ทำการคัดเลือกวิธีสกัดน้ำตาล และโปรตีนจากเนื้อลำไยอบแห้งค้างสต็อกที่เหมาะสมจาก 5 วิธีการดังนี้ (1) วิธีสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (2) วิธีสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดต่อด้วยน้ำเดือดอีก 30 นาที (3) วิธีสกัดด้วยไอน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที (4) วิธีสกัดด้วยน้ำเดือด 30 นาที และ(5) วิธีสกัดด้วยน้ำเดือด 30 นาที จำนวน 2 ครั้ง สำหรับมวลเนื้อลำไย 6 ระดับ (10, 30, 50, 70, 100 และ 130 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) ภายหลังการวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลและโปรตีน แล้วทำการเปรียบเทียบคะแนนประสิทธิภาพการสกัด และคะแนนประสิทธิภาพการสกัดสัมพัทธ์ต่อค่าใช้จ่ายและเวลาสกัด พบว่าวิธีการสกัดด้วยน้ำเดือด 30 นาที โดยใช้มวลเนื้อลำไยอบแห้ง 30 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ได้คะแนนสูงที่สุดเท่ากับ 74.1 ± 1.1 และ 100 ± 1.5 ตามลำดับ และแตกต่างกับวิธีสกัดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยสารสกัดที่ได้มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด 191 ± 3 กรัมต่อลิตร มวลน้ำตาลที่สกัดได้คิดเป็นร้อยละ 33.0 ± 0.3 กรัมต่อกรัมเนื้อลำไยอบแห้ง ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และความเข้มข้นโปรตีนมีค่าเท่ากับ 10.1 ± 1.5 องศาบริกซ์ และ 6.74 ± 0.26 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ 15 สายพันธุ์ ในสภาวะตั้งนิ่งระดับ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 25.6 องศาเซลเซียส ที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนเป็นกากน้ำตาล ลำไยอบแห้งหมดอายุ และลำไยอบแห้งหมดอายุผสมกากน้ำตาล โดยใช้มวลเนื้อลำไยอบแห้ง 30 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร หลังการสกัดด้วยน้ำเดือด 30 นาที และไม่มีการเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนอื่นเพิ่มเติม เพื่อตรวจสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล และการผลิตสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิคโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวประสิทธิภาพสูง พบว่าในกรณีที่ใช้กากน้ำตาลเพียงอย่างเดียว เชื้อจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5606 และ TISTR 5020 สามารถใช้น้ำตาลทั้งหมด (น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส) ในกากน้ำตาลได้มากที่สุดโดยมีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดในหน่วยกรัมต่อลิตร (ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมด) เหลืออยู่เท่ากับ 3.73 ± 2.4 (95.3 ± 11.2) และ 14.2 ± 6.5 (82.1 ± 8.3) ตามลำดับ ส่วนในแง่ความสามารถในการผลิตสารอินทรีย์พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5606 ผลิตเอทานอลได้ 50.5 ± 1.6 กรัมต่อลิตร *Zymomonas mobilis* TISTR 405 ผลิตกรดแลกติกได้ 8.21 ± 0.73 กรัมต่อลิตร *Z. mobilis* TISTR 548 ผลิตกรดซิตริกและกรดฟอร์มิกได้ 10.2 ± 4.8 และ 0.78 ± 0.07 กรัมต่อลิตร *S. cerevisiae* TISTR 5339 ผลิตกรดอะซิติกได้ 2.70 ± 1.59 กรัมต่อลิตร *Candida utilis* TISTR

5001 ผลิตกรดโพรพาโนอิกได้ 8.04 ± 1.04 กรัมต่อลิตร และ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ผลิตกลีเซอรอลได้ 3.14 ± 0.33 กรัมต่อลิตร สำหรับการศึกษาผลกระทบจากตัวทำละลายอินทรีย์จำพวกแอลกอฮอล์ปฐมภูมิต่างชนิด (C7 - C9) ที่มีการผสมไดโพรพิลีนไกลคอล (DPG) ในระดับหนึ่งต่อหนึ่ง ที่มีต่อระดับการผลิต *R*-phenylacetylcarbinol (PAC) สำหรับระบบของเหลวสองชั้น ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 250 รอบต่อนาที และค่า pH เริ่มต้น 6.00 พบว่าการใช้เซลล์รวมความเข้มข้น 6.12 กรัมต่อลิตรเทียบเท่ามวลชีวภาพแห้ง สามารถผลิต PAC ได้สูงสุดที่ระดับ 75.8 ± 1.8 มิลลิโมล่าร์ในชั้นสารอินทรีย์ และ 6.83 ± 0.29 มิลลิโมล่าร์ในชั้นฟอสเฟต-บัฟเฟอร์ สำหรับระบบที่ใช้ C8 + DPG เป็นชั้นสารอินทรีย์

ในกรณีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นลำไยอบแห้งหมดอายุเพียงอย่างเดียวพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR 361 *Z. mobilis* TISTR 550 *Klebsiella* sp. TISTR 1383 *S. cerevisiae* TISTR 5339 *E. coli* TISTR 1261 และ *C. utilis* TISTR 5198 ที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสกระทั่งเหลือความเข้มข้นสุดท้ายในระดับที่ต่ำกว่า 4 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ *C. utilis* TISTR 5001 *Z. mobilis* TISTR 548 *C. utilis* TISTR 5046 และ *C. utilis* TISTR 5032 มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่มากกว่า 16 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ไม่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลและสารอินทรีย์ เนื่องจากขาดแคลนแหล่งอาหารไนโตรเจนที่พอเพียง โดย *S. cerevisiae* TISTR 5020 ผลิตเอทานอลได้ 6.77 ± 2.22 กรัมต่อลิตร *Klebsiella* sp. TISTR 1383 ผลิตกรดแลกติกได้ 2.91 ± 1.18 กรัมต่อลิตร *Z. mobilis* TISTR 550 ผลิตกรดซิตริกได้ 5.55 ± 5.28 กรัมต่อลิตร *C. utilis* TISTR 5001 ผลิตกรดโพรพาโนอิกได้ 6.37 ± 0.06 กรัมต่อลิตร และ *C. utilis* TISTR 5198 ผลิตกลีเซอรอลได้ 2.63 ± 0.54 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ระดับความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้งสูงสุดที่วัดได้ยังมีค่าเพียง 3.40 ± 0.64 กรัมต่อลิตร สำหรับ *C. utilis* TISTR 5198 และในการศึกษาผลกระทบจากตัวทำละลายอินทรีย์พบว่าการใช้เซลล์รวมความเข้มข้น 6.12 กรัมต่อลิตรเทียบเท่ามวลชีวภาพแห้ง สามารถผลิต PAC ได้สูงสุดที่ระดับ 83.3 ± 23.5 มิลลิโมล่าร์ในชั้นสารอินทรีย์ และ 6.70 ± 1.88 มิลลิโมล่าร์ในชั้นฟอสเฟต-บัฟเฟอร์ สำหรับระบบที่ใช้ C8 + DPG เป็นชั้นสารอินทรีย์

ส่วนในกรณีที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจากลำไยอบแห้งหมดอายุผสมกากน้ำตาลที่สัดส่วนหนึ่งต่อหนึ่ง พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *S. cerevisiae* TISTR 5606 ผลิตเอทานอลและกลีเซอรอลได้ระดับสูงสุดเท่ากับ 38.4 ± 1.3 และ 4.51 ± 0.16 กรัมต่อลิตร *Z. mobilis* TISTR 405 ผลิตกรดแลกติกได้ 3.93 ± 0.15 กรัมต่อลิตร *E. coli* TISTR 1261 ผลิตกรดซิตริกและกรดฟอร์มิกได้ 29.1 ± 1.7 และ

2.92 ± 0.99 กรัมต่อลิตร และ *C. utilis* TISTR 5001 ผลิตกรดโพรพาโนอิกได้ 7.71 ± 0.39 กรัมต่อลิตร ภายหลังการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์ที่มีค่า pH ระดับต่ำที่สุดคือ *Z. mobilis* TISTR 405 (4.32 ± 0.01) ซึ่งสอดคล้องกับการที่จุลินทรีย์ชนิดนี้ผลิตกรดแลกติกได้ระดับสูงที่สุด ส่วนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ มีค่าลดลงต่ำที่สุด 8.00 ± 0.08 องศาบริกซ์ สำหรับ *S. cerevisiae* TISTR 5606 และในการศึกษาผลกระทบจากตัวทำละลายอินทรีย์พบว่าการใช้เซลล์รวมความเข้มข้น 6.12 กรัมต่อลิตรเทียบเท่ามวลชีวภาพแห้ง สามารถผลิต PAC ได้สูงสุดที่ระดับ 65.5 ± 3.2 มิลลิโมล่าร์ ในชั้นสารอินทรีย์ และ 7.63 ± 0.41 มิลลิโมล่าร์ ในชั้นฟอสเฟต-บัฟเฟอร์ สำหรับระบบที่ใช้ C9 + DPG เป็นชั้นสารอินทรีย์

การทดลองใช้ลำไยอบแห้งอายุ 6 ปี และ 10 เดือน ที่มีการเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนเพิ่มเติม ด้วยจุลินทรีย์ผลิตเอทานอล 15 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้อากาศก่อนเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมักเป็นสารสกัดจากลำไยอบแห้งอายุ 6 ปี พบความเข้มข้นสูงสุดของเอทานอล และค่ากิจกรรมการทำงานของไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสจาก *C. utilis* TISTR 5001 (1.26 ± 0.82 กรัมต่อลิตร) และ *S. cerevisiae* TISTR 5606 (0.01 ± 0.00 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ ส่วนการใช้สารสกัดจากลำไยอบแห้งอายุ 10 เดือน พบความเข้มข้นเอทานอลระดับสูงสุดเท่ากับ 24.7 ± 3.3 กรัมต่อลิตร โดย *S. cerevisiae* TISTR 5606 และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสสูงสุดเท่ากับ 0.05 ± 0.00 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดย *C. utilis* TISTR 5198 การประเมินจลนพลศาสตร์การเจริญโดยใช้ลำไยอบแห้งอายุ 10 เดือน เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5606 เป็นสายพันธุ์ที่ใช้น้ำตาลซูโครสและผลิตเอทานอลได้ระดับความเข้มข้นสูงสุด ยีสต์ *C. utilis* TISTR 5198 เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส (11.7 ± 0.7 กรัมต่อลิตร) และผลิตเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส (0.05 ± 0.01 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ได้ในระดับสูง กระบวนการผลิต PAC กระทำโดยใช้เอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสในรูปเซลล์รวมจาก *C. utilis* TISTR 5198 และ *S. cerevisiae* TISTR 5606 ในระบบของเหลวสองชั้นที่มีสารตั้งต้นเป็นไพรูเวตความเข้มข้น 300 มิลลิโมล่าร์ และเบนซาลดีไฮด์ความเข้มข้น 1.75 โมล่าร์ ในสารอินทรีย์หลายชนิด ที่อุณหภูมิ 6 – 8 องศาเซลเซียส อัตราเร็วในการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบระดับความเข้มข้นสูงสุดของ PAC จาก *C. utilis* TISTR 5198 (83.8 ± 6.8 มิลลิโมล่าร์) โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์โนนานอลเป็นชั้นสารอินทรีย์และตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพเซลล์รวมความเข้มข้น 12.24 กรัมต่อลิตร การใช้เซลล์รวมของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสจาก *S. cerevisiae* TISTR 5606 ผลิต PAC ได้ระดับสูงสุด (37.4 ± 2.8 มิลลิโมล่าร์) เมื่อใช้ชั้นตัวทำละลายอินทรีย์เป็นสารผสมระหว่างออกทานอลและไดโพรพิลีนไกลคอล ในสัดส่วนส่วนหนึ่งต่อหนึ่งด้วยเซลล์รวมความเข้มข้น 12.24 กรัมต่อลิตร

The selection of an appropriate sugars and protein extraction procedure from dead stock dried longan flesh using the following five extraction strategies; (1) soaking in distilled water at room temperature for 24 h, (2) soaking as described in (1) and followed by boiling for 30 min, (3) steaming for 30 min, (4) boiling for 30 min and (5) boiling for 30 min twice. Six levels of dried longan flesh were used (10, 30, 50, 70, 100 and 130 g per 100 ml distilled water). After the analyses of sugars and protein concentrations, the comparison of extraction efficiency score as well as relative extraction efficiency score, which took into account the extraction expense and time, were made. Boiling strategy for 30 min which utilized 30 g dried longan flesh per 100 ml distilled water yielded the highest scores of 74.1 ± 1.1 and 100 ± 1.5 respectively, which were different statistically from the other extraction strategies ($p \leq 0.05$). The centrifuged solution contained 191 ± 3 g/l of total sugars, $33.0 \pm 0.3\%$ g sugars per g dried longan flesh, total soluble solids of 10.1 ± 1.5 $^{\circ}$Brix, and total protein concentration of 6.74 ± 0.26 g/l.

The propagations of 15 microbial strains in static condition at 100 ml level were carried out for 48 h at 25.6°C. The employed carbon sources were the molasses, the expired dried longan and the expired dried longan mixed with molasses. All of carbon sources without the addition of any other nitrogen source were passed the boiling strategy for 30 min which utilized 30 g dried longan flesh per 100 ml distilled water. In case of the molasses, the abilities of these microbes in utilizing sugars and producing various types of organic compounds were investigated by high pressure liquid chromatography technique. On the aspect of sugars consumption, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5606 and TISIR 5020 could consume the highest level of total sugars (sucrose, glucose, and fructose) presented in the molasses with the corresponding remnants total sugars concentration in grams per litre (percentage of

total sugars consumption) of 3.73 ± 2.4 (95.3 ± 11.2) and 14.2 ± 6.5 (82.1 ± 8.3), respectively. In respect to the organic compounds production capability, *S. cerevisiae* TISTR 5606 produced 50.6 ± 1.6 g/l ethanol while *Zymomonas mobilis* TISTR 405 liberated 8.21 ± 0.73 g/l lactic acid. In addition, *Z. mobilis* TISTR 548 produced 10.2 ± 4.8 g/l citric acid and 0.78 ± 0.07 g/l formic acid, *S. cerevisiae* TISTR 5339 released 2.70 ± 1.59 g/l acetic acid. This was compared to *Candida utilis* TISTR 5001 which generated 8.04 ± 1.04 g/l propanoic acid and *S. cerevisiae* TISTR 5020 whose cultivating medium contained 3.14 ± 0.33 g/l glycerol at 48 h. The investigation of organic solvents which belonged to primary alcohol class (C7 – C9) with dipropylene-glycol (DPG) at the volume ratio of 1:1 to the production level of *R*-phenylacetyl-carbinol (PAC) for the biphasic system at 8°C, 250 rpm shaking speed and initial pH level of 6.00 indicated that the application of whole cells with concentration of 6.12 g/l (equivalent to dried biomass) resulted in the highest level of PAC at 75.8 ± 1.8 mM in organic phase and 6.83 ± 0.29 mM in phosphate buffer for the system which utilized C8 + DPG as an organic phase.

For the expired dried longan as a carbon source, the inspection of whether these microbes possessed the production capability of various organic compounds was performed. It was evident that 6 microbial strains, namely; *Escherichia coli* TISTR 361, *Z. mobilis* TISTR 550, *Klebsiella sp.* TISTR 1383, *S. cerevisiae* TISTR 5339, *E. coli* TISTR 1261, and *C. utilis* TISTR 5198, were able to consume glucose until the final concentration of this sugar was less than 4 g/l after 48 h cultivation. This was in contrast to *C. utilis* TISTR 5001, *Z. mobilis* TISTR 548, *C. utilis* TISTR 5046, and *C. utilis* TISTR 5032 whose glucose concentrations were more than 16 g/l. However, this cultivation medium was considered inappropriate for the production of ethanol and organic compounds due to the lack of adequate nitrogen source. *S. cerevisiae* TISTR 5020 was able to produce 6.77 ± 2.22 g/l ethanol while *Klebsiella sp.* TISTR 1383 generated 2.91 ± 1.18 g/l lactic acid. The concentration of citric acid up to 5.55 ± 5.28

g/l was achieved by *Z. mobilis* TISTR 550 whereas 6.37 ± 0.06 g/l of propanoic acid was evident for *C. utilis* TISTR 5001. *C. utilis* TISTR 5198 produced 2.63 ± 0.54 g/l glycerol. Besides, the maximum dried biomass concentration of merely 3.40 ± 0.64 g/l was attained by *C. utilis* TISTR 5198. The investigation of organic indicated that the application of whole cells with concentration of 6.12 g/l (equivalent to dried biomass) resulted in the highest level of PAC at 83.3 ± 23.5 mM in organic phase and 6.70 ± 1.88 mM in phosphate buffer for the system which utilized C8 + DPG as an organic phase.

The carbon sources consisted of expired dried longan mixed with. The capability of these microorganisms in the production of myriad organic compounds was investigated. *S. cerevisiae* TISTR 5606 was found to produce ethanol and glycerol at 38.4 ± 1.3 g/l and 4.51 ± 0.16 g/l, respectively. *Z. mobilis* TISTR 405 generated 3.93 ± 0.15 g/l lactic acid whereas *Escherichia coli* TISTR 1261 released 29.1 ± 1.7 g/l and 2.92 ± 0.99 g/l of citric and formic acids. This was compared to *C. utilis* TISTR 5001 which liberated 7.71 ± 0.39 g/l of propanoic acid. After 48 h cultivation period, medium with the lowest pH level belonged to *Z. mobilis* TISTR 405 (4.32 ± 0.01) which corresponded to the highest level of lactic acid produced by this microbe. The total soluble solid (TSS) was decreased to the lowest level of 8.00 ± 0.08 °Brix for *S. cerevisiae* TISTR 5606. The investigation of organic indicated that the application of whole cells with concentration of 6.12 g/l (equivalent to dried biomass) resulted in the highest level of PAC at 65.5 ± 3.2 mM in organic phase and 7.63 ± 0.41 mM in phosphate buffer for the system which utilized C9 + DPG as an organic phase.

The experiment employed 6 years and 10 months old dried longan with the addition of nitrogen sources and 15 strains of ethanol producing microbes which were cultivated in the aerated condition prior to the induction of pyruvate decarboxylase (PDC) production. By using 6 years old dried longan extract as fermentation medium, the highest level of ethanol and PDC activity were produced by *C. utilis* TISTR 5001

(1.26 ± 0.82 g/l) and *S. cerevisiae* TISTR 5606 (0.01 ± 0.00 U/ml), respectively. Meanwhile, the utilization of 10 months old dried longan extract resulted in the highest level of ethanol (24.71 ± 3.34 g/l) by *S. cerevisiae* TISTR 5606 and PDC activity of 0.05 ± 0.00 U/ml by *C. utilis* TISTR 5198. The growth kinetic assessment with 10 months old dried longan as cultivation medium of *S. cerevisiae* TISTR 5606 was acknowledged as the strain which consumed sucrose and produced ethanol at the highest level. *C. utilis* TISTR 5198 was the strain which consumed glucose (11.68 ± 0.69 g/l) and capable of producing PDC (0.05 ± 0.01 U/ml) at high level. PAC biotransformation was conducted by using whole cell PDC from *C. utilis* TISTR 5198 and *S. cerevisiae* TISTR 5606 in biphasic system with 300 mM of pyruvate and 1.75 M of benzaldehyde in various organic solvents at 6 - 8°C, 250 rpm for 72 h. The highest level of PAC was produced by *C. utilis* TISTR 5198 (83.8 ± 6.8 mM) with C9 (1-nonanol) as organic solvent and 12.24 g/l whole cells PDC as a biocatalyst. The utilization of whole cell PDC from *S. cerevisiae* TISTR 5606 resulted in the highest level of PAC (37.4 ± 2.8 mM) when the mixture of C8 (1-octanol) and dipropylene glycol (DPG) in 1:1 ratio was used as organic solvent with 12.24 g/l of whole cells PDC concentration.