วว.TISTR

โครงการวิจัยที่ ภ.62-10/ย.1/รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

# โครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตน้ำตาลความเข้มข้นสูงจากข้าวโดยใช้เทคโนโลยีเมมเบรน

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

**สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย**

**โครงการวิจัยที่ ภ.62-10**
**ชุดโครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการแปรรูปข้าว เพื่อใช้ทางการแพทย์**

**โครงการย่อยที่ 1**
**โครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตน้ำตาลความเข้มข้นสูงจากข้าว**
**โดยใช้เทคโนโลยีเมมเบรน**

# รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)
# โครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตน้ำตาลความเข้มข้นสูงจากข้าว โดยใช้เทคโนโลยีเมมเบรน


**โดย**

**อธิษฐาน ทิมแย้มประเสริฐ** **ลาวัลย์ ชตานนท์**
**บุญเตือน มงคลแถลง** **จุฬาลักษณ์ จันด้วง**



บรรณาธิการ วว., ปทุมธานี 2563
อลิสรา คูประสิทธิ์
บุญเรียม น้อยชุมแพ
สลิลดา พัฒนศิริ



สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(นางชุติมา เอี่ยมโชติชวลิต)
ผู้ว่าการ

# กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้จัดทำโครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตน้ำตาลความเข้มข้นสูงจากข้าวโดยใช้เทคโนโลยีเมมเบรน ขอแสดงความขอบคุณ ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่สนับสนุนเชื้อจุลินทรีย์ในการทดสอบ รวมทั้งนางสาวปิยธิดา คำภูธร และนายก้องภพ เพาะทรัพย์ นักศึกษาฝึกงานจากคณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ ที่มีส่วนช่วยให้งานสำเร็จตามวัตถุประสงค์ ไว้ ณ ที่นี้.

# สารบัญ

**หน้า**


| | |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | ก |
| สารบัญตาราง | ค |
| สารบัญรูป | ง |
| ABSTRACT | 1 |
| บทคัดย่อ | 2 |
| 1. บทนำ | 3 |
| 2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ | 5 |
| 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ | 28 |
| 4. สรุปผลการวิจัย | 49 |
| 5. แนวทางการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ | 52 |
| 6. ข้อเสนอแนะ | 54 |
| 7. เอกสารอ้างอิง | 55 |

# สารบัญตาราง


| | | หน้า |
|---|---|---|
| ตารางที่ 1. | ผลการศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 สำหรับผลิตน้ำตาลข้าว เพื่อลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง | 30 |
| ตารางที่ 2. | การทดลองหาปริมาณชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลข้าว โดยใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง | 32 |
| ตารางที่ 3. | ผลการศึกษาการเตรียมข้าวเจ้าสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave สำหรับใช้ในการผลิตน้ำตาลข้าว | 34 |
| ตารางที่ 4. | จำนวนปัจจัยและระดับในการออกแบบการทดลองโดยใช้ CCD เพื่อหาความเหมาะสมในการผลิตน้ำตาลข้าวด้วยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 | 35 |
| ตารางที่ 5. | ผลการทดลองตามแผนการทดลองโดยใช้ CCD และค่าการทำนายผลการทดลองเพื่อหาความเหมาะสมของการผลิตน้ำตาลข้าวจากข้าวเจ้าที่สุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave และใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง | 36 |
| ตารางที่ 6. | ค่าสัมประสิทธิ์ของโมเดล RSM (Regression coefficients of predicted quadratic polynomial model for the regression equation of production of rice sugar) | 37 |
| ตารางที่ 7. | การวิเคราะห์ทางสถิติของโมเดล (ANOVA for the quadratic polynomial model of production of rice sugar) | 37 |
| ตารางที่ 8. | ผลการทดลองเพิ่มข้าวเจ้าสุกในระหว่างการหมัก เพื่อต่อเชื้อและเพาะเลี้ยงให้ขยายในข้าวใหม่ | 42 |

# สารบัญรูป


| | | หน้า |
|---|---|---|
| รูปที่ 1. | การวัดจำนวนชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร โดยวัดจากการทำตารางจากด้านนอกของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ | 7 |
| รูปที่ 2. | หลอดของเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญใน YM broth สำหรับนำไปคลุกเคล้ากับแป้งข้าวเจ้า (ตราปลาไทย 5 ดาว) ในขวดรูปชมพู่ ก่อนที่จะนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ | 8 |
| รูปที่ 3. | การวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) ในน้ำตาลข้าวที่อยู่ในหลอดทดลองและในขวดรูปชมพู่ โดยใช้ Hand refractometer | 9 |
| รูปที่ 4. | หลอดของเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญใน YM broth, ข้าวเจ้าหุงสุก 10 กรัม ในขวดรูปชมพู่ และเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญบนข้าวเจ้าสุก | 9 |
| รูปที่ 5. | การทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ในถุงใสซึ่งแขวนไว้ในแนวตั้งที่อุณหภูมิห้อง | 10 |
| รูปที่ 6. | หลอดเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญบนอาหารแข็งแบบผิวหน้าเอียง (PDA slant) | 11 |
| รูปที่ 7. | การตัดชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญอยู่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ขนาด 1×1 ตารางเซนติเมตร | 12 |
| รูปที่ 8. | หลอดของเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่บ่มด้วย YM broth ร่วมกับข้าวเจ้าหุงสุก | 13 |
| รูปที่ 9. | การใช้ไมโครปิเปตต์ดูดน้ำตาลข้าวที่ผลิตได้ในแต่ละวันออกมาเก็บในขวดเพื่อวัดปริมาตรและวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด | 14 |
| รูปที่ 10. | ข้าวเจ้าดิบ 30 กรัม ในถุงร้อนใสขนาด 7x11 นิ้ว ที่ผสมน้ำในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อนำไปทำให้สุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวด้วย Autoclave | 15 |
| รูปที่ 11. | ข้าวเจ้าดิบและน้ำตามอัตราส่วนต่างๆ ก่อนเข้า Autoclave เพื่อหุงสุกและฆ่าเชื้อ และข้าวที่ออกจาก Autoclave พักไว้ในตู้ปลอดเชื้อ | 17 |
| รูปที่ 12. | การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตน้ำตาลข้าว | 17 |
| รูปที่ 13. | เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เตรียมไว้นำไปใส่ผลิตน้ำตาลจากข้าวร่วมกับชิ้นเชื้อ | 18 |

# สารบัญรูป (ต่อ)


| | | หน้า |
|---|---|---|
| รูปที่ 14. | ชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 สำหรับผลิตน้ำตาลจากข้าวร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส | 18 |
| รูปที่ 15. | การทดลองเพิ่มข้าวเจ้าสุกในระหว่างการหมัก | 19 |
| รูปที่ 16. | การทดลองนำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวเจ้ากลับมาใช้ซ้ำในข้าวเจ้าสุกใหม่ปลอดเชื้อ | 20 |
| รูปที่ 17. | การทดลองนำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวเหนียวกลับมาใช้ซ้ำในข้าวเหนียวสุกใหม่ปลอดเชื้อ | 20 |
| รูปที่ 18. | การทดลองขยายขนาดปริมาณการผลิตน้ำตาลจากข้าวแบบแยกน้ำตาลข้าวจากผลของความเหมาะสมตามสถิติโมเดล RSM | 21 |
| รูปที่ 19. | แบบสร้างเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าว | 22 |
| รูปที่ 20. | ข้าวเจ้าดิบสำหรับเตรียมไปหุงพร้อมนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave | 23 |
| รูปที่ 21. | การนำข้าวดิบไปหุงพร้อมนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave และข้าวสุกที่ได้ใน Autoclave | 23 |
| รูปที่ 22. | ข้าวที่ได้จากการหุงพร้อมฆ่าเชื้อด้วย Autoclave | 24 |
| รูปที่ 23. | ชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 สำหรับนำไปคลุกเคล้ากับข้าวสุกเพื่อเตรียมหัวเชื้อ | 25 |
| รูปที่ 24. | การทดสอบต้นแบบเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าว | 25 |
| รูปที่ 25. | การกรองน้ำตาลข้าวด้วย Ultrafiltration membrane เพื่อแยกน้ำตาลออกมาใช้ และการนำเอนไซม์ที่แยกได้ใส่กลับเข้าไปใช้ซ้ำในถังของต้นแบบเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าว | 26 |
| รูปที่ 26. | อุปกรณ์เมมเบรนและปั๊มในการกรองน้ำตาลข้าว | 26 |
| รูปที่ 27. | Response surface plots ที่แสดงผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลข้าว | 38 |
| รูปที่ 28. | Response surface plots ที่แสดงผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลข้าวที่ใช้เชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส | 40 |
| รูปที่ 29. | น้ำตาลข้าวเจ้าที่ผลิตได้จากการนำเอนไซม์ในน้ำตาลข้าวเจ้ากลับมาใช้ซ้ำและกากข้าวหมักที่เหลือ | 43 |

# สารบัญรูป (ต่อ)


| | | |
|---|---|---|
| รูปที่ 30. | น้ำตาลข้าวเหนียวที่ผลิตได้จากการนำเอนไซม์ในน้ำตาลข้าวเหนียวกลับมาใช้ซ้ำและกากข้าวหมักที่เหลือ | 44 |
| รูปที่ 31. | ผลการทดลองขยายขนาดปริมาณการผลิตน้ำตาลจากข้าวแบบแยกน้ำตาลข้าวจากผลของความเหมาะสมตามสถิติโมเดล RSM | 45 |
| รูปที่ 32. | ตะแกรงและใบกวนที่ถอดประกอบได้ในถังหมัก | 46 |
| รูปที่ 33. | อุปกรณ์เมมเบรนในการนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำ และเซรามิคเมมเบรนขนาด 0.3 ไมครอน สำหรับกรองอากาศให้ปลอดเชื้อ | 47 |
| รูปที่ 34. | ระบบควบคุมอุณหภูมิที่ประกอบอยู่ใต้ตัวถัง และระบบควบคุมความชื้นที่ประกอบอยู่บนตัวถัง | 47 |
| รูปที่ 35. | น้ำตาลข้าวที่ได้จากการผลิตด้วยเครื่องต้นแบบ | 48 |

# RESEARCH AND DEVELOPMENT ON RICE SUGAR CONCENTRATING PROCESS BY MEMBRANE TECHNOLOGY

**Athitan Timyamprasert, Lawan Chatanon, Boonteun Mongkoltalang and Julalak Chanduang**

## ABSTRACT

The development of rice sugar concentrating process from rice using membrane technology for recycling enzyme is the purpose of this research study. The experimental results for production the rice sugar showed that the optimum conditions were 5 pieces of starter culture (Amylomyces rouxii TISTR 3182), 100 g of sterilized Thai white rice (ml of water to g of raw Thai white rice ratio of 2 : 1 was sterilized by autoclave). This method could reduce the culture time of the Amylomyces rouxii TISTR 3182 from 9 days to 3 days and higher production of rice sugar. The experimental results for adding the sterilized Thai white rice (STWR) during the fermentation showed that the maximum of adding the STWR were 1 times a day for 10 days. The experimental results for recycling enzyme with the STWR showed that the 500 g of STWR was disintegrated at 57.2% and gave 337 ml of rice sugar product and total dissolved solids content at 23.5°Brix. For recycling enzyme with sterilized Thai white sticky rice (STWSR) showed that the 500 g of STWSR was disintegrated at 81.4% and gave 498 ml of rice sugar product and total dissolved solids content at 37.5°Brix. The experimental results for testing the rice sugar production machine showed that the 5 kg of STWR could give the rice sugar product on the second days of fermentation process. After recycling enzyme and adding 5 kg of STWR, it gave 4,242 ml of rice sugar product, total dissolved solids content at 23°Brix and reducing sugar content at 552.68 mg/ml in 8 days of fermentation process. For the STWSR, the experimental results of the rice sugar production machine showed that the 5 kg of STWSR could give the rice sugar product on the first days of the fermentation process. After recycling enzyme and adding 5 kg of STWSR, it gave 6,300 ml of rice sugar product, total dissolved solids content at 38°Brix and reducing sugar content at 875.09 mg/ml in 7 days of fermentation process. Thai white rice sugar and Thai white sticky rice sugar were concentrated from 23 to 49.5°Brix and 38 to 56°Brix, respectively.

# โครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตน้ำตาลความเข้มข้นสูงจากข้าวโดยใช้เทคโนโลยีเมมเบรน

**อธิษฐาน ทิมแย้มประเสริฐ[1], ลาวัลย์ ชตานนท์[2], บุญเตือน มงคลแถลง[1] และ จุฬาลักษณ์ จันด้วง[1]**

## บทคัดย่อ

โครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตน้ำตาลความเข้มข้นสูงจากข้าวโดยใช้เทคโนโลยีเมมเบรนนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตน้ำตาลความเข้มข้นสูงจากข้าวโดยใช้เมมเบรนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำ การทดลองหาสภาวะและกระบวนการที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลจากข้าว พบว่าการใช้ชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 จำนวน 5 ชิ้น บ่มและขยายเชื้อให้เจริญบนข้าวเจ้าสุกปลอดเชื้อจำนวน 100 กรัม ที่ผ่านการหุงสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันโดยใช้ Autoclave ในอัตราส่วนน้ำต่อข้าวเจ้าดิบ 2 : 1 สามารถลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อจาก 9 วัน ลงเหลือ 3 วัน และผลิตน้ำตาลได้สูงสุด การทดลองเพิ่มข้าวเจ้าสุกในระหว่างการหมักเพื่อต่อเชื้อและเพาะเลี้ยงให้ขยายในข้าวใหม่ พบว่าเพิ่มข้าวสุกได้สูงสุด 10 ครั้ง โดยเพิ่มได้วันละ 1 ครั้ง นาน 10 วัน การทดลองนำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวกลับมาใช้ซ้ำ พบว่าข้าวเจ้าสุกใหม่ปลอดเชื้อ 500 กรัม ถูกย่อยไป 286 กรัม (57.2 เปอร์เซ็นต์) สามารถผลิตน้ำตาลข้าวได้ 337 มิลลิลิตร มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 23.5 องศาบริกซ์ ส่วนข้าวเหนียวสุกใหม่ 500 กรัม ถูกย่อยไป 402 กรัม (81.4 เปอร์เซ็นต์) สามารถผลิตน้ำตาลข้าวได้ 436 มิลลิลิตร มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 37.5 องศาบริกซ์ การทดสอบเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าว พบว่าหมักข้าวเจ้าสุกปลอดเชื้อ 5 กิโลกรัม ในเครื่อง เริ่มได้น้ำตาลข้าวเจ้าในวันที่ 2 ของการหมัก ทำการเก็บน้ำตาลข้าวแล้วนำเอนไซม์กลับไปใช้ซ้ำพร้อมกับเพิ่มข้าวเจ้าสุกใหม่ปลอดเชื้อ 5 กิโลกรัม สามารถเก็บน้ำตาลข้าวได้ทุกวันเริ่มตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 8 ได้น้ำตาลทั้งหมด 4,242 มิลลิลิตร มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 23 องศาบริกซ์ และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 552.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับข้าวเหนียว พบว่าได้น้ำตาลข้าวตั้งแต่วันที่ 1 ของการหมัก ทำการเก็บน้ำตาลข้าวแล้วนำเอนไซม์กลับไปใช้ซ้ำพร้อมกับเพิ่มข้าวเหนียวสุกใหม่ปลอดเชื้อ 5 กิโลกรัม สามารถเก็บน้ำตาลข้าวเหนียวทุกวันเริ่มตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ได้น้ำตาลทั้งหมด 6,300 มิลลิลิตร มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 38 องศาบริกซ์ และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 875.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเพิ่มความเข้มข้นของค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของน้ำตาลข้าวเจ้าและน้ำตาลข้าวเหนียวโดยใช้ความร้อนได้เท่ากับ 49.5 และ 56 องศาบริกซ์ ตามลำดับ

---

[1]ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมหุ่นยนต์และเครื่องจักรกลอัตโนมัติ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)
[2]ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ, วว.

# 1. บทนำ

โครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตน้ำตาลความเข้มข้นสูงจากข้าวโดยใช้เทคโนโลยีเมมเบรน เป็นหนึ่งในชุดของโครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการแปรรูปข้าว เพื่อใช้ทางการแพทย์ ซึ่งเน้นเรื่องการพัฒนาเทคโนโลยีในการเพิ่มมูลค่าข้าว แปรรูปข้าวให้เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการส่งเสริมและรักษาสุขภาพ เนื่องจากในปัจจุบันราคาข้าวเปลือกและข้าวสารมักตกต่ำอยู่เป็นประจำและประเทศไทยยังคงขายข้าวในรูปแบบเดิม คือ เมล็ดข้าว โดยการนำข้าวเปลือกมาสีแล้วส่งออก แต่ไม่มีการแปรรูปข้าวให้มีมูลค่าสูงขึ้น จนส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศ.

ความเป็นมาของโครงการนี้คือ การสืบเนื่องมาจาก มีหนังสือด่วนที่สุด จากเลขาธิการคณะรัฐมนตรี ตามเอกสารเลขที่ นร 0506/ว 66 สำนักเลขาธิการคณะรัฐมนตรี ทำเนียบรัฐบาล เรื่อง ข้อสั่งการของนายยกรัฐมนตรี ถึงรัฐมนตรีว่าการกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และหนังสือด่วนที่สุด จาก รอง ปกท.วท ตามเอกสารเลขที่ วท 0211/ว 2287 จากสำนักงานปลัดกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีถึง ผวว. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยท่าน รมว.วท. มีบัญชาให้สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย พิจารณาและดำเนินการตามข้อสั่งการของนายกรัฐมนตรี และขอได้โปรดดำเนินการตามมติคณะรัฐมนตรีในส่วนที่เกี่ยวข้องด้านเศรษฐกิจ ข้อ 5. คือ ให้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ร่วมกับกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและกระทรวงอุตสาหกรรมให้การสนับสนุนนวัตกรรมและเทคโนโลยีในการเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตร การแปรรูปข้าวให้เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆ.

ดังนั้นจึงได้ศึกษาวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตน้ำตาลความเข้มข้นสูงจากข้าวโดยใช้เทคโนโลยีเมมเบรนขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์ของโครงการ คือ เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตน้ำตาลความเข้มข้นสูงจากข้าวโดยใช้เมมเบรนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำ.

ขอบเขตของโครงการนี้ คือ การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำตาลจากข้าวโดยการใช้เชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้สูง และทำการศึกษาในระบบปิดแบบแยกน้ำตาลข้าว โดยใช้เทคโนโลยีเมมเบรนในการแยกกลับคืนเอนไซม์ในน้ำตาลข้าวที่ผลิตได้เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ เป็นการลดค่าใช้จ่ายในการซื้อเอนไซม์สำเร็จรูปมาใช้ การออกแบบระบบวิธีการหมักให้สามารถเพิ่มข้าวในการหมักได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่ต้องหยุดการหมัก เป็นการหมักแบบต่อเนื่อง สามารถเก็บน้ำตาลที่ผลิตได้ออกมาใช้ได้ตลอดเวลา และสร้างเครื่องต้นแบบระบบการ

ผลิตน้ำตาลจากข้าว เพื่อสามารถนำไปพัฒนาและถ่ายทอดออกสู่ผู้ประกอบการ ผู้ผลิตน้ำตาลหรือผู้ผลิตน้ำส้มสายชู รวมทั้งผู้ที่ต้องการนำน้ำตาลไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ.

จากปัญหาของประเทศไทยที่เป็นประเทศเกษตรกรรม พืชเศรษฐกิจที่สำคัญ คือ ข้าว ไทยส่งออกข้าวได้มากเป็นอันดับต้นๆของโลก แต่เนื่องจากข้าวมีปริมาณมาก ราคาจึงไม่แน่นอน ในบางปีราคาตกต่ำและมีข้าวเหลือจากการส่งออกอยู่เป็นจำนวนมาก บางครั้งอยู่ในสภาพเสื่อมคุณภาพ สาเหตุเนื่องจากการส่งออกข้าวในรูปข้าวสารนั้นมักจะประสบกับปัญหาการแข่งขันด้านราคาในตลาดโลก โดยเฉพาะภาวะที่มีผลผลิตข้าวปริมาณมากเกินความต้องการของตลาดโลก อีกทั้งมีประเทศคู่แข่งในการส่งออกข้าวอยู่หลายประเทศ มีการแข่งขันกันสูงส่งผลกระทบต่อการส่งออกข้าวของไทย ดังนั้น การแปรรูปข้าวนับเป็นทางเลือกที่ดีในการแก้ไขปัญหาข้าวราคาตกหรือข้าวล้นตลาดได้ การศึกษาวิจัยการนำข้าวมาแปรรูปเป็นน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงซึ่งเป็นน้ำตาลที่สามารถใส่ในอาหารได้หรือนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มหรือใช้กับเครื่องดื่มร้อน ชา กาแฟ หรือเป็นน้ำเชื่อมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ นอกจากนี้ยังสามารถนำมอลโตสในน้ำตาลที่ผลิตได้ไปผลิตต่อเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีคุณสมบัติเป็นอาหารเสริมสุขภาพพรีไบโอติก นอกจากนี้ยังสามารถนำกลูโคสไปผลิตเป็นแผ่นเซลลูโลสเพื่อบำรุงสุขภาพหรือเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในทางการแพทย์ได้ นับเป็นการเพิ่มมูลค่าข้าวได้ทางหนึ่ง.

ในปัจจุบันโดยปกติแล้วน้ำตาลมักจะผลิตจากธัญพืช มักเป็นพืชที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก โดยปกติการย่อยแป้งจะเป็นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) โดยมีเอนไซม์และความร้อนเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาล และเอนไซม์ที่ใช้ในขบวนการผลิตน้ำตาลจะใช้เอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลซึ่งก็ใช้ต้นทุนสูงเพราะเอนไซม์มีราคาแพง (Klaithin, Khunajakr and Wongwicharn 2014) และอีกวิธีหนึ่งก็คือหมักข้าวในลักษณะเดียวกับการทำไวน์ข้าวทำข้าวหมากหรือสาโท โดยใช้เชื้อราในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลข้าวหรือที่เรียกว่าน้ำต้อย แต่การหมักจะใส่เชื้อราหรือลูกแป้งสาโทลงไปในข้าวเหนียวที่สุก แล้วทำการหมักทิ้งไว้ 3-4 วัน จะได้น้ำตาลข้าวหรือน้ำต้อยแช่อยู่ในข้าว (Kudpeng, Soemphol and Tanamool 2016) ซึ่งอาจจะทำให้เชื้อรายย่อยแป้งได้ไม่หมดหรือย่อยได้ไม่ดีเท่าที่ควรเนื่องจากขาดก๊าซออกซิเจนเพราะเชื้อราบางส่วนจมอยู่ในน้ำต้อย

ดังนั้นการศึกษาค้นคว้ากระบวนการหมักโดยการใช้เชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้สูงในระบบปิดแบบแยกน้ำตาลข้าวแบบใหม่ โดยใช้เทคโนโลยีเมมเบรนในการส่งผ่านคัดกรองอากาศเพื่อเพิ่มออกซิเจนและป้องกันการปนเปื้อนเพื่อผลิตน้ำตาลจากข้าวให้ได้ความเข้มข้นสูง นอกจากนี้ยังใช้เทคโนโลยีเมมเบรนในการแยกกลับคืนเอ็มไซม์ในน้ำตาลข้าวที่ผลิตได้เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ และการออกแบบวิธีการหมักแบบแยกน้ำตาลข้าวได้นี้สามารถเพิ่มข้าวในการหมักได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่ต้องหยุดการหมักและเชื้อราสามารถย่อยแป้งหรือและทำงานได้อย่างต่อเนื่องตลอดเวลาจะทำให้ได้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง

# 2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

## วัสดุและอุปกรณ์

1. กระบอกตวง 100 มิลลิลิตร
2. กระดาษชั่งสาร
3. อะลูมิเนียมฟอยล์
4. ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ (Duran)
5. เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
6. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
7. เครื่องชั่งสปริง
8. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH)
9. เครื่องวัดความหวาน (Hand refractometer)
10. เครื่องให้ความร้อน (Hot Plate)
11. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
12. จุกสำลี
13. ช้อนตักสาร
14. ตะแกรง
15. ตะเกียงไฟฟ้า
16. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
17. ตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Cabinet Class II)
18. ตู้อบ (Heating Oven)
19. ที่วางหลอดทดลอง (Rack)
20. เทอร์โมมิเตอร์
21. ถุงพลาสติกใสชนิดร้อนขนาด 5x6, 4.5x7, 6x9, 7x11, 16x24, 20x30 นิ้ว
22. น้ำกลั่น
23. บีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร, 100 มิลลิลิตร, 500 มิลลิลิตร, 1,000 มิลลิลิตร
24. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 1 มิลลิลิตร, 10 มิลลิลิตร
25. ผ้าขาวบาง
26. มีดผ่าตัด
27. หลอดฝาเกลียวขนาด 8 แดรม

28. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง (Autoclave)
29. หม้อหุงข้าวไฟฟ้า
30. หนังยาง
31. กระดาษเช็ดมือ
32. Tip ขนาด 1 มิลลิลิตร, 10 มิลลิลิตร
33. เครื่อง Vortex
34. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร, 1,000 มิลลิลิตร
35. ตู้ดูดควัน (Hood)
36. เมมเบรน (Ultrafiltration membrane) CMW: 6,000-30,000
37. ปั๊มสำหรับระบบ reverse osmosis (Uni-Pure 300 GPD)
38. ขวดบีบน้ำกลั่น
39. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร, 1,000 มิลลิลิตร

## วัตถุดิบ

1. ข้าวเจ้าเสาไห้ (ข้าวขาวตรามงกุฎแดง)
2. ข้าวเหนียว (ตราโลตัส)
3. แป้งข้าวเจ้า (ปลาไทย 5 ดาว)

## สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)
2. เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ($\alpha$-amylase)
3. แอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์
4. แอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์
5. D-Glucose
6. DNS (3, 5 - dinitrosalicylic acid)
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
8. โพแทสเซียม โซเดียม ทาร์เทรต ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)
9. ไอโอดีน ($I_2$)
10. โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)
11. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

12. Soluble starch
13. โซเดียม ฟอสเฟต ($Na_2HPO_4$)
14. Benzoic acid
15. โพแทสเซียม ไอโอเดต ($KIO_3$)
16. กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
17. โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS)
18. น้ำกลั่น

## เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อราสายพันธุ์ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 (จากศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

## วิธีการ

**1. การศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 สำหรับผลิตน้ำตาลข้าว เพื่อลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง**

1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยการบ่มและขยายเชื้อด้วย YM broth และแป้งข้าวเจ้า (ตราปลาไทย 5 ดาว)

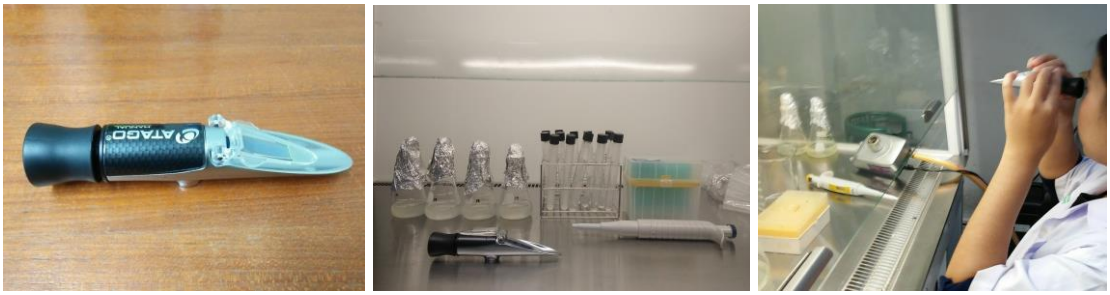
1.1.1 เขี่ยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 จากหลอด stock ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (เตรียมจากอาหาร PDA สำเร็จรูป) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาตัดชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญบน PDA ขนาดประมาณ 1×1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 1 ชิ้น ใส่ลงในหลอดอาหารเหลว YM broth ที่มี YM broth อยู่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออีกที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.

**รูปที่ 1. การวัดจำนวนชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร โดยวัดจากการทำตารางจากด้านนอกของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ.**

1.1.2 เมื่อครบ 72 ชั่วโมง นำออกมาเขี่ยเส้นใยเชื้อจากหลอด YM broth ลงในแป้งข้าวเจ้าจำนวน 10 กรัม ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยให้เส้นใยเชื้อให้กระจายในแป้งข้าวเจ้า แล้วเทอาหารเหลว YM broth 5 มิลลิลิตร ลงไปคลุกเคล้าให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

**รูปที่ 2. หลอดของเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญใน YM broth สำหรับนำไปคลุกเคล้ากับแป้งข้าวเจ้า (ตราปลาไทย 5 ดาว) ในขวดรูปชมพู่ ก่อนที่จะนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ.**

1.1.3 นำเชื้อที่ได้ไปผสมกับข้าวเจ้าหุงสุกจำนวน 500 กรัม ที่อยู่ในถุงใสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปจนครบ 15 มิลลิลิตร และคลุกเคล้าให้เข้ากัน อุดปากถุงด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใช้หนังยางมัดทับอีกรอบ ใช้หนังยางรัดรอบถุงเพื่อทำพื้นที่ที่ก้นถุงให้ว่างสำหรับเป็นที่รองรับน้ำตาล จากนั้นแขวนถุงหมักในแนวตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เก็บปริมาณน้ำตาลข้าวที่ได้ในแต่ละวันและนำไปวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด โดยใช้ Hand refractometer (Kudpeng, Soemphol and Tanamool 2016)

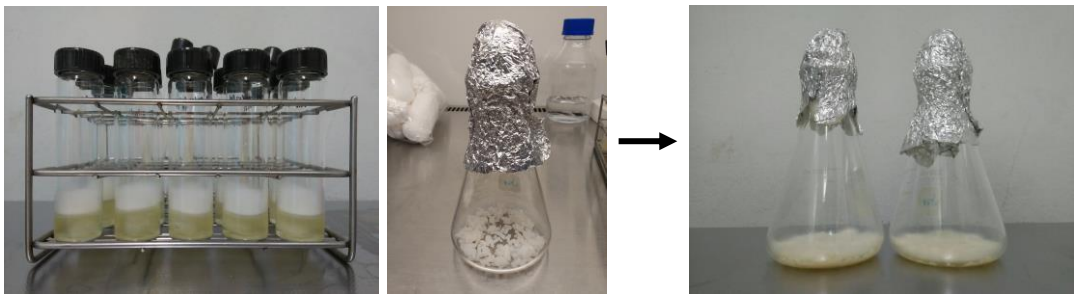


**รูปที่ 3. การวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) ในน้ำตาลข้าวที่อยู่ในหลอดทดลอง และในขวดรูปชมพู่ โดยใช้ Hand refractometer.**

1.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยการบ่มและขยายเชื้อด้วย YM broth และข้าวเจ้าหุงสุก

1.2.1 เขี่ยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 จากหลอด stock ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (เตรียมจากอาหาร PDA สำเร็จรูป) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาตัดชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญบน PDA ขนาดประมาณ 1×1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 1 ชิ้น ใส่ลงในหลอดอาหารเหลว YM broth ที่มี YM broth อยู่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

1.2.2 เมื่อครบ 72 ชั่วโมง เขี่ยเส้นใยเชื้อจากหลอด YM broth ลงในข้าวเจ้าหุงสุกจำนวน 10 กรัม ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยเชื้อ 1 หลอด ต่อข้าวเจ้าหุงสุก 10 กรัม เขี่ยให้เส้นใยเชื้อกระจายในข้าวเจ้าหุงสุก แล้วเทอาหารเหลวจากหลอด YM broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปคลุกเคล้าให้เข้ากันอีกครั้ง หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



**รูปที่ 4. หลอดของเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญใน YM broth, ข้าวเจ้าหุงสุก 10 กรัม ในขวดรูปชมพู่และเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญบนข้าวเจ้าสุก.**

1.2.3 นำเชื้อที่ได้ไปผสมกับข้าวเจ้าหุงสุกจำนวน 100 กรัม ที่อยู่ในถุงใสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และคลุกเคล้าให้เข้ากัน อุดปากถุงด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใช้หนังยางมัดทับอีกรอบ ใช้หนังยางรัดรอบถุงเพื่อทำพื้นที่ที่ก้นถุงให้ว่างสำหรับเป็นที่รองรับน้ำตาล นำไปแขวนถุงหมักในแนวตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เก็บปริมาณน้ำตาลข้าวที่ได้ในแต่ละวันและนำไปวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด โดยใช้ Hand refractometer

1.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยการบ่มและขยายเชื้อด้วย YM broth

1.3.1 เขี่ยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 จากหลอด stock ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (เตรียมจากอาหาร PDA สำเร็จรูป) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาตัดชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญบน PDA ขนาดประมาณ 1×1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 1 ชิ้น ใส่ลงในหลอดอาหารเหลว YM broth ที่มี YM broth อยู่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

1.3.2 เมื่อครบ 72 ชั่วโมง นำเส้นใยเชื้อที่ได้ไปผสมกับข้าวเจ้าหุงสุกจำนวน 100 กรัม ที่อยู่ในถุงใสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และคลุกเคล้าให้เข้ากัน อุดปากถุงด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใช้หนังยางมัดทับอีกรอบ ใช้หนังยางรัดรอบถุงเพื่อทำพื้นที่ที่ก้นถุงให้ว่างสำหรับเป็นที่รองรับน้ำตาล แล้วแขวนถุงหมักในแนวตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เก็บปริมาณน้ำตาลข้าวที่ได้ในแต่ละวันและนำไปวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด โดยใช้ Hand refractometer

**รูปที่ 5. การทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ในถุงใสซึ่งแขวนไว้ในแนวตั้งที่อุณหภูมิห้อง.**

1.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยการบ่มและขยายเชื้อโดยใช้อาหารแข็งแบบผิวหน้าเอียง

1.4.1 เขี่ยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 จากหลอด stock ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (เตรียมจากอาหาร PDA สำเร็จรูป) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

1.4.2 เมื่อครบ 72 ชั่วโมง นำเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ออกมาเขี่ยเชื้อลงในหลอดอาหารแข็งแบบผิวหน้าเอียง (PDA slant) จำนวน 1 หลอด นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

**รูปที่ 6. หลอดเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญบนอาหารแข็งแบบผิวหน้าเอียง (PDA slant).**

1.4.3 นำเส้นใยเชื้อที่เจริญในหลอดอาหารแข็งแบบผิวหน้าเอียงที่ได้ โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อชะล้างแล้วนำไปผสมกับข้าวเจ้าหุงสุกจำนวน 100 กรัม ที่อยู่ในถุงใสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และคลุกเคล้าให้เข้ากัน อุดปากถุงด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใช้หนังยางมัดทับอีกรอบ ใช้หนังยางรัดรอบถุงเพื่อทำพื้นที่ที่ก้นถุงให้ว่างสำหรับเป็นที่รองรับน้ำตาล แล้วแขวนถุงหมักในแนวตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเก็บปริมาณน้ำตาลข้าวที่ได้ในแต่ละวันและนำไปวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด โดยใช้ Hand refractometer

1.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยบ่มและขยายเชื้อให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง

1.5.1 เขี่ยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 จากหลอด stock ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (เตรียมจากอาหาร PDA สำเร็จรูป) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

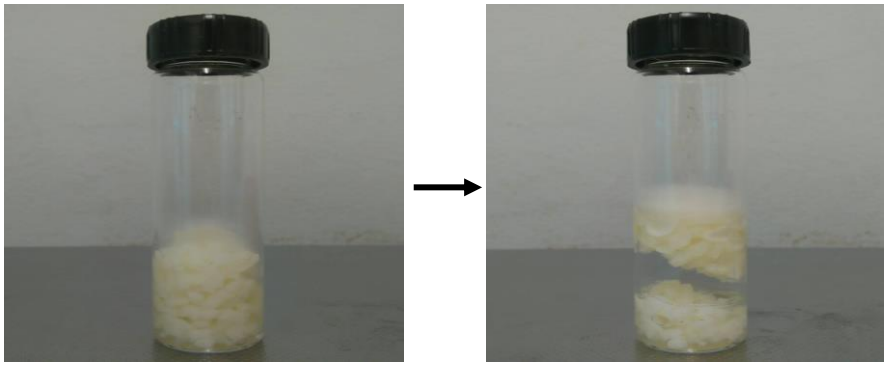
1.5.2 เมื่อครบ 72 ชั่วโมง นำออกมาตัดชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญบน PDA ขนาดประมาณ 1×1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้น ใส่ลงในข้าวเจ้าหุงสุก จำนวน 100 กรัม ที่อยู่ในถุงใสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และคลุกเคล้าให้เข้ากัน อุดปากถุงด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใช้หนังยางมัดทับอีกรอบ ใช้หนังยางรัดรอบถุงเพื่อทำพื้นที่ที่ก้นถุงให้ว่าง สำหรับเป็นที่รองรับน้ำตาล แล้วแขวนถุงหมักในแนวตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลักจากนั้นเก็บปริมาณน้ำตาลข้าวที่ได้ในแต่ละวันและนำไปวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด โดยใช้ Hand refractometer

**รูปที่ 7. การตัดชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญอยู่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ขนาด 1×1 ตารางเซนติเมตร.**

1.6 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยการบ่มและขยายเชื้อด้วย YM broth ร่วมกับข้าวเจ้าหุงสุก

1.6.1 เขี่ยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 จากหลอด stock ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (เตรียมจากอาหาร PDA สำเร็จรูป) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

1.6.2 เมื่อครบ 72 ชั่วโมง นำออกมาตัดชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญบน PDA ขนาดประมาณ 1×1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 1 ชิ้น ใส่ลงในหลอดอาหารเหลว YM broth ที่มี YM broth อยู่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเติมข้าวเจ้าหุงสุกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 5 กรัม จากนั้นบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



**รูปที่ 8. หลอดของเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่บ่มด้วย YM broth ร่วมกับข้าวเจ้าหุงสุก.**

1.6.3 เมื่อครบ 72 ชั่วโมง นำเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เจริญใน YM broth ร่วมกับข้าวเจ้าหุงสุกที่ได้ ไปผสมกับข้าวเจ้าหุงสุกจำนวน 100 กรัม ที่อยู่ในถุงใสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และคลุกเคล้าให้เข้ากัน อุดปากถุงด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใช้หนังยางมัดทับอีกรอบ ใช้หนังยางรัดรอบถุงเพื่อทำพื้นที่ที่ก้นถุงให้ว่างสำหรับเป็นที่รองรับน้ำตาล แล้วแขวนถุงหมักในแนวตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเก็บปริมาณน้ำตาลข้าวที่ได้ในแต่ละวันและนำไปวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด โดยใช้ Hand refractometer

**2. การทดลองหาปริมาณชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลข้าว โดยใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง**

2.1 การเตรียมเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 สำหรับผลิตน้ำตาลข้าวโดยใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรงจาก (ข้อ 1.5)

2.2 การเตรียมข้าวเจ้าสุกสำหรับผลิตน้ำตาลข้าว

2.2.1 เตรียมข้าวเจ้า (ข้าวเจ้าขาวตรามงกุฎแดง) อัตราส่วนน้ำต่อข้าว เท่ากับ 4:1 โดยชั่งเมล็ดข้าว 600 กรัม นำไปล้างด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง หลังจากนั้นตวงน้ำ 2,400 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหม้อข้าว และหุงด้วยหม้อหุงข้าวไฟฟ้า นานประมาณ 48 นาที

2.2.2 เมื่อข้าวสุกคนข้าวให้ทั่วหม้อ และตั้งข้าวทิ้งไว้อีกประมาณ 30 นาที ตักข้าวใส่ในถาด ทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลง จากนั้นตักข้าวใส่ถุงใส ถุงละ 100 กรัม จำนวน 6 ถุง จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2.3 นำข้าวสุกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้จนเย็น แล้วนำไปใช้ทดลอง

2.3 การทดลองผลิตน้ำตาลข้าวจากข้าวเจ้าด้วยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182

2.3.1 นำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 มาตัดเป็นชิ้นขนาด 1×1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2, 3, 4, 5, 10 และ 15 ชิ้น ใส่ลงในข้าวเจ้าจำนวน 100 กรัม ที่อยู่ในถุงใสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทุกถุงของการทดลอง (หมายเลข 1 ถึง 6) ตามลำดับ และคลุกเคล้าให้เข้ากันในถุงใส อุดปากถุงด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใช้หนังยางมัดทับอีกรอบ ใช้หนังยางรัดรอบถุงเพื่อทำพื้นที่ที่ก้นถุงให้ว่างสำหรับเป็นที่รองรับน้ำตาล แล้วแขวนถุงหมักในแนวตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.3.2 เก็บน้ำตาลข้าว โดยนำชุดการทดลองเข้าตู้ปลอดเชื้อ ใช้กรรกไกรตัดบริเวณก้นถุงด้านข้างสำหรับทำเป็นช่องสำหรับเก็บน้ำตาลข้าว ทำความสะอาดช่องด้วยกระดาษเช็ดมือที่พรมด้วย 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ ปล่อยให้แห้ง และเปิดช่องสำหรับเก็บน้ำตาลข้าว

2.3.3 ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดน้ำตาลข้าวที่ผลิตได้ในแต่ละวันออกมาและวัดปริมาตรน้ำตาลข้าว จากนั้นเก็บน้ำตาลข้าวไว้ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และปิดฝาให้สนิท เมื่อเก็บน้ำตาลข้าวเสร็จแล้ว นำกระดาษเช็ดมือพรมด้วย 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ เช็ดช่องสำหรับเก็บน้ำตาลข้าวอีกครั้ง ปล่อยให้แห้ง และปิดช่องสำหรับเก็บน้ำตาลข้าวให้สนิท

2.3.4 วัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด โดยดูดตัวอย่างน้ำตาลข้าวประมาณ 0.2 มิลลิลิตร หยดลงบน hand refractometer อ่านผลในหน่วยองศาบริกซ์ และบันทึกผลการทดลอง

**รูปที่ 9. การใช้ไมโครปิเปตต์ดูดน้ำตาลข้าวที่ผลิตได้ในแต่ละวันออกมาเก็บในขวดเพื่อวัดปริมาตรและวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด.**

**3. การศึกษาการเตรียมข้าวเจ้าสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave สำหรับใช้ในการผลิตน้ำตาลข้าว**

3.1 การเตรียมเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 สำหรับผลิตน้ำตาลข้าว โดยใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรงจาก (ข้อ 1.5)

3.2 การเตรียมข้าวเจ้าสุกสำหรับผลิตน้ำตาลข้าว

3.2.1 ชั่งข้าวเจ้าดิบ 30 กรัม ใส่ถุงร้อนใสขนาด 7x11 นิ้ว จำนวน 6 ถุง ล้างข้าวด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เติมน้ำกลั่นลงไปในถุงข้าวแต่ละถุง ในอัตราส่วนน้ำต่อข้าว เท่ากับ 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1 และ 4 : 1

3.2.2 นำข้าวทุกถุงไปนึ่งเพื่อหุงและฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**รูปที่ 10. ข้าวเจ้าดิบ 30 กรัม ในถุงร้อนใสขนาด 7x11 นิ้ว ที่ผสมน้ำในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อนำไปทำให้สุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวด้วย Autoclave.**

3.3 การทดลองผลิตน้ำตาลข้าวด้วยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง (ใช้ข้าวหุงสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวด้วย Autoclave)

3.3.1 นำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 ออกมาตัดเป็นชิ้นขนาด 1×1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในข้าวที่หุงสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวด้วย Autoclave จำนวน 100 กรัม ที่อยู่ในถุงใสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ที่เตรียมได้ในข้อ 3.2 ทุกถุง และคลุกเคล้าให้เข้ากันในถุงใส อุดปากถุงด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใช้หนังยางมัดทับอีกรอบ ใช้หนังยางรัด

รอบถุงเพื่อทำพื้นที่ที่ก้นถุงให้ว่างสำหรับเป็นที่รองรับน้ำตาล แล้วแขวนถุงหมักในแนวตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.3.2 เก็บน้ำตาลข้าว โดยนำชุดการทดลองเข้าตู้ปลอดเชื้อ ใช้กรรกไกรตัดบริเวณก้นถุงด้านข้างสำหรับทำเป็นช่องสำหรับเก็บน้ำตาลข้าว ทำความสะอาดช่องด้วยกระดาษเช็ดมือที่พรมด้วย 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ ปล่อยให้แห้ง และเปิดช่องสำหรับเก็บน้ำตาลข้าว

3.3.3 ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดน้ำตาลข้าวที่ผลิตได้ในแต่ละวันออกมาและวัดปริมาตรน้ำตาลข้าว จากนั้นเก็บน้ำตาลข้าวไว้ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และปิดฝาให้สนิท เมื่อเก็บน้ำตาลข้าวเสร็จแล้ว นำกระดาษเช็ดมือพรมด้วย 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ เช็ดช่องสำหรับเก็บน้ำตาลข้าวอีกครั้ง ปล่อยให้แห้ง และปิดช่องสำหรับเก็บน้ำตาลข้าวให้สนิท

3.3.4 วัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด โดยดูดตัวอย่างน้ำตาลข้าวประมาณ 0.2 มิลลิลิตร หยดลงบน hand refractometer อ่านผลในหน่วยองศาบริกซ์ และบันทึกผลการทดลอง

**4. การศึกษาหาความเหมาะสมของการผลิตน้ำตาลข้าวจากข้าวเจ้าที่หุงสุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave และใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง**

ทำการทดลองผลิตน้ำตาลข้าว โดยศึกษาตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลข้าวด้วยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 คือ อัตราส่วนน้ำต่อข้าว, จำนวนชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 และระยะเวลาในการหมัก โดยใช้สถิติโมเดลทำนายแบบ Response surface methodology (RSM) ซึ่ง (Chinma, Ilowefah and Muhammad 2014), (Astray *et al*. 2016), (Ahmad and Munaim 2018) ได้นำมาใช้ศึกษาในกระบวนการหมักแบบต่างๆ

4.1 การเตรียมเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 สำหรับการผลิตน้ำตาลข้าว โดยใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง ทำการทดลองดัง (ข้อ 1.5)

4.2 การเตรียมข้าวเจ้าสุกสำหรับผลิตน้ำตาลข้าวจำนวนทั้งหมด 20 ถุง และทำการทดลองดัง (ข้อ 3.2)

**รูปที่ 11. ข้าวเจ้าดิบและน้ำตามอัตราส่วนต่างๆ ก่อนเข้า Autoclave เพื่อหุงสุกและฆ่าเชื้อ และข้าวที่ออกจาก Autoclave พักไว้ในตู้ปลอดเชื้อ.**

4.3 การทดลองผลิตน้ำตาลข้าวด้วยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง (ใช้ข้าวหุงสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวด้วย Autoclave) ทำการทดลองดัง (ข้อ 3.3)

**รูปที่ 12. การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตน้ำตาลข้าว.**

**5. การศึกษาหาความเหมาะสมของการผลิตน้ำตาลข้าวจากข้าวเจ้าที่สุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave และใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง ร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส**

ทำการทดลองผลิตน้ำตาลข้าว โดยศึกษาตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลข้าวด้วยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 คือ จำนวนชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182, ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และระยะเวลาในการหมัก โดยใช้สถิติโมเดลทำนายแบบ

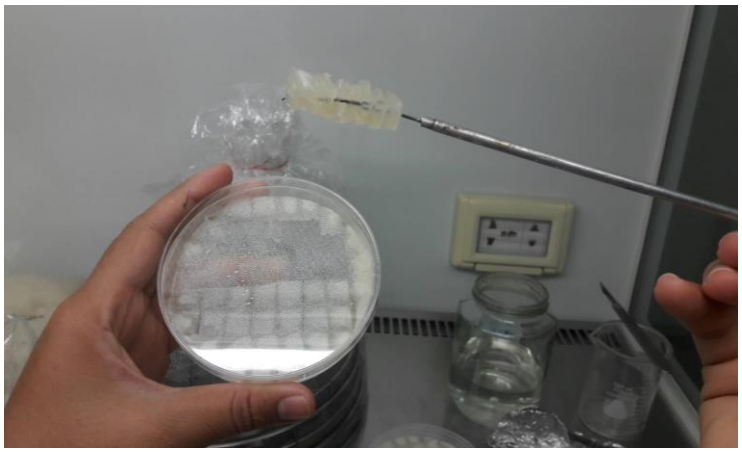
RSM ซึ่ง Francis *et al*. (2003) และ Vasiee *et al*. (2016) ได้นำมาใช้ศึกษาในกระบวนการผลิตเอนไซม์แบบต่างๆ

5.1 การเตรียมเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 สำหรับผลิตน้ำตาลข้าว โดยใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง ทดลองดัง (ข้อ 1.5)

5.2 การเตรียมข้าวเจ้าสุกสำหรับผลิตน้ำตาลข้าว ในอัตราส่วนน้ำต่อข้าว เท่ากับ 2:1 จำนวน 20 ถุง โดยเตรียมข้าวสุกดังการทดลอง (ข้อ 3.2)

5.3 การทดลองผลิตน้ำตาลข้าวด้วยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง ร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ทำการทดลองดัง (ข้อ 3.3)

**รูปที่ 13. เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เตรียมไว้นำไปใส่ผลิตน้ำตาลจากข้าวร่วมกับชิ้นเชื้อ.**



**รูปที่ 14. ชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 สำหรับผลิตน้ำตาลจากข้าวร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส.**

**6. การทดลองเพิ่มข้าวเจ้าสุกในระหว่างการหมัก เพื่อต่อเชื้อและเพาะเลี้ยงให้ขยายในข้าวใหม่**

6.1 การเตรียมเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 สำหรับผลิตน้ำตาลข้าว โดยใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง (ข้อ 1.5)

6.2 การเตรียมข้าวเจ้าสุกสำหรับผลิตน้ำตาลข้าว ในอัตราส่วนน้ำต่อข้าว เท่ากับ 2:1 จำนวน 20 ถุง โดยเตรียมข้าวสุกดังการทดลอง (ข้อ 3.2)

6.3 การทดลองผลิตน้ำตาลข้าวด้วยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ตามการทดลองที่ 4 (ข้อ 4.3) และการทดลองที่ 5 (ข้อ 5.3)

6.4 เติมข้าวสุกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพิ่มในการทดลองทุกวัน หลังจากนั้นเก็บน้ำตาลและวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด

**รูปที่ 15. การทดลองเพิ่มข้าวเจ้าสุกในระหว่างการหมัก.**

**7. การทดลองนำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวกลับมาใช้ซ้ำในข้าวสุกใหม่ปลอดเชื้อ**

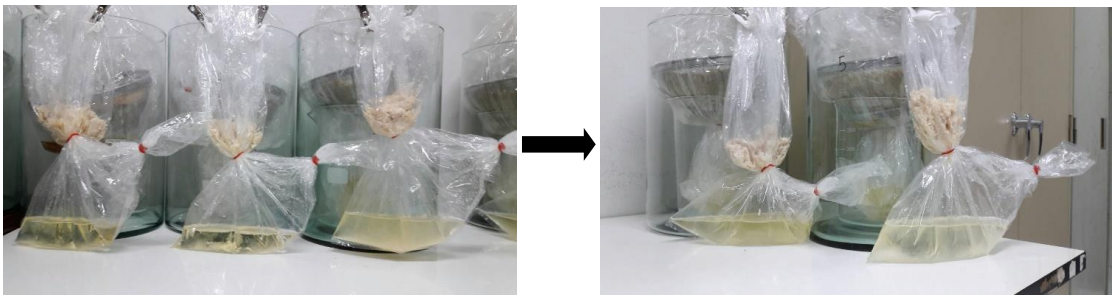
7.1 การทดลองนำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวเจ้ากลับมาใช้ซ้ำในข้าวเจ้าสุกใหม่ปลอดเชื้อ

นำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวเจ้าที่ผลิตได้ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในข้าวเจ้าที่หุงสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวด้วย Autoclave ในอัตราส่วนน้ำต่อข้าวเท่ากับ 2 : 1 จำนวน 500 กรัม ที่อยู่ในถุงใสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และคลุกเคล้าให้เข้ากันในถุงใส อุดปากถุงด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใช้หนังยางมัดทับอีกรอบ ใช้หนังยางรัดรอบถุงเพื่อทำพื้นที่ที่ก้นถุงให้ว่างสำหรับเป็นที่รองรับน้ำตาล แล้วแขวนถุงหมักในแนวตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเมื่อครบกำหนด 1 วัน เก็บน้ำตาลและวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด แล้วนำน้ำตาลข้าวพร้อมเอนไซม์ทั้งหมดที่ได้ใส่กลับเข้าไปในข้าวหมักเหมือนเดิมทุกวัน เป็นเวลา 30 วัน ต่อจากนั้นหาปริมาณของกากข้าวหมักที่เหลือ ดังรูปที่ 16

**รูปที่ 16. การทดลองนำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวเจ้ากลับมาใช้ซ้ำในข้าวเจ้าสุกใหม่ปลอดเชื้อ.**

7.2 การทดลองนำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวเหนียวกลับมาใช้ซ้ำในข้าวเหนียวสุกใหม่ปลอดเชื้อ

นำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวเหนียวที่ผลิตได้ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในข้าวเหนียวสุกใหม่ปลอดเชื้อ จำนวน 500 กรัม ที่อยู่ในถุงใสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และคลุกเคล้าให้เข้ากันในถุงใส อุดปากถุงด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใช้หนังยางมัดทับอีกรอบ ใช้หนังยางรัดรอบถุงเพื่อทำพื้นที่ที่ก้นถุงให้ว่างสำหรับเป็นที่รองรับน้ำตาล แล้วแขวนถุงหมักในแนวตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเมื่อครบกำหนด 1 วัน เก็บน้ำตาลและวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด แล้วนำน้ำตาลข้าวพร้อมเอนไซม์ทั้งหมดที่ได้ใส่กลับเข้าไปในข้าวหมักเหมือนเดิมทุกวัน เป็นเวลา 30 วัน ต่อจากนั้นหาปริมาณของกากข้าวหมักที่เหลือ ดังรูปที่ 17.



**รูปที่ 17. การทดลองนำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวเหนียวกลับมาใช้ซ้ำในข้าวเหนียวสุกใหม่ปลอดเชื้อ.**

**8. การทดลองขยายขนาดปริมาณการผลิตน้ำตาลจากข้าวแบบแยกน้ำตาลข้าวจากผลของความเหมาะสมตามสถิติโมเดล RSM**

จากผลของสถิติโมเดล Response surface methodology (RSM) ข้อ 4 พบว่าความเหมาะสมของการผลิตน้ำตาลข้าวจากข้าวเจ้า คือ ใช้ข้าวเจ้าในอัตราส่วนน้ำต่อข้าว เท่ากับ 2 : 1 (หุงสุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave) โดยใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง จำนวน 5 ชิ้น และใช้ระยะเวลาในการหมัก 7 วัน

8.1 นำข้าวเจ้าดิบจำนวน 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงใสพร้อมเติมน้ำในอัตราส่วนน้ำต่อข้าวเท่ากับ 2:1 นำไปหุงสุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave และตั้งข้าวทิ้งไว้จนเย็นที่อุณหภูมิห้อง

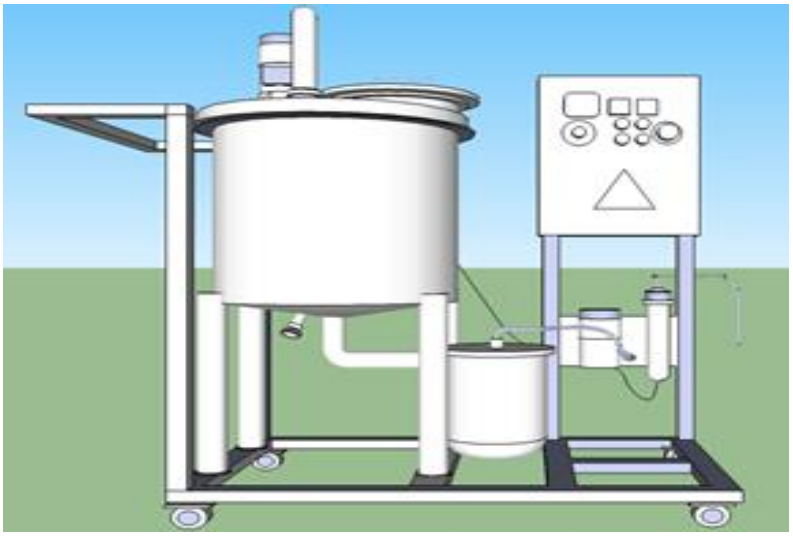
8.2 นำชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง ขนาดชิ้นละ 1x1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 50 ชิ้น ใส่ลงในถุงข้าวที่เตรียมไว้ในข้อ 7.1 คลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วใส่ข้าวผสมเชื้อลงในตะแกรงที่บรรจุอยู่ในถุงใสหรือโถแก้วที่ผ่านการฆ่าชื้อแล้ว จากนั้นอุดปากถุงด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหรือเซรามิคเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.3 ไมครอน แล้วใช้หนังยางรัดรอบถุงเพื่อทำพื้นที่ก้นถุงให้ว่างสำหรับเป็นที่รองรับน้ำตาล ใช้ตะแกรงวางบนบีกเกอร์หรือฐานสแตนเลส รูปที่ 18

**รูปที่ 18. การทดลองขยายขนาดปริมาณการผลิตน้ำตาลจากข้าวแบบแยกน้ำตาลข้าวจากผลของความเหมาะสมตามสถิติโมเดล RSM.**

**9. วิธีการออกแบบสร้างเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าว โดยใช้เมมเบรนนำเอนไซม์ในน้ำตาลข้าวที่ผลิตได้กลับมาใช้ซ้ำ**

หลักการออกแบบเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าวได้ออกแบบให้เป็นการหมักในระบบปิดแบบแยกน้ำตาลข้าวเพื่อไม่ให้ข้าวจมน้ำตาลจนเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ขาดออกซิเจน โดยหมักข้าวในตะแกรงที่ถอดประกอบได้ซึ่งอยู่ด้านในถังหมัก ให้น้ำตาลที่ผลิตได้แยกจากข้าวไหลลงมาเก็บไว้ด้านล่างของถัง ในถังมีใบกวนแบบถอดประกอบได้สำหรับคลุกเคล้าข้าวและเชื้อหรือเอนไซม์ให้กระจายอย่างสม่ำเสมอ

สำหรับการเติมอากาศโดยใช้เมมเบรนที่มีขนาดของรูพรุน 0.3 ไมครอน ในการส่งผ่านคัดกรองอากาศเพื่อเพิ่มออกซิเจนและป้องกันการปนเปื้อน นอกจากนี้ยังใช้ Ultrafiltration membrane ในการแยกเอ็นไซม์ในน้ำตาลข้าว (Qi *et al*. 2012), (Zain and Mohammad 2016) ที่ผลิตได้และนำกลับมาใช้ใหม่ และให้สามารถเพิ่มข้าวในระหว่างการหมักได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่ต้องหยุดการหมักหรือเริ่มต้นใหม่ นอกจากนี้ยังสามารถเก็บน้ำตาลข้าวไปใช้ได้ทุกวัน



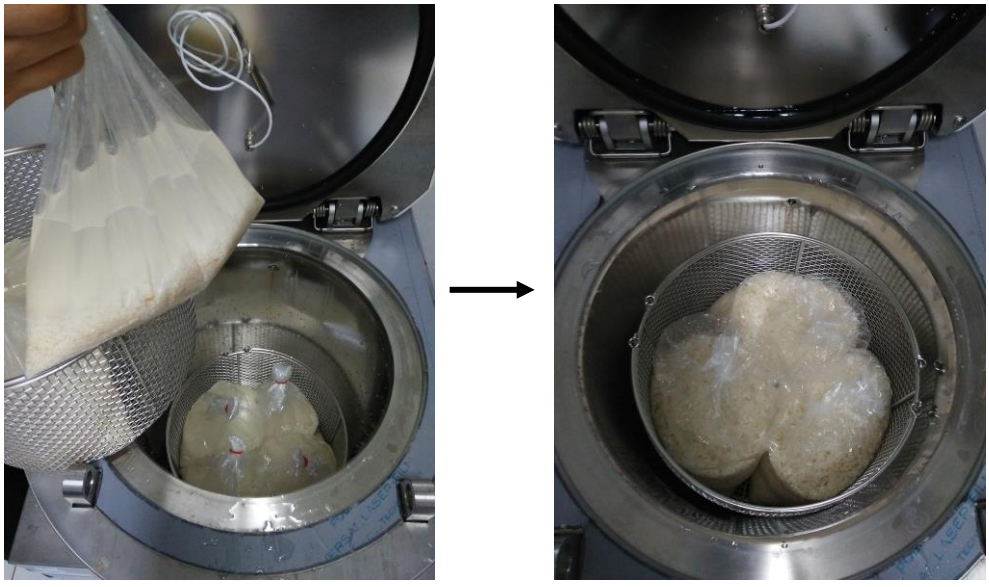
**รูปที่ 19. แบบสร้างเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าว.**

**10. การทดสอบเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าว และนำเอนไซม์ในน้ำตาลข้าวกลับมาใช้ซ้ำ**

10.1 นำสารละลายโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ลงไปแช่ในถังให้ท่วมเต็ม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำร้อนหรือน้ำปลอดเชื้อ

10.2 นำข้าวเจ้าดิบจำนวน 1,630 กรัม (เมื่อสุกแล้ว ได้น้ำหนัก 5 กิโลกรัม) ล้างด้วยน้ำประปา 1 ครั้ง แล้วเติมน้ำในอัตราส่วนน้ำต่อข้าวเท่ากับ 2 : 1 นำไป หุงสุกพร้อมฆ่าเชื้อด้วย Autoclave หลังจากนั้นตั้งไว้จนเย็นที่อุณหภูมิห้อง จะได้ข้าวเจ้าสุกจำนวน 5 กิโลกรัม (สำหรับเตรียมข้าวสุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวอาจใช้เครื่อง boiler ผลิต stream ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดัน 1.5 บาร์ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว พ่นอัดเข้าไปในเครื่องเป็นเวลานาน 15 นาที)

**รูปที่ 20. ข้าวเจ้าดิบสำหรับเตรียมไปหุงพร้อมนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave.**



**รูปที่ 21. การนำข้าวดิบไปหุงพร้อมนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave และข้าวสุกที่ได้ใน Autoclave.**

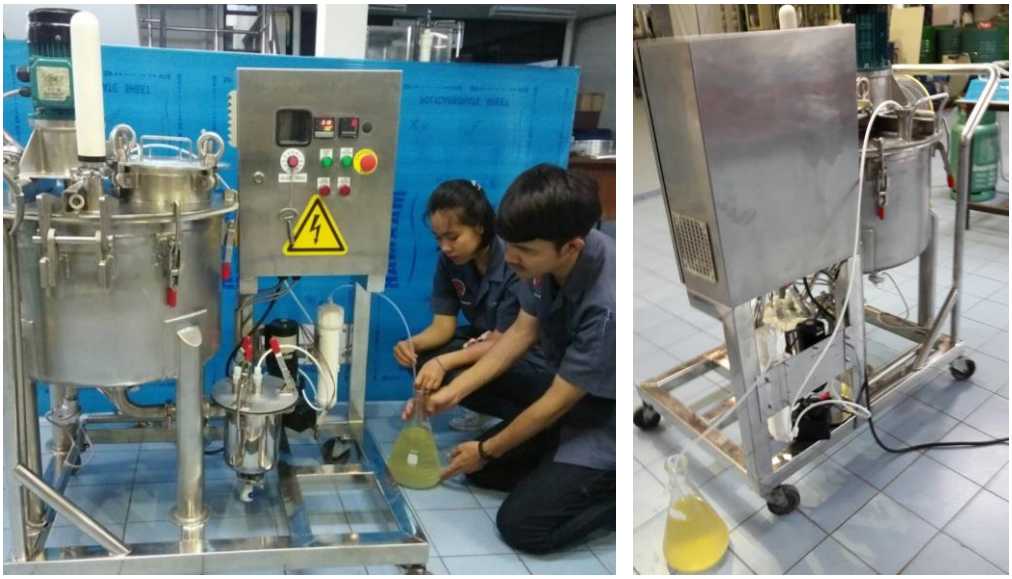
**รูปที่ 22. ข้าวที่ได้จากการหุงพร้อมฆ่าเชื้อด้วย Autoclave.**

10.3 เติมชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 จำนวน 250 ชิ้น (6 plate) แล้วนำไปใส่ในตะแกรงในเครื่องผลิตน้ำตาลข้าว ปิดฝาเครื่อง กดปุ่มการทำงานของเครื่อง และตั้งระบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส หมักเพื่อทำหัวเชื้อเป็นระยะเวลา 2 วัน แล้วเติมข้าวเจ้าสุกอีก 5 กิโลกรัม เปิดใบกวนในอัตราความเร็ว เท่ากับ 70 รอบต่อนาที เพื่อกวนผสมหัวเชื้อเก่าที่ผลิตได้กับข้าวใหม่ที่ใส่ลงไป เพื่อผลิตน้ำตาลข้าว สำหรับข้าวเหนียวเติมได้เมื่อหัวเชื้อได้ 1 วัน

**รูปที่ 23. ชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 สำหรับนำไปคลุกเคล้ากับข้าวสุกเพื่อเตรียมหัวเชื้อ.**

**รูปที่ 24. การทดสอบต้นแบบเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าว.**

10.4 เมื่อได้น้ำตาลข้าว ใช้ระบบกรองผ่าน Ultrafiltration membrane นำเอนไซม์ใส่กลับเข้าไปพ่นในถังหมักในเครื่องเพื่อเพิ่มเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล ดังรูปที่ 25



**รูปที่ 25. การกรองน้ำตาลข้าวด้วย Ultrafiltration membrane เพื่อแยกน้ำตาลออกมาใช้ และการนำเอนไซม์ที่แยกได้ใส่กลับเข้าไปใช้ซ้ำในถังของต้นแบบเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าว.**

**รูปที่ 26. อุปกรณ์เมมเบรนและปั๊มในการกรองน้ำตาลข้าว.**

10.5 นำน้ำตาลข้าวที่ได้จากการแยกเอนไซม์ออกไปใช้ซ้ำแล้วมาวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างน้ำตาลข้าว

10.5.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำตาลข้าว

การเตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) โดยชั่ง Sodium potassium tartrate tetrahydrate ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$) 374 กรัม นำมาละลายใน 2M NaOH ปริมาตร 250 มิลลิลิตร (Reagent 1) จากนั้นเตรียม Reagent 2 โดยชั่ง 3, 5-dinitrosalicylic acid 11.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปตั้งบน hot plate จนละลาย นำ Reagent 2 เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วเติม Reagent 1 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ลงช้าๆ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

10.5.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกลูโคส 0.0100 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ในขวดปรับปริมาตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเตรียมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เติมสารละลาย dinitrosalicylic acid (DNS) ในอัตราส่วน 0.5 มิลลิลิตร ต่อสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีในน้ำเย็นเป็นเวลา 10 นาที และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Miller 1959) แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปสร้างกราฟความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

10.5.3 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างน้ำตาลข้าว

ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำตาลข้าวด้วยน้ำกลั่น 10, 100 และ 1,000 เท่า เติมสารละลาย dinitrosalicylic acid (DNS) ที่เตรียมได้ในข้อ 9.5.1 ในอัตราส่วน 0.5 มิลลิลิตร ต่อสารละลายน้ำตาลข้าวที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีในน้ำเย็นเป็นเวลา 10 นาที และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสในตัวอย่างน้ำตาลข้าว โดยเทียบกับกราฟความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}} \quad (1)$$

# 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

**1. การศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 สำหรับผลิตน้ำตาลข้าว เพื่อลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง**

ผลการศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 สำหรับผลิตน้ำตาลข้าว เพื่อลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง จากตารางที่ 1 ได้ทำการศึกษาทั้งหมด 6 วิธี ดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยการบ่มและขยายเชื้อด้วย YM broth และแป้งข้าวเจ้า (ตราปลาไทย 5 ดาว) ซึ่งเป็นการเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วตัดชิ้นเชื้อนำไปเลี้ยงใน YM broth จากนั้นขยายเชื้อด้วยแป้งข้าวเจ้า (ตราปลาไทย 5 ดาว) ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 216 ชั่วโมง หรือ 9 วัน ซึ่งเป็นขั้นตอนการเตรียมเชื้อโดยทั่วไป นำเชื้อที่ได้ไปหมักในข้าวจำนวน 500 กรัม เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 60.7 มิลลิลิตร ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 14 องศาบริกซ์

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยการบ่มและขยายเชื้อด้วย YM broth และข้าวเจ้าหุงสุก ซึ่งเป็นการเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วตัดชิ้นเชื้อนำไปเลี้ยงใน YM broth จากนั้นขยายเชื้อด้วยข้าวเจ้าสุก ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 216 ชั่วโมง หรือ 9 วันนำเชื้อที่ได้ไปหมักในข้าวจำนวน 100 กรัม เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 38.6 มิลลิลิตร ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 16.5 องศาบริกซ์

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยการบ่มและขยายเชื้อด้วย YM broth ซึ่งเป็นการเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วตัดชิ้นเชื้อไปเลี้ยงเพื่อขยายเชื้อใน YM broth ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 144 ชั่วโมง หรือ 6 วัน นำเชื้อที่ได้ไปหมักในข้าวจำนวน 100 กรัม เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 38.5 มิลลิลิตร ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 18 องศาบริกซ์

4. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยการบ่มและขยายเชื้อโดยใช้อาหารแข็งแบบผิวหน้าเอียง ซึ่งเป็นการเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็งแบบผิวหน้าเอียง ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 144 ชั่วโมง หรือ 6 วัน นำเชื้อที่ได้ไปหมักในข้าวจำนวน 100 กรัม เป็นเวลา 7 วัน ได้

ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 44.5 มิลลิลิตร ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 16.5 องศาบริกซ์

5. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยบ่มและขยายเชื้อให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง ซึ่งเป็นการเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 72 ชั่วโมง หรือ 3 วัน แล้วตัดชิ้นเชื้อไปเลี้ยงเพื่อขยายเชื้อในข้าวเจ้าหุงสุกจำนวน 100 กรัม เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 40.7 มิลลิลิตร ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 19 องศาบริกซ์

6. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยการบ่มและขยายเชื้อด้วย YM broth ร่วมกับข้าวเจ้าหุงสุก ซึ่งเป็นการเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วตัดชิ้นเชื้อนำไปเลี้ยงเพื่อขยายเชื้อใน YM broth ร่วมกับข้าวเจ้าสุก ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 144 ชั่วโมง หรือ 6 วัน นำเชื้อที่ได้ไปหมักในข้าวจำนวน 100 กรัม เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 47.3 มิลลิลิตร ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 16.5 องศาบริกซ์

ซึ่งพบว่าวิธีที่เหมาะสมที่สุด คือ วิธีที่ 5 ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง เนื่องจากนำชิ้นเชื้อมาใช้ในการผลิตน้ำตาลได้โดยตรง โดยที่ไม่ต้องนำไปเลี้ยงใน YM broth หรือในแป้งข้าวต่างๆ ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการจัดหา YM broth หรือในแป้งข้าวต่างๆ อีกทั้งใช้เวลาในการเตรียมเชื้อน้อยเพียงแค่ 72 ชั่วโมง หรือ 3 วัน ก็สามารถนำเชื้อมาใช้ในการผลิตน้ำตาลได้ทันที อีกทั้งยังเป็นวิธีที่สามารถผลิตน้ำตาลได้ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงถึง 19 องศาบริกซ์ ซึ่งเป็นค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดที่สูงกว่าวิธีอื่นๆ.

**ตารางที่ 1. ผลการศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 สำหรับผลิตน้ำตาลข้าว เพื่อลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง**

| การทดลอง | ปริมาณน้ำตาลข้าว (มิลลิลิตร) | | | | | | | ปริมาณน้ำตาลข้าวรวม (มิลลิลิตร) | ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | | | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยการบ่มและขยายเชื้อด้วย YM broth และแป้งข้าวเจ้า (ตราปลาไทย 5 ดาว) | 4.7 | 11.7 | 14.3 | 11.6 | → | | 18.4 | 60.7 | 0.0 | 13.5 | 14.0 | 14.0 | ND | ND | 13.0 |
| 2. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยการบ่มและขยายเชื้อด้วย YM broth และข้าวเจ้าหุงสุก | ND | 16.2 | 11.4 | 6.9 | → | | 4.1 | 38.6 | ND | 16.5 | 16.5 | 16.5 | ND | ND | 16.5 |
| 3. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยการบ่มและขยายเชื้อด้วย YM broth | ND | 5.6 | → | 21.0 | 7.1 | 3.1 | 1.7 | 38.5 | ND | 17.0 | ND | 17.5 | 17.0 | 17.0 | 18.0 |
| 4. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยการบ่มและขยายเชื้อโดยใช้อาหารแข็งแบบผิวหน้าเอียง | ND | 11.9 | → | 1.0 | 6.4 | 3.4 | 1.8 | 44.5 | ND | 16.5 | ND | 16.5 | 16.0 | 15.5 | 15.5 |
| 5. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยบ่มและขยายเชื้อให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง | ND | 7.2 | 17.0 | 10.0 | 3.4 | → | 3.1 | 40.7 | ND | 17.0 | 19.0 | 19.0 | 19.0 | ND | 19.0 |
| 6. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยการบ่มและขยายเชื้อด้วย YM broth ร่วมกับข้าวเจ้าหุงสุก | ND | 13.4 | → | 9.0 | 5.4 | 4.8 | 4.7 | 47.3 | ND | 16.5 | ND | 16.5 | 16.0 | 15.0 | 15.0 |

หมายเหตุ: → = เก็บน้ำตาลข้าวรวมไว้ในวันถัดไป, ND = Not Detect

**2. การทดลองหาปริมาณชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลข้าว โดยใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง**

ผลการทดลองหาปริมาณชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลข้าว โดยใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง ดังตารางที่ 2.

เป็นผลการทดลองเพื่อหาจำนวนชิ้นเชื้อที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจากวิธีที่เหมาะสมแล้ว (วิธีที่ 5 ในข้อ 1) โดยทำการทดลองทั้งหมด 6 การทดลอง แต่ละการทดลองใช้จำนวนชิ้นเชื้อในการผลิตน้ำตาลในปริมาณต่างๆ กัน มาหมักในข้าวเจ้าสุกจำนวน 100 กรัม พบว่า

การทดลองที่ 1 ใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 2 ชิ้น ไปหมักในข้าว เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 44.4 มิลลิลิตร ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 16 องศาบริกซ์.

การทดลองที่ 2 ใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 3 ชิ้น ไปหมักในข้าว เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 46.9 มิลลิลิตร ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 16.5 องศาบริกซ์.

การทดลองที่ 3 ใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 4 ชิ้น ไปหมักในข้าว เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 49.6 มิลลิลิตร ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 16 องศาบริกซ์.

การทดลองที่ 4 ใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 5 ชิ้น ไปหมักในข้าว เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 50.6 มิลลิลิตร ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 18 องศาบริกซ์.

การทดลองที่ 5 ใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 10 ชิ้น ไปหมักในข้าว เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 52.2 มิลลิลิตร ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 16 องศาบริกซ์.

การทดลองที่ 6 ใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 15 ชิ้น ไปหมักในข้าว เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 53.9 มิลลิลิตร ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 16 องศาบริกซ์.

ซึ่งพบว่าการทดลองที่เหมาะสมที่สุด คือ การทดลองที่ 4 ซึ่งใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 5 ชิ้น หมักในข้าว เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 50.6 มิลลิลิตร และได้ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 18 องศาบริกซ์ ซึ่งเป็นค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดที่สูงกว่าการทดลองอื่นๆ ทั้งหมด.

**ตารางที่ 2. การทดลองหาปริมาณชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลข้าว โดยใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง**

| การทดลอง | จำนวนชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร (ชิ้น) | ปริมาณน้ำตาลข้าว (มิลลิลิตร) ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | | | | ปริมาณน้ำตาลข้าวรวม (มิลลิลิตร) | ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1. | 2 | ND | 18.4 | 12.1 | → | | 11.4 | 2.5 | 44.4 | ND | 16.0 | 16.0 | ND | ND | 16.0 | 15.5 |
| 2. | 3 | ND | 17.7 | 12.3 | → | | 13.5 | 3.4 | 46.9 | ND | 16.0 | 16.0 | ND | ND | 16.5 | 15.0 |
| 3. | 4 | ND | 17.8 | 12.3 | → | | 18.2 | 1.3 | 49.6 | ND | 16.0 | 16.0 | ND | ND | 15.0 | 15.5 |
| 4. | 5 | ND | 19.0 | 13.3 | → | | 17.3 | 1.0 | 50.6 | ND | 16.0 | 16.0 | ND | ND | 17.0 | 18.0 |
| 5. | 10 | ND | 20.9 | 11.9 | → | | 18.5 | 0.9 | 52.2 | ND | 16.0 | 16.0 | ND | ND | 15.5 | 14.0 |
| 6. | 15 | ND | 25.8 | 10.1 | → | | 17.7 | 0.3 | 53.9 | ND | 15.0 | 16.0 | ND | ND | 13.75 | 14.0 |

หมายเหตุ: → = เก็บน้ำตาลข้าวรวมไว้ในวันถัดไป, ND = Not Detect

**3. การศึกษาการเตรียมข้าวเจ้าสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave สำหรับใช้ในการผลิตน้ำตาลข้าว**

ผลการศึกษาการเตรียมข้าวเจ้าสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave สำหรับใช้ในการผลิตน้ำตาลข้าว ดังตารางที่ 3.

เป็นผลการทดลองเพื่อหาอัตราส่วนระหว่างน้ำต่อข้าวเจ้าดิบที่ใช้ในการเตรียมข้าวเจ้าสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave สำหรับใช้ในการผลิตน้ำตาลข้าว และจำนวนชิ้นเชื้อที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจากวิธีที่เหมาะสมแล้ว (วิธีที่ 5 ในข้อ 1) และจำนวนชิ้นเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองที่ 4 (ข้อ 2) ซึ่งใช้ชิ้นเชื้อที่เหมาะสม คือ จำนวน 5 ชิ้น โดยทำการทดลองทั้งหมด 4 การทดลอง แต่ละการทดลองใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อข้าวเจ้าดิบในการเตรียมข้าวสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave สำหรับใช้ในการผลิตน้ำตาลข้าว พบว่า

การทดลองที่ 1 ใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อข้าวเจ้าดิบในการเตรียมข้าวสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave เท่ากับ 1 : 1 (30 : 30) ใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 5 ชิ้น ไปหมักในข้าวเป็นเวลา 7 วัน พบว่าไม่มีน้ำตาลข้าว.

การทดลองที่ 2 ใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อข้าวเจ้าดิบในการเตรียมข้าวสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave เท่ากับ 2 : 1 (60 : 30) ใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 5 ชิ้น ไปหมักในข้าวเป็นเวลา 7 วัน พบว่าไม่มีน้ำตาลข้าว ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 17.7 มิลลิลิตร ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 21.5 องศาบริกซ์.

การทดลองที่ 3 ใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อข้าวเจ้าดิบในการเตรียมข้าวสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave เท่ากับ 3 : 1 (90 : 30) ใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 5 ชิ้น ไปหมักในข้าวเป็นเวลา 7 วัน พบว่าไม่มีน้ำตาลข้าว ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 63.4 มิลลิลิตร ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 15 องศาบริกซ์.

การทดลองที่ 4 ใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อข้าวเจ้าดิบในการเตรียมข้าวสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave เท่ากับ 4 : 1 (120 : 30) ใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 5 ชิ้น ไปหมักในข้าว เป็นเวลา 7 วัน พบว่าไม่มีน้ำตาลข้าว ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 73.1 มิลลิลิตร ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 12.5 องศาบริกซ์

ซึ่งพบว่าการทดลองที่เหมาะสมที่สุด คือ การทดลองที่ 2 ซึ่งใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อข้าวเจ้าดิบในการเตรียมข้าวสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave เท่ากับ 2 : 1 (60 : 30) ใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 5 ชิ้น หมักในข้าว เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 17.7 มิลลิลิตร และได้ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 21.5 องศาบริกซ์ ซึ่งเป็นค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดที่สูงกว่าการทดลองอื่นๆ ทั้งหมด.

**ตารางที่ 3. ผลการศึกษาการเตรียมข้าวเจ้าสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave สำหรับใช้ในการผลิตน้ำตาลข้าว**

| การทดลอง | อัตราส่วนน้ำต่อข้าวดิบ (มิลลิลิตร : กรัม) | น้ำหนักของข้าวสุกที่ได้ (กรัม) | ปริมาณน้ำตาลข้าว (มิลลิลิตร) ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | | | | ปริมาณน้ำตาลข้าวรวม (มิลลิลิตร) | ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1. | 1 : 1 (30 : 30) | 73 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.0 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 2. | 2 : 1 (60 : 30) | 97 | ND | 2.3 | 1.5 | → | | 9.0 | 4.9 | 17.7 | ND | 21.0 | 21.5 | ND | ND | 21.5 | 20.5 |
| 3. | 3 : 1 (90 : 30) | 134 | ND | 24.3 | 20.3 | → | | 12.6 | 6.2 | 63.4 | ND | 12.0 | 14.25 | ND | ND | 15.0 | 14.5 |
| 4. | 4 : 1 (120 : 30) | 152 | ND | 21.0 | 29.7 | → | | 15.5 | 6.9 | 73.1 | ND | 10.0 | 12.5 | ND | ND | 12.5 | 12.5 |

หมายเหตุ: → = เก็บน้ำตาลข้าวรวมไว้ในวันถัดไป, ND = Not Detect

**4. การศึกษาหาความเหมาะสมของการผลิตน้ำตาลข้าวจากข้าวเจ้าที่หุงสุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave และใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง**

ผลจากการทดสอบการผลิตน้ำตาลข้าวจากข้าวเจ้าที่สุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave และใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลข้าวด้วยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 คือ อัตราส่วนน้ำต่อข้าว, จำนวนชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 และระยะเวลาในการหมัก โดยใช้สถิติโมเดลทำนายแบบ Response surface methodology (RSM) เพื่อหาความเหมาะสมของการผลิตน้ำตาลข้าวด้วยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ผลการออกแบบการทดลองโดยใช้ Central composite design; CCD มีสิ่งทดลองที่เป็นตัวแปรที่สำคัญ ทั้งหมด 3 ตัวแปร 5 ระดับ ดังตารางที่ 4.

**ตารางที่ 4. จำนวนปัจจัยและระดับในการออกแบบการทดลองโดยใช้ CCD เพื่อหาความเหมาะสมในการผลิตน้ำตาลข้าวด้วยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182**

| Variables | Code levels[a] | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Symbols | -1.68 | -1 | 0 | + 1 | + 1.68 |
| | (Uncoded) | (-$\alpha$) | | | | ( + $\alpha$) |
| Water to rice ratio (ml) | W | 1.328 | 1.6 | 2 | 2.4 | 2.672 |
| *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 (pieces) | S | 1.0016 | 2.62 | 5 | 7.38 | 8.9984 |
| Fermentation time (days) | T | 2.0096 | 3.22 | 5 | 6.78 | 7.9904 |

หมายเหตุ: [a] Transformation of variable levels from code (X) to uncoded could be obtained as: W = 2 + 0.4 X, S = 5 + 2.38 X and T = 5 + 1.78 X.

จากตารางที่ 5 ผลจากการได้ใช้ SPSS software (version 12.0) หาค่าการทำนายผลการทดลองการหาความเหมาะสมของการผลิตน้ำตาลข้าวจากข้าวเจ้าที่สุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave และใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองจริงที่ทำการทดลองได้ ซึ่งพบว่ามีค่าใกล้เคียงกันมากผลดังตารางที่ 5 ค่าสัมประสิทธิ์ของโมเดล RSM แสดงดังตารางที่ 6 และสูตรของโมเดล (2) การวิเคราะห์ ANOVA ของโมเดล แสดงดังตารางที่ 7 ได้กราฟโมเดลดังรูปที่ 27.

**ตารางที่ 5. ผลการทดลองตามแผนการทดลองโดยใช้ CCD และค่าการทำนายผลการทดลองเพื่อหาความเหมาะสมของการผลิตน้ำตาลข้าวจากข้าวเจ้าที่สุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave และใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง**

| Treatment | W | S | T | W | S | T | Rice sugar (ml) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | (ml) | (pieces) | (days) | Experimental | Predicted |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 1.60 | 2.62 | 3.22 | 2.70 | 1.75 |
| 2 | -1 | -1 | 1 | 1.60 | 2.62 | 6.78 | 12.50 | 11.54 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 1.60 | 7.38 | 3.22 | 4.20 | 3.59 |
| 4 | -1 | 1 | 1 | 1.60 | 7.38 | 6.78 | 13.30 | 11.79 |
| 5 | 1 | -1 | -1 | 2.40 | 2.62 | 3.22 | 13.40 | 13.93 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | 2.40 | 2.62 | 6.78 | 29.90 | 29.52 |
| 7 | 1 | 1 | -1 | 2.40 | 7.38 | 3.22 | 16.80 | 16.77 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 2.40 | 7.38 | 6.78 | 30.80 | 30.77 |
| 9 | -1.68 | 0 | 0 | 1.328 | 5.00 | 5.00 | 1.80 | 3.73 |
| 10 | +1.68 | 0 | 0 | 2.672 | 5.00 | 5.00 | 30.40 | 29.91 |
| 11 | 0 | -1.68 | 0 | 2.00 | 1.0016 | 5.00 | 15.20 | 15.77 |
| 12 | 0 | +1.68 | 0 | 2.00 | 8.9984 | 5.00 | 17.50 | 18.37 |
| 13 | 0 | 0 | -1.68 | 2.00 | 5.00 | 2.0096 | 1.20 | 1.38 |
| 14 | 0 | 0 | +1.68 | 2.00 | 5.00 | 7.9904 | 20.10 | 21.35 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 2.00 | 5.00 | 5.00 | 16.40 | 17.13 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 2.00 | 5.00 | 5.00 | 17.40 | 17.13 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 2.00 | 5.00 | 5.00 | 17.90 | 17.13 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 2.00 | 5.00 | 5.00 | 16.40 | 17.13 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 2.00 | 5.00 | 5.00 | 17.50 | 17.13 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 2.00 | 5.00 | 5.00 | 17.40 | 17.13 |

หมายเหตุ: W = Water to rice ratio, S = *Amylomyces rouxii* TISTR 3182, T = Fermentation time

**ตารางที่ 6. ค่าสัมประสิทธิ์ของโมเดล RSM (Regression coefficients of predicted quadratic polynomial model for the regression equation of production of rice sugar)**

| Model | Unstandardized Coefficients | | Standardized Coefficients | t | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| | B | Std. error | Beta | | |
| 1 (Constant) | -38.490 | 11.354 | | -3.390 | 0.007 |
| W | 10.752 | 8.511 | 0.423 | 1.263 | 0.235 |
| S | 0.309 | 1.137 | 0.072 | 0.272 | 0.791 |
| T | 6.186 | 1.593 | 1.083 | 3.883 | 0.003 |
| WW | -0.695 | 1.917 | -0.110 | -0.363 | 0.725 |
| SS | -0.004 | 0.054 | -0.010 | -0.074 | 0.943 |
| TT | -0.645 | 0.097 | -1.147 | -6.657 | 0.000 |
| WS | 0.263 | 0.432 | 0.135 | 0.608 | 0.557 |
| ST | -0.094 | 0.097 | -0.141 | -0.973 | 0.354 |
| WT | 2.037 | 0.577 | 0.825 | 3.527 | 0.005 |

จากตารางที่ 6 นำมาสร้างสูตรสมการของโมเดลได้ดังสมการ (2) เมื่อ y หมายถึงค่า *Raoultella terrigena* TISTR 1568 (log)

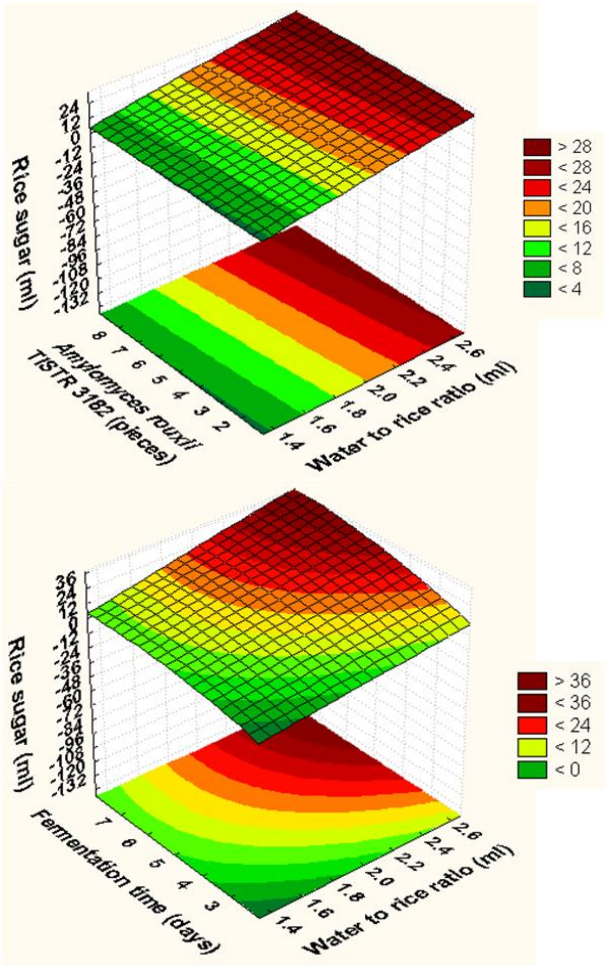
$$Y = -38.490+10.752W+0.309S+6.186T-0.695W^2-0.004S^2-0.645T^2+0.263WS-0.094ST+2.037WT \quad (2)$$

**ตารางที่ 7. การวิเคราะห์ทางสถิติของโมเดล (ANOVA for the quadratic polynomial model of production of rice sugar)**

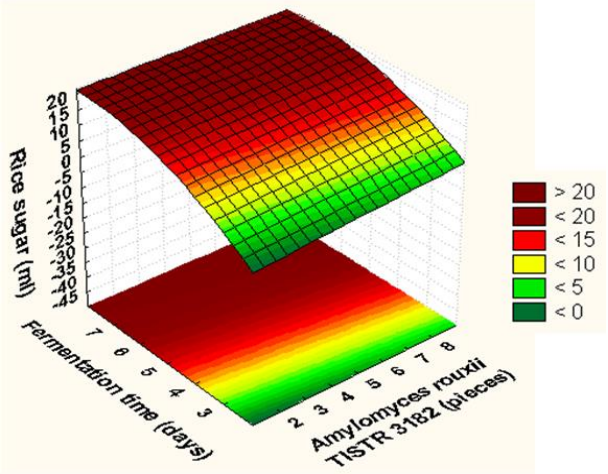
| Model | Sum of squares | df | Mean square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Regression | 1397.407 | 9 | 155.227 | 114.804 | 0.000[a] |
| Residual | 13.521 | 10 | 1.352 | | |
| Total | 1410.568 | 19 | | | |

หมายเหตุ: [a] Predictors: (Constant), WT, SS, WW, ST, TT, WS, S, T, W.

กราฟโมเดลรูปที่ 27 แสดงอิทธิพลของอัตราส่วนน้ำต่อข้าว, จำนวนชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 และระยะเวลาในการหมักต่อความสามารถในการผลิตน้ำตาลข้าว จาก Response surface plots ของ RSM ทั้งหมด พบว่า อัตราส่วนน้ำต่อข้าวอยู่ในช่วง 2-2.672 : 1 (มิลลิลิตร : กรัม), ชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 จำนวน 5-8 ชิ้น และระยะเวลาในการผลิตในช่วง 5-8 วัน สามารถผลิตน้ำตาลข้าวได้สูงสุดปริมาณ 20 มิลลิลิตร และได้ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 21.5 องศาบริกซ์




**รูปที่ 27. Response surface plots ที่แสดงผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลข้าว.**

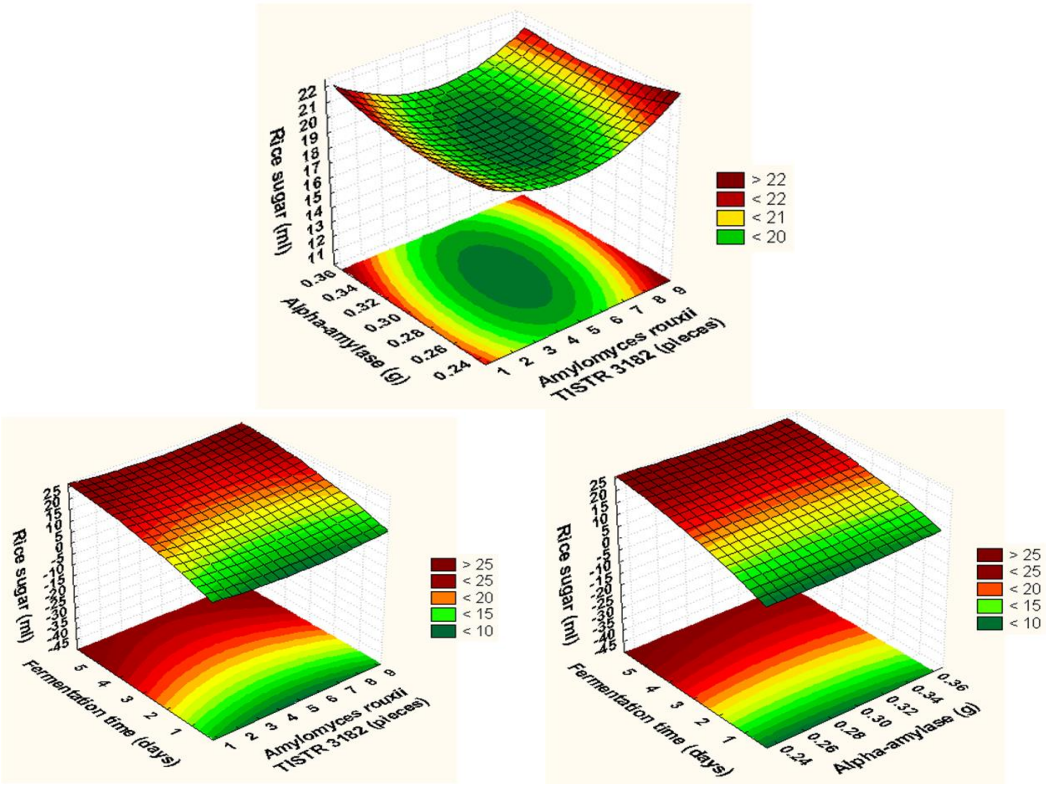



**รูปที่ 27. (ต่อ).**

**5. ผลการศึกษาหาความเหมาะสมของการผลิตน้ำตาลข้าวจากข้าวเจ้าที่สุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave และใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง ร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส**

ผลจากการทดสอบการผลิตน้ำตาลข้าวจากข้าวเจ้าที่สุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave และใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง ร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลข้าว คือ จำนวนชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182, ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และระยะเวลาในการหมัก โดยใช้สถิติโมเดลทำนายแบบ Response surface methodology (RSM) เพื่อหาความเหมาะสมของการผลิตน้ำตาลข้าวด้วยเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยออกแบบการทดลองโดยใช้ Central composite design; CCD.

ผลที่ได้จากการได้ใช้ SPSS software (version12.0) หาค่าการทำนายผลการผลิตน้ำตาลข้าวที่ใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง ร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองจริงที่ทำการทดลองได้ ซึ่งพบว่ามีค่าใกล้เคียงกันมาก มีค่าสัมประสิทธิ์ของโมเดล RSM การวิเคราะห์ ANOVA ของโมเดล ได้กราฟโมเดลดังรูปที่ 28.




**รูปที่ 28. Response surface plots ที่แสดงผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลข้าวที่ใช้เชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส.**

กราฟโมเดลรูปที่ 28 แสดงอิทธิพลของจำนวนชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182, ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และระยะเวลาในการหมักต่อความสามารถในการผลิตน้ำตาลข้าว จาก Response surface plots ของ RSM ทั้งหมด พบว่าชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 จำนวน 3-6 ชิ้น, ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.23-0.36 กรัม และระยะเวลาในการผลิตในช่วง 3.5-5.8 วัน สามารถผลิตน้ำตาลข้าวได้สูงสุดปริมาณ 27 มิลลิลิตร และได้ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 24 องศาบริกซ์.

**6. ผลการทดลองเพิ่มข้าวเจ้าสุกในระหว่างการหมัก เพื่อต่อเชื้อและเพาะเลี้ยงให้ขยายในข้าวใหม่**

ผลการทดลองเพิ่มข้าวเจ้าสุกในระหว่างการหมัก ดังตารางที่ 8 เป็นผลการทดลองที่ศึกษาการเพิ่มข้าวสุกในระหว่างการหมักที่ได้หมักแบบใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อข้าวเจ้าดิบ เท่ากับ 2 : 1 เตรียมข้าวเจ้าสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave และจำนวนชิ้นเชื้อที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจากวิธีที่เหมาะสมแล้ว (วิธีที่ 5 ในข้อ 1) และจำนวนชิ้นเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากผล

การทดลองที่ 4 (ข้อ 2) ซึ่งใช้ชิ้นเชื้อที่เหมาะสม คือ จำนวน 5 ชิ้น โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 การทดลอง และเติมข้าวทุกวัน วันละ 1 เท่า ของข้าวที่หมักในตอนแรก พบว่า

การทดลองที่ 1 ในข้าวเริ่มต้น ใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อข้าวเจ้าดิบในการเตรียมข้าวสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave เท่ากับ 2 : 1 (60 : 30) จำนวนประมาณ 100 กรัมข้าวสุก ใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 5 ชิ้น หมักเป็นเวลา 13 วัน และเพิ่มข้าวสุกลงไปในวันที่หมักครบ 2 วัน (เนื่องจากพบว่าเมื่อหมักครบ 1 วัน ไม่มีน้ำตาลข้าวเกิดขึ้น) พบว่าข้าวที่หมักได้เริ่มมีน้ำตาลเกิดขึ้นเมื่อหมักครบ 2 วัน คือ 3.5 มิลลิลิตร และมีปริมาณสูงขึ้นเรื่อยๆ ในวันที่ 3, 4, 5 ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลข้าว 11.7, 20.6 และ 29.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลสูงที่สุดในวันที่ 5 หลังจากนั้นน้ำตาลจะลดลงเล็กน้อยซึ่งเก็บน้ำตาลได้ไปจนถึงวันที่ 13 ซึ่งหยุดการเพิ่มข้าว เนื่องจากพบว่าข้าวมีลักษณะเปลี่ยนไป ปริมาณน้ำตาลในวันที่ 6, 7, 8, 9, 10, 12 และ 13 คือ 26.0, 27.2, 20.8, 25.5, 15.8, 17.0, 21.4 และ 25.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 22.0 องศาบริกซ์.

การทดลองที่ 2 ในข้าวเริ่มต้น ใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อข้าวเจ้าดิบในการเตรียมข้าวสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave เท่ากับ 2 : 1 (60 : 30) จำนวนประมาณ 100 กรัมข้าวสุก ใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 5 ชิ้น ร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จำนวน 0.2500 กรัม หมักเป็นเวลา 13 วัน และเพิ่มข้าวสุกลงไปในวันที่หมักครบ 1 วัน เนื่องจากพบว่าเมื่อหมักครบ 1 วัน มีน้ำตาลข้าวเกิดขึ้น ถึง 17.2 มิลลิลิตร และในวันที่ 2, 3, 4, 5 ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวเท่ากับ 15.3, 18.1, 25.2 และ 30.7 มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลสูงที่สุดในวันที่ 5 หลังจากนั้นน้ำตาลจะลดลงเล็กน้อย ซึ่งเก็บน้ำตาลได้ไปจนถึงวันที่ 13 จึงหยุดการเพิ่มข้าว เนื่องจากพบว่าข้าวมีลักษณะเปลี่ยนไป ปริมาณน้ำตาลในวันที่ 6, 7, 8, 9, 10, 12 และ 13 คือ 19.1, 27.2, 20.0, 22.0, 21.8, 23.1, 26.9 และ 25.8 มิลลิลิตร ตามลำดับ มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 23.5 องศาบริกซ์.

ซึ่งพบว่าระยะเวลาการเติมข้าวในระหว่างการหมักได้สูงสุดถึง 10 วัน ซึ่งจะได้ปริมาณน้ำตาลข้าวใกล้เคียงกันทุกวัน โดยข้าวที่หมักด้วยชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 อย่างเดียว น้ำตาลจะเกิดขึ้นในวันที่ 2 และสูงสุดในวันที่ 5 ส่วนการทดลองที่หมักด้วยชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จะมีน้ำตาลเกิดขึ้นตั้งแต่วันแรกถึง 17.2 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่มากเท่าๆ กับวันอื่นๆ และปริมาณน้ำตาลข้าวจะสูงที่สุดในวันที่ 5 ถึง 30.7 มิลลิลิตร มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในช่วงวันแรกๆ สูงกว่าการหมักด้วยชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 เพียงอย่างเดียว (23.5 องศาบริกซ์).

**ตารางที่ 8. ผลการทดลองเพิ่มข้าวเจ้าสุกในระหว่างการหมัก เพื่อต่อเชื้อและเพาะเลี้ยงให้ขยายในข้าวใหม่**

| ระยะเวลาหมัก (วัน) | การทดลองที่ 1 (ทดลองผลิตน้ำตาลข้าวด้วยชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ในข้าวเริ่มต้น) | | | การทดลองที่ 2 (ทดลองผลิตน้ำตาลข้าวด้วยชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในข้าวเริ่มต้น) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ปริมาณข้าวสุกที่เพิ่มลงไปหลังจากหมักครบระยะเวลา (กรัม) | ปริมาณน้ำตาลข้าวที่ผลิตได้ (มิลลิลิตร) | ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) | ปริมาณข้าวสุกที่เพิ่มลงไปหลังจากหมักครบระยะเวลา (กรัม) | ปริมาณน้ำตาลข้าวที่ผลิตได้ (มิลลิลิตร) | ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) |
| 1 | 0.00 | 0.0 | 0.0 | 90.96 | 17.2 | 23.5 |
| 2 | 91.54 | 3.5 | 20.0 | 92.61 | 15.3 | 23.1 |
| 3 | 92.75 | 11.7 | 21.0 | 91.38 | 18.1 | 22.5 |
| 4 | 91.24 | 20.6 | 20.5 | 91.01 | 25.2 | 22.5 |
| 5 | 90.73 | 29.2 | 19.0 | 90.67 | 30.7 | 21.5 |
| 6 | 85.87 | 26.0 | 19.5 | 90.28 | 19.1 | 21.0 |
| 7 | 91.99 | 27.2 | 20.3 | 90.39 | 27.2 | 20.2 |
| 8 | 89.80 | 20.8 | 21.5 | 91.43 | 20.0 | 20.0 |
| 9 | 90.87 | 25.5 | 20.0 | 89.44 | 22.0 | 20.5 |
| 10 | 91.34 | 15.8 | 21.5 | 91.45 | 21.8 | 20.0 |
| 11 | 91.76 | 17.0 | 22.0 | 91.79 | 23.1 | 21.0 |
| 12 | 91.14 | 21.4 | 21.75 | 91.44 | 26.9 | 21.5 |
| 13 | 0.00 | 25.0 | 21.5 | 0.00 | 25.8 | 21.5 |

**7. ผลการทดลองนำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวกลับมาใช้ซ้ำในข้าวสุกใหม่ปลอดเชื้อ**

7.1 ผลการทดลองนำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวเจ้ากลับมาใช้ซ้ำในข้าวเจ้าสุกใหม่ปลอดเชื้อ

ผลของการนำน้ำตาลข้าวเจ้าพร้อมเอนไซม์ที่มีอยู่ในน้ำตาลข้าวเจ้าจากที่ผลิตได้ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในข้าวเจ้าที่หุงสุกที่ฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวด้วย Autoclave (อัตราส่วนน้ำต่อข้าวเท่ากับ 2 : 1) จำนวน 500 กรัม ใส่ในถุงใสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว คลุกเคล้าให้เข้ากันในถุงใส อุดปากถุงด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใช้หนังยางมัดทับอีกรอบ ใช้หนังยางรัดรอบถุงเพื่อทำพื้นที่ที่ก้นถุงให้ว่างสำหรับเป็นที่รองรับน้ำตาล แล้วแขวนถุงหมักในแนวตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเมื่อครบกำหนด 1 วัน เก็บน้ำตาลและวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด แล้วนำน้ำตาลข้าวพร้อมเอนไซม์ทั้งหมดที่ได้ใส่กลับเข้าไปในข้าวหมักเหมือนเดิมทุกวัน เป็นเวลา 30 วัน ต่อจากนั้นหาปริมาณของกากข้าวหมักที่เหลือ พบว่าจากข้าวเจ้าสุก 500 กรัม ถูกย่อยไป 286 กรัม (57.2 เปอร์เซ็นต์) เหลือกากข้าวหมักเฉลี่ย 214 กรัม (42.8 เปอร์เซ็นต์) สามารถผลิตน้ำตาลข้าวได้เฉลี่ย 337 มิลลิลิตร และมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 23.5 องศาบริกซ์ ดังรูปที่ 29.

**รูปที่ 29. น้ำตาลข้าวเจ้าที่ผลิตได้จากการนำเอนไซม์ในน้ำตาลข้าวเจ้ากลับมาใช้ซ้ำและกากข้าวหมักที่เหลือ.**

7.2 ผลการทดลองนำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวเหนียวกลับมาใช้ซ้ำในข้าวเหนียวสุกใหม่ปลอดเชื้อ

ผลของการนำน้ำตาลข้าวเหนียวพร้อมเอนไซม์ที่มีอยู่ในน้ำตาลข้าวเหนียวจากที่ผลิตได้ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในข้าวเหนียวสุกใหม่ปลอดเชื้อ จำนวน 500 กรัม ที่อยู่ในถุงใสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และคลุกเคล้าให้เข้ากันในถุงใส อุดปากถุงด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใช้หนังยางมัดทับอีกรอบ ใช้หนังยางรัดรอบถุงเพื่อทำพื้นที่ที่ก้นถุงให้ว่างสำหรับเป็นที่รองรับน้ำตาล แล้วแขวนถุงหมักในแนวตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเมื่อครบกำหนด 1 วัน เก็บน้ำตาลและวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด แล้วนำน้ำตาลข้าวพร้อมเอนไซม์ทั้งหมดที่ได้ใส่กลับเข้าไปใน

ข้าวหมักเหมือนเดิมทุกวัน เป็นเวลา 30 วัน ต่อจากนั้นหาปริมาณของกากข้าวหมักที่เหลือ พบว่าจากข้าวเหนียวสุก 500 กรัม ถูกย่อยไป 407 กรัม (81.4 เปอร์เซ็นต์) เหลือกากข้าวหมักเฉลี่ย 93 กรัม (18.6 เปอร์เซ็นต์) สามารถผลิตน้ำตาลข้าวได้เฉลี่ย 498 มิลลิลิตร และมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 37.5 องศาบริกซ์ ดังรูปที่ 30.

**รูปที่ 30. น้ำตาลข้าวเหนียวที่ผลิตได้จากการนำเอนไซม์ในน้ำตาลข้าวเหนียวกลับมาใช้ซ้ำและกากข้าวหมักที่เหลือ.**

**8. ผลการทดลองขยายขนาดปริมาณการผลิตน้ำตาลจากข้าวแบบแยกน้ำตาลข้าวจากผลของความเหมาะสมตามสถิติโมเดล RSM**

จากผลของสถิติโมเดล Response surface methodology (RSM) ข้อ 4 พบว่าความเหมาะสมของการผลิตน้ำตาลข้าวจากข้าวเจ้า คือ ใช้ข้าวเจ้าในอัตราส่วนน้ำต่อข้าว เท่ากับ 2 : 1 (หุงสุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave) โดยใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง จำนวน 5 ชิ้น และใช้ระยะเวลาในการหมัก 6 วัน.

ผลของการนำข้าวเจ้าดิบจำนวน 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงใสพร้อมเติมน้ำในอัตราส่วนน้ำต่อข้าว เท่ากับ 2 : 1 นำไปหุงสุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave และตั้งข้าวทิ้งไว้จนเย็นที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง ขนาดชิ้นละ 1x1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในถุงข้าว คลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วใส่ข้าวผสมเชื้อลงในตะแกรงที่บรรจุอยู่ในถุงใสหรือโถแก้วที่ผ่านการฆ่าชื้อแล้ว จากนั้นอุดปากถุงด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหรือเซรามิคเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.3 ไมครอน แล้วใช้หนังยางรัดรอบถุงเพื่อทำพื้นที่ที่ก้นถุงให้ว่างสำหรับเป็นที่รองรับน้ำตาล ใช้ตะแกรงวางบนบีกเกอร์ ได้ผลดังรูปที่ 31.

**รูปที่ 31. ผลการทดลองขยายขนาดปริมาณการผลิตน้ำตาลจากข้าวแบบแยกน้ำตาลข้าวจากผลของความเหมาะสมตามสถิติโมเดล RSM.**

**9. ผลของวิธีการออกแบบสร้างเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าว โดยใช้เมมเบรนนำเอนไซม์ในน้ำตาลข้าวที่ผลิตได้กลับมาใช้ซ้ำ**

จากการออกแบบเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าวได้ออกแบบให้เป็นการหมักในระบบปิดแบบแยกน้ำตาลข้าวเพื่อไม่ให้ข้าวจมน้ำตาลจนเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ขาดออกซิเจน โดยหมักข้าวในตะแกรงที่ถอดประกอบได้ซึ่งอยู่ด้านในถังหมัก ให้น้ำตาลที่ผลิตได้แยกจากข้าวไหลลงมาเก็บไว้ด้านล่างของถัง ในถังมีใบกวนแบบถอดประกอบได้สำหรับคลุกเคล้าข้าวและเชื้อหรือเอนไซม์ให้กระจายอย่างสม่ำเสมอ.

**รูปที่ 32. ตะแกรงและใบกวนที่ถอดประกอบได้ในถังหมัก.**

สำหรับการเติมอากาศโดยใช้เมมแบรนที่มีขนาดของรูพรุน 0.3 ไมครอน ในการส่งผ่านคัดกรองอากาศเพื่อเพิ่มออกซิเจนและป้องกันการปนเปื้อน นอกจากนี้ยังใช้ Ultrafiltration membrane ในการแยกกลับคืนเอ็นไซม์ในน้ำตาลข้าวที่ผลิตได้เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ รวมทั้งระบบควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ออกแบบให้สามารถเพิ่มข้าวในระหว่างการหมักได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่ต้องหยุดการหมักหรือเริ่มต้นใหม่ นอกจากนี้ยังสามารถเก็บน้ำตาลข้าวไปใช้ได้ทุกวัน.

**รูปที่ 33. อุปกรณ์เมมเบรนในการนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำ และเซรามิคเมมเบรนขนาด 0.3 ไมครอน สำหรับกรองอากาศให้ปลอดเชื้อ.**

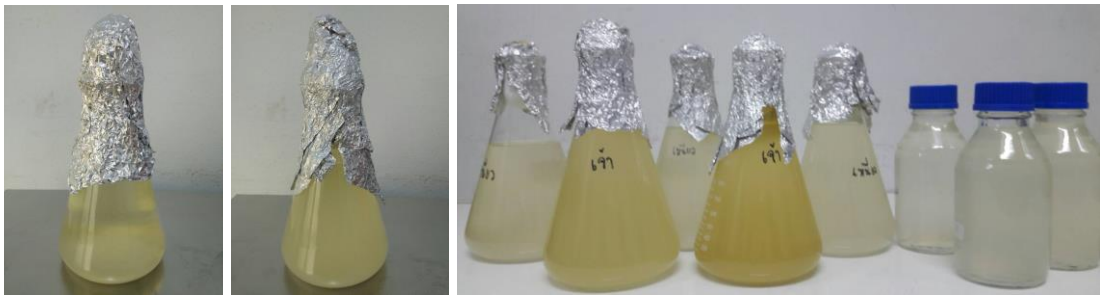
**รูปที่ 34. ระบบควบคุมอุณหภูมิที่ประกอบอยู่ใต้ตัวถัง และระบบควบคุมความชื้นที่ประกอบอยู่บนตัวถัง.**

**10. ผลการทดสอบเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าว และนำเอนไซม์ในน้ำตาลข้าวกลับมาใช้ซ้ำ**

ผลการทดสอบเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าว

ผลการผลิตน้ำตาลจากข้าวเจ้า จากการทำหัวเชื้อราจากข้าวเจ้าดิบจำนวน 1.63 กิโลกรัม (5 กิโลกรัมข้าวสุก) เติมชิ้นเชื้อจำนวน 250 ชิ้น (6 plate) แล้วนำไปใส่ในตะแกรงในเครื่องผลิตน้ำตาลข้าว ปิดฝาเครื่อง ตั้งระบบควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาล คือ 30 องศาเซลเซียส หมักเพื่อทำหัวเชื้อเป็นระยะเวลา 2 วัน และได้เติมข้าวเจ้าสุกในวันที่ 2 จำนวน 5 กิโลกรัม รวมเป็นข้าวสุกทั้งหมดในระบบการผลิต 10 กิโลกรัมข้าวสุก ปรับตั้งอุปกรณ์การกวนที่เหมาะสม คือ ที่อัตราความเร็ว เท่ากับ 70 รอบต่อนาที เพื่อกวนผสมหัวเชื้อเก่าที่ผลิตได้กับข้าวใหม่ที่ใส่ลงไป พบว่าเริ่มได้น้ำตาลข้าวในวันที่ 2 ของการหมัก และเก็บน้ำตาลข้าวทุกวันเริ่มตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 8 รวมกันได้ 4,242 มิลลิลิตร พบว่าน้ำตาลในส่วนที่ผ่าน Ultrafiltration membrane ที่แรงดันในช่วง 100-300 kPa ในส่วน (permeate) ที่เป็นน้ำตาลข้าว มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 23 องศาบริกซ์ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 552.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับผลการผลิตน้ำตาลจากข้าวเหนียว จากการทำหัวเชื้อราจากข้าวเหนียวสุกจำนวน 5 กิโลกรัม เติมชิ้นเชื้อจำนวน 250 ชิ้น (6 plate) แล้วนำไปใส่ในตะแกรงในเครื่องผลิตน้ำตาลข้าว ปิดฝาเครื่อง ตั้งระบบควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาล คือ 30 องศาเซลเซียส หมักเพื่อทำหัวเชื้อเป็นระยะเวลา 1 วัน และได้เติมข้าวเหนียวสุกในวันที่ 1 จำนวน 5 กิโลกรัม รวมเป็นข้าวเหนียวสุกทั้งหมดในระบบการผลิต 10 กิโลกรัมข้าวเหนียวสุก ปรับตั้งอุปกรณ์การกวนที่เหมาะสม คือ ที่อัตราความเร็ว เท่ากับ 70 รอบต่อนาที เพื่อกวนผสมหัวเชื้อเก่าที่ผลิตได้กับข้าวใหม่ที่ใส่ลงไป พบว่าเริ่มได้น้ำตาลข้าวเหนียวในวันที่ 1 ของการหมัก และเก็บน้ำตาลข้าวเหนียวทุกวันเริ่มตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 รวมกันได้ 6,300 มิลลิลิตร พบว่าน้ำตาลในส่วนที่ผ่าน Ultrafiltration membrane ที่แรงดันในช่วง 100-300 kPa ในส่วน (permeate) ที่เป็นน้ำตาลข้าวเหนียว มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 38 องศาบริกซ์ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 875.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.



**รูปที่ 35. น้ำตาลข้าวที่ได้จากการผลิตด้วยเครื่องต้นแบบ.**

# 4. สรุปผลการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตน้ำตาลความเข้มข้นสูงจากข้าวโดยใช้เทคโนโลยีเมมเบรน ได้ทำการศึกษาวิจัยตลอดจนสร้างเครื่องผลิตน้ำตาลได้ผลการศึกษา ดังนี้ คือ วิธีที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 สำหรับผลิตน้ำตาลข้าวเพื่อลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง พบว่าวิธีที่เหมาะสมที่สุด คือ การเพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง เนื่องจากนำชิ้นเชื้อมาใช้ในการผลิตน้ำตาลได้โดยตรง โดยที่ไม่ต้องนำไปเลี้ยงใน YM broth หรือในแป้งข้าวต่างๆ ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการจัดหา YM broth หรือในแป้งข้าวต่างๆ อีกทั้งใช้เวลาในการเตรียมเชื้อน้อยเพียงแค่ 72 ชั่วโมง หรือ 3 วัน ก็สามารถนำเชื้อมาใช้ในการผลิตน้ำตาลได้ทันที อีกทั้งยังเป็นวิธีที่สามารถผลิตน้ำตาลได้ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงถึง 19 องศาบริกซ์ ซึ่งเป็นค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดที่สูงกว่าวิธีอื่นๆ.

ผลการทดลองหาปริมาณชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลข้าว โดยใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง พบว่าใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 5 ชิ้น หมักในข้าว เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 50.6 มิลลิลิตร และได้ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 18 องศาบริกซ์ ซึ่งเป็นค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดที่สูงกว่าการทดลองอื่นๆ ทั้งหมด.

การศึกษาการเตรียมข้าวเจ้าสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave สำหรับใช้ในการผลิตน้ำตาลข้าว พบว่าใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อข้าวเจ้าดิบในการเตรียมข้าวสุกและฆ่าเชื้อพร้อมกันในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave เท่ากับ 2 : 1 (60 : 30) ใช้ชิ้นเชื้อจำนวน 5 ชิ้น หมักในข้าว เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลข้าวทั้งหมด 17.7 มิลลิลิตร และได้ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 21.5 องศาบริกซ์ ซึ่งเป็นค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดที่สูงกว่าการทดลองอื่นๆ ทั้งหมด.

การศึกษาหาความเหมาะสมของการผลิตน้ำตาลข้าวจากข้าวเจ้าที่หุงสุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave และใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรง จาก Response surface plots ของ RSM พบว่า อัตราส่วนน้ำต่อข้าวอยู่ในช่วง 2-2.672 : 1 (มิลลิลิตร : กรัม), ชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 จำนวน 5-8 ชิ้น และระยะเวลาในการ

ผลิตในช่วง 5-8 วัน สามารถผลิตน้ำตาลข้าวได้สูงสุดปริมาณ 20 มิลลิลิตร และได้ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 21.5 องศาบริกซ์.

ผลการศึกษาหาความเหมาะสมของการผลิตน้ำตาลข้าวจากข้าวเจ้าที่สุกพร้อมฆ่าเชื้อในขั้นตอนเดียวโดยใช้ Autoclave และใช้ชิ้นเชื้อจากการเพาะเลี้ยงโดยให้เจริญบนข้าวเจ้าหุงสุกโดยตรงร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจาก Response surface plots ของ RSM พบว่าชิ้นเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 จำนวน 3-6 ชิ้น, ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.23-0.36 กรัม และระยะเวลาในการผลิตในช่วง 3.5-5.8 วัน สามารถผลิตน้ำตาลข้าวได้สูงสุดปริมาณ 27 มิลลิลิตร และได้ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 24 องศาบริกซ์.

ผลการทดลองเพิ่มข้าวเจ้าสุกในระหว่างการหมัก เพื่อต่อเชื้อและเพาะเลี้ยงให้ขยายในข้าวใหม่ พบว่าระยะเวลาการเติมข้าวในระหว่างการหมักได้สูงสุดถึง 10 วัน ซึ่งจะได้ปริมาณน้ำตาลข้าวใกล้เคียงกันทุกวัน โดยข้าวที่หมักด้วยชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 อย่างเดียวน้ำตาลจะเกิดขึ้นในวันที่ 2 และสูงสุดในวันที่ 5 ส่วนการทดลองที่หมักด้วยชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จะมีน้ำตาลเกิดขึ้นตั้งแต่วันแรกถึง 17.2 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่มากเท่าๆ กับวันอื่นๆ และปริมาณน้ำตาลข้าวจะสูงที่สุดในวันที่ 5 ถึง 30.7 มิลลิลิตร มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในช่วงวันแรกๆ สูงกว่าการหมักด้วยชิ้นเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 เพียงอย่างเดียว (23.5 องศาบริกซ์).

ผลการทดลองนำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวกลับมาใช้ซ้ำในข้าวสุกใหม่ปลอดเชื้อ เป็นผลการทดลองนำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวเจ้ากลับมาใช้ซ้ำในข้าวเจ้าสุกใหม่ปลอดเชื้อ พบว่าจากข้าวเจ้าสุก 500 กรัม ถูกย่อยไป 286 กรัม (57.2 เปอร์เซ็นต์) เหลือกากข้าวหมักเฉลี่ย 214 กรัม (42.8 เปอร์เซ็นต์) สามารถผลิตน้ำตาลข้าวได้เฉลี่ย 337 มิลลิลิตร และมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 23.5 องศาบริกซ์.

ผลการทดลองนำเอนไซม์จากน้ำตาลข้าวเหนียวกลับมาใช้ซ้ำในข้าวเหนียวสุกใหม่ปลอดเชื้อ พบว่าจากข้าวเหนียวสุก 500 กรัม ถูกย่อยไป 407 กรัม (81.4 เปอร์เซ็นต์) เหลือกากข้าวหมักเฉลี่ย 93 กรัม (18.6 เปอร์เซ็นต์) สามารถผลิตน้ำตาลข้าวได้เฉลี่ย 498 มิลลิลิตร และมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 37.5 องศาบริกซ์.

ผลการทดสอบเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าวเจ้าและนำเอนไซม์ในน้ำตาลข้าวกลับมาใช้ซ้ำ พบว่าเริ่มได้น้ำตาลข้าวในวันที่ 2 ของการหมัก และเก็บน้ำตาลข้าวทุกวันเริ่มตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 8 รวมกันได้ 4,242 มิลลิลิตร พบว่าน้ำตาลในส่วนที่ผ่าน Ultrafiltration membrane ที่แรงดันในช่วง 100-300 kPa ในส่วน (permeate) ที่เป็นน้ำตาลข้าว มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 23 องศาบริกซ์ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 552.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.

สำหรับผลการผลิตน้ำตาลจากข้าวเหนียว พบว่าเริ่มได้น้ำตาลข้าวเหนียวในวันที่ 1 ของการหมัก และเก็บน้ำตาลข้าวเหนียวทุกวันเริ่มตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 รวมกันได้ 6,300 มิลลิลิตร พบว่าน้ำตาลในส่วนที่ผ่าน Ultrafiltration membrane ที่แรงดันในช่วง 100-300 กิโลพาสคัล ในส่วน (permeate) ที่เป็นน้ำตาลข้าวเหนียว มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 38 องศาบริกซ์ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 875.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.

# 5. แนวทางการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การนำผลงานวิจัยของโครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตน้ำตาลความเข้มข้นสูงจากข้าวโดยใช้เทคโนโลยีเมมเบรนไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ซึ่งสามารถใช้ได้หลายกลุ่มอุตสาหกรรม เนื่องจากผลผลิตของโครงการมีทั้งองค์ความรู้ด้านกระบวนการผลิตและเครื่องผลิตน้ำตาล ซึ่งผู้ที่สนใจสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ ได้ดังนี้

**1. ผลผลิตของโครงการ**

1.1 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลจากข้าวโดยใช้เชื้อราในระบบการหมักแบบแยกน้ำตาลข้าว

1.2 กระบวนการผลิตน้ำตาลจากข้าวแบบต่อเนื่องและนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำ

1.3 ต้นแบบเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าวแบบต่อเนื่องและนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำ

**2. ผู้นำผลงานไปใช้ประโยชน์**

2.1 กลุ่มงานวิจัยที่ต้องการนำน้ำตาลจากข้าวไปเป็นวัตถุดิบในงานวิจัยแปรรูปข้าวเพื่อใช้ทางการแพทย์ เช่น การนำมอลโทสในน้ำตาลข้าวไปใช้ในการผลิตสารโอลิโกแซคคาร์ไรด์ และกลูโคสในน้ำตาลข้าวไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเส้นใยอาหารเสริมภูมิคุ้มกันและแบคทีเรียเซลลูโลสเพื่อใช้ทางการแพทย์

2.2 กลุ่มแม่บ้านหรือกลุ่มวิสาหกิจชุมชนผู้ผลิตน้ำตาลข้าว

2.3 กลุ่มผู้ผลิตน้ำส้มสายชู

2.4 โรงงานผลิตเครื่องดื่มหรืออาหารที่ใช้น้ำตาลหรือน้ำเชื่อมในอุตสาหกรรม

2.5 กลุ่มผู้ที่สนใจนำไปเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตอาหารเสริมหรือบำรุงสุขภาพ อื่นๆ เช่น อาหารเสริมสุขภาพพรีไบโอติก เป็นต้น

**3. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์**

**3.1 การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์** ซึ่งกลุ่มแม่บ้านหรือกลุ่มวิสาหกิจชุมชนผู้ผลิตน้ำตาลข้าว กลุ่มผู้ผลิตน้ำส้มสายชู โรงงานผลิตเครื่องดื่มหรืออาหารที่ใช้น้ำตาลหรือน้ำเชื่อมในอุตสาหกรรม กลุ่มผู้ที่สนใจนำไปเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตอาหารเสริมหรือบำรุงสุขภาพ อื่นๆ เช่น อาหารเสริมสุขภาพพรีไบโอติก เป็นต้น สามารถนำผลผลิตของโครงการไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตได้ เพื่อลดระยะเวลาในการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้ดีขึ้น

**3.2 การใช้ประโยชน์เชิงสังคม** กลุ่มแม่บ้านหรือกลุ่มวิสาหกิจชุมชนผู้ผลิตน้ำตาลข้าว สามารถนำไปใช้ขยายผลในชุมชนได้ เพื่อลดระยะเวลาในการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้ดีขึ้น

**3.3 การใช้ประโยชน์มิติสิ่งแวดล้อม** ผู้นำผลงานไปใช้ประโยชน์ในการผลิตน้ำตาลข้าว สามารถนำกากข้าวหมักที่เหลือไปเป็นอาหารสัตว์ได้ เพื่อเป็นการใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้ง

**4. ผลลัพธ์ของโครงการ (ประโยชน์ที่ได้รับ)**

4.1 ลดระยะเวลาในการผลิต

4.2 เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้ดีขึ้น

4.3 การใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้ง

**5. หน่วยงานที่จะนำไปต่อยอด**

สถาบันการศึกษา นักวิชาการ นักวิจัย เจ้าของโรงงานที่ต้องการนำน้ำตาลข้าวไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ.

# 6. ข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับกระบวนการผลิตน้ำตาลความเข้มข้นสูงจากข้าวโดยใช้เทคโนโลยีเมมเบรนในครั้งต่อไป เพื่อให้สามารถใช้เป็นแนวทางในการวิจัยในอนาคตให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น ควรมีข้อควรระวังดังนี้

1. ในขั้นตอนของกระบวนการผลิตน้ำตาลข้าว มีข้อที่พึงระวัง คือ เรื่องการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นในระหว่างการดำเนินการผลิต ซึ่งจะทำให้ได้ผลผลิตน้ำตาลต่ำและทำให้ไม่สามารถผลิตแบบต่อเนื่องได้ ดังนั้น ผู้วิจัยหรือผู้ผลิตต้องมีความระมัดระวังการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ ในทุกขั้นตอนของการผลิต

2. ในการผลิตแบบต่อเนื่อง วัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตต้องอยู่ในสภาพที่ปลอดเชื้อจึงจะส่งผลให้การผลิตน้ำตาลได้เปอร์เซ็นต์บริกซ์สูงและสามารถผลิตได้ในระยะเวลานาน

3. ในการวิจัยหรือการพัฒนาการสร้างเครื่องผลิตน้ำตาลจากข้าว ผู้ออกแบบเครื่องต้องให้ความสำคัญกับระบบการฆ่าเชื้อที่ทำให้อุปกรณ์ทุกพื้นที่และพื้นผิวภายในตัวเครื่องปลอดเชื้อได้ จึงจะสามารถผลิตน้ำตาลได้อย่างต่อเนื่องได้ดี

# 7. เอกสารอ้างอิง


Ahmad, Z. S. and Munaim, M. S. A., 2018. Response surface methodology based optimization of sorbitol production via solid state fermentation process engineering in agriculture. *Environment and Food*, **12**(2), pp. 150-154.

Astray, G., Gullón, B., Labidi, J. and Gullón, P., 2016. Comparison between developed models using response surface methodology (RSM) and artificial neural networks (ANNs) with the purpose to optimize oligosaccharide mixtures production from sugar beet pulp. *Industrial Crops and Products*, **92**, pp. 290-299.

Chinma, C. E., Ilowefah, M. and Muhammad, K., 2014. Optimization of rice bran fermentation conditions enhanced by baker's yeast for extraction of protein concentrate. *Nigerian Food Journal,* **32**(1), pp. 126-132.

Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K. M., Ramachandran, S., Ghosh, S., Szakacs, G. and Pandey, A., 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of **α**-amylase by Aspergillus oryzae. *Biochem Eng. J.,* **15**, pp. 107–115.

Klaithin, K., Khunajakr, N. and Wongwicharn, A., 2014. Hydrolysis of Low Grade Rice Starch by Commercial Enzyme Amylase. *Agricultural Sci J.,* **45**(2)(Suppl.), pp. 677-680.

Kudpeng, C., Soemphol, W. and Tanamool, V., 2016. Study on Production of Sato from Indigenous Rice Varieties in Nakhon Ratchasima. The National and International Graduate Research Conference, pp. 371-380.

Miller, G. L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry. 31. Washington, DC: American Chemical Society, pp. 426-428.

Qi, B., Luo, J., Chen, G., Chen, X. and Wan, Y., 2012. Application of ultrafiltration and nanofiltration for recycling cellulose and concentrating glucose from enzymatic hydrolyzate of steam exploded wheat straw. *Bioresource technology*, **104**, pp. 466-472.

Vasiee, A., Behbahani, B. A., Yazdi, F. T. and Moradi, S., 2016. Optimization of the production conditions of the lipase produced by Bacillus cereus from rice flour through Plackett-Burman Design (PBD) and response surface methodology (RSM). *Microbial Pathogenesis*, **101**, pp. 36-43.

Zain, M. M. and Mohammad, W. A., 2016. Clarification of Glucose from Cellulose Hydrolysate by Ultrafiltration with Polyethersulfone Membrane. *Internaional Journal of Biomass & Renewables*, **5**(1), pp. 14-18.