บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. จากการศึกษาผลของการใช้ช่วงคลื่นแสงต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง เปรียบเทียบกับการเก็บมันไว้ในที่ ๆ ไม่มีแสง พบว่าการเก็บมันสำปะหลังสดที่หั่นเป็นชิ้น ไว้ในที่ ๆ ไม่มีแสงเป็นเวลา 3 วัน ปริมาณไซยาไนด์ทั้ง 3 ชนิด คือ ไซยาไนด์ทั้งหมด ไซยาไนด์เกาะติด และไซยาไนด์อิสระ มีค่าขึ้นลงไม่เป็นระบบ ดังแสดงในกราฟที่ 1

เมื่อนำมันสำปะหลังที่หั่นเป็นชิ้นขนาด 3x4x2 ซม. ไปไว้ในที่ ๆ มีแสงสีเขียว ความยาวคลื่นประมาณ 500 นาโนเมตร เป็นเวลา 3 วัน จากกราฟที่ 2 พบว่าปริมาณไซยาไนด์ทั้ง 3 ชนิด มีค่าขึ้นลงไม่เป็นระบบเช่นกัน

การนำมันสำปะหลังที่หั่นแล้วขนาด 3x4x2 ซม. ไปไว้ในที่ ๆ มีแสงสีแดง ความยาวคลื่นประมาณ 700 นาโนเมตร เป็นเวลา 3 วัน พบว่าปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมด และไซยาไนด์เกาะติดมีค่าขึ้นลงโดยมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย ในขณะที่ปริมาณไซยาไนด์อิสระมีค่าขึ้นลงไม่แน่นอน ดังแสดงในกราฟที่ 3

การนำมันสำปะหลังที่หั่นแล้วขนาด 3x4x2 ซม. ไปไว้ในที่ ๆ มีแสงสีน้ำเงิน ความยาวคลื่นปริมาณ 380 นาโนเมตร เป็นเวลา 3 วัน พบว่า ปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมดมีค่าขึ้นลงอย่างไม่เป็นระบบ ปริมาณไซยาไนด์เกาะติดมีค่าขึ้นลง โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในขณะที่ปริมาณไซยาไนด์อิสระ มีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย ดังแสดงในกราฟที่ 4

เมื่อนำมันสำปะหลังที่หั่นแล้วขนาด 3x4x2 ซม. ไปไว้ในที่ ๆ มีแสงอุลตราไวโอเลต ความยาวคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร เป็นเวลา 3 วัน ผลการทดลองดังแสดงในกราฟที่ 5 พบว่าปริมาณไซยาไนด์ทั้ง 3 ชนิด มีค่าขึ้นลงไม่แน่นอน

นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้แสงสีแดง และแสงอุลตราไวโอเลต มีผลต่อการคายน้ำของหัวมันสำปะหลัง ทำให้ปริมาณความชื้นในเนื้อมันเพิ่มขึ้นจาก 55% เป็น 80% ในการใช้แสง

สีแดงเป็นเวลา 48 ช.ม. แสดงในกราฟที่ 3 และความยืนเพิ่มขึ้นจาก 55% เป็น 72% ในการใช้แสงอุลตราไวโอเลตเป็นเวลา 48 ช.ม. แสดงผลในกราฟที่ 5

2. ผลของการใช้แสงแดดต่อการเปลี่ยนแปลงไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง ได้ทำการทดลองใน 2 ระยะเวลา คือ ฤดูฝนในเดือน พฤษภาคม และฤดูร้อน ในเดือนมีนาคม

จากการทดลองในเดือนพฤษภาคม พบว่า อุณหภูมิเฉลี่ยที่ลานคอนกรีตเท่ากับ 32^{0}ซ. ปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมด, ไซยาไนด์เกาะติด และไซยาไนด์อิสระลดลง 57.74%, 27.71% และ 78.28% ตามลำดับ โดยที่ปริมาณความยืน ลดลงจาก 65% เป็น 50% ในเวลา 72 ช.ม. ดังแสดงในกราฟที่ 6

เมื่อทดลองตากมันบนลานคอนกรีตโดยวิธีเดียวกันในเดือนมีนาคม พบว่าอุณหภูมิเฉลี่ยที่ลานตากเท่ากับ 40^{0}ซ. ปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมด, ไซยาไนด์เกาะติด และไซยาไนด์อิสระลดลง 66.4%, 65.9% และ 67.9% ตามลำดับ ปริมาณความยืนลดลงจาก 66% เป็น 10.4% ในเวลา 72 ช.ม. แสดงผลในกราฟที่ 7 และเมื่อนำมันที่ตากแห้งแล้ว เก็บไว้ในที่ร่มเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าปริมาณไซยาไนด์ลดลงจากเมื่อตากแห้งใหม่ ๆ คือ ปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมด, ไซยาไนด์เกาะติด และไซยาไนด์อิสระลดลง 80.6%, 76.8% และ 95.0% ของปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลังก่อนที่จะนำมาผึ่งแดด โดยที่ปริมาณความยืนในเนื้อมันคงที่ที่ 10.4% (กราฟที่ 7)

3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง เมื่อนำไปอบในตู้อบที่ 50^{0}ซ. ดังวิธีการในข้อ 1.3.1 บทที่ 2 พบว่าในการอบเป็นเวลา 72 ช.ม. ปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมด, ไซยาไนด์เกาะติด และไซยาไนด์อิสระลดลง 61.84%, 71.48% และ 45.95% ตามลำดับ และปริมาณความยืนลดลงจาก 70% เป็น 4% (กราฟที่ 8)

4. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง เมื่อนำไปนึ่งด้วยไอน้ำที่ 100^{0}ซ. ดังวิธีในข้อ 1.3.2 บทที่ 2 พบว่าในเวลาการนึ่ง 5 นาที ไซยาไนด์อิสระลดลงอย่างรวดเร็ว เท่ากับ 81.4% ในขณะที่ไม่มีการลดปริมาณไซยาไนด์เกาะติด ส่วนไซยาไนด์ทั้งหมดลดลง 47.6% เมื่อนึ่งมันครบ 30 นาที ดังแสดงผลในกราฟที่ 9

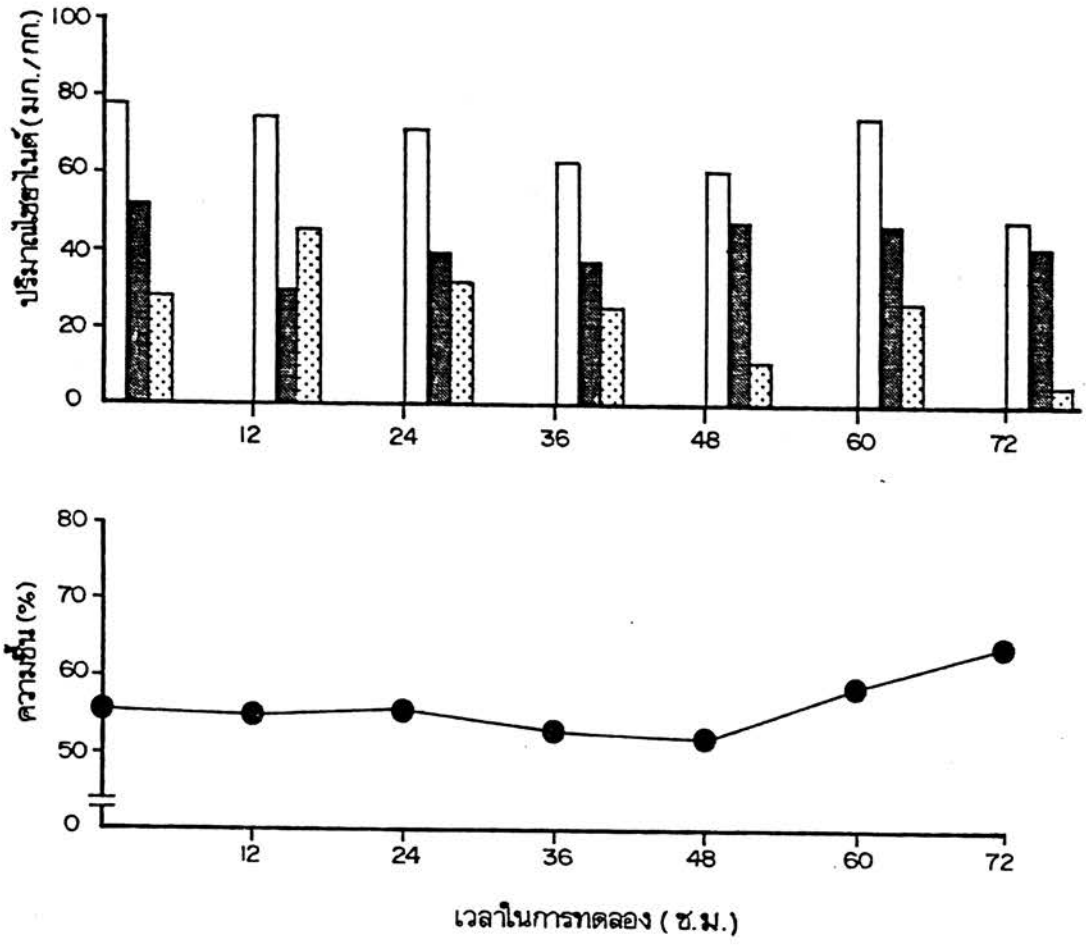
5. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลังโดยใช้กระบวนการโดยทำการทดลองตามวิธีในข้อ 1.4 บทที่ 2 โดยนำมันที่ตากแห้ง และเก็บไว้เป็นเวลา 1 เดือน ซึ่งมีปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมด, ไซยาไนด์เกาะติด และไซยาไนด์อิสระเท่ากับ 121, 113 และ 7.6 มก./กก. ตามลำดับ มาแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง 30^0ซ. เป็นเวลา 90 นาที จะมีปริมาณน้ำที่ถูกดูดซับ 52.4% โดยน้ำหนักเปียก ดังแสดงผลในกราฟที่ 10 และมีปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมด และไซยาไนด์เกาะติดลดลง 46.2% และ 47.13% ของปริมาณไซยาไนด์ในมันตากแห้งก่อนแช่น้ำ โดยที่ปริมาณไซยาไนด์อิสระค่อนข้างคงที่ ในปริมาณน้อยมากเพียง 7.4 มก./กก. (กราฟที่ 11)

6. การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง เมื่อนำไปหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ในสภาพต่าง ๆ กัน

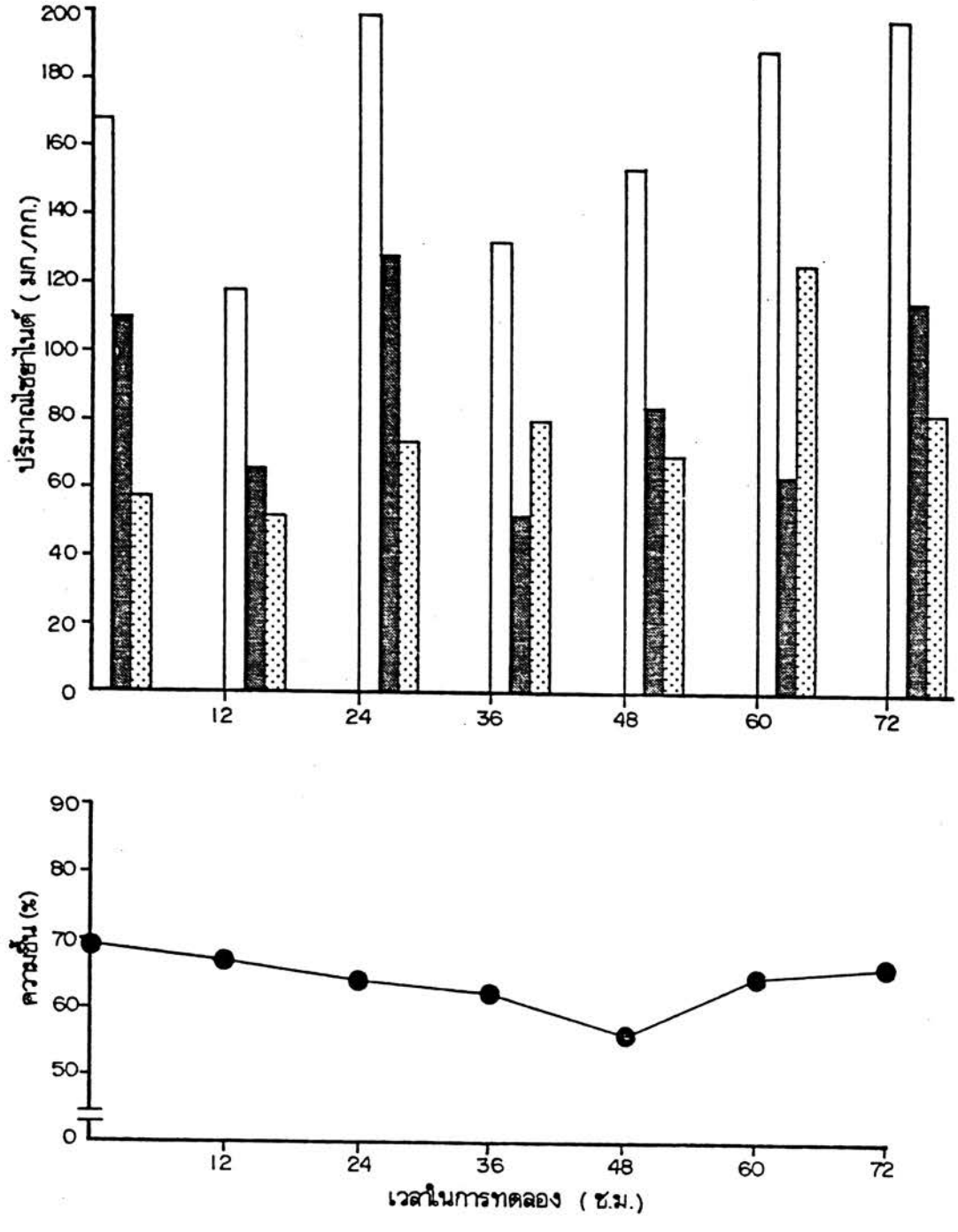
6.1 การหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติแบบกึ่งไร้อากาศ ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 1.5 บทที่ 2 พบว่า การหมักวิธีนี้จะทำให้ไซยาไนด์เกาะติดถูกเปลี่ยนเป็นไซยาไนด์อิสระอย่างรวดเร็วในวันที่ 6-8 ของการหมัก และเปลี่ยนเป็นไซยาไนด์อิสระหมดในวันที่ 8 ของการหมักโดยที่ไซยาไนด์อิสระนี้ยังคงอยู่ในยื้นมันสำปะหลังหมัก เมื่อหมักครบ 12 วัน ดังแสดงผลในกราฟที่ 12

ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในมันสำปะหลังแบบกึ่งไร้อากาศนี้ พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนมากที่สุดคือ 10^9 เซล/กรัม ของมันหมัก และมีจำนวนค่อนข้างคงที่ตลอดการหมัก ดังแสดงในกราฟที่ 16 พบว่ายีสต์ และ Geotrichum sp. เพิ่มจำนวนขึ้นจาก 10^4 เซล/กรัม ในวันที่ 1 เป็น 10^7 เซล/กรัม ในวันที่ 5 ของการหมัก สำหรับแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกมีปริมาณมากเท่ากับ 10^5 เซล/กรัม ในวันที่ 1 แล้วลดจำนวนลงในวันที่ 2 ของการหมัก ความเป็นกรดด่างของมันสำปะหลังหมักลดลงจาก 6.2 ในวันที่ 0 เป็น 3.5 ในวันที่ 3 ของการหมัก (กราฟที่ 13)

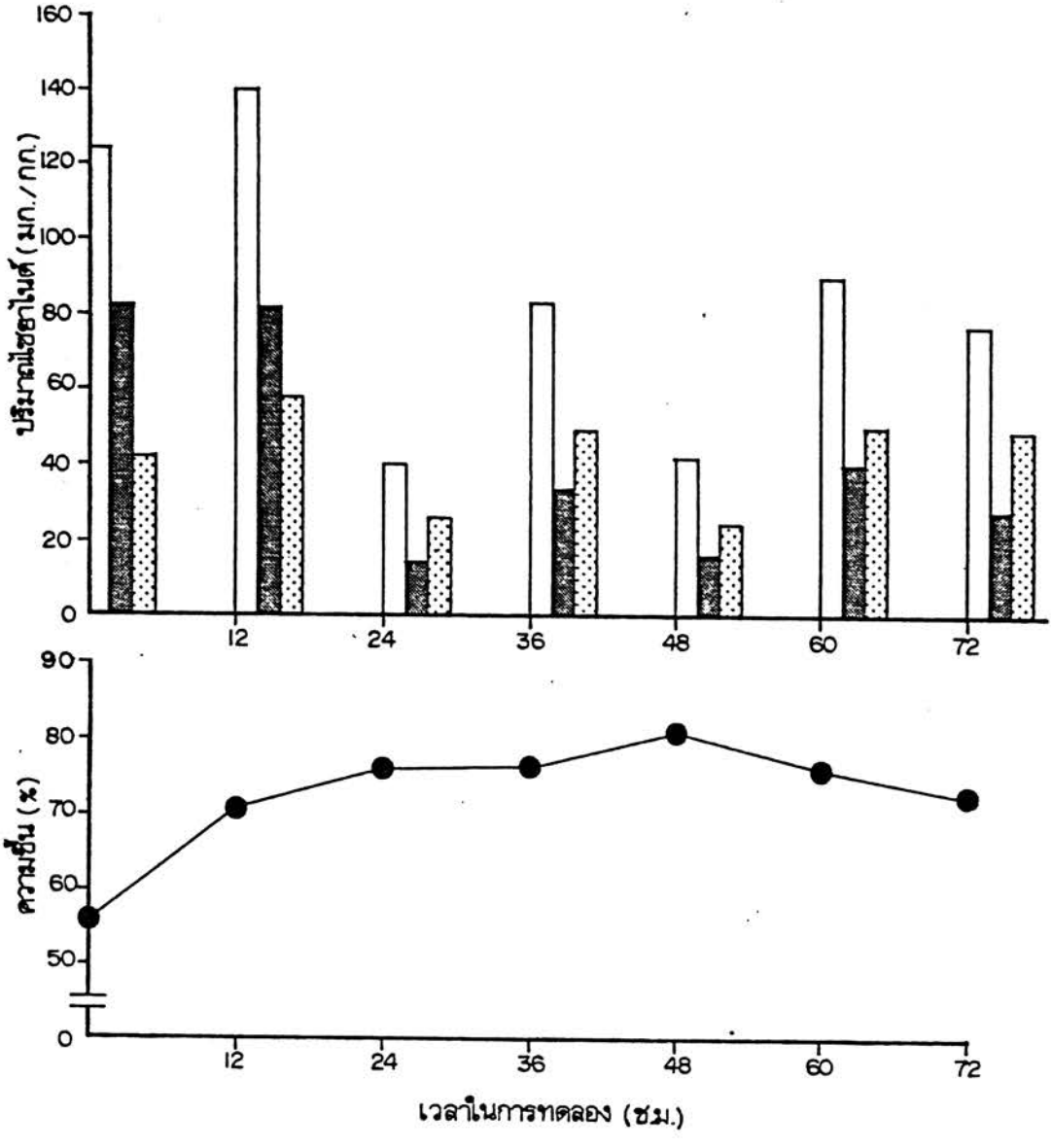
6.2 การหมักมันสำปะหลังแบบมีอากาศโดยใช้เชื้อธรรมชาติตามวิธีในข้อ 1.6 บทที่ 2 พบว่า การหมักวิธีนี้ทำให้มันสำปะหลังเน่าเสียในเวลาเพียง 4 วัน



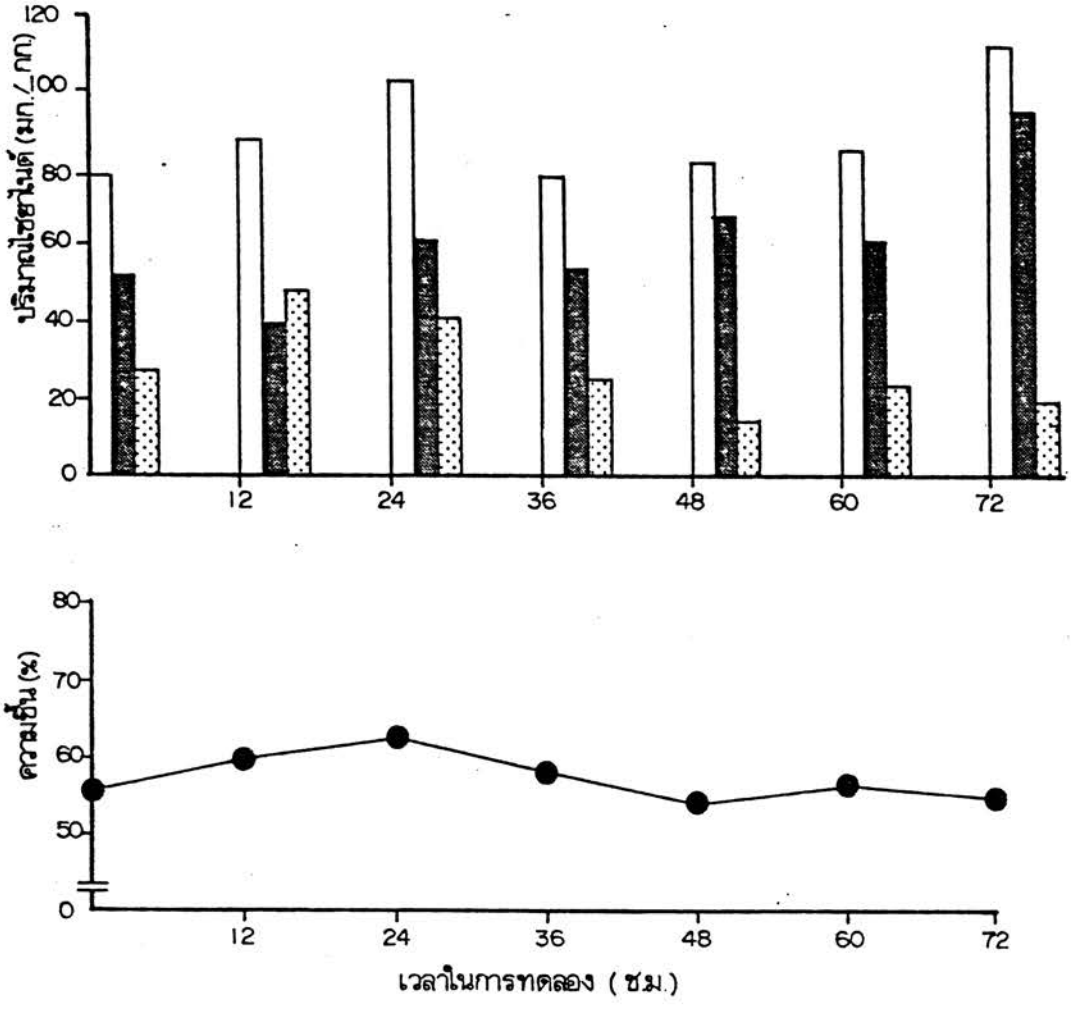
กราฟที่ 1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไซยาไนด์ทั้ง 3 ชนิด และปริมาณความยืน ในมันสำปะหลังสด หั่นทั้งเปลือก ขนาด 3 x 4 x 2 ซม. เมื่อเก็บไว้ในที่ ๆ ไม่มีแสงสว่าง เป็นเวลา 72 ชม. ☐ ไซยาไนด์ทั้งหมด, ■ ไซยาไนด์ เกาะติด, ⁘ ไซยาไนด์อิสระ, ●—● ความยืน



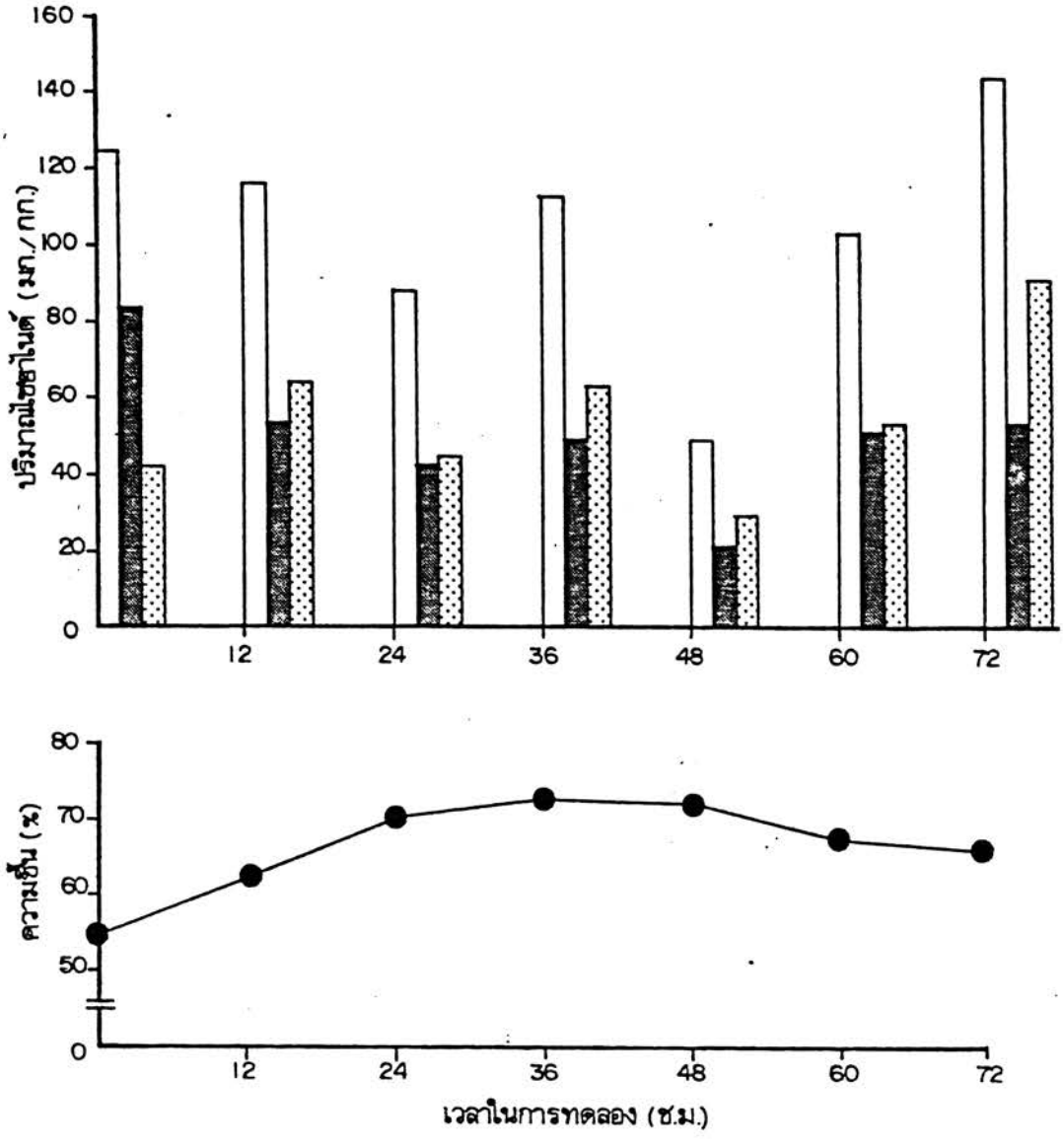
กราฟที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไซยาไนด์ทั้ง 3ชนิด และปริมาณความยืน ในมันสำปะหลัง หั่นทั้งเปลือกขนาด 3 x 4 x 2 ซม. เก็บไว้ในช่วงแล่งลีเยียวเป็นเวลา 72 ชม. ☐ ไซยาไนด์ทั้งหมด, ▩ ไซยาไนด์เกาะติด, ⁘ ไซยาไนด์อิสระ, ●—● ความยืน



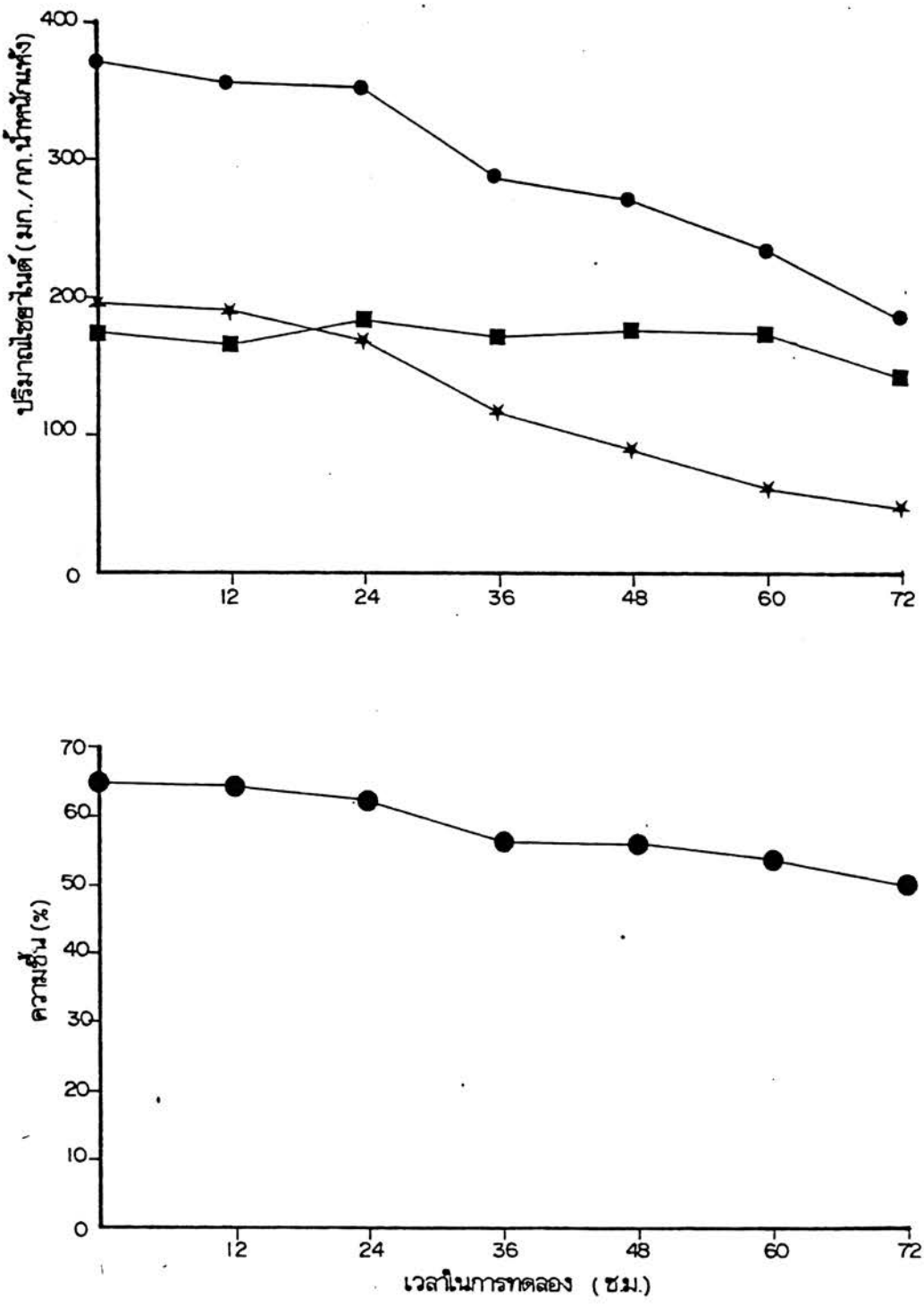
กราฟที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ 3 ชนิด และความยืน ในมันสำปะหลังสด หั่นทั้งเปลือกยนาด 3 x 4 x 2 ซม. เก็บไว้ในช่วงแสงสีแดงเป็นเวลา 72 ชม. ▯ ไซยาไนด์ทั้งหมด, ▮ ไซยาไนด์เกาะติด, ⁘ ไซยาไนด์อิสระ, ●—● ความยืน



กราฟที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ 3 ชนิด และปริมาณความยืน ในมันสำปะหลังสด หั่นทั้งเปลือกขนาด 3x4x2 ซ.ม เก็บไว้ในบ่วงแล่งสีน้ำเงิน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง □ : ไซยาไนด์ทั้งหมด, ▓ : ไซยาไนด์เกาะติด, ⁘ : ไซยาไนด์อิสระ, ●—● : ความยืน

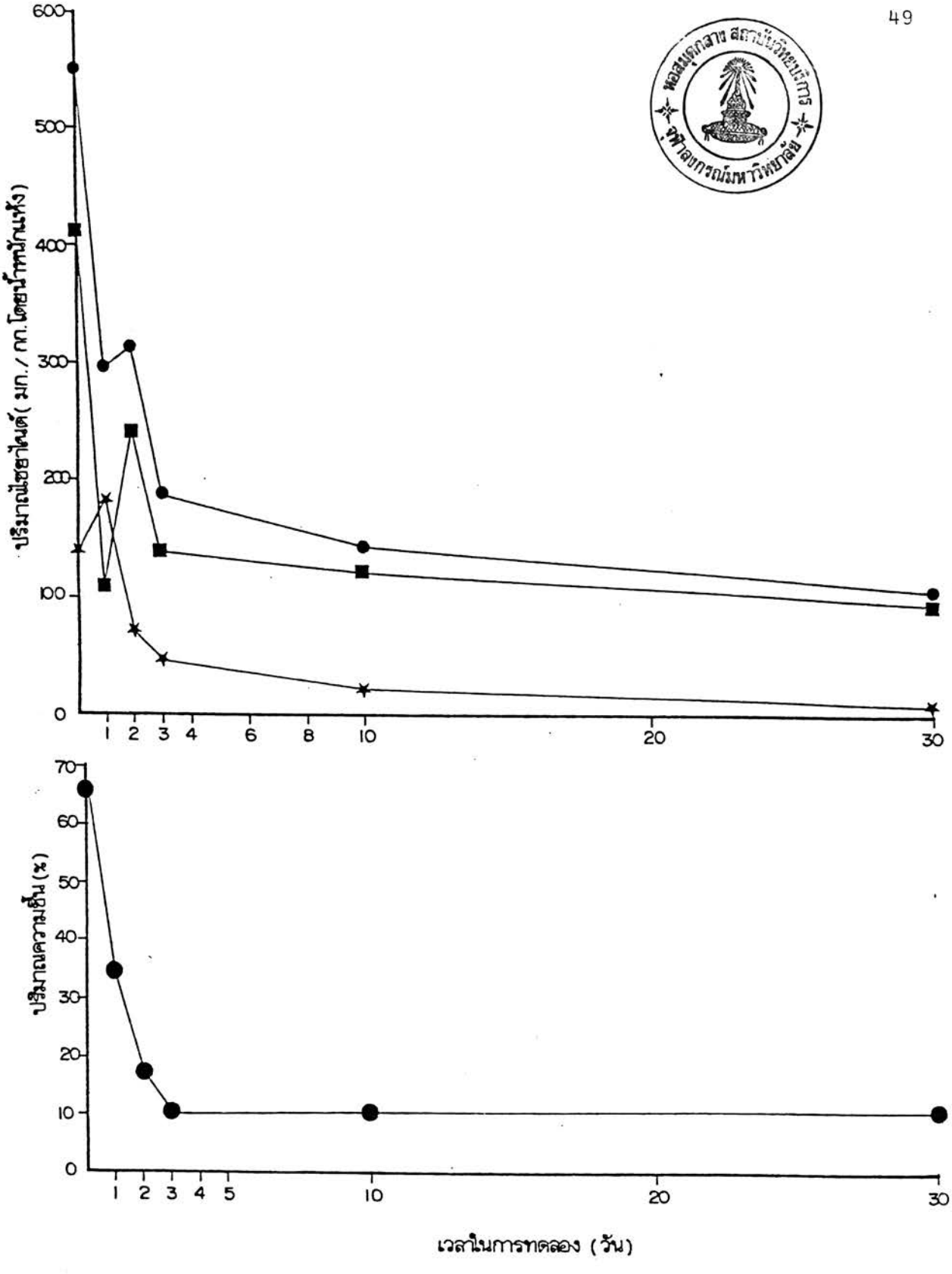


กราฟที่ 5 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ 3 ชนิด และปริมาณความชื้นในมันสำปะหลังสด หั่นทั้งเปลือกขนาด 3x4x2 ซ.ม เก็บไว้ในห้องแสง U.V. เป็นเวลา 72 ช.ม □ : ไซยาไนด์ทั้งหมด, ■ : ไซยาไนด์เกาะติด, ▨ : ไซยาไนด์อิสระ, ●—● : ความชื้น



กราฟที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ 3 ชนิด และความยื้นในมันสำปะหลังสด หั่นทั้งเปลือกขนาด 3x4x2 ซ.ม. ผึ่งแดดบนลานคอนกรีตเป็นเวลา 3 วัน ในเดือนพฤษภาคม ความยื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 77.2% (ตารางในภาคผนวกข้อ 2)
อุณหภูมิเฉลี่ยที่ลานตากเท่ากับ 32°ซ. ●-●: ไซยาไนด์ทั้งหมด, ■-■: ไซยาไนด์เกาะติด, ✶-✶ : ไซยาไนด์อิสระ, ●-●: ความยื้น

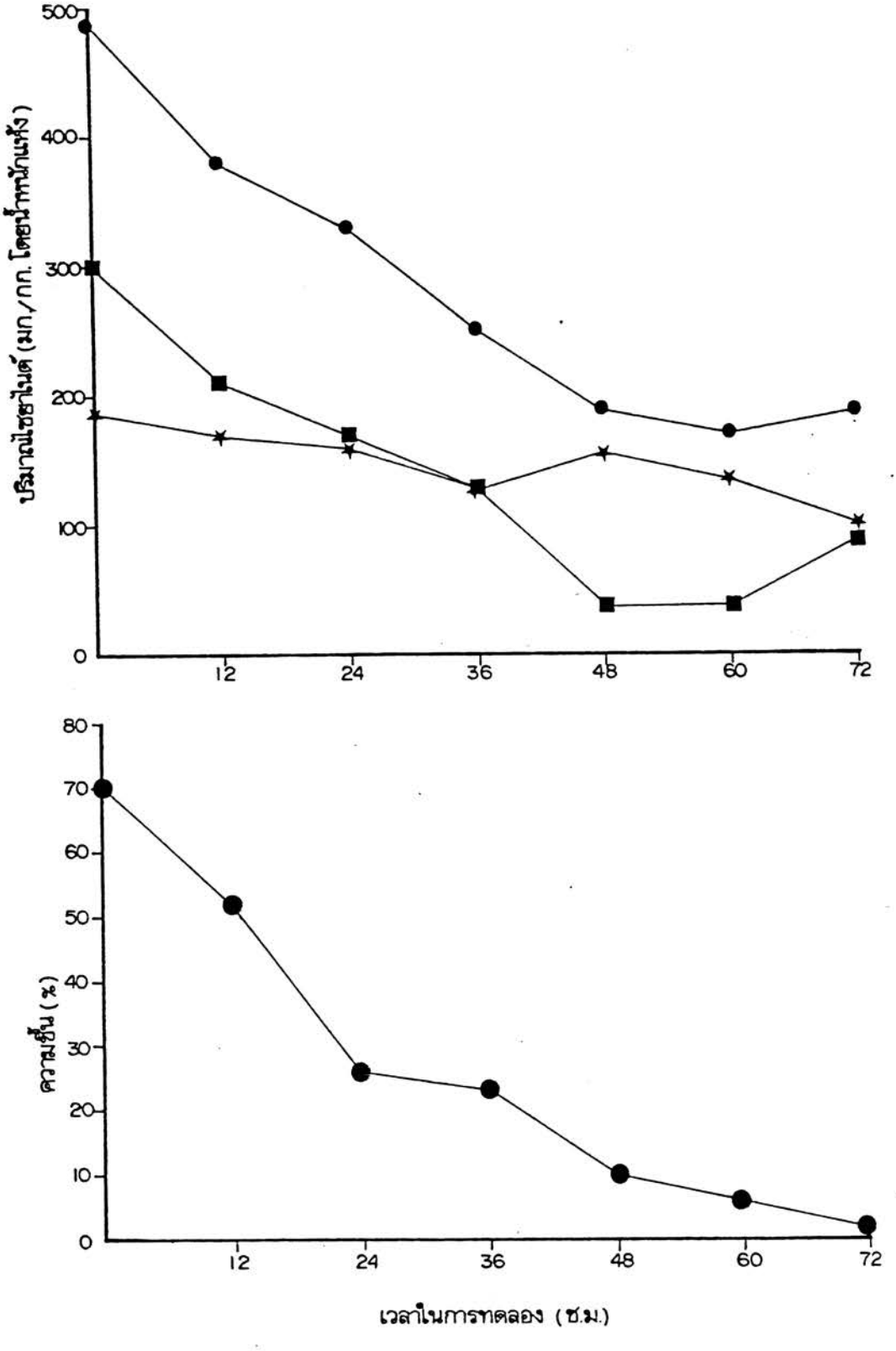
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



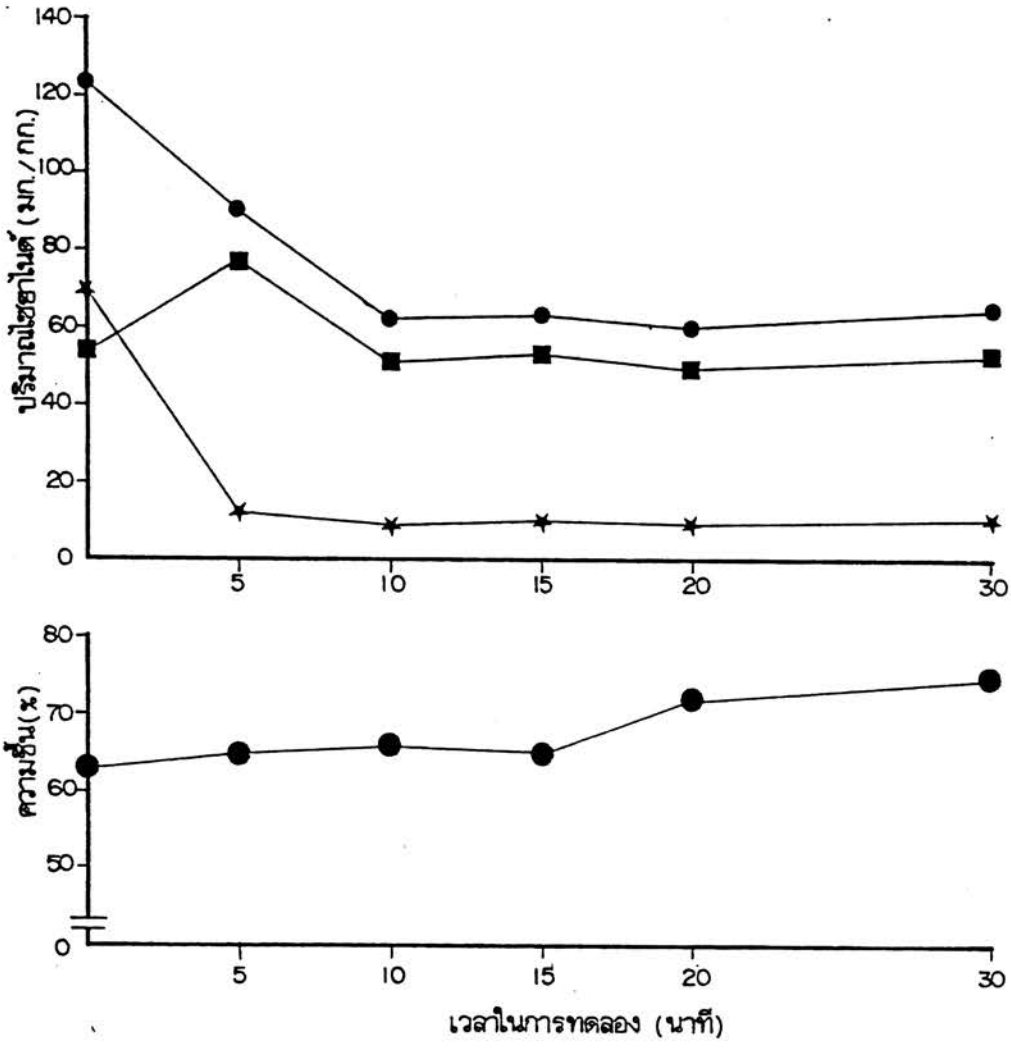
กราฟที่ 7 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ 3 ชนิด และปริมาณความยืนในมันสำปะหลังสด หั่นทั้งเปลือกขนาด 3x4x2 ซ.ม. ผึ่งแดดบนลานคอนกรีตเป็นเวลา 3 วัน ในเดือนมีนาคม ความยืนสัมพัทธ์เฉลี่ย 67.0% (ตารางในภาคผนวกข้อ 3) อุณหภูมิเฉลี่ยที่ลานคอนกรีตเท่ากับ 40°ซ. และเก็บไว้ในที่ร่มเป็นเวลา 30 วัน

●—● : ไซยาไนด์ทั้งหมด, ■—■ : ไซยาไนด์เกาะติด, ✶—✶ : ไซยาไนด์อิสระ

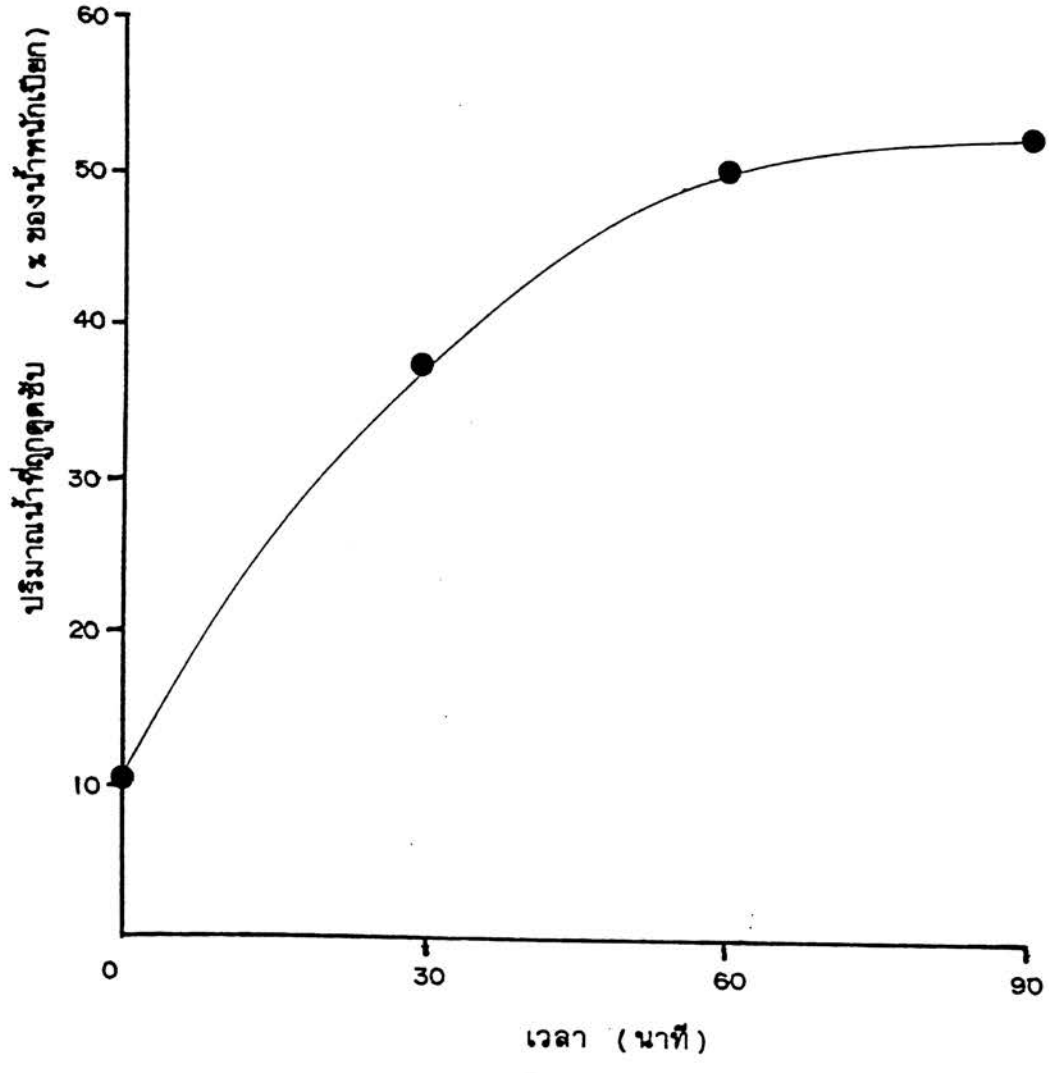
●—● : ความยืน



กราฟที่ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ 3 ชนิด และปริมาณความชื้นในมันสำปะหลังสด หั่นทั้งเปลือกขนาด 3 x 4 x 2 ซม. อบในตู้อบที่มีพัดลม ที่อุณหภูมิ 50^{0}ซ เป็นเวลา 72 ชม. ●—● ไซยาไนด์ทั้งหมด, ■—■ ไซยาไนด์เกาะติด, ✶—✶ ไซยาไนด์อิสระ, ●—● ความชื้น

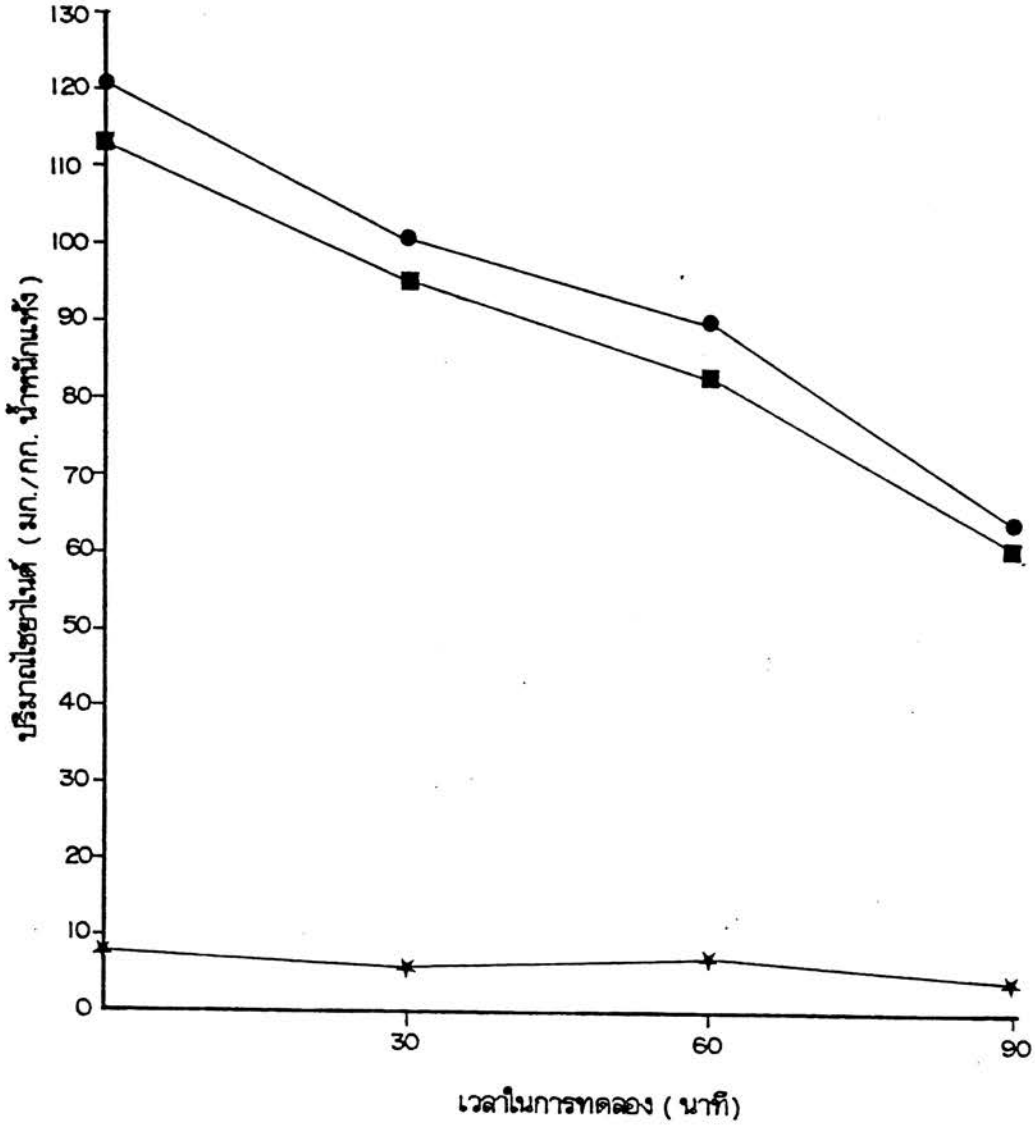


กราฟที่ 9 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ 3 ชนิด และความชื้น ในมันสำปะหลังสด หั่นทั้งเปลือกขนาด 3 x 4 x 2 ซม. นึ่งด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 100^0ซ เป็นเวลา 30 นาที, ●—● ไซยาไนด์ทั้งหมด, ■—■ ไซยาไนด์เกาะติด, ✶—✶ ไซยาไนด์อิสระ, ●—● ความชื้น

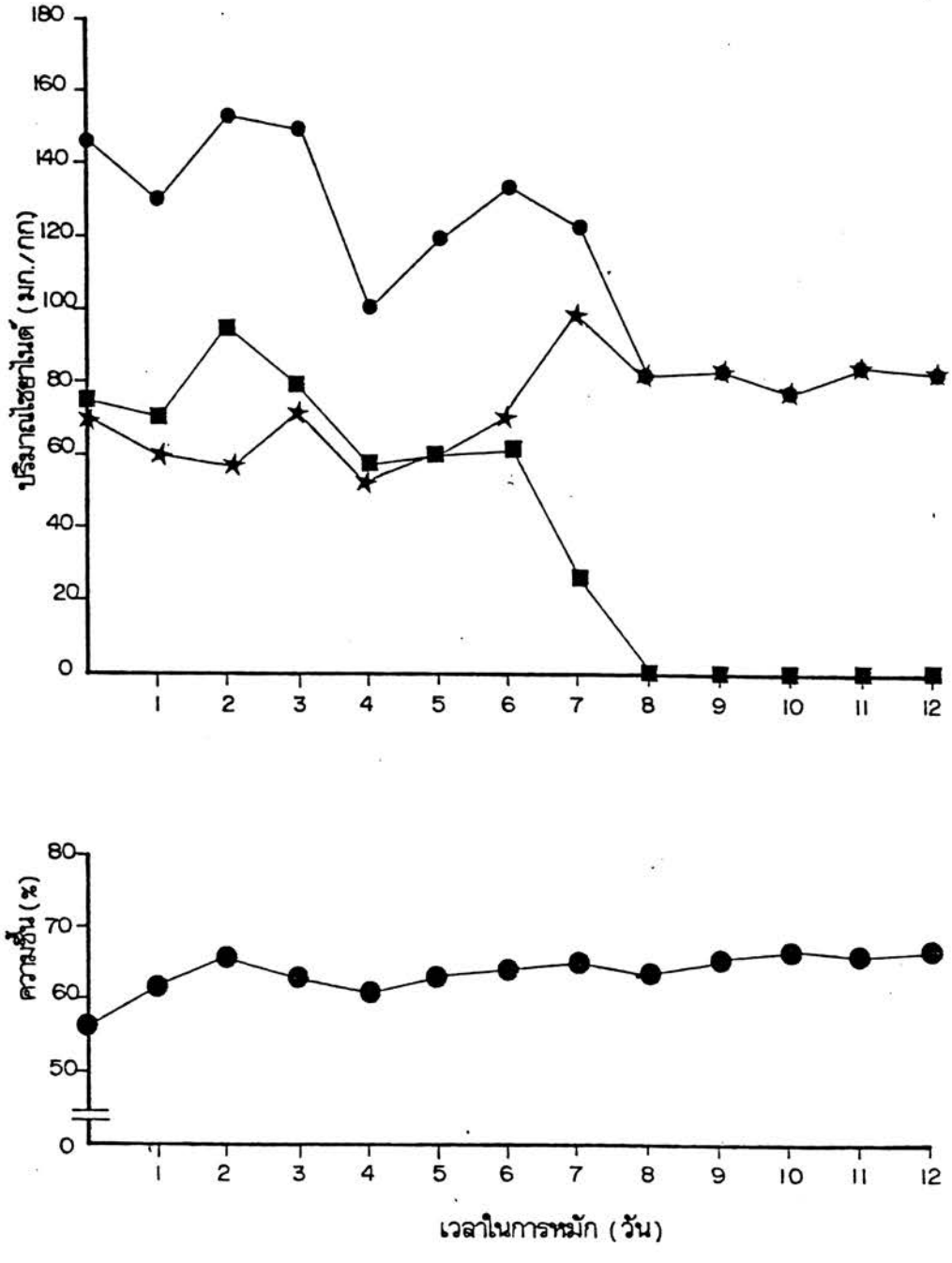


กราฟที่ 10 แสดงปริมาณน้ำที่ถูกดูดซับในยิ้นมันเส้นที่ผึ่งแดดจนแห้ง แล้วนำมาแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง 30 °ซ. เป็นเวลา 90 นาที

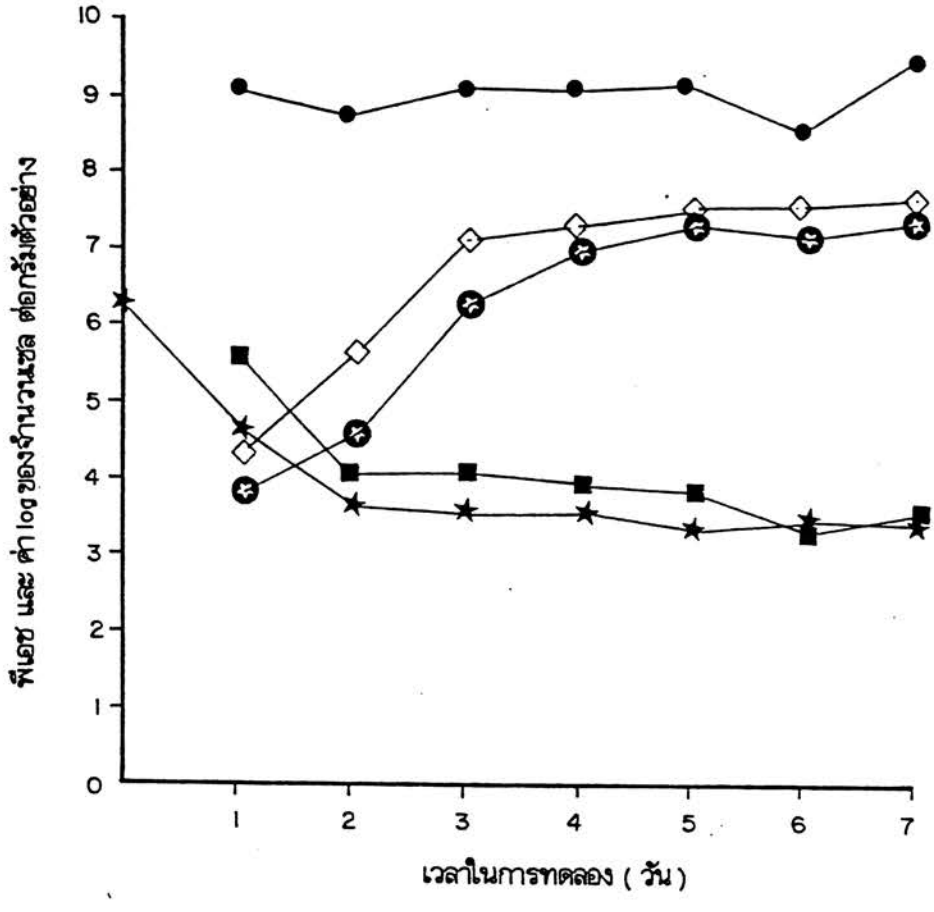
●—● ปริมาณน้ำที่ถูกดูดซับ



กราฟที่. 11 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ทั้ง 3 ชนิดในมันเส้นตากแห้ง เมื่อนำมันแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที ●—● ไซยาไนด์ทั้งหมด, ■—■ ไซยาไนด์เกาะติด, ✶—✶ ไซยาไนด์อิสระ



กราฟที่ 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ 3 ชนิด และความยืนในมันสำปะหลังสด หั่นทั้งเปลือกขนาด 3 x 4 x 2 ซม. หมักแบบกึ่งไร้อากาศ (Microaerophilic fermentation) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 วัน ●—● ไซยาไนด์ทั้งหมด, ■—■ ไซยาไนด์เกาะติด, ✶—✶ ไซยาไนด์อิสระ, ●—● ความยืน



กราฟที่ 13 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ต่าง ๆ และพีเอช
ในมันสำปะหลังสดหมักแบบกึ่งไร้อากาศ เป็นเวลา 7 วัน
●—● แบคทีเรียทั้งหมด, ◇—◇ Geotrichum sp.,
✪—✪ ยีสต์, ■—■ แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก,
✶—✶ พีเอชของมันหมัก

7. การศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของ Cephalosporium eichhorniae ต่อการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบและความทนต่อไซยาไนด์

7.1 ความสามารถของ C.eichhorniae ในการใช้แป้งมันสำปะหลังที่อบฆ่าเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอน ทำตามวิธีในข้อ 5.2.1 บทที่ 2 พบว่าเชื้อรานี้เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งดิบเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่สร้างบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงในรูปที่ 3

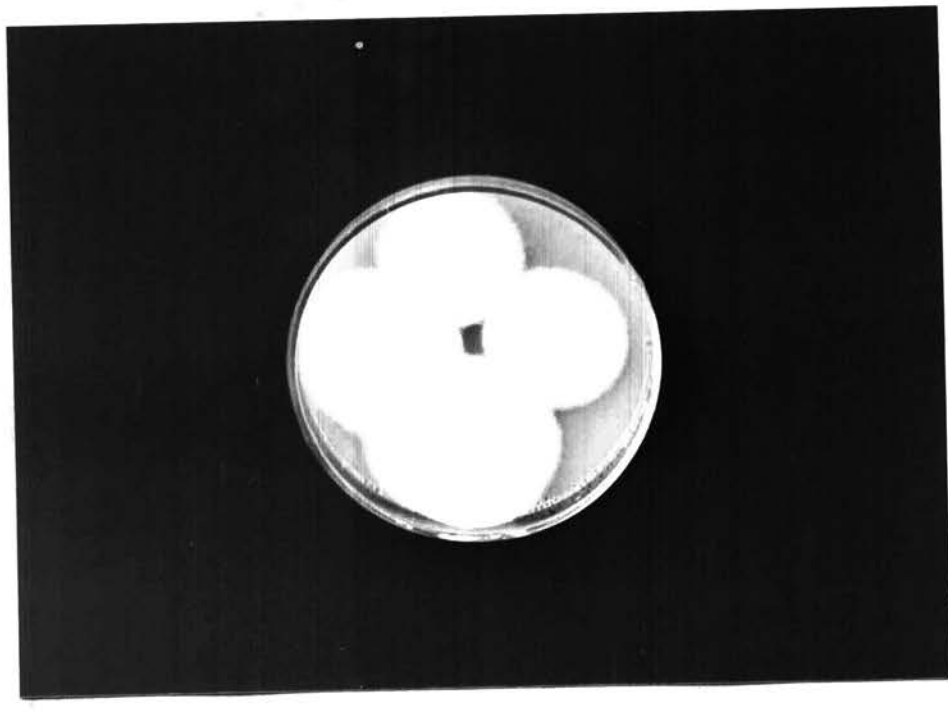
7.2 ความทนต่อไซยาไนด์ของ C.eichhorniae ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 5.2.2 บทที่ 2 พบว่า เชื้อราชนิดนี้ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่มีโปแตสเซียม-ไซยาไนด์อยู่ในปริมาณสูงกว่าหรือเท่ากับ 20 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ดังแสดงในรูปที่ 4

8. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ C.eichhorniae บนอาหารแข็งมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ (inoculum)

8.1 เป็นการทดลองหาวัตถุดิบชนิดที่เหมาะสมในการหมักหัวเชื้อเพื่อใช้ในการเพิ่มโปรตีน โดยใช้มันสำปะหลังสด, มันเส้น และกากมันมาทดลองเลี้ยงเชื้อ C.eichhorniae ตามวิธีในข้อ 6.1 บทที่ 2 พบว่าเชื้อรานี้ไม่เจริญในอาหารที่ทำจากมันสำปะหลังสด และมันเส้นอายุ 1 เดือน ดังรูปที่ 5 เมื่อใช้อาหารที่ทำจากมันเส้นอายุ 1 ปี และกากมัน พบว่าเชื้อราเจริญได้ดี ดังแสดงในกราฟที่ 14 และ 15

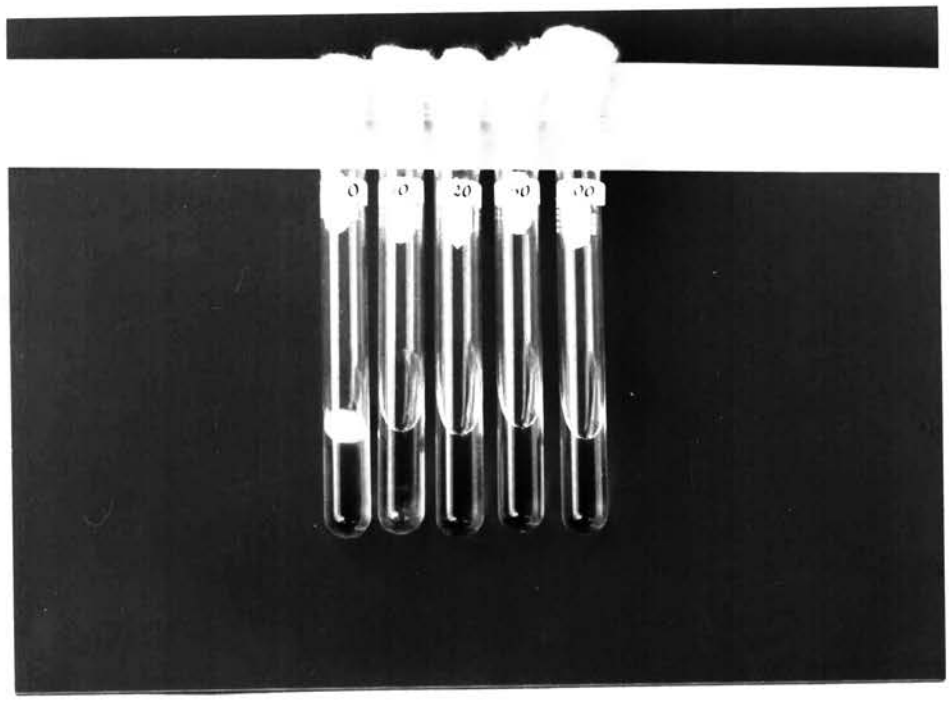
ในอาหารที่ประกอบด้วยมันเส้นอายุ 1 ปี : รำข้าว : แกสบ ในอัตราส่วน 12 : 2 : 1 เมื่อใช้ความชื้นต่าง ๆ พบว่า เชื้อจะเจริญและสร้างโปรตีนได้ดีที่สุดที่ปริมาณอาหาร : น้ำเป็น 1:1.1 ดังแสดงในกราฟที่ 14 และพบว่าในอาหารแข็งที่ทำจากกากมัน เชื้อจะสร้างโปรตีนได้ดีที่ปริมาณอาหาร : น้ำ เป็น 1:1.7-1:2.1 ดังแสดงในกราฟที่ 15

นอกจากนี้ ยังพบว่า เชื้อ C.eichhorniae เป็น homothallic fungi เมื่อเจริญอาหารกากมันที่มีปริมาณอาหาร : น้ำ เป็น 1:1.9 บ่มที่ 45^{0}ซ. เป็นเวลา 4 วัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน เชื้อจะสร้างแอสคัส (ascus) และแอสโคสปอร์ (ascospore) ลักษณะของสปอร์, แอสคัส และแอสโคสปอร์ ดังแสดงในรูปที่ 6, 7 และ 8

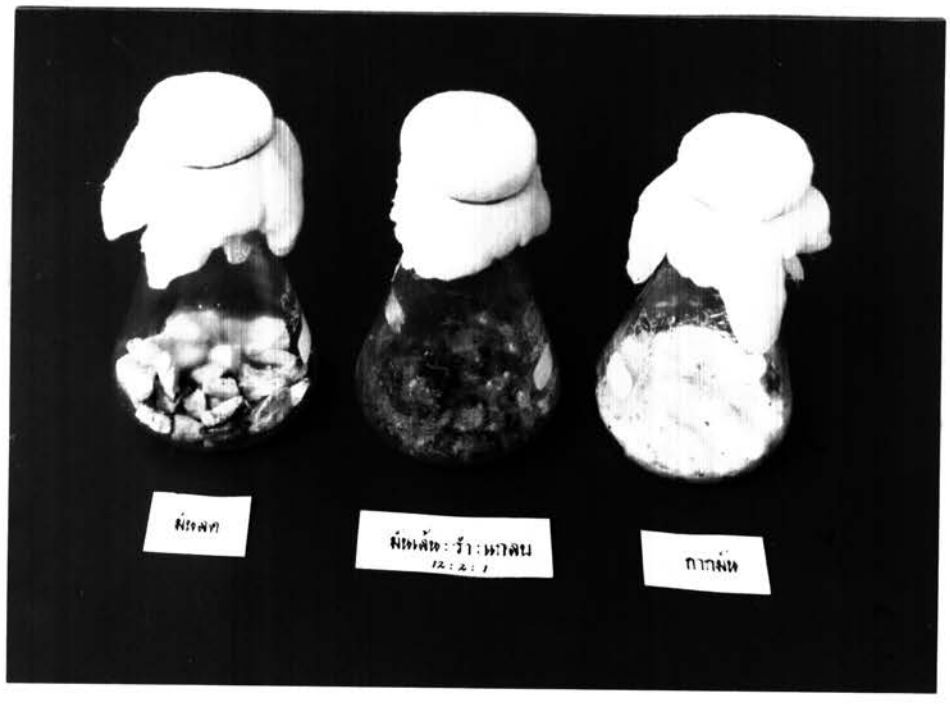


หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

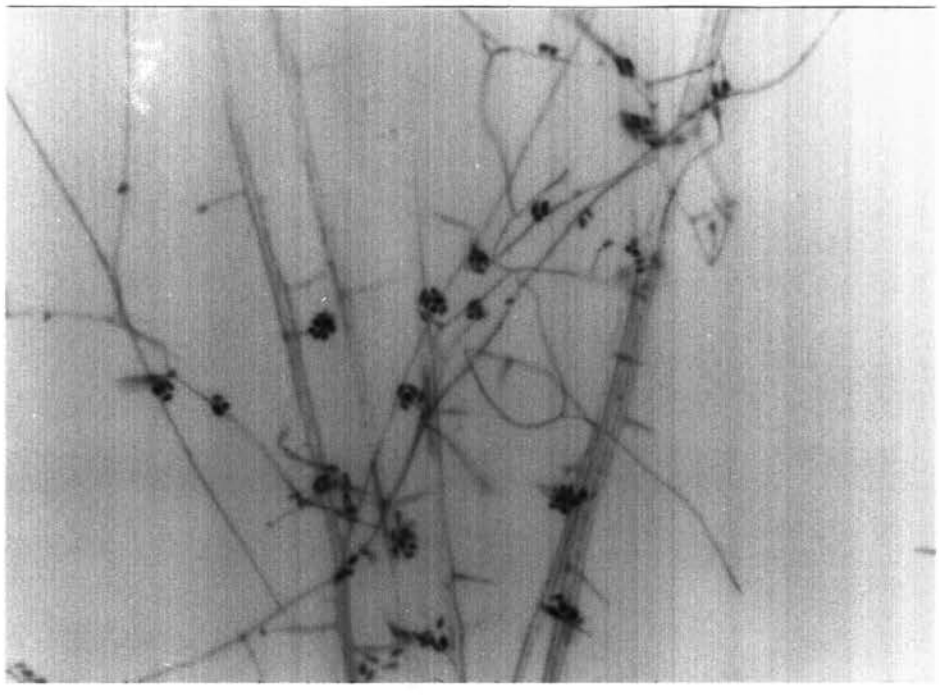
รูปที่ 3 แสดงการเจริญของ C.eichhorniae บนวุ้นอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบเป็นแหล่งคาร์บอน



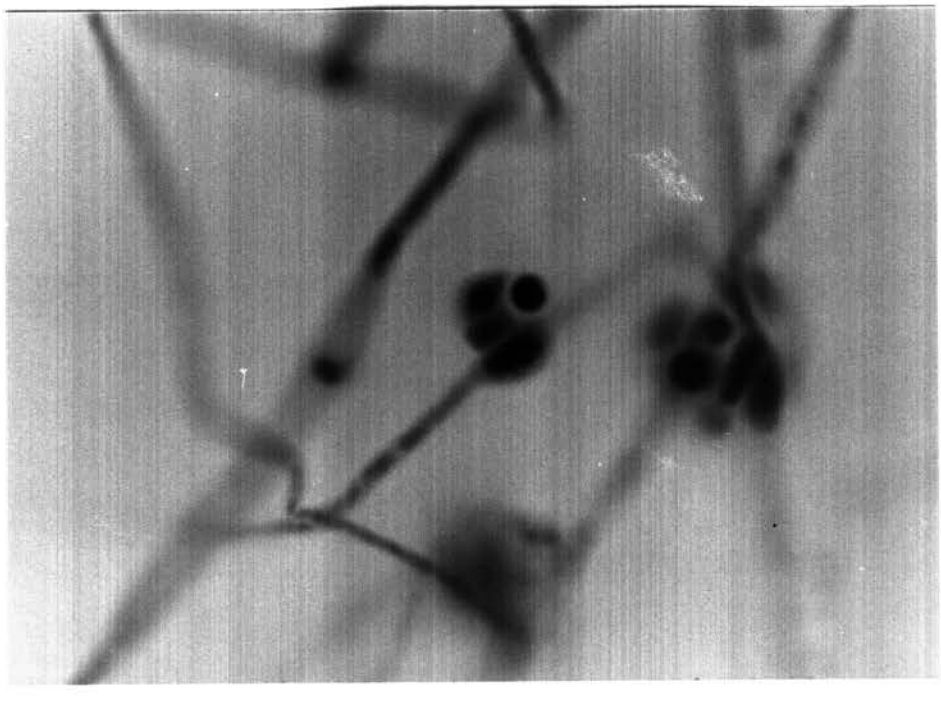
รูปที่ 4 แสดงการเจริญของ C.eichhorniae ใส่อาหารเหลวมันฝรั่งที่มีโปแตสเซียมไซยาไนด์ 0, 10, 20, 50, 100 ส่วนในล้านส่วน (ppm) บ่มที่ 45^{0}ซ. เป็นเวลา 49 ช.ม.



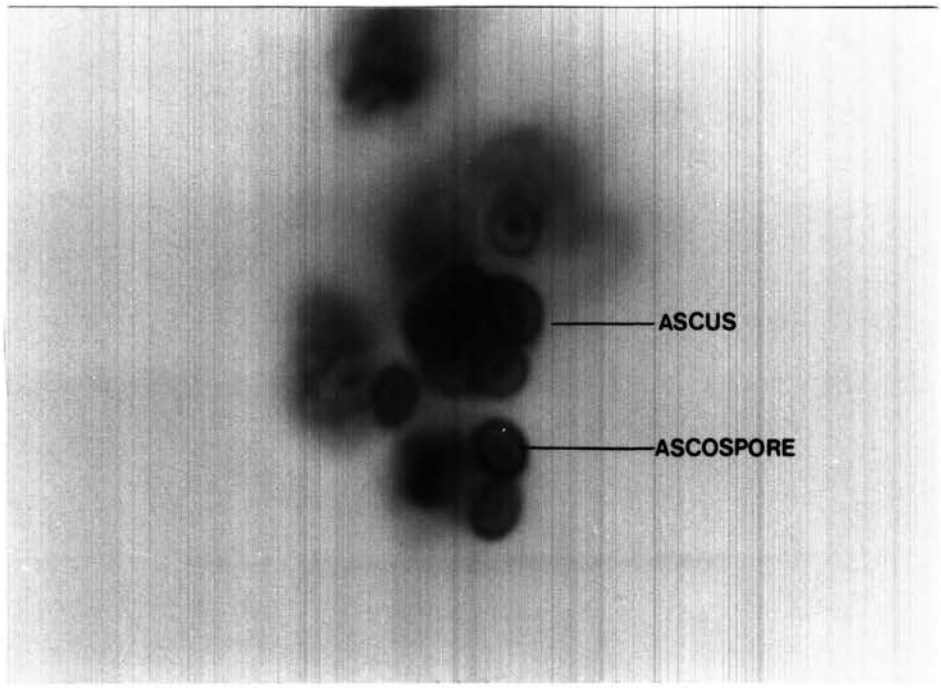
รูปที่ 5 แสดงการเจริญของ C.eichhorniae ในอาหารแข็งมันสำปะหลังสด, มันเส้น : รำ : แกลบ 12:2:1, และกากมัน



รูปที่ 6 แสดงโคนิเดียของ C.eichhorniae (กำลังขยาย 400 เท่า)



รูปที่ 7 แสดงโคนิเดีย และสปอร์ของ C.eichhorniae (กำลังขยาย 1,000 เท่า)



รูปที่ 8 แสดงแอสคัสและแอสโคสปอร์ของ C.eichhorniae (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

8.2 ปริมาณอาหาร : น้ำ ในอาหารกากมันที่เหมาะสม พบว่าปริมาณอาหาร : น้ำ ที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีนของเชื้อรานี้คือ 1:1.9 โดยสร้างลอรี่โปรตีน 1.5% และมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.42% ในเวลา 4 วันของการเจริญดังแสดงในกราฟที่ 15

8.3 ระยะเวลาการนึ่งอาหารที่เหมาะสมทำการทดลองตามวิธีในข้อ 6.3 บทที่ 2 ผลการทดลองแสดงในกราฟที่ 16 พบว่า การนึ่งอาหารเป็นเวลา 15 นาที เชื้อจะสร้างลอรี่โปรตีน 1.45% ส่วนการนึ่งที่ใช้เวลา 30, 45, และ 60 นาที เชื้อจะสร้างโปรตีนได้ประมาณ 1% ในเวลาการเจริญ 4 วัน

8.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีน เมื่อทำการทดลองตามวิธีในข้อ 6.4 บทที่ 2 พบว่าเชื้อรา C.eichhorniae จะสร้างโปรตีนได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 40-45^{0}ซ. โดยสร้างลอรี่โปรตีน 1.65% ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 45^{0}ซ. ผลการทดลองแสดงในกราฟที่ 17 พบว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40^{0}ซ. เชื้อจะสร้างลอรี่โปรตีนเพียง 1.0-1.1% และที่อุณหภูมิ 55^{0}ซ. เชื้อสร้างลอรี่โปรตีนได้เพียง 0.45%

8.5 ความเป็นกรดด่างของอาหาร ทดลองตามวิธีในข้อ 6.5 บทที่ 6 พบว่า ความเป็นกรดด่างของอาหารที่เชื้อรานี้จะสร้างโปรตีนได้ดีอยู่ในช่วงระหว่างพีเอช 3.5-6 โดยมีพีเอชของอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีนได้สูงที่สุดเท่ากับ 3.5 ผลการทดลองแสดงในกราฟที่ 18

8.6 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีน โดยแบ่งแหล่งไนโตรเจนเป็น 2 ประเภทคือ

อนินทรีย์ไนโตรเจนเป็นปุ๋ยเคมีคือ ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต และปุ๋ยโปแตสเซียมไนเตรต

อินทรีย์ไนโตรเจนคือ รำข้าว และปุ๋ยยูเรีย

เมื่อทดลองตามวิธีการในข้อ 6.6 บทที่ 2 พบว่าการใช้ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5% ของน้ำหนักแห้ง สามารถทำให้เชื้อราสร้างโปรตีนได้ดีที่สุดคือ ในการหมักเป็นเวลา

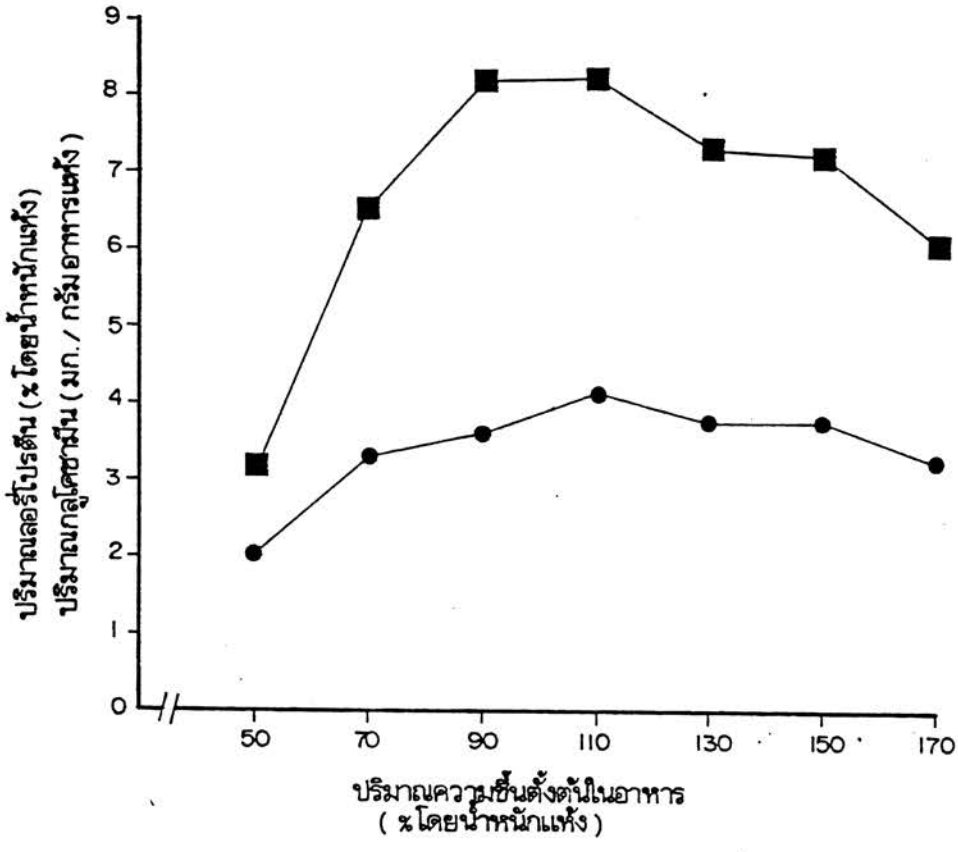
4 วัน เชื้อสร้างลอรี่โปรตีน 3.25% เมื่อใช้ปุ๋ยโปแตสเซียมไนเตรต 1.0-2.0% เชื้อสร้างลอรี่โปรตีนได้เพียง 1.3-1.5% ผลการทดลองแสดงในกราฟที่ 19 การใช้ปุ๋ยยูเรีย 1.5% ทำให้เชื้อสร้างลอรี่โปรตีน 2.75%

เมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า มีการสร้างลอรี่โปรตีนเพิ่มขึ้นเพียง 0-0.25% ในการหมักเป็นเวลา 4 วัน ดังแสดงในกราฟที่ 20

8.7 ชนิดและปริมาณเกลือแร่ในอาหารกากมันที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีน ทำตามวิธีในข้อ 6.7 บทที่ 2 พบว่าการเติมโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5-2.0% แมกนีเซียมซัลเฟต 0.01-0.09% เหล็กซัลเฟต 0.002-0.01% โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.002-0.006% แคลเซียมคลอไรด์ 0.01-0.15% โซเดียมโมลิบเดต 0.0025-0.015% แมงกานีส-ซัลเฟต 0.001-0.006% และคอปเปอร์ซัลเฟต 0.001-0.1% ในอาหารกากมันที่มีแอมโมเนียม-ซัลเฟต 1.5% ไม่มีผลต่อการสร้างลอรี่โปรตีนของเชื้อ C.eichhorniae เมื่อหมักเป็นเวลา 4 วัน ผลการทดลองแสดงในกราฟที่ 21-28

เมื่อนำเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ มาใส่ในอาหารกากมันในอัตราส่วนต่าง ๆ ตามวิธีในข้อ 6.7.9-6.7.12 พบว่าอัตราส่วนของเกลือแร่ที่เหมาะสมคือ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจน 0.006% ซึ่งเมื่อเติมเกลือแร่ในอัตราส่วนดังกล่าวลงในกากมันที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5% เลี้ยงเชื้อรา C.eichhorniae เป็นเวลา 4 วัน จะได้กากมันหมักที่มีลอรี่โปรตีน 3.5% และไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 0.62% ดังแสดงในกราฟที่ 29

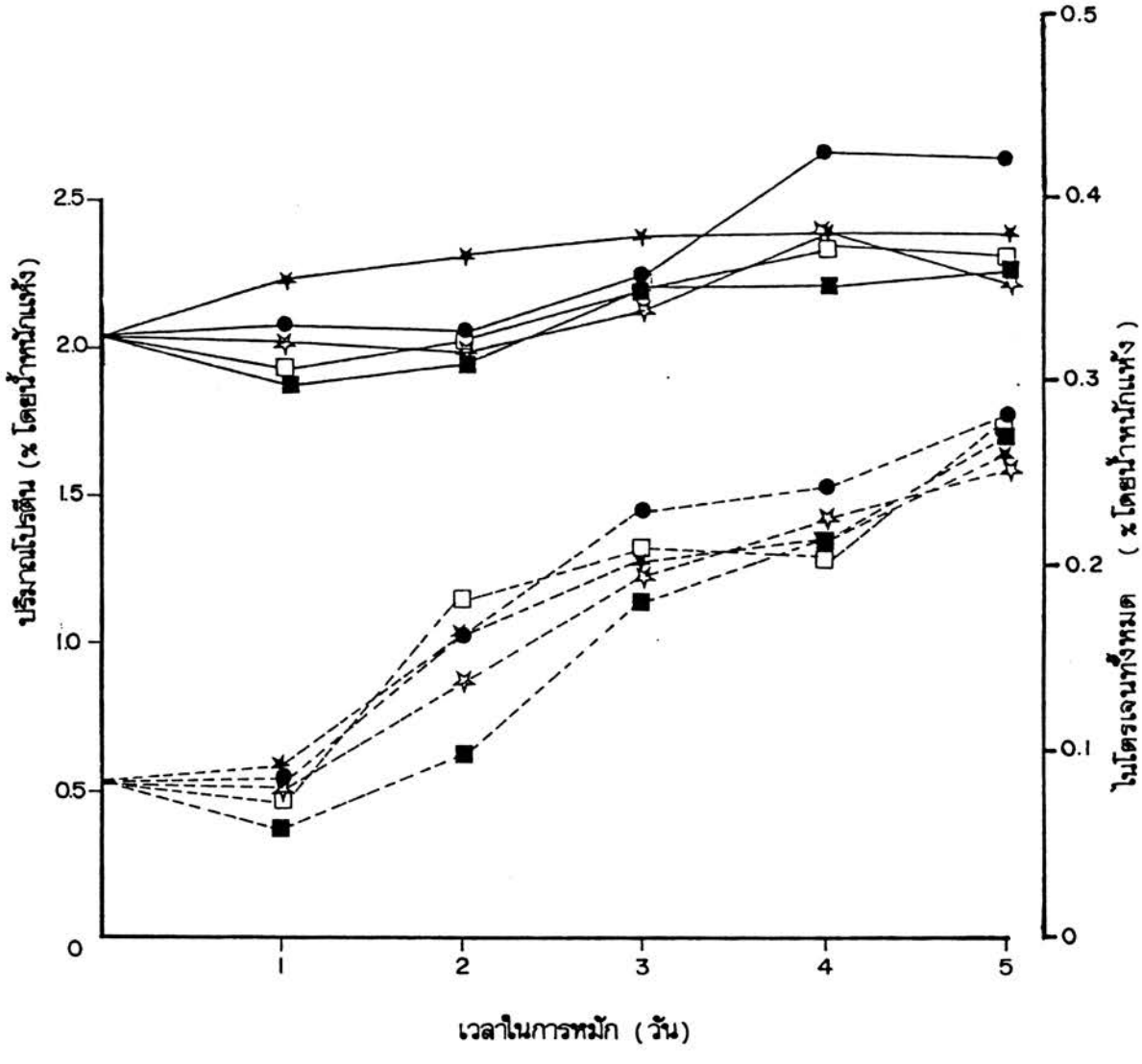
9. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างโปรตีนของเชื้อรา C.eichhorniae จากผลการทดลองในกราฟที่ 30 พบว่าเชื้อราเจริญอย่างรวดเร็ว (log phase) ในวันที่ 1-5 มีปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นจาก 1.5 มก./ก อาหารแห้งเป็น 11.0 มก./ก. อาหารแห้ง และลอรี่โปรตีนเพิ่มจาก 1.0% ในวันที่ 1 เป็น 3.5% ในวันที่ 4-7 ของการเจริญ สรุปได้ว่าการเจริญและการสร้างโปรตีนของเชื้อมีความสัมพันธ์กัน (growth associate)



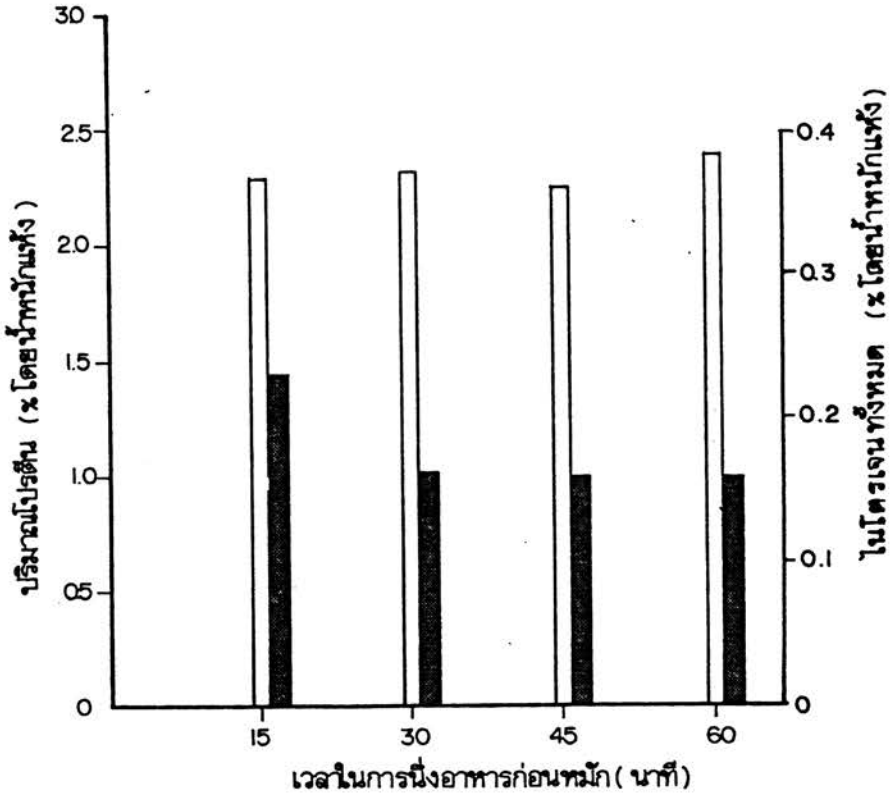
กราฟที่ 14 แสดงผลของความยืนตั้งตันในอาหาร ต่อการเจริญและการสร้าง โปรตีนของ C.eichhorniae เมื่อเจริญในอาหารแข็งที่ประกอบด้วยมันเส้น : รำข้าว : แกลบ ในอัตราส่วน 12 : 2 : 1

■-■ การเจริญเป็นปริมาณกลูโคซามีนต่อกรัม อาหารแห้ง,

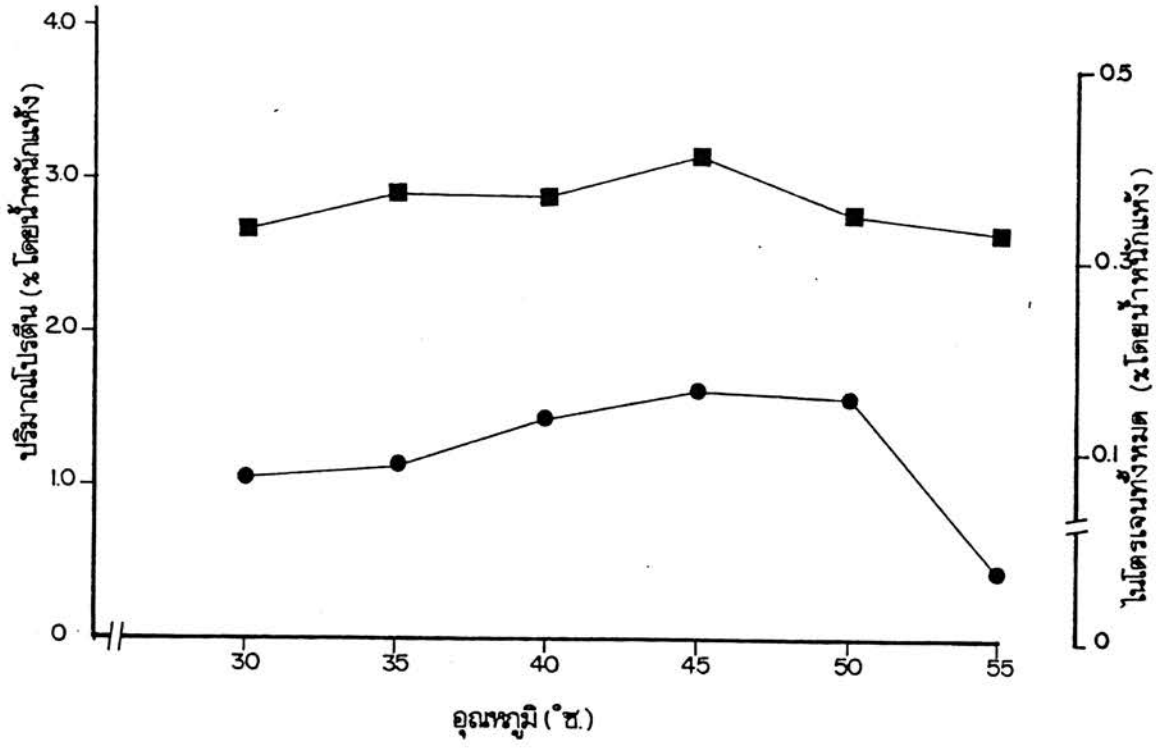
●-● ลอรีโปรตีน



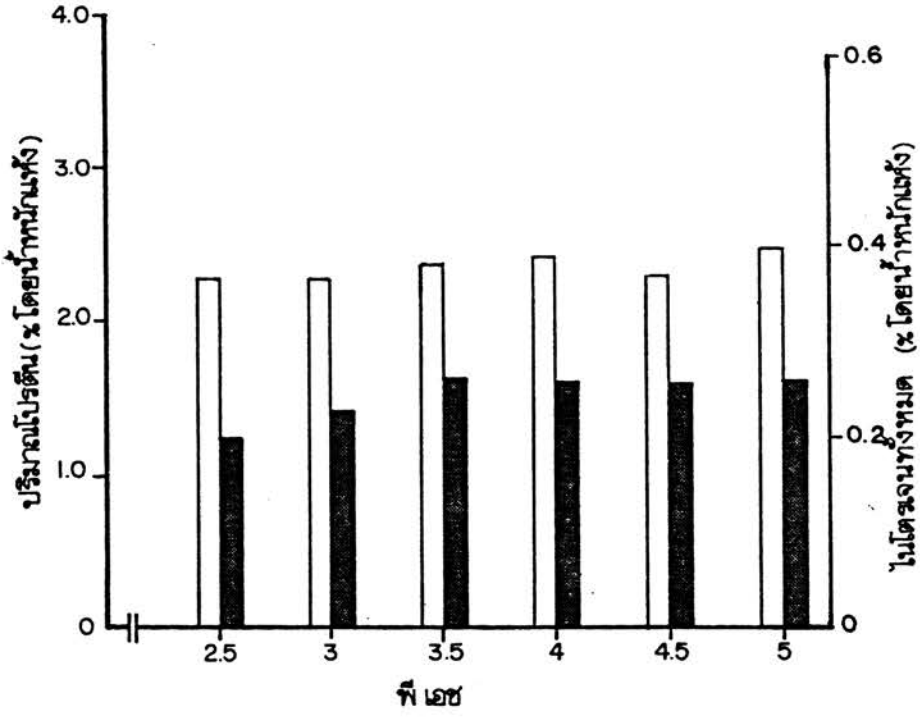
กราฟที่ 15 แสดงผลของความชื้นตั้งต้นของอาหาร ต่อการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae ที่เจริญในอาหารกากมัน พีเอชตั้งต้น 4 บ่มที่อุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลา 5 วัน ■—■ : อาหาร : น้ำ 1:1.3 ☆—☆ : อาหาร :น้ำ 1.1.5 □—□ : อาหาร :น้ำ 1:1.7 ●—● : อาหาร :น้ำ 1:1.9 ✶—✶ :อาหาร :น้ำ 1:2.1 — : ไนโตรเจนทั้งหมด ---- : ลอร์โปรตีน



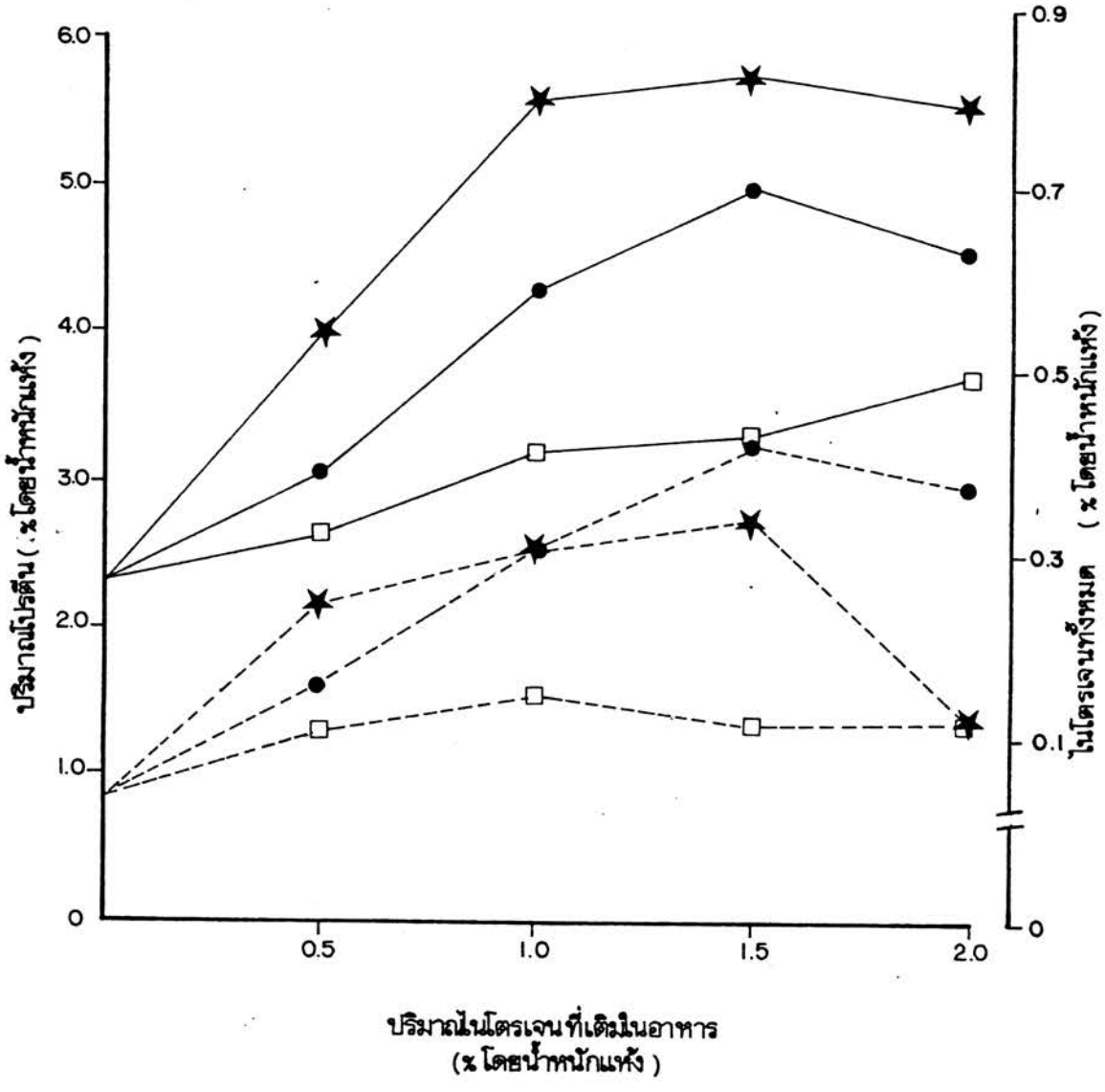
กราฟที่ 16 แสดงผลของเวลาที่ใช้ในการนึ่งอาหารก่อนหมัก ต่อการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae ในกากมัน:น้ำ 1:1.9พีเอช 4.0 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45° เป็นเวลา 4 วัน □ : ไนโตรเจนทั้งหมด ■ : ลอร์โปรตีน



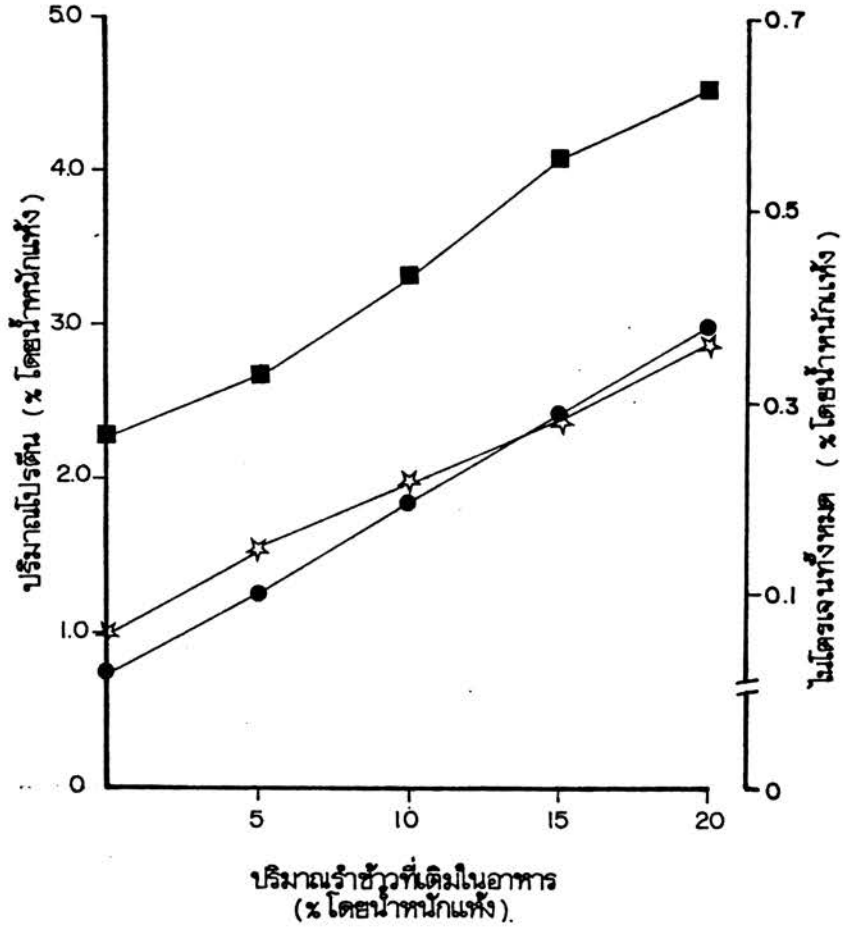
กราฟที่ 17 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae เมื่อเจริญในอาหารกากมัน : น้ำ 1:1.9 เวลาในการนึ่งอาหารก่อนหมัก 15 นาที, พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4 ●—●: ลอรี่โปรตีน ■—■: ไนโตรเจนทั้งหมด



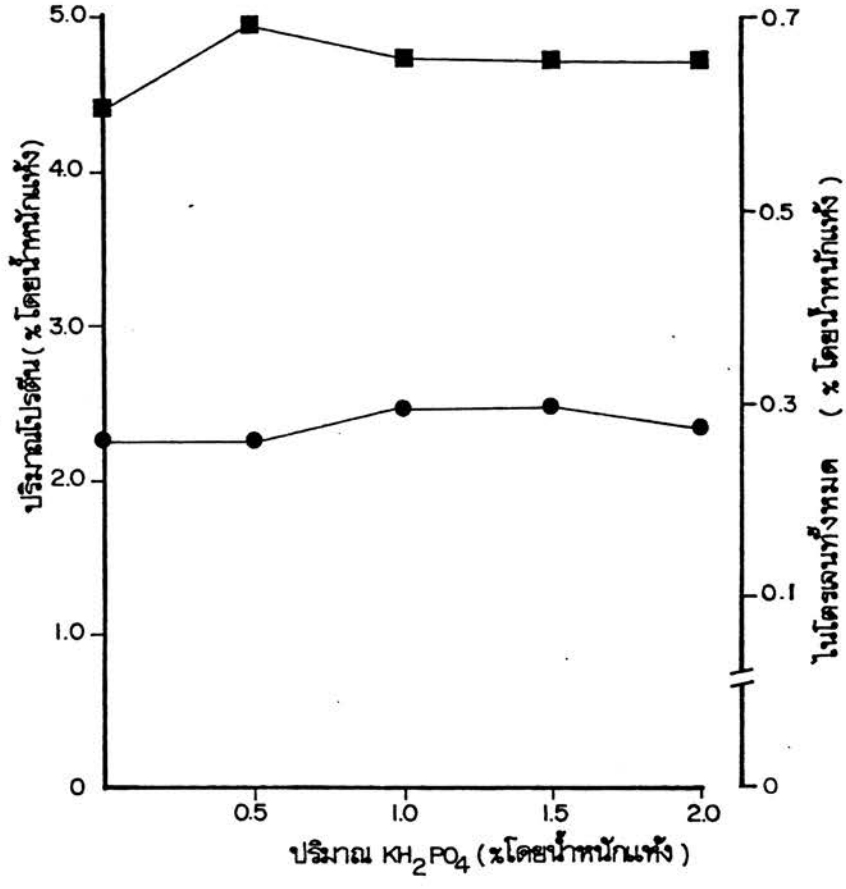
กราฟที่ 18 แสดงผลของพีเอชของอาหารก่อนหมักต่อการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae ที่เจริญในอาหารแข็งกากมัน : น้ำ 1:1.9 บ่มที่อุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลา 4 วัน ☐ : ไนโตรเจนทั้งหมด ■ : ลอร์โปรตีน



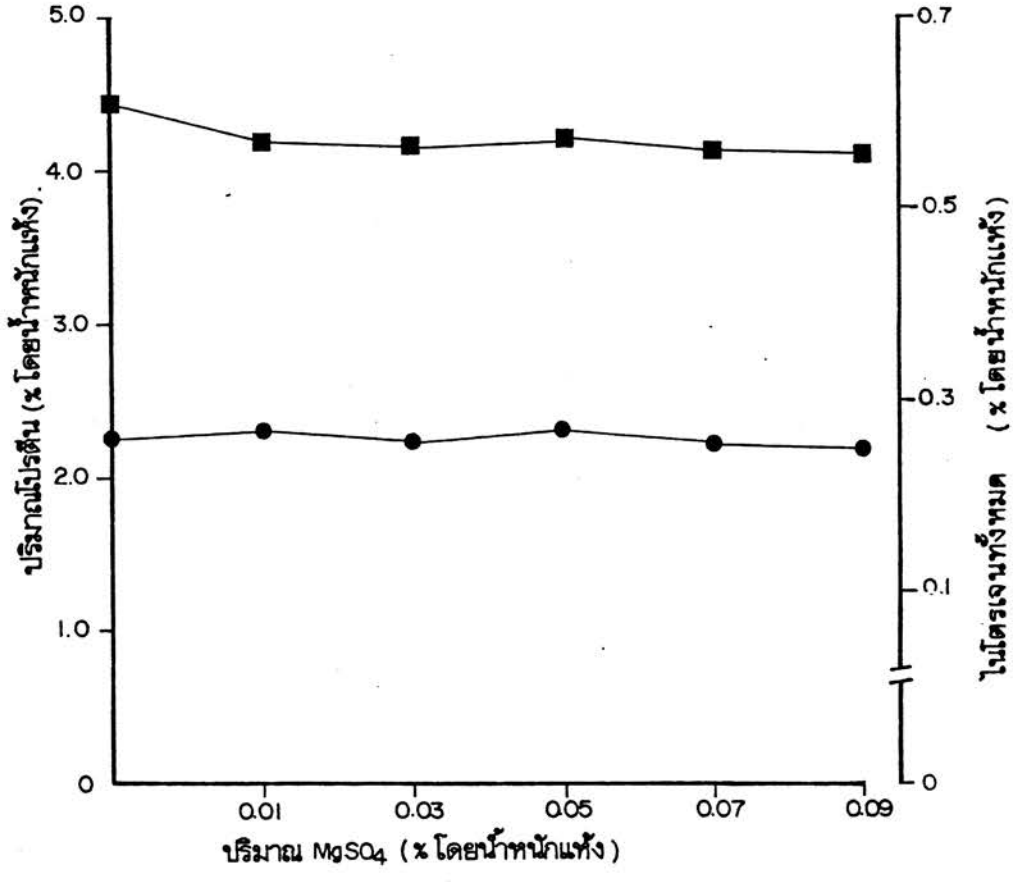
กราฟที่ 19 แสดงผลของการเติมปุ๋ยไนโตรเจน ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae เมื่อบ่มที่ 45°ซ. เป็นเวลา 4 วัน ●-●: แอมโมเนียมซัลเฟต, ★-★: ยูเรีย, □-□: โปแตสเซียมไนเตรต, —— : ไนโตรเจนทั้งหมด --- : ลอร์โปรตีน



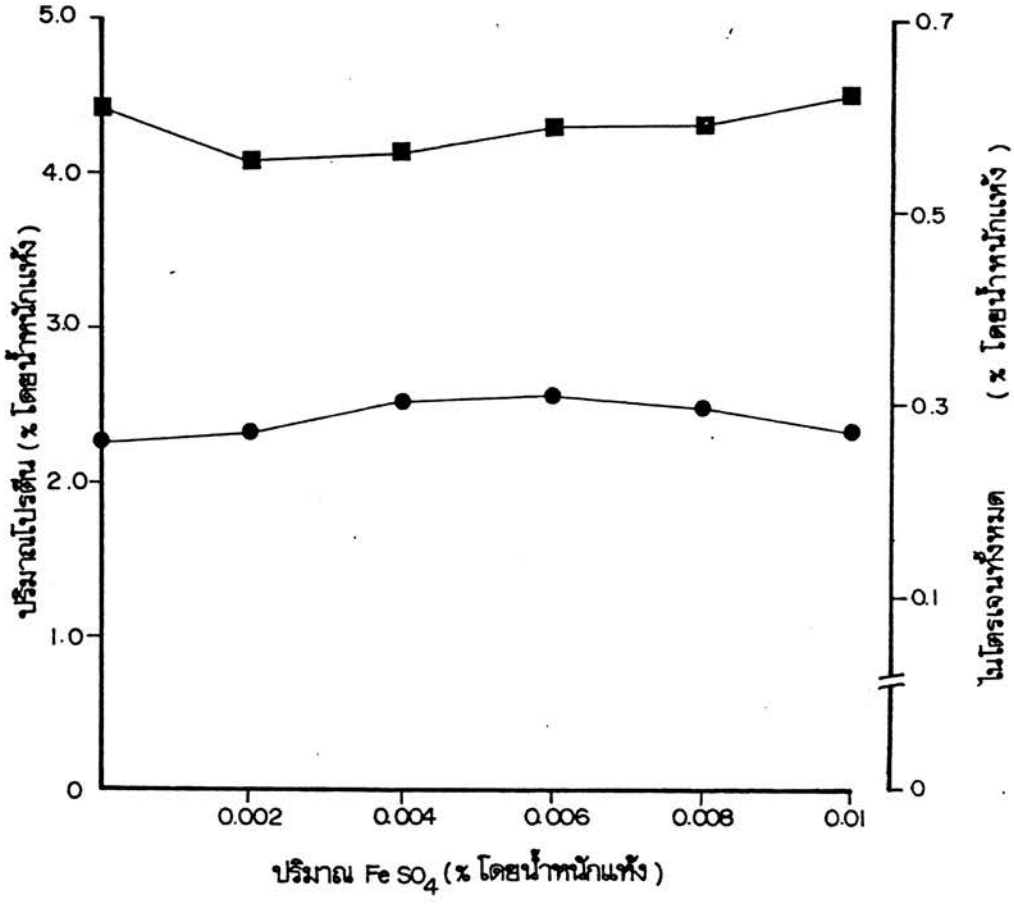
กราฟที่ 20 แสดงผลการเติมรำข้าวปริมาณต่าง ๆ ในอาหารกากมันต่อการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae บ่มที่ 45°ซ. เป็นเวลา 4 วัน ☆—☆ : ลอร์โปรตีนก่อนหมัก, ●—● : ลอร์โปรตีนหลังหมัก, ■—■ : ไนโตรเจนทั้งหมด



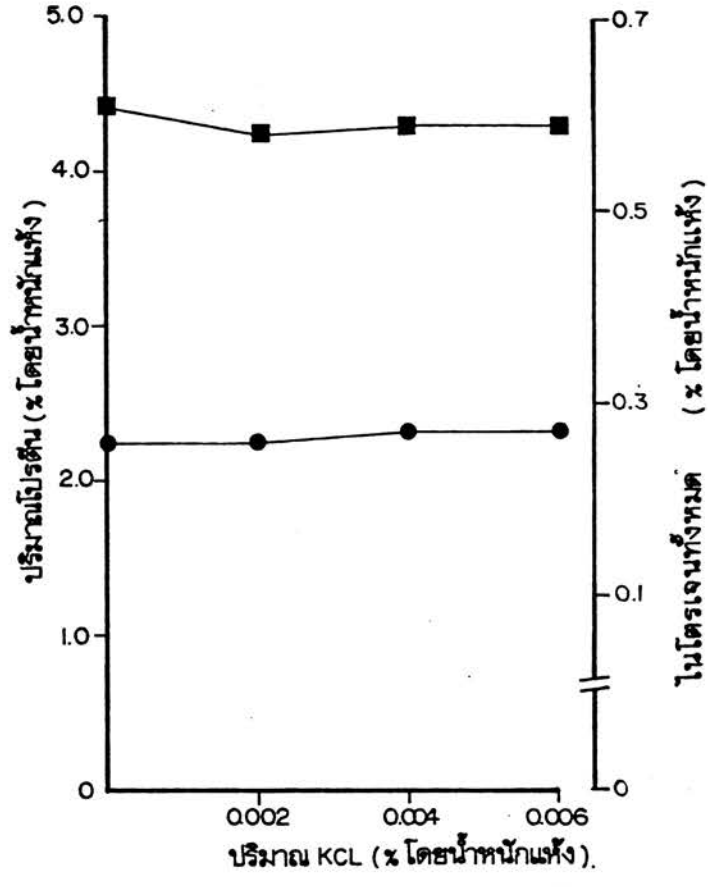
กราฟที่ 21 แสดงผลการเติมโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารพื้นฐานต่อการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae บ่มที่อุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลา 4 วัน ●—●: ลอร์โปรตีน, ■—■: ไนโตรเจนทั้งหมด



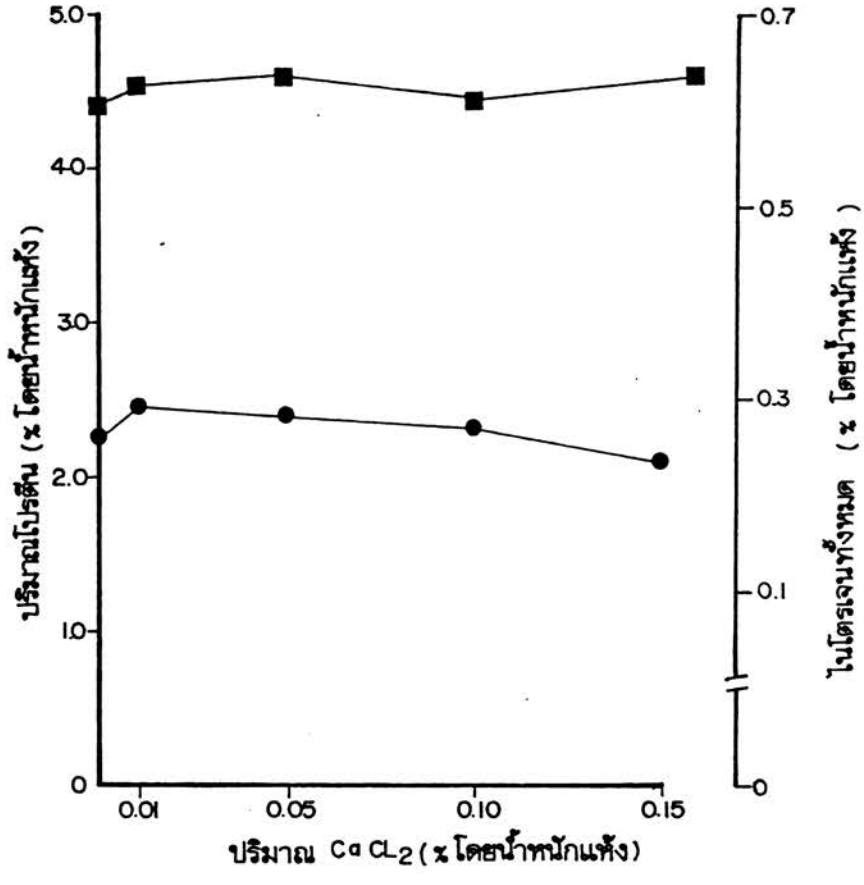
กราฟที่ 22 แสดงผลการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารพื้นฐาน ต่อการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae ●–● : ลอรี่โปรตีน, ■–■ : ไนโตรเจนทั้งหมด



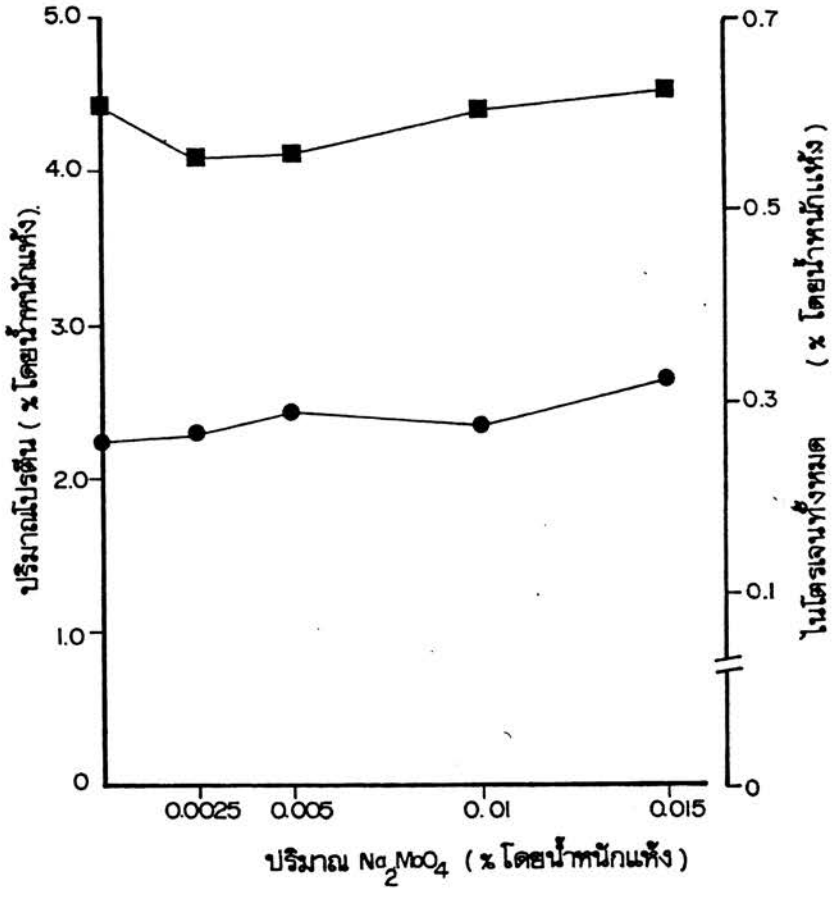
กราฟที่ 23 แสดงผลการเติมเหล็กซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารพื้นฐานต่อการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae ●—●: ลอร์โปรตีน, ■—■: ไนโตรเจนทั้งหมด



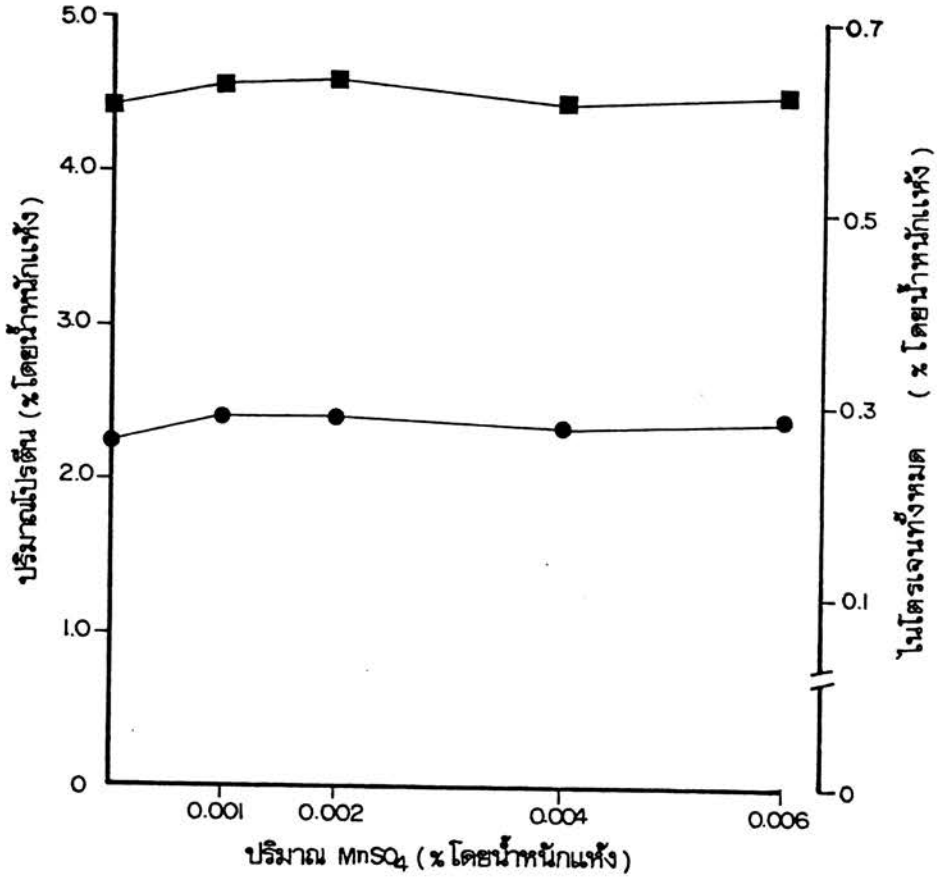
กราฟที่ 24 แสดงผลของการเติมโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารพื้นฐานต่อการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae ●—●: ลอรี่โปรตีน, ■—■: ไนโตรเจนทั้งหมด



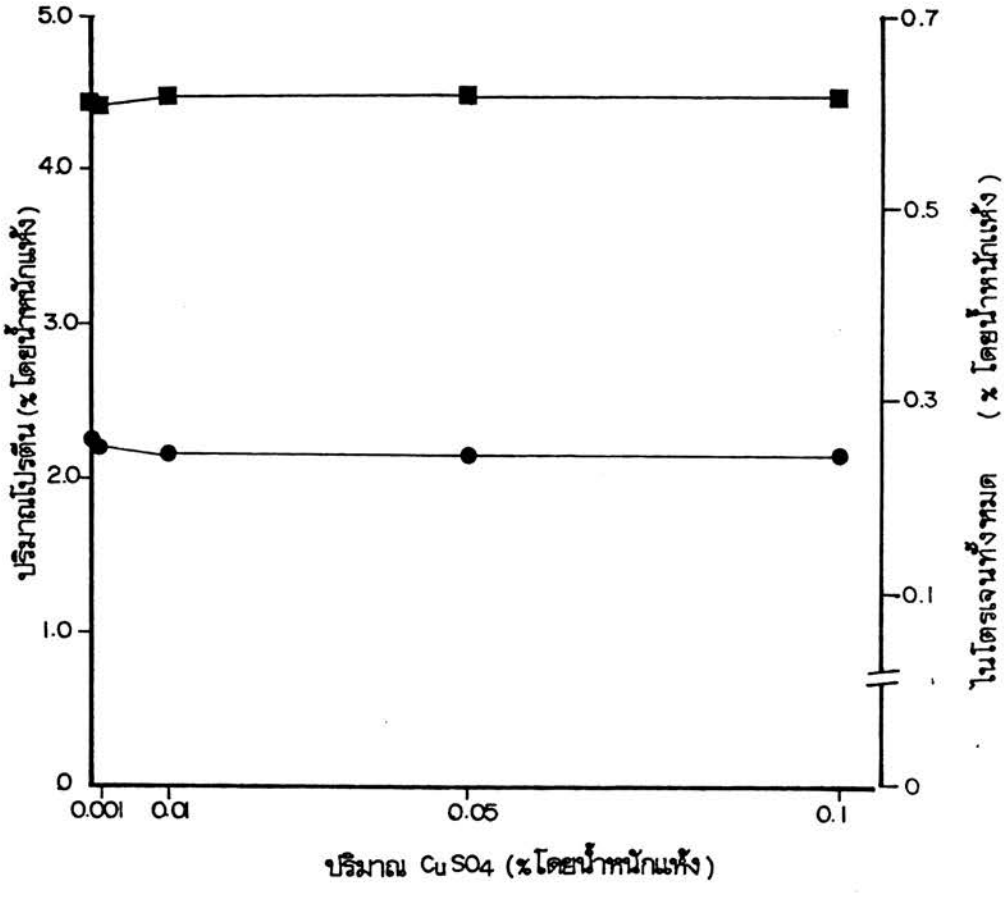
กราฟที่ 25 แสดงผลของการเติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารพื้นฐานต่อการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae ●—●: ลอรี่โปรตีน, ■—■: ไนโตรเจนทั้งหมด



กราฟที่ 26 แสดงผลของการเติมโซเดียมโมลิบเดทความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารพื้นฐานต่อการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae ●—●: ลอร์โปรตีน, ■—■: ไนโตรเจนทั้งหมด

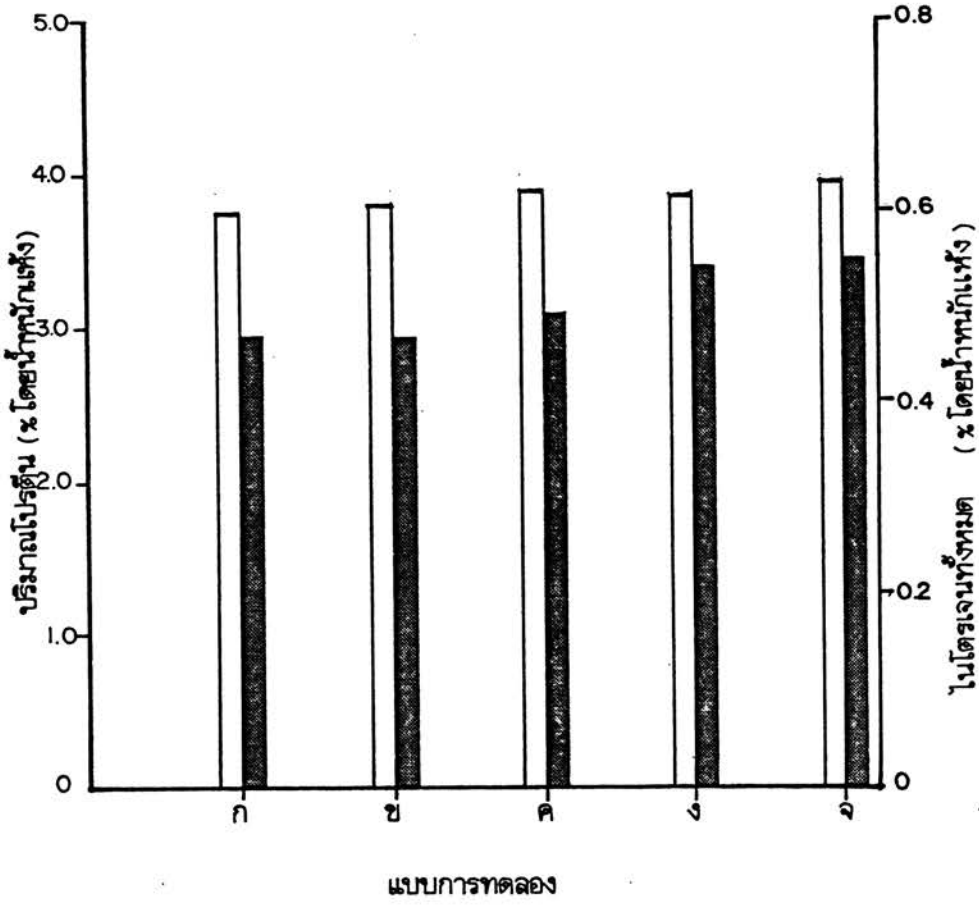


ภราฟที่ 27 แสดงผลของการเติมแมงกานีสซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ กันในอาหารพื้นฐานต่อการสร้างโปรตีนของเชื้อ C.eichhorniae ●—●: ลอรี่โปรตีน ■—■ : ไนโตรเจนทั้งหมด



ภราฟที่ 28 แสดงผลการเติมคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ กันในอาหารพื้นฐานต่อการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae

●—● : ลอรี่โปรตีน, ■—■ : ไนโตรเจนทั้งหมด



กราฟที่ 29 แสดงผลของการใส่เกลือแร่ในอาหารพื้นฐานในช่นิดและปริมาณต่าง ๆ กัน (% ต่อน้ำหนักอาหารแห้ง) ต่อการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae บ่มที่ 45°ซ. เป็นเวลา 4 วัน

ก. อาหารพื้นฐานไม่เติมเกลือแร่

ข. อาหารพื้นฐานเติม KH_2PO_4 1.0%, $FeSO_4$ 0.006%, $CaCl_2$ 0.01%, $NaMoO_4$ 0.005%, $MnSO_4$ 0.002%

ค. อาหารพื้นฐานเติม KH_2PO_4 1.0%, $FeSO_4$ 0.006%, $CaCl_2$ 0.01%, $MgSO_4$ 0.01%, KCl 0.006%

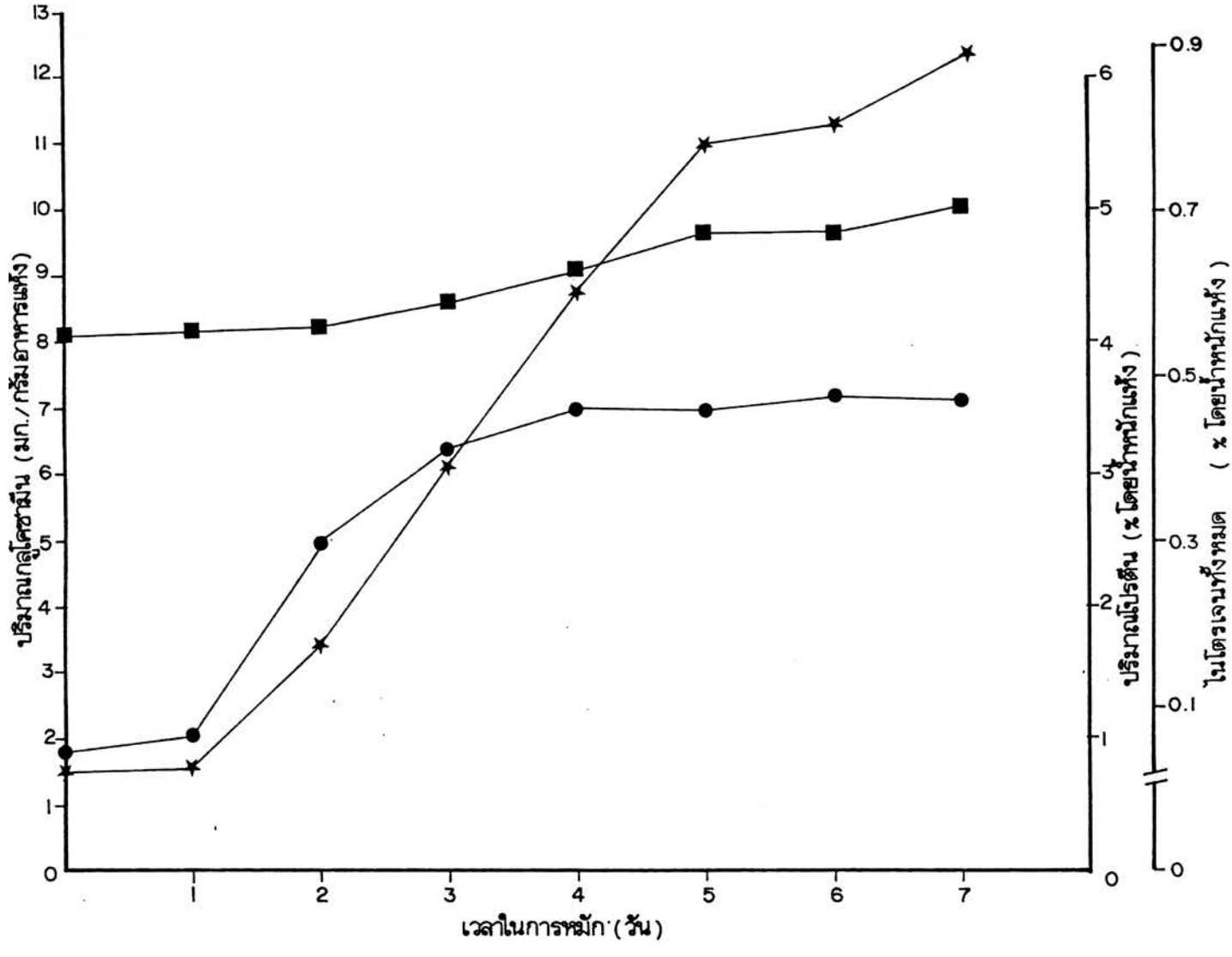
ง. อาหารพื้นฐานเติม KH_2PO_4 1.0%, $FeSO_4$ 0.004%, $MgSO_4$ 0.01%, KCl 0.006%

จ. อาหารพื้นฐานเติม KH_2PO_4 0.5%, $FeSO_4$ 0.004%, $MgSO_4$ 0.01%, KCl 0.006%

□ : ไนโตรเจนทั้งหมด

▓ : ลอร์โปรตีน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 30 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae เมื่อเจริญในอาหารแข็งที่ประกอบด้วย กากมัน, แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5%, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5%, เหล็กซัลเฟต 0.004%, โปแตสเซียม-คลอไรด์ 0.006% และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.01% โดยน้ำหนักแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลา 7 วัน ★—★: การเจริญ, ■—■: ไนโตรเจนทั้งหมด ●—●: ลอรี่โปรตีน

10. การทดลองใช้แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นสูง ศึกษาผลต่อการสร้างโปรตีน ทำตามวิธีในข้อ 10 บทที่ 2 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 7 (ก) พบว่าการใช้ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต 4.165% ผสมกับปุ๋ยยูเรีย 1.015% ในกากมันสำปะหลัง เมื่อหมักกับเชื้อรา C.eichhorniae เป็นเวลา 4 วัน จะได้อาหารหมักที่มีลอรี่โปรตีน 5.95% และไนโตรเจนทั้งหมด 1.78%

11. การขยายขนาดของอาหารหมัก ทำการทดลองขยายปริมาณการหมักจาก 10 กรัม เป็น 500 กรัม ใช้กากมันที่มี C.eichhorniae เจริญเต็มที่แล้ว เป็นหัวเชื้อ หมักกับมันเส้นขนาด 1 x 1 x1 ซม. โดยแปรผันอัตราส่วนของหัวเชื้อ มันเส้น และปริมาณอาหารต่อถุง หมักได้ผลการทดลองดังนี้

11.1 การแปรผันอัตราส่วนหัวเชื้อ มันเส้น ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 11.2 บทที่ 2 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 8 พบว่าอัตราส่วนหัวเชื้อ มันเส้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างโปรตีนของเชื้อรา C.eichhorniae คือ หัวเชื้อ มันเส้นเท่ากับ 4 : 6 อาหารที่หมักเป็นเวลา 4 วัน จะมีลอรี่โปรตีน 4.07% และไนโตรเจนทั้งหมด 0.79%

11.2 การแปรผันปริมาณของมันต่อขนาดของถุง ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 11.3 บทที่ 2 โดยใช้อัตราส่วนของหัวเชื้อ :มันเส้น เป็น 4 : 6 และผันแปรน้ำหนักอาหารทั้งหมดในถุงขนาด 40 x 60 ซม. เป็น 500, 700 และ 1000 กรัม เมื่อวางถุงในแนวตั้ง ความสูงของมันหมักจะเท่ากับ 7.5, 10.5 และ 15 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางของปากถุงเท่ากับ 20 ซม. ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 9 พบว่า การเลี้ยงเชื้อ C.eichhorniae ในอาหารปริมาณ 500, 700 และ 1000 กรัม ทำให้เชื้อสร้างลอรี่โปรตีน และไนโตรเจนทั้งหมดประมาณ 4% และ 0.75% ตามลำดับ

11.3 การขยายขนาดการหมักเมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นสูง ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 11.4 บทที่ 2 โดยใช้หัวเชื้อและมันเส้นที่ใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต 4.165% และยูเรีย 1.015% หมักในถุงขนาด 40 x 60 ซม. ปริมาณอาหารทั้งหมดเป็น 500 กรัม ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 7(ข) พบว่าอาหารที่หมักเป็นเวลา 4 วัน จะมีลอรี่โปรตีน 6.8% และไนโตรเจนทั้งหมด 1.66%

12. การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนที่ได้ในอาหารหมัก ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่า มีปริมาณเมทไธโอนีนประมาณ 1.03 นาโนโมลต่อกรัมตัวอย่างแห้ง

ตารางที่ 7 แสดงการสร้างโปรตีนของเชื้อรา C.eichhorniae เมื่อเจริญในอาหารแข็ง กากมัน และมันเส้น ที่เติมไนโตรเจน ความเข้มข้นสูงในการหมักขนาดต่าง ๆ กัน

ลำดับที่	ชนิดของอาหาร	ขนาดของการหมัก (กรัม)	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (%โดยน้ำหนักแห้ง)	ลอรี่โปรตีน (%โดยน้ำหนักแห้ง)
(ก)				
1.	กากมัน + $(NH_4)_2SO_4$ 8.33 % + urea 2.03 %	10	2.49 ± 0.10	3.08 ± 0.12
2.	กากมัน + $(NH_4)_2SO_4$ 4.16% + urea 1.01%	10	1.67 ± 0.05	5.95 ± 0.50
(ข) ขยายขนาด (Scale up)				
3.	กากมัน:มันเส้น 4:6 + $(NH_4)_2SO_4$ 4.16 % + urea 1.01 %	500	1.66 ± 0.04	6.82 ± 1.62

ตารางที่ 8 แสดงผลการแปรผันปริมาณหัวเชื้อต่อมันเส้น น้ำหนักรวม 500 กรัม ที่มีต่อการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae บ่มที่ 45^0 ซ เป็นเวลา 4 วัน

อัตราส่วน กากมัน: มันเส้น	ลอรี่โปรตีนก่อนหมัก (% โดยน้ำหนักแห้ง)	ลอรี่โปรตีนหลังหมัก (% โดยน้ำหนักแห้ง)	ไนโตรเจนทั้งหมด (% โดยน้ำหนักแห้ง)
1:9	1.38 ± 0.61	2.64 ± 0.81	0.73 ± 0.17
2:8	1.56 ± 0.58	2.94 ± 0.96	0.73 ± 0.32
3:7	1.70 ± 0.72	3.69 ± 1.01	0.75 ± 0.33
4:6	1.92 ± 0.51	4.07 ± 0.75	0.79 ± 0.17
5:5	2.1 ± 0.93	4.32 ± 0.84	0.76 ± 0.19

ตารางที่ 9 แสดงผลการแปรผันปริมาณอาหารต่อภาชนะหมัก ต่อการสร้างโปรตีนของ C. eichhorniae บ่มที่ 45^0ซ เป็นเวลา 4 วัน

ขนาดอาหาร (กรัม)	ความหนาของอาหาร (ซม.)	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (% โดยน้ำหนักแห้ง)	ลอรี่โปรตีน (% โดยน้ำหนักแห้ง)
500	7.5	0.75 ± 0.06	3.96 ± 0.68
700	10.5	0.77 ± 0.17	4.08 ± 0.73
1000	15.0	0.75 ± 0.15	4.02 ± 0.79

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 แสดงการยายยพาดการหมักยอง C.eichhorniae ในมันเส้น บ่มที่ 45°ซ. เป็นเวลา 4 วัน

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณกรดอะมิโนในกากมัน และมันเส้นหมักกับเชื้อรา บ่มที่ 45^{0}ซ. เป็นเวลา 4 วัน

ชนิดของกรดอะมิโน	ความเข้มข้น (นาโนโมลของกรดอะมิโน/กรัมตัวอย่างแห้ง)
แอสปาร์ติก	28.92
ทรีโอนีน	20.07
ซีรีน	21.78
กลูตามิก	35.60
โพรลีน (440)	19.07
ไกลซีน	29.94
อะลานีน	36.80
กรดซีสเตอิก	น้อยมาก
วาลีน	19.47
เมทไธโอนีน	3.58
ไอโซลิวซีน	11.8.2
ลิวซีน	21.81
ไธโรซีน	6.02
เฟนนิลอะลานีน	9.78
ไลซีน	12.11
ฮีสติดีน	5.15
อาร์จีนีน	13.36
เมทไธโอนีน ซัลโฟน	1.03