้อที่มีเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ในสภาวะที่เป็นกรด เป็นต้น แหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นอาหารของจุลินทรีย์มี 2 ประเภทคือพวกสารอินทรีย์ เช่น ยีสต์สกัด ยูเรีย beef extract, peptone, เป็นต้น และพวกสารอนินทรีย์ เช่น  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  เป็นต้น (36)

#### แหล่งน้ำ

จุลินทรีย์ต้องการน้ำในการเจริญเติบโตในอาหารที่มีน้ำอยู่ด้วยจุลินทรีย์จึงเจริญได้ น้ำในอาหารสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือน้ำที่ถูกยึดไว้ด้วยพันธะทางเคมีอย่างแน่นหนาภายในโมเลกุลของอาหาร เรียกว่า น้ำผูกพัน (Bound water) และน้ำที่เกาะอยู่กับอาหารอย่างหลวมๆ เรียกว่า น้ำอิสระ (Free water) น้ำอิสระเป็นน้ำที่จุลินทรีย์นำมาใช้ในการเจริญเติบโต จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า วอเตอร์แอกติวิตี (Water activity) ใช้สัญลักษณ์ว่า  $a_w$

#### อุณหภูมิ

ความเหมาะสมของอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโต เช่น ทำงานของเอนไซม์อะไมโลไลติกเหมาะสมที่ 60 ถึง 90 องศาเซลเซียส แต่การเจริญเติบโตของยีสต์และรา ส่วนมากอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 27 ถึง 32 องศาเซลเซียส ส่วนแบคทีเรียอยู่ในช่วง 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส

การหมักเอทานอลจะมีอัตราการหมักที่สูงขึ้นตามอุณหภูมิ เช่น การหมักเอทานอลจะเพิ่มสูงขึ้นในอัตราส่วน 140.2 แคลอรีต่อกรัมน้ำตาลกลูโคส อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการทำงานของยีสต์ แต่มีผลทางอ้อมต่อปริมาณแอลกอฮอล์ และ aromatic compounds ต่าง ๆ ซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงมาก ๆ จะทำให้เอนไซม์ในยีสต์เกิดการเสียสภาพอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์จะลดลงในระหว่างที่อุณหภูมิอยู่ในช่วง 55 ถึง 58 องศาเซลเซียส และอาจทำให้ยีสต์ตายได้ ในการหมักยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลางในช่วง 25 ถึง 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดที่จะทนได้คือ 5 ถึง 10 องศาเซลเซียส (37)

#### ความเป็นกรดต่าง (pH)

การปรับพีเอชในอาหารมีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเช่น รา *A. oryzae* สามารถย่อยแป้งได้ดีที่พีเอช 5 ส่วนแบคทีเรียและยีสต์สามารถย่อยได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง ส่วนใน

กระบวนการผลิตเอทานอล เช่น ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* สามารถเจริญได้ดีในสภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลที่ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 2.4 ถึง 8.6 โดยมีค่าที่เหมาะสมอยู่ในช่วงประมาณ 4.5 ซึ่งในสภาพเป็นกรดอ่อนนี้สามารถช่วยควบคุมการปนเปื้อนแบคทีเรียได้ดี

### ออกซิเจน

ไม่มีผลโดยตรงกับการผลิตเอโนไซม์อะไมโลไลติก แต่มีผลกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ แต่ในการผลิตเอทานอลออกซิเจนมีผลโดยตรง คือ เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในห่วงโซ่ของกระบวนการหายใจ (Respiratory chain) นอกจากนี้ ออกซิเจนยังทำหน้าที่เป็น growth factor ของยีสต์อีกด้วย โดยเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดไขมันที่มีพันธะคู่ ซึ่งนอกจากจะช่วยส่งเสริมการเจริญของยีสต์ภายใต้ภาวะที่ปราศจากออกซิเจนแล้วยังเพิ่มความทนต่อปริมาณเอทานอลด้วย (38)

### คาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยความดันบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ที่สูงจะเกิดจากยับยั้งการเจริญเติบโตและหมักอย่างรุนแรง ถ้าไม่มีการระบายออกจากระบบการหมักจะทำให้ความดันสูงขึ้น ทำให้มีผลต่ออัตราการหมัก นอกจากนั้นยังพบว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ความสามารถในการขนส่งสารแลกเปลี่ยนไปทำให้อัตราการผลิตเอทานอลและการเจริญเติบโตลดลง (39)

### วิตามินต่างๆ (Growth factor)

จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสร้างวิตามินที่ต้องการในการเจริญเติบโตขึ้นมาใช้เองได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารกลุ่มนี้ลงไปในการหมักสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วย โดยทั่วไปอาหารทั่วไปที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์จะมีวิตามินและแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบอยู่ ด้วยซึ่งจะมีปริมาณมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารแต่ละชนิด จุลินทรีย์ต้องการวิตามินในปริมาณเล็กน้อยสำหรับการเจริญเติบโต ซึ่งวิตามินที่ใช้จะมีปริมาณต่ำกว่าสารอาหารชนิดอื่นๆ ซึ่งอาหารโดยทั่วไปที่อยู่ในธรรมชาติ มักมีปริมาณสารอาหารที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อยู่แล้ว โดยพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกสามารถสังเคราะห์สารอาหารสำหรับการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย หรือบางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง จึงจำเป็นต้องพึ่งพาสารอาหารจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ส่วนแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อรา สามารถสังเคราะห์อาหารได้เองเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นเราจึงสามารถพบแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อราเติบโตได้ในที่มีวิตามินบีต่ำ เช่น ผลไม้ที่มีความเป็นกรด ซึ่งผลไม้มีวิตามินบีต่ำกว่าเนื้อสัตว์ จึงทำให้เชื้อราเติบโตได้มากกว่าแบคทีเรีย เป็นต้น

## แร่ธาตุ

แร่ธาตุมีผลต่อการรักษาสมดุลของสารละลายภายในและภายนอกเซลล์ทำให้เซลล์คงรูปอยู่ได้เป็นปกติ เกลือแร่ยังมีผลต่อการถ่ายเทอิเล็กตรอนในรูปของอ็อกซิเจน เพื่อให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ดำเนินไปได้ จุลินทรีย์บางชนิดต้องการเกลือแร่บางชนิดในช่วงเวลาของการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันไป

## 2.9 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกและผลิตเอทานอล

### 2.9.1 การออกแบบการทดลองแบบสุ่มภายในบล็อก Random block design (RBD)

เป็นออกแบบแผนการทดลองที่ใช้กับหน่วยทดลองที่มีลักษณะแตกต่างกัน โดยต้องทราบสาเหตุที่ทำให้เกิดความผันแปรในหน่วยทดลองและใช้สาเหตุดังกล่าวเป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่มหรือบล็อก โดยการจัดกลุ่มการทดลองให้มีความคล้ายกันอยู่ในบล็อกเดียวกัน และหน่วยทดลองที่อยู่ต่างบล็อกมีลักษณะแตกต่างกัน บล็อกเป็นบล็อกสมบูรณ์คือ ภายในแต่ละบล็อก จะมีครบทุกทรีทเมนต์ หลักการจัดบล็อก โดยพิจารณาหน่วยทดลองที่แตกต่างกันดังนี้

1. บล็อกเนื่องจากปัจจัยในหน่วยทดลอง เช่น การทดลองทางสัตว์บล็อกตามเพศ อายุ เป็นต้นสำหรับการทดลองเปรียบเทียบ 2 ทรีทเมนต์กับหน่วยทดลองเดียวกัน ตัวอย่างเช่น การเปรียบเทียบยาแก้ปวดศรีษะ 2 ชนิด คนไข้ แต่ละคนเป็นบล็อก

2. บล็อกเนื่องจากปัจจัยภายนอกที่เกิดกับหน่วยทดลอง เช่น การทดลองเปรียบเทียบพันธุ์ข้าวปลูกข้าวในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่างกัน ผู้ทดลองจะแบ่งพื้นที่ปลูกออกเป็นบล็อก แล้วแบ่งบล็อกเป็นแปลงย่อย (Plot) ตามจำนวนพันธุ์ข้าวที่จะเปรียบเทียบ แปลงย่อยที่อยู่ภายในบล็อกเดียวกันมีความสม่ำเสมอมากที่สุดและแปลงย่อยที่อยู่ต่างบล็อก จะมีความแตกต่างกันสำหรับขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลผลิตพืช บางครั้งใช้เวลานานมีผลทำให้ผลผลิตของแปลงทดลองที่เก็บเกี่ยวช่วงแรกกับแปลงทดลองที่เก็บเกี่ยวช่วงสุดท้ายคนละวันแตกต่างกัน จึงบล็อกด้วยเวลาการเก็บเกี่ยวให้เสร็จภายในเวลาใกล้เคียงกัน การบล็อกเช่นนี้ไม่เห็นรูปร่างบล็อก

ขนาดของบล็อกขนาดเล็กที่สุดมี 2 หน่วยทดลอง เช่น การทดลองเปรียบเทียบ 2 ทรีทเมนต์ แต่ละบล็อกจะมีทรีทเมนต์ทั้งสองอยู่ในบล็อกเดียวกันเป็นคู่ๆ วิธีสุ่มทรีทเมนต์ให้กับหน่วยทดลองจะทำภายในแต่ละบล็อก การวิเคราะห์ข้อมูลสามารถใช้ t-test แบบจับคู่ (Paired Samples) หรือ การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ RBD ทดสอบจะให้ผลสรุปเช่นเดียวกัน

การทดลองแบบสุ่มภายในบล็อก เป็นการจัดทริทเมนต์ที่มีจำนวนเท่ากับ  $t$  ทริทเมนต์กับหน่วยทดลองที่อยู่ภายในบล็อกซึ่งเป็นขนาดของบล็อกเท่ากับ  $k$  ถ้า  $t = k$  การทดลองนั้นเป็นแบบบล็อกสมบูรณ์ (Complete block) คือ ในแต่ละบล็อกจะมีครบทุกทริทเมนต์ แต่ถ้า  $t > k$  การทดลองนั้นจะเป็นแบบบล็อกไม่สมบูรณ์ (Incomplete block) ในกรณีนี้ผู้ทดลองมีจำนวนทริทเมนต์มากกว่าจำนวนหน่วยทดลองในบล็อก

#### ลักษณะของรูปแบบการทดลอง

มีตัวแปรอิสระหรือตัวแปรทดลอง 1 ตัวซึ่งแบ่งออกเป็นหลายระดับ โดยมีการจัดกลุ่มออกเป็นกลุ่ม (Block) แต่ละกลุ่มจะที่มีความคลาดเคลื่อนภายในน้อยที่สุดกับกลุ่มทดลองทุกๆกลุ่มจะต้องได้รับตัวแปรทดลองทุกๆระดับโดยการสุ่ม

แผนการทดลองแบบสุ่มแบบบล็อก แสดงตามสมการเชิงคณิตศาสตร์ได้ดังนี้

$$Y_{ij} = U + T_i + B_j + E_{ij}$$

เมื่อ  $Y_{ij}$  = ค่าสังเกตแต่ละค่าที่ได้จากทริทเมนต์  $i$  บล็อก  $j$

$i$  = 1, ...,  $t$  ( $t$ =จำนวนทริทเมนต์)

$j$  = 1, ...,  $r$  ( $r$ =จำนวนซ้ำหรือบล็อก)

$U$  = ค่าเฉลี่ยของทริทเมนต์ทั้งหมดในการทดลอง

$T_i$  = อิทธิพลของทริทเมนต์  $i$

$B_j$  = อิทธิพลของบล็อก  $j$

$E_{ij}$  = ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างตารางการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ RBD

ตัวแปร	ปริมาณของตัวแปร		
	5%	10%	15%
A	1	2	3
B	1	2	3
C	1	2	3
D	1	2	3

### การวิเคราะห์ผลของ RBD

1. สร้างตารางวิธีการวิเคราะห์การเบี่ยงเบนสองทางสำหรับแต่ละบล็อกและการรักษา ระดับแต่ละระดับ โดยเลือกตัวแปรทั้งหมดที่มีผลต่อการทดลอง
2. จากตาราง ANOVA โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปคือ Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) จากตารางจะแสดง Tests of Between-Subjects Effects เพื่อบอกความ significant ของแต่ละตัวแปร ค่าความแปรปรวน ตามค่าความเชื่อมั่นที่กำหนดไว้ (โดยทั่วไปใช้ที่ 95 เปอร์เซ็นต์) และตาราง Homogeneous Subsets แสดงการวิเคราะห์ด้วยวิธี Tukey (HSD) และวิธี Duncan tests เป็นการเปรียบเทียบแบบ multiple ranges

### 2.9.2 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman

การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman เป็นการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Fractional factorial design ในปี ค.ศ. 1946 R.L. Plackett และ J.P. Burman ได้ตีพิมพ์ผลงานที่ชื่อ Optimal multifactorial experiments นำเสนอวิธีการออกแบบที่ใช้สำหรับกรณีมี Factor จำนวนมาก วิธีการคือเลือกใช้จำนวน Run ให้เป็นเลข 4 เท่าของเลขอนุกรมคณิตศาสตร์ คือจะมีจำนวน Run เป็น 4,8,12,16,20... โดยให้จำนวน Run มีค่ามากกว่าจำนวน Factor อยู่ 1 เป็นอย่างน้อยเสมอ หรือ  $k+1$  ดังนั้นเมื่อมีจำนวน Factor 9 ตัว จะได้จำนวน Run เท่ากับ 12 หรือเมื่อมีจำนวน Factor 11 ตัวก็จะได้จำนวน Run เท่ากับ 12 เช่นกัน หรืออีกนัยหนึ่ง จำนวน Run 12 สามารถออกแบบการทดลองสำหรับจำนวน Factor ได้สูงสุด 11 ตัว จะเห็นว่าแม้จำนวน Factor เพิ่มขึ้น แต่จำนวน Run อาจจะไม่เพิ่มก็ได้ ลักษณะเช่นนี้จะเรียกว่า Non-geometry เมื่อเป็นเช่นนี้ การออกแบบทั้งหมดตามวิธี Plackett-Burman เหมาะที่จะใช้ในการทำการทดลองที่เรียกว่า Screening เพื่อคัดกรอง Factor ที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติออก (40)

#### วิธีการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman

1. กำหนด generating vector ขึ้นก่อน หลักการก็คือต้องให้จำนวน Code (+1) มีจำนวนมากกว่า (-1) อยู่ 1 ตัวเสมอ และมีจำนวน Code รวมกันแล้วน้อยกว่าจำนวน Run ในการทดลองอยู่ 1 เสมอ ดังตัวอย่างต่อไปนี้

Run = 8 ใช้ ( + + + - + - - )

Run = 12 ใช้ ( + + - + + + - - - + - )

Run = 16 ใช้ ( + + + + - + - + + - - + - - - )

Run = 20 ใช้ ( + + - - + + + + - + - + - - - - + + - )

Run = 24 ใช้ ( + + + + + - + - + + - - + + - - + - + - - - - )

2. สร้างตารางการออกแบบ (Design matrix) โดยแนว Column เป็น Factor และแนว Row เป็น Run โดยกำหนดให้ Column แรกใช้ Code จาก generating vector

3. Column ถัดไปก็ให้เริ่มต้นด้วย Code ตัวสุดท้ายของ Column ก่อนหน้านี้ แล้วจากนั้นก็ต่อด้วย Code จาก Column ก่อนหน้านี้ที่อยู่ Row ก่อนหน้านี้ (หมายเลข row ต่ำกว่า 1 row) และทำเช่นนี้ไปเรื่อยจนจบทุก Factor

4. แถว (Run) สุดท้ายจะเป็น แถวที่ต้องใส่ Code (-1) ทั้งหมด ดังตัวอย่างตามภาพที่ 2.16

Run	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+
2	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
3	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
4	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

รูปที่ 2.14 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman

จากรูปที่ 2.14 จะสังเกตเห็นว่า Column ถัดไปจะเป็นการเลื่อนลงไป 1 ของ Column ก่อนหน้านั้นเอง สังเกตจากแนวของ Code (+) จะเอียงลงทางขวามือ กรณีผู้ออกแบบมี Factor แค่ 9 ตัว ก็ใช้ตารางที่ 1 ถึงแค่ Column I แต่จะต้องใช้ Run เท่าเดิม คือ 12

5. ทำการแปรผันตัวแปร ดังในตารางที่ 2.3 ได้แก่ A B C D E และ F ตามลำดับ มีระดับสูงและต่ำ (+) และ (-) แทนระดับของตัวแปร โดยวิเคราะห์ผลกระทบของตัวแปรแต่ละตัวโดยถูกกำหนดโดยสมการพหุนามคือ



$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i \quad (i = 1, \dots, k) \quad (1)$$

ที่  $Y$  คือค่าจากสมการ(ค่ากิจกรรมของเอนไซม์)

$\beta_0$  เป็นค่าเริ่มต้น

$\beta_i$  เป็นค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้น

$x_i$  เป็นรหัสตัวแปรอิสระ

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman

Variables	Low level	High level
	(-) values	(+) values
A	-	+
B	-	+
C	-	+
D	-	+
E	-	+
F	-	+

การวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman การวิเคราะห์ผลจะใช้ผลการทดลองที่ได้จริง Experimental data (Exp.) มาวิเคราะห์ผลทางสถิติกับผลกระทบของระดับความเข้มข้นของตัวแปรแต่ละตัว และสร้างสมการพหุนามเพื่อใช้ทำนายผลการทดลอง Predicted data (Pred.) เพื่อวิเคราะห์หาว่าตัวแปรใดบ้างที่มีผลกับการทดลองด้วยกราฟ Pareto โดยมีค่า standardized effect เป็นเส้นค่ามาตรฐานที่ได้จากการคำนวณ การอ่านค่าจากกราฟจะพิจารณาตัวแปรที่มีค่ามากกว่าเส้นมาตรฐานเป็นตัวแปรที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการทดลอง การหาประสิทธิภาพของสมการพหุนามจะใช้ผลที่ได้จากการทดลอง plot กราฟร่วมกับผลที่ได้จากการทำนายเพื่อหาเส้นตรงของส่วนเบี่ยงเบนระหว่างความสัมพันธ์

ข้อดีของการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman คือการลดจำนวนการทดลองจากการออกแบบการทดลองแบบ t-test หรือแบบการทดลองที่ละปัจจัย (One factor method) ที่ต้องใช้จำนวนการออกแบบการทดลองที่  $2^n$  การทดลอง โดยที่  $n$  คือ จำนวนตัวแปร กล่าวคือ เมื่อสามารถลดจำนวนการทดลองได้ โดยที่การวิเคราะห์ผลทางสถิติมีความเชื่อมั่นที่ดีเท่าเดิม ความแปรปรวนของความผิดพลาดที่เกิดจากการทดลองจึงลดลงด้วยเช่นกัน

### 2.9.3 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Response surface methodology (RSM)

Response surface methodology (RSM) เป็นการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยการตรวจสอบความสัมพันธ์ของตัวแปร สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง ตัวแปรต้น กับค่าการตอบสนอง สามารถแสดงให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของผลตอบสนอง เมื่อระดับของปัจจัยเชิงปริมาณเปลี่ยนแปลง โดยสามารถหาจุดสมมูลที่เหมาะสม (Optimization) จากความสัมพันธ์ของตัวแปรทุกตัวในการทดลองได้ (41)

ตัวแปร (Input variable) ตัวแปรต้นเป็นตัวแปรต้น หรือปัจจัยเชิงปริมาณ เช่น อุณหภูมิ ความดัน ความเข้มข้น ปริมาณสาร เป็นต้น

ค่าผลตอบสนอง (Response variable) เป็นผลจากตัวแปรที่ต้องการ เช่น ผลผลิต (Yield) ความหนืด ความแข็ง คະแนนความชอบ เป็นต้น

#### วิธีการออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM

1. กำหนดแผนการทดลองโดยเลือกตัวแปรที่เหมาะสมที่สามารถให้ข้อมูลเพียงพอในการสร้าง Contour plot โดยกำหนด Factor level ดังแสดงในตาราง 2.3 โดยแต่ละระดับ (Level) และการออกแบบการทดลองโดยแต่การทดลองเป็นการกระจายตัวตามสมการอนุกรมคณิตศาสตร์ ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างการออกแบบการทดลองแบบ RSM

Level	Variable			
	A	B	C	D
-2	1	1	1	1
-1	2	2	2	2
0	3	3	3	3
1	4	4	4	4
2	5	5	5	5

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างการออกแบบการทดลองแบบ RSM

Run	Variable(g/l)				Exp.
	A	B	C	D	
1	-2	0	0	0	x
2	1	1	-1	-1	x
3	0	0	0	0	x
4	-1	-1	-1	1	x
5	0	0	0	0	x
6	1	-1	-1	-1	x
...	...	...	...	...	...

2. เก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการทดลองและนำข้อมูลที่ได้มาสร้างสมการพหุนามกำลังสอง  
คือ

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

ที่ Y คือค่าจากสมการ(ค่ากิจกรรมของเอนไซม์)

$\beta_0$  เป็นค่าเริ่มต้น

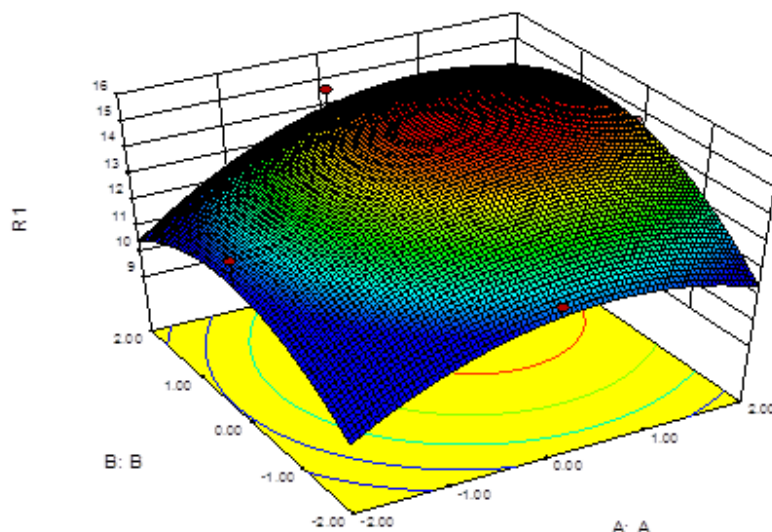
$\beta_i$  เป็นค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้น

$\beta_{ii}$  ค่าสัมประสิทธิ์สมการ

$\beta_{ij}$  ค่าสัมประสิทธิ์ร่วมสมการ

$x_i$  เป็นรหัสตัวแปรอิสระ

3. สร้าง Contour plot จากการวิเคราะห์ผลข้อมูลจากผลการทดลอง โดยสร้างกราฟ 3 มิติ แสดงระดับและความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปรที่เหมาะสม แสดงดังรูป 2.17



รูปที่ 2.15 กราฟ Contour plot แบบ 3 มิติของตัวแปร

4. วิเคราะห์ค่าที่เหมาะสมจากสมการพหุนามกำลังสอง โดยเลือกค่าต่างๆของตัวแปรแต่ละตัวที่จุดสมมูลบนพื้นผิวตอบสนองบนกราฟ Contour plot

5. ตรวจสอบสมการพหุนามกำลังสองโดยการใช้ค่าที่เหมาะสมของตัวแปรที่จุดสมมูล ด้วยการทดลองจริงตามค่า (Validation)

โดยการวิเคราะห์ผลการทดลองอยู่ 2 วิธี คือ

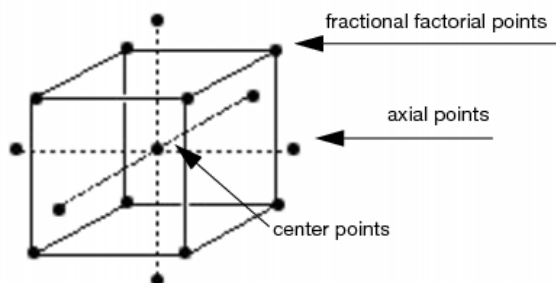
1. การออกแบบส่วนประสมกลาง (Central composite design; CCD)

เป็นหนึ่งในวิธีการหาพื้นผิวตอบสนอง (RSM) ใช้เพื่อหาค่าการที่เหมาะสม โดยทั่วไปประกอบไปด้วยส่วนกลาง (Center point) และส่วนประกอบด้วย Factorial (ตามจุดที่แสดงเป็นแผนภาพดังรูป 2.18) โดยถ้าเป็นการทดลองแบบ 2 ตัวแปร การออกแบบจะเป็นแนวระนาบเรียงตามแกน Axial แต่ถ้าเป็นการทดลองแบบ 3 ตัวแปรขึ้นไปจะเป็นรูปกล่อง ตามแผนภาพ ดังรูปที่ 2.18

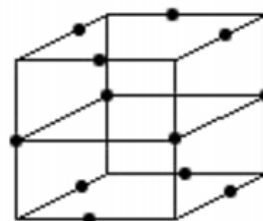
2. การออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken Design)

เป็นการออกแบบสามระดับสำหรับพีตพื้นผิวตอบสนอง (RSM) การออกแบบนี้ถูกสร้างขึ้นจากการรวมการออกแบบ Factorial  $2^k$  กับการออกแบบบล็อกแบบไม่สมบูรณ์ ผลของการออกแบบด้วยวิธีนี้มีผลในด้านจำนวนของการทดลองที่ต้องการ โดยการออกแบบ Box-Behnken เป็นการออกแบบจุดโดยที่ทุกจุดวางอยู่บนรัศมีซึ่งกันและกัน และไม่ได้รวมเอาจุดใดๆที่เป็นจุดยอดของรูปลูกบาศก์ที่สร้างขึ้นจากขีดจำกัดบนและล่างของแต่ละตัวแปรเอาไว้ การวางจุดแบบนี้ทำให้ผลต่อปัจจัยระดับ (Factor-Level Combination)

Central Composite Design



Box-Behnken Design



รูปที่ 2.16 การวิเคราะห์ผลแบบ Central composite design (CCD) และ Box-Behnken design

## 2.10 ตัวแปรที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางที่ 2.6 ตัวแปรที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ผลทางสถิติของกระบวนการผลิตเอโนไซม์อะไมไลติกจากจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	แร่ธาตุ	ภาวะ	Amylolytic activity (U/ml)	วิธีการวิเคราะห์	อ้างอิง
<i>B. amyloliquefaciens</i> II B-14	แลคโตส	สารสกัดจากยีสต์, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	pH 7 อุณหภูมิ 37 °C	0.82	Plackett-burman	(42)
<i>B. amyloliquefaciens</i> II B-14	รำข้าว สาลี	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	pH 7.2 อุณหภูมิ 40 °C	0.52	RSM	(43)
<i>B. amyloliquefaciens</i> P-001	แป้ง ข้าวโพด	Tryptone, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Ca <sup>2+</sup>	pH 6.5 อุณหภูมิ 42 °C	54.93	One factor at a time	(44)

ตารางที่ 2.6 ตัวแปรที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ผลทางสถิติของกระบวนการผลิตเอโนไซม์ไลติกจากจุลินทรีย์ (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	แร่ธาตุ	ภาวะ	Amylolytic activity (U/ml)	วิธีการวิเคราะห์	อ้างอิง
<i>Aspergillus oryzae</i>	มอลโตส	(NH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> , NaCl	pH 6 อุณหภูมิ 30 °C	32.85	One factor at a time	(45)
<i>A. oryzae</i>	รำข้าว	(NH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> , FeSO <sub>4</sub>	อุณหภูมิ 30 °C	14.70	Plackett-burman /RSM	(46)
<i>A. oryzae</i>	รำข้าว	(NH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> , FeSO <sub>4</sub>	อุณหภูมิ 30 °C	14.70	Plackett-burman /RSM	(46)

ตารางที่ 2.7 ตัวแปรที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ผลทางสถิติของกระบวนการผลิตเอทานอลจากจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	แร่ธาตุ	ภาวะ	Ethanol production (g/l)	วิธีการวิเคราะห์	อ้างอิง
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ข้าวฟ่างหวาน	ยูเรีย	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{MgSO}_4$	อุณหภูมิ 30 °C	86.2	RSM	(47)
<i>S. cerevisiae</i>	ลำต้นน้ำมันปาล์ม	$(\text{NH}_2)_4\text{SO}_4$	$\text{MgSO}_4$	อุณหภูมิ 30 °C	34.64	One factor at a time	(48)
<i>Zymomonas mobilis</i>	เมล็ดข้าวฟ่าง	$(\text{NH}_2)_4\text{SO}_4$	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{MgSO}_4$	อุณหภูมิ 30 °C SHF : เอนไซม์ กลูโคสไมเลส 0.021% กลูต้าเซอ 30.19% SSF : เอนไซม์ กลูโคสไมเลส 0.021% กลูต้าเซอ 17.51%	SHF : 134.80 SSF : 155.66	RSM	(49)



### บทที่ 3

## วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 วัสดุอุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทและประเทศ
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	รุ่น CHS, Olympus optical, Japan
เครื่องกวนควบคุมอุณหภูมิ (Hot plate stirrer)	รุ่น PC-101, Corning, U.S.A
เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)	รุ่น Vortex-Genie 560E, Scientific industries, U.S.A
เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (Rotary incubator shaker)	รุ่น G-25, New Brunswick Scientific Co., U.S.A
เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Microcentrifuge)	รุ่น MC-15A, Tomy Seiko, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge)	รุ่น KR-20000T, Kubota Co., Japan
เครื่องชั่ง ตำแหน่ง 2 (Electronic balance)	รุ่น AR 2140, Ohaus Co., U.S.A
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Electronic balance)	รุ่น AR 2140, Ohaus Co., U.S.A
เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน	รุ่น Buchi 345 Distillation unit, Buchi 345 Digester, Buchi Laboratory Techniques Ltd., Switzerland
เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	รุ่น MV Spectronic 21, Bausch&Lomb, Japan
เครื่อง (Gas chromatography)	รุ่น Model 163, Hitachi, Japan
เตาอบไมโครเวฟ (Microwave oven)	รุ่น NE-767C, Matsuchita Electric ind., Japan
ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator 30, 37 C°)	Sanyo, Japan
ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow)	International Scientific, ประเทศไทย
ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ (-20 C°)	Sanyo, Japan
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (4 C°)	Frigidaire, ประเทศไทย
หม้อนึ่งควบคุมความดัน (Autocleave)	รุ่น HV-50, Hirayama Manufacturing Co., Japan

## 3.2 เคมีภัณฑ์

เคมีภัณฑ์	บริษัทและประเทศ
Agar	Difco, U.S.A
Ammonium sulfate ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Carlo Erba, Italy
Beef extract	Difco,U.S.A
Calcium chloride monohydrate (CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O)	Fluka, Switzerland
Copper sulfate (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)	Fluka, Switzerland
D-glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	Univar,Australia
Dinitrosalicylic acid	Sigma,U.S.A
Ethanol	กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย
Ethanol absolute 99.98%	Merck, Germany
Ferrous sulfate heptahydrate (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Merck, Germany
Hydrochloric acid (HCl)	Merck, Germany
Magnesium sulfate heptahydrate (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Fluka, Switzerland
Zinc sulfate monohydrate (ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O)	Fluka, Switzerland
Peptone	Difco, U.S.A
Potassium dihydrogen phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Germany
Propanol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O)	Merck, Germany
Sodium chloride (NaCl)	Merck, Germany
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck, Germany
Sulfuric acid (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Germany
Urea ((NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO)	Merck, Germany
Yeast extract	Difco, U.S.A

### 3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.3.1 ปรับสภาพเมล็ดข้าวฟ่างโดยวิธีการทางกายภาพ

เมล็ดข้าวฟ่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ นำมาบดด้วยเครื่องบด กรองแยกโดยใช้ตะแกรงขนาด 500 ไมโครเมตรและนำไปอบในตู้อบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในการทดลองใช้ปริมาณเมล็ดข้าวฟ่าง 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในขวดขนาด 125 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที

#### 3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ

##### 3.3.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก

3.3.2.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* TISTR 1045 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ คือ อาหารแข็ง Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงและเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การเตรียมกล้าเชื้อทำโดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียจากอาหารแข็ง ลงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปเป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

3.3.2.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ คือ อาหารแข็ง Yeast extract peptone dextrose agar (YPDA) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมงและเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การเตรียมกล้าเชื้อทำโดยถ่ายเชื้อยีสต์จากอาหารแข็ง ลงในอาหารเหลว Yeast extract peptone dextrose broth (YPDB) เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปเป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

3.3.2.1.3 การเตรียมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ คือ อาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมงและเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การเตรียมกล้าเชื้อทำโดยนับสปอร์จากอาหารแข็ง ด้วยการเขี่ยสปอร์โดยใช้ลูบแล้วนำมาใส่

ในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10-15 มิลลิลิตร กรองผ่านผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นทำการนับจำนวนสปอร์ด้วยเครื่องฮีมาไซโตมิเตอร์ ปรับปริมาตรจำนวนสปอร์ให้เป็น  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วจึงนำไปเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไป

### 3.3.2.2 การเตรียมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตเอทานอล

3.3.2.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ คือ อาหารแข็ง YPD agar เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมงและเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การเตรียมกล้าเชื้อทำโดยถ่ายเชื้อยีสต์จากอาหารแข็ง ลงในอาหารเหลว YPD เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปเป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

3.3.2.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ *Zymomonas mobilis* TISTR 551 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ คือ อาหารแข็ง NA เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงและเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การเตรียมกล้าเชื้อทำโดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียจากอาหารแข็ง ลงในอาหารเหลว NB เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปเป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

### 3.3.3 สูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตเอโนไซม์อะไมโลไลติก

เปรียบเทียบการผลิตเอโนไซม์จากจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ได้แก่ *A. oryzae* TISTR 3086, *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 และ *S. fibuligera* TISTR 5033 โดยใช้เมล็ดข้าวฟ่างที่ปรับสภาพแล้วจากข้อ 3.3.1 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เติมแร่ธาตุต่างๆได้แก่ 0.5 เปอร์เซ็นต์  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1 เปอร์เซ็นต์  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 เปอร์เซ็นต์  $\text{MgSO}_4$ , 0.01 เปอร์เซ็นต์  $\text{CaCl}_2$  และ  $\text{NaCl}$  เปอร์เซ็นต์ โดยเติมกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.2 ปริมาณ 10 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อที่ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนใสนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอโนไซม์และปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น

3.3.4 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

3.3.4.1 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Random block design (RBD)

โดยใช้เชื้อที่มีศักยภาพจากข้อ 3.3.3 โดยแปรผันปริมาณแหล่งของแหล่งคาร์บอนคือ เมล็ดข้าวฟ่างที่ปรับสภาพแล้ว 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัด และเพป्टอน โดยให้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนเป็นพรีทริทเม้นและปริมาณของแหล่งคาร์บอนเป็นบล็อก ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Random block design (RBD) โดยการแปรผันปริมาณแหล่งของคาร์บอนและชนิดของไนโตรเจนสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณของแหล่งคาร์บอน		
	5%	10%	15%
ยูเรีย	1	2	3
แอมโมเนียมซัลเฟต	1	2	3
ยีสต์สกัด	1	2	3
เพป्टอน	1	2	3

เลี้ยงเชื้อในขวดขนาด 125 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง บั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณน้ำตาล

3.3.4.2 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์ด้วยการแปรผันแหล่งแร่ธาตุโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman

ทำการแปรผันแหล่งของแร่ธาตุตามตัวแปร ดังในตารางที่ 3.2 ได้แก่  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (A),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (B),  $\text{MgSO}_4$  (C),  $\text{CaCl}_2$  (D),  $\text{NaCl}$  (E) และ  $\text{FeSO}_4$  (F) ตามลำดับ มีระดับสูงและต่ำ (+) และ (-) แทนระดับความเข้มข้นของแร่ธาตุโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ Minitab 17 วิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองจากผลกระทบของตัวแปรแต่ละตัวโดยถูกกำหนดโดยสมการพหุนามคือ

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i \quad (i = 1, \dots, k) \quad (1)$$

ที่ Y คือค่าจากสมการ(ค่ากิจกรรมของเอนไซม์)

$\beta_0$  เป็นค่าเริ่มต้น

$\beta_i$  เป็นค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้น

$x_i$  เป็นรหัสตัวแปรอิสระ

ตารางที่ 3.2 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman โดยการแปรผันชนิดของแร่ธาตุและระดับความเข้มข้นสำหรับผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์

Variables	Components	Low level	High level
		(-) values (g/l)	(+) values (g/l)
A	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	10
B	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5	5
C	$\text{MgSO}_4$	0.1	2
D	$\text{CaCl}_2$	0.5	5
E	$\text{NaCl}$	0.5	5
F	$\text{FeSO}_4$	0.1	1

โดยใช้เมล็ดข้าวฟ่างที่ปรับสภาพแล้ว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่เก็บได้ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใสมาทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองจากผลกระทบระดับของตัวแปรแต่ละตัวโดยสมการพหุนาม

3.3.4.3 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์ด้วยการแปรผันแหล่งแร่ธาตุโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Response surface methodology (RSM)

จากผลการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman ในข้อ 3.3.4.2 นำมาวางแผนการทดลองด้วยวิธี Central composite design (CCD) โดยเลือกจุดสมมูลบนพื้นผิวตอบสนองบนกราฟ RSM ด้วยการใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ Design expert 9.1 ออกแบบการทดลอง ตามตารางที่ 3.3 จำนวนการทดลองแปรผันตามจำนวนตัวแปรแหล่งแร่ธาตุ โดยแต่ละการทดลองเป็นการกระจายตัวตามสมการอนุกรมคณิตศาสตร์ การวิเคราะห์ผลจะนำผลการทดลองที่ได้จริง Experimental data (Exp.) มาวิเคราะห์ผลทางสถิติกับผลกระทบของความเข้มข้นระดับต่างๆและความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปร เพื่อวิเคราะห์หาว่าระดับความเข้มข้นที่จุดสมมูลใดมีผลกับภาวะเหมาะสมสำหรับผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก โดยสร้างสมการพหุนามกำลังสองเพื่อใช้ทำนายผลการทดลอง Predicted data (Pred.) คือ

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

ที่ Y คือค่าจากสมการ(ค่ากิจกรรมของเอนไซม์)

$\beta_0$  เป็นค่าเริ่มต้น

$\beta_i$  เป็นค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้น

$\beta_{ii}$  ค่าสัมประสิทธิ์สมการ

$\beta_{ij}$  ค่าสัมประสิทธิ์ร่วมสมการ

$x_i$  เป็นรหัสตัวแปรอิสระ

ตารางที่ 3.3 การออกแบบการทดลองแบบด้วยวิธี RSM โดยการแปรผันระดับความเข้มข้นของแร่ธาตุ แต่ละชนิดสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์

level	Variable(g/l)			
	(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	NaCl
-2	1	0.5	0.1	0.5
-1	3	1.5	0.6	1.5
0	5	2.5	1.1	2.5
1	7	3.5	1.6	3.5
2	9	4.5	2.1	4.5

โดยใช้เมล็ดข้าวฟ่างที่ปรับสภาพแล้ว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่เก็บได้ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาทีและนำสารละลายส่วนใสมาทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองของความสัมพันธ์ในระดับตัวแปรแต่ละตัวโดยสมการพหุนามกำลังสอง

3.3.5 ผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

นำภาวะเหมาะสมของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกจากข้อ 3.3.4 มาเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล คือ *S. cerevisiae* หรือ *Z. mobilis* TISTR 551 โดยเติมกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่เวลา 0 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อที่ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาส่วนใส วิเคราะห์น้ำตาลและปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC)



3.3.6 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก เพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

3.3.6.1 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman

แปรผันชนิดของแหล่งแร่ธาตุ ดังตารางที่ 3.4 ได้แก่  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (A),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (B),  $\text{MgSO}_4$  (C),  $\text{MnSO}_4$  (D) เวลาที่ทำการลงกล้าเชื้อ (E) และปริมาณกล้าเชื้อ (F) ตามลำดับ โดยมีระดับสูงและต่ำ (+) และ (-) แทนระดับความเข้มข้นของแร่ธาตุ เวลาที่ทำการลงกล้าเชื้อ และปริมาณกล้าเชื้อ ด้วยการใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ Minitab 17 นำมาวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองจากผลกระทบของตัวแปรแต่ละตัวโดยถูกกำหนดโดยสมการพหุนามคือ

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i \quad (i = 1, \dots, k) \quad (3)$$

ที่ Y คือค่าจากสมการ(ปริมาณเอทานอล)

$\beta_0$  เป็นค่าเริ่มต้น

$\beta_i$  เป็นค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้น

$x_i$  เป็นรหัสตัวแปรอิสระ

ตารางที่ 3.4 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman โดยการแปรผันชนิดของแร่ธาตุ เวลาที่ทำการลงกล้าเชื้อ และปริมาณกล้าเชื้อ สำหรับภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

Variables	Components	Low level	High level
		(-) values	(+) values
A	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/l)	1	10
B	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/l)	0.5	5
C	$\text{MgSO}_4$ (g/l)	0.1	2
D	$\text{MnSO}_4$ (g/l)	0.01	0.1
E	Time (h.)	0	24
F	Innoculum (%)	2	20

โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5 แปรผันแร่ธาตุ เวลาและปริมาณกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* ตามระดับตัวแปรตามการออกแบบการทดลองเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่เก็บได้ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาทีและนำสารละลายส่วนใสมาทำการวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) และวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองจากผลกระทบระดับของตัวแปรแต่ละตัวโดยสมการพหุนาม

3.3.6.2 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเฉพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Response surface methodology (RSM)

ใช้ตัวแปรและระดับตัวแปรที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman ในข้อ 3.3.6.1 มาวางแผนการทดลองด้วยวิธี Central composite design (CCD) โดยเลือกจุดสมมูลบนพื้นผิวตอบสนองบนกราฟ RSM ด้วยการใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ Design expert 9.1 ออกแบบการทดลอง ตามตารางที่ 3.5 การวิเคราะห์ผลจะใช้ผลการทดลองที่ได้จริง (Exp.) มาวิเคราะห์ผลทางสถิติกับผลกระทบของระดับต่างๆของตัวแปรและความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปร เพื่อวิเคราะห์หาว่าระดับความเข้มข้นที่จุดสมมูลใดมีผลกับภาวะเหมาะสมโดยการสร้างสมการพหุนามเพื่อใช้ทำนายผลการทดลอง (Pred.) คือ

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (4)$$

ที่ Y คือค่าจากสมการ(ปริมาณเอทานอล)

$\beta_0$  เป็นค่าเริ่มต้น

$\beta_i$  เป็นค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้น

$\beta_{ii}$  ค่าสัมประสิทธิ์สมการ

$\beta_{ij}$  ค่าสัมประสิทธิ์ร่วมสมการ

$x_i$  เป็นรหัสตัวแปรอิสระ

ตารางที่ 3.5 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM โดยการแปรผันระดับความเข้มข้นของแต่ละตัวแปรสำหรับภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

Level	Variable(g/L)	
	Time(h)	Innoc.(%)
-1.41	0	2
-1	6	6
0	12	10
1	18	14
1.41	24	18

โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.6.1 แปรผันเวลาและปริมาณกล้าเชื้อตามระดับตัวแปรตามการออกแบบการทดลอง เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่เก็บได้ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาทีและนำสารละลายส่วนใสมาทำการวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) และวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองจากผลกระทบระดับของตัวแปรแต่ละตัวโดยสมการพหุนามกำลังสอง

3.3.7 ทดสอบภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

### 3.4 วิธีวิเคราะห์ต่างๆ

3.4.1 การวัดปริมาณน้ำตาลโดยใช้วิธี DNSA

3.4.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมโลไลติก

นำสับสเตรทและเอนไซม์ทำปฏิกิริยากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ (U/ml)

### 3.4.3 การวิเคราะห์เอทานอล

นำตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตทจากนั้นฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ทำการผสมกับ propanol มาตรฐานที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร

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

นำมาคำนวณความเข้มข้นเทียบกราฟมาตรฐานของเอทานอล

### 3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

โดยวิเคราะห์ตามวิธีเจลดาล์ (Kjeldahl)

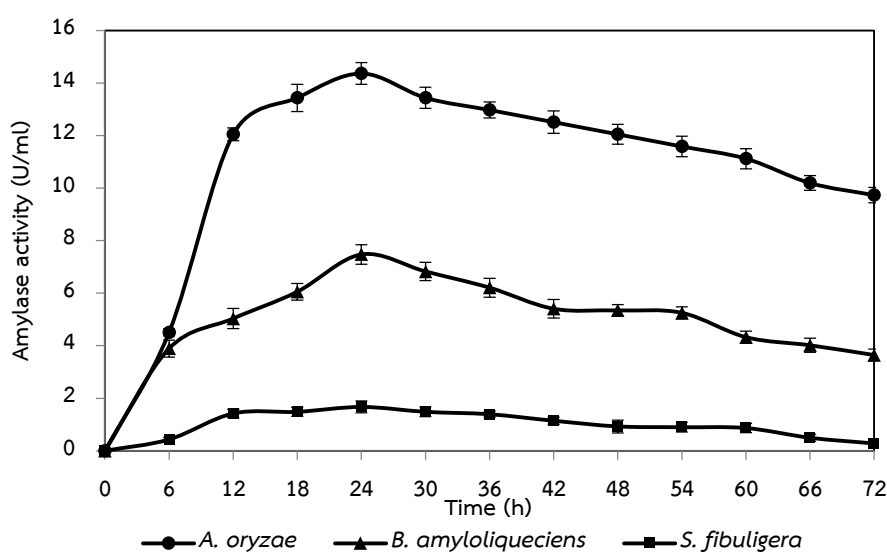
### 3.4.5 การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติทำการทดลอง 3 ซ้ำ

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกจากจุลินทรีย์ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา การผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกจากจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* TISTR 1045, *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 โดยใช้ข้าวฟ่างที่ปรับสภาพแล้ว 10 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.1 การผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกที่ระยะเวลาต่างๆโดย *A. oryzae* TISTR 3086, *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 และ *S. fibuligera* TISTR 5033

การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ ดังรูปที่ 4.1 พบว่า *A. oryzae* TISTR 3086 และ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกสูงสุด 14.363 U/ml และ 7.475 U/ml ตามลำดับในขณะที่ *S. fibuligera* TISTR 5033 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติก 1.688 U/ml ดังนั้นจึงเลือก *A. oryzae* TISTR 3086 และ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 ในการศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกต่อไป

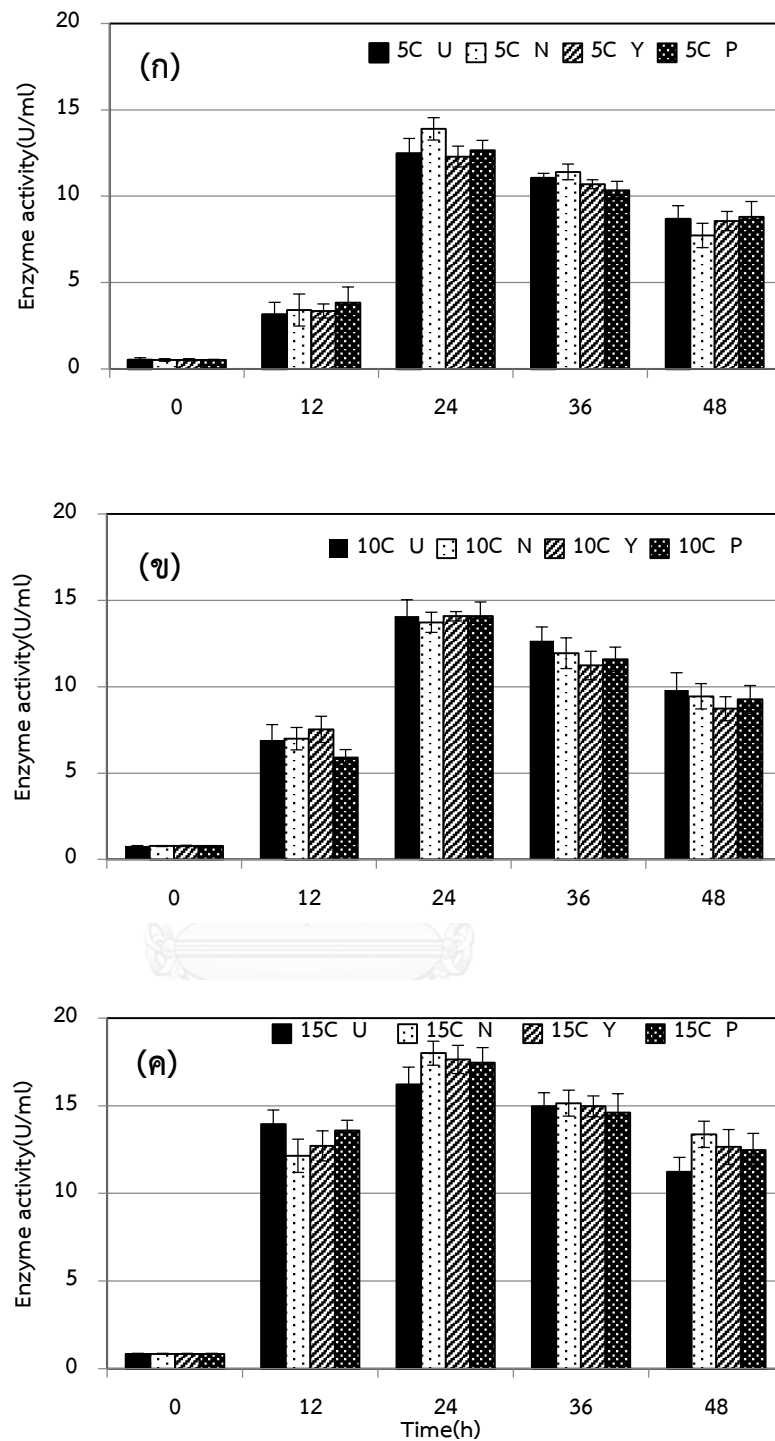
#### 4.2 ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์ด้วยวิธีทางสถิติ

4.2.1 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดยการออกแบบการทดลองแบบด้วยวิธี Random block design (RBD)

4.2.1.1 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยวิธี RBD

แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนคือเมล็ดข้าวฟ่างที่ปรับสภาพแล้ว 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ และชนิดของแหล่งไนโตรเจน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ยูเรีย,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , สารสกัดจากยีสต์ และเปปโตเน





รูปที่ 4.2 การผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกที่ระยะเวลาต่างๆโดย *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยการแปรผันปริมาณของแหล่งคาร์บอน (C) 5 (ก), 10 (ข) และ 15 (ค) เปอร์เซ็นต์ และชนิดแหล่งไนโตรเจน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ยูเรีย (U),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (N), สารสกัดจากยีสต์ (Y) และเปป्टอน (P)

จากผลการทดลอง รูปที่ 4.2 ที่เวลา 24 ชั่วโมงแสดงค่าสูงสุดของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์และชนิดแหล่งไนโตรเจน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ยูเรีย,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , สารสกัดจากยีสต์ และเปปโตเนน จึงต้องใช้ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติ RBD ทดสอบความแตกต่างแบบ multiple comparison โดยให้แหล่งไนโตรเจนเป็นพรีทรีทเม้น และปริมาณของแหล่งคาร์บอนเป็นบล็อก โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดย *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยการแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนและชนิดของแหล่งไนโตรเจน ที่เวลา 24 ชั่วโมง

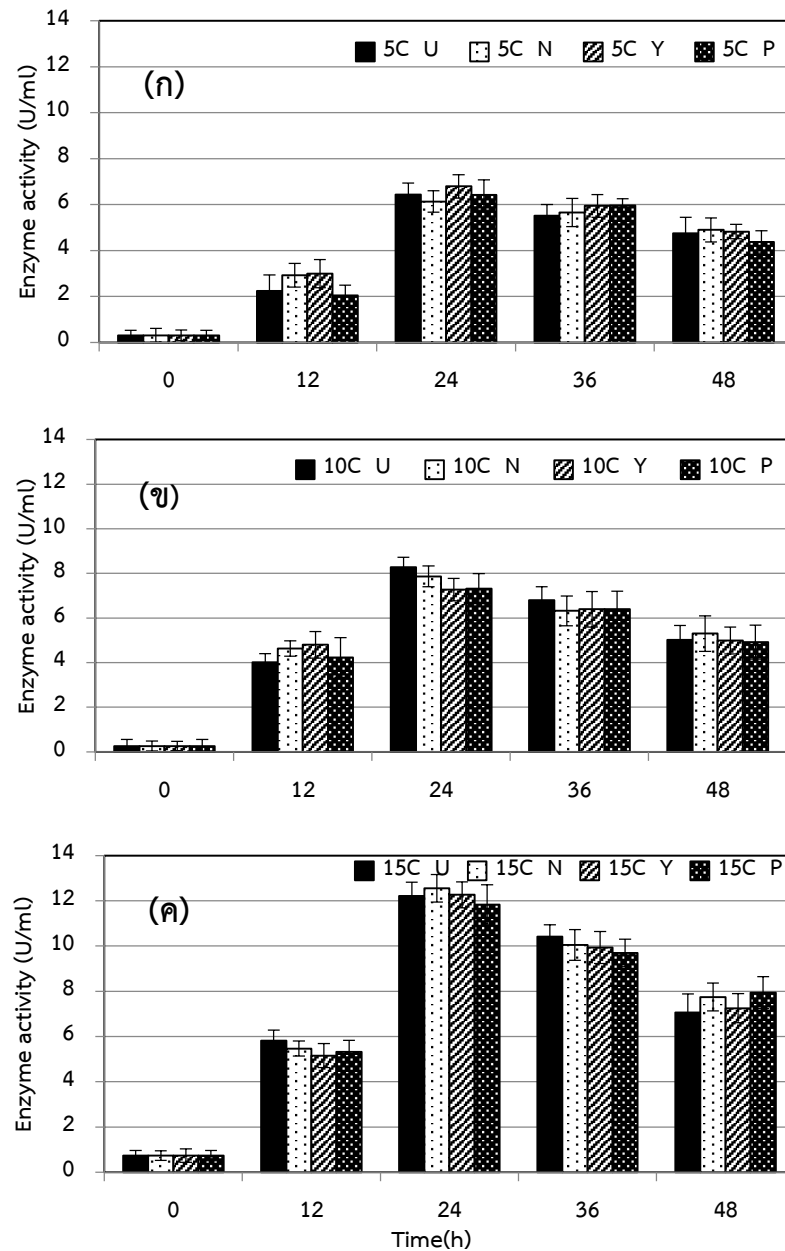
Nitrogen source	Carbon source (w/v)			
	0.5% (w/v)	5%	10%	15%
Urea (U)		12.477	14.081	16.220
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (N)		13.903	13.725	18.003
Yeast extract (Y)		12.299	14.081	17.646
Peptone (P)		12.655	14.081	17.468

จากตารางที่ 4.1 ภาวะเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกด้วยการแปรผันปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีการวิเคราะห์ของ Tukey (HSD) และ Duncan พบว่าปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ 15 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างจากแหล่งคาร์บอน 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนโดยการวิเคราะห์ของ Tukey (HSD) และ Duncan พบว่า  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  มีความแตกต่างของกิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติกจาก ยูเรีย สารสกัดจากยีสต์ และเปปโตเนน โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติกสูงสุด 18.003 U/ml

ดังนั้นภาวะเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086 คือ เมล็ดข้าฟาง 15 เปอร์เซ็นต์, 0.5 เปอร์เซ็นต์  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



4.2.1.2 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 ด้วยวิธี RBD



รูปที่ 4.3 การผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกที่ระยะเวลาต่างๆโดย *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 ด้วยการแปรผันปริมาณของแหล่งคาร์บอน (C) 5 (ก), 10 (ข) และ 15 (ค) เปอร์เซ็นต์ และชนิดของแหล่งไนโตรเจน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ยูเรีย (U),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (N), สารสกัดจากยีสต์ (Y) และเปปโติน (P)

จากผลการทดลอง รูปที่ 4.3 ที่เวลา 24 ชั่วโมงแสดงค่าสูงสุดของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 ที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ และชนิดของแหล่งไนโตรเจน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ยูเรีย,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , สารสกัดจากยีสต์ และเปปโตเน จึงต้องใช้ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติแบบ RBD ทดสอบความแตกต่างแบบ multiple comparison โดยให้แหล่งไนโตรเจนเป็นพรีทริทเม้น และปริมาณของแหล่งคาร์บอนเป็นบล็อก ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดย *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 ด้วยการแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนและชนิดของแหล่งไนโตรเจน ที่เวลา 24 ชั่วโมง

Nitrogen source	Carbon source (w/v)			
	0.5 % (w/v)	5%	10%	15%
Urea (U)	6.441	8.270	12.216	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (N)	6.132	7.866	12.548	
Yeast extract (Y)	6.797	7.272	12.263	
Peptone (P)	6.417	7.320	11.835	

จากตารางที่ 4.2 ภาวะเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกด้วยการแปรผันปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีการวิเคราะห์ของ Tukey (HSD) และ Duncan พบว่าปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ 15 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างจากแหล่งคาร์บอน 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยการวิเคราะห์ของ Tukey (HSD) และ Duncan พบว่า  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  มีความแตกต่างของกิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติกจาก ยูเรีย สารสกัดจากยีสต์ และเปปโตเน โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติกสูงสุด 12.548 U/ml

ดังนั้นภาวะเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 คือ เมล็ดข้างฟาง 15 เปอร์เซ็นต์, 0.5 เปอร์เซ็นต์  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2.2 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman

4.2.2.1 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยวิธี Plackett-Burman

การแปรผันชนิดของแหล่งแร่ธาตุและระดับความเข้มข้น โดยใช้การวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman ดังตารางที่ 4.3 ตัวแปรแทนชนิดของแร่ธาตุได้แก่  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (A),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (B),  $\text{MgSO}_4$  (C),  $\text{CaCl}_2$  (D),  $\text{NaCl}$  (E) และ  $\text{FeSO}_4$  (F) ตามลำดับ โดยมีระดับสูง (+) และต่ำ (-) แทนระดับความเข้มข้นของแร่ธาตุ ด้วยการใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ Minitab 17 มาวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองจากผลกระทบของตัวแปรแต่ละตัวที่ถูกกำหนดโดยสมการพหุนาม

ตารางที่ 4.3 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman สำหรับภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

Variables	Components	Low level	High level
		(-) values (g/l)	(+) values (g/l)
A	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	10
B	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5	5
C	$\text{MgSO}_4$	0.1	2
D	$\text{CaCl}_2$	0.5	5
E	$\text{NaCl}$	0.5	5
F	$\text{FeSO}_4$	0.1	1

(กล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์, ข้าวฟ่างที่ปรับสภาพแล้ว 15 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman จะแบ่งจำนวนการทดลองแปรผันตามจำนวนตัวแปร โดยแต่ละการทดลองเป็นการกระจายตัวตามสมการอนุกรมคณิตศาสตร์ แบ่งได้เป็น 12 การทดลอง ในการวิเคราะห์ผลจะใช้ผลการทดลองที่ได้จริง Experimental data (Exp.) มาวิเคราะห์ผลทางสถิติกับผลกระทบของระดับความเข้มข้นของตัวแปรแต่ละตัว และสร้างสมการพหุนามเพื่อใช้ทำนายผลการทดลอง Predicted data (Pred.) ในตารางที่ 4.4 เพื่อวิเคราะห์หาว่าตัวแปรใดบ้างที่มีผลกับภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

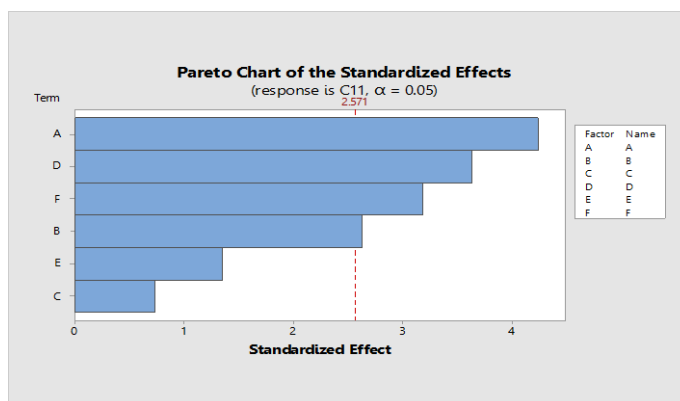
ตารางที่ 4.4 ผลการทดลองการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman สำหรับภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

Factor	A	B	C	D	E	F	Amylase activity (U/ml)	
(g/l)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	NaCl	FeSO <sub>4</sub>	Exp.	Pred.
Low(-1)	1	0.5	0.1	0.5	0.5	0.1		
High(+1)	10	5	2	5	5	1		
Runs								
1	1	-1	-1	-1	1	1	13.153	13.960
2	-1	-1	-1	1	1	1	19.477	19.509
3	-1	1	1	1	-1	1	18.030	19.121
4	1	1	-1	1	1	-1	17.149	16.908
5	-1	-1	1	1	1	-1	21.774	22.267
6	1	1	1	-1	1	1	12.932	12.618
7	-1	1	1	-1	1	-1	18.628	17.852
8	1	-1	1	-1	-1	-1	16.551	17.673
9	-1	1	-1	-1	-1	1	16.048	16.048
10	1	-1	1	1	-1	1	19.603	17.988
11	1	1	-1	1	-1	-1	17.621	17.862
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	20.988	20.149

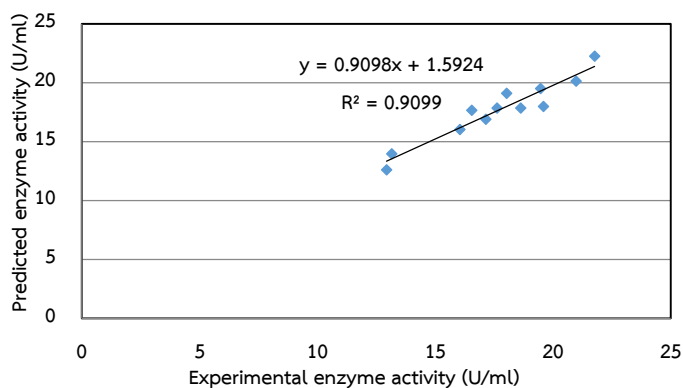
(กล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์, ข้าวฟ่างที่ปรับสภาพแล้ว 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

สมการทำนายผลภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

$$Y = 17.663 - 1.495 A - 0.928 B + 0.257 C + 1.280 D - 0.477 E - 1.122 F \quad (5)$$



รูปที่ 4.4 กราฟ Pareto ของ standardized effect กับตัวแปรต่างๆในภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดย *A. oryzae* TISTR 3086



รูปที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ ( $R^2$ ) ระหว่างผลที่ได้จากการทดลอง (Exp.) และผลที่ได้จากการทำนายของสมการ (Pred.) ของภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดย *A. oryzae* TISTR 3086

ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman ที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ รูปที่ 4.4 กราฟ Pareto ของ standardized effect กับตัวแปรต่างๆแสดงให้เห็นว่าตัวแปรที่มีค่ามากกว่าค่า standardized effect มีผลต่อสภาวะเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ A B D และ F

รูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างผลจากการทดลองที่วัดได้จริงและผลที่ได้จากการคาดการณ์ไว้ โดยส่วนเบี่ยงเบนระหว่างความสัมพันธ์คือค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9099 แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้สมการพหุนามที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman ทำนายผลการทดลองได้ด้วยความแปรปรวน 90.99 เปอร์เซ็นต์ จากค่าที่ทดลองได้จริง

#### 4.2.2.2 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 ด้วยวิธี Plackett-Burman

การแปรผันชนิดของแหล่งแร่ธาตุและระดับความเข้มข้น โดยใช้การวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman ดังตารางที่ 4.5 โดยมีตัวแปรแทนชนิดของแร่ธาตุ ได้แก่ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (A), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (B), MgSO<sub>4</sub> (C), CaCl<sub>2</sub> (D) และ NaCl (E) ตามลำดับ และมีระดับสูง (+) และต่ำ (-) แทนระดับความเข้มข้นของแร่ธาตุ

ตารางที่ 4.5 การออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี Plackett-Burman สำหรับภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

Variables	Components	Low level	High level
		(-) values (g/l)	(+) values (g/l)
A	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	10
B	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	5
C	MgSO <sub>4</sub>	0.1	2
D	CaCl <sub>2</sub>	0.5	5
E	NaCl	0.5	5

(กล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์, ข้าวฟ่างที่ปรับสภาพแล้ว 15 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman จะแบ่งจำนวนการทดลองแปรผันตามจำนวนตัวแปร โดยแต่ละการทดลองเป็นการกระจายตัวตามสมการอนุกรมคณิตศาสตร์ แบ่งได้เป็น 12 การทดลอง ในการวิเคราะห์ผลจะใช้ผลการทดลองที่ได้จริง (Exp.) มาวิเคราะห์ผลทางสถิติกับผลกระทบของระดับความเข้มข้นของตัวแปรแต่ละตัว และสร้างสมการพหุนามเพื่อใช้ทำนายผลการทดลอง (Pred.) ในตารางที่ 4.6 เพื่อวิเคราะห์หาว่าตัวแปรใดบ้างที่มีผลกับภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

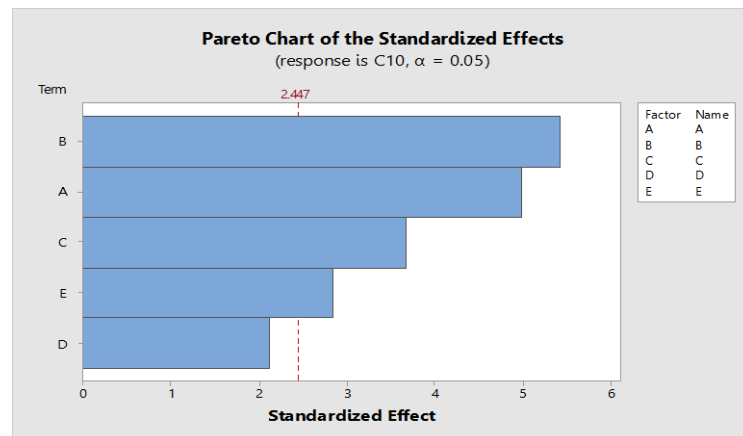
ตารางที่ 4.6 ผลการทดลองการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้วิธี Plackett-Burman สำหรับภาวะเหมาะสมที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

Factor	A	B	C	D	E	Amylase activity	
(g/l)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	NaCl	Exp.	Pred.
Low(-1)	1	0.5	0.1	0.5	0.5		
High(+1)	10	5	2	5	5		
Run						Amylase activity (U/ml)	
						Exp.	Pred.
1	1	1	1	-1	1	12.272	11.839
2	1	-1	1	-1	-1	12.885	12.862
3	1	-1	1	1	-1	12.696	12.303
4	-1	1	-1	-1	-1	14.348	13.829
5	1	1	-1	1	-1	12.319	11.941
6	-1	-1	-1	1	1	15.717	15.819
7	-1	-1	-1	-1	-1	15.198	15.615
8	1	-1	-1	-1	1	14.584	15.049
9	-1	1	1	1	-1	11.516	11.847
10	-1	-1	1	1	1	14.962	14.396
11	-1	1	1	-1	1	13.924	13.168
12	1	1	-1	1	1	12.366	12.704

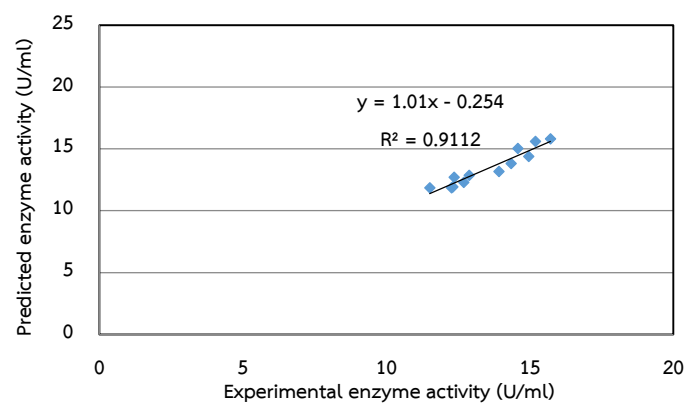
(กล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์, ข้าวฟ่างที่ปรับสภาพแล้ว 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

สมการทำนายผลภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

$$Y = 13.566 - 0.712 A - 0.775 B - 0.523 C - 0.303 D + 0.405 E \quad (6)$$



รูปที่ 4.6 กราฟ Pareto ของ standardized effect กับตัวแปรต่างๆในภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดย *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045



รูปที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ ( $R^2$ ) ระหว่างผลที่ได้จากการทดลอง (Exp.) และผลที่ได้จากการทำนายของสมการ (Pred.) ของภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดย *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 ด้วยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman ที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ภาพที่ 4.6 กราฟ Pareto ของ standardized effect กับตัวแปรต่างๆแสดงให้เห็นว่าตัวแปรที่มีค่ามากกว่าค่า standardized effect มีผลต่อสภาวะเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ A B C และ E



ภาพที่ 4.7 แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างผลจากการทดลองที่วัดได้จริงและผลที่ได้จากคาดการณ์ไว้ โดยส่วนเบี่ยงเบนระหว่างความสัมพันธ์คือค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9112 แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้สมการพหุนามที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman ทำนายผลการทดลองได้ด้วยความแปรปรวน 91.12 เปอร์เซ็นต์ จากค่าที่ทดลองได้จริง



#### 4.2.3 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Response surface methodology (RSM)

##### 4.2.3.1 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยวิธี RSM

ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman ได้แก่  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (A),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (B),  $\text{CaCl}_2$  (D) และ  $\text{FeSO}_4$  (F) โดยช่วงของตัวแปรที่ผ่านการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Plackett-Burman เป็นช่วงความเข้มข้นที่มีผลนัยสำคัญทางสถิติกับภาวะเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก ดังนั้นช่วงความเข้มข้นดังกล่าวเป็นจุดต่ำสุดและสูงสุดจะถูกนำมาใช้ในการวางแผนการทดลองด้วยวิธี Central composite design (CCD) โดยเป็นวิธีที่เกี่ยวข้องกับการคัดเลือกจุดสมมูลบนพื้นผิวตอบสนองบนกราฟ RSM ตารางที่ 4.7 แสดงตัวแปรความเข้มข้นทั้ง 4 แบ่งระดับความเข้มข้นออกเป็น 5 ระดับ ด้วยโปรแกรม Design expert 9.1 โดยจำนวนการทดลองแปรผันตามจำนวนตัวแปร โดยแต่ละการทดลองเป็นการกระจายตัวตามสมการอนุกรมคณิตศาสตร์ แบ่งได้เป็น 30 การทดลองตามตารางที่ 4.8 ในการวิเคราะห์ผลจะใช้ผลการทดลองที่ได้จริง Experimental data (Exp.) มาวิเคราะห์ผลทางสถิติกับผลกระทบของความเข้มข้นระดับต่างๆและความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปรเพื่อวิเคราะห์หาว่าระดับความเข้มข้นที่จุดสมมูลใดมีผลกับภาวะเหมาะสมที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086 โดยสร้างสมการพหุนามกำลังสองเพื่อใช้ทำนายผลการทดลอง Predicted data (Pred.)

ตารางที่ 4.7 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM สำหรับภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

Level	Variable(g/l)			
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$\text{CaCl}_2$	$\text{FeSO}_4$
-2	1	0.5	0.5	0.1
-1	3	1.5	1.5	0.3
0	5	2.5	2.5	0.5
1	7	3.5	3.5	0.7
2	9	4.5	4.5	0.9

(กล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์, ข้าวฟ่างที่ปรับสภาพแล้ว 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

ตารางที่ 4.8 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี RSM

Run	Variable(g/l)				Exp. (U/ml)
	(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	FeSO <sub>4</sub>	
1	-2	0	0	0	16.2366
2	1	1	-1	-1	21.0947
3	0	0	0	0	19.8312
4	-1	-1	-1	1	17.8437
5	0	0	0	0	19.8571
6	1	-1	-1	-1	20.8176
7	0	0	0	-2	20.1526
8	1	-1	1	1	18.7488
9	1	1	-1	1	19.0443
10	0	0	2	0	19.0813
11	0	0	0	0	19.8238
12	0	0	0	0	19.7278
13	1	-1	1	-1	19.5061
14	0	0	0	2	17.3634
15	0	0	-2	0	19.3214
16	-1	1	1	1	18.2796
17	0	0	0	0	19.7647
18	0	-2	0	0	16.5507
19	-1	1	1	-1	20.7622
20	1	1	1	-1	20.8952
21	2	0	0	0	19.5061
22	-1	1	-1	1	18.4348
23	0	0	0	0	19.7278
24	-1	1	-1	-1	20.5775
25	-1	-1	-1	-1	18.6158
26	0	2	0	0	19.1367
27	-1	-1	1	1	17.5666
28	-1	-1	1	-1	18.2316
29	1	1	1	1	19.3399
30	1	-1	-1	1	18.8042

สมการทำนายผลภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

$$Y = 19.7888 + 0.6032*A + 0.5618*B - 0.0992*C - 0.7507*D - 0.2061*AB - 0.0399*AC - 0.01963*AD + 0.1346*BC - 0.2514*BD + 0.0948*CD - 0.3349*A^2 - 0.3418*B^2 - 0.0024*C^2 - 0.1132*D^2 \quad (7)$$

จากความสัมพันธ์ระหว่างผลจากการทดลองที่วัดได้จริงและผลที่ได้จากคาดการณ์ไว้ โดยส่วนเบี่ยงเบนระหว่างความสัมพันธ์คือค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.8746 แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้สมการพหุนามกำลังที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Response surface methodology (RSM) ทำนายผลการทดลองได้ด้วยค่าความแปรปรวน 87.46 เปอร์เซ็นต์ จากค่าที่ทดลองได้จริง

ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086 โดยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี RSM ที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ตารางที่ 4.9 แสดงถึงค่าของความเข้มข้นเมื่อเทียบกับค่าของระดับตัวแปร -2, -1, 0, 1 และ 2 ที่จุดสมมูลของภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก โดยมีค่าดังนี้  $(NH_4)_2SO_4$  5.97 กรัมต่อลิตร  $KH_2PO_4$  3.33 กรัมต่อลิตร  $CaCl_2$  1.97 กรัมต่อลิตร และ  $FeSO_4$  0.14 กรัมต่อลิตร จุดสมมูลสูงสุดจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์จากการคำนวณทางสถิติที่ 21.6304 U/ml เมื่อทำการทดลองเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของสมการพหุนามโดยใช้ค่าความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณทางสถิติพบว่าให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ 21.2790 U/ml

ตารางที่ 4.9 ค่าระดับความเข้มข้นที่จุดสมมูลของภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

Variable	Pred. level	g/l
$(NH_4)_2SO_4$	0.4863	5.97
$KH_2PO_4$	0.8322	3.33
$CaCl_2$	-0.5283	1.97
$FeSO_4$	-1.8154	0.14

Muralikandhan และคณะ ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกจากรำข้าวของ *A. oryzae* MTCC8624 ด้วยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman และ RSM (46) โดยมีตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับภาวะที่เหมาะสมได้แก่  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.69 กรัมต่อลิตร  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4.95 กรัมต่อลิตร  $\text{MgSO}_4$  1.70 กรัมต่อลิตร  $\text{CaCl}_2$  0.53 กรัมต่อลิตรและ  $\text{FeSO}_4$  0.5 กรัมต่อลิตร มีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติก 14.7 U/ml ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกจากเมล็ดข้าวฟ่างของ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman และ RSM โดยมีตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับภาวะที่เหมาะสมได้แก่  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5.97 กรัมต่อลิตร  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.33 กรัมต่อลิตร  $\text{CaCl}_2$  1.97 กรัมต่อลิตรและ  $\text{FeSO}_4$  0.14 กรัมต่อลิตร มีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติก 21.2790 U/ml อาจเนื่องมาจากชนิดแหล่งคาร์บอนจากเมล็ดข้าวฟ่างมีปริมาณแป้งในเมล็ดประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าในรำข้าวที่มีปริมาณแป้งเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเพียงพอและเหมาะสม การผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* จึงให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมโลไลติกที่สูงขึ้นด้วย



#### 4.2.3.2 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 ด้วยวิธี RSM

ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 ด้วยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman ได้แก่  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (A),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (B),  $\text{MgSO}_4$  (C) และ NaCl (E) โดยช่วงของตัวแปรที่ผ่านการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Plackett-Burman เป็นช่วงความเข้มข้นที่มีผลนัยสำคัญทางสถิติกับภาวะเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก ดังนั้นช่วงความเข้มข้นดังกล่าวเป็นจุดต่ำสุดและสูงสุดจะถูกนำมาใช้และการวางแผนการทดลองด้วยวิธี CCD โดยเป็นวิธีที่เกี่ยวข้องกับการคัดเลือกจุดสมมูลบนพื้นผิวตอบสนองบนกราฟ RSM ตารางที่ 4.10 แสดงตัวแปรความเข้มข้นทั้ง 4 แบ่งระดับความเข้มข้นออกเป็น 5 ระดับ ด้วยโปรแกรม Design expert 9.1 โดยจำนวนการทดลองแปรผันตามจำนวนตัวแปร โดยแต่ละการทดลองเป็นการกระจายตัวตามสมการอนุกรมคณิตศาสตร์ แบ่งได้เป็น 30 การทดลองตามตารางที่ 4.11 ในการวิเคราะห์ผลจะใช้ผลการทดลองที่ได้จริง Experimental data (Exp.) มาวิเคราะห์ผลทางสถิติกับผลกระทบของความเข้มข้นระดับต่างๆและความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปรเพื่อวิเคราะห์หาว่าระดับความเข้มข้นที่จุดสมมูลใดมีผลกับภาวะเหมาะสมที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 โดยสร้างสมการพหุนามกำลังสองเพื่อใช้ทำนายผลการทดลอง Predicted data (Pred.)

ตารางที่ 4.10 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM สำหรับภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

Level	Variable(g/l)			
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$\text{MgSO}_4$	NaCl
-2	1	0.5	0.1	0.5
-1	3	1.5	0.6	1.5
0	5	2.5	1.1	2.5
1	7	3.5	1.6	3.5
2	9	4.5	2.1	4.5

(กล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์, ข้าวฟ่างที่ปรับสภาพแล้ว 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

ตารางที่ 4.11 ภาวะที่เหมาะสมการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี RSM

Run	Variable(g/l)				Exp. (U/ml)
	(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	NaCl	
1	-2	0	0	0	12.8932
2	1	1	-1	-1	14.7589
3	0	0	0	0	15.0729
4	-1	-1	-1	1	12.5608
5	0	0	0	0	15.1653
6	1	-1	-1	-1	13.7429
7	0	0	0	-2	14.6074
8	1	-1	1	1	13.5213
9	1	1	-1	1	14.5816
10	0	0	2	0	14.0570
11	0	0	0	0	15.0360
12	0	0	0	0	15.0729
13	1	-1	1	-1	13.2073
14	0	0	0	2	14.0237
15	0	0	-2	0	14.6481
16	-1	1	1	1	12.9524
17	0	0	0	0	15.0729
18	0	-2	0	0	12.5977
19	-1	1	1	-1	12.9838
20	1	1	1	-1	14.2491
21	2	0	0	0	14.6111
22	-1	1	-1	1	12.8932
23	0	0	0	0	15.0360
24	-1	1	-1	-1	12.4278
25	-1	-1	-1	-1	11.9179
26	0	2	0	0	14.6148
27	-1	-1	1	1	12.2098
28	-1	-1	1	-1	12.1211
29	1	1	1	1	14.8882
30	1	-1	-1	1	13.8796

สมการทำนายผลภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

$$Y = 15.0760 + 0.6749*A + 0.4420*B - 0.0755*C + 0.0379*D + 0.1049*AB - 0.0977*AC - 0.0158*AD + 0.0908*BC - 0.0178*BD - 0.0035*CD - 0.4477*A^2 - 0.4842*B^2 - 0.2976*C^2 - 0.3068*D^2 \quad (8)$$

จากความสัมพันธ์ระหว่างผลจากการทดลองที่วัดได้จริงและผลที่ได้จากคาดการณ์ไว้ โดยส่วนเบี่ยงเบนระหว่างความสัมพันธ์คือค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.8718 แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้สมการพหุนามกำลังที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี RSM ทำนายผลการทดลองได้ด้วยความแปรปรวน 87.18 เปอร์เซ็นต์ จากค่าที่ทดลองได้จริง

ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 โดยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี RSM ที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ตารางที่ 4.12 แสดงถึงค่าของความเข้มข้นเมื่อเทียบกับค่าของระดับตัวแปร -2, -1, 0, 1 และ 2 ที่จุดสมมูลของภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดยมีค่าดังนี้  $(NH_4)_2SO_4$  6.57 กรัมต่อลิตร,  $KH_2PO_4$  3.00 กรัมต่อลิตร,  $MgSO_4$  1.02 กรัมต่อลิตร และ NaCl 2.53 กรัมต่อลิตร จุดสมมูลสูงสุดจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์จากการคำนวณทางสถิติที่ 15.4807 U/ml เมื่อทำการทดลองเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของสมการพหุนามโดยใช้ค่าความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณทางสถิติพบว่าให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ 15.2950 U/ml

#### CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4.12 ค่าระดับความเข้มข้นที่จุดสมมูลของภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

Variable	Pred. level	g/l
$(NH_4)_2SO_4$	0.7826	6.57
$KH_2PO_4$	0.4986	3.00
$MgSO_4$	-0.1641	1.02
NaCl	0.0258	2.53



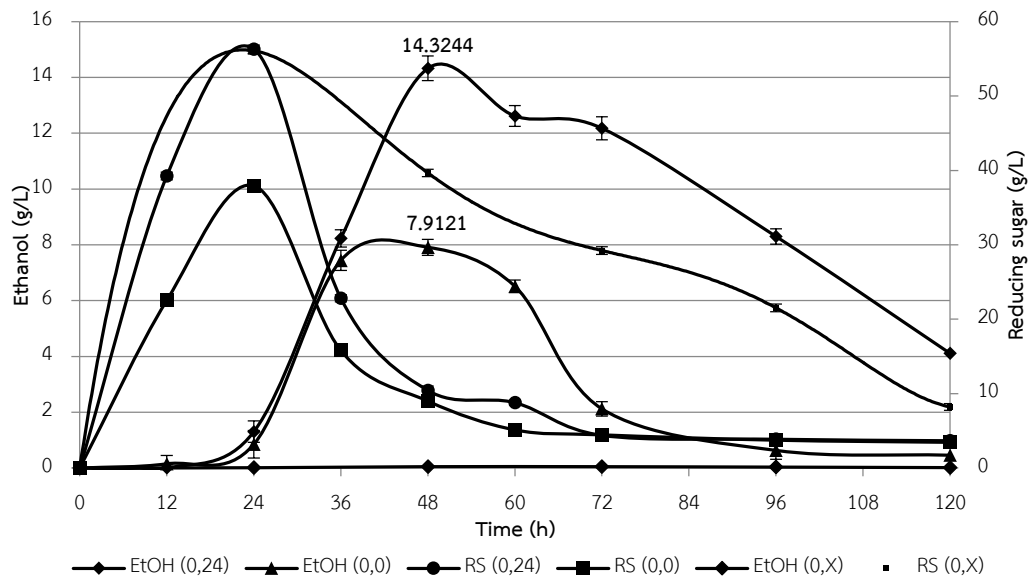
Zar และคณะ ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกจากแลคโตสของ *B. amyloliquefaciens* IIB-14 โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman (42) โดยมีตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับภาวะที่เหมาะสมได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ และ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  มีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติก 0.82 U/ml และด้วยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM (43) โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับภาวะที่เหมาะสมได้แก่ pH 7.2 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ ปริมาณกลูต้าซีอ 20 เปอร์เซ็นต์ มีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติก 0.52 U/ml ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกจากเมล็ดข้าวฟ่างของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 ด้วยการออกแบบการด้วยวิธี Plackett-Burman และ RSM โดยมีตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับภาวะที่เหมาะสมได้แก่  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  6.57 กรัมต่อลิตร,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.00 กรัมต่อลิตร,  $\text{MgSO}_4$  1.02 กรัมต่อลิตรและ NaCl 2.53 กรัมต่อลิตร มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 15.29 U/ml แต่ Deb และคณะ ได้ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกจากแป้งข้าวโพดของ *B. amyloliquefaciens* P-001 ด้วยการแปรผันแบบ on factor at a time (44) พบว่า trytone 2 กรัมต่อลิตร  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2 กรัมต่อลิตร  $\text{Ca}^{2+}$  0.002 กรัมต่อลิตร pH 6.5 อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติกที่สูงถึง 54.93 U/ml เนื่องจากชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ต่างกันคือ เมล็ดข้าวฟ่างมีปริมาณแป้งในเมล็ดประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าในรำข้าวสาลีที่มีปริมาณแป้งเพียง 25 เปอร์เซ็นต์และแลคโตสที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ แต่น้อยกว่าแป้งข้าวโพดที่เป็นแป้งอยู่แล้ว ดังนั้นเมื่อปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเพียงพอและเหมาะสม จึงมีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens*

การออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ทางสถิติของการหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่แม่นยำและถูกต้องด้วยวิธี Plackett-Burman ที่เป็นวิธีการหาชนิดของตัวแปรที่เหมาะสมและ วิธี RSM ที่เป็นวิธีหาปริมาณที่เหมาะสมของตัวแปรที่จุดสมมูล สิ่งที่สำคัญคือการกำหนดตัวแปรที่เหมาะสมในวิธี Plackett-Burman โดยการเลือกตัวแปรจากรายงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ กลไกในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก เช่น  $\text{Ca}^{2+}$  เป็น co-factor ในเอนไซม์อะไมเลส โดยมีด้านปลายเป็น  $\text{Cl}^-$  ดังนั้นตัวแปรที่เกี่ยวข้องควรมี  $\text{CaCl}_2$ , NaCl เป็นต้น หรือตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น สารประกอบแร่ธาตุอื่นๆ ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) บัฟเฟอร์ ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) เป็นต้น

การเลือกตัวแปรขึ้นในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกมาเป็นตัวแปรในวิธี Plackett-Burman ของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 คือ  $\text{FeSO}_4$  ซึ่งทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างมาก แม้ว่าจะให้ค่า  $R^2$  ของค่า Exp. และ Pred. ที่สูงก็ตาม แต่ในทางการออกแบบการทดลองถือว่าเป็นการเลือกตัวแปรที่ผิด จึงต้องเลือกตัวแปรและออกแบบการทดลองใหม่

#### 4.3 ผลผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับ จุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

##### 4.3.1 ผลผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*



RS = Reducing sugar, EtOH = Ethanol

(0,x) = การเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติกเชื้อเดียวที่ 0 ชั่วโมง

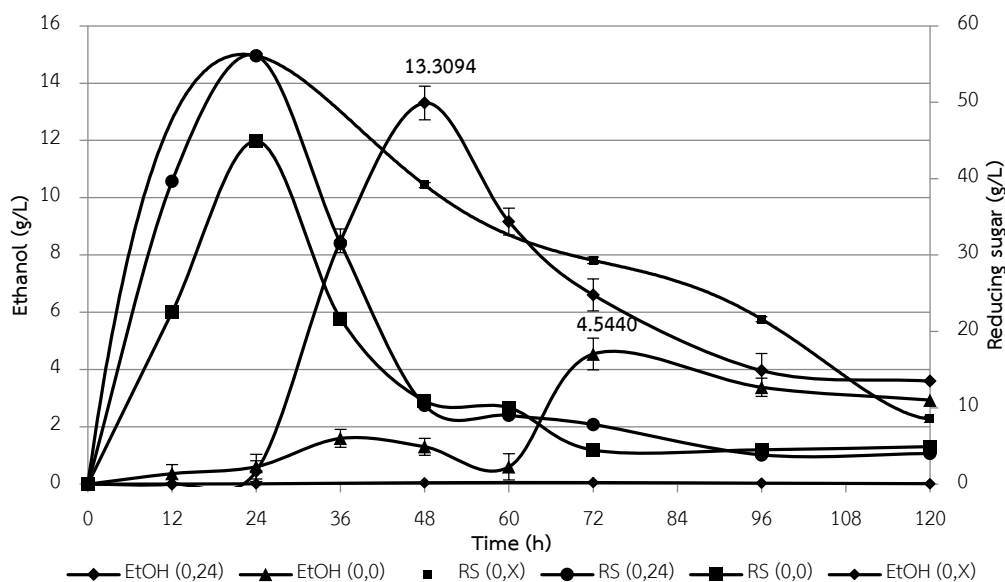
(0,0) = การเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติกและลงเชื้อที่ผลิตเอทานอลที่ 0 ชั่วโมง

(0,24) = การเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติกที่ 0 ชั่วโมงและลงเชื้อที่ผลิตเอทานอลที่ 24 ชั่วโมง

รูปที่ 4.8 การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* ที่เวลาลงเลี้ยงเชื้อที่ 0 ชั่วโมงและที่ 24 ชั่วโมง

รูปที่ 4.8 แสดงการผลิตเอทานอลสูงสุดจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกันกับ *S. cerevisiae* โดยการเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* ได้ปริมาณเอทานอล 14.3244 กรัมต่อลิตรที่เวลา 48 ชั่วโมง ส่วนการเพาะเลี้ยงร่วมกันตั้งแต่เริ่มต้นลงเชื้อที่ 0 ชั่วโมงปริมาณเอทานอล 7.9121 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง เนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงร่วมของ *S. cerevisiae* ที่เวลา 24 ชั่วโมงในระบบมี น้ำตาลเพียงพอที่จะให้เชื้อได้ใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีกว่า ต่างจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันที่เกิดการผลิตน้ำตาลไปพร้อมกับการผลิตเอทานอล ดังนั้นที่เวลา 24 ชั่วโมง *A. oryzae* TISTR 3086 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกมาย่อยข้าวฟ่างได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด จึงเป็นช่วงเวลาที่ดีที่สุดของการผลิตเอทานอลจากการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*

4.3.2 ผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Z. mobilis* TISTR 551



RS = Reducing sugar, EtOH = Ethanol

(0,x) = การเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติกเชื้อเดียวที่ 0 ชั่วโมง

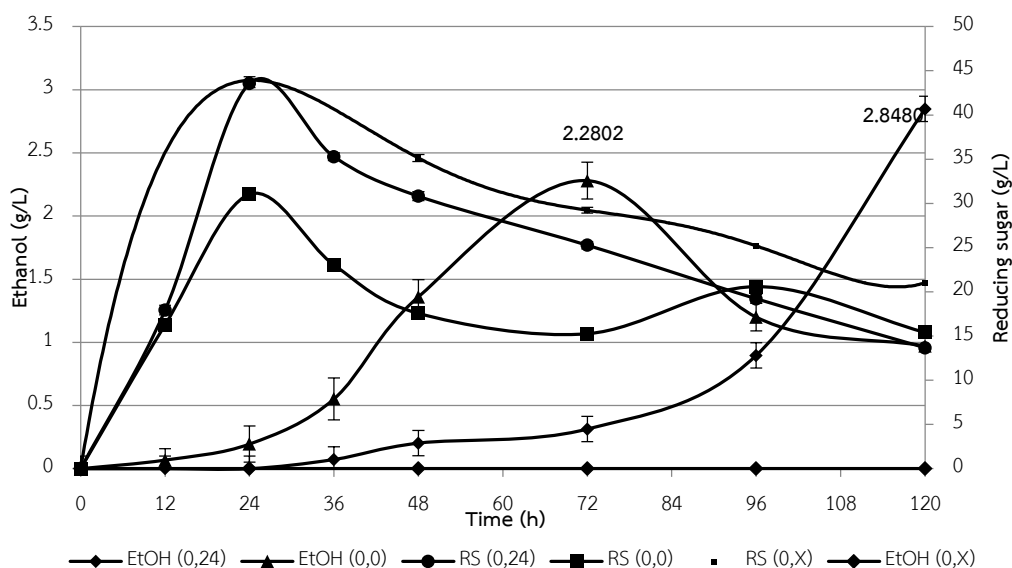
(0,0) = การเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติกและลงเชื้อที่ผลิตเอทานอลที่ 0 ชั่วโมง

(0,24) = การเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติกที่ 0 ชั่วโมงและลงเชื้อที่ผลิตเอทานอลที่ 24 ชั่วโมง

รูปที่ 4.9 การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Z. mobilis* TISTR 551 ที่เวลาเริ่มลงเลี้ยงเชื้อที่ 0 ชั่วโมงและที่ 24 ชั่วโมง

รูปที่ 4.9 แสดงการผลิตเอทานอลสูงสุดจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกันกับ *Z. mobilis* TISTR 551 โดยการเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วจึงเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Z. mobilis* TISTR 551 ได้ปริมาณเอทานอล 13.3094 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ส่วนการเพาะเลี้ยงร่วมกันตั้งแต่ 0 ชั่วโมงปริมาณเอทานอล 4.5440 กรัมต่อลิตรที่เวลา 72 ชั่วโมง เนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงร่วมของ *Z. mobilis* TISTR 551 ที่เวลา 24 ชั่วโมงในระบบมีน้ำตาลเพียงพอที่จะให้เชื้อได้ใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีกว่า ต่างจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันที่เกิดการผลิตน้ำตาลไปพร้อมกับการผลิตเอทานอล ดังนั้นที่เวลา 24 ชั่วโมงของการผลิตน้ำตาลของ *A. oryzae* TISTR 3086 จึงเป็นช่วงเวลาที่ดีที่สุดของการผลิตเอทานอลจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันกับ *Z. mobilis* TISTR 551

4.3.3 ผลผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045  
เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*



RS = Reducing sugar, EtOH = Ethanol

(0,x) = การเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติกเชื้อเดียวที่ 0 ชั่วโมง

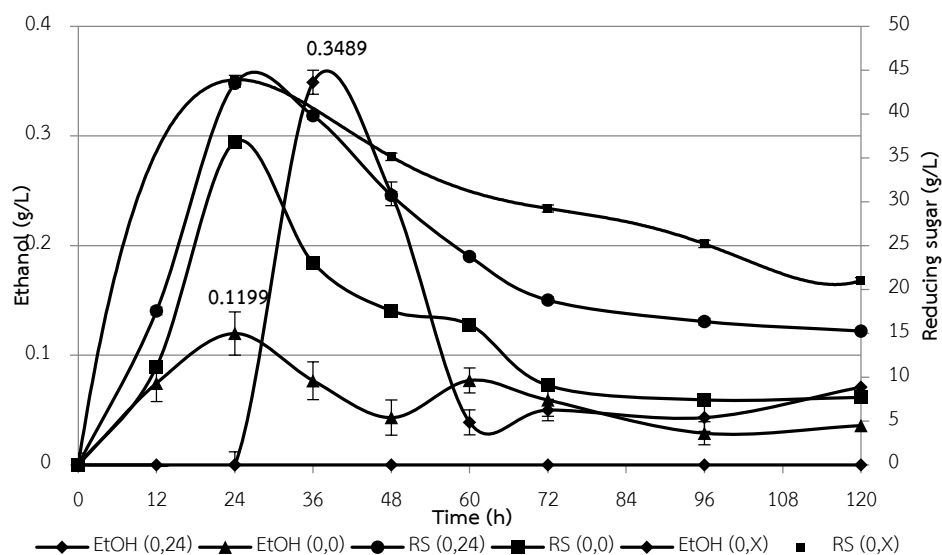
(0,0) = การเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติกและลงเชื้อที่ผลิตเอทานอลที่ 0 ชั่วโมง

(0,24) = การเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติกที่ 0 ชั่วโมงและลงเชื้อที่ผลิตเอทานอลที่ 24 ชั่วโมง

รูปที่ 4.10 การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045  
เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* ที่เวลาเริ่มลงเลี้ยงเชื้อที่ 0 ชั่วโมงและที่ 24 ชั่วโมง

รูปที่ 4.10 แสดงการผลิตเอทานอลสูงสุดจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* โดยการเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วจึงเพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* ได้ปริมาณเอทานอล 2.8480 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมง ส่วนการเพาะเลี้ยงร่วมกันตั้งแต่เริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมงปริมาณเอทานอล 2.2802 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจึงต้องใช้ในการหาอัตราการผลิตต่อชั่วโมง

4.3.4 ผลผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045  
เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Z. mobilis* TISTR 551



RS = Reducing sugar, EtOH = Ethanol

(0,x) = การเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติกเชื้อเดียวที่ 0 ชั่วโมง

(0,0) = การเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติกและลงเชื้อที่ผลิตเอทานอลที่ 0 ชั่วโมง

(0,24) = การเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติกที่ 0 ชั่วโมงและลงเชื้อที่ผลิตเอทานอลที่ 24 ชั่วโมง

รูปที่ 4.11 การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045  
เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Z. mobilis* TISTR 551 ที่เวลาเริ่มลงเลี้ยงเชื้อที่ 0 ชั่วโมงและที่ 24 ชั่วโมง

รูปที่ 4.11 แสดงการผลิตเอทานอลสูงสุดจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Z. mobilis* TISTR 551 โดยการเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วจึงเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Z. mobilis* TISTR 551 ได้ปริมาณเอทานอล 0.3489 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง ส่วนการเพาะเลี้ยงร่วมกันตั้งแต่ 0 ชั่วโมงปริมาณเอทานอล 0.1199 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจึงต้องใช้เวลา ค่าอัตราการผลิตต่อชั่วโมง

ตารางที่ 4.13 สรุปการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก เพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลที่เวลาเริ่มลงเลี้ยงเชื้อที่ 0 ชั่วโมงและที่ 24 ชั่วโมง

Co-cultivation by M.O	Innoc. Time	Max. EtOH (g/l)	hr.	Max RS. (g/l)	hr.	Productivity (g/l/h)
<i>A. oryzae</i> + <i>S. cerevisiae</i>	(0,X)	0.1879	72	56.1555	24	0.0026
	(0,0)	7.9121	48	37.9410	24	0.1648
	(0,24)	14.3244	48	56.1555	24	0.2984
<i>A. oryzae</i> + <i>Z. mobilis</i>	(0,X)	0.2061	72	56.1555	24	0.0029
	(0,0)	4.5440	72	44.9244	24	0.0631
	(0,24)	13.3094	48	56.0835	24	0.2773
<i>B. amyloliqueciens</i> + <i>S. cerevisiae</i>	(0,X)	0	-	43.9165	24	0.0000
	(0,0)	2.2802	72	31.0295	24	0.0317
	(0,24)	2.8480	120	43.5565	24	0.0237
<i>B. amyloliqueciens</i> + <i>Z. mobilis</i>	(0,X)	0	-	43.9165	24	0.0000
	(0,0)	0.1199	24	36.7891	24	0.0050
	(0,24)	0.3489	36	43.4845	24	0.0097

RS = Reducing sugar, EtOH = Ethanol

(0,x) = การเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติกเชื้อเดียวที่ 0 ชั่วโมง

(0,0) = การเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติกและลงเชื้อที่ผลิตเอทานอลที่ 0 ชั่วโมง

(0,24) = การเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติกที่ 0 ชั่วโมงและลงเชื้อที่ผลิตเอทานอลที่ 24 ชั่วโมง

จากตารางที่ 4.13 แสดงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงร่วมกัน เวลาที่ลงกล้าเชื้อ ปริมาณและเวลาของเอทานอลที่สูงที่สุด ปริมาณและเวลาของน้ำตาลที่สูงที่สุด ค่าการผลิตเอทานอลต่อชั่วโมง จะเห็นได้ว่าถ้าพิจารณาจากค่าการผลิตเอทานอลต่อชั่วโมงแล้ว การเพาะเพาะเลี้ยง *A. oryzae* TISTR 3086 ที่ 0 ชั่วโมงแล้วจึงเพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* ที่เวลา 24 ชั่วโมงนั้น ให้ค่าผลผลิตเอทานอลต่อชั่วโมงสูงสุดที่ 0.2984 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จึงเลือกเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกันกับ *S. cerevisiae* ไปหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป ส่วนเชื้อที่มีค่าผลผลิตเอทานอลต่อชั่วโมงรองลงมาคือ *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกันกับ *Z. mobilis* TISTR 551 ที่

0.2773 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนการเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 กับ *S. cerevisiae* หรือ *Z. mobilis* TISTR 551 นั้นได้ค่าผลผลิตเอทานอลต่อชั่วโมงที่น้อยอาจเป็นเพราะเกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมของการเจริญเติบโตร่วมกันของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกกับเชื้อที่ผลิตเอทานอล

4.4 ศึกษาภาวะเหมาะสมการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีสถิติ

4.4.1 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman

ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* ด้วยการแปรผันแหล่งแร่ธาตุ เวลาที่ทำการลงกล้าเชื้อ และปริมาณกล้าเชื้อโดยการออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman ดังตารางที่ 4.14 โดยมีระดับสูง (+) และต่ำ (-) แทนระดับความเข้มข้นของแร่ธาตุได้แก่  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (A),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (B),  $\text{MgSO}_4$  (C),  $\text{ZnSO}_4$  (D) เวลาที่ทำการลงกล้าเชื้อ (E) และปริมาณกล้าเชื้อ (F) ตามลำดับ

ตารางที่ 4.14 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman สำหรับภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*

Variables	Components	Low level	High level
		(-) values	(+) values
A	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/l)	1	10
B	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/l)	0.5	5
C	$\text{MgSO}_4$ (g/l)	0.1	2
D	$\text{ZnSO}_4$ (g/l)	0.01	0.1
E	Time (h.)	0	24
F	Innoculum (%)	2	20

การวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman จะแบ่งจำนวนการทดลองแปรผันตามจำนวนตัวแปร โดยแต่ละการทดลองเป็นการกระจายตัวตามสมการอนุกรมคณิตศาสตร์ แบ่งได้เป็น

12 การทดลอง ในการวิเคราะห์ผลจะใช้ผลการทดลองที่ได้จริง (Exp.) มาวิเคราะห์ผลทางสถิติกับ ผลกระทบของระดับความเข้มข้นของตัวแปรแต่ละตัว และสร้างสมการพหุนามเพื่อใช้ทำนายผลการ ทดลอง (Pred.) ในตารางที่ 4.15 เพื่อวิเคราะห์หาว่าตัวแปรใดบ้างที่มีผลกับภาวะเหมาะสมที่ในการ ผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*

ตารางที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman สำหรับภาวะเหมาะสมในการ ผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*

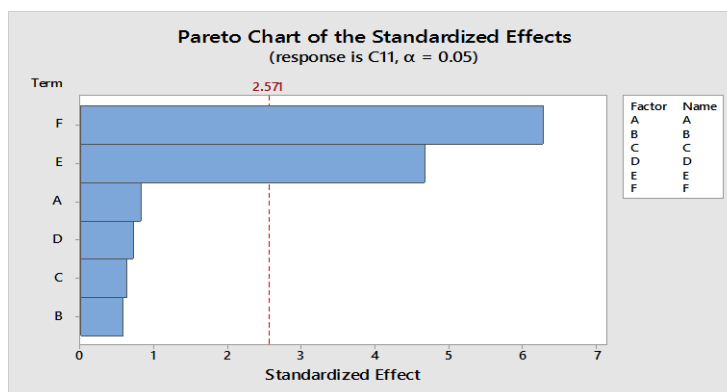
สมการทำนายผลภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae*

Factor	A	B	C	D	E	F		
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	ZnSO <sub>4</sub>	Time(h)	Innoc.(%)	Ethanol	
Low(-1)	1	0.5	0.1	0.01	0	2	Production (g/l)	
High(+1)	10	5	2	0.1	24	20		
	Runs						Exp.	Pred.
1	1	-1	-1	-1	1	1	16.8380	16.8152
2	-1	-1	-1	1	1	1	16.6435	15.6628
3	-1	1	1	1	-1	1	11.9263	11.2503
4	1	1	-1	1	1	-1	9.9348	11.1177
5	-1	-1	1	1	1	-1	10.0549	10.4618
6	1	1	1	-1	1	1	16.7486	15.9159
7	-1	1	1	-1	1	-1	10.3248	10.5711
8	1	-1	1	-1	-1	-1	8.4952	8.1009
9	-1	1	-1	-1	-1	1	10.9964	12.2589
10	1	-1	1	1	-1	1	11.0434	12.2933
11	1	1	-1	1	-1	-1	8.7874	7.6045
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8.2160	7.9571

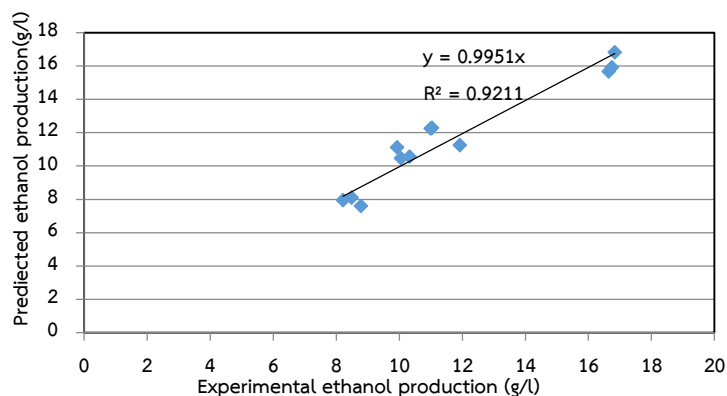
TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*

$$Y = 11.667 + 0.307 A - 0.214 B - 0.235 C - 0.269 D + 1.757 E + 2.365 F \quad (9)$$





รูปที่ 4.12 กราฟ Pareto ของ standardized effect กับตัวแปรต่างๆในภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*



รูปที่ 4.13 แสดงความสัมพันธ์ ( $R^2$ ) ระหว่างผลที่ได้จากการทดลอง (Exp.) และผลที่ได้จากการทำนายของสมการ (Pred.) ของภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*

ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* โดยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman ที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ รูปที่ 4.12 กราฟ Pareto ของ standardized effect กับตัวแปรต่างๆแสดงให้เห็นว่าตัวแปรที่มีค่ามากกว่าค่า standardized effect มีผลต่อภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* อย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ Time (E) และ Innoc. (F)

รูปที่ 4.13 แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างผลจากการทดลองที่วัดได้จริงและผลที่ได้จากคาดการณ์ไว้ โดยส่วนเบี่ยงเบนระหว่างความสัมพันธ์คือค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9211 แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้สมการพหุนามที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman ทำนายผลการทดลองได้ด้วยความแปรปรวน 92.11เปอร์เซ็นต์ จากค่าที่ทดลองได้จริง

4.4.2 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM

ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* จากตัวแปรที่เหมาะสมด้วยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman ได้แก่ เวลาที่ลงกล้าเชื้อ และ ปริมาณกล้าเชื้อ โดยช่วงของตัวแปรที่ผ่านการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Plackett-Burman เป็นช่วงความเข้มข้นที่มีผลนัยสำคัญทางสถิติกับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* ดังนั้นช่วงความเข้มข้นดังกล่าวเป็นจุดต่ำสุดและสูงสุดจะถูกนำมาใช้และการวางแผนการทดลองด้วยวิธี CCD โดยเป็นวิธีที่เกี่ยวข้องกับการคัดเลือกจุดสมมูลบนพื้นผิวตอบสนองบนกราฟ RSM ตารางที่ 4.16 แสดงตัวแปรความเข้มข้นทั้ง 2 แบ่งระดับความเข้มข้นออกเป็น 5 ระดับ ด้วยโปรแกรม Design expert 9.1 โดยจำนวนการทดลองแปรผันตามจำนวนตัวแปร โดยแต่ละการทดลองเป็นการกระจายตัวตามสมการอนุกรมคณิตศาสตร์ แบ่งได้เป็น 13 การทดลองตามตารางที่ 4.17 ในการวิเคราะห์ผลจะใช้ผลการทดลองที่ได้จริง (Exp.) มาวิเคราะห์ผลทางสถิติกับผลกระทบของระดับต่างๆของตัวแปรและความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปร เพื่อวิเคราะห์หาว่าระดับความเข้มข้นที่จุดสมมูลใดมีผลกับภาวะเหมาะสมโดยการสร้างสมการพหุนามเพื่อใช้ทำนายผลการทดลอง (Pred.)

ตารางที่ 4.16 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM สำหรับภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*

Level	Variable(g/L)	
	Time (h)	Innoc (%)
-1.41	0	2
-1	6	6
0	12	10
1	18	14
1.41	24	18

ตารางที่ 4.17 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี RSM

Run	Variable(g/L)		Ethanol(g/L)
	Time(h)	Innoc.(%)	
1	-1	-1	8.2395
2	1.41	0	14.1909
3	0	0	12.0349
4	0	1.41	12.2871
5	1	-1	13.6496
6	0	0	12.0641
7	-1.41	0	7.4619
8	1	1	14.8733
9	0	0	12.1540
10	0	0	12.1096
11	0	-1.41	9.1450
12	0	0	12.1305
13	-1	1	9.8186

สมการทำนายภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*

$$Y = 11.5507 + 2.4976 * A + 0.9057 * B \quad (10)$$

จากความสัมพันธ์ระหว่างผลจากการทดลองที่วัดได้จริงและผลที่ได้จากการคำนวณไว้ โดยส่วนเบี่ยงเบนระหว่างความสัมพันธ์คือค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9266 แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้สมการพหุนามกำลังที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี RSM ทำนายผลการทดลองได้ด้วยความแปรปรวน 92.66 เปอร์เซ็นต์ จากค่าที่ทดลองได้จริง

ตารางที่ 4.18 ค่าระดับความเข้มข้นที่จุดสมมูลของภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*

Variable	Pred. level	Pred. effect
Time (h)	1.4	23.8298
Innoc (%)	1.19	15.1914

ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* ด้วยการแปรผันเวลาที่ลงกล้าเชื้อ และปริมาณกล้าเชื้อที่ โดยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี RSM ที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ตารางที่ 4.18 แสดงถึงค่าของความเข้มข้นเมื่อเทียบกับค่าของระดับตัวแปร -1.41, -1, 0, 1 และ 1.41 ที่จุดสมมูลของสภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* โดยมีค่าดังนี้ เวลาที่ลงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เวลา 23.8298 ชั่วโมง และปริมาณกล้าเชื้อ 15.1914 เปอร์เซ็นต์ โดยจุดสมมูลสูงสุดจะให้ปริมาณเอทานอลจากการคำนวณทางสถิติที่ 16.1317 กรัมต่อลิตร

#### 4.5 ทดสอบภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

จากนั้นทดสอบสมการพหุนามที่ได้ด้วยค่าของตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* TISTR 3086 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในข้าวฟ่างที่ปรับสภาพแล้ว 15 เปอร์เซ็นต์ แร่ธาตุได้แก่  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5.97 กรัมต่อลิตร,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.33 กรัมต่อลิตร,  $\text{CaCl}_2$  1.97 กรัมต่อลิตร และ  $\text{FeSO}_4$  0.14 กรัมต่อลิตร จากนั้นที่เวลา 23.8298 ชั่วโมงจึงใส่กล้าเชื้อ *S. cerevisiae* ปริมาณ 15.1914 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.19 การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* เวลาที่ลงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เวลา 23.8298 ชั่วโมง และปริมาณกล้าเชื้อ 15.1914 เปอร์เซ็นต์

Time (h.)	EtOH (g/l)	RS (g/l)	Nitrogen (%)	Protein (%)
0	0	0	2.3685	14.8029
24	1.8726	54.0834	3.6870	23.0435
48	16.6762	7.8724	5.0929	31.8309
72	14.9488	3.0801	5.1204	32.0023
96	12.3309	2.8808	5.1315	32.0721
120	8.5750	2.8084	5.1931	32.4570

(RS = Reducing sugar, EtOH = Ethanol, Time = เวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อรวม)

ตารางที่ 4.19 แสดงผลการทดลองเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของสมการพหุนามโดยใช้ค่าตามตัวแปรที่ได้จากการคำนวณทางสถิติคือ เวลาที่ลงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เวลา 23.8298 ชั่วโมง และปริมาณกล้าเชื้อ 15.1914 เพอร์เซ็นต์ พบว่ามีปริมาณเอทานอลสูงสุดที่เกิดขึ้นจริง 16.6762 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง คิดเป็นค่าผลผลิตต่อชั่วโมงได้ 0.3474 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลสูงสุดที่ 54.0834 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจริง มีค่ามากกว่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติ 16.1317 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ค่าผลผลิตต่อชั่วโมงได้ 0.3360 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ผลทดลองทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman ซึ่งเป็นวิธีการหาความสัมพันธ์ของระดับตัวแปรที่มีผลกับการทดลองและวิธี RSM ซึ่งเป็นวิธีหาความสัมพันธ์ของจุดสมมูลของตัวแปรที่มีผลต่อการทดลองสามารถนำมาใช้ออกแบบทำการทดลองและวิเคราะห์ผลภาวะที่เหมาะสมของ *A. oryzae* TISTR 3086 ที่ผลิตเอนไซม์ไโม่โลไลติกแล้วเพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* ได้

ผลการทดลองการหาภาวะเหมาะสมของ *A. oryzae* TISTR 3086 การผลิตเอนไซม์ไโม่โลไลติกแล้วเพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* เพื่อผลิตเอทานอลคือ ปริมาณเมล็ดข้าวฟ่างที่ 15 เพอร์เซ็นต์,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5.97 กรัมต่อลิตร,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.33 กรัมต่อลิตร,  $\text{CaCl}_2$  1.97 กรัมต่อลิตรและ  $\text{FeSO}_4$  0.14 กรัมต่อลิตร ปริมาณกล้าเชื้อ 10 เพอร์เซ็นต์ ( $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นที่เวลา 23.8298 ชั่วโมงจึงใส่กล้าเชื้อ *S. cerevisiae* ปริมาณ 15.114 เพอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 16.6762 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง คิดเป็นค่าผลผลิตต่อชั่วโมงได้ 0.3474 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีปริมาณโปรตีน 31.8309 เพอร์เซ็นต์

Zhao และคณะ ศึกษาการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* จากน้ำตาลที่มาจากข้าวฟ่างหวานโดยวิธี RSM (47) โดยมีตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับภาวะที่เหมาะสมได้แก่ ยูเรีย 4.75 กรัมต่อลิตร  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.58 กรัมต่อลิตร และ  $\text{MgSO}_4$  0.98 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ปริมาณเอทานอล 86.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าการผลิตเอทานอลจาก *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* (งานวิจัยนี้) เนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลที่ *S. cerevisiae* สามารถนำไปใช้ได้เลย เป็นผลให้ได้เอทานอลในปริมาณที่สูง โดยไม่ต้องรอน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งในเมล็ดข้างฟ่างเหมือนการใช้เชื้อร่วม

Chrisnasari และคณะ ศึกษาการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างแบบ SSF โดยวิธี RSM (49) โดยมีตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับภาวะที่เหมาะสมได้แก่ เอนไซม์กลูโคอะไมเลส 0.021 เพอร์เซ็นต์ และกล้าเชื้อ *Zymomonas mobilis* 17.51 เพอร์เซ็นต์ พบว่าได้ปริมาณเอทานอล 155.66 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์เพาะเลี้ยงร่วมกัน เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์อะไมโลไลติกทางการค้าที่สูงสามารถเปลี่ยนแป้งในเมล็ดข้างฟ่างให้เป็นน้ำตาลได้มากกว่า รวมถึงเวลาที่ลงกล้า

เชื้อและปริมาณกล้าเชื้อของ *Zymomonas mobilis* ที่มากเพียงพอและเหมาะสม จึงเลือกตัวแปร ปริมาณกล้าเชื้อและเวลาที่ทำการลงเชื้อมาออกแบบการทดลองทางสถิติ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เมื่อศึกษากลไกไกลโคไลซิสพบว่า  $H_2PO_4$  และ  $Mg^{2+}$  มีผลต่อการผลิตเอทานอลด้วย

นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในกากเมล็ดข้าวฟ่าง (DDGS) พบว่า มีปริมาณ โปรตีนเริ่มต้นที่ 14.8029 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาในช่วง 48 ชั่วโมงที่มีปริมาณเอทานอลสูงที่สุด มีปริมาณ โปรตีน 31.8309 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโปรตีนสูงสุด 32.4570 เปอร์เซ็นต์ ที่ 120 ชั่วโมง เนื่องจาก เมล็ดข้าวฟ่างที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีโปรตีนสูง เมื่อ *A. oryzae* TISTR 3086 ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเปลี่ยนแป้งในเมล็ดข้าวฟ่างเป็นน้ำตาล แล้วเพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* ที่สามารถเปลี่ยน น้ำตาลให้เป็นเอทานอลได้และด้วย *S. cerevisiae* ที่เป็นโปรตีนเซลล์เดี่ยวอยู่แล้ว เมื่อเจริญเติบโตได้ดี จึงทำให้โปรตีนในระบบสูงขึ้นด้วย



## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 การผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกจากเมล็ดข้าฟางโดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา

จากการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมโลไลติกพบว่า *A. oryzae* TISTR 3086 และ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกสูงสุด 14.363 U/ml และ 7.475 U/ml ตามลำดับ ในขณะที่ *S. fibuligera* TISTR 5033 มีค่ากิจกรรมเอน 1.688 U/ml ดังนั้นจึงเลือก *A. oryzae* TISTR 3086 และ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 ในการศึกษาหาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกต่อไป

5.2 ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

5.2.1 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Random block designs (RBD)

ภาวะเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกด้วยการแปรผันปริมาณของแหล่งคาร์บอนและชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ของ *A. oryzae* TISTR 3086 พบว่าโดยวิธีการวิเคราะห์ของ Tukey (HSD) และ Duncan พบว่าปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ 15 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างจากแหล่งคาร์บอน 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการวิเคราะห์แหล่งไนโตรเจนโดยวิธีของ Tukey (HSD) และ Duncan พบว่า  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  มีความแตกต่างของกิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติก จาก ยูเรีย สารสกัดจากยีสต์ และเปปโตน โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติกสูงสุด 18.003 U/ml ดังนั้นจึงเลือก 0.5 เปอร์เซ็นต์  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  เป็นแหล่งไนโตรเจน และเมล็ดข้าฟาง 15 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และภาวะเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 โดยวิธีการวิเคราะห์ของ Tukey (HSD) และ Duncan พบว่าปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ 15 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างจากแหล่งคาร์บอน 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนด้วยการวิเคราะห์ของ Tukey (HSD) และ Duncan พบว่า  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  มีความแตกต่างของกิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติกจาก ยูเรีย สารสกัดจากยีสต์ และเปปโตน โดยมีค่ากิจกรรม



เอนไซม์อะไมโลไลติกสูงสุด 12.548 U/ml ดังนั้นจึงเลือก 0.5 เปอร์เซ็นต์  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  เป็นแหล่งไนโตรเจนและเมล็ดข้างฟาง 15 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.2.2 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman

ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman โดยการแปรผันชนิดของแหล่งแร่ธาตุและระดับความเข้มข้นที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าตัวแปรที่มีผลกับการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086 คือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  และ  $\text{FeSO}_4$  โดยมีค่าความแปรปรวนจากสมการพหุนาม 90.99 เปอร์เซ็นต์ และตัวแปรที่มีผลกับการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 คือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  และ  $\text{NaCl}$  โดยมีค่าความแปรปรวนจากสมการพหุนาม 91.12 เปอร์เซ็นต์

5.2.3 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของจุลินทรีย์ด้วยโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM

ภาวะเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกโดยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี RSM ที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ *A. oryzae* TISTR 3086 ที่จุดสมมูลสูงสุดมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ 21.6304 U/ml โดยใช้ความเข้มข้นของแร่ธาตุคือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5.97 กรัมต่อลิตร  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.33 กรัมต่อลิตร  $\text{CaCl}_2$  1.97 กรัมต่อลิตรและ  $\text{FeSO}_4$  0.14 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการทดลองเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของสมการพหุนามโดยใช้ค่าความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณทางสถิติพบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ 21.2790 U/ml และภาวะเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 ที่จุดสมมูลสูงสุดจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ 15.4807 U/ml โดยใช้ความเข้มข้นของแร่ธาตุคือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  6.57 กรัมต่อลิตร,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.00 กรัมต่อลิตร,  $\text{MgSO}_2$  1.02 กรัมต่อลิตรและ  $\text{NaCl}$  2.53 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการทดลองเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของสมการพหุนามโดยใช้ค่าความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณทางสถิติพบว่าให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ 15.2950 U/ml

5.3 ผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับ จุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

ผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้ *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกันกับ *S. cerevisiae* โดยการเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วจึงเพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 14.3244 กรัมต่อลิตรที่เวลา 48 ชั่วโมง ส่วนการเพาะเลี้ยง ร่วมกันตั้งแต่เริ่มต้นลงเชื้อที่ 0 ชั่วโมงปริมาณเอทานอลสูงสุด 7.9121 กรัมต่อลิตรที่เวลา 48 ชั่วโมง ดังนั้นในการลงเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เวลา 24 ชั่วโมงจะให้ค่าเอทานอลสูงสุด เนื่องจาก *A. oryzae* TISTR 3086 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกมาย่อยข้าวฟ่างได้ปริมาณน้ำตาลสูงที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* ที่ใช้น้ำตาลในการผลิตเอทานอลได้สูง เมื่อเทียบกับการการ เพาะเลี้ยงร่วมโดยจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

5.4 ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

5.4.1 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman

ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* ด้วยวิธี Plackett-Burman ที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ ความเชื่อมั่นที่ 95% โดยการแปรผันแหล่งแร่ธาตุ เวลาที่ทำการลงกล้าเชื้อ และปริมาณกล้าเชื้อพบตัว แปรที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลคือ เวลาที่ทำการลงกล้าเชื้อ และปริมาณกล้าเชื้อ

5.4.2 ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM

ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* ด้วยวิธี RSM ที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% มีค่าเวลาที่ลงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เวลา 23.8298 ชั่วโมง และปริมาณกล้าเชื้อ 15.1914 เปอร์เซ็นต์ โดยจุดสมมูลสูงสุดจะให้ปริมาณเอทานอลจากการคำนวณทางสถิติที่ 16.1317 กรัมต่อ ลิตร

5.5 ทดสอบภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

ตรวจสอบความถูกต้องของสมการพหุนามโดยใช้ค่าตามตัวแปรที่ได้จากการคำนวณทางสถิติ คือ เวลาที่ลงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เวลา 23.8298 ชั่วโมง และปริมาณกล้าเชื้อ 15.1914 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีปริมาณเอทานอลสูงสุดที่เกิดขึ้นจริง 16.6762 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง คิดเป็นค่าผลผลิตต่อชั่วโมงได้ 0.3474 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลสูงสุดที่ 54.0834 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจริง มีค่ามากกว่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติ 16.1317 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ค่าผลผลิตต่อชั่วโมงได้ 0.3360 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดข้าวฟ่างที่เพิ่มขึ้นในช่วงเวลา 120 ชั่วโมง โดยในช่วงเวลา 0 ชั่วโมงมีปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่ 14.8029 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาในช่วง 48 ชั่วโมงที่มีปริมาณเอทานอลสูงที่สุด มีปริมาณโปรตีน 31.8309 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโปรตีนสูงสุด 32.4570 เปอร์เซ็นต์ ที่ 120 ชั่วโมง



### ข้อเสนอแนะ

1. การย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยเอนไซม์ในกลุ่มอะไมโลไลติก ในงานวิจัยนี้ใช้การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเป็นตัวชี้ภาวะเหมาะสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อะไมโลไลติกจะอยู่ที่ 60 ถึง 90 องศาเซลเซียส ดังนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติกที่ผลิตจากจุลินทรีย์อาจแตกต่างจากกิจกรรมเอนไซม์สกัดบริสุทธิ์ทางการค้า ตามทฤษฎีการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยเอนไซม์อะไมโลไลติกหลายชนิดจากจุลินทรีย์จะได้ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลแตกต่างกันตามกลไกการย่อย โดยค่าปริมาณน้ำตาลในการวิเคราะห์จะรายงานค่าของปริมาณน้ำตาลรีดิวแทนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เอนไซม์อะไมโลไลติกย่อยได้จากข้าวฟ่าง

2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Plackett-Burman และ RSM เป็นวิธีที่ช่วยการลดจำนวนการทดลองและให้ผลที่น่าเชื่อถือแม่นยำกว่าการแปรผันแบบ Random block design ที่เป็นการออกแบบการทดลองแบบ  $2^n$  การทดลอง ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองต้นทุนและเวลาในการทดลอง การแปรผันชนิดแหล่งแร่ธาตุและระดับความเข้มข้นของภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก โดยออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman โดยการเลือกตัวแปรที่เหมาะสมต่อการทดลองจะช่วยลดจำนวนการทดลองได้และส่งผลกระทบต่อการสร้างสมการพหุนามด้วย แต่ถ้าออกแบบการทดลองโดยการเลือกตัวแปรและความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม เช่น ตัวแปรและระดับของตัวแปรที่ส่งผลยับยั้งต่อการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกหรือต่อเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ก็อาจส่งผลกระทบต่อผลการทดลองที่ให้ค่าผิดพลาดของสมการพหุนามได้

ตัวแปรและระดับของตัวแปรที่เหมาะสมจะส่งผลกระทบต่อจุดสมมูลของการวิเคราะห์ผลด้วยวิธี RSM โดยถ้าตัวแปรและระดับตัวแปรให้ค่าที่เกินหรือต่ำกว่ากราฟของ CCD แสดงว่าตัวแปรและระดับของตัวแปรจากวิธี Plackett-Burman ยังไม่เหมาะสมกับการทดลอง ต้องทำการทดลองใหม่โดยการหาตัวแปรและระดับของตัวแปรที่เหมาะสม

3. ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลสำหรับยีสต์ *S. cerevisiae* จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 35 องศาเซลเซียส โดยการทดลองนี้เป็นการหมักแบบ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) โดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล ช่วงอุณหภูมิเดียวที่ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้นถ้าในช่วงการย่อยแป้งและหมักของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ประเภท ต้องการอุณหภูมิในการเจริญเติบโตที่ต่างกัน อาจส่งผลกระทบต่อปริมาณน้ำตาลและเอทานอลด้วย

4. ในการผลิตเอทานอลด้วยจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกเฉพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลนอกจะทำให้เอทานอลเป็นผลผลิตแล้ว กากที่เหลือจากการหมักยังให้ปริมาณโปรตีนที่สูง และสามารถนำไปใช้ผสมอาหารสัตว์ ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากงานวิจัยนี้



## รายการอ้างอิง

1. Zhan, X, Wang, D, Tuinstra, MR, Bean, S, Mo, X, Sun, XS, et al. Ethanol production from supercritical-fluid-extrusion cooked sorghum. *Industrial Crops and Products*. 2006;23:304–.310
2. Teague, WM, Brumm, PJ. Commercial enzymes for starch hydrolysis products in Starch Hydrolysis Products. *Worldwide Technology Production and Application*. 1992;.291-2:277
3. Klanrit, P, Laopaiboon, L, Nuanpeng, S, Srinophakun, P, Laopaiboon, P. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology. *Bioresource Technology*. 2012;100:4176–.4182
4. Soleimani, S, Ghasemi, MF, Shokri, S. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* PTCC 1718 using low cost substrates. *African Journal of Microbiology Research*. 2012;.712-6:704
5. Hubbard, JE, Hall, HH, Earle, FR .Composition of the component parts of the sorghum kernel. *Cereal Chemistry*. 1950;.420-27:415
6. Almodares, A, Hadi, MR. Production of bioethanol from sweet sorghum: A review. *African Journal of Agricultural Research*. 2009;.780-772:(9)4
7. Cohen, R, Orlova, Y, Kovalev, M, Ungar, Y, Shimoni, E. Structural and functional properties of amylose complexes with genistein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;.4218-4212:(11)56
8. Mark, M, Glenn, B, Harold, H. Amylose and Amylopectin. *Journal of Chemical Education*. 1975;.729:(11)52
9. Smith, G, Alison, M. The Biosynthesis of Starch Granules. *Biomacromolecules*. 2001;.41-35:(2)2
10. Fukumoto, J. Isolation of bacteria secreting potent amylases and their distribution. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*. 1943;19:487–.503
11. Horvathova, V, Janeck, S, Sturdik, E. Amylolytic enzymes and properties. *Biologia*. 2000;.615-605:(6)55

12. Aline, M, Castro, R, Leda, M, Castilho, D, Freire, G. An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanol by conventional and non-conventional processes. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2011;.255-1:245
13. Lane, AN, Fan, TWM, Higashi, RM. Metabolic acidosis and the importance of balanced equations. *Metabolomics*. 2009;.165-163:(2)5
14. Okamura, T, Matsui, T, Tomoda, T, Fukuda, S, Ohsugi, M. Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages. *Journal of Molecular Catalysis*. 2003;23:133-.144
15. Keller, MA, Turchyn, AV, Ralser, M. Non-enzymatic glycolysis and pentose phosphate pathway-like reactions in a plausible Archean ocean. *Molecular Systems Biology*. 2014;.(4)10
16. Scholz, R, Molohon, KJ, Nachtigall, J, Vater, J, Markley, AL, Sussmuth, RD, et al. Plantazolicin, a Novel Microcin B/17 Streptolysin S-Like Natural Product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB .42*Journal of Bacteriology*. 2011;.224-215:(1)193
17. Priest, FG, Shute, LA, Berkeley, RCW. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1987;.71-69:(1)37
18. Chi, Z, Chi, Z, Liu, G, Wang, F, Ju, L, Zhang, T. *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 2009;.431-423:(4)27
19. Gogoi, BK, Bezbaruah, RL, Pillai, KR, Baruah, JN. Production Purification and Characterization of an  $\alpha$ -amylase Produced by *Saccharomycopsis fibuligera*. *Journal of Applied Bacteriology*. 1987;.379-63:373
20. Chi, ZM, Chi, Z, Liu, GL, Wang, F, Ju, L, Zhang, T. *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnol Adv*. 2009;.431-423:(4)27
21. Kitamoto, K. Molecular biology of the Koji molds. *Advances in Applied Microbiology*, Vol 2002 .51;.153-51:129
22. Rokas, A. The effect of domestication on the fungal proteome. *Trends in Genetics*. 2009;.63-60:(2)25

23. Swings, J, De Ley, J. The biology of *Zymomonas*. Bacteriological reviews. 1977;.46-1:(1)41
24. Agrawal, M, Mao, ZC, Chen, RR. Adaptation Yields a Highly Efficient Xylose-Fermenting *Zymomonas mobilis* Strain. Biotechnology and Bioengineering. 2011;.785-777:(4)108
25. Joachimsthal, EL, Rogers, PL. Characterization of a high-productivity recombinant strain of *Zymomonas mobilis* for ethanol production from glucose/xylose mixtures. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2000;.356-6:343-84
26. Erskowitz, I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology review. 1998;.53-36:(4)52
27. Kaeberlein, M, Burtner, CR, Kennedy, BK. Recent developments in yeast aging. Plos Genetics. 2007;.660-655:(5)3
28. Stefanini, I, Dapporto, L, Legras, JL, Calabretta, A, Di Paola, M, De Filippo, C, et al. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;.13403-13398:(33)109
29. Botstein, D, Chervitz, SA, Cherry, JM. Genetics - Yeast as a model organism. Science. 1997;.1260-1259:(5330)277
30. Indhumathi, J, Vidyalakshmi, R, Paranthaman, R. Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* sp. World Journal of Chemistry. 2009;-4:89 .91
31. Horn, CH, Preez, JC, Kilian, SG. Fermentation of grain sorghum starch by Co-cultivation of *Schwanniomyces occidentalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology. 1992;.31-42:27
32. Ge, XY, Qian, H, Zhang, WG. Ethanol production from soybean sirup by co-cultivation of *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biotechnology. 2008;.136S-297S.297
33. Abu, EA, Ado, SA, James, DB. Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on sorghum pomace. African Journal of Biotechnology. 2005;.790-785:(8)4



34. Rodriguez, GC, Tellez, SJ, Vazquezc, M, Lois, JA, Ramirez, JA. Evaluation of sorghum grain hydrolysates and dried distillers grains with solubles for the production of microbial transglutaminase. *Journal of Food*. 2013;.120-115:(2)12
35. Rogers, P, Lee, K, Skotnicki, M, Tribe, D. Microbial reactions: Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*. Springer. 1982;.44-54:37
36. Suribabu, K, Lalitha, T, Hemalatha, KPJ. Optimization of various Nitrogen sources for the production of Alpha-Amylase using *Brevibacillus borstelensis*. *International Journal of current microbiology and applied sciences*. 2014;.-3:791 .800
37. Charis, M, Kordulisb, C, Kanellakib, M. Effect of pressure and temperature on alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on  $\gamma$ -alumina pellets. *Bioresource Technology*. 2012;.498-114:492
38. Magdalena, EL, Bernard, AP, James, C. The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of d -xylose and d -glucose to ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1988;.68-63:(1)28
39. Rodney, P, J,, Paul, F, G,. Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 1982;.223-210:(4)4
40. Plackett, R, L. , Burman, J, P, . The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*. 1946;.25-5:(4)33
41. Box, GEP, Wilson, KB. Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1951;.45-1:(1)13
42. Zar, M, S,, Ali, S, Shahid, A, A,. The influence of carbon and nitrogen supplementation on alpha amylase productivity of *Bacillus amyloliquefaciens* IIB-14 using fuzzy-logic and two-factorial designs. *African Journal of Microbiology Research*. 2013;.129-120:(2)7
43. Zar, M, S,, Ali, S, Haq, I. Optimization of the alpha amylase production from *Bacillus amyloliquefaciens* IIB-1 4 via parameter significance analysis and response surface methodology. *African Journal of Microbiology Research*. 2012;.3855-3845:(17)6

44. Deb, P, Talukdar, S, Mohsina, K, Sarker, P, Sayem, S. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P- .001Springer. 2013;.2:154
45. Carlsen, M, Nielsen, J. Influence of carbon source on alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2001;-346:(3)57 .349
46. Muralikandhan, K, Muthuvelayudham, R, Manikkandan, TR, Viruthagiri, T. Statistical optimization of nutrient medium for the production of alpha-amylase by *Aspergillus oryzae*. International Journal of Recent Scientific. 2013;1140:(7)4–1144,.
47. Zhao, S, Wang, B, Liang, X. Enhanced ethanol production from stalk juice of sweet sorghum by response surface methodology. African Journal of Biotechnology. 2012;.(22)11
48. Shahirah, MNN, Gimbun, J, Pang, SF, Zakria, RM, Cheng, CK, Chua, GK, et al. Influence of nutrient addition on the bioethanol yield from oil palm trunk sap fermented by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2015;.217-23:213
49. Chrisnasari, R, Susetyo, D, Sugianto, A, P, Panjajani, T. Optimization Modeling of Ethanol Production from *Sorghum bicolor* Grain comparison between Separate Hydrolysis and simultaneous saccharification fermentation Microbiology. 2013;.16-9:(1)7



**ภาคผนวก ก**  
**อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม**

**1. Nutrient broth (NB)**

Beef extract	0.3	เปอร์เซ็นต์
peptone	0.5	เปอร์เซ็นต์
อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที		

**2. Nutrient Agar (NA)**

Beef extract	0.3	เปอร์เซ็นต์
Peptone	0.5	เปอร์เซ็นต์
Agar	1.5	เปอร์เซ็นต์
อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที		

**3. Yeast extract Peptone Dextrose broth (YPDB)**

Yeast extract	1.0	เปอร์เซ็นต์
Peptone	2.0	นตเปอร์เซ็นต์
Dextrose	2.0	เปอร์เซ็นต์
อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที		

**4. Yeast extract Peptone Dextrose Agar (YPDA)**

Yeast extract	1.0	เปอร์เซ็นต์
Peptone	2.0	เปอร์เซ็นต์
Dextrose	2.0	เปอร์เซ็นต์
Agar	1.5	เปอร์เซ็นต์
อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที		

**5. Potato Dextrose broth (PDB)**

Potato	300	กรัม
Dextrose	2.0	เปอร์เซ็นต์
อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที		

### 6. Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato	300	กรัม
Dextrose	2.0	เปอร์เซ็นต์
Agar	1.5	เปอร์เซ็นต์

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 7. สูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก

เมล็ดข้าวฟ่าง	10	เปอร์เซ็นต์
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5	เปอร์เซ็นต์
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1	เปอร์เซ็นต์
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1	เปอร์เซ็นต์
NaCl	0.01	เปอร์เซ็นต์
CaCl <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> O	0.01	เปอร์เซ็นต์

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 8. สูตรอาหารภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

เมล็ดข้าวฟ่าง	15	เปอร์เซ็นต์
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.597	เปอร์เซ็นต์
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.333	เปอร์เซ็นต์
CaCl <sub>2</sub>	0.197	เปอร์เซ็นต์
FeSO <sub>4</sub>	0.014	เปอร์เซ็นต์

### 9. สูตรอาหารภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

เมล็ดข้าวฟ่าง	15	เปอร์เซ็นต์
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.657	เปอร์เซ็นต์
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.300	เปอร์เซ็นต์
MgSO <sub>2</sub>	0.102	เปอร์เซ็นต์
NaCl	0.253	เปอร์เซ็นต์

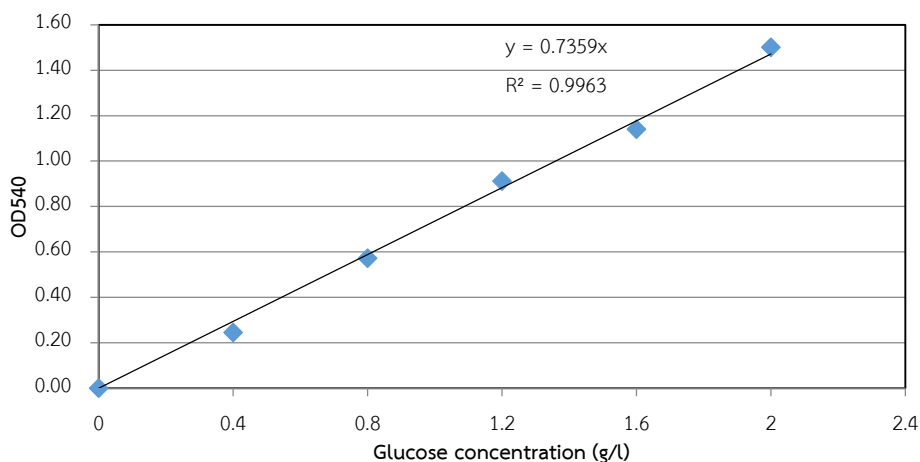
## ภาคผนวก ข

## วิธีวิเคราะห์

## 1. น้ำตาล (reducing sugar) โดยวิธี DNSA

## วิธีการทดลอง

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 0.15 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน ปิดปากหลอดทดลอง นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็น
3. เติมน้ำขจัดไอออน 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายผสมในข้อ 2 ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
4. เตรียม blank โดยใช้ น้ำแทนสารละลายตัวอย่าง แล้วนำไปทำการทดลองเช่นเดียวกันกับสารละลายตัวอย่าง เทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส
  1. เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 2 กรัมต่อลิตร
  2. เจือจางให้ได้ 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2 กรัมต่อลิตร
  3. นำไปทำการทดลองเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่าง แล้วนำไปเขียนกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส แสดงในรูปที่ ข.1



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

## 2. กิจกรรมของเอนไซม์อะไมโลไลติก

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

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

วิธีในการวิเคราะห์

1. เตรียมสับสเตรทโดยใช้สารละลายน้ำแป้งสุกปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร สารละลาย acetate Buffer 0.1 M pH 5.8 ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. เติมตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ (เอนไซม์) ความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายสับสเตรทในข้อ นำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 10 นาที
3. วัดปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาในข้อ 3 ด้วยวิธี DNSA โดยใช้ 0.1 M acetate buffer เป็น blank แทนเอนไซม์

วิธีการคำนวณค่า Unit of enzyme

$$\begin{aligned} \text{หน่วยเอนไซม์ } 1 &= 1 \text{ mole ของ substrate ที่ถูกย่อยใน } 1 \text{ นาที} \\ &= 1 \text{ mole ของ glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน } 1 \text{ นาที} \\ &= 0.18 \text{ มิลลิกรัม ของ glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน } 1 \text{ นาที} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ถ้า } 0.18 \text{ มิลลิกรัม glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน } 1 \text{ นาที มีค่า } & 1 \text{ หน่วย} \\ 1 \text{ มิลลิกรัม glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน } 10 \text{ นาที มีค่า } & 1 / (0.18 \times 10) \text{ หน่วย} \\ &= 0.556 \text{ นาที} \end{aligned}$$

เมื่อใช้เอนไซม์ 0.05 มิลลิลิตร สามารถปล่อย glucose B มิลลิกรัม ใน 10

$$\text{นาที} = B \times 0.556 \text{ หน่วย}$$

เมื่อใช้เอนไซม์ 1 มิลลิลิตร สามารถปล่อย glucose B มิลลิกรัม ใน 10 นาที มีค่า

$$= (B \times 0.556) / 0.05 \text{ หน่วยต่อมิลลิลิตร}$$

## 3. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีเจลดาล์ (Kjeldahl protein, A.O.A.C., 1975)

1. ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม เติมตัวเร่งปฏิกิริยาใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วยโปรแตสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟตอัตราส่วน 95:5 ลงไปจำนวน 7 กรัม จากนั้นเติมกรดซัลฟูริก 15 มิลลิลิตร

2. นำไปย่อยบนเตาหลุมจนสารละลายเป็นเวลา 45 นาที ที่งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร

3. จากนั้นนำไปประกอบเข้ากับเครื่องกลั่นไนโตรเจน และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หรือจนสารละลายเป็นสีดำ แล้วกลั่นจับก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่เติมอินดิเคเตอร์เมทิลเรดเมทิลีนบลู (methyl red methylene blue) 1 หยด กลั่นจนสารละลายบอริกมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร

4. นำสารละลายที่กลั่นได้มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรตแล้วคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนหรือปริมาณโปรตีน

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = (\text{ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริก(มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริก(M)} \times 1.4) / \text{น้ำหนักแห้ง}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์โปรตีน} = \text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} \times 6.25$$



#### 4. ปริมาณเอทานอล

วิธีการ

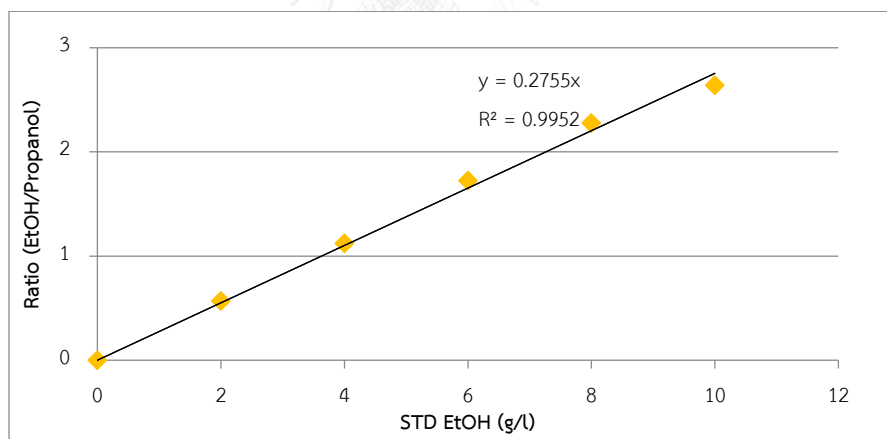
1. เตรียมตัวอย่างที่ใช้ฉีด GC โดยการปั่นเหวี่ยงก่อนที่ 10000 รอบต่อนาที 5 นาที นำส่วนใสไปกรองด้วยไมโครฟิวเตอร์

2. ทำกราฟมาตรฐานของเอทานอลโดยเตรียมความเข้มข้นที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10 กรัมต่อลิตร

3. ผสมตัวอย่างเอทานอล จากข้อ 2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กับ 3 กรัมต่อลิตร propanol ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (Internal standard) ฉีด GC ที่ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

4. นำตัวอย่างที่กรองแล้วทำตามข้อ 3 แล้วเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลกับกราฟมาตรฐาน  
วิธีการคำนวณ

ค่า Peak area ได้จากการวัดด้วยเครื่อง Gas Liquid Chromatography ในการคำนวณนำค่า Peak area ของเอทานอลมาตรฐานหารด้วย Peak area ของ propanol จะได้ค่าเป็น ratio นำไป plot กราฟมาตรฐานของเอทานอล ดังรูปที่ ข.2 จากนั้นหาค่า Peak area ของตัวอย่างหารด้วย Peak area ของ propanol ได้ ratio นำเทียบกับค่าปริมาณเอทานอลจากกราฟมาตรฐาน ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร



รูปที่ ข. 2 กราฟมาตรฐานเอทานอล

## ภาคผนวก ค

## ตารางสถิติ

## ตารางสถิติของการทดลองแบบ Random block design (RBD)

1. ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

ตารางที่ ค.1 ตาราง ANOVA ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

## Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: EA

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5143.859(a)	59	87.184	367004.993	.000
Intercept	15128.990	1	15128.990	63686126.385	.000
Nitrogen	.974	3	.325	1367.319	.000
Cabon	642.745	2	321.372	1352831.047	.000
Time	4184.844	4	1046.211	4404069.743	.000
Nitrogen * Cabon	3.683	6	.614	2583.726	.000
Nitrogen * Time	8.368	12	.697	2935.547	.000
Cabon * Time	278.394	8	34.799	146489.077	.000
Nitrogen * Cabon * Time	24.851	24	1.035	4358.752	.000
Error	.029	120	.000		
Total	20272.877	180			
Corrected Total	5143.888	179			

a R Squared = 0.989 (Adjusted R Squared = 0.979)

ตารางที่ ค.2 ตาราง Homogeneous ชนิดแหล่งไนโตรเจนของภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

**Homogeneous Subsets(Nitrogen source)**

Nitrogen		N	Subset			
		1	2	3	4	1
Tukey	Yeast_extract	45	9.108564			
HSD	Peptone	45	9.116102			
(a,b)	Urea	45		9.155278		
	(NH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	45			9.291558	
	Sig.		.099	1.000	1.000	
Duncan	Yeast_extract	45	9.108564			
(a,b)	Peptone	45		9.116102		
	Urea	45			9.155278	
	(NH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	45				9.291558
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 5.149

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000

b Alpha = 0.05

ตารางที่ ค.3 ตาราง Homogeneous ปริมาณแหล่งคาร์บอนของภาวะเหมาะสมในการผลิต  
เอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

Homogeneous Subsets(Carbon source)

Cabon	N	Subset		
		1	2	3
Tukey HSD(a,b)	5g/l	60	7.221568	
	10g/l	60		8.555115
	15g/l	60		11.726943
	Sig.		1.000	1.000
Duncan (a,b)	5g/l	60	7.221568	
	10g/l	60		8.555115
	15g/l	60		11.726943
	Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 5.149.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 40.000.

b Alpha = 0.05

ตารางที่ ค.3 ตาราง Homogeneous เวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

Homogeneous Subsets(Time source)

Time	N	Subset				
	1	2	3	4	5	1
Tukey HSD(a,b)						
0h	36	.724700				
12h	36		7.787383			
48h	36			10.057119		
36h	36				12.551119	
24h	36					14.719056
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Duncan (a,b)						
0h	36	.724700				
12h	36		7.787383			
48h	36			10.057119		
36h	36				12.551119	
24h	36					14.719056
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 5.149.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000.

b Alpha = 0.05

2.ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

ตารางที่ ค.4 ตาราง ANOVA ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: EA

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1974.308(a)	59	33.463	2627.842	.000
Intercept	5058.709	1	5058.709	397261.033	.000
Nitrogen	1.022	3	.341	26.756	.000
Cabon	317.717	2	158.859	12475.188	.000
Time	1510.196	4	377.549	29648.977	.000
Nitrogen * Cabon	1.379	6	.230	18.050	.000
Nitrogen * Time	2.445	12	.204	16.000	.000
Cabon * Time	135.050	8	16.881	1325.690	.000
Nitrogen * Cabon * Time	6.498	24	.271	21.263	.000
Error	1.528	120	.013		
Total	7034.546	180			
Corrected Total	1975.836	179			

a R Squared = 0.985 (Adjusted R Squared = 0.971)

ตารางที่ ค.5 ตาราง Homogeneous ชนิดแหล่งไนโตรเจนของภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

**Homogeneous Subsets(Nitrogen source)**

Nitrogen		N	Subset		
			1	2	3
Tukey HSD(a,b)	Peptone	45	5.178793		
	Urea	45		5.319807	
	Yeast_extract	45		5.322107	
	(NH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	45			5.384553
	Sig.		1.000	1.000	1.000
Duncan (a,b)	Peptone	45	5.178793		
	Urea	45		5.319807	
	Yeast_extract	45		5.322107	
	(NH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	45			5.384553
	Sig.		1.000	.923	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 3.183

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000

b Alpha = 0.05

ตารางที่ ค.6 ตาราง Homogeneous ปริมาณแหล่งคาร์บอนของภาวะเหมาะสมในการผลิต  
เอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

**Homogeneous Subsets(Carbon source)**

Cabon		N	Subset		
		1	2	3	1
Tukey	5g/l	60	3.980055		
HSD(a,b)	10g/l	60		4.805075	
	15g/l	60			7.118815
	Sig.		1.000	1.000	1.000
Duncan	5g/l	60	3.980055		
(a,b)	10g/l	60		4.805075	
	15g/l	60			7.118815
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 3.183

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 40.000

b Alpha = 0.05



ตารางที่ ค.7 ตาราง Homogeneous เวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

Homogeneous Subsets(Time source)

Time	N	Subset					
		1	2	2	3	4	5
Tukey HSD(a,b)	0h	36	.423833				
	12h	36		14.654128			
	48h	36			18.365748		
	36h	36				20.038114	
	24h	36					23.712332
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Duncan (a,b)	0h	36	.423833				
	12h	36		14.654128			
	48h	36			18.365748		
	36h	36				20.038114	
	24h	36					23.712332
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 3.183

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000

b Alpha = 0.05

### ตารางสถิติของการทดลองแบบ Plackett-burman

3.ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

ตารางที่ ค.8 ตาราง ANOVA ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

#### Effect and Coefficients

Term	Effect	Coef.	SE Coef.	T-Value	P-Value
Constant		17.663	0.353	50.04	0.000
A	-2.989	-1.495	0.353	-4.23	0.008
B	-1.856	-0.928	0.353	-2.63	0.047
C	0.499	0.514	0.257	0.353	0.73
D	2.559	1.280	0.353	3.62	0.015
E	-0.954	-0.477	0.353	-1.35	0.234
F	-2.245	-1.122	0.353	-3.18	0.025

ตารางที่ ค.9 ตาราง ANOVA ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

#### Effect and Coefficients

Term	Effect	Coef.	SE Coef.	T-Value	P-Value
Constant		13.448	0.247	54.43	0.000
A	-1.329	-0.665	0.247	-2.69	0.036
B	-1.786	-0.893	0.247	-3.61	0.011
C	-1.424	-0.712	0.247	-2.88	0.028
D	-0.559	-0.279	0.247	-1.13	0.301
E	0.763	0.382	0.247	1.54	0.173

4.ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*

ตารางที่ ค.10 ตาราง ANOVA ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*

**Effect and Coefficients**

Term	Effect	Coef.	SE Coef.	T-Value	P-Value
Constant		11.667	0.377	30.97	0.000
A	0.614	0.307	0.377	0.82	0.452
B	-0.429	-0.214	0.377	-0.57	0.594
C	-0.470	-0.235	0.377	-0.62	0.560
D	-0.538	-0.269	0.377	-0.71	0.507
E	3.513	1.757	0.377	4.66	0.006
F	4.731	2.365	0.377	6.28	0.002

ตารางสถิติของการทดลองแบบ Response surface method (RSM)

1.ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

ตารางที่ ค.11 ตาราง ANOVA ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

ANOVA for Response Surface Quadratic model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-value Prob > F
Model	37.93968	14	2.709977	7.475334	0.000196
A-A	8.734054	1	8.734054	24.09244	0.000189
B-B	7.555451	1	7.555451	20.84132	0.000372
C-C	0.236584	1	0.236584	0.652604	0.431808
D-D	13.52605	1	13.52605	37.3109	2E-05
AB	0.680236	1	0.680236	1.876396	0.190902
AC	0.02553	1	0.02553	0.070423	0.794334
AD	0.006163	1	0.006163	0.017	0.897994
BC	0.28993	1	0.28993	0.799758	0.385291
BD	1.011608	1	1.011608	2.790469	0.115555
CD	0.144092	1	0.144092	0.397471	0.537886
A <sup>2</sup>	3.07663	1	3.07663	8.486726	0.010704
B <sup>2</sup>	3.205211	1	3.205211	8.84141	0.009471
C <sup>2</sup>	0.000161	1	0.000161	0.000445	0.983453
D <sup>2</sup>	0.351818	1	0.351818	0.970471	0.340187
Residual	5.437839	15	0.362523		
Lack of Fit	5.422123	10	0.542212	172.5039	1.04E-05
Pure Error	0.015716	5	0.003143		
Cor Total	43.37752	29			

ตารางที่ ค.12 ตาราง ANOVA ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae*  
TISTR 3086

Sequential Model Sum of Squares [Type I]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value
					Prob > F
Mean vs Total	11007.244	1	11007.244		
Linear vs Mean	30.052135	4	7.5130336	14.095339	3.782E-06
2FI vs Linear	2.1575595	6	0.3595933	0.6117816	0.7181572
Quadratic vs 2FI	5.729989	4	1.432497	3.95147	0.021954
Cubic vs Quadratic	1.411053	8	0.176382	0.306614	0.940223
Residual	4.026786	7	0.575255		
Total	11050.62	30	368.3541		

ตารางที่ ค.13 ตาราง ANOVAภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae*  
TISTR 3086

Std. Dev.	0.602098	R-Squared	0.874639
Mean	19.15485	Adj R-Squared	0.757636
C.V. %	3.143322	Pred R-Squared	0.279487
PRESS	31.25406	Adeq Precision	9.46262

ตารางที่ ค.14 ตาราง ANOVA ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

ANOVA for Response Surface Quadratic model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-value
					Prob > F
Model	28.47489743	14	2.033921	7.287724	0.000227
A-A	10.93214769	1	10.93215	39.17088	1.53E-05
B-B	4.689029692	1	4.68903	16.80122	0.000948
C-C	0.13681804	1	0.136818	0.490231	0.494541
D-D	0.034554068	1	0.034554	0.12381	0.729832
AB	0.176207494	1	0.176207	0.631367	0.439246
AC	0.152990136	1	0.15299	0.548178	0.470495
AD	0.004002559	1	0.004003	0.014342	0.906266
BC	0.132082741	1	0.132083	0.473264	0.50199
BD	0.005123421	1	0.005123	0.018358	0.894026
CD	0.000204937	1	0.000205	0.000734	0.978739
A^2	5.498354712	1	5.498355	19.7011	0.000478
B^2	6.430891525	1	6.430892	23.04247	0.000234
C^2	2.429974933	1	2.429975	8.706821	0.009919
D^2	2.58311791	1	2.583118	9.255546	0.008232
Residual	4.186329975	15	0.279089		
Lack of Fit	4.175127047	10	0.417513	186.3409	8.63E-06
Pure Error	0.011202929	5	0.002241		
Cor Total	32.6612274	29			

ตารางที่ ค.15 ตาราง ANOVA ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

Sequential Model Sum of Squares [Type I]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-value Prob > F
Mean vs Total	5752.068366	1	5752.0684		
Linear vs Mean	15.7925495	4	3.9481374	5.8512845	0.0018236
2FI vs Linear	0.470611288	6	0.0784352	0.0908808	0.9965281
Quadratic vs 2FI	12.21173664	4	3.0529342	10.93894	0.0002352
Cubic vs Quadratic	1.535725885	8	0.1919657	0.5069637	0.8192894
Residual	2.65060409	7	0.3786577		
Total	5784.729594	30	192.8243		

ตารางที่ ค.16 ตาราง ANOVA ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

Std. Dev.	0.528288	R-Squared	0.871826
Mean	13.84686	Adj R-Squared	0.752196
C.V. %	3.815221	Pred R-Squared	0.263198
PRESS	24.06486	Adeq Precision	8.407669

2.ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S.cerevisiae*

ตารางที่ ค.17 ตาราง ANOVA ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*

ANOVA for Response Surface Linear Model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	56.46946	2	28.23473	63.17404	< 0.0001
A-A	49.90577	1	49.90577	111.6621	< 0.0001
B-B	6.563689	1	6.563689	14.68598	0.0033
Residual	4.469356	10	0.446936		
Lack of Fit	4.459893	6	0.743316	314.2012	< 0.0001
Pure Error	0.009463	4	0.002366		
Cor Total	60.93881	12			



ตารางที่ ค.18 ตาราง ANOVA ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*

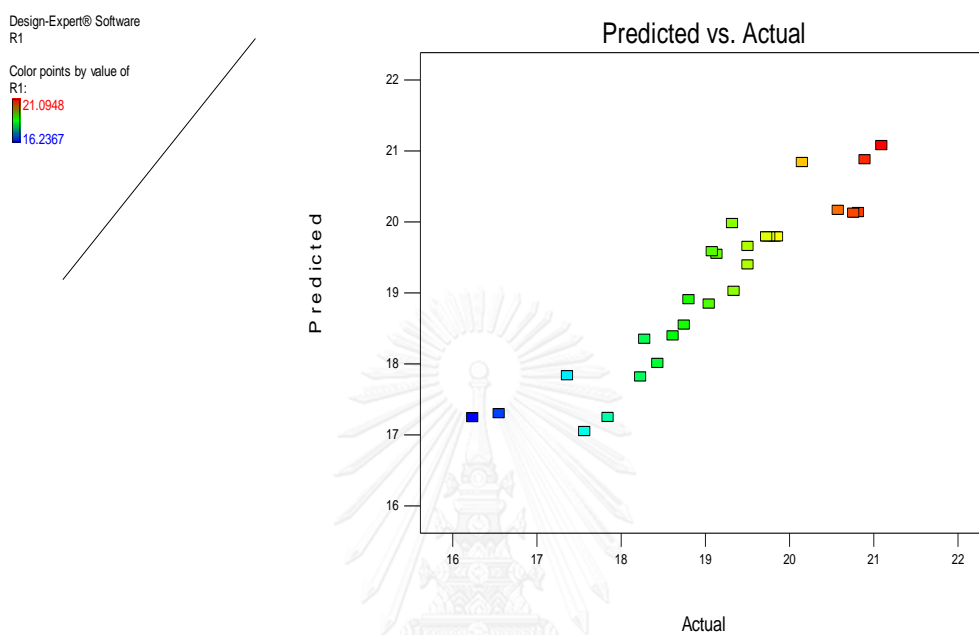
Sequential Model Sum of Squares [Type I]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Mean vs Total	1734.441	1	1734.441		
Linear vs Mean	56.46946	2	28.23473	63.17404	< 0.0001
2FI vs Linear	0.031576	1	0.031576	0.064037	0.8059
Quadratic vs 2FI	2.451354	2	1.225677	4.319183	0.0600
Cubic vs Quadratic	0.44902	2	0.22451	0.730158	0.5270
Residual	1.537407	5	0.307481		
Total	1795.38	13	138.1062		

ตารางที่ ค.19 ตาราง ANOVA ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างโดย *A. oryzae* TISTR 3086 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*

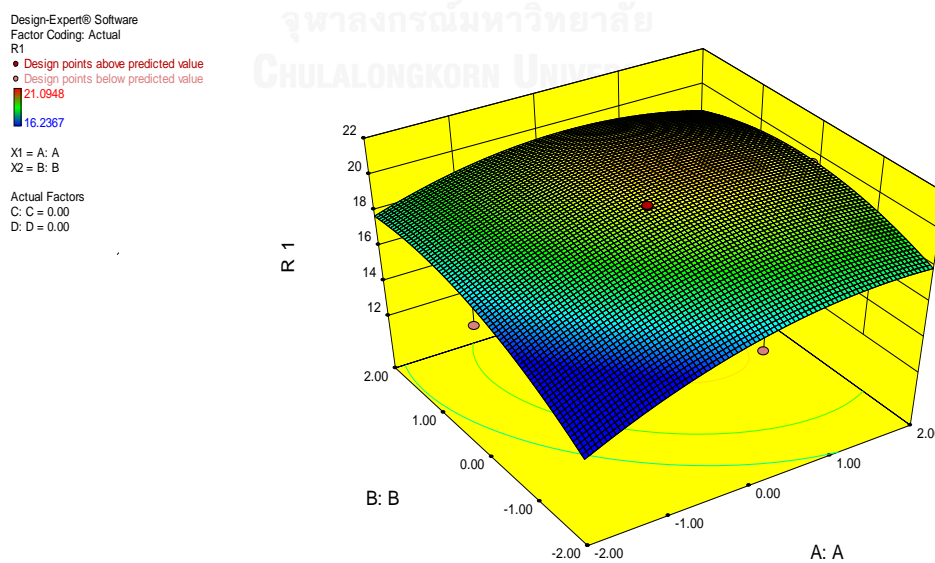
Std. Dev.	0.668532	R-Squared	0.926658
Mean	11.5507	Adj R-Squared	0.91199
C.V. %	5.787811	Pred R-Squared	0.863733
PRESS	8.303962	Adeq Precision	21.99702

## ภาพจากการทดลองแบบ Response surface method (RSM)

### 1. ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก



รูปที่ ค.1 Normal plot ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ  
*A. oryzae* TISTR 3086



รูปที่ ค.2 จุดสมมุติระหว่างตัวแปร A และ B ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ  
*A. oryzae* TISTR 3086

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual

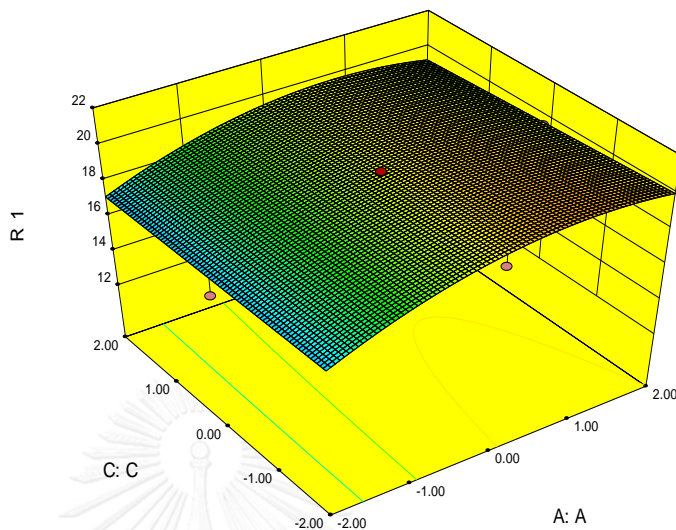
R1

- Design points above predicted value
- Design points below predicted value

21.0948  
16.2367

X1 = A: A  
X2 = C: C

Actual Factors  
B: B = 0.00  
D: D = 0.00



รูปที่ ค.3 จุดสมมุติระหว่างตัวแปร A และ C ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual

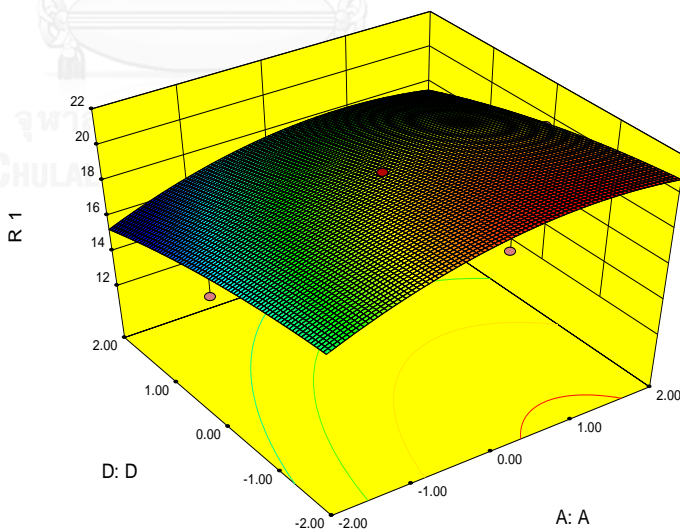
R1

- Design points above predicted value
- Design points below predicted value

21.0948  
16.2367

X1 = A: A  
X2 = D: D

Actual Factors  
B: B = 0.00  
C: C = 0.00



รูปที่ ค.4 จุดสมมุติระหว่างตัวแปร A และ D ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual

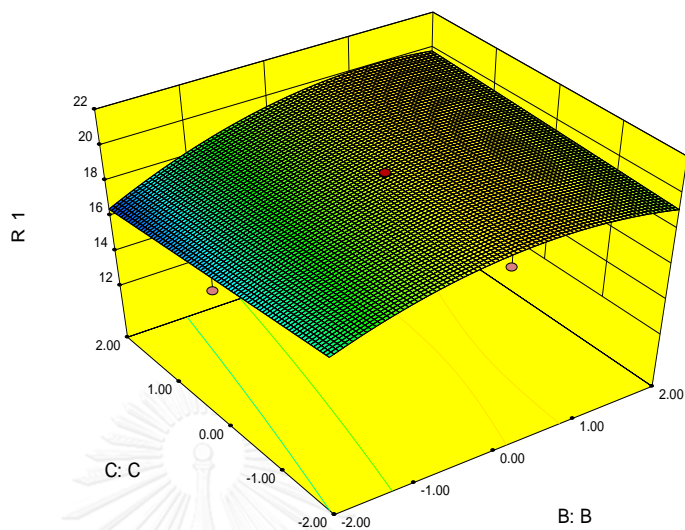
R1

- Design points above predicted value
- Design points below predicted value

21.0948  
16.2367

X1 = B: B  
X2 = C: C

Actual Factors  
A: A = 0.00  
D: D = 0.00



รูปที่ ค.5 จุดสมมุติระหว่างตัวแปร B และ C ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual

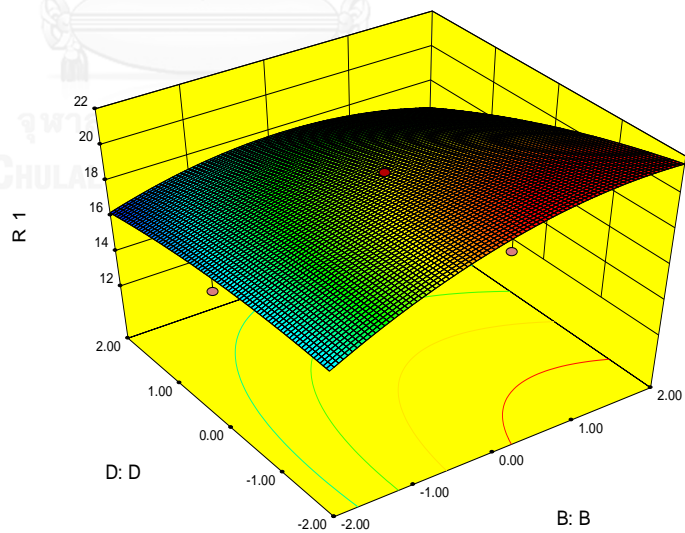
R1

- Design points above predicted value
- Design points below predicted value

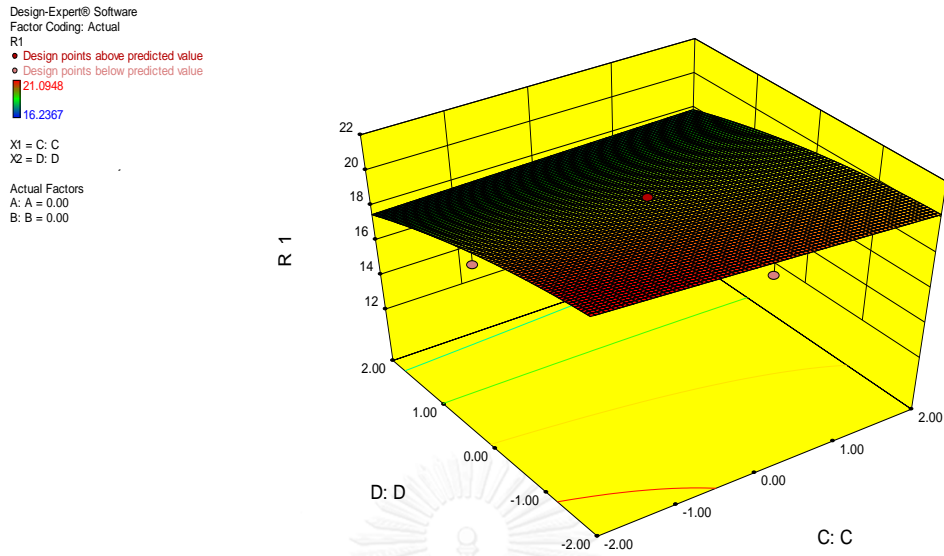
21.0948  
16.2367

X1 = B: B  
X2 = D: D

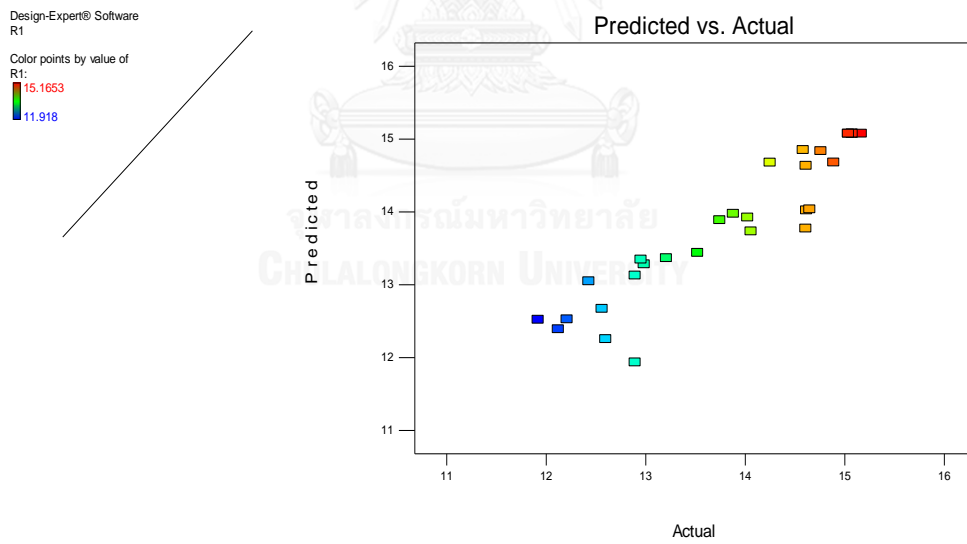
Actual Factors  
A: A = 0.00  
C: C = 0.00



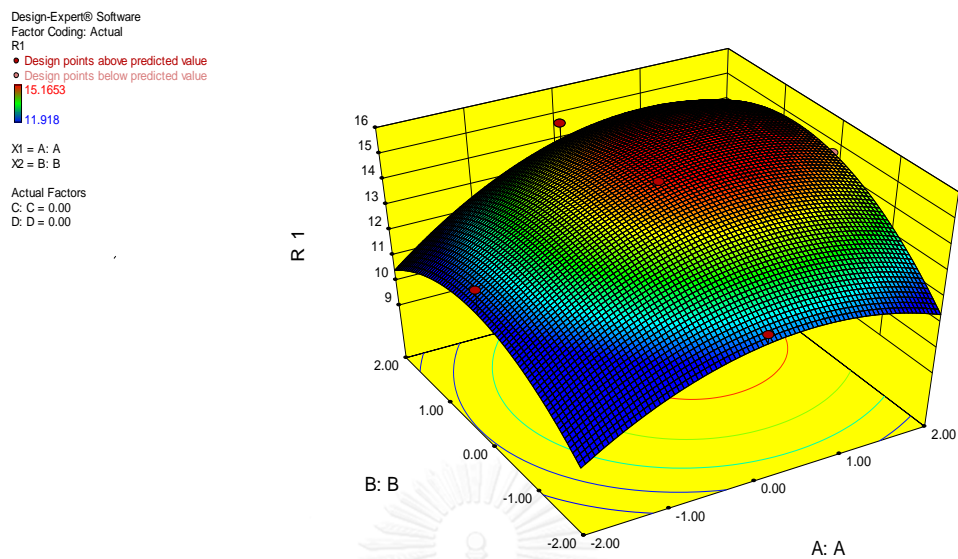
รูปที่ ค.6 จุดสมมุติระหว่างตัวแปร B และ D ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086



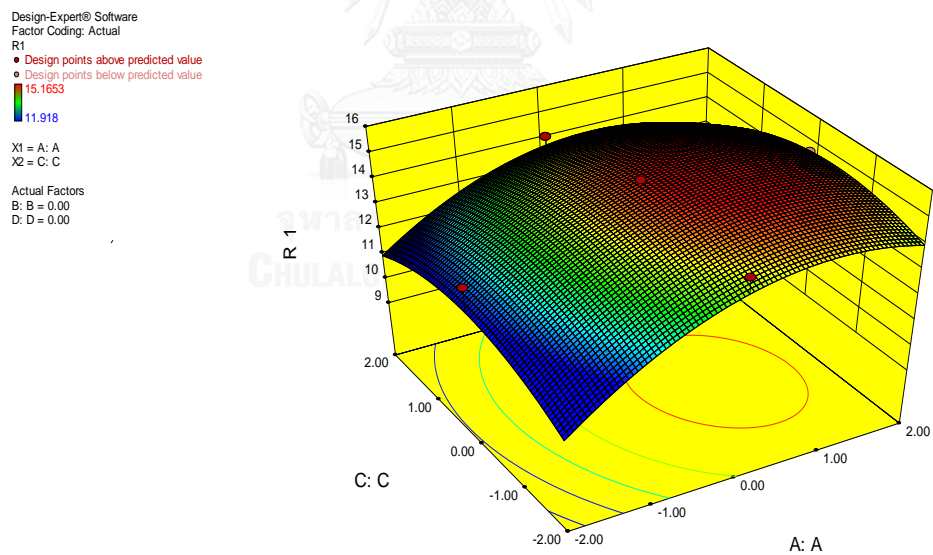
รูปที่ ค.7 จุดสมมุติระหว่างตัวแปร C และ D ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *A. oryzae* TISTR 3086



รูปที่ ค.8 Normal plot ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

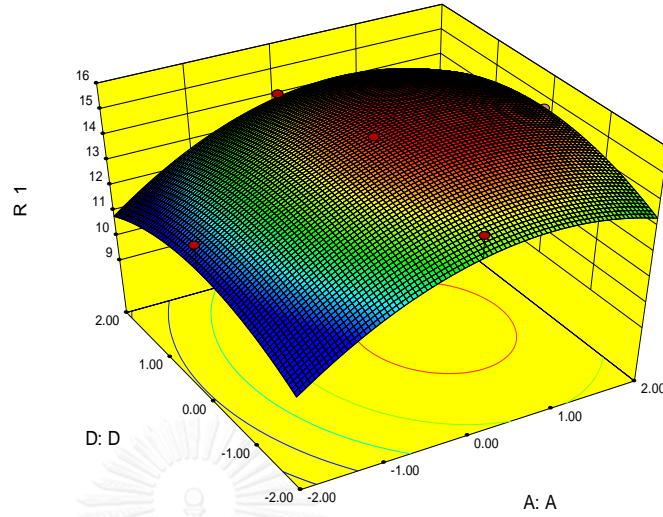


รูปที่ ค.9 จุดสมมุติระหว่างตัวแปร A และ B ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045



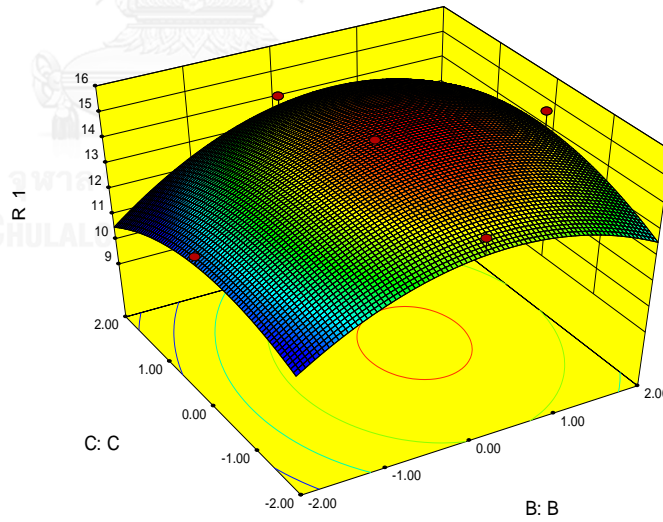
รูปที่ ค.10 จุดสมมุติระหว่างตัวแปร A และ C ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 R1  
 ● Design points above predicted value  
 ● Design points below predicted value  
 15.1653  
 11.918  
 X1 = A: A  
 X2 = D: D  
 Actual Factors  
 B: B = 0.00  
 C: C = 0.00



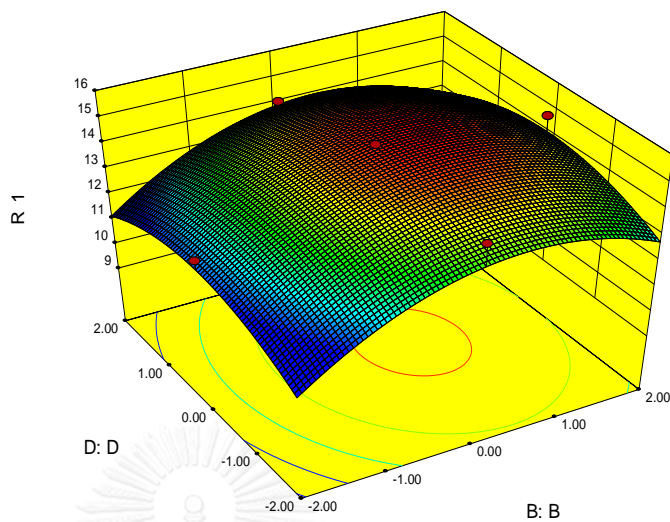
รูปที่ ค.11 จุดสมมูลระหว่างตัวแปร A และ D ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 R1  
 ● Design points above predicted value  
 ● Design points below predicted value  
 15.1653  
 11.918  
 X1 = B: B  
 X2 = C: C  
 Actual Factors  
 A: A = 0.00  
 D: D = 0.00



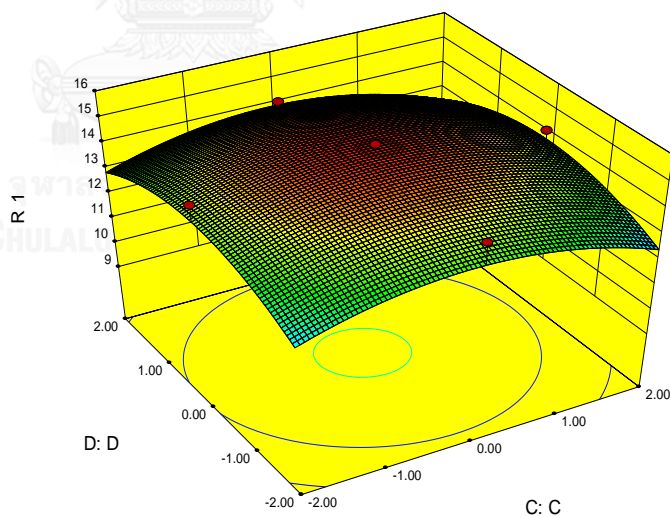
รูปที่ ค.12 จุดสมมูลระหว่างตัวแปร B และ C ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 R1  
 ● Design points above predicted value  
 ● Design points below predicted value  
 15.1653  
 11.918  
 X1 = B: B  
 X2 = D: D  
 Actual Factors  
 A: A = 0.00  
 C: C = 0.00



รูปที่ ค.13 จุดสมมูลระหว่างตัวแปร B และ D ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045

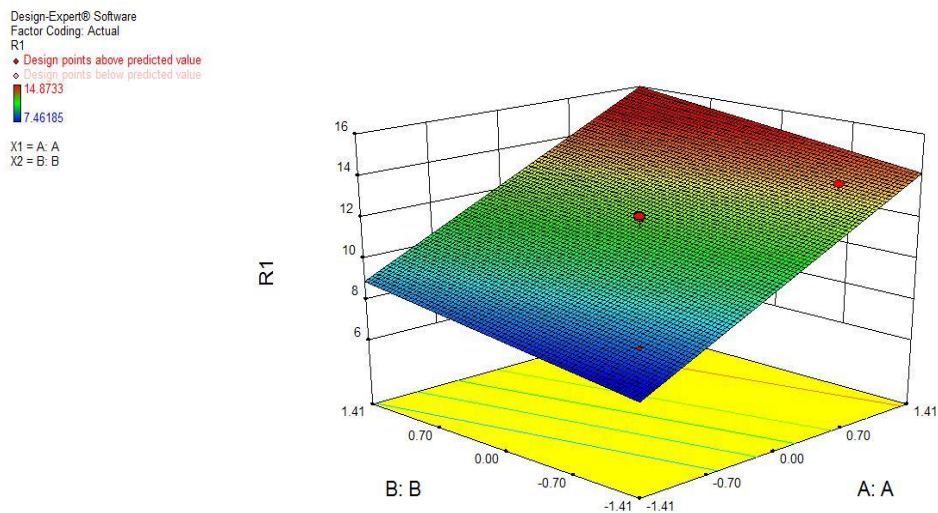
Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 R1  
 ● Design points above predicted value  
 ● Design points below predicted value  
 15.1653  
 11.918  
 X1 = C: C  
 X2 = D: D  
 Actual Factors  
 A: A = 0.00  
 B: B = 0.00



รูปที่ ค.14 จุดสมมูลระหว่างตัวแปร C และ D ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกของ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045



2.ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เเพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*



รูปที่ ค.13 จุดสมมุติระหว่าง A และ B ของภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดย *A. oryzae* TISTR 3086 เเพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae*

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายชยุตม์ อินตะยะ เกิดวันที่ 30 สิงหาคม พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดตาก สำเร็จการศึกษา  
ระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์  
มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2553 ต่อมาได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554

#### การเสนอผลงานวิจัย

Intaya C.and Teeradakorn S, Optimization of medium components for  
amylase production using the Plackett-Burman design a statistical approach. The  
26nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International  
Conference TSB2014 : Bio-energy and Biomass, 26-29 November, 2014, Mae Fah  
Luang University, Chiang Rai, Thailand.