บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การศึกษาหาปริมาตรกรดซัลฟิวริกที่เหมาะสมในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส

ภายหลังการเติมน้ำกลั่นแทนกรดซัลฟิวริกในช่วงปริมาตร 0.1 – 5.0 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างควบคุมและปล่อยให้เอนไซม์อะไมเลสทำปฏิกิริยาต่อเป็นเวลา 10 นาที (ภาพที่ 4.1) พบการผลิตน้ำตาลกลูโคสในช่วง 0.81 – 1.34 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.2 (ก) และ (ข)) ในขณะที่การเติมกรดซัลฟิวริกปริมาตรตั้งแต่ 1 - 5 มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสที่ใช้ย่อยแป้งข้าวโพดได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ของสารละลายส่งผลต่อประจุที่เกิดขึ้นบนโมเลกุลของเอนไซม์ที่เป็นโปรตีน โดยเฉพาะ active site ซึ่งเป็นบริเวณที่เอนไซม์ต้องเข้ารวมตัวกับสารตั้งต้นทำให้ความเร็วของปฏิกิริยาช้าลง (นิธิยา, 2549) การเติมกรดซัลฟิวริกในระดับ 0.1 – 0.5 มิลลิลิตร ยังสังเกตเห็นการผลิตน้ำตาลกลูโคสในช่วง 0.03 – 0.04 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกกรดซัลฟิวริกปริมาตร 1 มิลลิลิตรสำหรับการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากเป็นปริมาตรน้อยที่สุดในช่วง 1.0 – 5.0 มิลลิลิตร ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสได้อย่างสมบูรณ์

ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างควบคุมที่เติมน้ำกลั่นแทนกรดซัลฟิวริกเข้มข้นเพื่อทดลองยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์อะไมเลส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.1 ผลกระทบของความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกที่ใช้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส

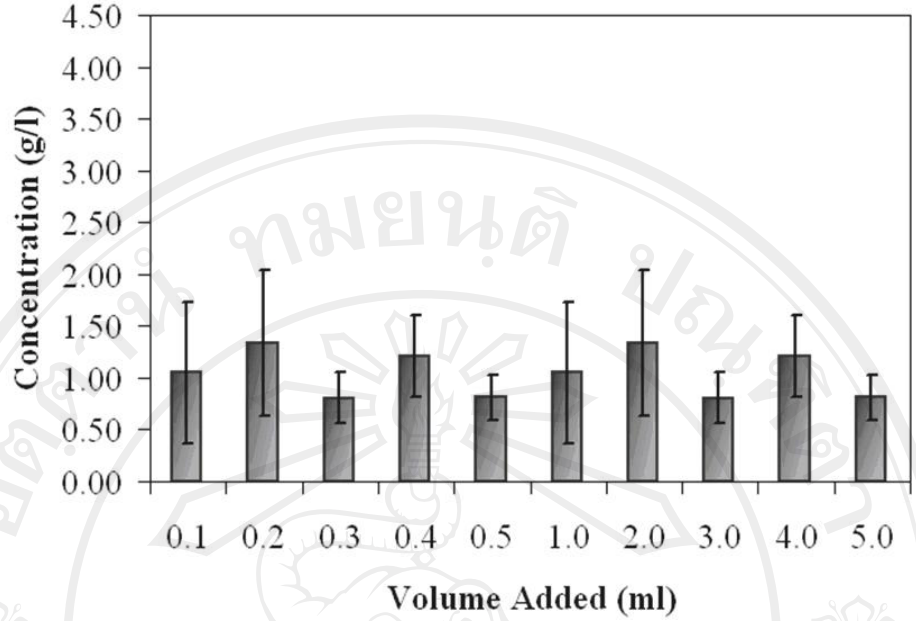
ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร) ภายหลังการหยุดปฏิกิริยาด้วย		pH
	กรดซัลฟิวริก	น้ำกลั่น	
0.1	0.034 ± 0.001^{b}	1.049 ± 0.689^{ns}	2.05 ± 0.00^{j}
0.2	0.029 ± 0.001^{b}	1.336 ± 0.698^{ns}	1.93 ± 0.00^{i}
0.3	0.032 ± 0.004^{b}	0.808 ± 0.246^{ns}	1.85 ± 0.00^{h}
0.4	0.031 ± 0.003^{b}	1.209 ± 0.392^{ns}	1.77 ± 0.01^{g}
0.5	0.036 ± 0.000^{b}	0.809 ± 0.212^{ns}	1.71 ± 0.00^{f}
1.0	0.000 ± 0.000^{a}	1.049 ± 0.681^{ns}	1.60 ± 0.00^{e}
2.0	0.000 ± 0.000^{a}	1.336 ± 0.698^{ns}	1.47 ± 0.00^{d}
3.0	0.000 ± 0.000^{a}	0.808 ± 0.246^{ns}	1.39 ± 0.00^{c}
4.0	0.000 ± 0.000^{a}	1.209 ± 0.391^{ns}	1.31 ± 0.00^{b}
5.0	0.000 ± 0.000^{a}	0.809 ± 0.212^{ns}	1.24 ± 0.00^{a}

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

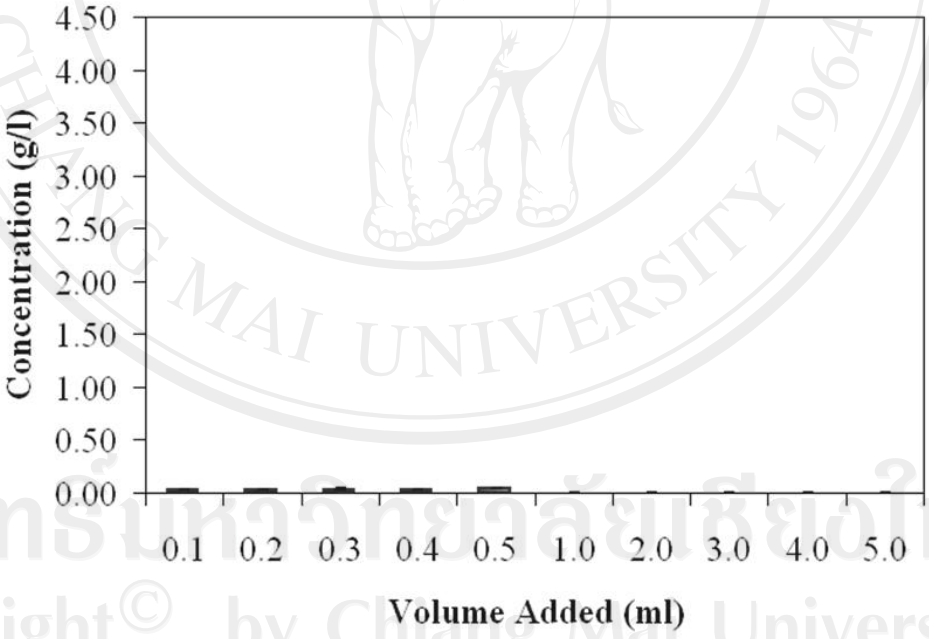
: ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก a – j ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

: ns ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



(ก)



(ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 4.2 ผลกระทบของการเติม (ก) น้ำและ (ข) กรดซัลฟิวริกปริมาตร 0.1 – 5.0 มิลลิลิตร ต่อการผลิตน้ำตาลกลูโคสในขวดทดลองที่มีสารผสมแป้งข้าวโพดร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเอนไซม์อะไมเลสเกรดการค้า 1 มิลลิลิตร

4.2 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่ได้หลังการย่อยเศษของแข็งเหลือทิ้งระหว่างเอนไซม์อะไมเลสเกรดบริสุทธิ์และเกรดการค้า

การย่อยแป้งข้าวโพดซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุม (positive control) พบการเกิดตะกอนเจลแป้งหลังการย่อย (ภาพที่ 4.3) เนื่องจากต้องใช้อุณหภูมิระหว่าง 60 – 80 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของแป้งข้าวโพดที่มีช่วงการเกิดปฏิกิริยาเจลาติไนเซชันที่ช่วงอุณหภูมิ 66 – 177 องศาเซลเซียส (นิธิยา, 2549) อย่างไรก็ตามการย่อยแป้งข้าวโพดได้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดมากกว่าการย่อยเศษของแข็งเหลือทิ้งประมาณ 2 - 3 เท่า ดังตารางที่ 4.2 - 4.3 และภาพที่ 4.4(ข) และ 4.5(ข) ในขณะที่การใช้เอนไซม์อะไมเลสเกรดบริสุทธิ์สามารถย่อยเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อน้ำกลั่นสัดส่วนร้อยละ 5.0 – 12.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดที่ระดับ 2.94 ± 0.43 ถึง 5.11 ± 0.38 กรัมต่อลิตร หรือ 40.9 ± 3.02 ถึง 58.9 ± 8.57 กรัมต่อวัตถุดิบ 100 กรัม มากกว่าการใช้เอนไซม์อะไมเลสเกรดการค้าที่ผลิตได้ 0.58 ± 0.04 ถึง 1.32 ± 0.20 กรัมต่อลิตร หรือ 9.99 ± 1.63 ถึง 11.7 ± 0.88 กรัมต่อวัตถุดิบ 100 กรัม ดังตารางที่ 4.2 – 4.3 และภาพที่ 4.4(ก) และ 4.5(ก) ในขณะที่การใช้เอนไซม์อะไมเลสเกรดบริสุทธิ์และเกรดการค้า สำหรับย่อยเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อน้ำกลั่นสัดส่วนร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดไม่แตกต่างจากสัดส่วนร้อยละ 12.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามแม้การใช้เอนไซม์อะไมเลสเกรดบริสุทธิ์ จะสามารถผลิตน้ำตาลทั้งหมดได้มากกว่าการใช้เอนไซม์อะไมเลสเกรดการค้าประมาณ 3 – 5 เท่า แต่เอนไซม์อะไมเลสเกรดบริสุทธิ์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสจาก *Aspergillus niger* ราคา 76.27 บาทต่อมิลลิลิตร (Sigma, 2009a) และเอนไซม์อะไมเลสจาก *A. oryzae* ราคา 94.23 บาทต่อมิลลิลิตร (Sigma, 2009b) แพงกว่าเอนไซม์อะไมเลส เกรดการค้าที่มีราคาเพียง 0.49 บาทต่อมิลลิลิตร (Wuxi Colotex Bio-Technology, 2009) ประมาณ 155 และ 192 เท่า ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้เอนไซม์อะไมเลสเกรดการค้าสำหรับการทดลองขั้นต่อไปเนื่องจากมีราคาถูกกว่ามาก

ภาพที่ 4.3 เจลแป้งข้าวโพดหลังการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส ณ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดของเศษของแข็งเหลือทิ้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสเกรดบริสุทธิ์และเกรดการค้า

สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อน้ำกลั่น (%w/v)	ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อวัตถุดิบ 100 กรัม)	
	เอนไซม์อะไมเลสเกรดบริสุทธิ์	เอนไซม์อะไมเลสเกรดการค้า	เอนไซม์อะไมเลสเกรดบริสุทธิ์	เอนไซม์อะไมเลสเกรดการค้า
0.0	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
5.0	2.94 ± 0.43^{b}	0.58 ± 0.04^{b}	58.9 ± 8.57^{c}	11.7 ± 0.88^{b}
7.5	3.77 ± 0.43^{bc}	0.84 ± 0.08^{bc}	50.2 ± 5.74^{bc}	11.1 ± 1.07^{b}
10.0	4.30 ± 0.24^{cd}	1.00 ± 0.16^{cd}	43.0 ± 2.38^{b}	9.99 ± 1.63^{b}
12.5	5.11 ± 0.38^{d}	1.32 ± 0.20^{d}	40.9 ± 3.02^{b}	10.6 ± 1.59^{b}

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

: ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก a – d ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

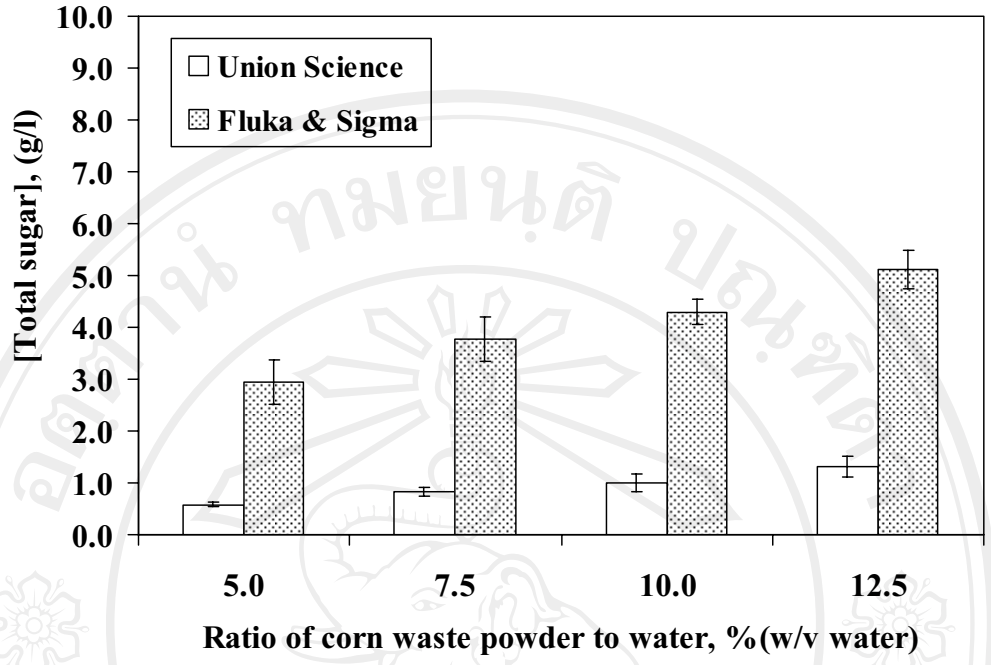
ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดของแป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสเกรดบริสุทธิ์และเกรดการค้า

สัดส่วน แป้งข้าวโพดต่อน้ำกลั่น (%w/v)	ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อวัตถุดิบ 100 กรัม)	
	เอนไซม์อะไมเลส เกรดบริสุทธิ์	เอนไซม์อะไมเลส เกรดการค้า	เอนไซม์อะไมเลส เกรดบริสุทธิ์	เอนไซม์อะไมเลส เกรดการค้า
0.0	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
5.0	6.63 ± 0.57^{b}	2.03 ± 0.04^{b}	133 ± 11.3^{c}	40.5 ± 0.87^{c}
7.5	7.56 ± 0.67^{bc}	2.57 ± 0.23^{c}	101 ± 8.96^{b}	34.3 ± 3.08^{b}
10.0	8.69 ± 0.82^{d}	3.18 ± 0.13^{d}	86.9 ± 8.22^{b}	31.8 ± 1.34^{b}
12.5	11.0 ± 0.57^{e}	3.63 ± 0.18^{e}	87.8 ± 4.59^{b}	29.0 ± 1.47^{b}

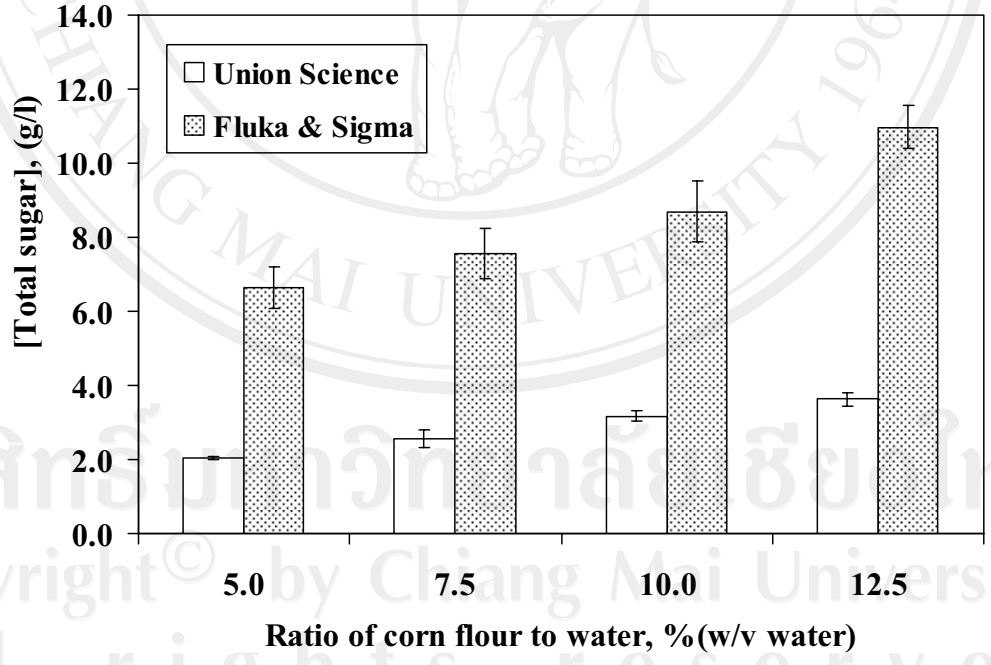
หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

: ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก a – e ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



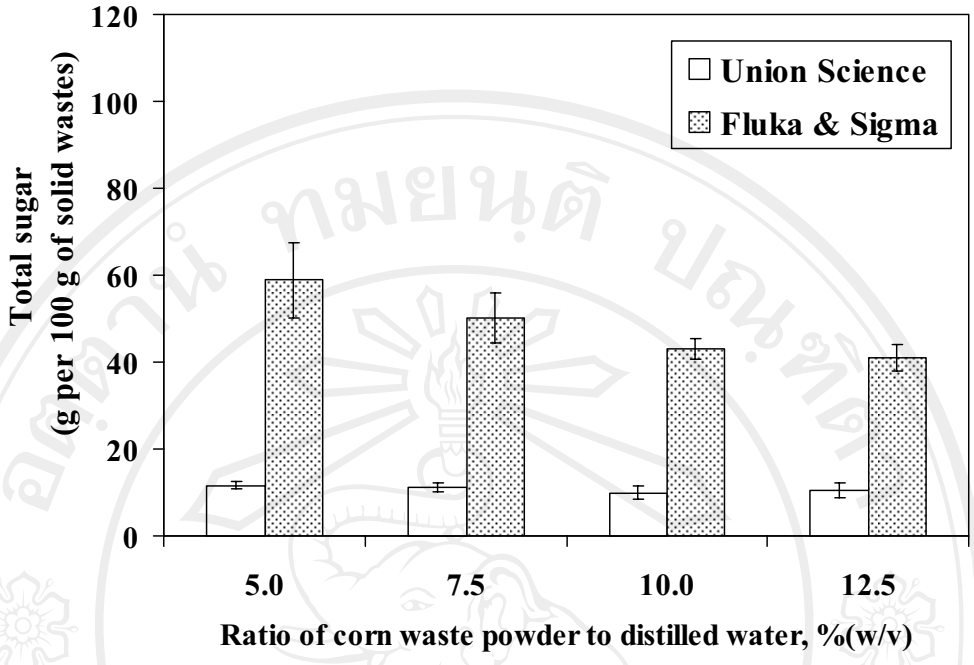
(ก)



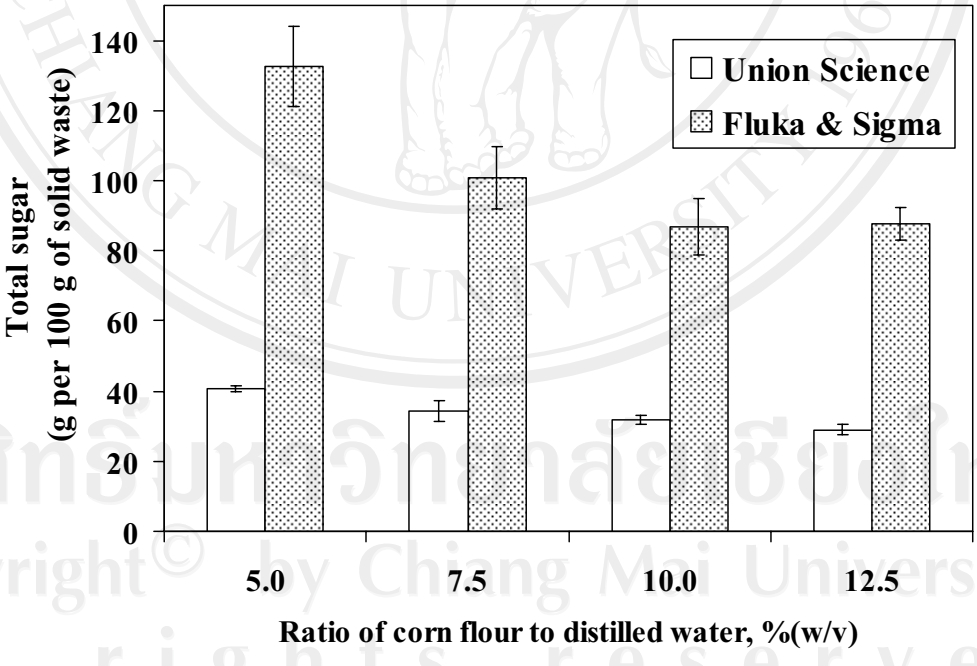
(ข)

ภาพที่ 4.4 ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดหลังการย่อย (ก) เศษของแข็งเหลือทิ้ง (ข) แป้งข้าวโพดด้วยเอนไซม์อะไมเลสบริสุทธิ์และเอนไซม์อะไมเลสเกรดการค้าในช่วงสัดส่วนร้อยละ 5.0 – 12.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.5 ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดต่อวัตถุดิบ 100 กรัม หลังการย่อย (ก) เศษของแข็งเหลือทิ้ง (ข) แป้งข้าวโพดด้วยเอนไซม์อะไมเลสบริสุทธิ์และเอนไซม์อะไมเลสเกรดการค้า ในช่วงสัดส่วนร้อยละ 5.0 - 12.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 การศึกษาสัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องต่อของเหลวที่เหมาะสม

4.3.1 การหาสัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อน้ำกลั่นที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล

การใช้สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อน้ำกลั่นร้อยละ 15.0 – 50.0 (15.0, 17.5, 20.0, 22.5, 25.0, 27.5, 30.0, 35.0, 40.0, 45.0 และ 50.0) โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้สารผสมที่มีลักษณะข้นไม่สามารถกรองได้ดังภาพที่ 4.6 ในขณะที่การใช้สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อน้ำกลั่นร้อยละ 1.0 - 4.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดน้อยกว่า 10 กรัมต่อลิตร จึงมีคะแนนประสิทธิภาพการสกัดน้ำตาลเท่ากับศูนย์ (ภาคผนวก ง) และที่สัดส่วนร้อยละ 12.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสไม่แตกต่างจากที่สัดส่วนร้อยละ 10.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แต่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสน้อยกว่าที่สัดส่วนร้อยละ 5.0 และ 7.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ตารางที่ 4.4) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อพิจารณาคะแนนประสิทธิภาพการสกัดร่วมกับผลทางสถิติพบว่าที่สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อน้ำกลั่นร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นสัดส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากเป็นสัดส่วนที่ใช้วัตถุดิบเศษของแข็งเหลือทิ้งน้อยสุด แต่ให้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสไม่แตกต่างจากสัดส่วนที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แม้ว่าจะได้คะแนนประสิทธิภาพการสกัดต่ำกว่าก็ตาม อย่างไรก็ตามสารสกัดหลังการย่อยมีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดค่อนข้างต่ำ จึงต้องผสมกากน้ำตาลเข้มข้นที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด 675.80 ± 3.17 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ ก1) เพื่อปรับความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเป็น 120 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก) เพื่อช่วยเพิ่มสัดส่วนการผลิตเอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปหรือ ethanol yield (Deak and Beuchat, 1996) นอกจากนี้มาโนช (2546) ยังระบุว่าการผลิตเอทานอลด้วย *Zymomonas mobilis* TISTR 548 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง ในสภาวะที่มีอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที พบอัตราการผลิตเอทานอลสูงสุด 3.64 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร

ภาพที่ 4.6 เศษของแข็งเหลือทิ้งต่อน้ำกลั่นที่สัดส่วนร้อยละ 15.0 – 50.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นน้ำตาลของเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อน้ำกลั่น

สัดส่วน (%w/v)	ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อวัตถุดิบ 100 กรัม)	คะแนน (เต็ม 100)
0.0	0.01 ± 0.01^{a}	0.00 ± 0.00^{a}	0.00
5.0	6.57 ± 0.18^{b}	5.50 ± 0.14^{b}	0.00
7.5	10.18 ± 0.17^{c}	5.48 ± 0.36^{b}	89.84
10.0	12.51 ± 0.98^{cd}	5.43 ± 0.65^{b}	89.02
12.5	16.36 ± 0.48^{d}	6.10 ± 0.26^{b}	100.00

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

: ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก a – e ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.3.2 การหาสัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่ออะซิเตตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผลิตฟอสเฟตไอออน

จากตารางที่ 4.5 สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่ออะซิเตตบัฟเฟอร์ที่สัดส่วนร้อยละ 1.0 – 4.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดน้อยกว่า 10 กรัมต่อลิตร จึงมีคะแนนประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลเท่ากับศูนย์ดังแสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก ง และเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่ออะซิเตตบัฟเฟอร์ร้อยละ 12.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสไม่แตกต่างจากสัดส่วนร้อยละ 10.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ส่วนที่สัดส่วนร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถผลิตความเข้มข้นกลูโคสได้สูงสุดที่ 8.06 ± 0.12 กรัมต่อวัตถุดิบ 100 กรัม และมีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดมากกว่า 10 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกสัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่ออะซิเตตบัฟเฟอร์ร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการศึกษากระบวนการผลิตฟอสเฟตไอออนของจุลินทรีย์ 12 สายพันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.5 ความเข้มข้นน้ำตาลของเศษของแข็งเหลือทิ้งต่ออะซิเตตบัฟเฟอร์

สัดส่วน (%w/v)	ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อวัตถุดิบ 100 กรัม)	คะแนน (เต็ม 100)
0.0	0.60 ± 0.03^{a}	0.00 ± 0.00^{a}	0.00
1.0	2.51 ± 0.02^{b}	9.09 ± 0.11^{e}	0.00
2.0	4.44 ± 0.04^{c}	8.27 ± 0.16^{d}	0.00
3.0	6.27 ± 0.05^{d}	$7.99 \pm 0.15^{c,d}$	0.00
4.0	8.23 ± 0.09^{e}	$8.07 \pm 0.16^{c,d}$	0.00
5.0	10.08 ± 0.07^{f}	$8.06 \pm 0.12^{c,d}$	100.00
7.5	14.45 ± 0.03^{g}	7.76 ± 0.02^{c}	96.28
10.0	18.23 ± 0.04^{h}	7.39 ± 0.03^{b}	91.69
12.5	21.71 ± 0.02^{i}	7.21 ± 0.01^{b}	89.45

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

: ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก a – i ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.4 การศึกษาระดับการผลิตเอทานอลและอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากทั้งหมด 15 สายพันธุ์

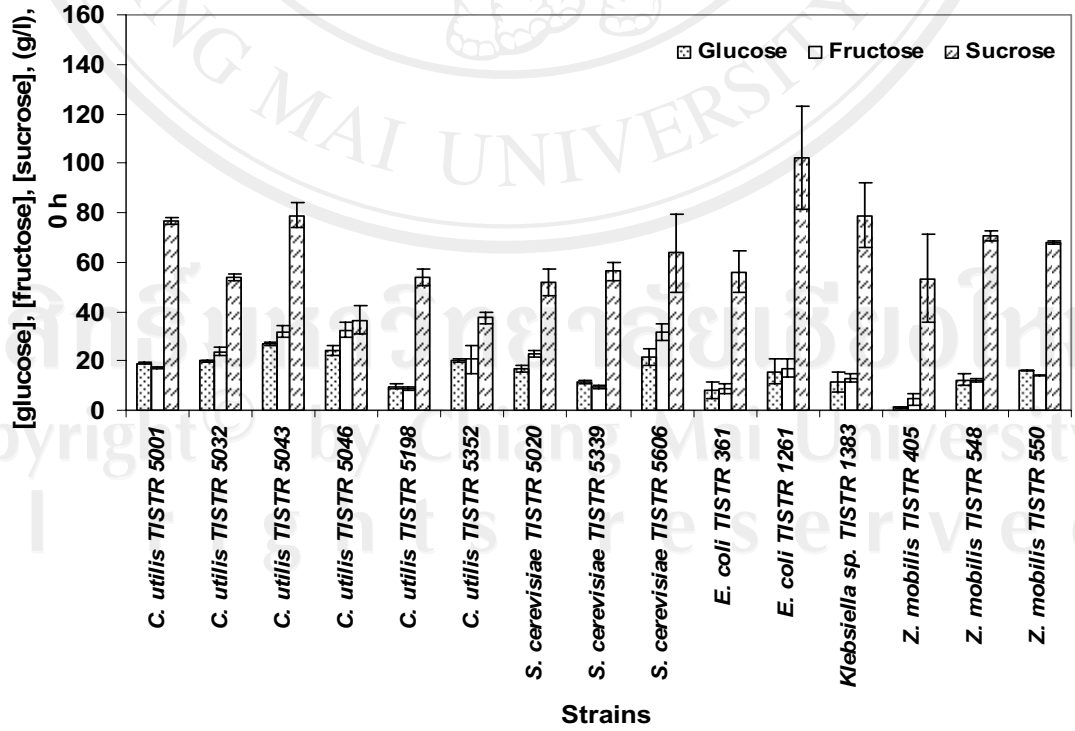
4.4.1 ความเข้มข้นน้ำตาล

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 15 สายพันธุ์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ มีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น แต่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* TISTR 1261 และ *Z. mobilis* TISTR 405 ยังคงใกล้เคียงกับเวลาเริ่มต้น บ่งบอกว่าจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลโดยรวมในสภาวะที่มีซูโครสอยู่ด้วยลดลงซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของพูนศิริและคณะ (2551) ที่ระบุว่า *Z. mobilis* TISTR 405 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสได้ในระดับต่ำที่ร้อยละ 34.50 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยลำไยอบแห้ง ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่ระดับ 63.50 – 64.40 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ผลการศึกษาของพรรณทิวาและคณะ (2551) พบว่า *Z. mobilis* TISTR 405 ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้เลย เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยลำไยอบแห้งผสมกากน้ำตาลเข้มข้นสัดส่วนหนึ่งต่อหนึ่ง ที่มีระดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

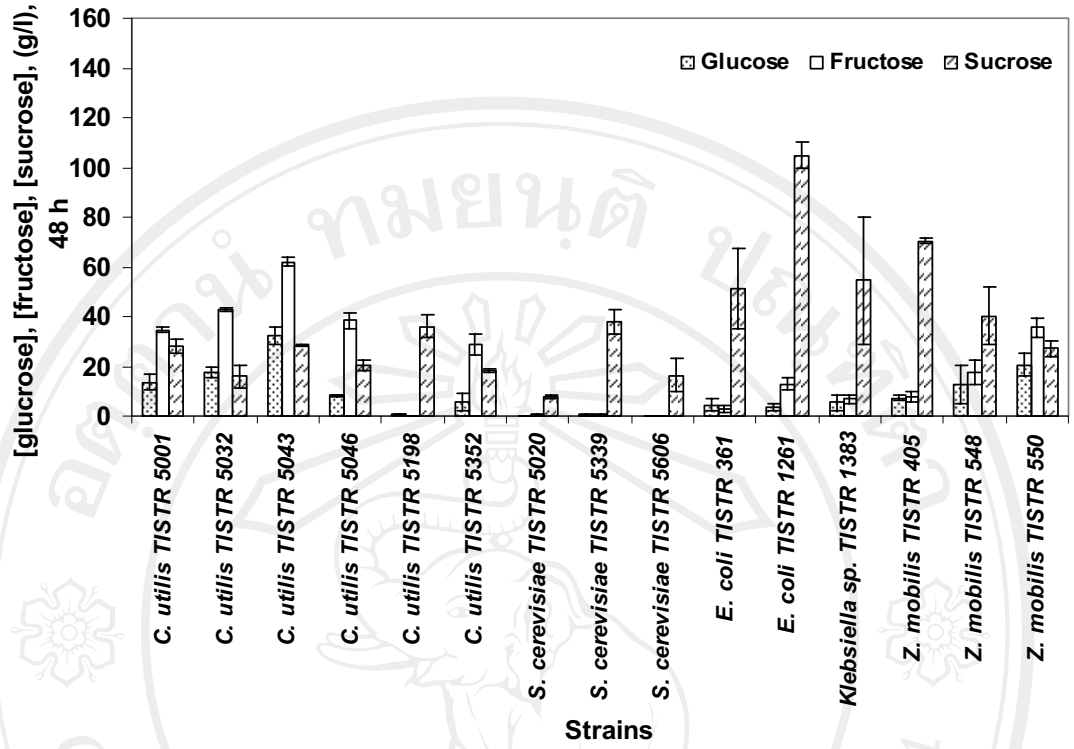
ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดที่ระดับเดียวกัน นอกจากนี้การที่ *Candida utilis* หลายสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสที่ดีกว่าหรือทัดเทียมกับ *Z. mobilis* TISTR 550 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5020, 5339 และ 5606 แต่ประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลโดยรวมกลับต่ำกว่า แสดงให้เห็นว่า *C. utilis* นำเอาน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไปใช้โดยมีประสิทธิภาพด้อยกว่า *Z. mobilis* หรือ *S. cerevisiae* สอดคล้องกับการศึกษาของ Verduyn *et al.* (1991) ที่ระบุว่า *C. utilis* ต้องใช้พลังงานในรูปของ ATP ในการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ในขณะที่ *S. cerevisiae* มีโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ ที่ช่วยนำเอาน้ำตาลกลูโคสเข้าไปใช้ได้โดยไม่ต้องใช้พลังงานในกระบวนการ facilitated diffusion

เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5020, 5339 และ 5606 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ได้โดดเด่นกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นที่เหลือ 12 สายพันธุ์ (ภาพที่ 4.7 – 4.9) บ่งบอกถึงความสามารถในการใช้น้ำตาลเพื่อเปลี่ยนเป็นสารอินทรีย์ได้ดีกว่า สอดคล้องกับผลการศึกษาของพูนศิริ และคณะ (2551) ที่พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5606 และ 5020 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลทั้งหมดภายหลัง 48 ชั่วโมง เทียบกับระดับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นสูงถึงร้อยละ 97.60 และ 97.30 ตามลำดับ เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จากลำไยอบแห้งที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่ระดับ 63.50 – 64.40 กรัมต่อลิตร

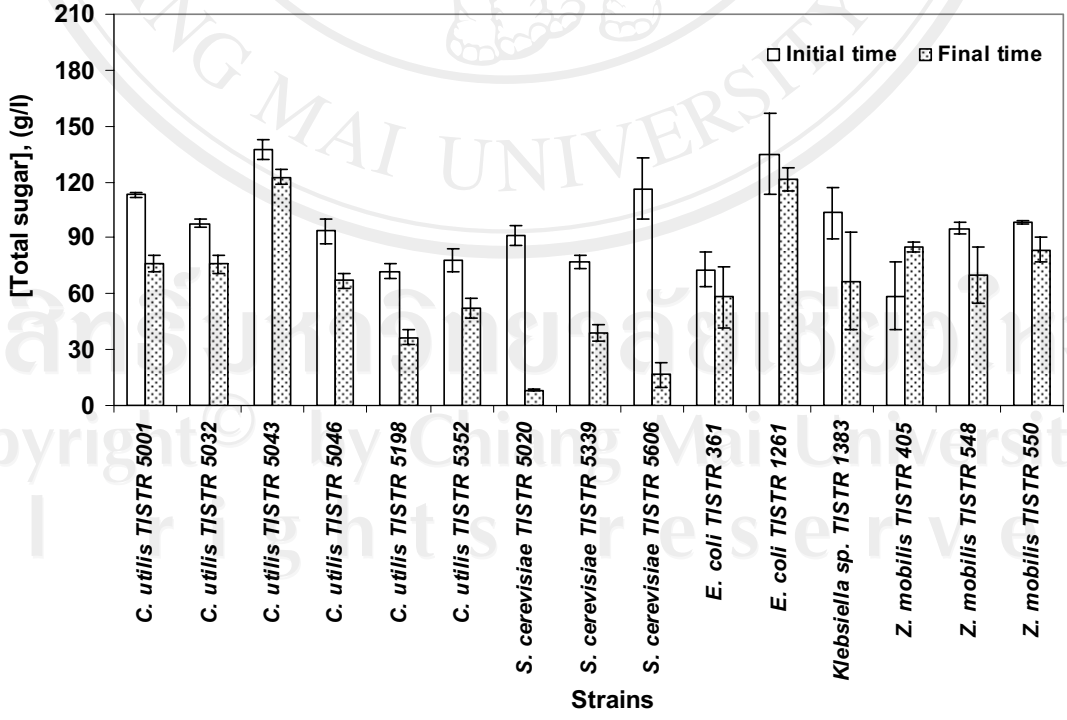


ภาพที่ 4.7 ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสที่เวลา 0 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.8 ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสที่เวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.9 ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมง

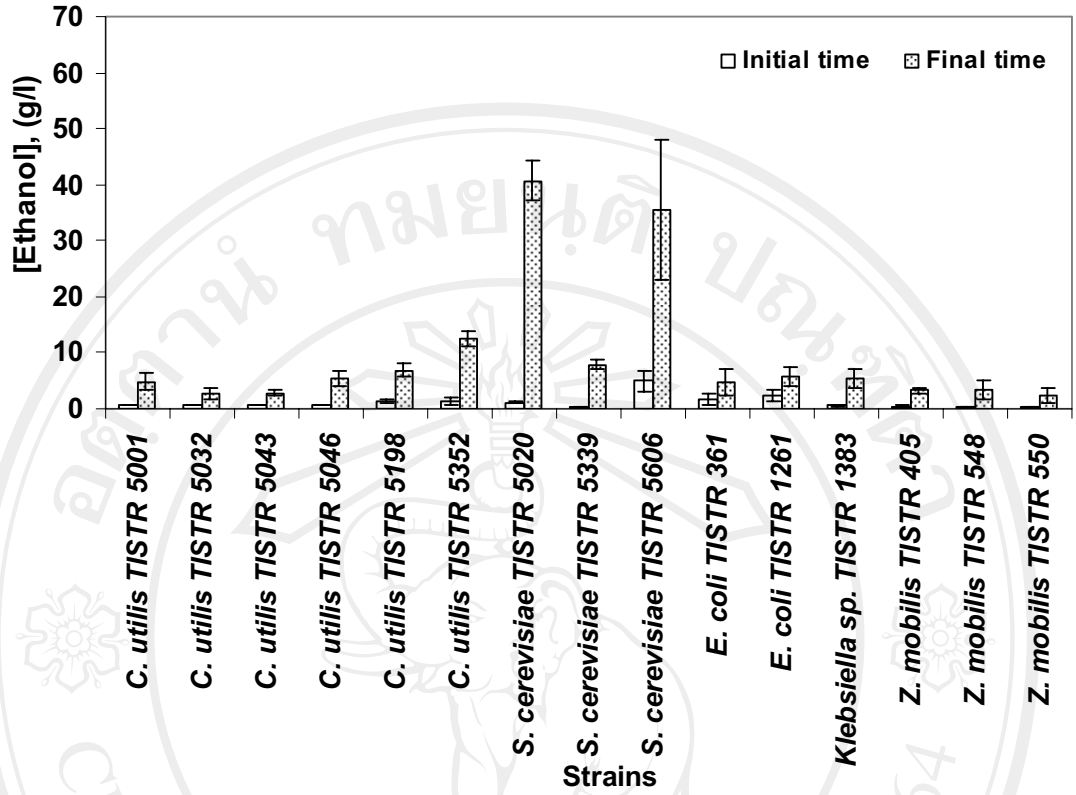
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4.2 ความเข้มข้นเอทานอล

เชื้อจุลินทรีย์ *C. utilis*, *Escherichia coli* และ *Z. mobilis* ผลิตเอทานอลได้ค่อนข้างน้อยในสภาวะตั้งนิ่งคือที่ระดับไม่เกิน 20 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* TISTR 5020 และ 5606 ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ที่ระดับความเข้มข้น 40.7 ± 3.56 และ 35.4 ± 12.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.10 ซึ่งมีแนวโน้มเดียวกับความสามารถในการใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ ในหัวข้อ 4.4.1 และใกล้เคียงกับการศึกษาของพูนศิริ และคณะ (2551) ที่พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5606 และ 5020 มีความสามารถในการผลิตเอทานอลสูงสุดที่ระดับ 45.0 ± 6.1 และ 41.8 ± 1.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสารสกัดลำไยอบแห้งที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 63.5 – 64.4 กรัมต่อลิตร และงานวิจัยของพรรณทิวาและคณะ (2551) ที่ระบุว่า *S. cerevisiae* TISTR 5606 และ 5020 มีความสามารถในการผลิตเอทานอลสูงสุดที่ระดับ 43.4 ± 4.0 และ 37.8 ± 3.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสารผสมลำไยอบแห้งและกากน้ำตาลเข้มข้น ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดในระดับเดียวกัน ทั้งนี้ Bai *et al.* (2008) อธิบายสาเหตุที่ *Z. mobilis* ผลิตเอทานอลได้ค่อนข้างน้อยเนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ได้เฉพาะน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสเท่านั้น นอกจากนี้กระบวนการหมักที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก มักจะมีสารผลิตภัณฑ์ข้างเคียงน้ำตาล ฟรุกโตสหรือ levan ผลิตขึ้นมาพร้อมกับซอร์บิทอล (sorbitol) ส่งผลให้ค่า yield ของเอทานอลลดต่ำลง ดังนั้น *S. cerevisiae* จึงมีความสามารถในในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่า

อย่างไรก็ตามการที่ *S. cerevisiae* TISTR 5606 และ *S. cerevisiae* TISTR 5020 สามารถผลิตความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงกว่าการศึกษาของฐิติพรและคณะ (2551) ที่เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวกันนี้ด้วยน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 63.5 – 64.4 กรัมต่อลิตร ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการเติมกากน้ำตาลเข้มข้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ให้มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่า 120 กรัมต่อลิตร ทำให้จุลินทรีย์มีแหล่งอาหารคาร์บอนในการเปลี่ยนเป็นเอทานอลมากกว่า หรืออาจเป็นเพราะยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ มีความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดอื่นเพื่อผลิตเอทานอลนอกจากน้ำตาลกลูโคส เช่น น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครสที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อจากสารสกัดเศษของแข็งเหลือทิ้งผสมกากน้ำตาลเข้มข้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

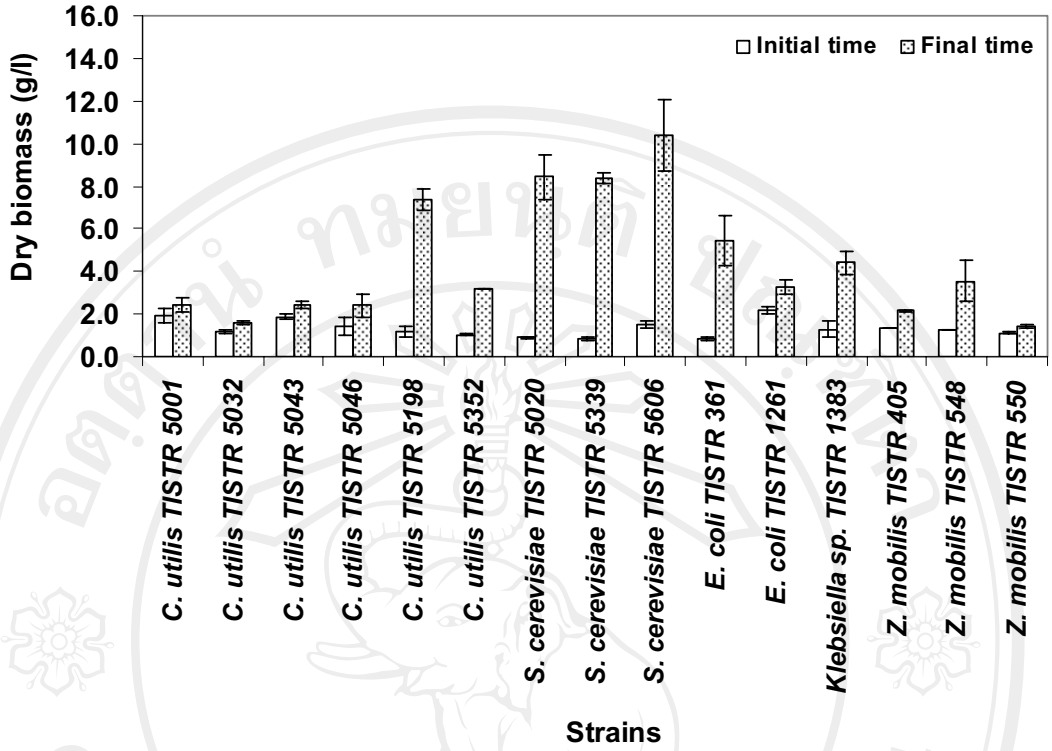


ภาพที่ 4.10 ความเข้มข้นเอทานอลที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมง

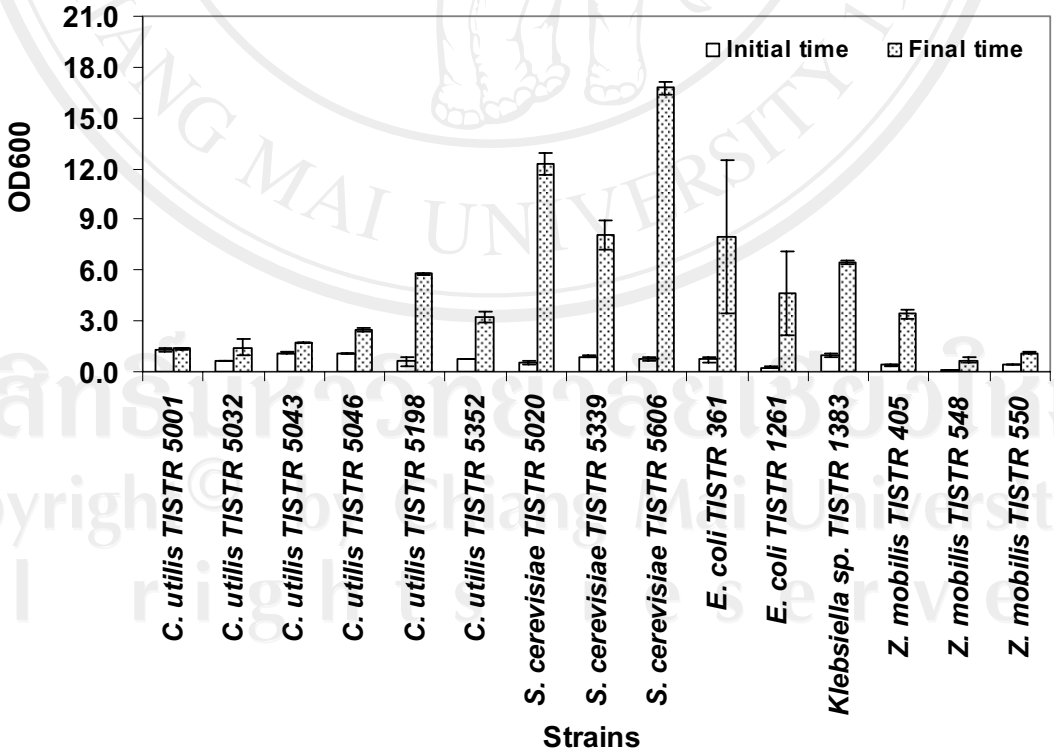
4.4.3 ความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้งและค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เปียกที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

การตรวจวัดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีหามวลชีวภาพแห้งในภาพที่ 4.11 และการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เปียกที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) ในภาพที่ 4.12 มีความสอดคล้องกัน คือ *S. cerevisiae* TISTR 5606 มีมวลชีวภาพแห้งสูงสุดที่ระดับ 10.39 ± 1.68 กรัมต่อลิตร ตามด้วยสายพันธุ์ TISTR 5020 และ 5339 ที่ระดับความเข้มข้น 8.43 ± 1.03 และ 8.37 ± 0.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนลำดับค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 3 ลำดับแรก มีแนวโน้มเช่นเดียวกับมวลชีวภาพแห้งกล่าวคือ *S. cerevisiae* TISTR 5606 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 16.75 ± 0.34 ในขณะที่สายพันธุ์ TISTR 5020 มีค่า OD600 ต่ำกว่าที่ระดับ 12.26 ± 0.68 ส่วนกรณีของสายพันธุ์ TISTR 5339 ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 8.07 ± 0.83 อย่างไรก็ตามในส่วนของยีสต์ *C. utilis* และแบคทีเรีย *Z. mobilis* มีความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้งและ OD600 เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย แสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อยในสภาวะตั้งนิ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.11 ความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้งที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมง

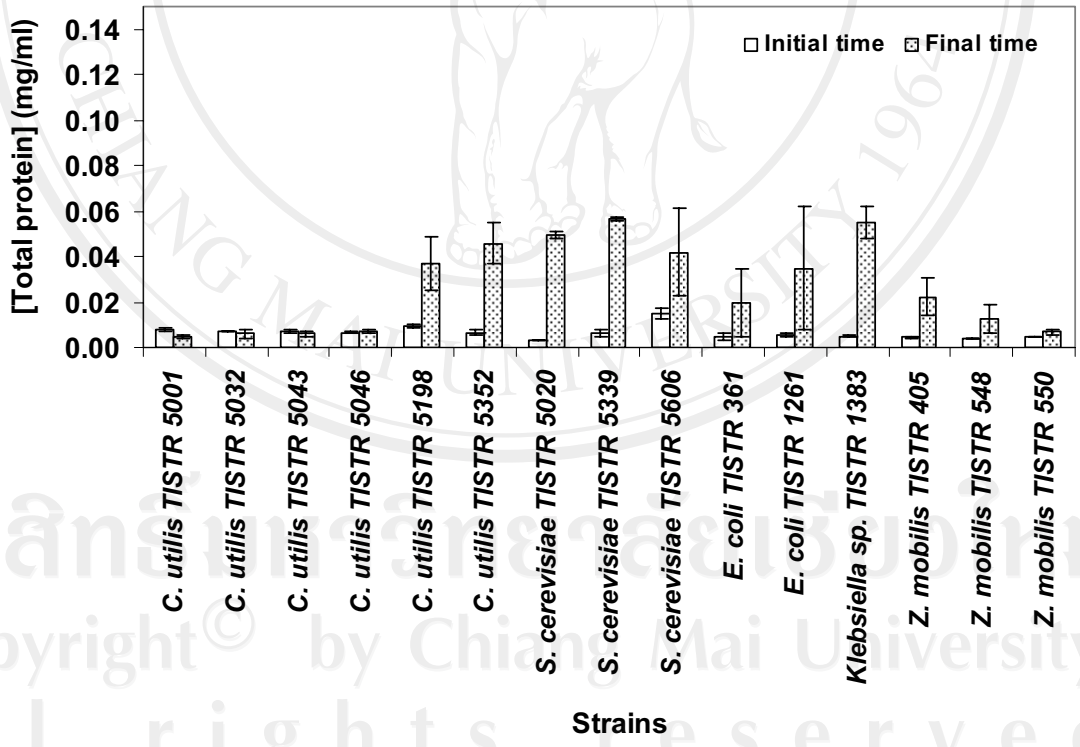


ภาพที่ 4.12 ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เปียกที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) ที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4.4 ความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ณ physiological pH

ค่าความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ณ physiological pH เป็นตัวบ่งชี้ทางอ้อมถึงความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ โดยค่าความเข้มข้นโปรตีนที่สูงแสดงว่าจุลินทรีย์สามารถสร้างเอนไซม์ได้มากตามไปด้วยทั้งนี้จากภาพที่ 4.13 พบว่าค่าความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ณ physiological pH มีแนวโน้มเดียวกับค่าความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้ง (ภาพที่ 4.11) และค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เปียกที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.12) โดยจุลินทรีย์ *C. utilis* TISTR 5198 และ 5352, *S. cerevisiae* TISTR 5020, 5339 และ 5606, *E. coli* TISTR 1261 และ *Klebsiella* sp. TISTR 1383 มีความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำได้สูงกว่า 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใกล้เคียงกับการศึกษาของพูนศิริและคณะ (2551) ที่พบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มเดียวกันนี้มีค่าความเข้มข้นโปรตีนที่ระดับสูงสุดไม่เกิน 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยลำไยอบแห้งที่มีค่าความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 63.50 – 64.40 กรัมต่อลิตร

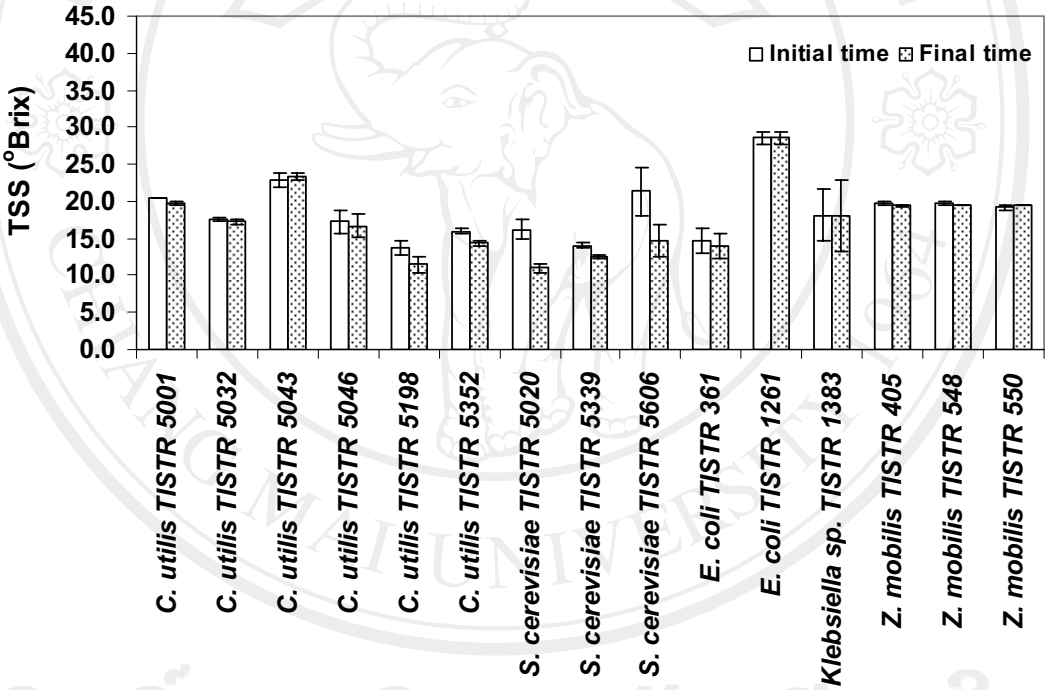


ภาพที่ 4.13 ค่าความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ณ physiological pH (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4.5 ความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด

การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังภาพที่ 4.14 เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ทางอ้อมถึงปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ เช่น น้ำตาลถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลมากน้อยเพียงใด หากค่าความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดลดลงมากแสดงว่ามีการใช้ของแข็งที่ละลายน้ำมากไปด้วยตามลำดับ ดังจะเห็นจากยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5020, 5606 และ 5339 ที่มีค่าความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดลดลงจากเวลาเริ่มต้นมากกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น ในขณะที่มีการผลิตเอทานอลได้ในระดับสูงที่ 56.53 ± 4.95, 49.17 ± 17.41 และ 11.01 ±1.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.10)

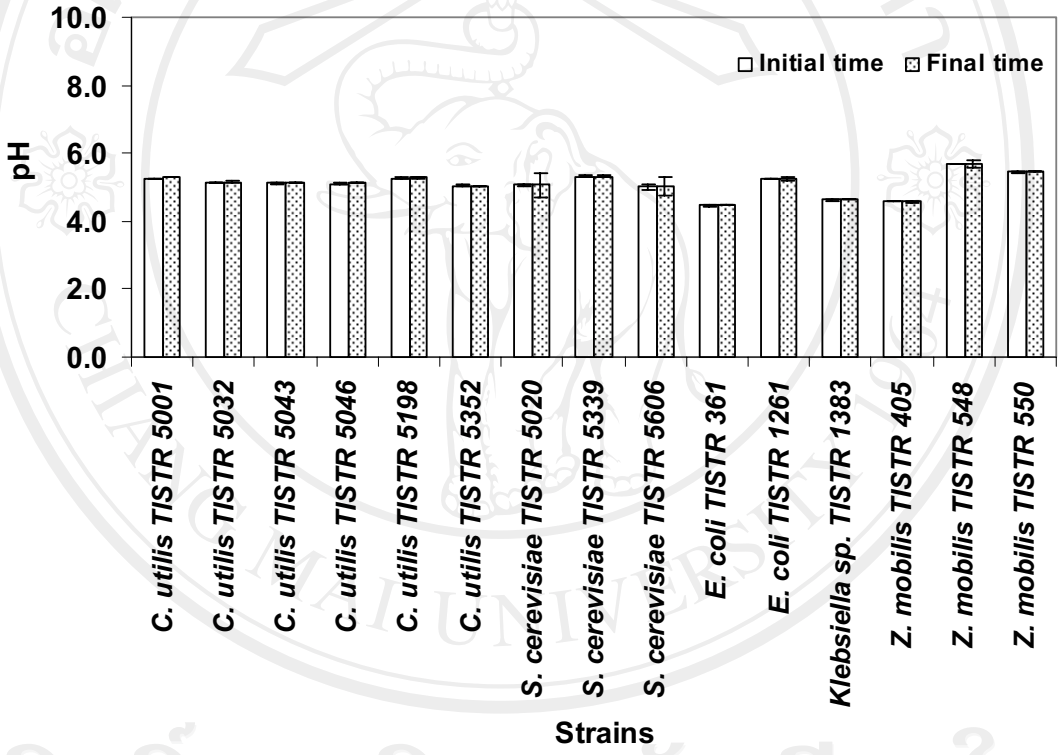


ภาพที่ 4.14 ความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4.6 ระดับ pH

ระดับ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 4.15) ยกเว้นแบคทีเรีย เช่น *E. coli* TISTR 361, *Klebsiella* sp. TISTR 1383 และ *Z. mobilis* TISTR 405 ภายหลังการหมักดำเนินไป 48 ชั่วโมง เนื่องจากกากน้ำตาลเข้มข้นมีองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ผสมอยู่ด้วย จึงเป็นปัจจัยที่ต้านทานการเปลี่ยนแปลงระดับ pH จากกรดอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Cazetta *et al*. (2007) ที่พบว่าค่า pH ระหว่างกระบวนการหมักที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเข้มข้นสูงถึง 200 กรัมต่อลิตร จะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย



ภาพที่ 4.15ระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมง

4.4.7 ความเข้มข้นอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลที่ผลิตได้จากเซลล์รวมจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์

เชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล (ภาพที่ 4.16 และตารางที่ 4.6) ได้แก่ *C. utilis* TISTR 5198 (37.6 ± 1.12 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน), *S. cerevisiae* TISTR 5606 (33.6 ± 16.6 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน), *S. cerevisiae* TISTR 5339 (26.0 ± 0.00 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน) และ *C. utilis* TISTR 5352 (2.33 ± 0.35 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน) ในขณะที่การศึกษาของพรรณทิวาและคณะ (2551) พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5606 สามารถผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลผ่าน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

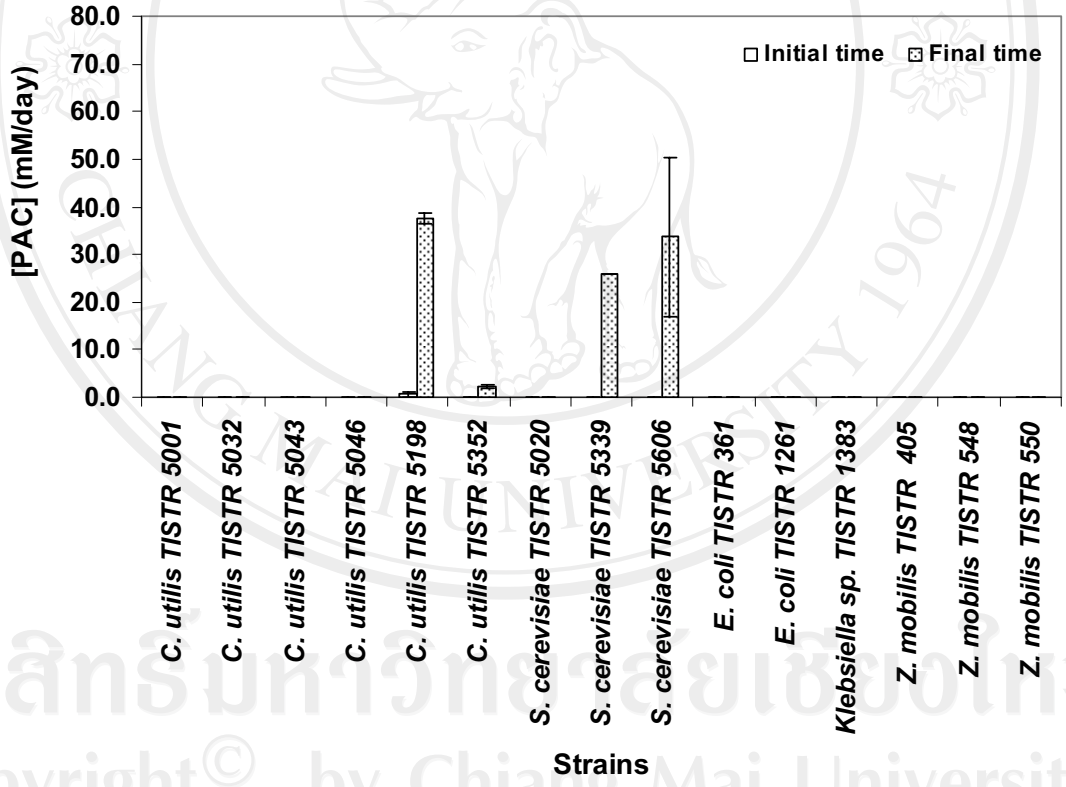
ปฏิกิริยาไบโอทรานฟอร์เมชั่นแบบสองชั้นที่มีสารอินทรีย์เป็นออกทานอลในสภาวะตั้งนิ่ง ที่ระดับ 3.97 และ 3.72 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน ที่อุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วน *C. utilis* TISTR 5198 ผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลได้ที่ระดับ 1.24 และ 2.98 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน ที่อุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดลำไยอบแห้งผสมกากน้ำตาลเข้มข้นสัดส่วนหนึ่งต่อหนึ่ง ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 63.5 – 64.4 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TISTR 5606 และ *C. utilis* TISTR 5198 ด้วยน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียวที่มีความเข้มข้น 63.5 – 64.4 กรัมต่อลิตร กลับไม่พบการผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล เมื่อทำปฏิกิริยาไบโอทรานฟอร์เมชั่นแบบของเหลวสองชั้นในตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ น้ำ ออกทานอล ไดโพรพิลีนไกลคอล และตัวทำละลายผสมระหว่างออกทานอลและไดโพรพิลีนไกลคอล (ฐิติพรและคณะ, 2551) นอกจากนี้ Agustina (2009) ยังได้รายงานความสามารถของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5606 ในการผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลด้วยกระบวนการไบโอทรานฟอร์เมชั่นแบบสองชั้นที่มีชั้นสารอินทรีย์คือออกทานอล และไดโพรพิลีน-ไกลคอลสัดส่วนหนึ่งต่อหนึ่ง ที่อุณหภูมิ 6 – 8 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีอัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที ที่ระดับ 12.5 ± 0.93 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสารสกัดลำไยอบแห้งอายุ 10 เดือนที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดประมาณ 52 กรัมต่อวัตถุดิบ 100 กรัม หรือ 157 กรัมต่อลิตร น้อยกว่ายีสต์ *C. utilis* TISTR 5198 ที่สามารถผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลด้วยกระบวนการไบโอทรานฟอร์เมชั่นแบบสองชั้นที่มีชั้นสารอินทรีย์เป็นโนนานอลที่ระดับ 29.9 ± 2.27 มิลลิ-โมล่าร์ต่อวัน ภายใต้สภาวะเดียวกัน สอดคล้องกับการศึกษานี้ที่พบว่า *C. utilis* TISTR 5198 สามารถผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลได้สูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5606 อย่างไรก็ตาม Satianegara *et al*. (2006) รายงานว่า *C. utilis* UNSW 70940 (World Federation of Culture Collection No. 248) สามารถผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลในระบบเบนซาลดีไฮด์อีมัลชั่นได้สูงถึง 239 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน ที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส โดยใช้เอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสที่มีค่ากิจกรรมการทำงานเทียบเท่ามวลชีวภาพแห้ง 7.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้การผลิตเซลล์รวมดังกล่าวกระทำในถังหมักชีวภาพที่มีการควบคุมการให้อากาศ แต่ไม่จำเป็นต้องควบคุมระดับ pH ตามการศึกษาของ Chen *et al*. (2005) ที่พบว่าการปล่อยให้ค่า pH ค่อยๆ ลดลงตามลำดับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ช่วยเพิ่มค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทราบส่วนผสมชัดเจน (defined medium)

นอกจากนี้ Rosche *et al.* (2002) ระบุว่าสามารถผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลด้วยระบบเบนซาลดีไฮด์อีมัลชั่นได้สูงถึง 41.9 กรัมต่อลิตรต่อวัน หรือ 279 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสจาก *Rhizopus javanicus* เป็นตัวเร่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปฏิกิริยา ในขณะที่ Sanford *et al*. (2005) สามารถผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลด้วยกระบวนการไบโอทรานฟอร์เมชั่นแบบของเหลวสองชั้น ที่มีสารอินทรีย์เป็นออกทานอลได้ที่ระดับ 69.1 กรัมต่อลิตร หรือ 459 มิลลิโมล่าร์ ในชั้นออกทานอล และ 9.31 กรัมต่อลิตร หรือ 62.2 มิลลิโมล่าร์ ในชั้นน้ำ ในสภาวะที่มีเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสจาก *C. utilis* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ 8.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การตรวจสอบความสามารถในการผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลสามารถประยุกต์ใช้เป็น enzyme activity assay โดยนิยามหมายถึงปริมาณเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสที่สามารถเปลี่ยนไพรูเวตและเบนซาลดีไฮด์ ให้กลายเป็นอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและ pH 6.4



ภาพที่ 4.16ความสามารถในการผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล (มิลลิโมล่าร์ต่อวัน) จากเซลล์รวมของจุลินทรีย์ 15 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการคาร์โบไลเกส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.6 ความเข้มข้นและอัตราการผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลที่จุลินทรีย์ 15 สายพันธุ์ ผลิตได้ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	สายพันธุ์	ความเข้มข้น/อัตราการผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล	
		มิลลิโมล่าร์	มิลลิโมล่าร์ต่อวัน
C. utilis	5001	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
C. utilis	5032	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
C. utilis	5043	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
C. utilis	5046	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
C. utilis	5198	0.52 ± 0.02^{d}	37.6 ± 1.12^{d}
C. utilis	5352	0.03 ± 0.00^{a}	2.33 ± 0.35^{a}
S. cerevisiae	5020	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
S. cerevisiae	5339	0.36 ± 0.00^{b}	26.0 ± 0.00^{b}
S. cerevisiae	5606	0.47 ± 0.23^{c}	33.6 ± 16.6^{c}
E. coli	361	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
E. coli	1261	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
Klebsiella sp.	1383	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
Z. mobilis	405	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
Z. mobilis	548	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
Z. mobilis	550	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

: ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก a – d ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

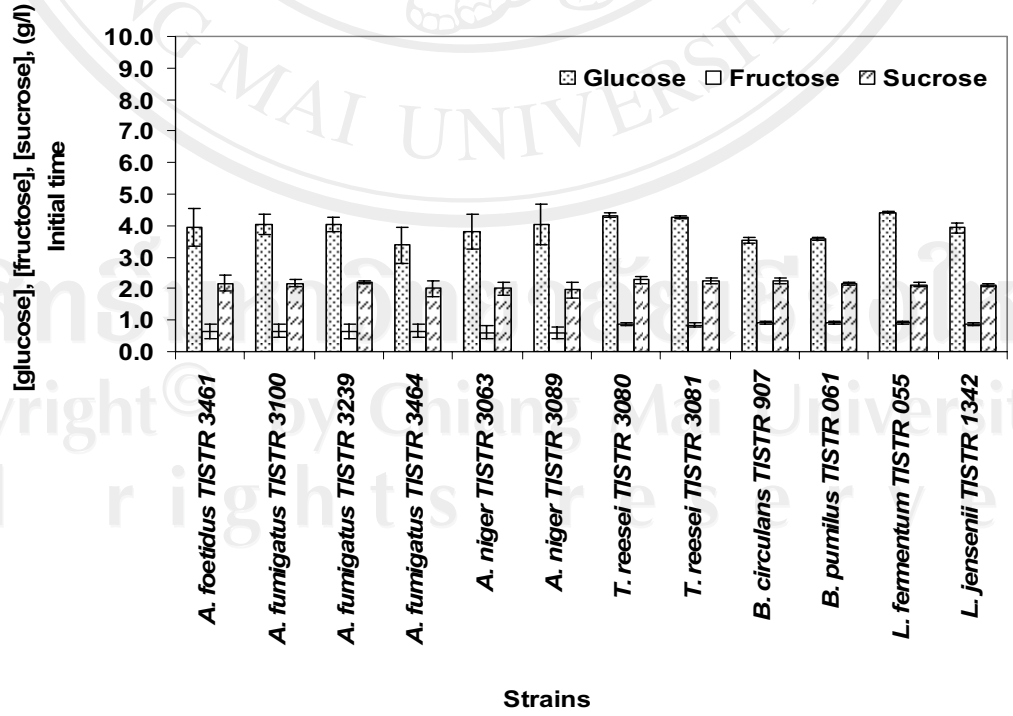
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5 การศึกษาระดับการผลิตฟอสเฟตไอออนและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากทั้งหมด 12 สายพันธุ์

4.5.1 ความเข้มข้นน้ำตาล

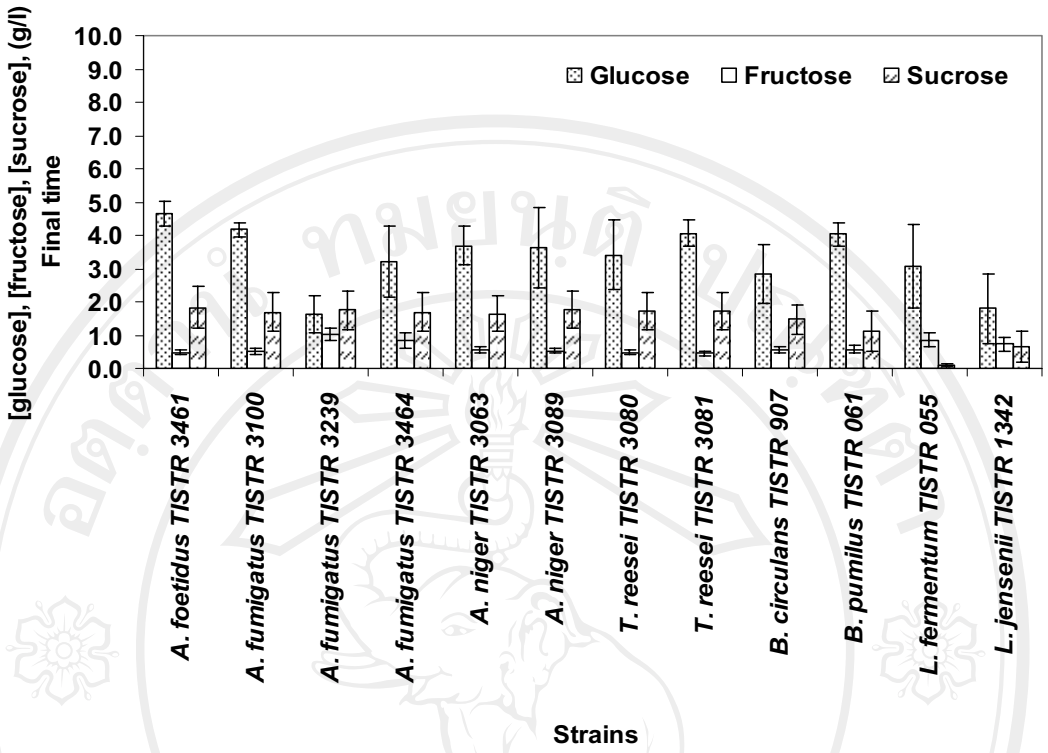
อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดที่เวลาเริ่มต้น (ภาพที่ 4.17) ที่ระดับ 6.04 ± 0.65 ถึง 7.47 ± 0.15 กรัมต่อลิตร แยกเป็นความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ระดับ 3.38 ± 0.56 ถึง 4.41 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่ระดับ 1.96 ± 0.25 ถึง 2.27 ± 0.13 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นน้ำตาลฟรุกโตสที่ระดับ 0.60 ± 0.20 ถึง 0.90 ± 0.04 กรัมต่อลิตร ส่วนที่เวลาสุดท้ายมีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4.18) ที่ระดับ 3.19 ± 1.17 ถึง 6.98 ± 0.72 กรัมต่อลิตร แยกเป็นความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ระดับ 1.63 ± 0.54 ถึง 4.66 ± 0.37 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่ระดับ 0.09 ± 0.04 ถึง 1.84 ± 0.61 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นน้ำตาล ฟรุกโตสที่ระดับ 0.45 ± 0.07 ถึง 1.02 ± 0.17 กรัมต่อลิตร

เมื่อวิเคราะห์ภาพที่ 4.19 พบการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus jensenii* TISTR 1342, *L. fermentum* TISTR 055 และ *A. fumigatus* TISTR 3239 ตามลำดับ แต่เมื่อคำนวณการลดลงของน้ำตาลทั้งหมดเทียบกับเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (ตารางที่ 3.2) พบว่า *Trichoderma reesei* TISTR 3080, *L. jensenii* TISTR 1342 และ *L. fermentum* TISTR 055 เป็นแบคทีเรียที่มีอัตราการลดลงของความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดสูงสุด ที่ระดับ 0.078, 0.052 และ 0.047 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

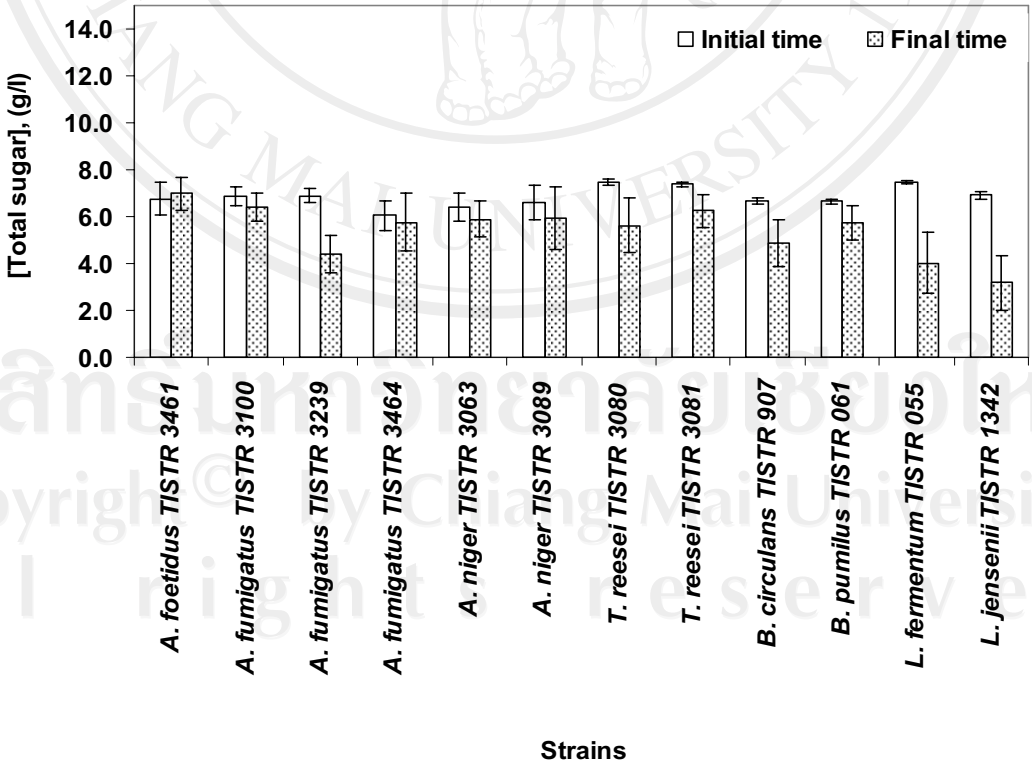


ภาพที่ 4.17ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสที่เวลาเริ่มต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.18ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสที่เวลาสุดท้าย

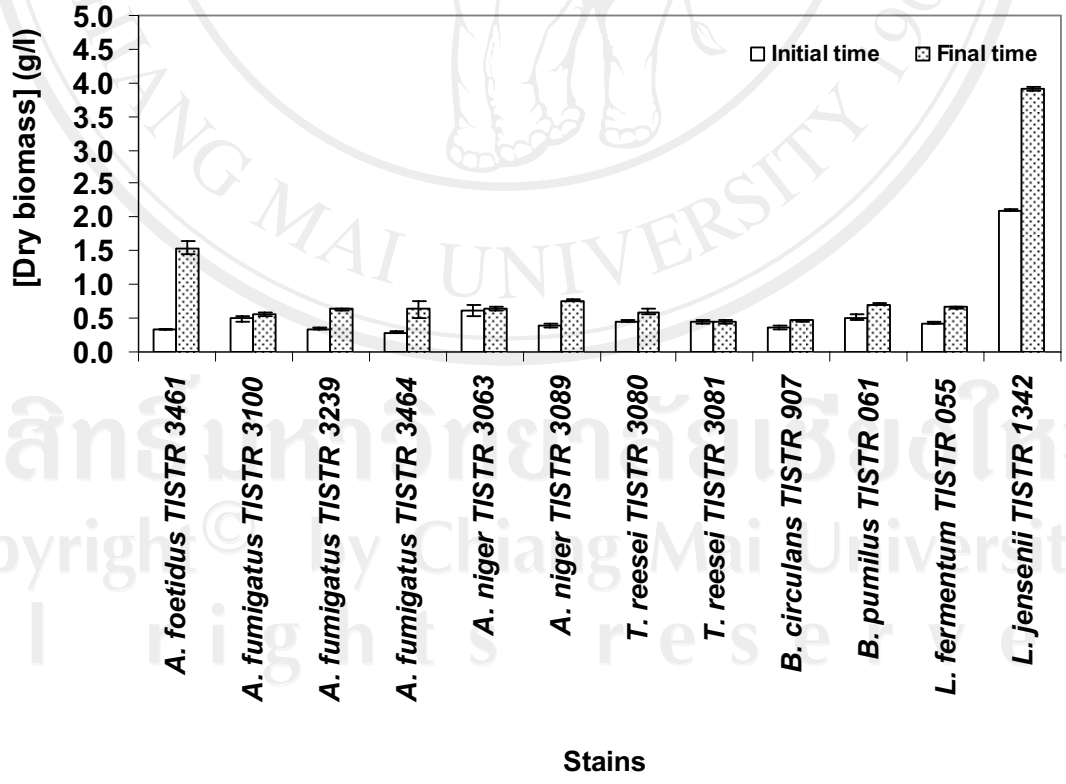


ภาพที่ 4.19ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสุดท้าย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

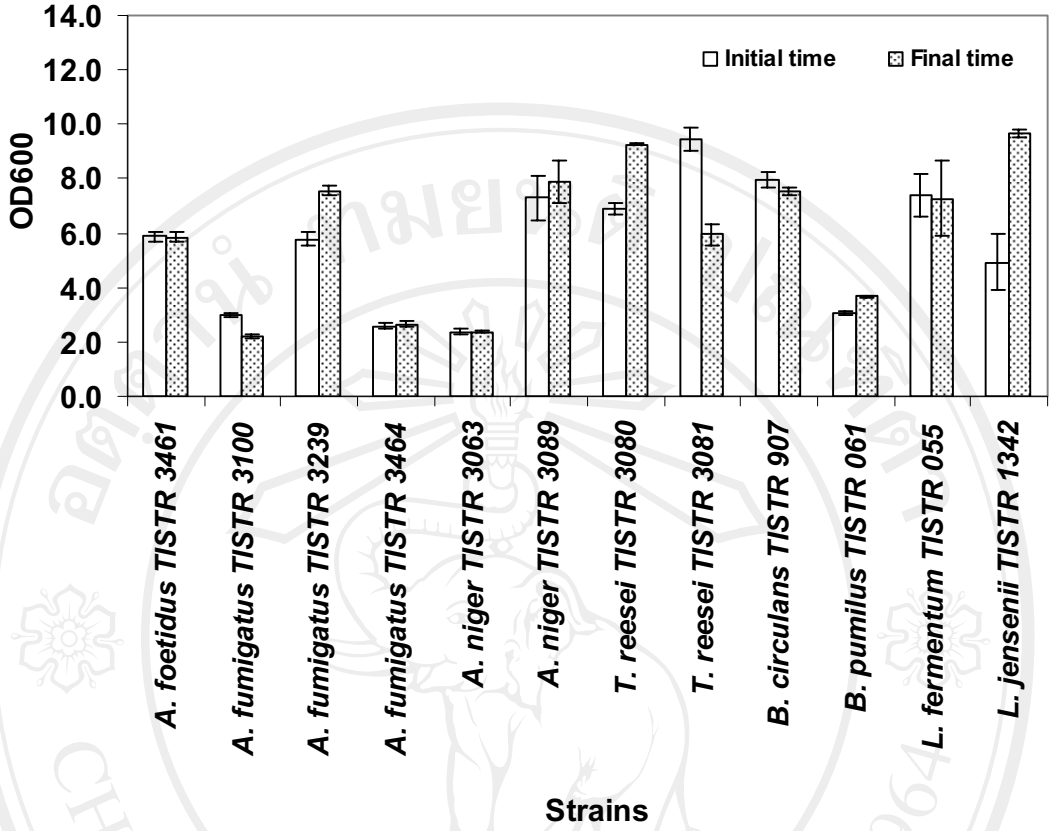
4.5.2 ความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้งและค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เปียก

การตรวจวัดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีหามวลชีวภาพแห้งในภาพที่ 4.20 และการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เปียกที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) ในภาพที่ 4.21 พบว่า *L. jensenii* TISTR 1342 มีการเปลี่ยนแปลงมวลชีวภาพแห้งสูงสุดจากที่ระดับ 2.11 ± 0.02 เพิ่มขึ้นเป็น 3.92 ± 0.03 กรัมต่อลิตร หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 85.78 ในขณะที่ค่า OD600 เพิ่มขึ้นจาก 4.92 ± 1.02 เป็น 9.66 ± 0.12 กรัมต่อลิตร หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 96.34 อย่างไรก็ตามค่ามวลชีวภาพแห้งและค่า OD600 มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อจากสารสกัดเศษของแข็งเหลือทิ้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างกลูคาเนส เพนโทซาเนส เฮมิเซลลูเลส และอะไมเลสมีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดค่อนข้างต่ำ ทำให้จุลินทรีย์มีระดับการเจริญเติบโตและสร้างมวลเซลล์ต่ำตามไปด้วย ทั้งนี้อาจอธิบายเหตุผลในลักษณะเดียวกับกรณีของจุลินทรีย์ชนิดผลิตเอทานอล และอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลที่จำเป็นต้องเพิ่มสารอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อช่วยเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ในสภาวะการหมักที่มีออกซิเจนไม่เพียงพอ (Deak and Beuchat, 1996)



ภาพที่ 4.20ความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้งที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสุดท้าย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

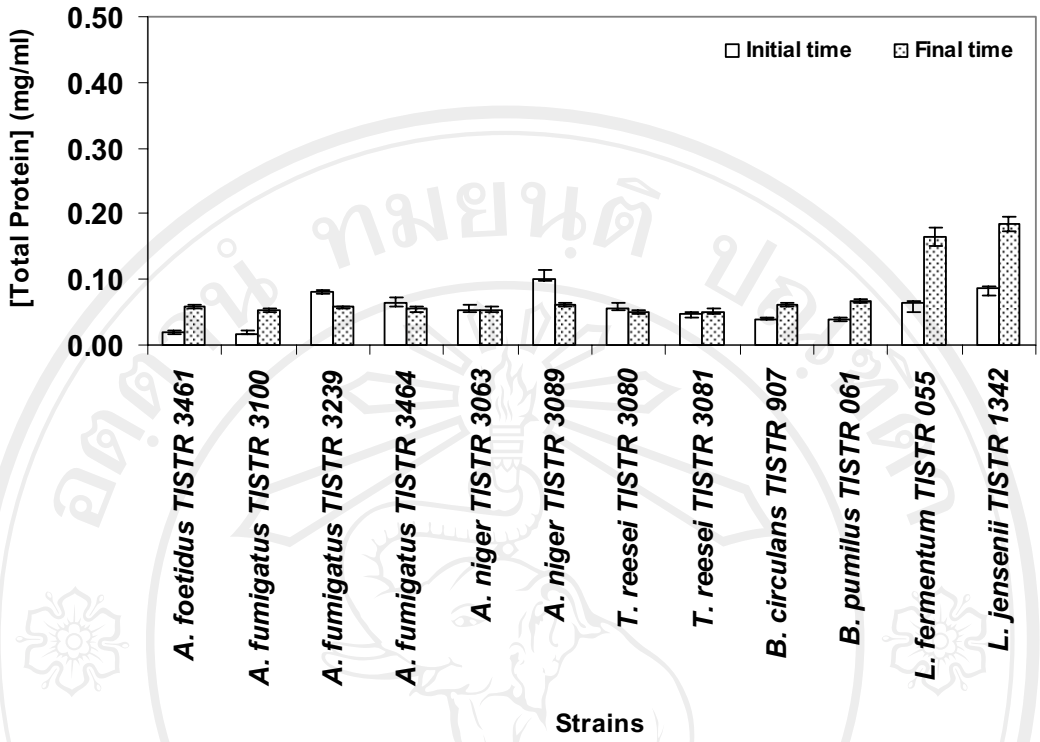


ภาพที่ 4.21 ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เปียกที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสุดท้าย

4.5.3 ความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ณ physiological pH

ค่าความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำ ณ physiological pH ของ *L. fermentum* TISTR 055 และ *L. jensenii* TISTR 1342 มีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น (ภาพที่ 4.22) ทั้งนี้ *L. fermentum* TISTR 055 มีค่าความเข้มข้นโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 0.064 ± 0.004 เป็น 0.165 ± 0.014 หรือเพิ่มขึ้น 1.6 เท่า ส่วน *L. fermentum* TISTR 1342 มีค่าความเข้มข้นโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 0.086 ± 0.003 เป็น 0.184 ± 0.011 หรือเพิ่มขึ้น 1.14 เท่า อย่างไรก็ตามค่าความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำไม่มีความเกี่ยวพันกับค่าความเข้มข้นฟอสเฟตไอออนที่จุลินทรีย์ผลิตได้ในจุลินทรีย์กลุ่มนี้ เนื่องจากไม่พบการผลิตฟอสเฟตไอออนในแบคทีเรีย *L. fermentum* TISTR 055 และ *L. jensenii* TISTR 1342 ที่สามารถผลิตความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำได้สูงสุด ในขณะที่ *A. fumigatus* TISTR 3464, *T. reesei* TISTR 3080 และ 3081, และ *Bacillus pumilus* TISTR 061 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตฟอสเฟตไอออนกลับมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำเพียงเล็กน้อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



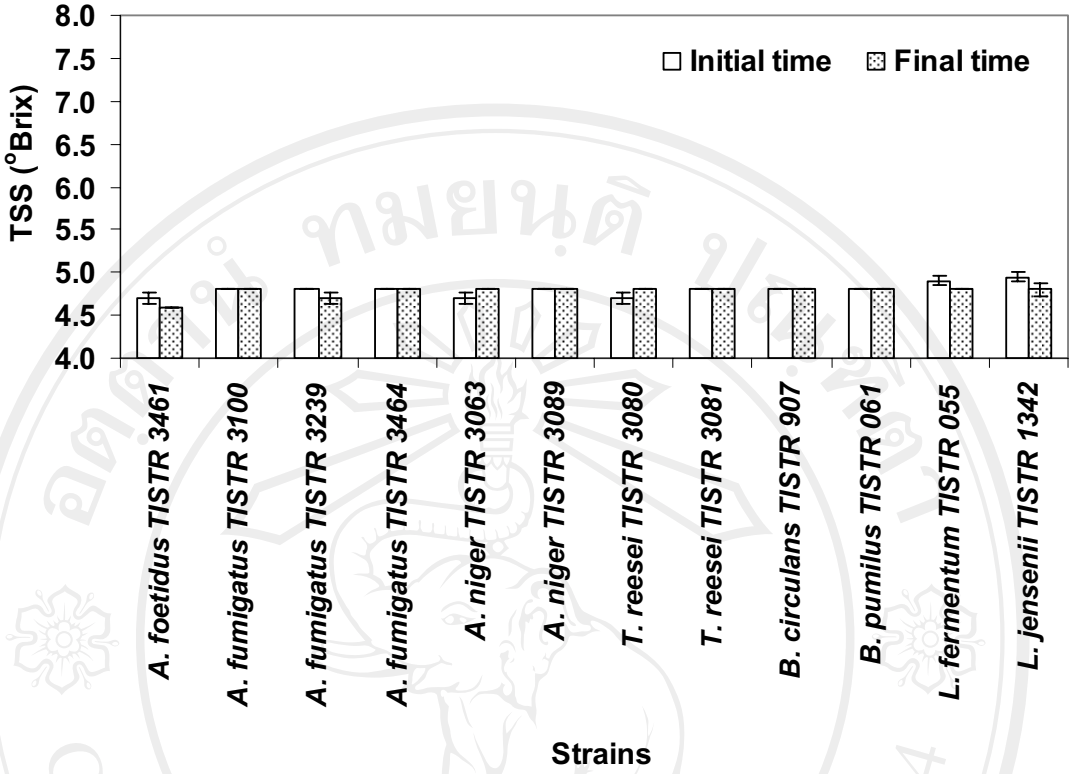
ภาพที่ 4.22ค่าความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ณ physiological pH (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสุดท้าย

4.5.4 ความเข้มข้นของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด

ความเข้มข้นของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดที่เวลาเริ่มต้นมีค่าอยู่ในช่วง 4.7 ± 0.1 ถึง 5.0 ± 0.1 เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ตามเวลาที่กำหนดไว้ (ตารางที่ 3.2) ค่าความเข้มข้นของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดมีค่าอยู่ในช่วง 4.6 ± 0.0 ถึง 4.8 ± 0.0 สอดคล้องกับค่าความเข้มข้นน้ำตาลที่มีแนวโน้มลดลง (ภาพที่ 4.17 – 4.19)

ค่าความเข้มข้นของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดที่ลดลง แสดงถึงการใช้ของแข็งที่ละลายน้ำของจุลินทรีย์ในการเจริญเติบโตและสร้างสารอินทรีย์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้จุลินทรีย์ทั้ง 12 สายพันธุ์ มีค่าความเข้มข้นของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดภายหลังการเพาะเลี้ยงไม่แตกต่างจากเวลาเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังภาพที่ 4.23 โดย *L. fermentum* TISTR 055 และ *L. jensenii* TISTR 1342 มีค่าความเข้มข้นของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

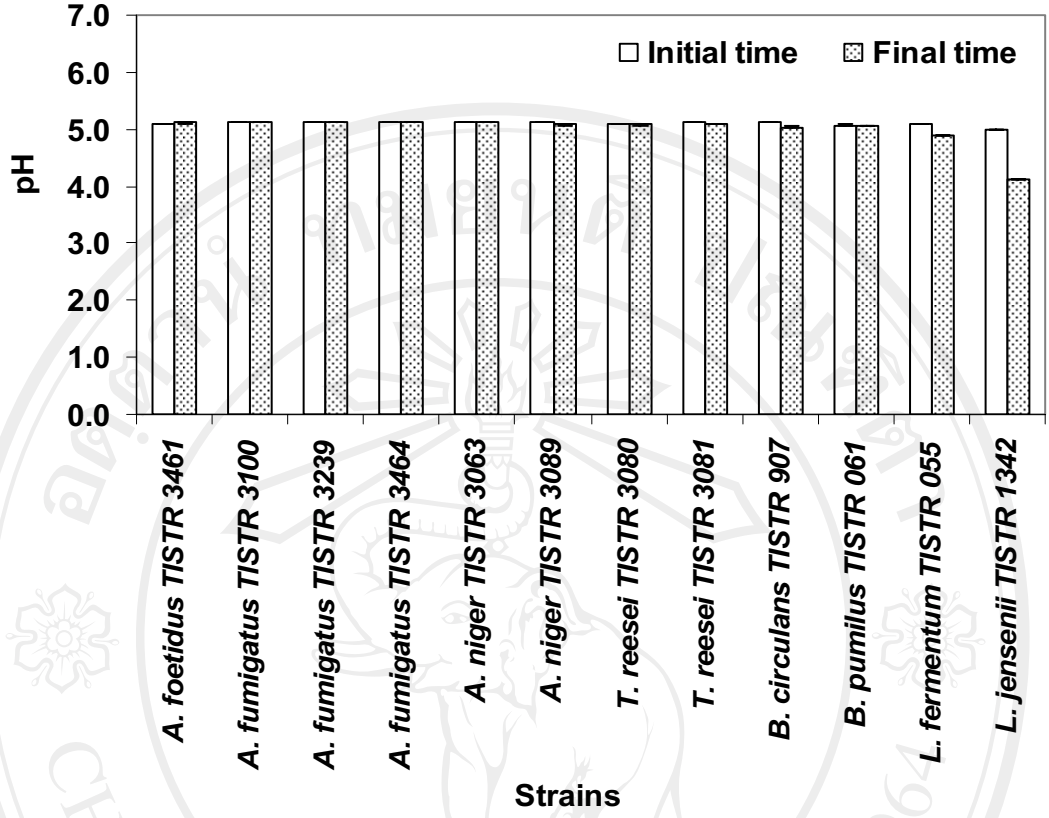


ภาพที่ 4.23ความเข้มข้นของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสุดท้าย

4.5.5 ระดับ pH

ค่าระดับ pH ในภาพที่ 4.24 มีแนวโน้มเดียวกับค่าความเข้มข้นของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด ในภาพที่ 4.23 ทั้งนี้เชื้อจุลินทรีย์ *L. fermentum* TISTR 055 และ *L. jensenii* TISTR 1342 มีค่า pH ภายหลังการเพาะเลี้ยงลดลงจากเวลาเริ่มต้น เนื่องจากจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถสร้างกรดแลคติกในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้มากพอที่จะทำให้ระดับ pH ลดลง อย่างไรก็ตามระดับ pH ของจุลินทรีย์ทั้ง 12 สายพันธุ์ มีค่าอยู่ในช่วง 3.0 – 6.0 ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตสเพื่อย่อยกรดไฟติกให้ปลดปล่อยฟอสเฟตไอออน (Maria *et al*., 2003) การที่ระดับ pH ลดลงไม่มากอาจมีสาเหตุสืบเนื่องจากการใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ ที่เป็นสารละลายผสมระหว่างคู่กรดเบสของกรดอะซิติกและโซเดียมอะซิเตต ประกอบด้วยตัวให้ไฮโดรเจน (H^+ donor) และตัวรับไฮโดรเจน (H^+ acceptor) ที่อยู่ในภาวะสมดุลจึงช่วยต้านทานการเปลี่ยนแปลงของ pH เมื่อมีการเติมกรดหรือด่างลงไปเพียงเล็กน้อยได้ในระดับหนึ่งซึ่งขึ้นอยู่กับ buffer capacity (นิธิยา, 2549)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.24ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสุดท้าย

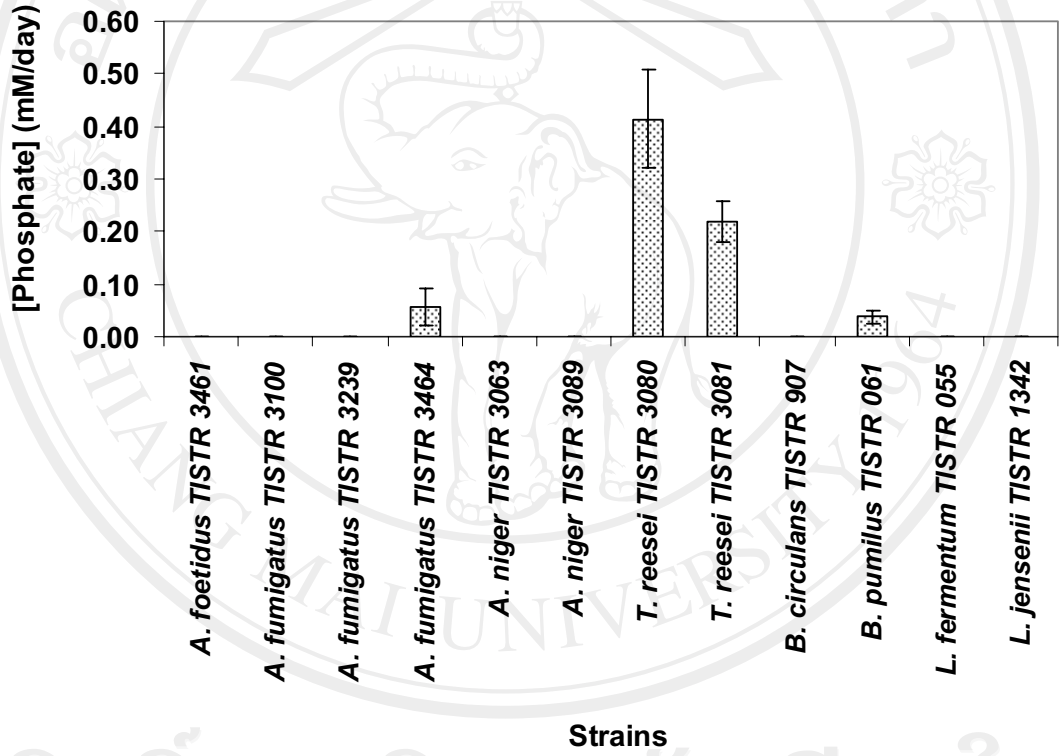
4.5.6 ค่าความเข้มข้นฟอสเฟตไอออน

การตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นฟอสเฟตไอออน เป็นการตรวจวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฟเตสทางอ้อมอีกวิธีหนึ่ง (สร้อย, 2546) จากการนำมวลเซลล์จุลินทรีย์เข้าไปย่อยสารตั้งต้นโซเดียมไฟเตตแล้วตรวจวัดความเข้มข้นฟอสเฟตไอออนที่ปลดปล่อยออกมา ดังแสดงผลการตรวจวัดในภาพที่ 4.25 และตารางที่ 4.7 ภายหลังการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งหมด 12 สายพันธุ์ ด้วยเศษของแข็งเหลือทิ้งต่ออะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมล่าร์ สัดส่วนร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ pH เริ่มต้น 5.0 พบจุลินทรีย์เพียง 4 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตฟอสเฟตไอออน ได้แก่ *T. reesei* TISTR 3080 ที่ระดับ 0.41 ± 0.09 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน ตามด้วย *T. reesei* TISTR 3081 ที่ระดับ 0.22 ± 0.04 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน *A. fumigatus* TISTR 3464 ที่ระดับ 0.06 ± 0.04 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน และ *B. pumilus* TISTR 061 ที่ระดับ 0.04 ± 0.01 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน

สาเหตุที่ไม่พบการผลิตเอนไซม์ไฟเตสใน *A. niger* TISTR 3063 และ 3089 อาจเป็นไปได้ว่าเศษของแข็งเหลือทิ้งประกอบด้วยไฟเตตในปริมาณมากเกินพอ ทั้งนี้ Vats and Bancrjee (2002) รายงานว่าความเข้มข้นฟอสเฟตในอาหารมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของ *A. niger* var

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

teigham โดยเมื่อเติมสารอนินทรีย์ฟอสเฟตในระดับตั้งแต่ร้อยละ 0.05 ขึ้นไป ส่งผลให้กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฟเตสจากเชื้อราลดลงร้อยละ 95 ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อทดลองเพาะเลี้ยงราในสูตรอาหารที่มีโซเดียมไฟเตตร้อยละ 1 เทียบกับแป้งข้าวเจ้าร้อยละ 1 พบว่าในสูตรอาหารที่มีแป้งข้าวเจ้าที่มีฟอสเฟตน้อยกว่า 1,000 เท่า กลับมีความเข้มข้นเอนไซม์มากกว่า 700 เท่า จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ในการผลิตเอนไซม์ไฟเตสต้องมีการจำกัดปริมาณฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณน้อยในระดับหนึ่ง และปริมาณไฟเตตเพียงร้อยละ 1 มีผลต่อการยับยั้งการสร้างเอนไซม์



ภาพที่ 4.25อัตราการผลิตฟอสเฟตไอออนต่อวัน (มิลลิโมล่าร์ต่อวัน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.7 ความเข้มข้นและอัตราการผลิตฟอสเฟตไอออนที่จุลินทรีย์ 12 สายพันธุ์ผลิตได้

จุลินทรีย์	สายพันธุ์	ความเข้มข้น/อัตราการผลิตฟอสเฟตไอออน	
		มิลลิโมล่าร์	มิลลิโมล่าร์ต่อวัน
A. foetidus	3461	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
A. fumigatus	3100	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
A. fumigatus	3239	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
A. fumigatus	3464	0.11 ± 0.07^{ab}	0.06 ± 0.04^{a}
A. niger	3063	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
A. niger	3089	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
T. reesei	3080	0.41 ± 0.09^{c}	0.41 ± 0.09^{b}
T. reesei	3081	0.44 ± 0.08^{c}	0.22 ± 0.04^{c}
B. circulans	907	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
B. pumilus	061	0.26 ± 0.08^{bc}	0.04 ± 0.01^{a}
L. fermentum	055	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
L. jensenii	1342	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

: ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก a – c ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.6 การศึกษาผลกระทบของสัดส่วนเศษของแข็งต่อรำข้าวต่างระดับต่อการผลิตเอทานอล อาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลและฟอสเฟตไอออนของจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือก

4.6.1 ความเข้มข้นเอทานอล

C. utilis TISTR 5198 สามารถผลิตเอทานอลได้ที่ระดับ 0.01 ± 0.01 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าว 50 ต่อ 50 เพียงสัดส่วนเดียว (ตารางที่ 4.8) ในขณะที่ *S. cerevisiae* TISTR 5339 สามารถผลิตความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่ระดับ 1.75 ± 0.73 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าว 75 ต่อ 25 แต่ไม่พบการผลิตเอทานอลเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าวสัดส่วน 25 ต่อ 75 และ 0 ต่อ 100 สาเหตุหนึ่งที่เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ผลิตความเข้มข้นเอทานอลได้ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเพียง 0.35 ± 0.04 ถึง 3.06 ± 0.43 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.9) เปรียบเทียบกับการศึกษาในหัวข้อ 4.4.2 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ด้วยสารสกัดเศษของแข็งเหลือทิ้งที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดที่เวลาเริ่มต้น 72.12 ± 3.84 ถึง 116.5 ± 16.35 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตความเข้มข้นเอทานอลได้ในระดับ 9.53 ± 1.68 ถึง 49.17 ± 17.41 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การศึกษาของพูนศิริ และคณะ (2551) และพรรณทิวาและคณะ (2551) ที่เพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TISTR 5606 และ 5020 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 63.5 – 64.4 กรัมต่อลิตร พบการผลิตเอทานอลที่ความเข้มข้น 43.4 ± 4.0 ถึง 45.0 ± 6.1 กรัมต่อลิตร และ 37.8 ± 3.1 ถึง 41.8 ± 1.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการศึกษาของฐิติพร (2551) ระบุว่าการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TISTR 5606 และ 5020 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียวที่มีความเข้มข้น 63.5 – 64.4 กรัมต่อลิตร พบเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตเอทานอลได้ที่ระดับความเข้มข้น 23.5 ± 2.6 และ 21.0 ± 0.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าการศึกษาของพูนศิริ และคณะ (2551) และพรรณทิวาและคณะ (2551) แสดงว่า *S. cerevisiae* TISTR 5606 และ 5020 สามารถใช้น้ำตาลชนิดอื่นนอกจากกลูโคสสำหรับการผลิตเอทานอล และเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจากเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าวทั้ง 5 สัดส่วน มีความสามารถในการผลิตเอทานอลไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.8 ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ที่จุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ผลิตได้ใน 5 สัดส่วนอาหาร

จุลินทรีย์	สายพันธุ์	สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าว				
		100 ต่อ 0	**75 ต่อ 25**	**50 ต่อ 50**	**25 ต่อ 75**	**0 ต่อ 100**
C. utilis	5198	0.00 ± 0.00^{ns}	0.00 ± 0.00^{ns}	0.01 ± 0.01^{ns}	0.00 ± 0.00^{ns}	0.00 ± 0.00^{ns}
C. utilis	5352	0.09 ± 0.11^{ns}	0.47 ± 0.29^{ns}	0.47 ± 0.22^{ns}	0.34 ± 0.33^{ns}	0.39 ± 0.16^{ns}
S. cerevisiae	5339	0.59 ± 0.38^{ns}	1.75 ± 0.73^{ns}	0.58 ± 0.43^{ns}	0.00 ± 0.07^{ns}	0.00 ± 0.00^{ns}
S. cerevisiae	5606	0.67 ± 0.51^{ns}	0.00 ± 0.00^{ns}	0.00 ± 0.00^{ns}	0.13 ± 0.22^{ns}	0.25 ± 0.15^{ns}

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

: ns ที่กำกับค่าของข้อมูลของแต่ละชุดทดลองตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.9 ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ใน 5 สัดส่วนอาหาร ที่เวลาเริ่มต้น

จุลินทรีย์	สายพันธุ์	สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าว				
		100 ต่อ 0	**75 ต่อ 25**	**50 ต่อ 50**	**25 ต่อ 75**	**0 ต่อ 100**
C. utilis	5198	$3.06 \pm 0.43^{a,II}$	$1.12 \pm 0.04^{b,I}$	$1.14 \pm 0.08^{b,I}$	$1.23 \pm 0.02^{b,I,II}$	$1.22 \pm 0.13^{b,I,II}$
C. utilis	5352	$0.94 \pm 0.02^{c,II}$	$0.84 \pm 0.02^{a,II}$	$1.05 \pm 0.15^{ab,II}$	$0.35 \pm 0.04^{a,I}$	$1.45 \pm 0.21^{b,II}$
S. cerevisiae	5339	$0.97 \pm 0.20^{bc,I,II}$	$1.03 \pm 0.06^{ab,II}$	$0.68 \pm 0.06^{a,I,II}$	$0.51 \pm 0.07^{a,I}$	$0.52 \pm 0.04^{a,I}$
S. cerevisiae	5606	$1.24 \pm 0.00^{ab,III}$	$0.96 \pm 0.06^{ab,II}$	$0.78 \pm 0.03^{ab,II}$	$0.44 \pm 0.01^{a,I}$	$0.40 \pm 0.02^{a,I}$

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

: ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก a – c ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

: ตัวอักษรโรมัน I – III ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

: ns ที่กำกับค่าของข้อมูลของแต่ละชุดทดลองตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.6.2 ความเข้มข้นอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลจากมวลเซลล์จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์

ยีสต์ *C. utilis* TISTR 5198 เป็นจุลินทรีย์เพียงสายพันธุ์เดียวที่มีความสามารถในการผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลจากสารผสมเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าวครบทั้ง 5 สัดส่วน ได้แก่ 100 ต่อ 0 (5.04 ± 0.72 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน) 75 ต่อ 25 (5.04 ± 0.72 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน) 50 ต่อ 50 (0.72 ± 0.00 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน) 25 ต่อ 75 (8.64 ± 0.72 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน) และ 0 ต่อ 100 (0.72 ± 0.00 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน) ในขณะที่การศึกษาของพรรณทิวาและคณะ (2551) พบว่ายีสต์ *C. utilis* TISTR 5198 สามารถผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลในระบบไบโอทรานฟอร์เมชั่นแบบสองชั้นได้ที่ระดับ 1.24 และ 2.98 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน ที่อุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสารผสมลำไยอบแห้งและกากน้ำตาลเข้มข้นที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 63.5 – 64.4 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้การศึกษาของพูนศิริและคณะ (2551) พบว่า *C. utilis* TISTR 5198 สามารถผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลในระบบเบนซาลดีไฮด์อิมัลชั่นได้ที่ระดับ 8.19 ± 0.54 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสารสกัดลำไยอบแห้งที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสในระดับเดียวกัน ทั้งนี้ยีสต์ *C. utilis* TISTR 5352 เป็นจุลินทรีย์อีกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลที่ระดับ 0.07 ± 0.04 มิลลิโมล่าร์ เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยเศษของแข็งเหลือทิ้งต่ออะซิเตตบัฟเฟอร์สัดส่วนร้อยละ 100 ต่อ 0 (ตารางที่ 4.10)

ค่าความเข้มข้นอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลจากการเพาะเลี้ยง *C. utilis* TISTR 5198 ด้วยเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าวสัดส่วน 25 ต่อ 75 มีค่าค่อนข้างน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Rosche *et al.* (2002) ที่ศึกษากระบวนการผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลในระบบเบนซาลดีไฮด์อิมัลชั่น พบว่าในสภาวะที่มีเบนซาลดีไฮด์ความเข้มข้น 400 มิลลิโมล่าร์ และไพรูเวตความเข้มข้น 600 มิลลิโมล่าร์ เมื่อเติมเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสจาก *R. javanicus* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ 7.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร สามารถผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลได้ที่ระดับ 41.9 กรัมต่อลิตรต่อวัน หรือ 279 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส และงานวิจัยของ Sanford *et al.* (2005) ที่ศึกษากระบวนการผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลแบบของเหลวสองชั้น โดยใช้เอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสจาก *C. utilis* ที่มีกิจกรรมคาร์โบไลเกสที่ระดับ 8.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร พบการผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลที่ระดับ 69 กรัมต่อลิตรต่อวัน หรือ 459 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน ในชั้นออกทานอล และ 9 กรัมต่อลิตรต่อวัน หรือ 62 มิลลิโมล่าร์ ในชั้นน้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.10 ความเข้มข้นอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล (มิลลิโมล่าร์ต่อวัน) ที่จุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ผลิตได้ใน 5 สัดส่วนอาหาร

จุลินทรีย์	สายพันธุ์	สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าว				
		100 ต่อ 0	**75 ต่อ 25**	**50 ต่อ 50**	**25 ต่อ 75**	**0 ต่อ 100**
C. utilis	5198	$0.07 \pm 0.01^{b,II}$	$0.07 \pm 0.01^{b,II}$	$0.01 \pm 0.00^{b,I}$	$0.12 \pm 0.01^{b,III}$	$0.01 \pm 0.00^{b,I}$
C. utilis	5352	$0.01 \pm 0.00^{a,II}$	$0.00 \pm 0.00^{a,II}$	$0.00 \pm 0.00^{a,I}$	$0.00 \pm 0.00^{a,I}$	$0.00 \pm 0.00^{a,I}$
S. cerevisiae	5339	$0.00 \pm 0.00^{a,ns}$	$0.00 \pm 0.00^{a,ns}$	$0.00 \pm 0.00^{a,ns}$	$0.00 \pm 0.00^{a,ns}$	$0.00 \pm 0.00^{a,ns}$
S. cerevisiae	5606	$0.00 \pm 0.00^{a,ns}$	$0.00 \pm 0.00^{a,ns}$	$0.00 \pm 0.00^{a,ns}$	$0.00 \pm 0.00^{a,ns}$	$0.00 \pm 0.00^{a,ns}$

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

: ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก a – c ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

: ตัวอักษรโรมัน I – III ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

: ns ที่กำกับค่าของข้อมูลของแต่ละชุดทดลองตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.6.2 ความเข้มข้นฟอสเฟตไอออน

จากตารางที่ 4.11 ที่สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าว 100 ต่อ 0 เชื้อจุลินทรีย์ *T. reesei* TISTR 3081 สามารถผลิตฟอสเฟตไอออนสูงสุดที่ระดับ 0.1862 ± 0.0050 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน ไม่แตกต่างจากสัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าว 50 ต่อ 50 ที่ผลิตความเข้มข้นฟอสเฟตไอออนได้ 0.1858 ± 0.0066 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามที่สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าว 75 ต่อ 25, 50 ต่อ 50, 25 ต่อ 75 และ 0 ต่อ 100 เชื้อจุลินทรีย์ *T. reesei* TISTR 3080 สามารถผลิตฟอสเฟตไอออนได้สูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 0.3262 ± 0.0081, 0.4285 ± 0.0191, 0.6295 ± 0.00133 และ 0.2683 ± 0.0086 มิลลิโมล่าร์ต่อวัน ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาสัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าวที่เหมาะสมพบว่ารา *A. fumigatus* TISTR 3464 มีค่าความเข้มข้นฟอสเฟตไอออนต่อวันเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของรำข้าวที่เพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่ *B. pumilus* TISTR 061 สามารถผลิตความเข้มข้นฟอสเฟตไอออนต่อวันได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าว 75 ต่อ 25, 50 ต่อ 50 และ 25 ต่อ 75 แต่ผลิตฟอสเฟตไอออนได้ในระดับต่ำที่สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าว 100 ต่อ 0 และ 0 ต่อ 100 ตามลำดับ เช่นเดียวกับในกรณีของ *T. reesei* TISTR 3080 และ 3081 อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ด้วยเศษของแข็งเหลือทิ้งเพียงอย่างเดียว หรือรำข้าวเพียงอย่างเดียวทำให้ค่าความเข้มข้นฟอสเฟตไอออนลดลงเนื่องจากความไม่สมดุลของแหล่งอาหารคาร์บอนและแหล่งอาหารไนโตรเจน ทั้งนี้เชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงด้วยเศษของแข็งเหลือทิ้งเพียงอย่างเดียว หรือรำข้าวเพียงอย่างเดียวยังคงมีการผลิตฟอสเฟสไอออนอยู่ในระดับหนึ่งเนื่องจากเศษของแข็งเหลือทิ้งประกอบด้วยเศษเมล็ด ซังเปลือก และไหมข้าวโพด ซึ่งมีองค์ประกอบของไนโตรเจนรวมอยู่ด้วย เช่นเดียวกับในรำข้าวที่มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรต (บทที่ 2) ทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งอาหารดังกล่าวเพื่อการเจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์ได้ในระดับหนึ่ง แต่ไม่มากเท่ากับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของแหล่งอาหารคาร์บอนและแหล่งอาหารไนโตรเจนมากพอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.11 ความเข้มข้นฟอสเฟตไอออน (มิลลิโมล่าร์ต่อวัน) ที่จุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ผลิตได้ใน 5 สัดส่วนอาหาร

จุลินทรีย์	สายพันธุ์	สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าว				
		100 ต่อ 0	**75 ต่อ 25**	**50 ต่อ 50**	**25 ต่อ 75**	**0 ต่อ 100**
A. fumigatus	3464	$0.1514 \pm 0.0028^{b,I}$	$0.1384 \pm 0.0023^{b,I}$	$0.1842 \pm 0.0067^{a,I,II}$	$0.1963 \pm 0.0081^{a,I,II}$	$0.2665 \pm 0.0030^{b,II}$
T. reesei	3080	$0.1679 \pm 0.0049^{b,I}$	$0.3262 \pm 0.0081^{c,I,II}$	$0.4285 \pm 0.0191^{b,II,III}$	$0.6295 \pm 0.0133^{b,III}$	$0.2683 \pm 0.0086^{b,I,II}$
T. reesei	3081	$0.1862 \pm 0.0050^{b,II}$	$0.1242 \pm 0.0059^{b,I,II}$	$0.1858 \pm 0.0066^{a,II}$	$0.1058 \pm 0.0055^{a,I,II}$	$0.0800 \pm 0.0052^{a,I}$
B. pumilus	061	$0.0254 \pm 0.0009^{a,I,II}$	$0.0375 \pm 0.0007^{a,II,III}$	$0.0504 \pm 0.0007^{a,III}$	$0.0486 \pm 0.0008^{a,III}$	$0.0218 \pm 0.0006^{a,II}$

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

: ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก a – c ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

: ตัวอักษรโรมัน I – III ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

: ns ที่กำกับค่าของข้อมูลของแต่ละชุดทดลองตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.12 ความเข้มข้นฟอสเฟตไอออน (มิลลิโมล่าร์) ที่จุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ผลิตได้ใน 5 สัดส่วนอาหาร

จุลินทรีย์	สายพันธุ์	สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อรำข้าว				
		100 ต่อ 0	**75 ต่อ 25**	**50 ต่อ 50**	**25 ต่อ 75**	**0 ต่อ 100**
A. fumigatus	3464	$0.3028 \pm 0.0056^{b,I}$	$0.2768 \pm 0.0047^{ns,I}$	$0.3685 \pm 0.0135^{ns,I,II}$	$0.3925 \pm 0.0163^{a,I,II}$	$0.5329 \pm 0.0061^{b,II}$
T. reesei	3080	$0.1679 \pm 0.0049^{a,I}$	$0.3262 \pm 0.0081^{ns,I,II}$	$0.4285 \pm 0.0191^{ns,II,III}$	$0.6295 \pm 0.0133^{b,III}$	$0.2683 \pm 0.0086^{a,I,II}$
T. reesei	3081	$0.3724 \pm 0.0101^{b,III}$	$0.2485 \pm 0.0117^{ns,I,II}$	$0.3715 \pm 0.0133^{ns,III}$	$0.2116 \pm 0.0110^{a,I,II}$	$0.1599 \pm 0.0103^{a,I}$
B. pumilus	061	$0.1775 \pm 0.0063^{a,I,II}$	$0.2626 \pm 0.0050^{ns,II,III}$	$0.3531 \pm 0.046^{ns,III}$	$0.3405 \pm 0.0054^{a,III}$	$0.1523 \pm 0.0041^{a,I}$

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

: ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก a – b ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

: ตัวอักษรโรมัน I – III ที่กำกับค่าของข้อมูลตามแนวตั้งของแต่ละชุดทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

: ns ที่กำกับค่าของข้อมูลของแต่ละชุดทดลองตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved