

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส

จากการเก็บตัวอย่างดิน น้ำ อาหารหมัก และลูกแป้ง (ภาพ 4) จากแหล่งต่าง ๆ ทั้งหมด 64 ตัวอย่าง เพื่อนำมาแยกและคัดเลือกเชื้อ ได้แบคทีเรีย แอคติโนมัยซิส และเชื้อราที่สามารถเจริญบนอาหาร starch agar, NA และ PDA ได้ทั้งอุณหภูมิ 25°C และ 45°C จำนวน 192 ไอโซเลท และเมื่อทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีนบนอาหาร starch agar ได้ไอโซเลทที่ให้วงใสรอบโคโลนี (ภาพ 5) ทั้งหมด 145 ไอโซเลท (ตาราง 8) เป็นแบคทีเรีย 102 ไอโซเลท แอคติโนมัยซิส 31 ไอโซเลท และเชื้อรา 12 ไอโซเลท



(a)

(b)

ภาพ 4 ลักษณะของลูกแป้ง (a) ตัวอย่างลูกแป้งจากแหล่งต่าง ๆ (b) ลูกแป้งข้าวหมากจากตลาดสด อ.สันทราย จ.เชียงใหม่



ภาพ 5 การเกิดวงใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียเมื่อทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน

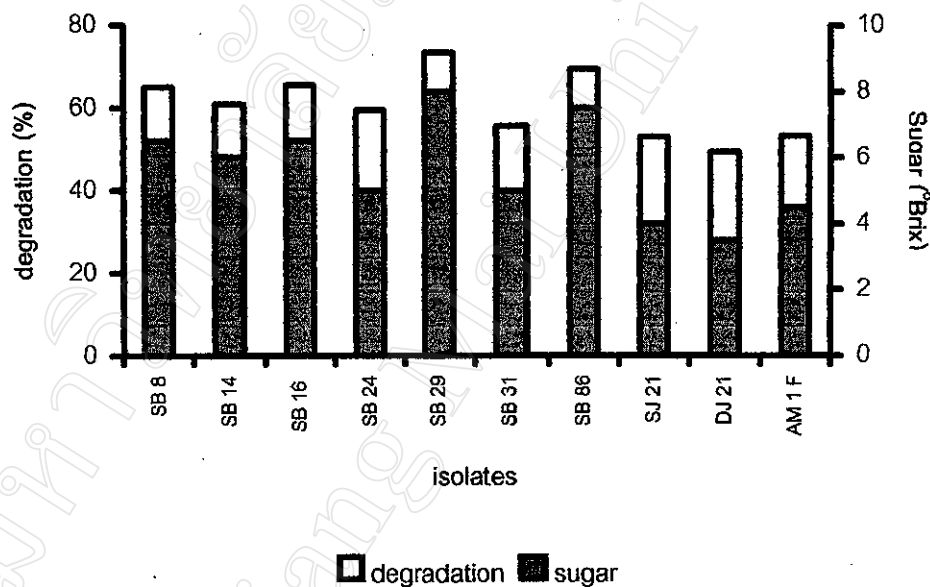
2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากข้าวกล้อง

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 145 ไอโซเลทในอาหารข้าวกล้อง 10 เปอร์เซ็นต์ เซย์ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ได้ 10 ไอโซเลทที่ให้ผลดีที่สุดดังตาราง 2

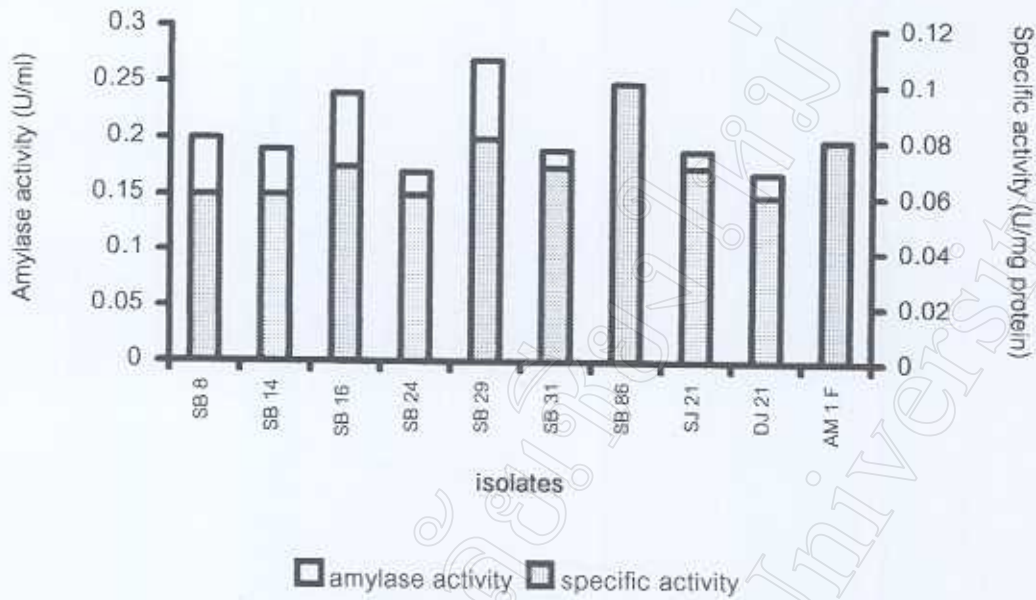
ตาราง 2 ชนิดและแหล่งที่พบจุลินทรีย์ 10 ไอโซเลทที่ให้ผลดีที่สุด

ไอโซเลท	ชนิดของจุลินทรีย์	แหล่งที่พบ
SB 8	แบคทีเรีย	ดินผสมปุ๋ยหมักและแกลบ
SB 14	แบคทีเรีย	ดินจากน้ำพุร้อน ไป่งเดือด (72°C)
SB 16	แบคทีเรีย	ดินจากบริเวณแหลมสน
SB 24	แบคทีเรีย	ขมจีนแป้งหมัก
SB 29	แบคทีเรีย	ถูกแบ่งจาก อ.ต้นทราย จ.เชียงใหม่
SB 31	แบคทีเรีย	ถูกแบ่งจาก จ. สุโขทัย
SB 86	แบคทีเรีย	ถูกแบ่งจาก อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่
SJ 21	แอคติโนมัยซิส	ดินจาก อ.แม่ทะ จ.ลำปาง
DJ 21	แอคติโนมัยซิส	ดินจากภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
AM 1 F	เชื้อรา	ดินจากภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้ง 10 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้ ในอาหารข้าวกล้อง 10% พบว่า ไอโซเลทที่ให้ผลดีที่สุดคือ SB 29 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากจาก อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ โดยให้ผลดังนี้ เปอร์เซ็นต์การย่อยข้าวกล้องสูงสุดคือ 73.3% ให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดคือ 8.0°Brix (ภาพ 6) ให้ค่า amylase activity สูงสุดคือ 0.27 U/ml ส่วนค่า specific activity ไอโซเลท SB 86 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกแป้ง อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่ คือ 0.10 U/mg protein (ภาพ 7) ดังแสดงในตาราง 9 ในภาคผนวก ข จึงคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลท SB 29 มาทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยข้าวกล้องและการผลิตเอนไซม์อะไมเลสต่อไป



ภาพ 6 เปอร์เซ็นต์การย่อยและปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าวกล้องของ 10 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้



ภาพ 7 ค่า amylase activity และค่า specific activity ที่ได้จากการหมักข้าวกล้องของ 10 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้

3. การบ่งชนิดของแบคทีเรีย SB 29



(a)

(b)

ภาพ 8 รูปร่างลักษณะของแบคทีเรีย SB 29 ที่อายุ 24 ชั่วโมง (a) Gram stain (b) endospores

ตาราง 3 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย SB 29 เทียบจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Holt *et al.*, 1994)

Characteristic	<i>Bacillus spp.</i>	<i>B. stearothermophilus</i>	SB 29
Rod-shaped	+	+	+
Endospores produced	+	+	+
Stain Gram-positive at least in young culture	+	+	+
Catalase	+	d	+
Voges-Proskauer test		-	-
Acid from			
Glucose	+	+	+
Fructose			+
Maltose			+
Arabinose		d	-
Mannitol		d	+
Dulcitol			-
Gas from glucose		-	-
Hydrolysis of			
Gelatin			-
Starch		+	+
Nitrate reduced to nitrite		d	+
Formation of Indole		-	-
Growth at			
30°C		-	+
40°C		+	+
50°C		+	+
55°C		+	+
65°C		+	+

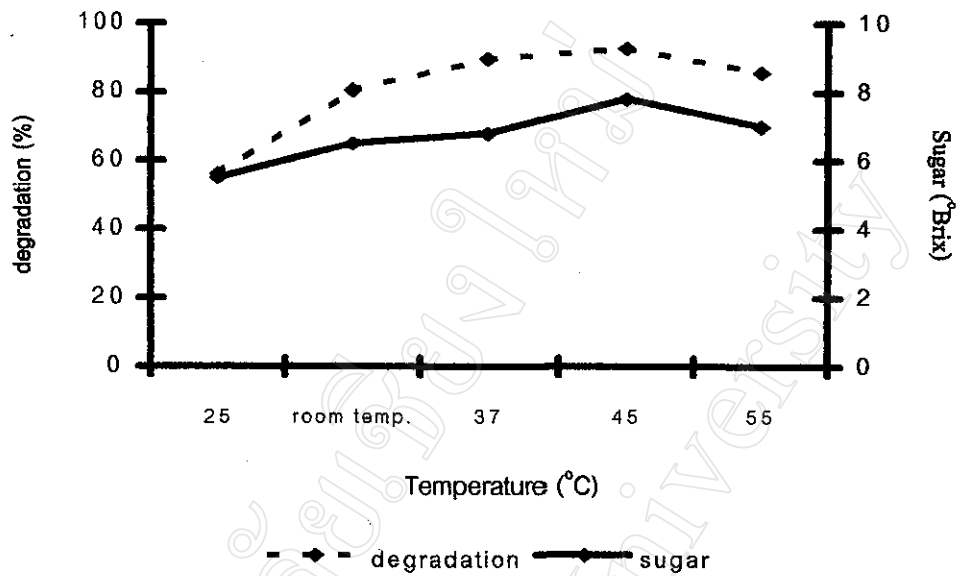
4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ *Bacillus* SB 29

4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ *Bacillus* SB 29

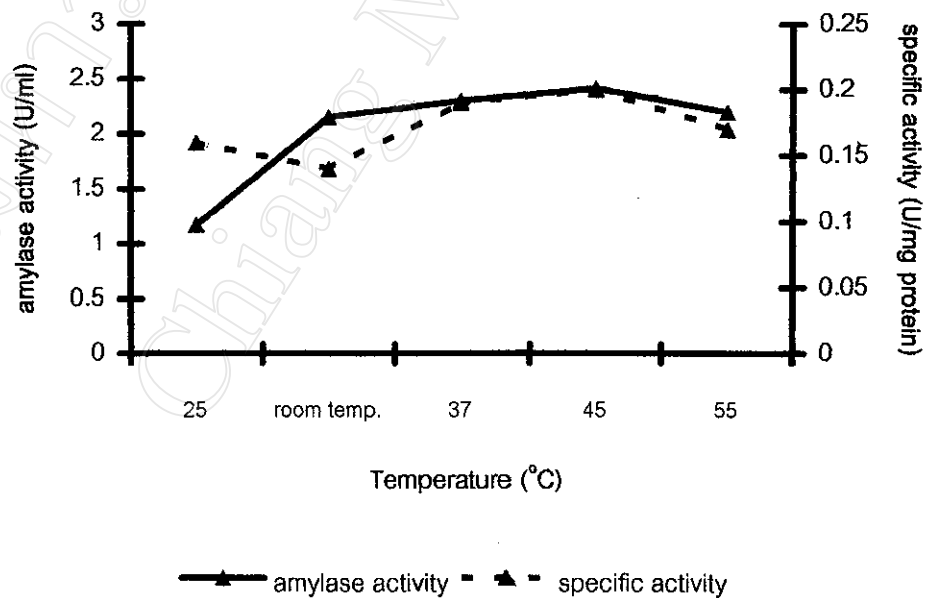
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* SB 29 ในอาหารข้าวกล้อง 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 9) ที่อุณหภูมิ 20°C, อุณหภูมิห้อง (28±2°C), 37°C, 45°C และ 55°C เป็นเวลา 3 วัน พบว่าที่อุณหภูมิ 45°C *Bacillus* SB 29 สามารถทำงานได้ดีที่สุดคือสามารถย่อยข้าวกล้องได้สูงถึง 92.72 % ได้ปริมาณน้ำตาล 7.8°Brix (ภาพ 10) ได้ค่า amylase activity 2.42 U/ml และ specific activity 0.20 U/mg protein (ภาพ 11) และตาราง 10 ในภาคผนวก จ



ภาพ 9 ลักษณะของอาหารข้าวกล้อง (a) ก่อนเกิดการย่อย (b) หลังเกิดการย่อยโดย *Bacillus* SB 29 เป็นเวลา 3 วัน



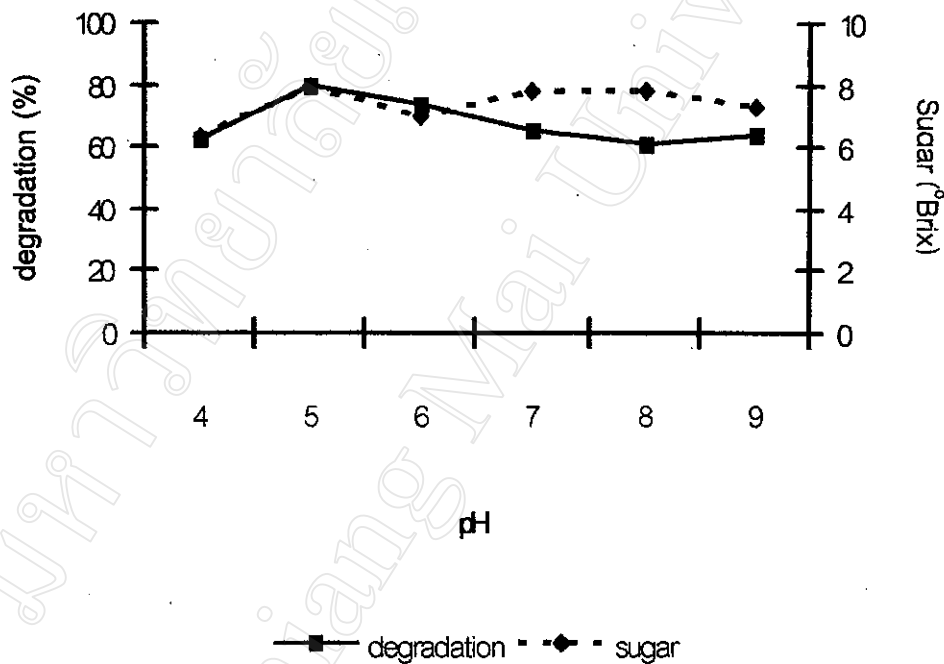
ภาพ 10 เปอร์เซ็นต์การย่อยและปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าวกล้อง 10% โดย *Bacillus* SB 29 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 3 วัน



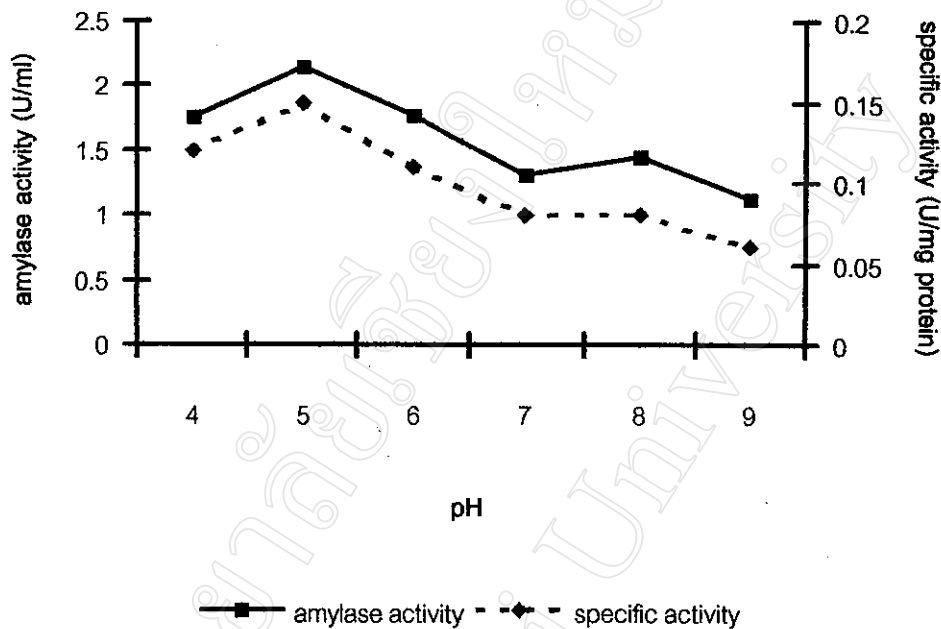
ภาพ 11 ค่า amylase activity และ specific activity ที่ได้จากการหมักข้าวกล้อง 10% โดย *Bacillus* SB 29 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 3 วัน

4.2 pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการทำงานของ *Bacillus* SB 29

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* SB 29 ในอาหารข้าวกล้อง 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 3 วัน พบว่าที่ pH 5.0 *Bacillus* SB 29 สามารถทำงานได้ดีที่สุดคือ สามารถย่อยข้าวกล้องได้ 79.37 % ได้ปริมาณน้ำตาล 8.0°Brix (ภาพ 12) ได้ค่า amylase activity 2.15 U/ml และ specific activity 0.15 U/mg protein (ภาพ 13) และตาราง 11 ในภาคผนวก จ



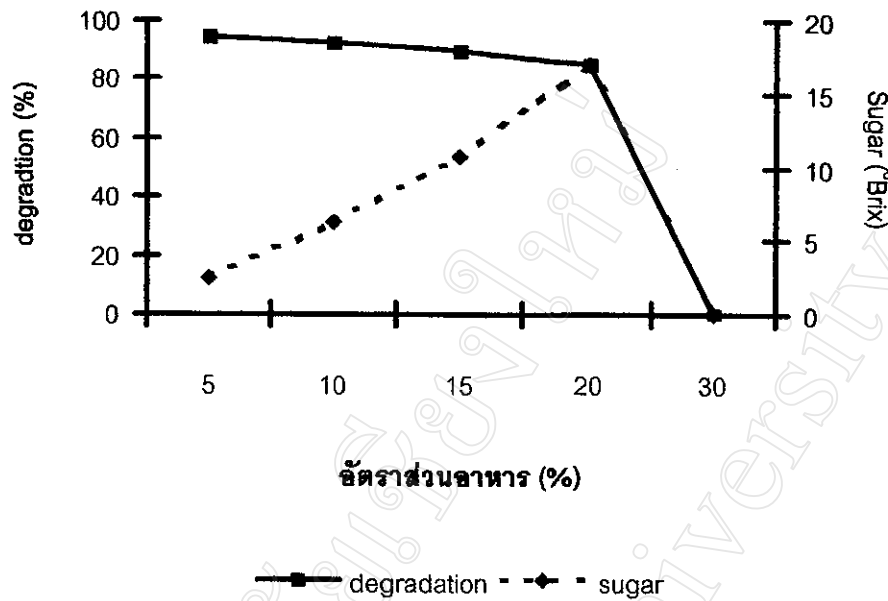
ภาพ 12 เปอร์เซ็นต์การย่อยและปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าวกล้อง 10% โดย *Bacillus* SB 29 ที่ pH ต่าง ๆ เป็นเวลา 3 วัน



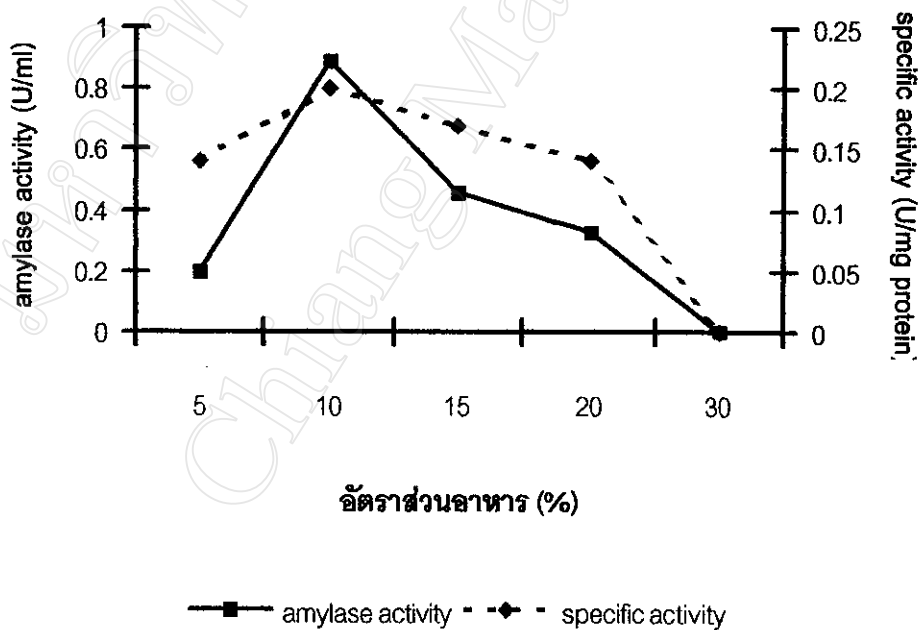
ภาพ 13 ค่า amylase activity และ specific activity ที่ได้จากการหมักข้าวกล้อง 10% โดย *Bacillus* SB 29 ที่ pH ต่าง ๆ เป็นเวลา 3 วัน

4.3 อัตราส่วนของอาหารข้าวกล้องที่เหมาะสมต่อการทำงานของ *Bacillus* SB 29

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* SB 29 ในอาหารข้าวกล้อง 5%, 10%, 15%, 20% และ 30% ที่ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 3 วัน พบว่าอาหารข้าวกล้อง 5% ให้เปอร์เซ็นต์การย่อยสูงสุดคือ 94.49% อาหารข้าวกล้อง 20% ได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดคือ 17°Brix (ภาพ 14) แต่ที่อาหารข้าวกล้อง 10% ให้ค่า amylase activity และ specific activity สูงสุดคือ 0.89 U/ml และ 0.20 U/mg protein (ภาพ 15) ตามลำดับดังแสดงในตาราง 12 ในภาคผนวก จ



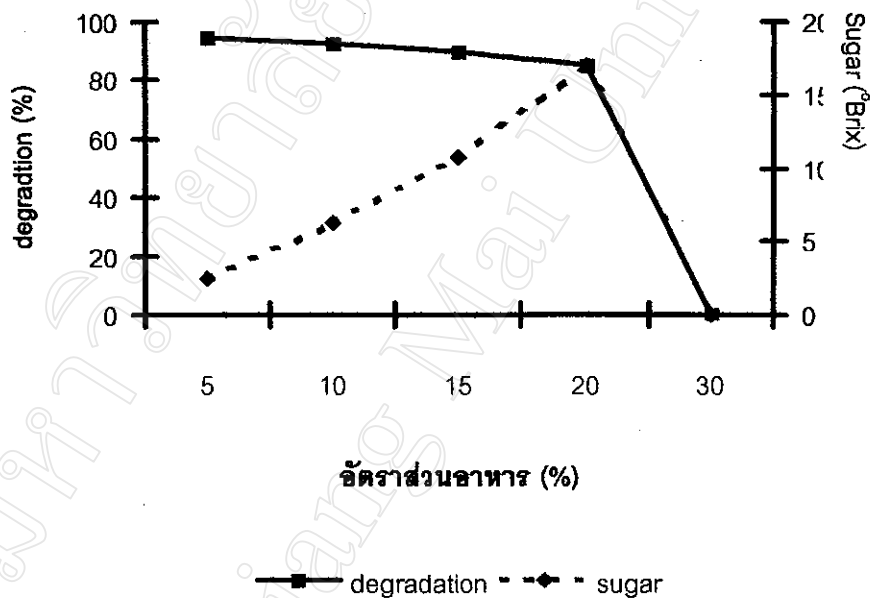
ภาพ 14 เปอร์เซ็นต์การย่อยและปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าวกล้องที่อัตราส่วนต่างๆ โดย *Bacillus SB 29* เป็นเวลา 3 วัน



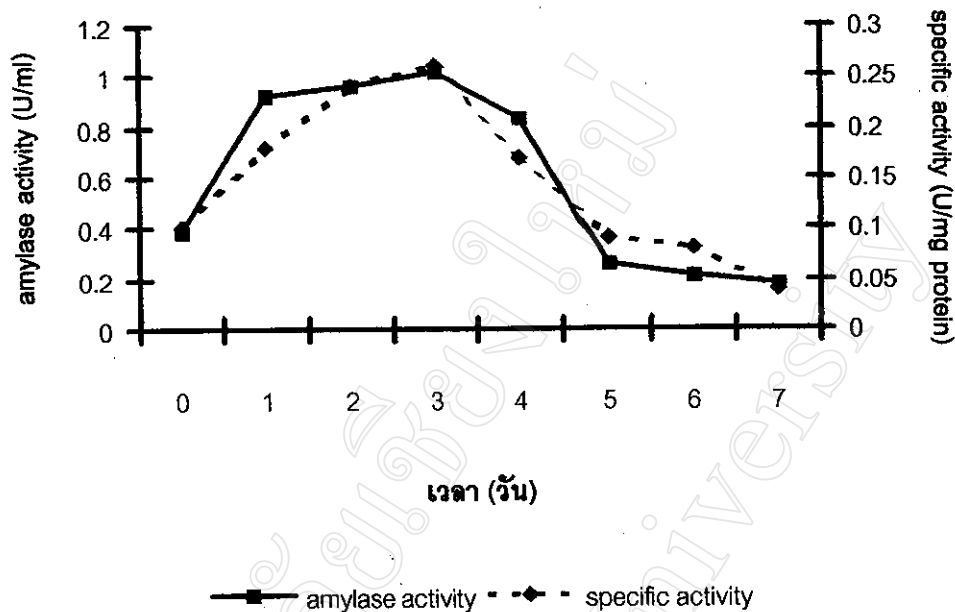
ภาพ 15 ค่า amylase activity และ specific activity ที่ได้จากการหมักข้าวกล้องที่อัตราส่วนต่างๆ โดย *Bacillus SB 29* เป็นเวลา 3 วัน

4.4 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของ *Bacillus* SB 29

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* SB 29 ในอาหารข้าวกล้อง 20% ที่ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วันพบว่าเชื้อสามารถย่อยข้าวได้มากขึ้นเรื่อย ๆ จนวันที่ 7 สามารถย่อยได้ 95.13% ส่วนปริมาณน้ำตาล amylase activity และ specific activity สูงสุดในวันที่ 3 คือ ได้น้ำตาล 7.0°Brix(ภาพ 16) ได้ค่า amylase activity 1.02 U/ml และ specific activity 0.26 U/mg protein (ภาพ 17) ดังตาราง 13 ในภาคผนวก จ



ภาพ 16 เปรียบเทียบการย่อยและปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าวกล้องที่ระยะเวลาต่างๆ โดย *Bacillus* SB 29

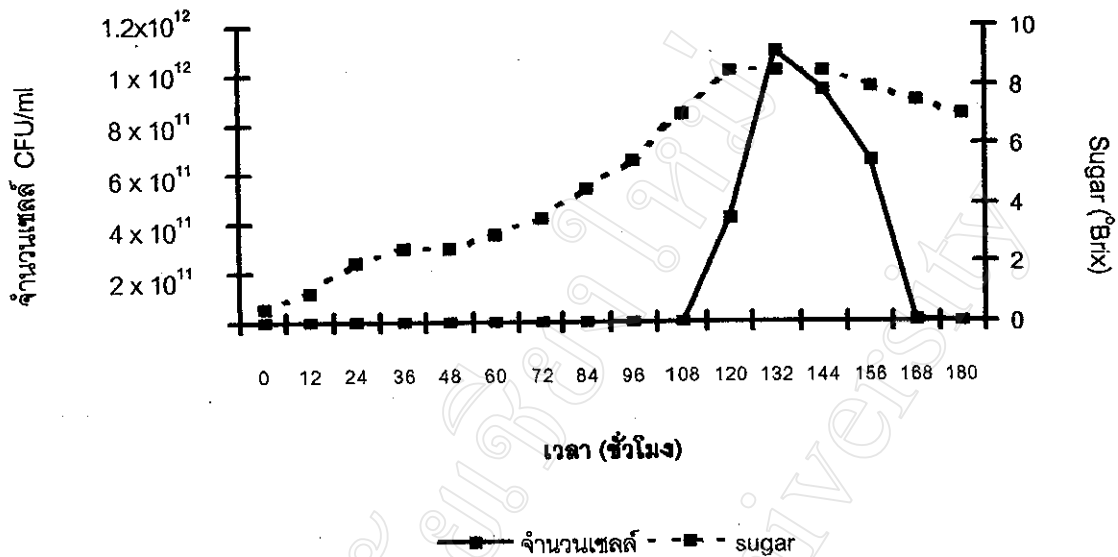


ภาพ 17 ค่า amylase activity และ specific activity ที่ได้จากการหมักข้าวกล้องที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดย *Bacillus* SB 29

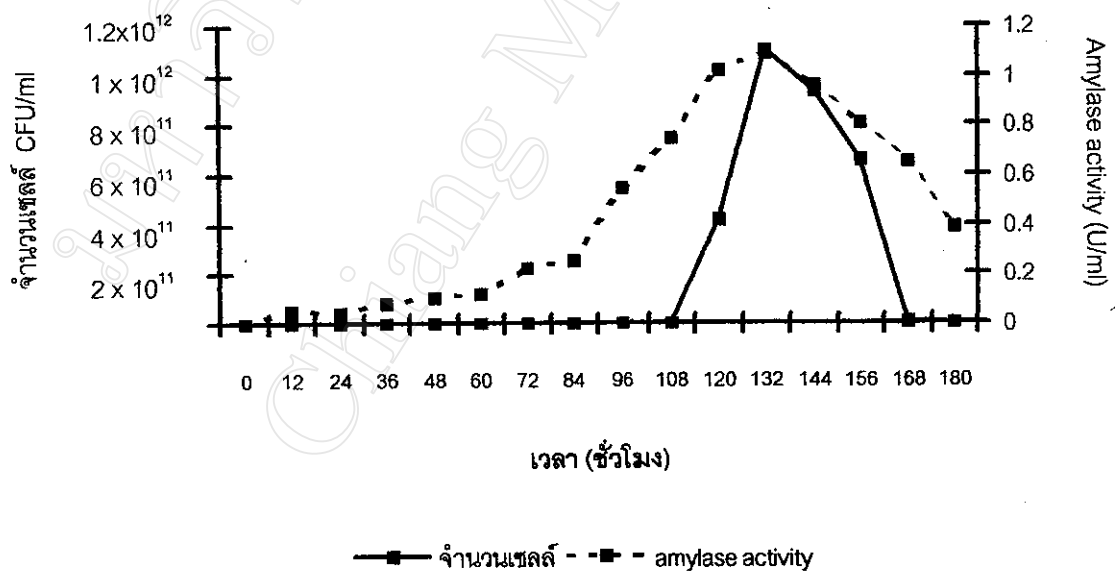
5. การศึกษาอัตราการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *Bacillus* SB 29

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* SB29 ในอาหารข้าวกล้อง 15% ที่มีการปรับ pH เริ่มต้นเป็น 5.0 เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เพื่อทำการ pour plate คู่อัตราการเจริญของเชื้อ พบว่าที่ ชั่วโมงที่ 0 มีเชื้อเริ่มต้น 7.5×10^7 CFU/ml และค่อนข้างคงที่หรือเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย จนถึงชั่วโมงที่ 108 และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 132 จนสูงสุดที่ 1.1×10^{12} CFU/ml และค่อนข้างคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 156 หลังจากนั้นก็ค่อย ๆ ลดลง

เมื่อวัดน้ำตาลที่ได้โดยใช้ refractometer พบว่าน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 0.5°Brix และเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 คือ 8.5°Brix และคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 144 จากนั้นจึงค่อย ๆ ลดลง (ภาพ 18) ดังตาราง 14 ในภาคผนวก ข



ภาพ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *Bacillus* SB 29 และปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าวกล้อง 15% ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่เขย่า



ภาพ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *Bacillus* SB 29 และการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ที่ได้จากการหมักข้าวกล้อง 15% ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่เขย่า

6. การหมักแอลกอฮอล์โดย *Bacillus* SB 29 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5094



ภาพ 20 การหมักในขวดสี่ขาปากแคบขนาด 4 ลิตร (a) ปิดด้วยจุกสำลีพันปลายไม้ (b) ปิดด้วย air lock

ผลการหมักแอลกอฮอล์จากข้าวกล้องชุดที่ 1 และ 3 หลังจากหมักด้วย *Bacillus* SB 29 เป็นเวลา 5 วันแล้ว จึงหมักต่อด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5094 จนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก พบว่าใช้เวลา 4 วัน (ไม่มีก๊าซพุ่งขึ้นมาที่ air lock) ส่วนชุดที่ 2 ที่มีการหมักด้วย *Bacillus* SB 29 และ *Sacch. cerevisiae* TISTR 5094 ไปพร้อม ๆ กัน พบว่าใช้เวลาในการหมัก 9 วันเช่นเดียวกัน จึงสิ้นสุดกระบวนการหมักโดยดูจากการที่ไม่มีก๊าซพุ่งขึ้นมาที่ air lock

ส่วนผลการหมักแอลกอฮอล์จากข้าวขาวก็ให้ผลเช่นเดียวกันคือ ชุดที่ 1 2 และ 3 ใช้ระยะเวลาในการหมักรวม 9 วันเช่นเดียวกัน แต่ผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ที่ได้จากการใช้ข้าวขาวจะมีปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำกว่า สีขาวขุ่นกว่า และให้กลิ่นที่ไม่ดีเท่าผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์จากข้าวกล้อง (ตาราง 4 และภาพ 21)

ตาราง 4 ผลการหมักแอลกอฮอล์ของข้าวกล้องและข้าวขาวโดย *Bacillus* SB 29 และ *Sacch. cerevisiae* TISTR 5094

ชุดทดลอง	เวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	น้ำตาลที่เหลือ (°Brix)	ปริมาณแอลกอฮอล์ (%)	ปริมาณกรดทั้งหมด (% w/v)
ข้าวกล้องชุดที่ 1	9	3.5	4.2	3.49
ข้าวกล้องชุดที่ 2	9	2.0	6.2	4.64
ข้าวกล้องชุดที่ 3	9	4.0	2.9	2.30
ข้าวขาวชุดที่ 1	9	3.5	2.5	2.70
ข้าวขาวชุดที่ 2	9	2.5	3.6	3.13
ข้าวขาวชุดที่ 3	9	3.5	2.7	1.48

ชุดที่ 1 หมายถึง เพาะเชื้อ *Bacillus* SB 29 หมักทิ้งไว้ 5 วัน จึงเพาะเชื้อ *Sacch. cerevisiae* TISTR 5094 หมักทิ้งไว้จนกว่าจะสิ้นสุดกระบวนการ

ชุดที่ 2 หมายถึง เพาะเชื้อ *Bacillus* SB และเชื้อ *Sacch. cerevisiae* TISTR 5094 หมักทิ้งไว้จนกว่าจะสิ้นสุดกระบวนการ

ชุดที่ 3 หมายถึง เพาะเชื้อ *Bacillus* SB 29 หมักทิ้งไว้ 5 วัน นำไปเหวี่ยงแยกตะกอน นำเฉพาะส่วนใสไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วจึงเพาะเชื้อ *Sacch. cerevisiae* TISTR 5094 หมักทิ้งไว้จนกว่าจะสิ้นสุดกระบวนการ



(a)

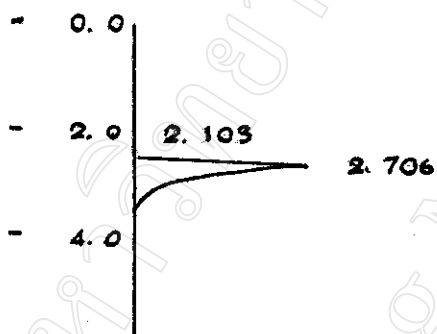
(b)

ภาพ 21 ผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ที่ได้ (a) จากการหมักข้าวกล้อง (b) จากการหมักข้าวขาว

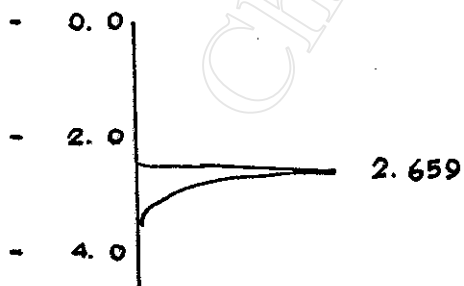
เมื่อนำผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ที่ได้จากข้าวกลี้ง ไปตรวจหาชนิดของแอลกอฮอล์โดยการ
ทำ gas chromatography (GC) พบว่าแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักทั้ง 3 จุด เป็นเอธิลแอลกอฮอล์
หรือ เอทานอล (ภาพ 22)



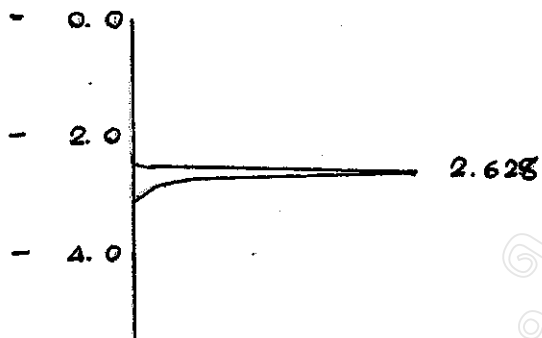
(a)



(b)



(c)



(d)

ภาพ 22 การตรวจชนิดแอลกอฮอล์โดย gas chromatography (GC)

- (a) Standard ethanol
- (b) ผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์จากข้าวกลั่นชุดที่ 1
- (c) ผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์จากข้าวกลั่นชุดที่ 2
- (d) ผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์จากข้าวกลั่นชุดที่ 3