ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอล ออกซิเจนที่ละลาย ความเป็นกรด-เบสต่อการหมักของ *Hansenula polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน

นางสาวลลิตา อุปสัน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EFFECTS OF GLYCEROL CONCENTRATION, DISSOLVED OXYGEN AND pH ON FERMENTATION OF *Hansenula polymorpha* IN STIRRED TANK BIOREACTOR

Ms. Lalita Upason

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอล ออกซิเจนที่ละลาย ความเป็นกรด-เบสต่อการหมักของ *Hansenula polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน
โดย	นางสาวลลิตา อุปสัน
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ศรินทิพ สุกใส
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. ณัฏฐา ทองจุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิ ทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ศรินทิพ สุกใส)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. ณัฏฐา ทองจุล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. สุวัฒนา พฤกษะศรี)

ลลิตา อุปสัน: ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอล ออกซิเจนที่ละลาย ความเป็นกรด-เบสต่อการหมักของ *Hansenula polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน. (EFFECTS OF GLYCEROL CONCENTRATION, DISSOLVED OXYGEN AND pH ON FERMENTATION OF *Hansenula polymorpha* IN STIRRED TANK BIOREACTOR) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ ดร.ศรินทิพ สุกใส , อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อาจารย์ ดร.ณัฏฐา ทองจุล, 125 หน้า

Hansenula polymorpha หรือ *Pichia angusta* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ คือเป็นยีสต์ที่สามารถใช้กลีเซอรอลและเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้เป็นอย่างดี ทนต่ออุณหภูมิสูงประมาณ 20 – 45^{O}C ทั้งยังสามารถเจริญในภาวะความหนาแน่นเซลล์สูง นิยมใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิต heterologous protein เช่น human epidermal growth factor (hEGF), hepatitis B vaccine, insulin, hirudin, interferon α2a และเอนไซม์ต่าง ๆ งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการเจริญของ *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน โดยทำการเพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมักแบบแบตช์แปรผันปัจจัยที่ต้องการศึกษา คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลายที่ 40 และ 80% ค่ากรด-เบสที่ 3.5 และ 5.5 ติดตามการเจริญโดยวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight) ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) และอัตราการผลิต (productivity) พบว่า กระบวนการหมักที่มีการใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล 10 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบส เท่ากับ 5.5 เป็นกระบวนการหมักที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด สำหรับการหมักแบบแบตช์ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ ค่ากรด-เบส เท่ากับ 5.5 เป็นการหมักแบบแบตช์ที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 34.70 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 ส่วนการหมักด้วยกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ด้วยภาวะที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ควบคุมค่ากรด-เบสของน้ำหมักเป็น 5.5 และค่าออกซิเจนละลายที่ระดับ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยเริ่มทำการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตรา 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ชั่วโมงที่ 12 โดยใช้อัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล และทำการควบคุมอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (C:N ratio) เท่ากับ 1.75 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 66.39 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 45 มีอัตราการเจริญจำเพาะตลอดกระบวนการหมัก เท่ากับ 0.1008 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตมวลเซลล์ เท่ากับ 1.1445 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลผลิตมวลเซลล์ เท่ากับ 1.0613 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล ซึ่งได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเป็นสองเท่าของการหมักแบบแบตช์ที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร และสูงกว่าการหมักแบบเฟดแบตช์ซึ่งไม่ได้ทำการควบคุมค่า C:N ratio ของสารอาหารที่ใช้ในการเติม จากการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี 2-level factorial design จะเห็นว่าปัจจัยทั้ง 3 มีผลร่วมกันต่อการเจริญของ *H. poloymorpha* เมื่อพิจารณาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลทางบวกมากที่สุด แต่กลับส่งผลทางลบต่ออัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด, อัตราการผลิตมวลเซลล์ และผลผลิตมวลเซลล์ ซึ่งเป็นค่าที่แสดงประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก สำหรับปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพกระบวนการหมักมากที่สุด ได้แก่ ปัจจัยของค่ากรด-เบส และค่าออกซิเจนละลายเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญน้อยที่สุด

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5172424823: MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS: *Hansenula polymorpha/* GLYCEROL/ pH/ DISSOLVED OXYGEN/ BATCH FERMENTATION/FED - BATCH FERMENTATION/ FACTORIAL DESIGN

LALITA UPASON: EFFECTS OF GLYCEROL CONCENTRATION, DISSOLVED OXYGEN AND pH ON FERMENTATION OF *Hansenula polymorpha* IN STIRRED TANK BIOREACTOR. ADVISOR: SARINTIP SOOKSAI, Ph.D: CO-ADVISOR: NUTTHA THONGCHUL, Ph.D, 125 pp.

Hansenula polymorpha, *aka Pichia angusta*, is a thermotolerant and methylotrophic yeast. It can utilize both glycerol and methanol as a sole carbon source and grow at a high cell density from 20 to 45^{O}C. *H. polymorpha* has been developed as a high yield production host for heterologous proteins such as human epidermal growth factor (hEGF), hepatitis B vaccine, insulin, hirudin, interferon α2a, and industrial enzymes. In this research, the growth of *H. polymorpha* in a stirred tank bioreactor was observed. The effects of initial glycerol concentrations (10 g/L, 30 g/L and 50 g/L), dissolved oxygen (40% and 80%) and pH (3.5 and 5.5) on growth were investigated during batch culture. The growth of *H. polymorpha* was determined by analysis of dry cell weight, yield, specific growth rate and productivity. It was found that 10 g/L initial glycerol concentration, 40% dissolved oxygen and pH 5.5 gave high bioreactor productivity. While the maximum cell dry weight was reached to 34.70 g/L at 48 h in batch fermentation using 50 g/L initial glycerol with the pH control at 5.5 and the DO level maintained at 80% saturated air. The optimal condition for fed-batch culture were at 10 g/L initial glycerol concentration, 40% dissolve oxygen and pH 5.5. After 12 h of batch culture, exponential feeding was applied at the C:N ratio of 1.75 to achieve the maximum cell dry weight of 66.39 g/L at 45 h.

On the basis of the results of factorial design, the maximum dry cell weight of *H. polymorpha* was strongly affected by the initial glycerol concentration, following by pH and dissolve oxygen, respectively. However, the increase in initial glycerol concentration showed inverted effects on yield, specific growth rate and productivity. While pH had clearly shown the positive effect on the productivity.

Field of Study : Biotechnology Student's Signature : .....
Academic Year : 2011 Advisor's Signature : .....
Co-advisor's Signature : .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาในหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต ซึ่งสำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ ดร.ศรินทิพ สุกใส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และอาจารย์ ดร.ณัฏฐา ทองจุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาเสียสละเวลาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย รวมทั้งตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี จึงขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส และอาจารย์ ดร.สุวัฒนา พฤกษะศรีที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คุณสมยศ โอศิริพันธุ์ (นักวิจัย) เจ้าหน้าที่ทุกๆ คน และที่สำคัญที่สุดพี่ๆ เพื่อนๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการ ที่คอยเป็นกำลังใจ ช่วยเหลือและให้แนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้มอบทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สนับสนุนค่าใช้จ่ายบางส่วนในงานวิจัยนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติทุก ๆ คน ที่สนับสนุนเรื่องการศึกษาทั้งในด้านการเงิน คำปรึกษา กำลังใจและให้ความเข้าใจด้วยดีตลอดมา

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		จ
กิตติกรรมประกาศ		ฉ
สารบัญ		ช
สารบัญตาราง		ฎ
สารบัญภาพ		ณ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ		ต
บทที่		
1	บทนำ	1
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
	1.3 วิธีดำเนินการวิจัย	3
	1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
	2.1 โปรตีนเซลล์เดี่ยว	5
	2.1.1 คำนิยามของโปรตีนเซลล์เดี่ยว	5
	2.1.2 ประวัติของโปรตีนเซลล์เดี่ยว	5
	. 2.1.3 องค์ประกอบของโปรตีนเซลล์เดี่ยว	6
	2.1.4 การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว	6
	2.1.5 ข้อดีของการใช้ยีสต์ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว	9
	2.1.6 การประยุกต์ใช้โปรตีนเซลล์เดี่ยว	10
	2.2. *Hansenula polymorpha*	11
	2.3 เมแทบอลิซึมของกลีเซอรอลในเมทิลโลโทรฟิกยีสต์	14
	2.4 กลีเซอรอล	16
	2.4.1 กลีเซอรอลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น	16
	2.4.2 คำนิยามของกลีเซอรอล	17
	2.4.3 การแบ่งประเภท คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกลีเซอรอล	17
	2.4.4. ประโยชน์ของกลีเซอรอล	20

บทที่		หน้า
	2.5 การหมักหรือการเพาะเลี้ยง (fermentation or cultivation)	20
	2.5.1 การหมักแบบแบตช์ (batch cultivation)	21
	2.5.2 การหมักแบบเฟดแบตช์ (fed batch cultivation).....	25
	2.6 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน (stirred tank bioreactor)	28
	2.7 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของ *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน.....	30
	2.7.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	30
	2.7.1.1 ประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	30
	2.7.1.2 สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญ.....	31
	2.7.2 ปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีที่เกี่ยวข้องในระหว่างกระบวนการหมัก...	36
	2.7.2.1 อุณหภูมิ.....	36
	2.7.2.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน.....	36
	2.7.2.3 ค่าออกซิเจนละลาย.....	37
	2.7.2.4 ค่าความเป็นกรด-เบส.....	39
3	วิธีการทดลอง.....	40
	3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	40
	3.1.1 วัสดุอุปกรณ์.....	40
	3.1.2 สารเคมี.....	42
	3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	43
	3.2.1 ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล.....	43
	3.2.2 ค่าการละลายออกซิเจนในน้ำหมัก.....	43
	3.2.3 ค่ากรด-เบสของน้ำหมัก.....	43
	3.3 ขั้นตอนการวิจัย.....	44
	3.3.1 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ.....	44
	3.3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....	44
	3.3.1.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์.....	45
	3.3.1.3 การเตรียมกล้าเชื้อ.....	45
	3.3.2 อาหารที่ใช้ในการหมัก.....	45
	3.3.2.1 อาหารสำหรับการเก็บรักษาจุลินทรีย์.....	45
	3.3.2.2 อาหารสำหรับกล้าเชื้อ.....	46

บทที่		หน้า
	3.3.2.3 อาหารสำหรับกระบวนการหมักแบบแบตช์……	46
	3.3.2.4 อาหารสำหรับการเติมสารอาหารในการหมักแบบเฟด-แบตช์...	47
	3.3.2.4.1 อาหารที่มีค่า C:N ratio เท่ากับ 28 ……..……	47
	3.3.2.4.2 อาหารที่มีค่า C:N ratio เท่ากับ 1.75 ……..……	47
	3.3.3 กระบวนการหมักแบบแบตช์……...	48
	3.3.4 กระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์……...	48
	3.3.5 วิธีการวิเคราะห์……...	49
	3.3.5.1 การหาน้ำหมักเซลล์แห้ง……	49
	3.3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลด้วยเครื่องไฮเปอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)……..	49
	3.3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl protein)……...	50
4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	51
	4.1 การเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบแบตช์ เมื่อทำการควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ใช้เป็นสารอาหารตั้งต้นเป็น 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด–เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 และ 5.5……	51
	4.2 การเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบเฟดแบตช์ เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40% และค่ากรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 โดยทำการแปรผันเวลาและอัตราในการเติมสารอาหารที่แตกต่างกัน ……	59
	4.3 การคำนวณทางสถิติ……..….	64
	4.3.1 ผลการคำนวณทางสถิติแบบ 2-level factorial design ของความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่มีอิทธิพลต่อน้ำหนักเซลล์แห้……	66
	4.3.2 ผลการคำนวณทางสถิติแบบ 2-level factorial design ของความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่มีอิทธิพลต่ออัตราการเจริญจำเพาะ ……..	66
	4.3.3 ผลการคำนวณทางสถิติแบบ 2-level factorial design ของความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิต ……	67
	4.3.4 ผลการคำนวณทางสถิติแบบ 2-level factorial design ของความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่มีอิทธิพลต่อผลผลิตมวลเซลล์ ……..	67

บทที่ หน้า
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ……..…….. 69
รายการอ้างอิง..... 72
ภาคผนวก..... 77
ภาคผนวก ก ……..... 78
ภาคผนวก ข ……..... 81
ภาคผนวก ค 86
ภาคผนวก ง 89
ภาคผนวก จ 122
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ ……. 125

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ส่วนประกอบของโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ……..……....	6
2.2	ตัวอย่างของจุลินทรีย์และสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว…….	8
2.3	การผลิตโปรตีนจากแหล่งอื่นใน *H. polymorpha*…….	12
2.4	ปริมาณองค์ประกอบทางอาหาร ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการวิเคราะห์เซลล์ *H. polymorpha*……	13
2.5	ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน (Amino acid) ใน *H. polymorpha*…….	13
2.6	ชนิดและปริมาณวิตามินในเซลล์ *H. polymorpha*…….	14
2.7	คุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของกลีเซอรอลในขั้นคุณภาพต่าง ๆ …….	18
3.1	ภาวะที่สนใจศึกษาโดยทำการแปรผันปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของ *H. polymorpha* ซึ่งทำการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล……...	44
4.1	สรุปผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบแบตช์ เมื่อทำการควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ใช้เป็นสารอาหารตั้งต้นเป็น 10, 30 และ 50 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 และ 80% และค่าความเป็นกรด– เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 และ 5.5……	56
4.2	สรุปผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบเฟดแบตช์ เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40% และค่ากรด-เบส ของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 ทำการแปรผันเวลาและอัตราการเติมสารอาหารที่แตกต่างกัน……..……	64
4.3	2^3 แฟคทอเรียลดีไซน์เมทริกซ์ (2^3 factorial design matrix)…….	65
ข.1	บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ระหว่างการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 g/L,ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40% และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง……	82
ข.2	แสดงพื้นที่ได้กราฟและปริมาณกลีเซอรอลที่ชั่วโมงต่าง ๆ…….	85
ค.1	อัตราการเติมสารอาหารแบบเอ็กโพแนนเชียลที่เวลาใด ๆ …….	87

ตารางที่ หน้า

ง.1.1 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 89

ง.1.2 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 nm ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 g/L, ค่าออกซิเจนละลาย 40% และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5..... 90

ง.1.3 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 80% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 91

ง.1.4 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 nm ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 g/L, ค่าออกซิเจนละลาย 80% และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5..... 92

ง.1.5 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 93

ง.1.6 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 nm ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 g/L, ค่าออกซิเจนละลาย 40% และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5..... 94

ง.1.7 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 80% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 95

ง.1.8 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 nm ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 g/L, ค่าออกซิเจนละลาย 80% และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5..... 96

ง.1.9 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 97

ตารางที่ หน้า

ง.1.10 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 nm ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 g/L, ค่าออกซิเจนละลาย 40% และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5…..... 98

ง.1.11 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 80% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง……. 99

ง.1.12 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 nm ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 g/L, ค่าออกซิเจนละลาย 80% และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5…..... 100

ง.1.13 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง……. 101

ง.1.14 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 nm ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 g/L, ค่าออกซิเจนละลาย 40% และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5…..... 102

ง.1.15 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 80% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง……. 103

ง.1.16 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 nm ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 g/L, ค่าออกซิเจนละลาย 80% และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5…..... 104

ง.1.17 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……. 105

ง.1.18 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 nm ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 g/L, ค่าออกซิเจนละลาย 40% และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5…..... 106

ตารางที่ หน้า

ง.1.19 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 80% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……. 108

ง.1.20 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 nm ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 g/L, ค่าออกซิเจนละลาย 80% และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5…..... 109

ง.1.21 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……. 111

ง.1.22 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 nm ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 g/L, ค่าออกซิเจนละลาย 40% และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5…..... 112

ง.1.23 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 80% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……. 114

ง.1.24 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 nm ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 g/L, ค่าออกซิเจนละลาย 80% และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5…..... 115

ง.2.1 ผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ทำการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3116 มิลลิลิตรต่อนาที…….. 117

ง.2.2 ผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ทำการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที…….. 118

ง.2.3 ผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ทำการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 9 ด้วยอัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที…….. 119

ตารางที่ หน้า

ง.2.4 ผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ทำการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมค่า C:N ratio เท่ากับ 1.75…….. 120

จ.1 ปัจจัยและระดับการทดลองแบบ 2-level factorial design ของความเข้มข้นของกลีเซอรอล 10 g/L และ 30 g/L…… 122

จ.2 การทดลองแบบ 2-level factorial design ของความเข้มข้นของกลีเซอรอล 10 g/L และ 30 g/L……..……. 122

จ.3 Table of contrast ของการทดลองแบบ 2-level factorial design ของความเข้มข้นของกลีเซอรอล 10 g/L และ 30 g/L……..…… 123

จ.4 สรุปผลของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *H. polymorpha*……. 124

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แผนภาพขั้นตอนการผลิตโปรตีนโปรตีนเซลล์เดี่ยว…….……	8
2.2	ตัวอย่างอาหารของสัตว์เลี้ยงจากยีสต์สกัด……,,……	10
2.3	ตัวอย่างสารสกัดจากยีสต์ที่ใช้เป็นส่วนประกอบสำหรับอาหารมังสวิรัต……..	10
2.4	ตัวอย่างสารสกัดจากยีสต์ที่ใช้เป็นส่วนประกอบสารปรุงแต่งกลิ่นรสในอาหาร……	10
2.5	ตัวอย่างเนื้อสัตว์สังเคราะห์ *Fusarium venenatum* ……	10
2.6	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทาขนมปังจากสารสกัดจากยีสต์……	10
2.7	ตัวอย่างโปรตีนเซลล์เดี่ยวบริสุทธิ์สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ……..	11
2.8	ลักษณะของเซลล์ *Hansenula sp.* ……	11
2.9	วิถีแอสสิมิเลชั่นการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์……	15
2.10	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น……	16
2.11	โครงสร้างเคมีของกลีเซอรอล…….	17
2.12	เปรียบเทียบปริมาตรของน้ำหมัก และการเจริญของจุลินทรีย์ที่เวลาใด ๆ ในระหว่างกระบวนการหมักแบบต่าง ๆ …….	21
2.13	อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ที่ระยะเวลาใด ๆ ……	22
2.14	ตัวอย่างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร……	28
2.15	แสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในเครื่องเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ……...	30
2.16	ตัวอย่างใบพัดของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ……	30
4.1	เปรียบเทียบกราฟผลของการเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบแบตช์ เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 และ 80% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 และ 5.5……..	52
4.2	เปรียบเทียบกราฟผลของการเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบแบตช์ เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 และ 80% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 และ 5.5……..	53
4.3	เปรียบเทียบกราฟผลของการเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบแบตช์ เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 และ 80% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 …….……..	54

ภาพที่ หน้า

4.4 เปรียบเทียบกราฟผลของการเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบแบตช์ เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 g/L ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 และ 80% และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 55

4.5 การเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ที่มีการเติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3116 ml/min..... 62

4.6 การเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ที่มีการเติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 ml/min..... 62

4.7 การเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ที่มีการเติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 9 ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 ml/min..... 63

4.8 การเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ที่มีการเติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3221 ml/min ควบคุมค่า C:N ratio เท่ากับ 1.75..... 63

4.9 กราฟแสดงผลการคำนวณทางสถิติถึงอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง..... 66

4.10 กราฟแสดงผลการคำนวณทางสถิติถึงอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ต่ออัตราการเจริญจำเพาะ..... 66

4.11 กราฟแสดงผลการคำนวณทางสถิติถึงอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ต่ออัตราการผลิต... 67

4.12 กราฟแสดงผลการคำนวณทางสถิติถึงอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ต่อผลผลิตมวลเซลล์ 67

ข.1 อัตราการเจริญจำเพาะตลอดกระบวนการหมักของ *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 g/L ค่าออกซิเจนละลาย 40% และค่ากรด-เบส เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 83

ข.2 อัตราการเจริญจำเพาะในช่วง log phase ของการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 g/L ค่าออกซิเจนละลาย 40% และค่ากรด-เบส เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 83

ข.3 ผลผลิตมวลเซลล์ของการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 g/L ค่าออกซิเจนละลาย 40% และค่ากรด-เบส เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 84

ข.4 อัตราการผลิตของการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 g/L ค่าออกซิเจนละลาย 40% ค่ากรด-เบส เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 84

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

h^{-1}	ต่อชั่วโมง
M	โมลาร์
rpm	รอบต่อนาที
vvm	ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที
nm	นาโนเมตร
G	ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอล
P	ผลของค่ากรด-เบส
D	ผลของค่าออกซิเจนละลาย
GP	ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลร่วมกับค่ากรด-เบส
GD	ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลร่วมกับค่าออกซิเจนละลาย
DP	ผลของค่าออกซิเจนละลายร่วมกับค่ากรด-เบส

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันโลกกำลังเผชิญกับปัญหาการขาดแคลนอาหาร โดยปริมาณอาหารไม่เพียงพอต่อความต้องการของประชากรโลกที่เพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ เมื่อพิจารณาถึงแหล่งอาหารของมนุษย์ พบว่าทั้งพืชและสัตว์จัดเป็นแหล่งอาหารหลักของมนุษย์ สำหรับจุลินทรีย์นั้นมนุษย์นำมาประยุกต์ใช้สำหรับบริโภคเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อเกิดการขาดแคลนอาหารโดยเฉพาะอาหารประเภทโปรตีน จึงทำให้เกิดความพยายามที่จะใช้จุลินทรีย์ชนิดที่มีปริมาณโปรตีนในเซลล์สูงเพื่อใช้ทดแทนเป็นแหล่งอาหารโปรตีนของมนุษย์ เราเรียกจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารมนุษย์และสัตว์ว่า โปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single Cell Protien; SCP) และบางคนอาจใช้คำว่า Microbial Biomass Protein (MBP) จุลินทรีย์ที่กล่าวถึงมีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และสาหร่าย เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปัจจัยประกอบทั้งในด้านคุณค่าทางอาหาร ทางด้านการผลิต และความคุ้นเคยของผู้บริโภคจะพบว่า ยีสต์มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่ดี โดยมีคุณสมบัติที่ได้เปรียบกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ คือ ยีสต์มีอัตราการเจริญรวดเร็ว สามารถเจริญเติบโตได้ในภาวะที่เป็นกรด เซลล์ยีสต์มีองค์ประกอบของโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และเกลือแร่ในปริมาณที่สูง และยังประกอบด้วยวิตามินและกรดอะมิโนที่สำคัญอีกหลายชนิด ทั้งยังสามารถปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติที่ดีตามที่ต้องการได้โดยง่าย ยีสต์จึงถือเป็นจุลินทรีย์ที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย ทั้งอุตสาหกรรมอาหาร และยา การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากยีสต์เพื่อนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์โดยตรง หรือนำมาแปรรูปเป็นสารสกัดจากยีสต์ สารปรุงแต่งกลิ่นรส และสารเสริมภูมิคุ้มกัน

ยีสต์ในกลุ่มเมทิลโลโทรฟิกส์ยีสต์ (methylotrophic yeast) สายพันธุ์ *Hansenula polymorpha* มีผู้สนใจศึกษากลไกรวมถึงวิถีการทำงาน และนำยีสต์นี้มาใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากคุณลักษณะเฉพาะที่สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูง ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Generally Recognized As Safe organism; GRAS) และสามารถเลี้ยงให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูงในน้ำหมักหรือเรียกว่า “High cell density” ได้เป็นอย่างดี (Khongto และคณะ, 2010) นอกจากจะทำการเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดี่ยวจาก *H. polymorpha* เพื่อเป็นอาหารแล้ว *H. polymorpha* ได้รับการยอมรับและเลือกใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิต heterologus protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีประโยชน์ทางการแพทย์หรือเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น human epidermal growth factor (hEGF), gamma-linolenic acid, hepatitis B vaccine, insulin, hirudin, interferon α2a เป็นต้น (Youn

และคณะ, 2010; Khongto และคณะ, 2010; Chen และคณะ, 2008; Heo และคณะ, 2008; Muller และคณะ, 2002; Heijtink และคณะ, 2002; Kim และคณะ, 1998)

ที่ผ่านมามีการศึกษากระบวนการเพาะเลี้ยงยีสต์ โดยมีการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญที่แตกต่างกัน เช่น กากน้ำตาล (Ordaz และคณะ, 2001), น้ำหางนม (whey) (Revillion และคณะ, 2003), น้ำเสียจากโรงงานเยื่อกระดาษ (Harris และคณะ, 1948) และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือของเสียจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยเฉพาะกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Moon และคณะ, 2002) ตั้งแต่ต้นปี ค.ศ. 2004 ถึงกลางปี ค.ศ. 2009 ปัญหาราคาน้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมมีราคาปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง น้ำมันดิบจากราคา 30 เหรียญสหรัฐต่อบาร์เรล ขึ้นไปถึง 140 เหรียญสหรัฐต่อบาร์เรล (อนุสรณ์ แสงนิ่มนวล, 2553: ออนไลน์) บวกกับกระแสความตื่นตัวต่อปัญหาภาวะโลกร้อน นักวิจัยทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยทำการแก้ปัญหาโดยการใช้พลังงานจากแหล่งอื่น ไบโอดีเซลถูกเลือกเป็นแหล่งพลังงานทดแทนและเป็นที่ยอมรับจากทั่วโลก ในช่วงปี ค.ศ.1998 – 2002 ประเทศสหรัฐอเมริกามีการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นจาก 0.8 ล้านลิตร เป็น 121 ล้านลิตร และคาดว่าในปี ค.ศ. 2011 จะมีการผลิตสูงถึง 1.3 ล้านล้านลิตร (Celik และคณะ, 2008) สำหรับประเทศไทยได้จัดทำแผนปฏิบัติการพัฒนาและส่งเสริมการผลิตไบโอดีเซล ทั้งระดับชุมชนและในเชิงพาณิชย์ โดยคาดว่าในปี พ.ศ.2555 ประเทศไทยจะมีความต้องการไบโอดีเซลถึงวันละ 8.5 ล้านลิตร (แคทลียา, 2550) ในระหว่างกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชั่น ซึ่งได้จากการนำน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันที่เหลือจากการประกอบอาหาร มาทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ โดยมีกรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทุกๆ 3 โมลของเมทิลเอสเทอร์ จะได้ 1 โมลของกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 10 ของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด (Karinen และ Krause, 2006) จากกระบวนการที่เกิดขึ้นทำให้มีปริมาณกลีเซอรอลมากจนเกินความต้องการ การนำเอากลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาทำการกำจัดของเสียที่ปนเปื้อนเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์จนสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนของคนและสัตว์ หรือนำมาใช้สำหรับอุตสาหกรรมอื่นๆ ซึ่งน่าจะเป็นส่วนหนึ่งในการแก้ปัญหาการขาดแคลนอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศด้อยพัฒนา ที่เกิดจากการนำวัตถุดิบจากการเกษตรจำพวกธัญพืชซึ่งเป็นอาหารหลักของประชากรโลกมาใช้ในการผลิตพลังงาน และยังเป็นการใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เกิดประโยชน์ ด้วยกรรมวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมแทนการผลิตซึ่งใช้ปฏิกิริยาทางเคมี

จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยเฉพาะยีสต์ในกลุ่มเมทิลโลโทรฟิกส์ยีสต์ที่สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนและภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์และการผลิตผลิตภัณฑ์ทั้งในระดับขวดเขย่าและในระดับขยาย พบว่า กลีเซอรอลเป็นสารอาหารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญมากกว่ากลูโคส (Tang และคณะ, 2009; แคทลียา,

2550) ในการเพาะเลี้ยงนอกจากจะต้องคำนึงถึงการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแล้ว เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสูดหรืออีกนัยหนึ่ง คือเพื่อให้ได้ผลผลิตมวลเซลล์สูง ยังจำเป็นต้องศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญอื่น ๆ อีกด้วย การควบคุมความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อความต้องการของยีสต์ที่ทำการเลี้ยง (Claret และคณะ, 1992; Li และคณะ ,2007; Tang และคณะ, 2009; Hang และคณะ, 2009) ค่าละลายออกซิเจนในน้ำหมัก (Kyu และคณะ, 2010; Wang และคณะ, 2010; Tang และคณะ, 2009; Shang และคณะ, 2009; Knoll และคณะ, 2007; Jahic และคณะ, 2002) ความเป็นกรด-เบสในน้ำหมักที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตผลิตภัณฑ์นั้น ๆ (แคทลียา, 2550; Chen และคณะ, 2008; Hellmuth และคณะ, 2001; Moon และคณะ, 2002; Muller และคณะ, 2002) จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องทำการศึกษาก่อนที่จะทำการเพาะเลี้ยง

จากการเล็งเห็นถึงการนำ *H. polymorpha* มาประยุกต์ให้เกิดประโยชน์ในอนาคต และสนใจศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *H. polymorpha* เมื่อศึกษางานวิจัยต่างๆ ที่เคยมีมา เพื่อให้ได้กระบวนการเพาะเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาจลนพลศาตร์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง (kinetics of fermentation) ได้แก่ บทบาทของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารดัดแปลง mineral salts medium (Hellmuth และคณะ, 2001) ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก และความเป็นกรด-เบส ที่ส่งผลต่อการเจริญของ *H. polymorpha* ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน เพื่อให้ *H. polymorpha* มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ), ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) และอัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) สูงสุด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาและออกแบบกระบวนการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการเลี้ยงเซลล์ *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนโดยการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์และแบบต่อเนื่อง รวมถึงทำการขยายขนาดการผลิตเพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมให้มีประสิทธิภาพ และมีความหนาแน่นเซลล์สูงต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอล ออกซิเจนที่ละลาย และความเป็นกรด-เบสต่อการเพาะเลี้ยง *Hansenula polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน

1.3 วิธีดำเนินการวิจัย

1.3.1 ค้นคว้า และรวบรวมเอกสารสำหรับการวิจัย

1.3.2 ทำการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนในระบบ

แบตช์ โดยทำการศึกษา

1.3.2.1 ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

1.3.2.2 ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ออกซิเจนที่ละลาย และค่ากรด-เบสในน้ำหมัก

1.3.3 วิเคราะห์ผล สรุปผลงานวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบผลกระทบของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ความเป็นกรด-เบส และออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักที่ส่งผลต่อการเจริญของ *H. polymorpha* ในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single Cell Protein; SCP)

2.1.1 คำนิยามของโปรตีนเซลล์เดี่ยว

โปรตีนเซลล์เดี่ยวหรือ Single Cell Protein หมายถึง เซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งอุดมไปด้วยโปรตีน โดยโปรตีนเซลล์เดี่ยวนั้นสามารถผลิตได้จากเซลล์ของจุลินทรีย์หลากหลายประเภท ทั้งยีสต์ แบคทีเรีย รา และสาหร่าย นำมาผ่านกระบวนการทำให้แห้ง สามารถนำมาใช้เป็นอาหารเสริมหรืออาหารทดแทนของมนุษย์และสัตว์ แทนอาหารโปรตีนจากพืชและสัตว์ซึ่งมีราคาสูง นอกจากนั้นยังเป็นการลดระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต และพื้นที่สำหรับการเพาะปลูกพืชหรือเลี้ยงสัตว์สำหรับเป็นอาหารอีกด้วย การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวมีต้นทุนที่ต่ำ โดยสามารถใช้ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร ผลพลอยได้จากกระบวนการแปรรูปผลิตผลทางการเกษตร หรืออาจจะเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากภาคเกษตรกรรมโดยตรง นอกจากจะเป็นการแก้ปัญหาการขาดแคลนอาหารประเภทโปรตีนแล้ว ยังเป็นการกำจัดของเสียโดยใช้วิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

2.1.2 ประวัติของโปรตีนเซลล์เดี่ยว

การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว โดยเฉพาะการผลิตยีสต์สำหรับใช้บริโภคเป็นอาหารของมนุษย์และเป็นอาหารของสัตว์ เริ่มครั้งแรกที่ประเทศเยอรมนี ในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 ช่วงปี ค.ศ.1914-1916 เนื่องจากการเกิดสงครามทำให้อาหารขาดแคลน จึงได้ทำการผลิตเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* หรือเซลล์ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตขนมปัง เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสำหรับมนุษย์ โดยใช้กากน้ำตาลเป็นสับสเตรทหลักในการผลิต ต่อมาในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ก็ได้มีการพัฒนาการผลิต โดยใช้ *Candida utilis* หมักใน sulfite waste liquor ที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ และน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายไม้มาใช้เป็นสับสเตรท หลังจากนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวกันอย่างแพร่หลาย จนกระทั่งในปี ค.ศ.1968 ได้มีการก่อตั้งโรงงานผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวเกิดขึ้นในหลายๆ ประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา สวิสเซอร์แลนด์ ไต้หวัน สหภาพโซเวียต ญี่ปุ่น ฟินแลนด์ ฝรั่งเศส อังกฤษ และไทย เป็นต้น

2.1.3 **องค์ประกอบของโปรตีนเซลล์เดี่ยว** (สาโรจน์, 2547)

เซลล์ยีสต์มีองค์ประกอบของโปรตีน 45 – 55 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญหลายชนิด ทั้งไลซีน ทรีโอนีน ไอโซลิวซีน และลิวซีน เซลล์ยีสต์ยังประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 30 – 35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีองค์ประกอบของไกลโคเจนที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานของมนุษย์ ทั้งนี้ยีสต์ยังมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอีก 7.5 – 9 เปอร์เซ็นต์ กรดนิวคลีอิก 6 – 12 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 5 – 9.5 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 2 – 6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2.1) นอกจากนี้ยีสต์ยังประกอบด้วยวิตามินอีกหลายชนิด เช่น วิตามีนบีรวม และธาตุอาหารอื่น ๆ อย่างไรก็ดี ยีสต์ก็มีข้อบกพร่องอยู่บ้างที่มีปริมาณของเมไทโอนีนและซีสเทอีนค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้การนำมาใช้เป็นอาหารมนุษย์ก็ยังมีข้อจำกัดอยู่ คือ ยีสต์มีปริมาณของกรดนิวคลีอิกสูงเกินไป ซึ่งหากผู้บริโภคได้รับกรดนิวคลีอิกในปริมาณมาก ก็จะทำให้ระดับของกรดยูริกในเลือดสูงจนกระทั่งมีการตกผลึกเกิดขึ้นได้ ซึ่งจะก่อให้เกิดโรคได้หลายชนิด เช่น โรคเก๊าต์ โรคไขข้ออักเสบ และโรคนิ่วในทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น โดยระดับของกรดนิวคลีอิกที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคคือ 2 กรัมต่อวัน ซึ่งสามารถคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ได้ประมาณ 20 – 30 กรัม จึงพบงานวิจัยที่สนใจศึกษาการลดปริมาณกรดนิวคลีอิกในเซลล์ยีสต์ โดยอาศัยความร้อน การใช้เอนไซม์ และการใช้สารเคมีเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งจะทำให้การประยุกต์ใช้ยีสต์โปรตีนเซลล์เดี่ยวมีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบของโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ

องค์ประกอบ	รา	สาหร่าย	ยีสต์	แบคทีเรีย
โปรตีน	30 – 45	40 – 60	45 – 55	50 – 65
ไขมัน	2 – 8	7 – 20	2 – 6	1 – 3
เถ้า	9 – 14	8 – 10	5 – 10	3 – 7
กรดนิวคลีอิก	7 – 10	3 – 8	6 – 12	8 – 12

(ดัดแปลงจาก: Nasseri แลคณะ, 2011; Miller และ Litsky, 1976)

2.1.4 **การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว** (วราวุฒิ และกรวิกา, 2539)

ยีสต์สามารถเติบโตได้ดีทั้งบนสารอาหารที่เป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน อาทิ แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง และแป้งมันฝรั่ง เป็นต้น และสารอาหารคาร์โบไฮเดรตเชิงเดี่ยว เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลแลกโทส เป็นต้น นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถเติบโตได้โดยใช้ของเสียที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ชานอ้อย และน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น น้ำทิ้ง

จากโรงงานผลิตสุรา น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตแป้งมัน หางนมจากโรงงานนมและผลิตภัณฑ์นม น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตกระดาษ และจากผลพลอยได้ในอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น มีเทน อัลเคน เอทานอล และเมทานอล แต่การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากผลพลอยได้ในอุตสาหกรรมปิโตรเคมีจะไม่นิยมนำมาใช้เป็นอาหารมนุษย์ เนื่องจากอาจมีองค์ประกอบทางเคมีของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นอันตรายตกค้างปะปนอยู่ได้ อย่างไรก็ตาม วัตถุดิบที่นิยมนำมาใช้กันมากก็คือกากน้ำตาลที่ได้จากอ้อยหรือหัวผักกาดหวานจากโรงงานผลิตน้ำตาล ในที่นี้จะกล่าวถึงการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากวัตถุดิบต่าง ๆ ในระดับอุตสาหกรรมในประเทศแถวยุโรปและญี่ปุ่น (ตารางที่ 2.2) เช่น

- การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากอัลเคนส์ (n – alkanes) หรือ พาราฟินส์ (n – paraffins)

บริษัท British Petroleum Protein (BP) จำกัด ได้ทำการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากอัลเคนส์และพาราฟินส์ โดยใช้ *Saccharomycopsis (Candida) lipolytica* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน (stirred tank bioreactor) และจำหน่ายโดยมีชื่อทางการค้าว่า “Toprina”

- การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมทานอล

บริษัท Imperial Chemical Industries (ICI) จำกัด ประเทศอังกฤษ ทำการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้เมทานอลเป็นวัตถุดิบสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย *Methylophilus methylotrophus* ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีชื่อทางการค้าว่า “Pruteen” นิยมใช้แทนนมในการเลี้ยงลูกวัว

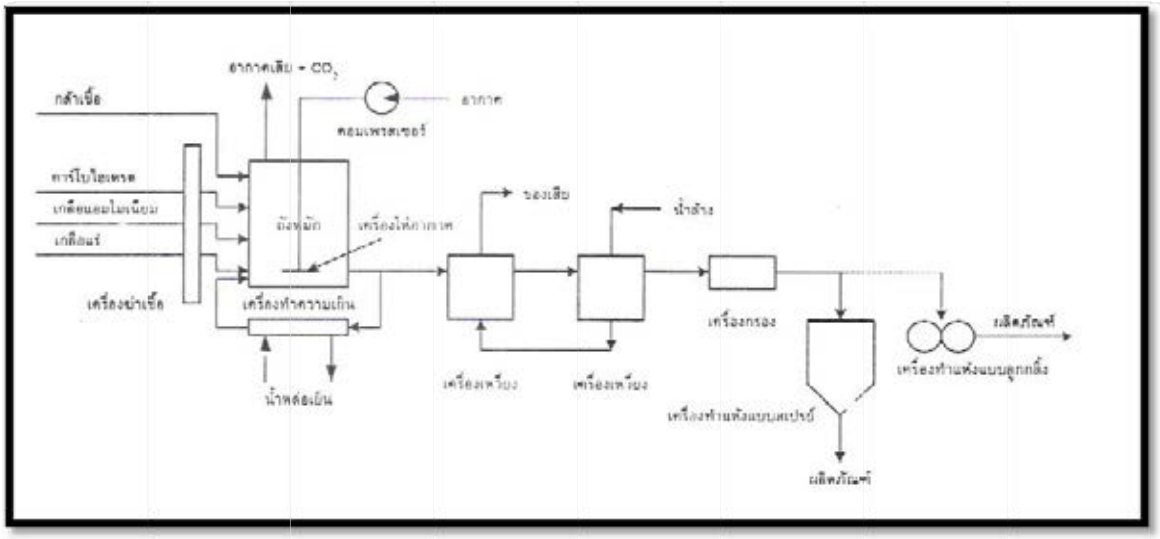
- การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยแป้ง

บริษัท Rank Hovis MC Dougall (RHM) จำกัด ในประเทศอังกฤษ ได้พัฒนาการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยแป้ง หรือเรียกว่า starch hydrolysates โดยเลือกใช้รา *Fusarium graminearum* โดยมีเป้าหมายที่จะทำผลิตภัณฑ์ให้มีลักษณะคล้ายเนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นมีชื่อทางการค้าว่า “Mycoprotein”

- การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากน้ำหางนม

มีการนำน้ำหางนมมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยใช้จุลินทรีย์หลายชนิด เช่น บริษัท Fromageries Le Bel จำกัด ประเทศฝรั่งเศส โดยใช้ *Kluyveromyces flagilis* และบริษัท Kiel จำกัด ประเทศเยอรมัน ใช้จุลินทรีย์ผสมระหว่างแบคทีเรีย *Lactobacillus bulgaricus* กับ *Candida krusei* ในขณะที่ บริษัท Vienna จำกัด ประเทศออสเตรีย ใช้ *Candida intermedia*

ผลิตภัณฑ์จาก *K. flagilis* ของ Fromageries Le Bel มีจำหน่ายมากว่า 10 ปีแล้วโดยใช้เป็นอาหารคน



ภาพที่ 2.1 แผนภาพขั้นตอนการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (สาโรจน์, 2547)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างของจุลินทรีย์และสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว

Microorganism	Substrate
Bacteria	
Aeromonas hydrophylla	Lactose
Acromobacter delvacvate	n-Alkanes
Acinetobacter calcoacenticus	Ethanol
Bacillus megaterium	Non-protein nitrogenous compounds
Bacillus subtilis, *Cellulomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Thermomonospora fusca*	Cellulose, Hemicellulose
Lactobacillus sp.	Glucose, Amylose, Maltose
Methylomonas methylotrophus, M. clara	Methanol
Pseudomonas fluorescens	Uric acid and other non-protein nitrogenous compounds
Rhodopseudomonas capsulata	Glucose
Fungi	
Aspergillus fumigatus	Maltose, Glucose
Aspergillus niger, A. oryzae, *Cephalosporium eichhorniae*, *Chaetomium cellulolyticum*	Cellulose, Hemicellulose
Penecillium cyclopium	Glucose, Lactose, Galactose
Rhizopus chinensis	Glucose, Maltose
Scytalidium aciduphlium, *Thricoderma viridae*, *Thricodermc alba*	Cellulose, pentose
Yeast	
Amoco torula	Ethanol
Candida tropicalis	Maltose, Glucose
Candida utilis	Glucose
Candida novellas	n-alkanes
Candida intermedia	Lactose
Saccharomyces cereviciae	Lactose, pentose, maltose
Algae	
Chlorella pyrenoidosa, *Chlorella sorokiana*, *Chondrus crispus*, *Scenedesmus* sp., *Spirulina* sp., *Porphyrium* sp.	Carbone dioxide through photosinthesis

(ที่มา: Nasseri และคณะ, 2011; Bhalla และคณะ, 2007)

2.1.5 **ข้อดีของการเลือกใช้ยีสต์ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว** (สาโรจน์, 2547)

จากที่กล่าวมาแล้วว่าโปรตีนเซลล์เดี่ยวสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละประเภทนั้นจะมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบของเซลล์ในปริมาณที่แตกต่างกัน ยีสต์มีโปรตีนประมาณ 45 - 55 เปอร์เซ็นต์ เช่น *C. utilis* มีโปรตีนอยู่ 50 - 52 เปอร์เซ็นต์ *H. polymorpha* มีโปรตีนอยู่ 42 เปอร์เซ็นต์ (แคทลียา, 2550) แบคทีเรียมีโปรตีนประมาณ 50 – 83 เปอร์เซ็นต์ เช่น *Methylomonas clara* มีโปรตีนอยู่ 70 – 72 เปอร์เซ็นต์ รามีโปรตีนประมาณ 31 – 55 เปอร์เซ็นต์ เช่น *F. graminearum* มีโปรตีนอยู่ 45 เปอร์เซ็นต์ และสาหร่ายมีโปรตีนประมาณ 47 – 63 เปอร์เซ็นต์ เช่น *Chlorella ellipsoids* เป็นต้น เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยด้านอื่น ๆ ไม่ว่าจะเป็นการยอมรับหรือความคุ้นเคยของผู้บริโภค การผลิต และทางด้านคุณค่าทางอาหารแล้ว พบว่ายีสต์มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวสำหรับเป็นแหล่งอาหารโปรตีน โดยมีคุณสมบัติที่ดีกว่าจุลินทรีย์ประเภทอื่น ๆ ดังนี้คือ

- ยีสต์มีอัตราการเติบโตเร็ว สามารถเติบโตได้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีส่วนประกอบง่าย ๆ ทั้งยังมีความต้องการวิตามินหรือธาตุอาหารต่าง ๆ น้อย
- เซลล์ยีสต์สามารถคลุกเคล้ากับอาหารเพาะเลี้ยงได้ดี และสามารแยกเซลล์ยีสต์ออกจากอาหารเพาะเลี้ยงได้ง่าย เนื่องจากเซลล์ยีสต์มีขนาดใหญ่แยกออกจากน้ำหมักได้โดยง่าย จึงเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิตได้เป็นอย่างดี
- ยีสต์สามารถต้านทานต่อการทำลายของไวรัสและเชื้ออื่นที่ปนเปื้อน เนื่องจากยีสต์สามารถเติบโตได้ในสภาวะที่เป็นกรด คือค่ากรด – เบสประมาณ 3.5 – 5.0 จึงเป็นการป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ดี ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงยีสต์ได้ทั้งในระบบปลอดเชื้อและระบบที่ไม่ปลอดเชื้อ
- ยีสต์มีความคงตัวสูงต่อการหมัก เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้แหล่งพลังงานจากสารอาหารที่เพาะเลี้ยงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เราสามารถใช้ยีสต์ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ดี
- ยีสต์มีคุณลักษณะของกลิ่นรสที่ดี ไม่เป็นพิษ และสามารถถูกย่อยได้ง่าย
- เซลล์ยีสต์มีองค์ประกอบของโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และเกลือแร่ในปริมาณที่สูง และยังประกอบด้วยวิตามินและกรดอะมิโนที่สำคัญอีกหลายชนิด เช่น ทรีโอนีน ไอโซลิซีน ลิวซีน เป็นต้น
- ยีสต์สามารถถูกปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติที่ดีตามต้องการได้โดยง่าย
- หลังจากผ่านกระบวนการผลิตที่ใช้ยีสต์แล้ว จะมีวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้อยมากหรือแทบจะไม่มีเลย

2.1.6 การประยุกต์ใช้โปรตีนเซลล์เดี่ยว

ปัจจุบันมีการนำโปรตีนเซลล์เดี่ยวมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น

ใช้เป็นอาหารเสริมในสัตว์ เนื่องจากเป็นโปรตีนที่ย่อยสลายและดูดซึมง่าย เร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ จึงช่วยลดระยะเวลาในการสืบพันธุ์ และยังช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันในสัตว์อีกด้วย (ภาพที่ 2.2)

http://biomaster2011.blogspot.com/2011/03/single-cell-protein-yeast.html

http://www.alibaba.com/showroom/cow-feed.html

ภาพที่ 2.2 ตัวอย่างอาหารของสัตว์เลี้ยงจากยีสต์สกัด

ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารสำหรับมนุษย์ มีโปรตีน วิตามินบี และกรดอะมิโน (ภาพที่ 2.3-2.6)

http://biomaster2011.blogspot.com/2011/03/single-cell-protein-yeast.html

ภาพที่ 2.3 ตัวอย่างสารสกัดจากยีสต์ที่ใช้เป็นส่วนประกอบสำหรับอาหารมังสวิรัต

http://biomaster2011.blogspot.com/2011_03_01_archive.html

ภาพที่ 2.4 ตัวอย่างสารสกัดจากยีสต์ที่ใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสในอาหาร

http://unmitigatedgrub.com/ingredients-2/

ภาพที่ 2.5 ตัวอย่างเนื้อสัตว์สังเคราะห์จากรา *Fusarium venenatum*

http://www.goodnessdirect.co.uk/

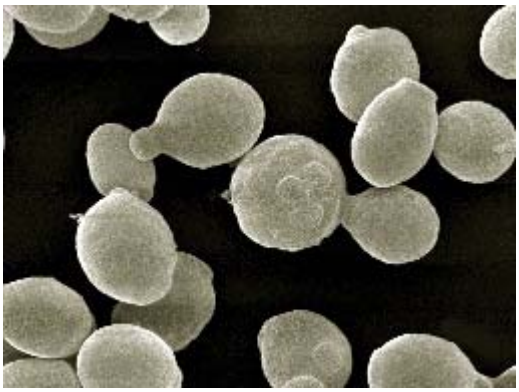
ภาพที่ 2.6 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทาขนมปังจากสารสกัดจากยีสต์

ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักทางชีวเคมี ซึ่งต้องการโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง สำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตยาปฏิชีวนะ และกรดอะมิโน (ภาพที่ 2.7)

http://www.appletonwoods.co.uk/acatalog/Alternative_Protein_Source_Peptones.html

ภาพที่ 2.7 ตัวอย่างโปรตีนเซลล์เดี่ยวบริสุทธิ์สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2 *Hansenula polymorpha*



http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=pichia&lang=1

ภาพที่ 2.8 ลักษณะของเซลล์ *Hansenula sp.*

H. polymorpha มีอนุกรมวิธานดังนี้ คือจัดอยู่ใน

อาณาจักร (Kingdom)	Fungi
ไฟลัม (phylum)	Ascomycota
คลาส (Class)	Saccharomycetes
ออร์เดอร์ (Order)	Saccharomycetales
แฟมิลี่ (Family)	Saccharomycetaceae
จีนัส (Genus)	*Hansenula*
สปีชีส์ (Species)	*Hansenula polymorpha*

H. polymorpha (*Pichia angusta)* เป็นยีสต์ที่มีลักษณะเซลล์กลมรี (oval shape) (ภาพที่ 2.8) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ (methylotrophic yeast) สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ ทั้งยังเป็น thermo tolerant yeast โดยสามารถเจริญในภาวะที่มีอุณหภูมิสูงระหว่าง 37 - 40 องศาเซลเซียส มีผู้สนใจศึกษากลไกรวมถึงวิถีการทำงาน และนำยีสต์นี้มาใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากคุณลักษณะเฉพาะที่สามารถใช้กลีเซอรอลและเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูง ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Generally Recognized As Safe organism; GRAS) และสามารถเลี้ยงให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูงในน้ำหมักหรือเรียกว่า “High cell density” ได้เป็นอย่างดี (Satyanarayana และ Kunze, 2009; แคทลียา, 2550; Khongto และคณะ, 2010) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง นิยมนำ *H. polymorpha* มาใช้ประโยชน์ในงานทางด้านพันธุวิศวกรรม เนื่องจากดีเอ็นเอจากแหล่งอื่นสามารถรวมเข้าไปในโครโมโซมได้หลายชุดและมีความคงตัว โปรตีนที่สร้างได้ไม่มีไกลคอซีเลตมากเกินไป (hyper – glycosylate) สามารถหลั่งโปรตีนและสะสมโปรตีนที่อาจเป็นอันตรายจากเอนไซม์ย่อยโปรตีนภายในเพอร์ออกซิโซม (peroxisome) (สาวิตรี, 2549) ดังแสดงตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตโปรตีนจากแหล่งอื่นใน *H. polymorpha* ในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การผลิตโปรตีนจากแหล่งอื่นใน *H. polymorpha*

	Product	Status	Brand name	Reference
Pharmaceutical	HBsAg *(adr)*	Launched	Hepa Vax Gene	Schaefer et al., 2002
	HbsAg *(adw)*	Launched		Schaefer et al., 2002
	Insulin	Launched	AgB	
	IFNα – 2a	Process transfer	Wosulin	Muller et al., 2001
	HSA	Pilot scale completed		Heo et al., 2003
	EGF	Lab scale completed		Heo et al., 2002
Food additive	Hexose oxidase	Launched	Grindamyl - Surebake	Cook and Thygesen, 2003
Feed additive	Phytase	Registration		Mayer et el., 1999
Enzymes	Levansucrase	Lab scale completed		Park et al., 2004

(ที่มา: Satyanarayana และ Kunze, 2009)

จากงานวิจัยของแคทลียา (2550) นำเซลล์ *H. polymorpha* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze Dryer และทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางอาหารในเซลล์, กรดไขมัน, กรดอะมิโน และวิตามิน ดังแสดงผลในตารางที่ 2.4-2.6

ตารางที่ 2.4 ปริมาณองค์ประกอบทางอาหาร ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการวิเคราะห์เซลล์ *H. polymorpha*

องค์ประกอบ	เปอร์เซ็นต์	กรดไขมัน	เปอร์เซ็นต์
โปรตีน	41.67	ปาลมิติก (Palmitic acid)	34.10
ไขมัน	16.49	ปาลมิโตเลอิก (Palmitoleic acid)	1.87
ความชื้น	72.34	สเตียร์ริก (Stearic acid)	3.47
เถ้า	3.08	โอเลอิก (Oleic acid)	37.13
คาร์โบไฮเดรต	38.76	ไลโนเลอิก (Linaleic acid)	17.37

(ดัดแปลงจาก: แคทลียา, 2550)

ตารางที่ 2.5 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน (Amino acid) ในเซลล์ *H. polymorpha*

กรดอะมิโน	ปริมาณ (mg/ 100g)	กรดอะมิโน	ปริมาณ (mg/ 100g)
Histidine*	27.46	Aspartic acid	201.30
Isoleucine*	590.24	Cystine	36.68
Leucine*	670.42	Glutamic acid	92.29
Lysine*	330.94	Glycine	158.31
Methionine*	<5.00	Methionine – Cystine	36.68
Phenylalanine*	716.48	Phenylalanine - tyrosine	822.24
Threonine*	81.88	Proline	<5.00
Tryptophan*	61.92	Serine	60.22
Valine*	281.47	Tyrosine	106.11
Alanine	312.18	Hydroxylysine	<5.00
Arginine	123.17	Hydroxyproline	<5.00

* หมายถึง กรดอะมิโนจำเป็น (Essential amino acid) (ที่มา: แคทลียา, 2550)

ตารางที่ 2.6 ชนิดและปริมาณวิตามินในเซลล์ *H. polymorpha*

วิตามิน	ปริมาณ (ppm)
Vitamin B1 (Thiamine)	<0.1
Vitamin B2 (Riboflavin)	0.9
Vitamin B3 (Niacin & Niacinamide)	<0.1
Vitamin B5 (Panthothenic acid)	2.0
Vitamin B6 (Pyridoxine)	<0.1
Vitamin B8 (Biotin)	32.5
Vitamin B9 (Folic acid)	84.9
Vitamin B12 (Cyanocobalamine)	<0.1

(ที่มา: แคทลียา, 2550)

จากผลการวิเคราะห์ข้างต้น เห็นได้ว่า *H. polymorpha* มีองค์ประกอบที่อุดมไปด้วยสารอาหาร กรดไขมัน กรดอะมิโน และวิตามินหลากหลายชนิดที่มีประโยชน์ เหมาะแก่การนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับคนและสัตว์ได้เป็นอย่างดี

2.3 เมแทบอลิซึมของกลีเซอรอลในเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ (แคทลียา, 2550)

กลีเซอรอลจัดเป็นสารสำคัญในการให้พลังงาน และการสังเคราะห์ไขมันในเซลล์ของยีสต์หลายชนิด นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการควบคุมสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ในเซลล์และวัฏจักรของสารอนินทรีย์จำพวกฟอสเฟต และยังพบว่า กลีเซอรอลเป็นสารเพียงชนิดเดี่ยวที่สามารถเมแทบอลิซึมและเข้าสู่ gluconeogenesis pathway นอกเหนือจากสารในกลุ่มพวกน้ำตาล

ยีสต์มีการนำกลีเซอรอลเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีแอคทีฟ ทรานส์สปอร์ต (active transport system) และสามารถแอสสิมิเลชั่นผ่านวิถีหลัก 3 วิถี คือ วิถี Phosphorylative โดยเอนไซม์ Glycerol kinase ส่วนอีก 2 วิถีเป็นวิถี Oxidative โดยเอนไซม์ $NADP^+$ - linked glycerol dehydrogenase หรือ $NAD(P^+)$ – linked glycerol dehydrogenase

สำหรับ *H. polymorpha* ซึ่งเป็นยีสต์ในจีนัส *Pichia* นั้นมีการแอสสิมิเลชั่นผ่านวิถี Phosphorylative โดยมีลำดับขั้นตอนการเปลี่ยนแปลง ดังนี้

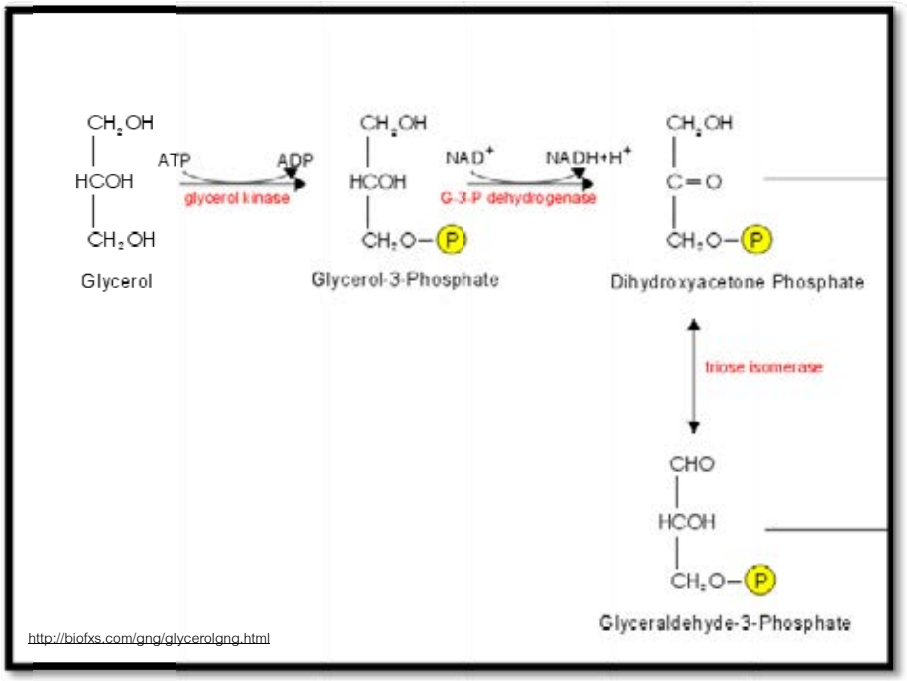
กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) ที่ผ่านเข้าสู่เซลล์ด้วยวิถีแอคทีฟทรานสปอร์ต จะถูกเปลี่ยนเป็นสาร glycerol–3–phosphate ($C_3H_9O_6P$) โดยเอนไซม์ glycerol kinase เร่งปฏิกิริยา และ ATP ซึ่งขั้นตอนนี้เกิดในส่วนของไซโตซอล

$$C_3H_8O_3 + ATP \longrightarrow C_3H_9O_6P + ADP$$

จากนั้น glycerol–3–phosphate เปลี่ยนเป็น dihydroxyacetone phosphate ($C_3H_7O_6P$) โดยมีเอนไซม์ glycerol–3–phosphate dehydrogenase เร่งปฏิกิริยา โดยขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในส่วนไมโทคอนเดรีย

$$C_3H_9O_6P + FAD \longrightarrow C_3H_7O_6P + FADH_2$$

ซึ่งสาร dihydroxyacetone phosphate ที่ได้จากการแอสสิมิเลชั่นกลีเซอรอล จัดเป็นสารตัวกลาง เหมือนกับการแอสสิมิเลชั่นเมทานอล จากนั้น dihydroxyacetone phosphate จะกลับเข้าสู่ไซโตซอลอีกครั้ง เพื่อเข้าสู่วิถี glycolysis หรือวิถี gluconeogenesis ต่อไป ดังแสดงแอสสิมิเลชั่นการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอล ดังภาพที่ 2.9

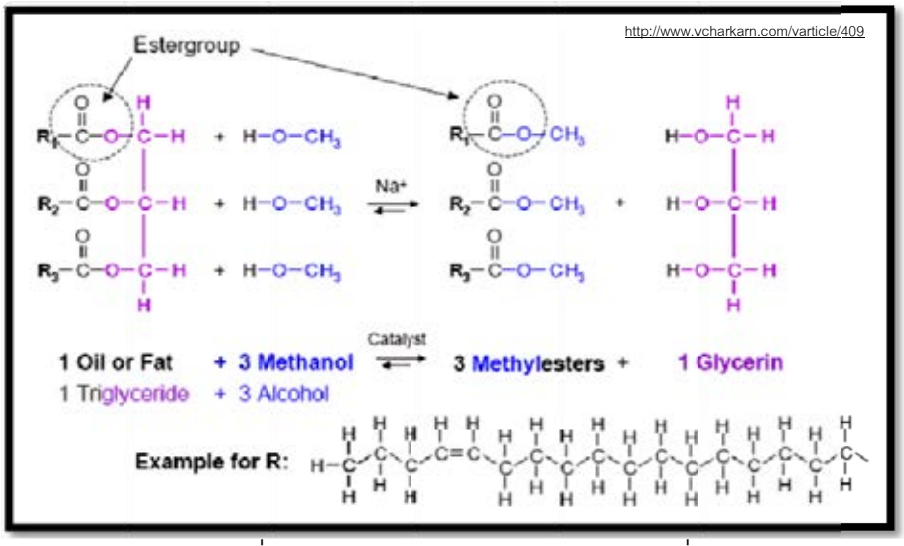


ภาพที่ 2.9 วิถีแอสสิมิเลชั่นการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์

2.4 กลีเซอรอล

2.4.1 กลีเซอรอลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น

นักวิจัยทั่วโลกได้ให้ความสนใจ นำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นมาใช้ในการแก้ไขวิกฤตพลังงาน ราคาน้ำมันดิบซึ่งใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงหลักของโลกได้ปรับตัวสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ตั้งแต่ต้นปี ค.ศ. 2004 ถึงกลางปี 2009 ปัญหาราคาน้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม มีราคาปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง น้ำมันดิบจากราคา 30 เหรียญสหรัฐต่อบาร์เรล ขึ้นไปถึง 140 เหรียญสหรัฐต่อบาร์เรล (อนุสรณ์ แสงนิ่มนวล, 2553: ออนไลน์) บวกกับกระแสความตื่นตัวต่อปัญหาภาวะโลกร้อน การแก้ปัญหาโดยการใช้พลังงานจากแหล่งอื่น จึงทำให้ไบโอดีเซลถูกเลือกเป็นแหล่งพลังงานทดแทนและเป็นที่ยอมรับจากทั่วโลก ในช่วงปี ค.ศ.1998 – 2002 ประเทศสหรัฐอเมริกามีการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นจาก 0.8 ล้านลิตร เป็น 121 ล้านลิตร และคาดว่าในปี 2011 จะมีการผลิตสูงถึง 1.3 ล้านล้านลิตร (Celik และคณะ, 2008) สำหรับประเทศไทยได้จัดทำแผนปฏิบัติการพัฒนาและส่งเสริมการผลิตไบโอดีเซล ทั้งระดับชุมชนและในเชิงพาณิชย์ โดยคาดว่าในปี พ.ศ. 2555 ประเทศไทยจะมีความต้องการไบโอดีเซลถึงวันละ 8.5 ล้านลิตร (แคทลียา, 2550) ในระหว่างกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชั่น ซึ่งได้จากการนำน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันที่เหลือจากการประกอบอาหาร มาทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ โดยมีกรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทุกๆ 3 โมลของเมทิลเอสเทอร์ จะได้ 1 โมลของกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 10 ของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด (Karinen และ Krause, 2006) (ภาพที่ 2.10)



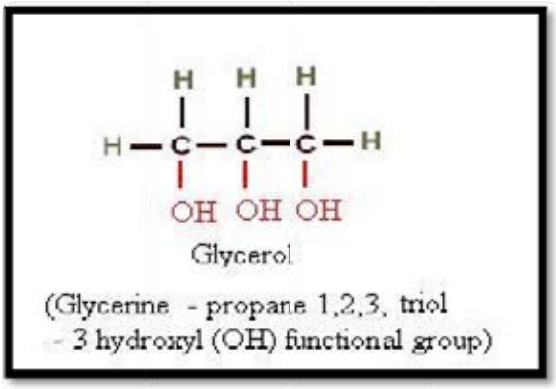
ภาพที่ 2.10 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชั่น

จากกระบวนการที่เกิดขึ้นทำให้มีปริมาณกลีเซอรอลมากจนเกินความต้องการ การนำเอากลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล มาทำการกำจัดของเสียที่ปนเปื้อนเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์จนสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนของ

คนและสัตว์ หรือนำมาใช้สำหรับอุตสาหกรรมอื่น ๆ จึงน่าจะเป็นส่วนหนึ่งในการแก้ปัญหาการขาดแคลนอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศด้อยพัฒนาที่เกิดการขาดแคลนอาหารจากการนำวัตถุดิบจากการเกษตร จำพวกธัญพืชซึ่งเป็นอาหารหลักของประชากรโลกมาใช้ในการผลิตพลังงาน และยังเป็นการใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการกำจัดของเสียที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

2.4.2 คำนิยามของกลีเซอรอล

กลีเซอรอล (Glycerol) หรือ กลีเซอรีน (Glycerine) เป็นสารประกอบอินทรีย์จำพวกพอลิไฮดริกแอลกอฮอล์ (polyhydric alcohol) มีสูตรเคมีเป็น $HOCH_2$ CHOH CH_2OH และชื่อทางเคมีว่า 1,2,3 – โพรเพนไตรออล (1,2,3 – Propanetriol) โดยมีสูตรโครงสร้างทางเคมี ดังภาพที่ 2.11



http://www.monashscientific.com.au/GlycerolMolecule.htm

ภาพที่ 2.11 โครงสร้างเคมีของกลีเซอรอล

2.4.3 การแบ่งประเภท คุณสมบัติทางกายภาพ และเคมีของกลีเซอรอล

(สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม, 2538; ศิริพงศ์ และ ฤดีมาศ, 2552)

สามารถแบ่งประเภทของกลีเซอรอล ได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

(1) **กลีเซอรอลดิบ** เป็นกลีเซอรอลที่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ได้แก่ กลีเซอรอลดิบจากการแยกสลายไขมัน (Hydrolyser Crude Glycerol) และกลีเซอรอลดิบจากอุตสาหกรรมสบู่ (Soap Lye Crude Glycerol)

(2) **กลีเซอรอลบริสุทธิ์** เป็นกลีเซอรอลที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ จนมีคุณสมบัติเหมาะสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยแบ่งเป็น 4 ชั้นคุณภาพ ได้แก่ ชั้นคุณภาพเคมี (Chemical Grade) ชั้นคุณภาพไดนาไมต์ (Dynamite Grade) ชั้นคุณภาพอุตสาหกรรม (Technical Grade) และชั้นคุณภาพยา (Pharmaceutical Grade) โดยขึ้นอยู่กับสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ ซึ่งแสดงองค์ประกอบได้ดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 คุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของกลีเซอรอลในชั้นคุณภาพต่าง ๆ

คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด			
	ชั้นคุณภาพเคมี	ชั้นคุณภาพไดนาไมต์	ชั้นคุณภาพอุตสาหกรรม	ชั้นคุณภาพยา
ค่าของสีโลวิบอนด์สเกลในเซลล์ขนาด 113 มิลลิเมตร ไม่เกิน	-	(5.0Y + 1.2R)	(5.0Y + 1.2R)	(5.0Y + 1.2R)
กลิ่น	ต้องไม่มีกลิ่นแปลกปลอม	ต้องไม่มีกลิ่นแปลกปลอม	ต้องไม่มีกลิ่นแปลกปลอม	ต้องไม่มีกลิ่นแปลกปลอม
กลีเซอรีนร้อยละโดยน้ำหนัก	99.0	99.0	99.0	95.0
ความหนาแน่นสัมพัทธ์ - ที่อุณหภูมิ 20/20 ^{0}C - ที่อุณหภูมิ 25/25 ^{0}C ไม่น้อยกว่า	1.261 ถึง 1.264 -	1.261 ถึง 1.264 -	1.261 ถึง 1.264 -	- 1.249
ความเป็นด่างหรือความเป็นกรดมิลลิอิควิวาเลนต์ต่อ 100 กรัม ไม่เกิน	0.064	0.32	0.32	-
เถ้าซัลเฟต มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	0.01	0.01	0.01	0.01
สารหนู มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	2.0	-	-	1.5
ตะกั่ว มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	1.0	-	-	-
โลหะหนักทั้งหมด (เทียบเป็นตะกั่ว) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	5.0	-	-	5.0
คลอไรด์ ร้อยละโดยน้ำหนัก ไม่เกิน	-	0.01	0.01	0.001
ขีดจำกัดปริมาณคลอไรด์ (chloride limit)	สารละลายที่ได้ต้องไม่ขุ่น	-	-	-

(ที่มา: สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม, 2538)

ตารางที่ 2.7 คุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของกลีเซอรอลในชั้นคุณภาพต่าง ๆ (ต่อ)

คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด			
	ชั้นคุณภาพเคมี	ชั้นคุณภาพไดนาไมต์	ชั้นคุณภาพอุตสาหกรรม	ชั้นคุณภาพยา
ขีดจำกัดปริมาณคลอไรด์อินทรีย์	สารละลายที่ได้ต้องไม่ขุ่นกว่าสารละลายอินทรีย์	-	-	-
สารประกอบคลอรีน (คำนวณเป็นคลอไรด์) ร้อยละโดยน้ำหนัก ไม่เกิน	-	-	-	0.003
เหล็ก มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	-	-	2.0	-
ซัลเฟต ร้อยละโดยน้ำหนัก ไม่เกิน	-	-	-	0.002
น้ำตาล	ต้องไม่พบ	-	-	-
ขีดจำกัดปริมาณสารรีดิวซ์	สีของสารละลายต้องไม่เข้มกว่าสีของสารละลายมาตรฐาน	สีของสารละลายต้องไม่เข้มกว่าสีของสารละลายมาตรฐาน	-	-
สะปอนิฟิเคชั่นอิควิวาเลนต์มิลลิอิควิวาเลนต์ต่อ 100 กรัม ไม่เกิน	0.64	0.64	-	-
กรดไขมันและเอสเทอร์	-	-	-	ทำปฏิกิริยาพอดีกับ NaOH 0.5 mol/dm ไม่เกิน 1 mol/cm^3

(ที่มา: สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม, 2538)

2.4.4 ประโยชน์ของกลีเซอรอล

กลีเซอรอลสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมได้อย่างกว้างขวาง เนื่องจาก เป็นของเหลว ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่เป็นพิษ และเป็นตัวทำละลายที่ดีต่อสารประกอบอินทรีย์และสารอนินทรีย์ นอกจากนี้ยังเป็นสารฮิวเมคแทนซี (humectancy) คือ เป็นสารที่ดูดน้ำจากอากาศเข้าสู่ผิวหนัง ดังที่กล่าวมานี้จึงทำให้กลีเซอรอลสามารถพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ต่อไปนี้

อาหาร กลีเซอรอล เป็นอาหารที่ย่อยง่ายและไม่เป็นพิษ สามารถนำไปผสมกับน้ำมันพืชหรือสัตว์เพื่อใช้บริโภคเป็นอาหาร นอกจากนี้ยังเป็นส่วนผสมของน้ำเชื่อมในลูกอมหรือใช้เป็นน้ำตาลไอซ์ซิ่งได้

ยาและเครื่องสำอาง กลีเซอรอลมักเป็นส่วนผสมในยาหลาย ๆ ชนิด เช่น ยาแก้ไอ ยาชา ยาหยอดหู เป็นต้น ส่วนในด้านเครื่องสำอาง กลีเซอรอลจะช่วยรักษาผิวหนังให้ชุ่มชื้น หรืออาจจะผสมในยาสีฟันเพื่อให้ข้นเหนียวและช่วยให้ฟันมีความเงางาม

ยาสูบ กลีเซอรอลจะนำไปใช้ในกระบวนการผลิตยาสูบ โดยจะนำไปพ่นที่ใบยาสูบก่อนที่จะบรรจุ เพื่อป้องกันไม่ให้ยาสูบนั้นหักระหว่างการบรรจุ นอกจากนี้ยังเป็นตัวช่วยรักษาความชุ่มชื้นและรสชาติในยาสูบไว้อีกด้วย

วัสดุหีบห่อ กลีเซอรอลมักเป็นสารเติมแต่งในอุตสาหกรรมการผลิตวัสดุหีบห่อ เนื่องจากกลีเซอรอลจะทำให้ยืดหยุ่น และเหนียว

สารหล่อลื่น กลีเซอรอลสามารถนำไปใช้เป็นสารหล่อลื่นได้ เช่น ปั๊ม หรือเครื่องอัดแก๊สออกซิเจน เนื่องจากมีความหนืดสูง และยังรักษาสภาพเป็นของเหลวได้ ณ อุณหภูมิต่ำ

อื่น ๆ ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ กลีเซอรอลยังสามารถใช้เป็นน้ำมันประสาน (textile oil) ในกระบวนการถัก ทอผ้าได้อีกด้วย

2.5 การหมักหรือการเพาะเลี้ยง (Fermentation or cultivation)

เป็นกระบวนการแปรสภาพทางชีวเคมี อันเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น เอนไซม์ สารปฏิชีวนะ กรดอะมิโน น้ำส้มสายชู รวมถึงสารที่ให้พลังงานทั้งแอลกอฮอล์ และก๊าซชีวภาพ ล้วนแล้วแต่อาศัยการหมัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งระบบการหมักในสภาพอาหารเหลว ซึ่งมีระบบการหมักที่วัตถุดิบ (แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน) ที่ใช้ในการหมักละลายอยู่ในอาหารเหลว เพื่อให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเจริญเติบโต และทำการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการต่อไป (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

หากแบ่งชนิดของการหมักตามกระบวนการที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง สามารถแบ่งเป็น 3 ประเภทหลัก ๆ ได้แก่ การหมักแบบแบตช์ (batch) การหมักแบบเฟดแบตช์หรือแบบครั้งคราว (fed batch) และการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous) (ภาพที่ 2.12) โดยการหมักแบบแบตช์เป็นระบบปิด ปริมาตรของอาหารจะคงที่ ส่วนการหมักแบบเฟดแบตช์เป็นการเพาะเลี้ยงระบบเปิด จะแตกต่างจากแบบแบตช์ตรงที่ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการเติมสารอาหารลงไปในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ทำให้ปริมาตรของน้ำหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเพิ่มขึ้น และการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นระบบเปิด ซึ่งสารอาหารจะถูกเติมเข้าไปในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพตลอดเวลา และมีการถ่ายน้ำหมักออกจากเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพอย่างต่อเนื่องไปพร้อมกัน เพื่อควบคุมให้ปริมาตรของน้ำหมักภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพคงที่ โดยในที่นี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ แบบเฟดแบตช์เท่านั้น

ภาพที่ 2.12 เปรียบเทียบปริมาตรของน้ำหมัก และการเจริญของจุลินทรีย์ที่เวลาใด ๆ ในระหว่างกระบวนการหมักแบบต่าง ๆ

2.5.1 **การหมักแบบแบตช์** (batch cultivation)

เมื่อศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ในการหมักแบบแบตช์ โดยทำการติดตามอัตราการเจริญแล้วนำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ที่ระยะเวลานั้น ๆ จะได้กราฟแสดงการเจริญของจุลินทรีย์ที่แบ่งออกเป็น 4 ระยะ (ภาพที่ 2.13) ได้แก่

http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/images/bacterial%20growth%20curve.jpg

ภาพที่ 2.13 อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ที่ระยะเวลาใด ๆ

(1) Lag phase เป็นระยะเริ่มต้นที่ทำการถ่ายกล้าเชื้อจุลินทรีย์ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ จุลินทรีย์จะมีการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ ๆ จำนวนของจุลินทรีย์ยังคงที่ เนื่องจากยังไม่มีการแบ่งตัว แต่เซลล์อาจมีขนาดใหญ่ขึ้น ระยะ lag phase จะนานเพียงใดขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและชนิดของจุลินทรีย์ เราสามารถลดระยะเวลาในระยะนี้ได้โดยการเลือกใช้กล้าเชื้อที่เหมาะสม

(2) Exponential phase (log phase) เป็นระยะที่จุลินทรีย์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ในอัตราเอ็กโพเนนเชียลในลักษณะที่มีการเพิ่มเป็นทวีคูณ อัตราการเติบโตเชิงปริมาตรจะเพิ่มขึ้น ในขณะที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจะคงที่ ในระยะนี้จะมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด

(3) Stationary phase เป็นระยะที่มีจำนวนจุลินทรีย์สูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวน คืออัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปเกือบหมด และอาจมีการขับของเสียที่เป็นพิษออกมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม

(4) Death phase เป็นระยะเวลาที่จุลินทรีย์ตายอย่างรวดเร็ว สาเหตุการตายอาจเนื่องมาจากสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์หมดไป และเกิดการสะสมของเสีย และสารพิษที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม

การหมักแบบแบตช์เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ระบบปิด (closed system) เป็นระบบที่ส่วนประกอบที่สำคัญในการหมัก ไม่สามารถนำเข้าหรือเอาออกจากระบบได้ ยกเว้นมีการเติมกรดและเบสที่ใช้ในการควบคุมค่ากรด – เบส และสารต้านการเกิดฟอง และมีการเก็บตัวอย่าง

น้ำหมักในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงเพียงเล็กน้อย จะเห็นว่าอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ในการหมักระบบปิด จะอยู่ในสภาวะที่ไม่คงที่สม่ำเสมอ กล่าวคือ จุลินทรีย์ได้รับสารอาหาร (growth limiting substrate) ที่เหมาะสมปริมาณหนึ่งในช่วงแรกของการหมักเท่านั้น ซึ่งเป็นผลให้เซลล์เจริญด้วยอัตราการเจริญจำเพาะสูงสูด ที่สภาวะนั้นอัตราการเจริญจะเป็นแบบทวีคูณ (exponential growth or log phase) พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารที่เหลืออยู่ เมื่อสารอาหารเหลือน้อยลงจนกระทั่งสารอาหารหมดและได้ปริมาณเซลล์สูงสุด เซลล์จะเข้าสู่สภาวะ stationary phase และ death phase ในที่สุด นอกจากสารอาหารลดลงแล้ว ในระหว่างที่จุลินทรีย์เจริญอาจมีการสะสมสารพิษ ซึ่งเป็นอีกสาเหตุหนึ่งในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วย ดังนั้นอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate) จึงถูกจำกัดด้วยปริมาณของสารอาหารตั้งต้น คือ ถ้ามีสารอาหารตั้งต้นมาก ๆ น่าจะส่งผลให้อัตราการเจริญจำเพาะสูง เนื่องจากสารอาหารไม่เป็นปัจจัยจำกัดในการเจริญ แต่การเพิ่มสารอาหารตั้งต้นมากเกินไปกลับส่งผลให้อัตราการเจริญลดลง (Claret และคณะ, 1992; Chiruvolu และคณะ, 1998; Li และคณะ, 2007; Tang และคณะ, 2009) ดังนั้นการหมักแบบแบตช์จึงมีข้อจำกัด คือไม่สามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดไว้ได้นานมากกว่าเดิม และเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง ถึงแม้ว่าเพิ่มปริมาณอาหารตั้งต้นจะสามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดไว้ได้ในช่วงสั้น ๆ แต่เมื่อสารอาหารตั้งต้นมากเกินไปกลับส่งผลให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดลดลงหรือเกิดปฏิกิริยาที่เรียกว่า substrate inhitbition

ในสภาวะหนึ่งที่มีสารอาหารที่เหมาะสมมากเกินพอ จุลินทรีย์จะสามารถเพิ่มจำนวนด้วยอัตราคงที่สูงสุด (maximum specific growth rate) และในช่วงระยะของการเจริญสูงสุดนี้น้ำหนักเซลล์และจำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างเป็นสัดส่วนกัน

ค่าคงที่ของการเจริญจำเพาะ ณ ช่วงเวลาใด ๆ (instantaneous specific growth rate,μ) หาได้จาก

$$\mu = (1/x)\, dx/dt$$

เมื่อ x คือ ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)

t คือ เวลา (ชั่วโมง)

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

Integrate สมการ จะได้

$$\ln (x_t) = \ln (x_0) + \mu t$$

หรือ

$$X_t = x_0 \, e^{\mu t}$$

อัตราการเจริญจำเพาะสามารถหาได้จากการเขียนกราฟระหว่างเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (t) บนแกน x ปกติ และความเข้มข้นของเซลล์ (x) บนแกน y ที่เป็นแกน natural log

นอกจากอัตราการเจริญจำเพาะแล้วยังมีพารามิเตอร์อื่น ๆ ที่สามารถหาได้โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในช่วง log phase คือ

(1) ระยะเวลาที่ใช้ในการแบ่งเซลล์ (generation or doubling time; t_d) หมายถึง เวลาที่ใช้ไปในการเพิ่มปริมาณของเซลล์เป็น 2 เท่า ซึ่งหาได้โดยกำหนดให้ $x = 2X_0$ เมื่อ $t = t_d$ แล้วแทนค่าในสมการ

$$\ln 2X_0 / X_0 = \mu t_d$$

จะได้

$$t_d = \ln 2 / \mu = 0.693 / \mu$$

(2) ผลได้ของเซลล์จากสารอาหารตั้งต้น (biomass yield; $Y_{X/S}$) หมายถึง สัดส่วนระหว่างปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (ΔX) ต่อปริมาณสารอาหารตั้งต้นที่ถูกใช้ไป (ΔS) จะได้ว่า

$$Yx/s = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X - X0}{S0 - S}$$

เมื่อ X_0, S_0 คือ ปริมาณเซลล์และสารอาหารที่เวลา t = 0 (กรัมต่อลิตร)

X, S คือ ปริมาณเซลล์และสารอาหารที่เวลาใด ๆ (กรัมต่อลิตร)

และ สามารถคำนวณหาค่า $Y_{X/S}$ โดยการเขียนกราฟระหว่าง X และ S จะได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าความชัน เท่ากับ $Y_{X/S}$

(3) ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสารอาหารตั้งต้น (product yield; $Y_{P/S}$) หมายถึง สัดส่วนระหว่างปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น (ΔP) สารอาหารตั้งต้นที่ถูกใช้ไป (ΔS) จะได้ว่า

$$Yp/s = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P - P0}{S0 - S}$$

และ สามารถคำนวณหาค่า $Y_{P/S}$ โดยการเขียนกราฟระหว่าง P และ S จะได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าความชัน เท่ากับ $Y_{P/S}$

การสร้างผลิตภัณฑ์ของเซลล์ในกระบวนการหมักแบบแบตช์ สามารถเกิดขึ้นได้พร้อม ๆ กับการเจริญเติบโตของเซลล์ เรียกว่า primary metabolites โดยปกติพบว่า ผลิตภัณฑ์นี้จะถูกสร้างในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์พลังงานของเซลล์ โดยที่ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์จะสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของเซลล์ในช่วง log phase หรืออาจกล่าวได้ว่า อัตราจำเพาะของการสร้างผลิตภัณฑ์สัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างหลังจากที่เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดหรืออยู่ในช่วง stationary phase เรียกว่า secondary metabolites

2.5.2 **การหมักแบบเฟดแบตช์** (fed batch cultivation)

การหมักแบบเฟดแบตช์มีลักษณะคล้ายกับการหมักแบบแบตช์แต่มีการเติมสารอาหารเข้าไปในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง การเติมสารอาหารให้แก่เซลล์อย่างต่อเนื่องเป็นระยะ ๆ เมื่อสิ้นสุดการเจริญใน batch culture โดยไม่มีการถ่ายเทอาหารออกจากเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งเป็นผลให้ปริมาตรภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเพิ่มขึ้น โดยสารที่เติมส่วนใหญ่มีเพียงแหล่งคาร์บอนมากกว่าที่จะเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามปกติแล้วสารอาหารที่ใช้เติมจะเตรียมให้มีความเข้มข้นสูงสุดเท่าที่จะทำให้การเพาะเลี้ยงสามารถดำเนินไปได้ เพื่อทำให้ปริมาตรของน้ำหมักเพิ่มขึ้นน้อยที่สุด ทั้งนี้ความเข้มข้นของสารอาหารที่นิยมใช้จะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 30 – 50 เปอร์เซ็นต์ นิยมทำการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์เพื่อทำการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว และเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ เพราะสามารถควบคุมระดับความเข้มข้นของสารอาหารให้อยู่ในระดับที่ต้องการได้โดยการเติมสารอาหารเพิ่มเข้าไปตามต้องการ

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์ (x) ใน fed batch culture ณ เวลา (t) ใด ๆ เป็นผลมาจากการเจริญของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นตามปริมาตร (v) ดังสมการ

$$\frac{d(Vx)}{dt} = \mu xV$$

$$x\frac{dV}{dt} + V\frac{dx}{dt} = \mu xV$$

$$x \cdot F + V\frac{dx}{dt} = \mu xV$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - Dx$$

ในการหมักแบบเฟดแบตช์ปริมาณเซลล์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก แต่ความเข้มข้นของเซลล์จะค่อนข้างคงที่ ($dx/dt \approx 0$) เนื่องจากปริมาตรในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเพิ่มขึ้นเช่นกัน ดังนั้นอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์จึงสามารถถูกควบคุมโดย dilution rate หรืออัตราการเติมสารอาหารเช่นเดียวกับในกรณีของการหมักแบบต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญจำเพาะของการหมักแบบเฟดแบตช์จะลดลงซึ่งเป็นผลมาจากปริมาตรที่เพิ่มขึ้น จึงเป็นการแก้ปัญหาการเกิด substrate inhibition ในการหมักแบบแบตช์ โดยมีการดัดแปลงการหมักแบบแบตช์ใช้ปริมาณสารอาหารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นต่ำ เพื่อไม่ให้ความเข้มข้นของสารอาหารตั้งต้นมีผลไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จากนั้นมีการเติมสารอาหารเข้าไปในระหว่างการเพาะเลี้ยง เพื่อเพิ่มปริมาณสารอาหาร หรือเพื่อเป็นตัวกระตุ้นให้มีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ เช่น ในงานวิจัยของ Ayed และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาการผลิต human interferon α2b เพื่อให้ได้ความหนาแน่นเซลล์สูงโดยใช้ *Pichia pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ โดยในช่วงการหมักแบบแบตช์ ทำการเก็บตัวอย่างนำมาวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร เมื่อพบว่าค่าความขุ่นของน้ำหมักมีค่าประมาณ 80 จึงทำการเติมกลีเซอรอลเพิ่มเข้าไปเพื่อเพิ่มการเจริญของยีสต์ หลังจากนั้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเติมเมทานอลเข้าไปเพื่อกระตุ้นการผลิต human interferon α2b และในงานวิจัยของ Li และคณะ (2007) ศึกษากระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ของ *Rhodosporidium toruloides* Y4 เพื่อให้ได้ความหนาแน่นเซลล์สูง เนื่องจากในกระบวนการหมักแบบแบตช์เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสซึ่งเป็นสารอาหารตั้งต้นมากกว่า 150 กรัมต่อลิตร ส่งผลยับยั้งการเจริญของ *R. toruloides* จึงแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นโดยทำการหมักแบบเฟดแบตช์ เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 134 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง, cellular lipid content และ lipid productivity เป็น 106.5 กรัมต่อลิตร, 67.5 % (w/w) และ 0.54 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ เป็นต้น นอกจากจะเป็นการควบคุมเมแทบอลิซึมในการเจริญของจุลินทรีย์ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ยังเป็นการควบคุมอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพระหว่างการ

เพาะเลี้ยงอีกด้วย คือเป็นการหลีกเลี่ยงปัญหาด้านข้อจำกัดของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ได้แก่ ระบบหล่อเย็น และระบบการให้อากาศ ในหลายกระบวนการพบว่าอัตราการเติบโตที่สูงเกินไปทำให้เกิดการคายความร้อนในปริมาณมากกว่าความสามารถในการควบคุมอุณหภูมิภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ รวมถึงอัตราการเติบโตที่สูงเกินไปทำให้ความต้องการออกซิเจนมากกว่าความสามารถในการเติมออกซิเจนของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

โดยรูปแบบการควบคุมการหมักแบบเฟดแบตช์สามารถแบ่งออกได้ 2 วิธี ได้แก่

(1) การควบคุมแบบย้อนกลับ (feedback regulation) เป็นการควบคุมอัตราการเติมสารอาหารโดยตอบสนองย้อนกลับกับความเข้มข้นของสารอาหารภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่เกิดการเปลี่ยนแปลง ส่วนใหญ่จะเป็นระบบที่มีการทำงานอัตโนมัติโดยอาศัยการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับความเข้มข้นของสารอาหารโดยตรงหรือวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทางอ้อม เช่น ค่าออกซิเจนละลายในน้ำหมัก หรือค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำหมัก เป็นต้น

(2) การควบคุมที่มีการกำหนดรูปแบบการเติมไว้ล่วงหน้า ซึ่งอาจมีการเติมสารอาหารเป็นระยะ (intermittent addition) หรือเป็นการควบคุมการเติมสารอาหารแบบต่อเนื่องโดยใช้ปั๊มด้วยอัตราคงที่ (constant feed rate) หรือเป็นการควบคุมการเติมสารอาหารแบบต่อเนื่องโดยใช้ปั๊มที่มีอัตราการเติมสารอาหารเป็นแบบอัตราเอ็กโพเนนเชียล (exponential feed rate) เป็นต้น

ในการหมักแบบเฟดแบตช์ เมื่อต้องการควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารให้คงที่ จำเป็นจะต้องมีการปรับอัตราการเติมสารอาหารตลอดเวลา เนื่องจากทั้งปริมาตรของน้ำหมักและความเข้มข้นของเซลล์เปลี่ยนแปลงตลอดเวลา โดยอัตราการใช้สารอาหารจะเพิ่มขึ้นในอัตราเอ็กโพเนนเชียลตามรูปแบบการเติบโตแบบเอ็กโพเนนเชียลของเซลล์ ซึ่งสามารถคำนวณหาอัตราการเติมสารอาหารในอัตราเอ็กโพเนนเชียลระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง โดยอาศัยสมดุลมวลของสารอาหารตั้งต้น ได้ดังนี้

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V}(Si - S) - \frac{\mu X}{Yx/s}$$

เมื่อ

S = ความเข้มข้นของสารอาหาร (กรัมต่อลิตร)

t = ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มทำการเติมสารอาหาร (ชั่วโมง)

F = อัตราการเติมสารอาหาร (ลิตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตรน้ำหมัก (ลิตร)

S^i = ความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารที่ใช้เติม (กรัมต่อลิตร)

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

Yx/s = ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (กรัมเซลล์ต่อกรัมสารอาหาร)

X = ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)

ภายใต้ภาวะที่สารอาหารมีอยู่อย่างจำกัดจะทำให้ค่า $S \approx 0$ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาให้ความเข้มข้นของสารอาหารในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพคงที่จะได้ $dS/dt = 0$ จากภาวะดังกว่าทำให้เราสามารถหาอัตราการเติมสารอาหารเริ่มต้น (F_0) ได้ดังสมการ

$$F_0 = \frac{\mu X_0 V_0}{Yx/s\ S^i}$$

เนื่องจากในกระบวนการหมักแบบเฟด – แบตช์ ทั้งปริมาตรและความเข้มข้นของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ซึ่งทำให้อัตราการเติมสารอาหารเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาด้วย หรืออาจกล่าวได้ว่าอัตราการเติมสารอาหารเป็นฟังก์ชันของเวลา ซึ่งสามารถคำนวณอัตราการเติมสารอาหารได้จากสมการ

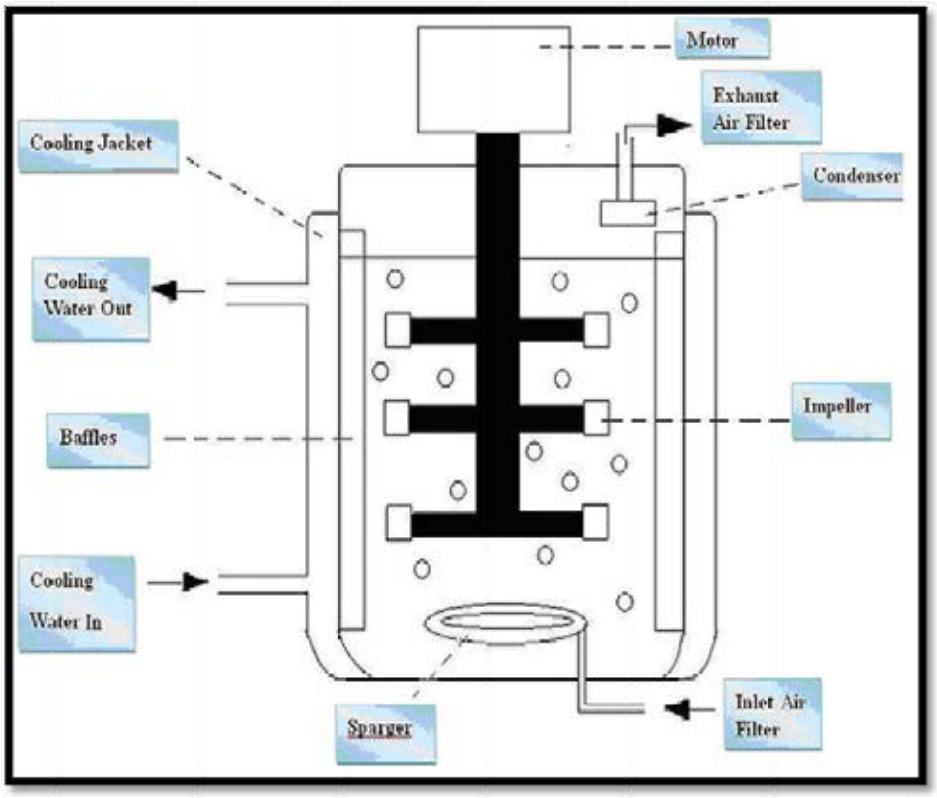
$$F(t) = F_0 e^{\mu t}$$

2.6 **เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน** (stirred tank bioreactor)

*(*สาวิตรี, 2549; วราวุฒิ และกรวิกา, 2539)

ภาพที่ 2.14 ตัวอย่างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร

ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องเลี้ยงในภาชนะและสามารถควบคุมสภาพต่าง ๆ ในการผลิตได้ ภาชนะนี้เรียกว่า เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ในอุตสาหกรรมนิยมใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน (ภาพที่ 2.14) เนื่องจากค่าใช้จ่ายสำหรับพลังงานในการกวนและการให้อากาศไม่สูง ถังชนิดนี้มีรูปร่างทรงกระบอกที่ตรงก้นถังเกือบตรงหรือโค้งเล็กน้อย การควบคุมอุณหภูมิทำโดยมี**แจ็กเกต**ให้ความร้อนและความเย็น มักมี**แผ่นกัน** (baffle) ยื่นจากผนังของตัวถังเข้าไปจำนวน 4 อัน เพื่อป้องกันการเกิดกระแสวนของของเหลวที่มีลักษณะเป็นรูปกรวยขนาดใหญ่ (large vortexing) ตรงกลางถังเนื่องจากแรงเหวี่ยง การทำให้ของเหลวในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเกิดการเคลื่อนไหวหรือการผสมทำโดยใช้**ใบพัด** (impeller) ที่ติดอยู่ตรงเพลาตรงกลางถัง จำนวนใบพัดขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของถัง **ใบกวน** (stirrer) มีหลายแบบแบ่งได้คร่าว ๆ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ turbine impeller และกลุ่มที่สองคือ axial flow impeller สำหรับ turbine impeller เป็นใบพัดที่ทำให้มีการกระจายของแก๊สซึ่งดัดแปลงมาจากใบพัดแบบธรรมดา (simple paddle) โดยมีแผ่นขนาดเล็กที่วางในแนวตั้งรอบแกน บางชนิดอาจเป็นใบพัดติดอยู่บนแผ่นกลมที่มีอยู่ในแนวนอนที่ระยะเท่า ๆ กัน เช่นใน rushton disc turbine และ concave bladed turbine สำหรับกลุ่มที่เป็น axial flow impeller แบบแผนของการไหลที่เป็นหลักคือของเหลวไหลขึ้นที่บริเวณข้างผนังถังและไหลลงตรงกลางรอบ ๆ แกนเครื่องกวนดังนั้นการผสมที่บริเวณแกนจะเกิดขึ้นได้ดีมากกว่า turbine impeller ซึ่งมีแนวโน้มจะทำให้เกิดจุดอับ (dead zone) ซึ่งเป็นบริเวณที่ของเหลวไม่มีการเคลื่อนที่ สำหรับของเหลวที่มีความหนืดน้อยอาจใช้ marine impeller ส่วนของเหลวที่มีความหนืดมากมักใช้ hydrofoil impellers ส่วนกระบวนการให้อากาศหรือแก๊สอื่น ๆ คือ ทำการพ่นแก๊สผ่าน**ตัวพ่น** (sparger) เข้าไปที่ก้นถังในระดับที่ต่ำกว่าใบพัดซึ่งอยู่ต่ำสุดของถัง ตัวพ่นอาจมีลักษณะเป็นท่อขดเป็นวงแหวน หรือเป็นแผ่น (ภาพที่ 2.15-2.16)



http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=36

ภาพที่ 2.15 แสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

Rushton disc turbine

Hydrofoil impellers

Axial flow impeller

Blade Radial Impeller

Marine impeller

concave bladed turbine

http://www.deryakrom.com.tr/en/?page_id=468

ภาพที่ 2.16 ตัวอย่างใบพัดของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

2.7 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของ *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน

2.7.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.7.1.1 ประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบ่งตามองค์ประกอบของอาหาร แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

(1) Synthetic medium หรือ Basal salt medium หรืออาหารสังเคราะห์ อาหารในกุล่มนี้เป็นอาหารที่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน โดยส่วนประกอบหลักเป็นเกลือต่าง ๆ และวิตามิน

(2) Non – synthetic medium หรือ Enrich medium อาหารในกลุ่มนี้ไม่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน โดยส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารในกลุ่มนี้ คือ ยีสต์สกัด เปปโตน และแหล่งคาร์บอน เช่น อาหารในกลุ่มนี้นิยมใช้ในการเก็บรักษาสายพันธุ์ การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น และการเพาะลี้ยงในระบบที่ไม่สามารถควบคุมค่าความเป็นกรด – เบส นอกจากนี้ยังนิยมใช้สำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่ม auxotroph

- อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบ่งตามลักษณะการใช้งาน แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

(1) General medium คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ทั่ว ๆ ไป เช่น อาหาร PDA ที่สามารถใช้เลี้ยงเชื้อราได้เกือบทุกชนิด อาหาร NA ที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย แต่ในบางครั้งอาหาร PDA และ NA อาจไม่เพียงพอจึงจำเป็นต้องเพิ่มเติมสารอาหาร หรืออาจต้องเปลี่ยนไปใช้สูตรอาหารอื่น ๆ แทน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษาในแต่ละการทดลอง

(2) Selective medium คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารอาหารบางอย่างลงไปเพื่อยังยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ โดยสารที่เติมลงไปนั้นไม่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการ เช่น การเติม crystal violet ลงไป 0.003% จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เป็นต้น

(3) Minimal medium คือ อาหารที่มีส่วนประกอบของสารในปริมาณน้อยเฉพาะที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิด

(4) Differential medium คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารเคมีบางชนิดลงไปเพื่อช่วยให้จุลินทรีย์ที่ต้องการเจริญอย่างรวดเร็ว และมีลักษณะจุลินทรีย์ที่แตกต่างแปลกไปจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น

2.7.1.2 **สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญ** (สาวิตรี, 2549)

การเจริญของยีสต์จำเป็นต้องมีสารอาหารที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน รวมทั้งธาตุอาหารหลัก (major element) อื่น ๆ ได้แก่ ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส โดยมีความต้องการธาตุอาหารบ้างชนิดในปริมาณมาก (macroelement) เช่น

แมกนีเซียมและโพแทสเซียม และยังจำเป็นต้องมีธาตุอาหารบางชนิด (microelement หรือ trace element) ซึ่งแม้ต้องการเพียงเล็กน้อยแต่ก็มีความสำคัญต่อการเจริญ ได้แก่ แคลเซียม เหล็ก ทองแดง แมงกานีส สังกะสี นิกเกิล โคบอลต์ และโมลิบดีนัม นอกจากนั้นยีสต์ยังต้องการสารประกอบบ้างชนิดเพื่อทำหน้าที่เป็น growth factor เช่น วิตามิน พิวรีน ไพริมิดีน และนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น

(1) แหล่งคาร์บอน (Carbon Source)

ยีสต์มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ร้อยละ 50 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ยีสต์ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนใหญ่สารอินทรีย์ที่ใช้ คือ น้ำตาล โดยกลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ทุกชนิดสามารถเมแทบอลิซึมได้ แต่กลูโคสอาจไม่ได้เป็นน้ำตาลที่เกิดเมแทบอลิซึมได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุดในยีสต์ทุกชนิด โดยปกติตามธรรมชาติกลูโคสจะไม่ได้มีอยู่อย่างอิสระ แต่อยู่ในรูปของพอลิเมอร์จำพวกเซลลูโลส แป้ง และพอลิแซ็กคาไรด์อื่น และไม่ค่อยนิยมนำกลูโคสมาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการหมักในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนั้นกลูโคสมักแสดงการกดดัน (repression) และมีผลยับยั้ง (inhibitory effect) การแอสสิมิเลตน้ำตาลอื่นของยีสต์

เมื่อยีสต์เจริญในที่มีกลูโคสความเข้มข้นสูงหน้าที่ของไมโทคอนเดรียจะถูกกดดันที่เรียกว่า อิทธิพลแคร็บทรี (Crabtree effect) หรืออิทธิพลกลูโคส (glucose effect) หรือการกดดันแคแทบอไลต์ (catabolite repression) ทำให้ยีสต์มีการหายใจลดลง นอกจากนั้นในสภาวะที่มีกลูโคสความเข้มข้นสูงยีสต์แสดงการเจริญแบบสองระยะหรือไดฟาซิก (diphasic) คือ หลังระยะ lag phase ถึง log phase กลูโคสจะถูกหมักเป็นเอทานอล ระหว่างนี้การหายใจแบบใช้ออกซิเจนถูกกดดัน ช่วงการเจริญที่สองของยีสต์จะใช้เอทานอลสำหรับการเจริญโดยเมแทบอลิซึมแบบใช้ออกซิเจนและได้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ยีสต์บางชนิดเท่านั้นที่ไวต่อกลูโคสความเข้มข้นสูง ในกรณีของ *Candida*, *Rhodotorula* และ *Torulopsis* ไม่ผลิตเอทานอลแม้จะเจริญในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้นสูงในภาวะที่มีออกซิเจนโดยจะใช้กระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจนทำให้ได้ผลผลิตชีวมวลสูง

ยีสต์บางชนิดเมแทบอลิซึมน้ำตาลห้าคาร์บอนได้ดีกว่ากลูโคส เช่น *Pichia stipitis* ใช้ไซโลสได้ดี ยีสต์จำนวนมากที่ใช้ไดแซ็กคาร์ไรด์จำพวกมอลโทส ซูโครส แลกโทส ทรีฮาโลส เมลิไบโอส เซลโลไบโอส และเมลิไซโทส สารประกอบอินทรีย์อื่นที่ศึกษากันมากในแง่ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของยีสต์ คือ ไฮโดรคาร์บอน และเมทานอล และยังมียีสต์บางสายพันธุ์ที่สามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนได้ สำหรับอุตสาหกรรมมักใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตมาจากวัตถุดิบที่ประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิด เช่น กากน้ำตาล ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส ฟรุกโทส ซูโครส และราฟฟิโนส

(2) ไนโตรเจน (Nitrogen)

ยีสต์มีไนโตรเจนภายในเซลล์ประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่มีปริมาณมากรองลงมาจากคาร์บอน สารหลายชนิดสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยแหล่งไนโตรเจนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและสามารถใช้ได้ง่าย เช่น แอมโมเนียมไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต มักใช้ในอุตสาหกรรมการหมักโดยยีสต์ เพราะนอกจากให้ไนโตรเจนแล้วยังให้ซัลเฟอร์ด้วย ยีสต์บางชนิดสามารถใช้ไนเตรตและไนไตรต์ได้ แต่ต้องเป็นไนไตรต์ที่ความเข้มข้นต่ำซึ่งไม่เป็นพิษกับยีสต์นั้น นอกจากอนินทรีย์ไนโตรเจนแล้วอินทรีย์ไนโตรเจนหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน เพบไทด์ พิวรีน และเอมีน สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของยีสต์บางชนิดได้ ยูเรียก็ถือเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดี แต่เมื่อมีการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนต้องมีการเติมไบโอตินลงในอาหารด้วย การใช้ยูเรียของยีสต์จะลดลงเมื่อมีแหล่งไนโตรเจนอื่นที่ยีสต์สามารถใช้ได้ดีกว่าเนื่องจากการกดดันของไนโตรเจน (nitrogen suppression)

ในอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมถ้ามีแหล่งไนโตรเจนมากกว่าหนึ่งชนิด ไนโตรเจนเหล่านั้นจะถูกใช้ในอัตราที่แตกต่างกัน ยีสต์จะเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดก่อน ซึ่งน่าจะเกิดจากวิธีการกดดันและการแบ่งส่วนของเมแทบอไลต์ (metabolite compartmentation) ดังนั้นการที่มีแหล่งไนโตรเจนที่ดี เช่น กลูทาเมต ในอาหารเป็นผลให้มีการกำจัดแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ดี (เช่น โพรลีน) ออกจากเซลล์ โดยไนโตรเจนที่ดีนั้นต้องเข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็ว เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ด้วยขั้นตอนที่น้อยที่สุดเพื่อสร้างกลูทาเมตหรือแอมโมเนีย และต้องไม่เป็นพิษกับเซลล์

(3) ไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนไอออน (H ion) หรือโปรตอน (proton) สำคัญมากในสรีรวิทยาของยีสต์ โดยค่าความเป็นกรด-เบสทั้งภายนอกและภายในเซลล์มีอิทธิพลมากต่อการเจริญ และเมแทบอลิซึมของยีสต์ ปกติยีสต์สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่ากรด-เบสเริ่มต้น ระหว่าง 4 – 6 แต่ยีสต์บางชนิดสามารถเจริญในค่ากรด – เบสที่กว้างกว่า คือ 2 – 8 และยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ไม่ดีนักในภาวะที่มีความเป็นเบส เมื่อยีสต์มีการเจริญอย่างรวดเร็วทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นกรด ซึ่งเป็นผลมาจากการนำเข้าของไอออนต่างชนิดกัน การปลดปล่อยโปรตอนระหว่างการขนส่งสารอาหาร การปลดปล่อยกรดอินทรีย์และการเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ ค่ากรด-เบสภายในเซลล์ที่กำลังเจริญมีการควบคุมภายในช่วงแคบ ๆ โดยการทำงานของ ATPase ในโปรตอนปั๊ม (protron pump) ที่พลาสมาเมมเบรนมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการนำเข้าสารอาหารและเมแทบอลิซึมของเซลล์ การผันแปรของค่ากรด - เบสภายนอกเซลล์ยังส่งผลต่อค่ากรด - เบสภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์อีกด้วย

(4) ออกซิเจน

ออกซิเจนมีหน้าที่หลักเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในห่วงโซ่อิเล็กตรอน (electron transport chain, ETC) นอกจากนั้นยังมีหน้าที่เป็น growth factor โดยยีสต์ต้องการออกซิเจนสำหรับการเกิดไฮดรอกซิเลชั่น (hydroxylation) เพื่อรักษาการเจริญ เช่น ใช้ในการสังเคราะห์สเตอรอลและกรดไขมันไม่อิ่มตัว ยีสต์บางชนิดต้องการโมเลกุลของออกซิเจนสำหรับเอนไซม์ออกซิเดสชนิดที่มีหน้าที่หลายอย่าง (mixed function oxidase) ที่ช่วยในการทำให้เกิดวงแหวน (cyclization) ของสควอลีน 2,3-epoxide เพื่อสร้างลาโนสเตอรอล (lanosterol) และสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว ดังนั้นออกซิเจนจึงถือเป็น growth factor ที่สำคัญของยีสต์

สำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมจากยีสต์บางชนิด เช่น ยีสต์ขนมปัง และโปรตีนชีวมวลของยีสต์หรือโปรตีนเซลล์เดี่ยวที่ต้องทำให้มีการเจริญโดยเมแทบอลิซึมแบบหายใจสูงสุดในกระบวนการผลิตจึงต้องรักษาให้มีออกซิเจนพอเพียงที่จะสนับสนุนการเจริญอย่างรวดเร็วของยีสต์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยออกซิเจนต้องค่อย ๆ ละลายลงในน้ำ และมีการปฏิบัติหลายอย่างเพื่อเพิ่มอัตราการดูดซึมออกซิเจน (oxygen absorption rate) ซึ่งเท่ากับ K_La.a.c (K_L คืออัตราที่ออกซิเจนจากบรรยากาศผ่านทาง liquid interface และละลายลงในสารละลาย ส่วน a คือ พื้นที่ของ interface และ c คือ ความเข้มข้นของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ)

(5) ซัลเฟอร์

ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบร้อยละ 0.3 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยร้อยละ 60 ของซัลเฟอร์อยู่ในกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในโปรตีน อีกร้อยละ 5 เป็นอนินทรีย์ซัลเฟตอิสระ ส่วนที่เหลืออยู่ในรูปของซัลเฟตที่เกาะกัน หรือกรดอะมิโนอิสระ นอกจากนั้นยังพบอยู่ในวิตามินบางชนิด เช่น ไบโอติน และสารที่มีซัลเฟอร์อื่น ๆ ยีสต์ต้องการซัลเฟอร์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในอันดับแรก

แหล่งของซัลเฟอร์ได้จากสารประกอบซัลเฟต (sulfate) ซัลไฟต์(sulfite) ไทโอซัลเฟต (thaiosulfate) อนินทรีย์ซัลเฟอร์อยู่ในรูปของซัลเฟตไอออน โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟตหรือโพแทสเซียมซัลเฟตเป็นแหล่งซัลเฟอร์ที่นิยมใช้ในอาหาร โดยยีสต์ทุกชนิดสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์จากซัลเฟตได้

(6) ฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสถูกแอสสิมิเลต (assimilate) ในรูปของไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน หรือออร์โทฟอสเฟตไอออน (orthophosphate, H_2PO_4) เท่านั้น บทบาทหลักของฟอสเฟตคือเป็นองค์ประกอบของน้ำตาลฟอสเฟต กรดนิวคลีอิก และนิวคลีโอไซไดฟอสเฟต หรือนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต และพบในอนินทรีย์ฟอสเฟตในรูปของพอลิเมอร์สายตรง คือ พอลิฟอสเฟต มีความสำคัญในการควบคุมเมแทบอลิซึมของเซลล์ ให้ฟอสเฟตสะสมและให้พลังงาน ฟอสฟอรัสทำให้มีประจุลบใน

ไซโทพลาสซึมของยีสต์ จากการที่มีอนินทรีย์ฟอสเฟตและกลุ่มฟอสเฟตในสารอินทรีย์ โดยยีสต์มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบในเซลล์ร้อยละ 3 – 5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปของออร์โทฟอสเฟต

(7) เกลือแร่

ยีสต์ต้องการเกลือแร่ (mineral elements) เหมือนกับจุลินทรีย์อื่น เกลือแร่ที่ยีสต์ต้องการประกอบด้วยโพแทสเซียม แมกนีเซียม และธาตุที่ต้องการในปริมาณต่ำหลายชนิด สำหรับโพแทสเซียมและแมกนีเซียมถือเป็นธาตุอาหาร macroelement ที่ยีสต์ต้องการในระดับความเข้มข้นเป็นมิลลิโมลาร์ เพื่อทำให้เกิดภาวะที่มีประจุบวกภายในเซลล์ยีสต์

ปกติยีสต์มีโพแทสเซียมประมาณร้อยละ 1 – 2.2 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยปริมาณโพแทสเซียมในเซลล์ผันแปรตามภาวะในการเจริญ โพแทสเซียมยังทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์สำหรับเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวกับปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชั่น (oxidative phosphorylation) การสังเคราะห์โปรตีน และเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต เช่น ไพรูเวตไคเนส (pyruvate kinase) อัลโดเลส (alsolase) อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) และเอทีพีเอส (ATPase) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนั้นยังร่วมในการนำสารอาหารอื่นเข้าเซลล์

ส่วนแมกนีเซียม เป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของยีสต์เช่นกัน และมีอยู่ร้อยละ 0.3 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำหน้าที่เกี่ยวกับโครงสร้างและเมแทบอลิซึม เช่น การทำงานของเอนไซม์เกี่ยวกับการเคลื่อนย้ายฟอสเฟต (transphosphorylation) ซึ่งต้องอาศัยแมกนีเซียมไอออน

และเกลือแร่อื่น ๆ ที่ยีสต์ต้องการในปริมาณที่ต่ำมากในระดับไมโครโมลาร์หรือนาโนโมลาร์ ประกอบด้วยแมงกานีส แคลเซียม เหล็ก สังกะสี ทองแดง นิเกิล โคบอลท์ และโมลิบดีนัม ในขณะที่เกลือแร่อื่น ๆ คือ เงิน แบเรียม แคดเมียม ปรอท ลิเทียม ตะกั่ว เป็นสารพิษ หากความเข้มข้นสูงกว่า 100 ไมโครโมลาร์จะมีผลเสียต่อการเจริญ

(8) Growth factor

เป็นสารอินทรีย์ซึ่งยีสต์ต้องการที่ความเข้มข้นต่ำมาก มีบทบาทในการเร่งหรือเป็นส่วนในโครงสร้าง สารที่เป็น growth factor สำหรับยีสต์คือ วิตามิน พิวรีน ไพริมิดีน นิวคลีโอไทด์ นิวคลีโอไซด์ (nucleoside) กรดอะมิโน กรดไขมัน และอื่น ๆ เช่น พอลิเอมีน (polyamine) โคลีน และมีโซอินอซิทอล (meso – inositol) การที่ยีสต์ต้องการ growth factor แบบนี้เรียกว่า relative growth factor

ยีสต์มักต้องการวิตามินที่ระดับความเข้มข้นไมโครโมลาร์ เช่น ไบโอตินซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยาที่เร่งโดยคาร์บอกซีเลส (carboxylase) กรดแพนโททีนิกซึ่งรูปที่ทำหน้าที่ คือ โอเอนไซม์เอ (coenzyme A) ที่ร่วมในปฏิกิริยารีดอกซ์ และไทเอมีน (thiamine) หรือวิตามินบี 1 ในรูปของไทเอมีนไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate) ซึ่งร่วมในปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชั่น (decarboxylation)

2.7.2 ปัจจัยทางกายภาพและเคมีที่เกี่ยวข้องระหว่างการหมัก

2.7.2.1 อุณหภูมิ

ปกติจุลินทรีย์จะเจริญเร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ การเลี้ยงยีสต์ส่วนใหญ่มักบ่มที่อุณหภูมิ 30 – 35 องศาเซลเซียส โดยการเจริญจะลดลงมากที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และไม่สามารถเจริญได้ที่ 60 – 70 องศาเซลเซียส สำหรับ *H. polymorpha* ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถทนความร้อน (thermo–tolerant yeast) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (แคทลียา, 2550; Youn และคณะ, 2010; Khongto และคณะ, 2010)

2.7.2.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ในกระบวนการหมักจำเป็นต้องใช้สารประกอบคาร์บอนเพื่อเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางชีวเคมีภายในเซลล์ให้ได้เป็นพลังงาน เพื่อนำพลังงานที่ได้ไปใช้ในกิจกรรมการเจริญและการสร้างเซลล์ใหม่ สารประกอบคาร์บอนที่ยีสต์สามารถนำไปเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี เช่น กลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส และซูโครส เป็นต้น โดยการเลือกสารประกอบคาร์บอนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์นั้น ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก สำหรับ *H. polymorpha* และ *P. pastoris* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ มีการเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสและกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอัตราการเจริญของยีสต์ทั้งสองซึ่งเพาะเลี้ยงโดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน มีอัตราการเจริญที่สูงกว่าในกลูโคส (แคทลียา, 2550; Tang และคณะ, 2009; Hang และคณะ, 2009) และเมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญ งานวิจัยของ Li และคณะ (2007) ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้เป็นสารอาหารตั้งต้นต่อการเจริญของ *Rhodosporidium toruloides* ใช้กลูโคสเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 10, 40, 60, 90, 120, 150, 200, 300 และ 400 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในระดับขวดเขย่า พบว่า *R. toruloides* เจริญได้ดีเมื่อใช้สารอาหารตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และยีสต์มีอัตราการเจริญที่ต่ำลงเมื่อใช้สารอาหารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นมากกว่า 150 กรัมต่อลิตร และงานวิจัยของ Tang และคณะ (2009) ทำการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ใช้เป็นสารอาหารตั้งต้น 4 ระดับ ได้แก่ 40, 50, 60 และ 70 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารอาหารตั้งต้นที่ 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเป็น 0.263, 0.266 และ 0.260 ต่อชั่วโมงตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ

สารอาหารตั้งต้นเป็น 70 กรัมต่อลิตร ยีสต์ถูกยับยั้งการเจริญโดยมีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่าเมื่อใช้สารอาหารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า

นอกจากเราจะต้องคัดเลือกประเภทของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แล้ว ความเข้มข้นเริ่มต้นของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งเพื่อให้กระบวนการหมักเกิดประสิทธิภาพ การเจริญของจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูง นั่นก็หมายถึงเราสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้มากตามไปด้วย ในการเพาะเลี้ยงซึ่งใช้กระบวนการหมักแบบแบตช์ความเข้มข้นเริ่มต้นของแหล่งคาร์บอนต้องมากเพียงพอต่อความต้องการ และไม่เกิด substrate inhibition หากต้องการเพาะเลี้ยงให้ได้ผลผลิตมวลเซลล์สูง อาจต้องเลือกใช้กระบวนการหมักแบบอื่น เช่น การหมักแบบเฟดแบตช์ (Khongto และคณะ, 2010; Hang และคณะ, 2009; Heo และคณะ, 2008) หรือการหมักแบบต่อเนื่อง (Khanna และ Srivastava, 2008) มาพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์นั้น ๆ

2.7.2.3 **ค่าออกซิเจนละลาย**

สารเคมีที่มีประโยชน์มากมายหลายชนิด อาหาร เครื่องดื่ม ยารักษาโรค และเชื้อเพลิงชีวภาพ ล้วนแต่เป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งได้จากกระบวนการหมักแบบใช้อากาศ (aerobic fermentation) อากาศที่ถูกเติมเข้าไปภายในระบบเป็นกุญแจสำคัญต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตผลิตภัณฑ์ แม้ว่าค่าการละลายออกซิเจนในน้ำหมักที่สูงอาจมีผลในทางลบต่อการผลิตหรือไม่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตบางประเภท เช่น การผลิตเอทานอลในกระบวนการหมักจากยีสต์, การสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) จากสลัดจ์ (sludge) ที่เกิดจากกระบวนการบำบัดน้ำเสีย และการผลิต alginate จาก *Azotobacter vinelandii* (Shang และคณะ, 2009) แต่ก็มีตัวอย่างงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า ปริมาณอากาศที่เพียงพอและเหมาะสมเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญแบบความหนาแน่นเซลล์สูงและการผลิตผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมักแบบใช้อากาศ

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีผลิตภัณฑ์เป็นตัวเซลล์ และเป็นการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่มีความหนาแน่นสูง จุลินทรีย์จึงมีความต้องการออกซิเจนในปริมาณมากเช่นกัน เพื่อให้การเจริญไม่ถูกยับยั้งเนื่องจากข้อจำกัดของปริมาณออกซิเจนที่ได้รับไม่เพียงพอต่อความต้องการสำหรับใช้ในการเจริญเติบโต เช่น ในงานวิจัยของ Tang และคณะ (2009) ทำการหมัก *P. pastoris* เพื่อผลิต phytase ได้เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์และการผลิตผลิตภัณฑ์เมื่อทำการควบคุมค่าออกซิเจนละลายที่ 10, 20 และ 30% พบว่า ค่าละลายออกซิเจนที่ 30% *P. pastoris* มีอัตราการเจริญดีที่สุด คือ ได้ผลผลิตมวลเซลล์ 0.508 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล แต่ค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะสมต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ คือ 20% ได้ phytase 1921 ยูนิตต่อกรัม Wang และคณะ

(2010) ศึกษาผลของค่าออกซิเจนละลายต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *Xenorhabdus nematophila* โดยทำการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์เมื่อการหมักมีค่าออกซิเจนละลายที่ 10, 30, 50 และ 70% พบว่า ในภาวะการหมักที่ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 10% *X. nematophila* มีอัตราการเจริญที่ช้าและได้ผลผลิตมวลเซลล์ต่ำ โดย 24 ชั่วโมงแรกของการหมักที่มีค่าออกซิเจนละลาย 70% *X. nematophila* มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็ว แต่หลังจากนั้น ภาวะที่มีการควบคุมระดับค่าออกซิเจนละลายที่ 50% *X. nematophila* มีอัตราการเจริญสูงที่สุด โดยน่าจะเป็นผลมาจากการควบคุมค่าออกซิเจนละลายที่ 70% ต้องใช้อัตราการกวน (agitation speed) ที่สูง ซึ่งส่งผลไปทำลายเซลล์ และอาจเกิดจากการย่อยสลายตัวของเซลล์ยีสต์เอง (autolysis) ในช่วงสุดท้ายของกระบวนการหมัก อย่างไรก็ตาม ภาวะการหมักที่มีค่าละลายออกซิเจนต่ำ ก็ให้ผลผลิตมวลเซลล์ต่ำเช่นกัน

จากตัวอย่างงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น ในการเพาะเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพหรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ การเพาะเลี้ยงที่ผลผลิตเซลล์มีความหนาแน่นของเซลล์สูงนั้น จำเป็นต้องได้รับออกซิเจนปริมาณมาก ๆ โดยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนค่าออกซิเจนละลายในน้ำหมัก สามารถควบคุมได้โดยอาศัยพารามิเตอร์ต่าง ๆ เช่น อัตราการให้อากาศ ความเข้มข้นของออกซิเจนที่เข้าสู่เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ความดันภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Knoll และคณะ, 2007) หรืออัตราการกวน โดยค่าออกซิเจนละลายในน้ำหมัก เกี่ยวเนื่องกับสองปัจจัยหลัก ๆ ร่วมกัน ได้แก่ การให้**อากาศจาก** sparger ที่อยู่ก้นเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยอากาศได้จากเครื่องอัดอากาศผ่านตัวกรอง (filter) เพื่อทำให้อากาศที่เข้าสู่ระบบมีความบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดย sparger จะอยู่ใต้ใบพัดพอดีเมื่อมีการให้อากาศ อากาศที่เข้าไปภายในถังจะลอยตัวสูงขึ้นไปตรงบริเวณใบพัด และ**การกวน**ของใบพัดจะทำหน้าที่กระจายอากาศให้แก่ระบบ โดยทำให้อนุภาคของออกซิเจนมีขนาดเล็กลง ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างออกซิเจนกับอาหารเลี้ยงเชื้อ และการที่อากาศมีอนุภาคเล็กทำให้ลอยตัวขึ้นสู่ด้านบนของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพช้าลงอีกด้วย จะเห็นว่าการกวน นอกจากจะเป็นการคลุกเคล้าให้อาหารเลี้ยงเชื้อ จุลินทรีย์ และอากาศผสมกันอย่างทั่วถึงแล้ว ระบบการกวนที่มีประสิทธิภาพจะทำให้การละลายของออกซิเจนในอาหารเหลวมีค่าสูง มีปริมาณเท่า ๆ กันทั่วทุกจุด อย่างไรก็ตาม การหมักเพื่อให้ได้ความหนาแน่นเซลล์สูง และไม่เกิดปัญหาการจำกัดของสับสเตรทที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จะไม่สามารถหลีกเลี่ยงสภาวะจำกัดออกซิเจนได้ จึงต้องทำการแก้ปัญหาโดยการเติมออกซิเจนบริสุทธิ์เข้าไปเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (Jahic และคณะ, 2002; Shang และคณะ, 2009; Youn และคณะ, 2010) โดยผลิตภัณฑ์จะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการควบคุมค่าออกซิเจนละลายในระดับที่สูง และเมื่อเพิ่มปริมาณการเติมออกซิเจนบริสุทธิ์เข้าไปในอากาศที่ใช้เติม

2.7.2.4 ค่าความเป็นกรด–เบส

เนื่องจากกระบวนการหมัก เป็นการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพซึ่งมีการทำงานของเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง ทั้งในระหว่างการเจริญของมวลชีวภาพเองและการผลิตผลิตภัณฑ์ ค่าความเป็นกรด–เบสของอาหารภายนอกเซลล์อาจมีผลต่อโครงสร้างและสภาพการซึมผ่านได้ของเซลล์ (cell permeability) ส่วนใหญ่แล้วผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จะเป็นพวกโปรตีน หากน้ำหมักมีค่ากรด–เบสที่ไม่เหมาะสมอาจส่งผลต่อผลิตภัณฑ์ทั้งในแง่อัตราการผลิตและคุณภาพ เนื่องจากกรด–เบสมีผลต่อความเสถียรของโปรตีนและกิจกรรมของโปรติเอสในน้ำหมักเป็นอย่างมาก นอกจากนั้นค่ากรด–เบสยังมีส่วนช่วยที่สำคัญในการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นในระหว่างกระบวนการหมัก

ค่ากรด–เบสที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการเพาะเลี้ยง และผลิตภัณฑ์ที่ต้องการผลิต ในระหว่างกระบวนการหมักจึงต้องทำการควบคุมค่ากรด–เบสที่เปลี่ยนแปลงโดยการเติมสารละลายกรดหรือเบสเพื่อปรับค่ากรด–เบสตามที่ต้องการ โดยค่ากรด–เบสที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์อยู่ในช่วง 3.0-7.0 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวกับอิทธิพลของค่ากรด–เบสต่อกระบวนการหมัก เช่น Moon และคณะ (2002) ทำการศึกษาค่ากรด–เบสที่เหมาะสมต่อการผลิต human epidermal growth factor (hEGF) จาก *H. polymorpha* แปรผันค่ากรด–เบสที่ทำการควบคุมในระหว่างกระบวนการหมักเป็น 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 พบว่า *H. polymorpha* เจริญได้ดีที่ค่ากรด–เบส เท่ากับ 5.0 ส่วน hEGF มีอัตราการผลิตสูงสุดที่ค่ากรด–เบส เท่ากับ 6.0 Chen และคณะ (2008) ศึกษาการผลิต uricase จากยีนของ *C. utilis* โดยใช้ *H. polymorpha* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน โดยทำการแปรผันค่ากรด–เบสของน้ำหมักที่ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 พบว่า ค่ากรด – เบสที่เหมาะสมต่อการเจริญ เท่ากับ 5.5 และค่ากรด–เบสที่เหมาะสำหรับการผลิต uricase เป็น 6.5 จากตัวอย่างงานวิจัยที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าในการหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตอย่างมีประสิทธิภาพโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เป็นพวกรีคอมบิแนนท์โปรตีนจำเป็นต้องทำการควบคุมค่ากรด–เบสในระหว่างการหมัก แบ่งการหมักออกเป็น 2 ระยะ โดยในระยะแรกควบคุมค่ากรด–เบสให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อให้จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญที่รวดเร็วและได้ผลผลิตมวลเซลล์สูง หลังจากนั้นจึงทำการเปลี่ยนค่ากรด–เบสของน้ำหมัก (pH – shift) ให้เหมาะสมต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ (Wu และคณะ, 2010) นอกจากเป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างผลิตภัณฑ์แล้ว ยังช่วยลดการเกิดโปรติโอไลซิสที่เกิดจากการที่เซลล์ที่ตายแล้วปล่อยเอนไซม์ออกมาสู่น้ำหมัก

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)	Vortex-Genie No.2	Scientific Industries., Inc.	สหรัฐอเมริกา
เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (Rotary incubator shaker)	G-25	New Brunswick Scientific Co., Inc.	สหรัฐอเมริกา
เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic balance)	FX-180	A&D Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องชั่งแบบหยาบ (Electronic balance)	FX-3000	A&D Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge)	KR-20000T	Kubota Corporation	ญี่ปุ่น
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge)	TOMY MC-15A	TOMY SEIKO	ญี่ปุ่น
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH-meter)	F-13	HORIBA	ญี่ปุ่น

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Recording spectrophotometer)	Model-UV160	Shimadzu Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
ตู้อบแห้ง (Oven)	UL-80	Memmert Co., Ltd.	เยอรมัน
เครื่องไฮเปอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography)	Shimadzu LC-6A	Shimadzu Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เตาอบไมโครเวฟ (Microwave oven)	NE-767C	Matsushita Electric Industrial	ญี่ปุ่น
ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)		Sanyo	ญี่ปุ่น
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)	KT-30 SD	ALP Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood)	NK system clean bench	International Scientific Supply	ไทย
ปั๊ม (Pump)	MPNI125	Thakita Electric Works	ญี่ปุ่น

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ	BIOSTAT	Sartorius Co., Ltd.	เยอรมัน
(Fermenter)	B plus		
เครื่องกลั่น (Distillation Unit)	K-355	Buchi Co., Ltd.	สวิตเซอร์แลนด์
เครื่องย่อย		Buchi Co., Ltd.	สวิตเซอร์แลนด์

3.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Acetic acid ($C_2H_4O_2$)	MERCK	เยอรมัน
Agar (วุ้นผงตรานางเงือก)	พัฒนสินเอ็นเตอร์ไพรส์	ไทย
Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)	MERCK	เยอรมัน
Ammoniumdihydrogenphosphate ($NH_4H_2PO_4$)	MERCK	เยอรมัน
Ammonium ferrous sulphate $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$	MERCK	เยอรมัน
Bacto peptone	DIFCO	สหรัฐอเมริกา
Boric acid (H_3BO_3)	MERCK	เยอรมัน
Biotin	Dr.Ehrenstorfer Gmbh	เยอรมัน
Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$)	CARLO ERBA	อิตาลี
Cobalt chloride ($CoCl_2.6H_2O$)	FLUKA	สวิตเซอร์แลนด์
Copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$)	FLUKA	สวิตเซอร์แลนด์
Ethanol	กรมสรรพสามิต	ไทย
Glucose (Dextrose)	สยามชัย เคมิคอล	ไทย
Glycerol	ปตท. จำกัด มหาชน	ไทย
Hydrochloric acid (HCl)	MERCK	เยอรมัน
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	CARLO ERBA	อิตาลี
Manganese sulfate ($MnSO_4.H_2O$)	MALLINCKRODT	สหรัฐอเมริกา
Phosphoric acid (H_3PO_4)	CARLO ERBA	อิตาลี
Potassium chloride (KCl)	MERCK	เยอรมัน
Potassium iodide (KI)	J.T. BAKER	สหรัฐอเมริกา

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	MERCK	เยอรมัน
Potassium sulfate (KSO_4)	MERCK	เยอรมัน
Sodium chloride (NaCl)	CARLO ERBA	อิตาลี
Sodium ethylenediaminetetraacetic acid (Na-EDTA)	MERCK	เยอรมัน
Sodium hydroxide (NaOH)	แกรนด์ เคมิคอล	ไทย
Sodium molybdate ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	CARLO ERBA	อิตาลี
Sulfuric acid (H_2SO_4)	MERCK	เยอรมัน
Thiamin Hydrochloride	SIGMA	เยอรมัน
Yeast extract	BIO SPRINGER	ฝรั่งเศส
Zinc sulfate ($ZnSO_4.7H_2O$)	MERCK	เยอรมัน

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

เลี้ยง *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนในระบบแบตช์ เพื่อศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของ *H. polymorpha* โดยทำการศึกษาผลของปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และปัจจัยทางกายภาพ ซึ่งได้แก่ ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก และความเป็นกรด-เบสในน้ำหมัก ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลร่วมกันต่อการเจริญของ *H. polymorpha* งานวิจัยนี้จึงทำการทดลองโดยอาศัยการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลดีไซน์ เพื่อศึกษาปัจจัยที่ส่งผลร่วมกัน โดยมีค่าตัวแปรที่สนใจทำการศึกษาดังนี้

3.2.1 ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล

ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร, 30 กรัมต่อลิตร และ 50 กรัมต่อลิตร

3.2.2 ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก

ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก 40 เปอร์เซ็นต์ และ 80 เปอร์เซ็นต์

3.2.3 ค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก

ค่าความเป็นกรด-เบสที่ 3.5 และ 5.5

ตาราง 3.1 ภาวะที่สนใจศึกษา โดยทำการแปรผันปัจจัยที่ส่งผลร่วมกันต่อการเจริญของ *H. polymorpha* ซึ่งทำการออกแบบการทดลองเป็นแบบแฟคทอเรียลดีไซน์

ลำดับที่	ความเข้มข้นกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ค่ากรด-เบส	ค่าการละลายออกซิเจน (เปอร์เซ็นต์)
1	10	3.5	40
2		3.5	80
3		5.5	40
4		5.5	80
5	30	3.5	40
6		3.5	80
7		5.5	40
8		5.5	80
9	50	3.5	40
10		3.5	80
11		5.5	40
12		5.5	80

3.3 ขั้นตอนการวิจัย

3.3.1 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ

3.3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Hansenula polymorpha IBGE-HP5001 เป็นยีสต์ที่ได้จากการนำ *H. polymorpha* NRRL-Y-2214 มาทำการกลายพันธุ์ด้วยสารเอธิลมีเทนซัลโฟเนต เพื่อให้มีความสามารถในการใช้กลีเซอรอลจากผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลได้ดีขึ้น โดยคณะผู้วิจัยของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.1.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

ถ่ายเชื้อ *H. polymorpha* ที่ใช้ในการทดลองโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งลาดเอียง สูตรอาหาร YPD (ดังข้อ 3.3.2.1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บยีสต์ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุก ๆ เดือน

3.3.1.3 การเตรียมกล้าเชื้อ

เลี้ยงยีสต์บนอาหารแข็งลาดเอียง (YPD slant) (ดังข้อ 3.3.2.1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายยีสต์ลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ 2% YE และ2% Glycerol (ดังข้อ 3.3.2.2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ควบคุมความเป็นกรด-เบสเริ่มต้น เท่ากับ 5.5 จำนวน 6 ขวด โดยเติมอาหารเหลวปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารแข็งลาดเอียงซึ่งมียีสต์เจริญอยู่บนผิวหน้าของอาหาร จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำปราศจากเชื้อ นำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณเซลล์แขวนลอยที่ต้องเติมลงในอาหารเพื่อใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นในอาหารวัดเป็นค่าความขุ่นเท่ากับ 2.0 ตามสูตรคำนวณ

$$V_1 N_1 = N_2 V_2$$

เมื่อ V_1 = ปริมาณกล้าเชื้อที่ต้องใช้

V_2 = ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหมัก

N_1 = ค่าความขุ่นของกล้าเชื้อที่เตรียมในน้ำปราศจากเชื้อ

N_2 = ค่าความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นในอาหารสำหรับหมัก

บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน (rotary incubator shaker) ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

3.3.2 อาหารที่ใช้ในการหมัก

3.3.2.1 อาหารสำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์ (Yeast Extract Peptone Dextrose Agar; YPD agar)

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลเดกโตส (dextrose)	20	กรัม

เปปโทน (peptone)	20	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10	กรัม
วุ้นผง (agar powder)	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปให้ความร้อนจนผงวุ้นละลาย ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อขณะร้อนลงในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร หลอดละ 7.0 มิลลิลิตร ปิดฝาและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำหลอดมาวางเอียงให้ผิวหน้าของอาหารมีความลาดเอียง วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว

3.3.2.2 **อาหารสำหรับกล้าเชื้อ (Yeast Extract Glycerol Broth)** (แคทลียา, 2550)

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	20	กรัม
กลีเซอรอล	20	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-เบสด้วยกรดฟอสฟอริก (85% phosphoric acid) หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ให้มีความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5.5 ใส่อาหารในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3.2.3 **อาหารสำหรับกระบวนการหมักแบบแบตช์ (Mineral Salt Medium; MSM)** (ดัดแปลงจาก Hellmuth และคณะ, 2001)

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลีเซอรอล	ตามความเข้มข้นที่ต้องการ	
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10.0	กรัม
KH_2PO_4	2.5	กรัม
$NH_4H_2PO_4$	5.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	2.25	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2.5	กรัม
KCl	1.15	กรัม
NaCl	0.25	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.375	กรัม
Na-EDTA	0.05	กรัม
$(NH_4)_2Fe_2(SO_4)_2.6H_2O$	0.05	กรัม
H_3BO_3	0.25	มิลลิกรัม

$CuSO_4.5H_2O$	4.0	มิลลิกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	15.0	มิลลิกรัม
$MnSO_4.H_2O$	20.0	มิลลิกรัม
$CoCl_2.6H_2O$	0.5	มิลลิกรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.5	มิลลิกรัม
KI	0.5	มิลลิกรัม
Thiamin.HCl	0.05	กรัม
Biotin	0.15	มิลลิกรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-เบสด้วยกรดฟอสฟอริก (85% phosphoric acid) หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ให้มีความเป็น กรด-เบสตามที่ต้องการ แยกฆ่าเชื้อกลีเซอรอลโดยการนึ่งด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ฆ่าเชื้อไทอามีนและไบโอตินโดยการกรองผ่านเซลลูโลสอะซิเตดเมนเบรน ในสภาพปลอดเชื้อ และฆ่าเชื้ออาหารในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดยการนึ่งด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 45 นาที

3.3.2.4 อาหารสำหรับการเติมในการหมักแบบเฟด – แบตช์

3.3.2.4.1 อาหารที่มีค่า C:N ratio เท่ากับ 28

ละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ใน 0.1 โมลาร์ $(NH_4)_2HPO_4$ และ $NH_4H_2PO_4$, ค่ากรด – เบส 5.5 โดยเตรียมสารละลาย 0.1 โมลาร์ $(NH_4)_2HPO_4$ และ $NH_4H_2PO_4$, ค่ากรด – เบส 5.5 ได้จาก เตรียม 1.0 โมลาร์ $NH_4H_2PO_4$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และทำการปรับค่ากรด – เบส เท่ากับ 5.5 ด้วย 1.0 โมลาร์ $(NH_4)H_2PO_4$ และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อโดยการนึ่งด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3.2.4.2 อาหารที่มีค่า C:N ratio เท่ากับ 1.75

ละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ใน 1.6 โมลาร์ $(NH_4)_2HPO_4$ และ $NH_4H_2PO_4$, ค่ากรด – เบส 5.5 โดยเตรียมสารละลาย 1.6 โมลาร์ $(NH_4)_2HPO_4$ และ $NH_4H_2PO_4$, ค่ากรด – เบส 5.5 ได้จาก เตรียม 1.8 โมลาร์ $NH_4H_2PO_4$ และทำการปรับค่ากรด – เบส เท่ากับ 5.5 ด้วย 1.8 โมลาร์ $(NH_4)H_2PO_4$ ฆ่าเชื้อโดยการนึ่งด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3.3 กระบวนการหมักแบบแบตช์

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.3.1.3 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (working volume 3 ลิตร) โดยปริมาตรของหัวเชื้อเริ่มต้นที่เติมลงไปคิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลวทั้งหมด ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส โดยในระหว่างกระบวนการหมักมีการศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล ออกซิเจนที่ละลาย และความเป็นกรด - เบสในน้ำหมักต่อการเจริญของ *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน โดยมีค่าตัวแปรของปัจจัยที่ทำการศึกษา ซึ่งต้องทำการควบคุมภาวะในระหว่างกระบวนการหมัก ดังตารางที่ 3.1

ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์มาวิเคราะห์เพื่อนำผลที่ได้ มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หาปริมาณกลีเซอรอลที่คงเหลือในน้ำหมักด้วยเครื่อง HPLC นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเจริญเพื่อนำมาคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ), ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) และอัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity)

3.3.4 กระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์

หลังจากทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของ *H. polymorpha* ด้วยการหมักแบบแบตช์แล้ว เพื่อให้ *H. polymorpha* มีการเจริญแบบความหนาแน่นเซลล์สูง จึงทำการหมักแบบเฟด – แบตช์ โดยอาศัยค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, μ) ที่ได้จากการหมักแบบแบตช์ มาใช้ในการคำนวณหาอัตราการเติมสารอาหาร โดยวิธีการคำนวณอัตราการเติมสารอาหารแบบเอ็กโพเนนเชียล แสดงดังภาคผนวก ค.

ขั้นตอนการหมัก โดยทำการถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.3.1.3 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (working volume 2 ลิตร) โดยปริมาตรของหัวเชื้อเริ่มต้นที่เติมลงไปคิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลวทั้งหมด ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส โดยในระหว่างกระบวนการหมัก.ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ออกซิเจนที่ละลาย เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และความเป็นกรด – เบสในน้ำหมัก เท่ากับ 5.5

ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุก 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์มาวิเคราะห์เพื่อนำผลที่ได้ มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หาปริมาณกลีเซอรอลที่คงเหลือในน้ำหมักด้วยเครื่อง HPLC นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเจริญเพื่อนำมาคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ), ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) และอัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity)

3.3.5 วิธีการวิเคราะห์

3.3.5.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตัวอย่างที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเซลล์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) โดยนำตัวอย่างมาทำการกรองผ่านกระดาษกรอง GF/C ที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีเซลล์ยีสต์อยู่ด้านบนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ นำตัวอย่างที่ได้มาชั่งหาน้ำหนักแห้ง

3.3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลด้วยเครื่องไฮเปอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)

นำตัวอย่างน้ำหมักส่วนใสที่ได้จากการกรองเซลล์ยีสต์มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสมาทำการเจือจางให้ความเข้มข้นเป็น 0.1 เท่า นำมากรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตต (cellulose acetate) ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเปอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) เพื่อหาปริมาณกลีเซอรอล และทำการคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร

คอลัมน์	Biorad Aminex HPX-87H ion exclusion organic acid column ขนาด 300 มิลลิเมตร x 7.8 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	กรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.005 mM
อุณหภูมิ	45 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	0.6 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	RI detector (Shimadzu รุ่น RID-6A)
เวลาที่อยู่ในคอลัมน์	25 นาที

คำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร

3.3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีเจลดาห์ล (แคทลียา, 2550)

นำตัวอย่างน้ำหมักส่วนใสที่ได้จากการกรองเซลล์ยีสต์มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกลั่น เติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วยโปรแตสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟตอัตราส่วน 95 : 5 จำนวน 7 กรัม จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมจนสารละลายใส เป็นเวลา 45 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปประกอบเข้ากับเครื่องกลั่นไนโตรเจนและเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 32 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 – 60 มิลลิลิตร หรือจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีดำ แล้วกลั่นจับก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นด้วยสารละลายบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 60 มิลลิลิตร ที่เติมเมทิลเรดเมทิล-ลีนบูล (methyl red methylene blue) ประมาณ 3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ กลั่นจนสารละลายบอริกมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่กลั่นได้มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรตแล้วคำนวณหาปริมาตรไนโตรเจน ดังนี้

เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน = (ปริมาตรกรดเกลือ x ความเข้มข้นกรดเกลือ x 1.4) / ปริมาตรตัวอย่าง

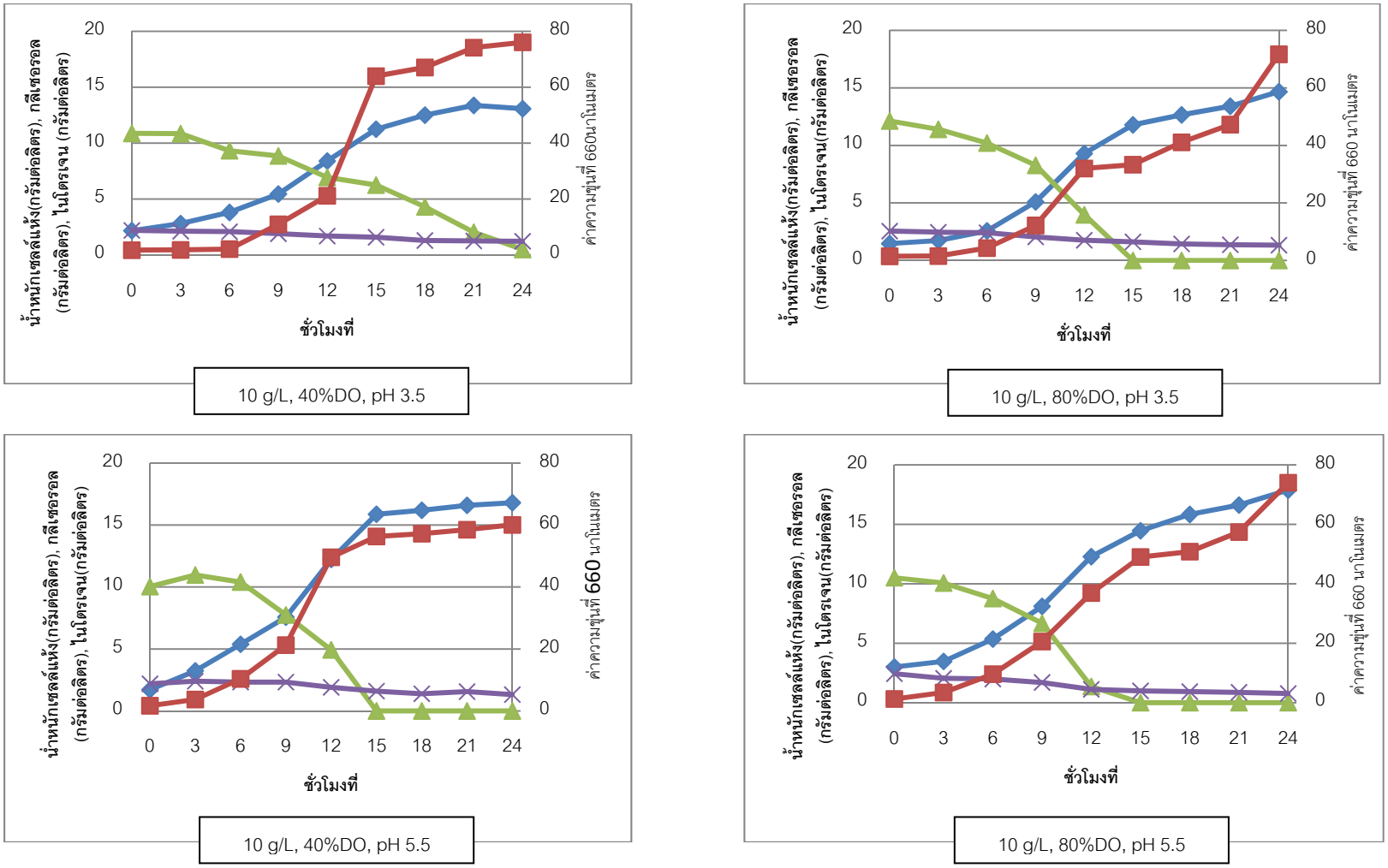
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลซึ่งใช้เป็นสารอาหารตั้งต้น ค่าออกซิเจนละลาย และค่ากรด–เบสของน้ำหมักต่อการหมัก *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร เพื่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว โดยทำการแปรผันปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ ได้แก่ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเป็น 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลายในน้ำหมักเป็น 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด–เบสของน้ำหมักเป็น 3.5 และ 5.5 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ออกแบบการทดลองเป็นแบบแฟคทอเรียลเพื่อช่วยอธิบายความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสามที่มีผลร่วมกัน และใช้ข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากกระบวนการหมักแบบแบตช์ เลือกภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นภาวะเริ่มต้นในการหมักแบบ เฟด-แบตช์ โดยคาดหวังว่าจะทำให้ยีสต์ มีการเจริญแบบความหนาแน่นเซลล์สูง

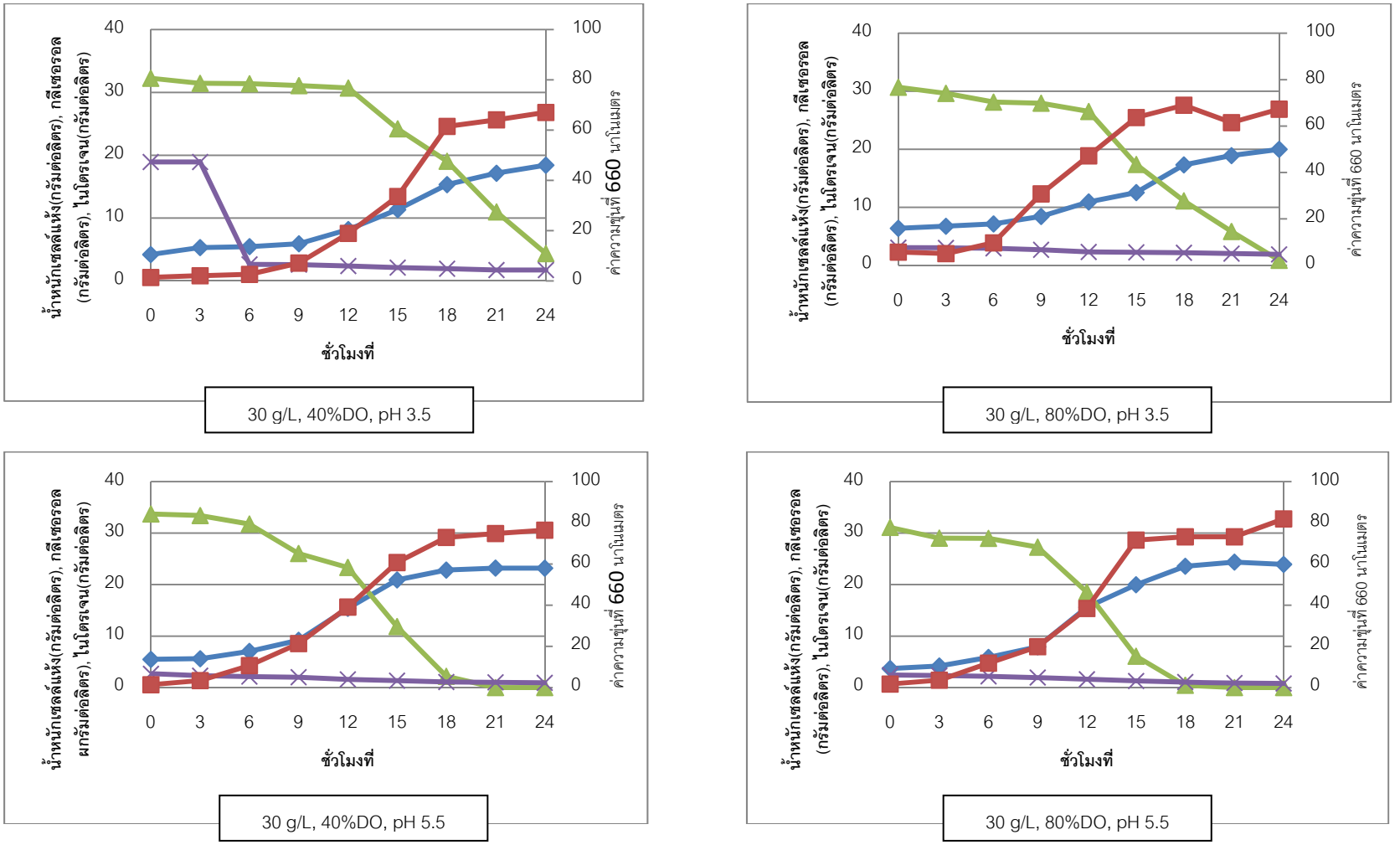
4.1 การเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบแบตช์ เมื่อทำการควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ใช้เป็นสารอาหารตั้งต้นเป็น 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 และ 5.5

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงการเจริญของ *H. polymorpha* ในระหว่างกระบวนการหมักแบบแบตช์ แสดงผลดังกราฟภาพที่ 4.1 – 4.4



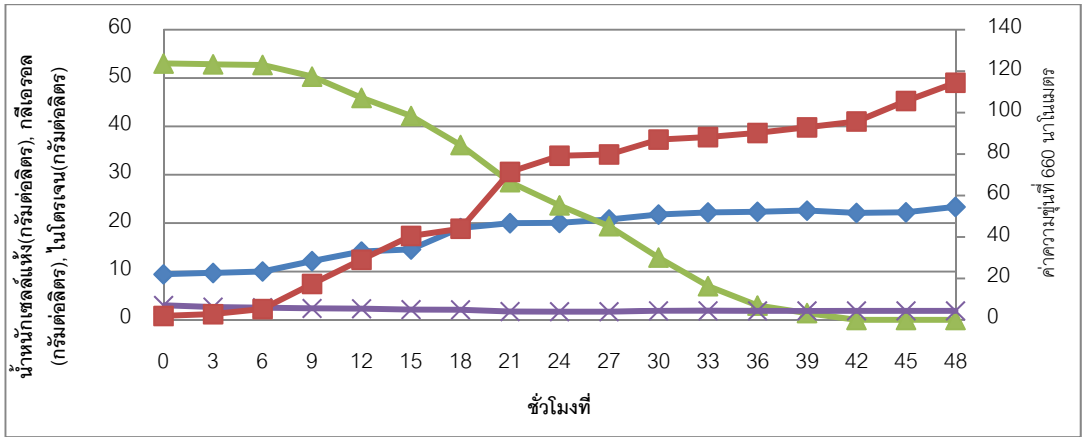
ภาพที่ 4.1 เปรียบเทียบกราฟผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบแบตช์ เมื่อทำการควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเป็น 10 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด–เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 และ 5.5

เมื่อ ◆ คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L), ■ คือ ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร, ▲ คือ กลีเซอรอล (g/L), X คือ ไนโตรเจน

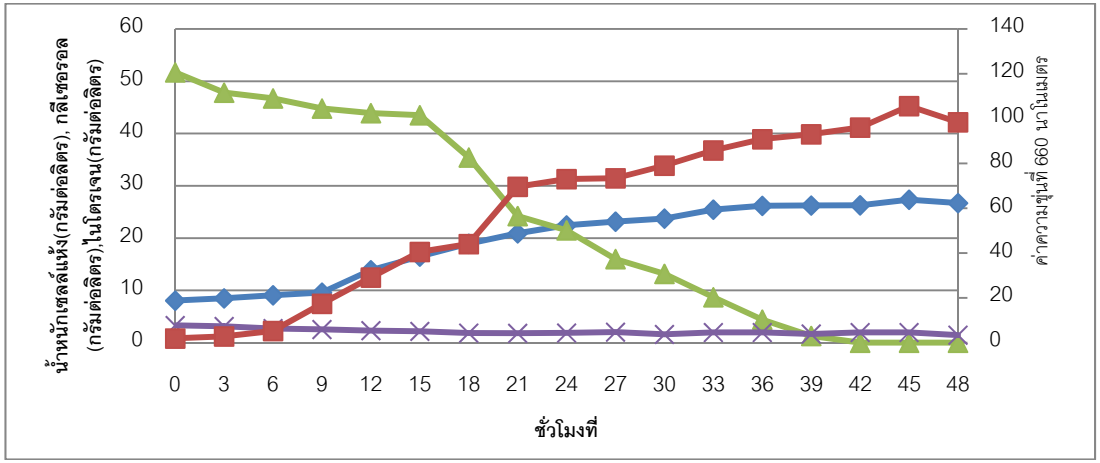


ภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบกราฟผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบแบตช์ เมื่อทำการควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเป็น 30 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด–เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 และ 5.5

เมื่อ ◆ คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L), ■ คือ ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร, ▲ คือ กลีเซอรอล (g/L), X คือ ไนโตรเจน



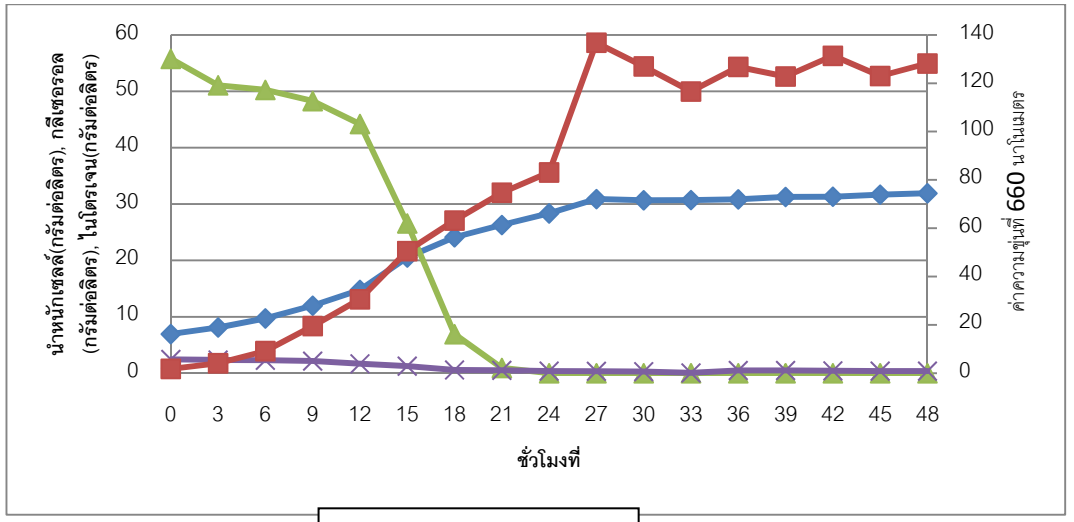
50 g/L, 40%DO, pH 3.5

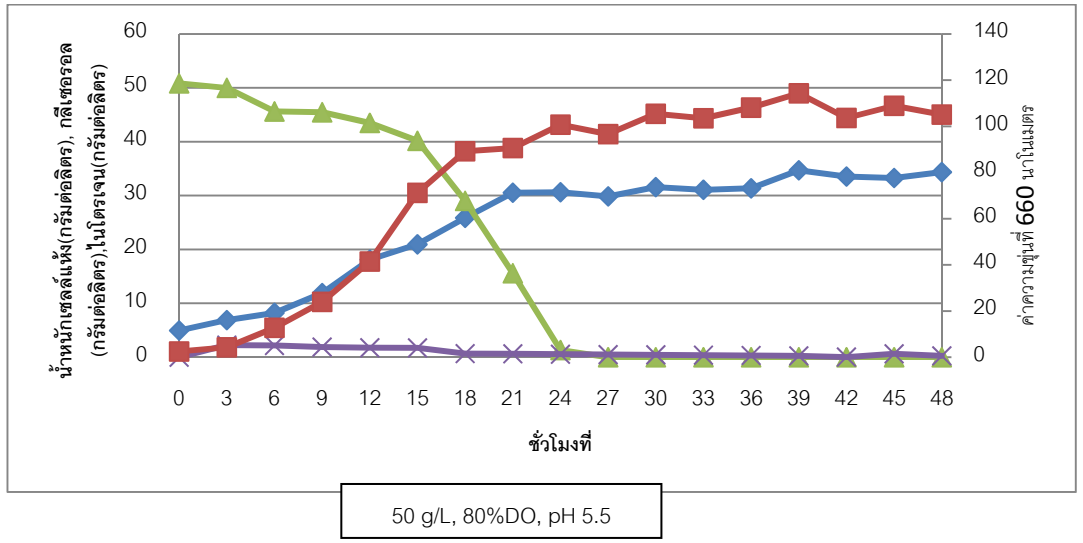


50 g/L, 80%DO, pH 3.5

ภาพที่ 4.3 เปรียบเทียบกราฟผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบแบตช์ เมื่อทำการควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเป็น 50 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด–เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5

เมื่อ ◆ คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L), ■ คือ ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร, ▲ คือ กลีเซอรอล (g/L), X คือ ไนโตรเจน





ภาพที่ 4.4 เปรียบเทียบกราฟผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบแบตช์ เมื่อทำการควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเป็น 50 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด–เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5

เมื่อ ◆ คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L), ■ คือ ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร, ▲ คือ กลีเซอรอล (g/L), X คือ ไนโตรเจน

ตาราง 4.1 สรุปผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบแบตช์ เมื่อทำการควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ใช้เป็นสารอาหารตั้งต้นเป็น 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 และ 5.5

ความเข้มข้นเริ่มต้น กลีเซอรอล (g/L)	ค่ากรด-เบส	ค่าออกซิเจนละลาย (%)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)		อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})		ผลผลิตมวลเซลล์ (g/g glycerol)	อัตราการผลิต (g/L.h)	กลีเซอรอล (g/L)		ไนโตรเจน (g/L)	
			สูงสุด	ชั่วโมงที่	ตลอดการหมัก	log phase			คงเหลือ	ชั่วโมงที่	คงเหลือ	ชั่วโมงที่
10	3.5	40	13.38±0.12	21	0.083	0.120	1.166	0.547	0.492	24	1.220	24
	3.5	80	14.67±0.80	24	0.107	0.140	0.991	0.637	0	15	1.330	24
	5.5	40	16.80±0.33	24	0.094	0.123	1.217	0.724	0	15	1.320	24
	5.5	80	17.88±0.46	24	0.081	0.138	1.216	0.701	0	15	0.770	24
30	3.5	40	18.42±0.43	24	0.067	0.106	0.518	0.653	4.356	24	1.730	24
	3.5	80	20.00±0.10	24	0.054	0.076	0.470	0.641	0.877	24	1.890	24
	5.5	40	23.21±0.24	21	0.073	0.126	0.530	0.927	0	21	0.930	24
	5.5	80	24.37±1.09	21	0.091	0.117	0.635	1.041	0	21	0.800	24
50	3.5	40	23.37±0.14	48	0.019	0.045	0.227	0.315	0	42	1.880	48
	3.5	80	27.36±0.15	45	0.027	0.053	0.349	0.454	0	42	1.450	48
	5.5	40	31.92±0.04	48	0.031	0.045	0.401	0.574	0	24	0.370	48
	5.5	80	34.70±2.78	39	0.036	0.059	0.450	0.637	0	27	0.260	48

จากการทดลองทำการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* ด้วยกระบวนการหมักแบบแบตช์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในภาวะต่าง ๆ ที่ได้แปรผันปัจจัยที่สนใจทำการศึกษาทั้ง 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล ค่าออกซิเจนละลายในน้ำหมัก และค่ากรด-เบสของน้ำหมักทั้ง 12 ภาวะ ว่าแต่ละปัจจัยมีผลต่อการเจริญของ *H. polymorpha* อย่างไร หากพิจารณาโดยดูจากการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลมากขึ้น ทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งมากตามไปด้วย *H. polymorpha* ที่ทำการหมักด้วยกระบวนการหมักแบบแบตช์ซึ่งใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 17.88 ± 0.46, 24.37 ± 1.09 และ 34.70 ± 2.78 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และกระบวนการหมักในภาวะที่มีการใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร ค่ากรด-เบส เท่ากับ 5.5 และค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นภาวะที่กระบวนการหมัก *H. polymorpha* ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 34.70 ± 2.78 กรัมต่อลิตรได้ผลใกลเคียงกับการทดลองของ Tang และคณะ (2009) ในการศึกษาการเจริญของ *P. pastoris* ซึ่งเป็นยีสต์ในกลุ่มเมทิลโลโทรฟิกส์ยีสต์เช่นเดียวกับ *H. polymorpha* โดยทำการหมักแบบแบตช์และใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 31.1 กรัมต่อลิตร และได้น้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ แคทลียา (2550) ซึ่งได้ทำการหมัก *H. polymorpha* แบบแบตช์ในระดับขวดเขย่าโดยใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 17.43 กรัมต่อลิตร

เมื่อกล่าวถึงประสิทธิภาพของกระบวนการหมักโดยพิจารณาจากอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate), อัตราการผลิตมวลเซลล์ (productivity) และผลผลิตมวลเซลล์ (yield) จากการทดลองพบว่าภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้น เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร มีค่า specific growth rate ทั้งตลอดกระบวนการหมักและในช่วง log phase รวมถึงค่าอัตราการผลิตมวลเซลล์และผลผลิตมวลเซลล์ มีแนวโน้มสูงกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ 30 และ 50 กรัมต่อลิตร สังเกตได้จากกราฟแสดงการเจริญ (ภาพที่ 4.1 – 4.4) พบว่า หากใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลต่ำ คือ 10 กรัมต่อลิตร ช่วง log phase จะเริ่มประมาณชั่วโมงที่ 3 แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเป็น 30 กรัมต่อลิตร การเจริญช่วง log phase จะช้าลง โดยเริ่มที่ประมาณชั่วโมงที่ 9 เมื่อควบคุมค่ากรด-เบสของน้ำหมักที่ 3.5 และเริ่มที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อควบคุมค่ากรด-เบสที่ 5.5 โดยภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร มีช่วง lag phase ที่ยาวนาน และภาวะที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเป็น 50 กรัมต่อลิตรมีช่วง lag phase ยาวนานที่สุด เนื่องจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่สูงทำให้การเจริญในช่วง lag phase นานกว่าภาวะอื่น ๆ โดยภาวะที่กล่าวมาข้างต้น น่าจะมีสาเหตุมาจาก ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน มีผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อ

มีการใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแหล่งคาร์บอนที่สูงเกินจุดวิกฤต หรือเรียกว่า เกิดการยับยั้งของสารอาหารตั้งต้น (substrate inhibition) (Tang และคณะ, 2009; Hang และคณะ, 2009; Li และคณะ, 2007; Claret และคณะ, 1992) จากการทดลองเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลกลับส่งผลให้อัตราการเจริญจำเพาะของ *H. polymorpha* ลดลงตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) ในกระบวนการหมักที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ค่ากรด-เบส เท่ากับ 5.5 และค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นภาวะที่ส่งผลให้กระบวนการหมักมีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยให้อัตราการผลิตมวลเซลล์ เท่ากับ 0.724 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลผลิตมวลเซลล์ เท่ากับ 1.217 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล ซึ่งสอดคล้องกับการงานวิจัยของ Claret และคณะ (1992) ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล ที่ไปมีผลยับยั้งการเจริญของ *Gluconobacter oxydans* และการผลิต dihydroxyacetone แปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ 31, 51, 76, 95 และ129 กรัมต่อลิตร ในกระบวนการหมักภาวะเดียวกัน พบว่า ผลผลิตมวลเซลล์ที่ได้จะลดลงตามลำดับความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เพิ่มมากขึ้น

สำหรับค่ากรด-เบสของน้ำหมักที่เหมาะสมต่อการเจริญ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์นั้น ๆ ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมักเป็นอย่างยิ่ง งานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าค่ากรด-เบสที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *H. polymorpha* อยู่ในช่วงระหว่าง 5.0 - 5.5 (Chen และคณะ, 2008; Moon และคณะ, 2002; Chiruvolu และคณะ, 1998) โดยในงานวิจัยนี้ ทำการเปรียบเทียบระหว่างค่ากรด–เบสของน้ำหมักที่ 3.5 และ 5.5 พบว่า ค่ากรด–เบสที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *H. polymorpha* เป็น 5.5 โดยที่ค่ากรด-เบส เท่ากับ 5.5 *H. polymorpha* สามารถนำกลีเซอรอลไปใช้ในการเจริญได้ดีกว่าที่ค่ากรด-เบส เท่ากับ 3.5 สังเกตได้ชัดเจนจากกระบวนการหมักที่ควบคุมค่ากรด-เบส เท่ากับ 3.5 ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ทั้งที่ใช้ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก ยังพบกลีเซอรอลคงเหลืออยู่ในน้ำหมัก 4.356 และ 0.877 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร ทั้งที่ใช้ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ชั่วโมงที่ 24 ยังพบกลีเซอรอลคงเหลืออยู่ในน้ำหมัก 23.680 และ 21.507 กรัมต่อลิตรตามลำดับเช่นกัน และเมื่อดูจากกราฟการเจริญ (ภาพที่ 4.1 – 4.4) จะเห็นว่า ภาวะที่ควบคุมค่ากรด-เบสของน้ำหมักเป็น 3.5 ถึงแม้ว่าปริมาตรน้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาในการหมัก แต่ไม่แสดงการเจริญในช่วง log phase ให้เห็นอย่างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาวะของกระบวนการหมักที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลสูงขึ้น

การเปรียบเทียบค่าการละลายออกซิเจนในน้ำหมักที่มีผลต่อการเจริญของ *H. polymorpha* โดยทำการควบคุมระดับค่าการละลายออกซิเจนในน้ำหมักที่ 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์

ด้วยการกวน การให้อากาศ และการเติมออกซิเจนบริสุทธิ์เพื่อรักษาระดับค่าละลายออกซิเจนในน้ำหมักตามที่ต้องการ จากการทดลองพบว่า ทุกภาวะที่สนใจศึกษา เมื่อควบคุมค่าละลายออกซิเจนเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการเจริญของ *H. polymorpha* มากกว่าที่ระดับค่าละลายออกซิเจนเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tang และคณะ (2009) ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับค่าละลายออกซิเจนในน้ำหมักที่ 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีผลต่อการเจริญของ *P. pastoris* พบว่า ผลผลิตมวลเซลล์เพิ่มขึ้นตามค่าละลายออกซิเจนในน้ำหมัก โดยผลผลิตมวลเซลล์สูงสุดเมื่อค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าในกระบวนการหมักแบบใช้อากาศเพื่อต้องการผลิตมวลชีวภาพ ภาวะที่มีค่าออกซิเจนละลายในน้ำหมักสูงเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *H. polymorpha* (Wang และคณะ, 2010; Kyu และคณะ, 2010; Shang และคณะ, 2009) ถึงแม้ว่าการควบคุมค่าออกซิเจนละลายให้มีค่าสูงจะทำให้การเจริญดีกว่า แต่จากการทดลองทั้ง 12 ภาวะ เมื่อทำการหมักโดยควบคุมค่าละลายออกซิเจนที่ 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลต่อการเจริญของ *H. polymorpha* ไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเปรียบเทียบทั้งน้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการผลิตมวลเซลล์ และผลผลิตมวลเซลล์

4.2 การเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบเฟดแบตช์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5 โดยทำการแปรผันเวลาและอัตราในการเติมสารอาหารที่แตกต่างกัน

เพื่อกระบวนการหมักที่มีประสิทธิภาพเราจำเป็นต้องรักษาภาวะของกระบวนการหมัก ให้เซลล์มีการเจริญด้วยอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด โดยที่ภาวะนั้นอัตราการเจริญจะเป็นแบบทวีคูณ (exponential growth or log phase) จากข้อจำกัดของกระบวนการหมักแบบแบตช์ คือ ไม่สามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดไว้ได้นาน แม้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงจะช่วยให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดสูงขึ้นแต่เมื่อสารอาหารตั้งต้นสูงขึ้นกลับส่งผลให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดลดลง การดัดแปลงกระบวนการหมักแบบแบตช์ โดยใช้ปริมาณสารอาหารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นต่ำ เพื่อไม่ให้ความเข้มข้นของสารอาหารตั้งต้นไปมีผลยับยั้งการเจริญ และทำการเติมสารอาหารเข้าไปในระหว่างกระบวนการหมักเพื่อเพิ่มปริมาณสารอาหารสำหรับใช้ในการเจริญ เราเรียกกระบวนการหมักนี้ว่า กระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ เป็นกระบวนการหมักที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพสูง (Ayed และคณะ, 2008; Li และคณะ, 2007)

จากการทดลองเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* ด้วยกระบวนการหมักแบบแบตช์ ในภาวะต่าง ๆ (ภาพที่ 4.1 – 4.4) พบว่า การเจริญของ *H. polymorpha* จะเริ่มเข้าสู่สภาวะ stationary phase

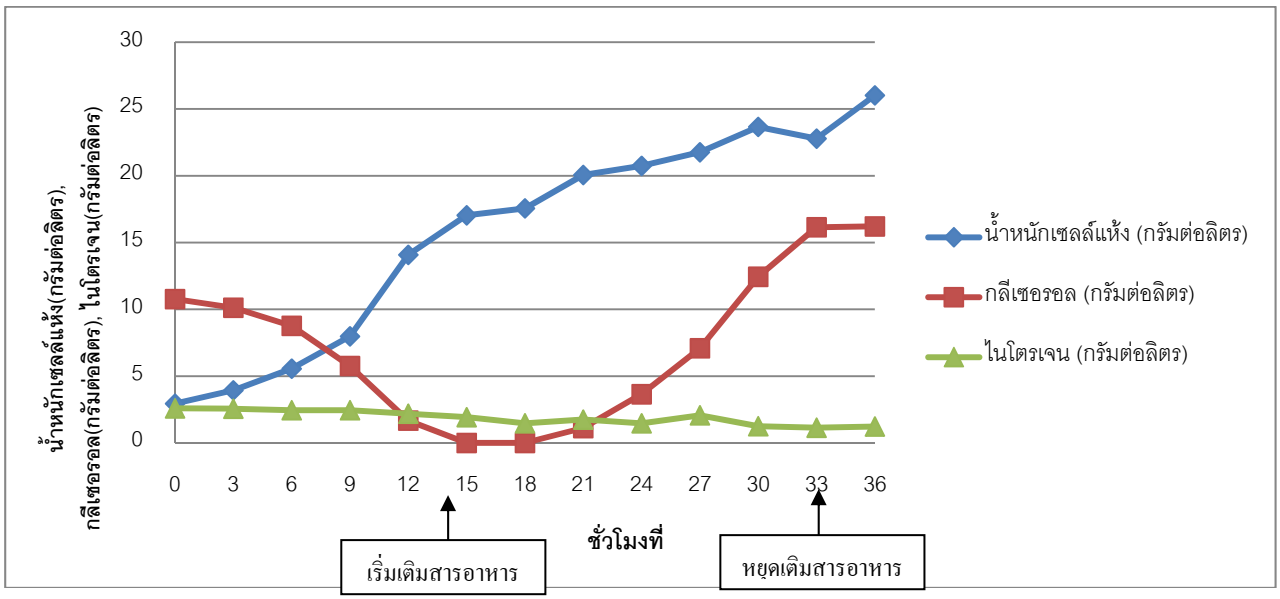
เมื่อกลีเซอรอลในอาหารหมด แสดงให้เห็นว่า กลีเซอรอลเป็นข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* เพื่อให้ได้ความหนาแน่นเซลล์สูง จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยทำการเพาะลี้ยง *H. polymorpha* ด้วยการหมักแบบเฟดแบตช์ โดยเลือกภาวะเริ่มต้นในกระบวนการหมักที่ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 10 กรัมต่อลิตร ควบคุมค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และควบคุมค่ากรด-เบสในน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 ซึ่งเป็นภาวะที่มีประสิทธิภาพของกระบวนการหมักสูงสุด คือ มีอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate), อัตราการผลิตมวลเซลล์ (productivity) และผลผลิตมวลเซลล์ (yield) สูงสุดซึ่งเป็นผลการทดลองที่ได้จากกระบวนการหมักแบบแบตช์เป็นภาวะเริ่มต้นในกระบวนการหมักก่อนที่จะทำการเติมสารอาหารต่อไป

จากที่ได้กล่าวมาแล้วว่า การหมักแบบเฟดแบตช์เป็นกระบวนการหมัก ที่ต้องการรักษาภาวะการเจริญของเซลล์ให้อยู่ในช่วงการเจริญที่มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด สำหรับการหมักแบบเฟดแบตช์ในงานวิจัยนี้ ทำการเปรียบเทียบการเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ที่ทำการเติมสารอาหารกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร (โดยมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารที่เติม เท่ากับ 28) ด้วยอัตราการเติมแบบเอกโพเนนเชียล (exponential feed) โดยใช้อัตราการเติมสารอาหารซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ (ภาคผนวก ค.) และระยะเวลาในการเติมที่แตกต่างกัน 3 ภาวะ ได้แก่ (1) กระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ที่มีการเติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3116 มิลลิลิตรต่อนาที (2) กระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ที่มีการเติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที (3) กระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ที่มีการเติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 9 ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที โดยทั้ง 3 ภาวะ ใช้ปริมาตรของอาหารเริ่มต้นภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เท่ากับ 2 ลิตร และทำการเติมสารอาหารจนกระทั่งปริมาตรของอาหารภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เท่ากับ 4 ลิตร ผลการทดลองแสดงดังกราฟภาพที่ 4.5 – 4.7

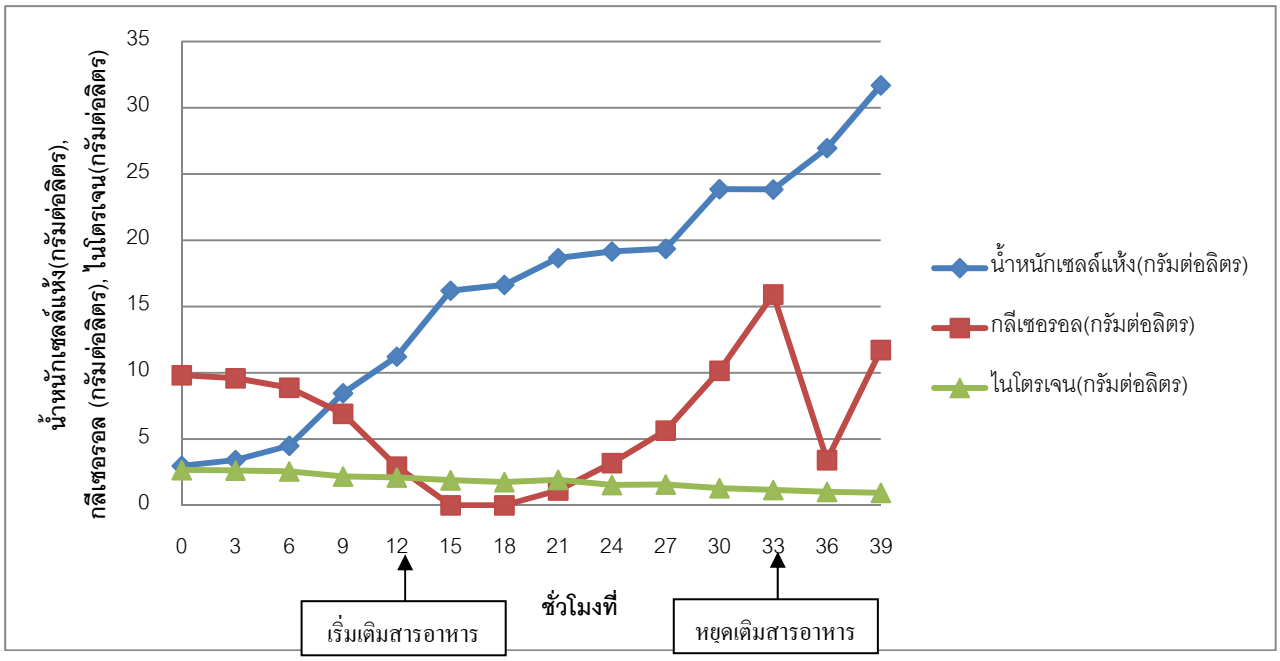
จากกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ทั้ง 3 ภาวะ ดังกล่าวให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดใกล้เคียงกัน คือ 26.02, 31.70 และ 32.72 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดใกล้เคียงกับกระบวนการหมักแบบแบตช์ ที่ใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร เมื่อสังเกตกราฟแสดงการเจริญ และปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมัก (ภาพที่ 4.5 – 4.7) จะเห็นว่าในช่วงแรกที่ทำการเติมสารอาหารเซลล์ยังสามารถนำกลีเซอรอลไปใช้ในการเจริญได้ ด้วยอัตราการเจริญจำเพาะ เท่ากับ 0.0798 - 0.0845 ต่อชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าอัตราการเจริญจำเพาะที่ใช้ในการคำนวณอัตราการเติมสารอาหาร ทำให้มีการสะสมของปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมักเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 21 ของกระบวนการหมัก และเมื่อพิจารณาที่น้ำหนักเซลล์แห้งจะเห็นว่า น้ำหนักเซลล์แห้งยังคงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตลอดกระบวนการหมัก เหตุที่การหมักแบบเฟดแบตช์ทั้ง 3 ภาวะ ยัง

ไม่สามารถทำให้ได้การเจริญแบบความหนาแน่นเซลล์สูงตามที่คาดหวังไว้ อาจเนื่องมาจาก การเจริญเติบโตของ *H. polymorpha* ไม่ได้ขึ้นกับความต้องการกลีเซอรอล (แหล่งคาร์บอน) เพียงอย่างเดียว โดยตามทฤษฎีเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้น การเพาะเลี้ยงเพื่อต้องการให้ได้ปริมาณเซลล์มาก ๆ นอกจากแหล่งคาร์บอนแล้ว ยังต้องมีแหล่งไนโตรเจนที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตด้วย โดยมีรายงานว่า เซลล์ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง (สาวิตรี, 2549) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาถึงวิถีการนำกลีเซอรอล เข้าสู่เซลล์ของ *H. polymorpha* (ภาพที่ 2.10) พบว่า การนำกลีเซอรอล 1 โมเลกุล เข้าสู่เซลล์ต้องอาศัย ATP 1 โมเลกุล โดย ATP 1 โมเลกุลประกอบไปด้วยไนโตรเจนถึง 5 อะตอม ดังนั้น การเติมสารอาหารในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ จำเป็นต้องควบคุมอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (C:N ratio) ที่ใช้เป็นสารอาหารในการเติมให้เหมาะสมด้วย ดังเช่นงานวิจัยของ Danesi และคณะ (2006) ได้ทำการหาค่า C:N ratio ที่เหมาะสมต่อการผลิต glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) จากกระบวนการหมัก *Saccharomyces cerevisiae* โดยทำการแปรผันค่า C:N ratio ของสารอาหารที่ 7, 10 และ 14 พบว่า ค่า C:N ratio เท่ากับ 10 เหมาะสมต่อการผลิต G6PDH มากที่สุด

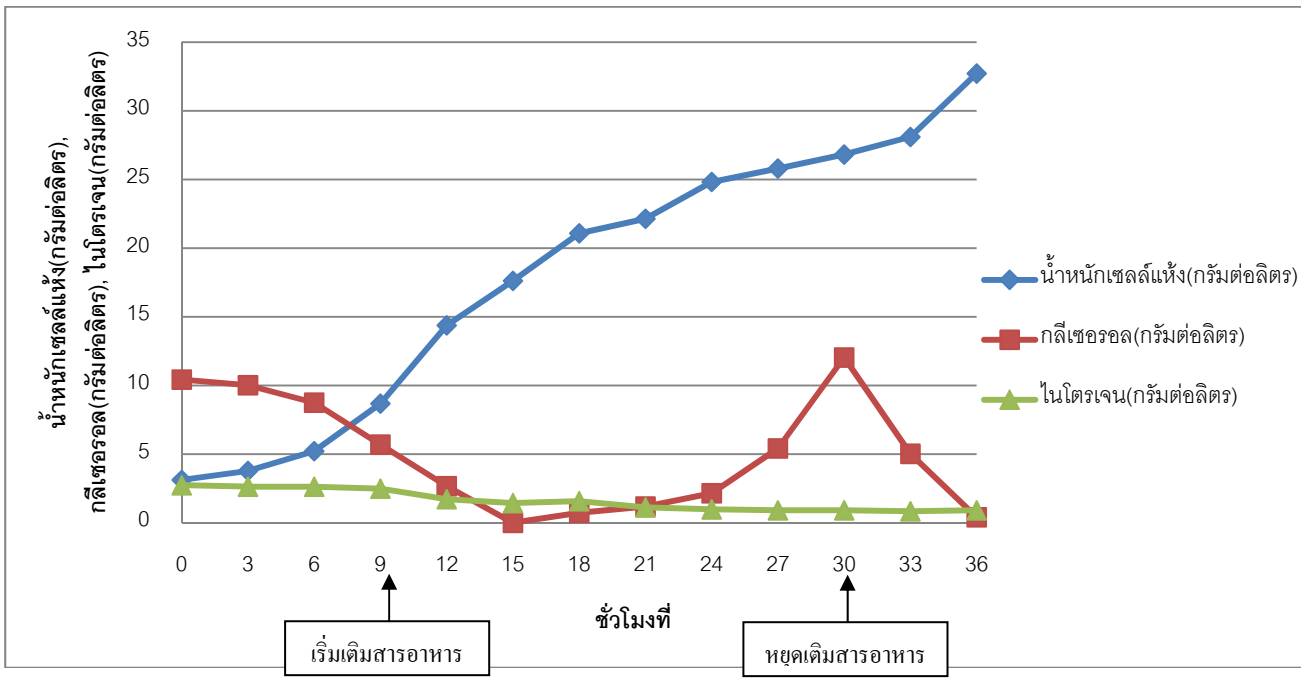
สำหรับงานวิจัยนี้ เพื่อให้ได้การเจริญของ *H. polymorpha* แบบความหนาแน่นเซลล์สูงจึงทำการหมักแบบเฟดแบตช์ โดยใช้สารอาหารที่ใช้ในการเติมมีค่า C:N ratio เพิ่มขึ้นเป็น 1.75 เท่ากับ C:N ratio ของอาหารเริ่มต้นในกระบวนการหมักแบบแบตช์ โดยทำการเติมสารอาหารด้วยอัตราการเติมแบบเอกโพเนนเชียล เริ่มทำการเติมที่ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราเท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที การหมักด้วยภาวะดังกล่าวช่วยทำให้ *H. polymorpha* สามารถนำกลีเซอรอลไปใช้ในการเจริญได้อย่างต่อเนื่อง (ภาพที่ 4.8) สังเกตจากกราฟการเจริญที่แสดงด้วยค่า น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมักถูกใช้ไปไม่มีการสะสม และหยุดการเติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 33 โดยทำการหมักเป็นเวลา 51 ชั่วโมง พบว่า ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 66.39 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 45 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.1114 ต่อชั่วโมง (ช่วง log phase ชม.ที่ 24 – 33) ผลผลิตมวลเซลล์ เท่ากับ 1.0613 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล และอัตราการผลิตมวลเซลล์ เท่ากับ 1.1445 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเป็นสองเท่าของการหมักแบบแบตช์ที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร



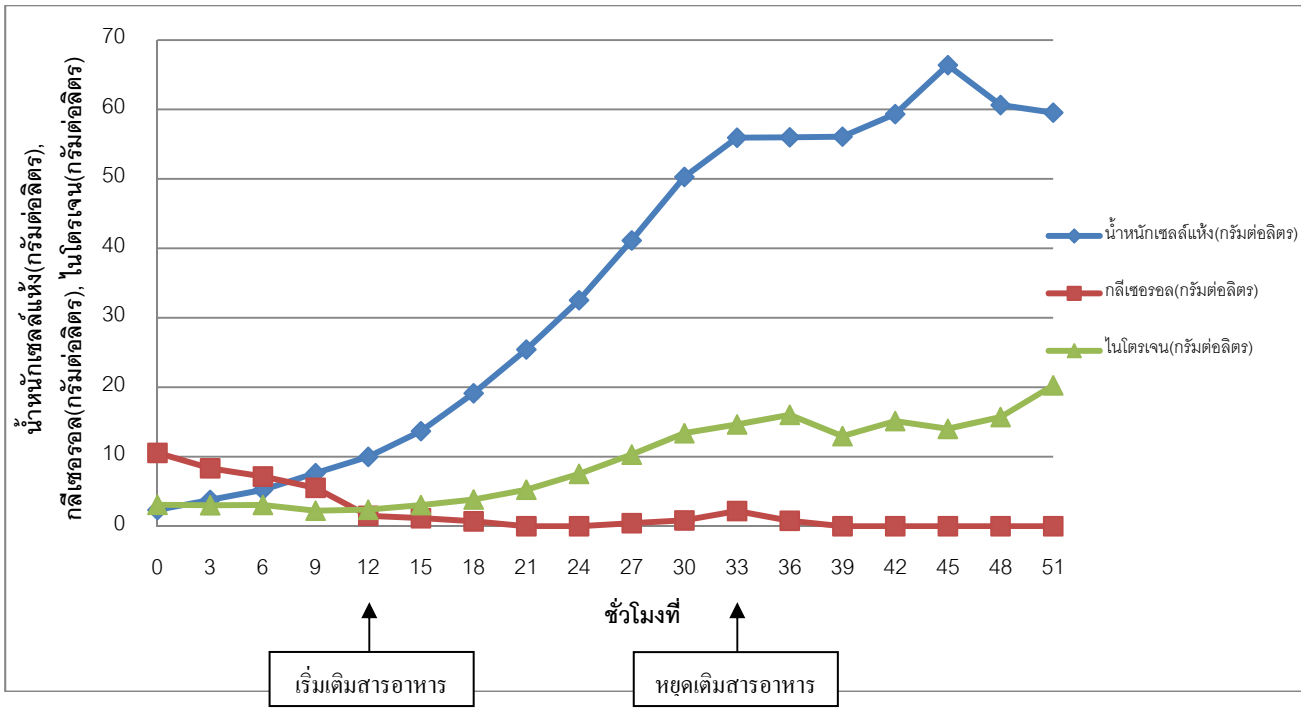
ภาพที่ 4.5 การเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ที่มีการเติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3116 มิลลิลิตรต่อนาที



ภาพที่ 4.6 การเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ที่มีการเติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที



ภาพที่ 4.7 การเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ที่มีการเติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 9 ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที



ภาพที่ 4.8 การเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ที่มีการเติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุม C:N ratio เท่ากับ 1.75

ตาราง 4.2 สรุปผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบเฟดแบตช์ เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 ทำการแปรผันเวลาและอัตราการเติมสารอาหารที่แตกต่างกัน

ภาวะการหมักแบบเฟดแบตช์	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (g/L)	อัตราการเจริญจำเพาะ (h-1)		ผลผลิตมวลเซลล์ (g/g glycerol)	อัตราการผลิต (g/L.h)
		ตลอดการหมัก	log phase		
เติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้นเท่ากับ 0.3116 ml/min	26.02 (ชั่วโมงที่ 36)	0.0798	0.0691 (ชั่วโมงที่ 9 - 27)	0.6329	0.6819
เติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้นเท่ากับ 0.3221 ml/min	31.70 (ชั่วโมงที่ 39)	0.0784	0.0647 (ชั่วโมงที่ 12 - 24)	0.6981	0.8392
เติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 9 ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้นเท่ากับ 0.3221 ml/min	32.72 (ชั่วโมงที่ 36)	0.0845	0.0709 (ชั่วโมงที่ 12 - 27)	0.5711	0.8656
เติมสารอาหารที่ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้นเท่ากับ 0.3221 ml/min (C:N = 1.75)	66.39 (ชั่วโมงที่ 45)	0.1008	0.1114 (ชั่วโมงที่ 24 - 33)	1.0613	1.1445

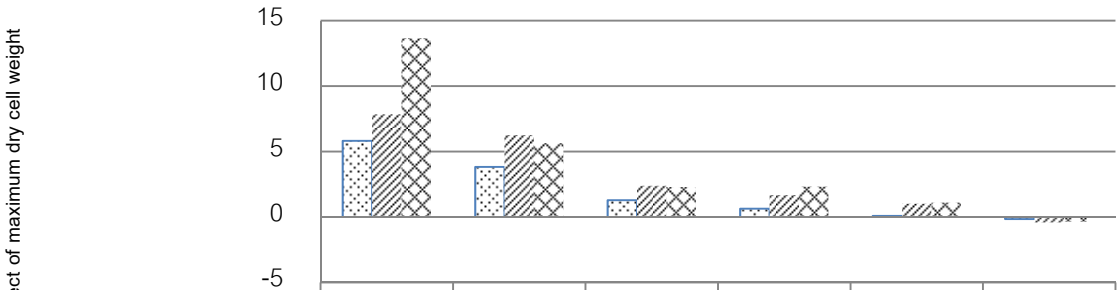
4.3 การคำนวณทางสถิติ

ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัย อันได้แก่ ความเข้มข้นของกลีเซอรอล ค่าออกซิเจนละลาย และค่ากรด-เบสของน้ำหมักที่ส่งผลต่อการเจริญของ *H. polymorpha* โดยทำการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial experiment) (ตารางที่ 4.2) และนำมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติถึงอิทธิพลของปัจจัย (main factor) ต่าง ๆ รวมทั้งปฏิกิริยาสัมพันธ์ (interaction) ของปัจจัยที่มีต่อกันด้วย

ตาราง 4.3 2^3 แฟคทอเรียลดีไซน์เมทริกซ์ (2^3 factorial design matrix)

ลำดับที่	ระดับปัจจัย					
	ความเข้มข้นของกลีเซอรอล(G)		ค่ากรด-เบส (P)		ค่าออกซิเจนละลาย (D)	
	(%)	ระดับ	ค่า	ระดับ	(%)	ระดับ
1	1	-1	3.5	-1	40	-1
2	1	-1	3.5	-1	80	+1
3	1	-1	5.5	+1	40	-1
4	1	-1	5.5	+1	80	+1
5	5	+1	3.5	-1	40	-1
6	5	+1	3.5	-1	80	+1
7	5	+1	5.5	+1	40	-1
8	5	+1	5.5	+1	80	+1
9	3	-1	3.5	-1	40	-1
10	3	-1	3.5	-1	80	+1
11	3	-1	5.5	+1	40	-1
12	3	-1	5.5	+1	80	+1
13	5	+1	3.5	-1	40	-1
14	5	+1	3.5	-1	80	+1
15	5	+1	5.5	+1	40	-1
16	5	+1	5.5	+1	80	+1
17	1	-1	3.5	-1	40	-1
18	1	-1	3.5	-1	80	+1
19	1	-1	5.5	+1	40	-1
20	1	-1	5.5	+1	80	+1
21	5	+1	3.5	-1	40	-1
22	5	+1	3.5	-1	80	+1
23	5	+1	5.5	+1	40	-1
24	5	+1	5.5	+1	80	+1

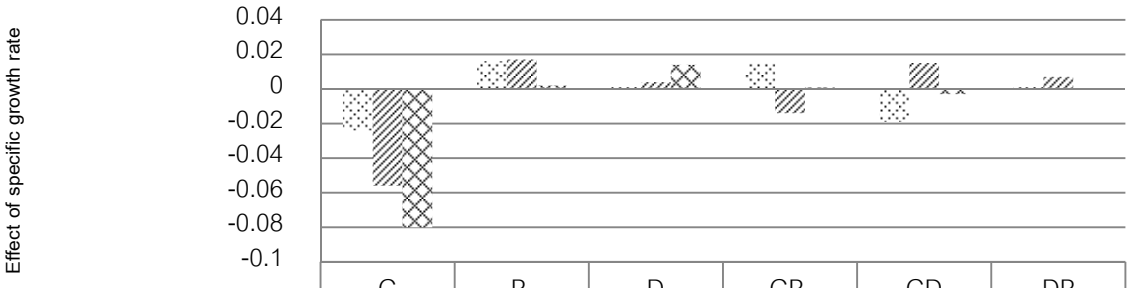
4.3.1 **ผลการคำนวณทางสถิติแบบ** 2-level factorial design **ของความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่มีอิทธิพลต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด**



	G	P	D	GP	GD	DP
1%glycerol: 3%glycerol	5.82	3.83	1.28	0.63	0.09	-0.16
3%glycerol: 5%glycerol	7.84	6.26	2.38	1.68	1.01	-0.41
1%glycerol: 5%glycerol	13.66	5.63	2.29	2.32	1.1	-0.36

รูปที่ 4.9 กราฟแสดงผลการคำนวณทางสถิติถึงอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

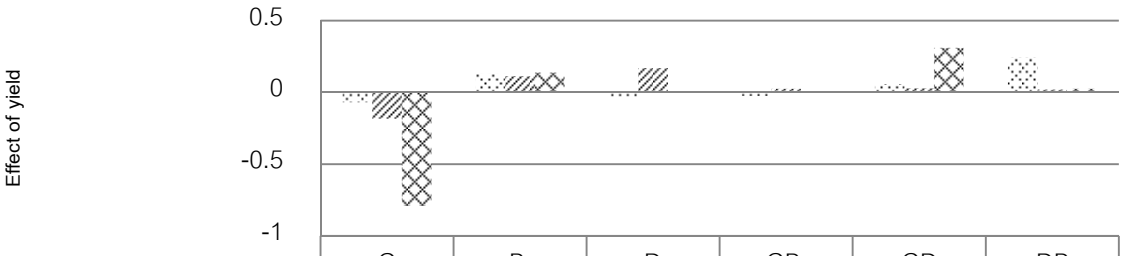
4.3.2 **ผลการคำนวณทางสถิติแบบ** 2-level factorial design **ของความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่มีอิทธิพลต่ออัตราการเจริญจำเพาะ** (specific growth rate)



	G	P	D	GP	GD	DP
1%glycerol: 3%glycerol	-0.024	0.016	0.001	0.015	-0.019	0.001
3%glycerol: 5%glycerol	-0.056	0.017	0.004	-0.014	0.015	0.007
1%glycerol: 5%glycerol	-0.08	0.002	0.014	0.001	-0.003	0

ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงผลการคำนวณทางสถิติถึงอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ต่ออัตราการเจริญจำเพาะ

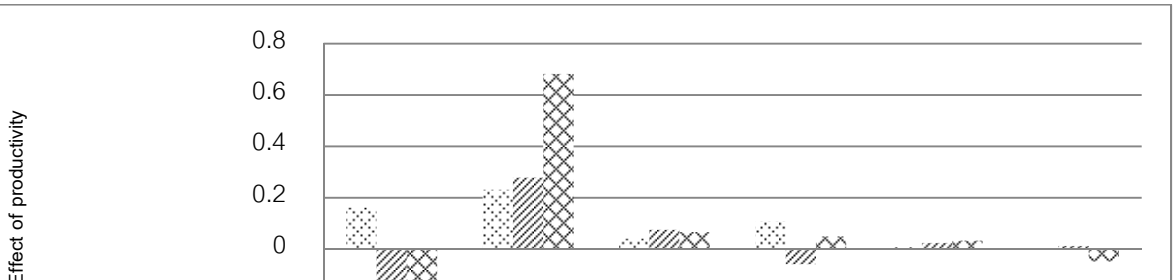
4.3.3 **ผลการคำนวณทางสถิติแบบ** 2-level factorial design **ของความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิต** (productivity)



	G	P	D	GP	GD	DP
1%glycerol: 3%glycerol	-0.069	0.129	-0.03	-0.025	0.058	0.241
3%glycerol: 5%glycerol	-0.182	0.113	0.17	0.025	0.028	0.02
1%glycerol: 5%glycerol	-0.791	0.138	-0.001	-0.0003	0.31	0.025

ภาพที่ 4.11 กราฟแสดงผลการคำนวณทางสถิติถึงอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ต่ออัตราการผลิต

4.3.4 **ผลการคำนวณทางสถิติแบบ** 2-level factorial design **ของความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่มีอิทธิพลต่อผลผลิตมวลเซลล์** (yield)



	G	P	D	GP	GD	DP
1%glycerol: 3%glycerol	0.163	0.232	0.042	0.108	0.009	0.003
3%glycerol: 5%glycerol	-0.321	0.279	0.076	-0.058	0.025	0.013
1%glycerol: 5%glycerol	-0.157	0.683	0.067	0.05	0.034	-0.047

ภาพที่ 4.12 กราฟแสดงผลการคำนวณทางสถิติถึงอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ต่อผลผลิตมวลเซลล์

จากการคำนวณทางสถิติแบบ 2-level factorial design (วิธีการคำนวณตามภาคผนวก จ.) ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล 1 % กับ 3 %, 3 % กับ 5 % และ 1 % กับ 5 % (ภาพที่ 4.9 - 4.12) เมื่อพิจารณาการเจริญของ *H. polymorpha* โดยดูจากการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเป็นปัจจัยที่มีอิทธิผลต่อการเจริญของ *H. polymorpha* มากที่สุด รองลงมาเป็นค่ากรด-เบส, ค่าออกซิเจนละลาย, ปัจจัยร่วมระหว่างความเข้มข้นของกลีเซอรอลกับค่ากรด-เบส และปัจจัยร่วมระหว่างความเข้มข้นของกลีเซอรอลกับค่าออกซิเจนละลาย ตามลำดับ ซึ่งผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด คือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลส่งผลทางบวกทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มมากตามไปด้วย แต่การเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลกลับให้ผลลบต่ออัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการผลิต และผลผลิตมวลเซลล์ หรือทำให้ประสิทธิภาพของกระบวนการหมักลดลง และเห็นได้ชัดเจนที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงๆ เมื่อพิจารณาจากการคำนวณทางสถิติโดยคำนึงถึงประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก พบว่า ค่ากรด-เบสเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลทางบวกต่ออัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการผลิต และผลผลิตมวลเซลล์ เห็นได้อย่างชัดเจนว่า ค่ากรด-เบสมีอิทธิพลต่อผลผลิตมวลเซลล์มากที่สุด และหากทำการปรับความเข้มข้นของกลีเซอรอล และค่าออกซิเจนละลายให้เหมาะสม น่าจะมีผลช่วยให้กระบวนการหมักมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ส่วนค่าออกซิเจนละลายเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเล็กน้อย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลของความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น ค่าออกซิเจนละลาย และค่ากรด-เบสต่อการเจริญของ *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน

จากงานวิจัยที่สนใจทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ค่าออกซิเจนละลาย และค่ากรด-เบสของน้ำหมัก ที่มีผลต่อกระบวนการหมักแบบแบตช์ของ *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน โดยทำการแปรผันปัจจัยที่ต้องการศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ค่ากรด-เบสของน้ำหมักเป็น 3.5 และ 5.5 และค่าออกซิเจนละลายที่ 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การหมักที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล 10 กรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเจริญของ *H. polymorpha* โดยไม่เกิดการยับยั้งของสารอาหารตั้งต้น และเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ถึงแม้ว่าจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มมากขึ้น แต่ทำให้เกิดการยับยั้งของสารอาหารตั้งต้น โดยสังเกตจากอัตราการเจริญจำเพาะ, อัตราการผลิตมวลเซลล์ และผลผลิตมวลเซลล์ที่มีค่าลดลงตามความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เพิ่มมากขึ้น สำหรับค่าออกซิเจนละลายต่อการเจริญของ *H. polymorpha* พบว่า ระดับค่าออกซิเจนสูง คือ 80 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้ *H. polymorpha* เจริญได้ดีกว่าที่ค่าออกซิเจนละลายที่ 40 เปอร์เซ็นต์แต่มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ส่วนค่ากรด-เบสที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *H. polymorpha* เท่ากับ 5.5 จากการทดลองกระบวนการหมักแบบแบตช์ทั้ง 12 ภาวะ พบว่า กระบวนการหมักที่มีการใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล 10 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบส เท่ากับ 5.5 เป็นกระบวนการหมักที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 16.80 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะ เท่ากับ 0.094 ต่อชั่วโมง, อัตราการผลิตมวลเซลล์ เท่ากับ 0.724 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลผลิตมวลเซลล์ เท่ากับ 1.217 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล และการหมักด้วยกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ด้วยภาวะที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ควบคุมค่ากรด-เบสของน้ำหมักเป็น 5.5 และค่าออกซิเจนละลายที่ระดับ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยเริ่มทำการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 12 ด้วยอัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียลโดยสารอาหารที่ใช้ในการเติมมีอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (C:N ratio) เท่ากับ 1.75 ภายหลังทำการหมักเป็นเวลา 51 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 66.39 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 45 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.1114 ต่อชั่วโมง (ช่วง log phase ชม.ที่ 24 – 33) ผลผลิตมวลเซลล์ เท่ากับ 1.0613 กรัมต่อกรัม

กลีเซอรอล และอัตราการผลิตมวลเซลล์ เท่ากับ 1.1445 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเป็นสองเท่าของการหมักแบบแบตช์ที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร และกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ที่สารอาหารที่ใช้เติมมีอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (C:N ratio) เท่ากับ 28 จากการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี 2-level factorial design จะเห็นว่าปัจจัยทั้ง 3 มีผลร่วมกันต่อการเจริญของ *H. poloymorpha* เมื่อพิจารณาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลทางบวกมากที่สุด แต่กลับส่งผลทางลบต่ออัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด, อัตราการผลิตมวลเซลล์ และผลผลิตมวลเซลล์ ซึ่งเป็นค่าที่แสดงประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก สำหรับปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพกระบวนการหมักมากที่สุด ได้แก่ ปัจจัยของค่ากรด-เบส และค่าออกซิเจนละลายเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญน้อยที่สุด

ข้อเสนอแนะ

1. เมื่อทำการหมักด้วยกระบวนการหมักแบบแบตช์ ที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารอาหารตั้งต้นมากเกินจุดวิกฤติ อาจเกิดการยับยั้งของสารอาหารตั้งต้นซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก เราสามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นโดยทำการหมักซึ่งใช้กระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ และคาดหวังว่าจะได้การเจริญเติบโตแบบความหนาแน่นสูง
2. การหมักแบบเฟดแบตช์ซึ่งมีการเติมสารอาหารแบบเอ็กโพเนนเชียส ควรทำการคำนวณอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (C:N ratio) ให้เหมาะสม ในงานวิจัยนี้อาศัยข้อมูลพื้นฐานจากกระบวนการหมักแบบแบตช์มาใช้ในการคำนวณหาค่า C:N ratio ของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *H. polymorpha* มีค่าเท่ากับ 1.75
3. เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการหมักอาจต้องอาศัยเทคนิคอื่น ๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ทำการหมักแบบเฟดแบตช์โดยการเติมสารอาหารแบบต่าง ๆ เช่น การเติมสารอาหารด้วยอัตราคงที่, การเติมสารอาหารด้วยอัตราแบบ step increase (0.5, 1.0, 1.3 มิลลิลิตรต่อนาที) และ step decrease (1.6, 1.3, 1.0, 0.8, 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที) เป็นต้น (Lee และคณะ, 2003) หรือกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ซึ่งมี online signal ทำการสั่งการอัตโนมัติในการเติมสารอาหาร ส่วนใหญ่การสั่งงานในลักษณะนี้จะขึ้นอยู่กับค่ากรด-เบส (pH-stat) หรือค่าละลายออกซิเจนในน้ำหมัก (DO-stat) (Hang และคณะ, 2009; Sun และคณะ, 2006; Lee และคณะ, 1999) เป็น real-time monitor สามารถติดตามและ

ควบคุมกระบวนการหมักให้เป็นไปตามที่ต้องการ และทำให้กระบวนการหมักมีประสิทธิภาพได้ผลผลิตมวลเซลล์และผลิตภัณฑ์สูง หรืออาจใช้กระบวนการหมักประเภทอื่น เช่น การหมักแบบต่อเนื่อง (Khannaและคณะ, 2008) (continuous) การหมักซ้ำ (repeated batch) (Moeller และคณะ, 2011;Liu, 2004; Gary และคณะ, 1992;) เป็นต้น ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยง

4. สามารถนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ ไปใช้เป็นพื้นฐานในการออกแบบกระบวนการหมักให้ได้ผลผลิตมวลเซลล์ที่มีความหนาแน่นเซลล์สูง โดยใช้ *H. polymorpha* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีนที่มีมูลค่าสูง เช่น ยาปฏิชีวนะ และเอนไซม์ต่าง ๆ

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

แคทลียา ตาลวงษ์. 2550. การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ *Hansenula polymorpha* โดยใช้กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน, วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชุมพล ยวงใย และสุวดี นำพาเจริญ. การทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial Designs)[ออนไลน์] แหล่งที่มา: http://www.solutioncenterminitab.com/download/paper/factorial.pdf [2552, 27 ธันวาคม]

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. ยีสต์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. 1000 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมัก และสิ่งแวดล้อม. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศิริพงศ์ ลิ้มพัธยาเนตร และ ฤดีมาศ มโนศักดิ์. 2552, การเพิ่มความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีทางเคมี, โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, หน้า 7 – 13

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2538, กลีเซอรีนบริสุทธิ์ (REFINED GLYCERINE), กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพมหานคร

วราวุฒิ ครูส่ง และกรวิกา สุขศรีวงษ์. 2539. เทคโนโลยีชีวภาพ (ฉบับปรับปรุงใหม่). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 213 หน้า

วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 209 หน้า

อนุสรณ์ แสงนิ่มนวล. แนวโน้มพลังงานไทยในอนาคต [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา: http://www.aeitf.org/article.php?id=22 [2554, มิถุนายน 9]

ภาษาอังกฤษ

Ayed, A., Rabhi, I., Dellagi, K. and Kallel, H. 2008. High level production and purification of human interferon α2b in high cell density culture of *Pichia pastoris.* Enzyme and Microbial Technology. 42: 173 – 180.

Bhalla, T. C., Sharma, N. N. and Sharma, M. 2007. Production of metabolites, industrial enzyme, amino acid, organic acid, antibiotics, vitamins and single cell protein. National Science Digital Library, India.

Box, G., Hunter, J. and Hunter, W. (2005) Statistics for Experimenters: Design Innovation and Discovery, 2nd Edition Wiley, New York.

Celik, E., Ozbay, N., Oktar, N. and Calik, P. 2008. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for the fermentation process by recombinant *Pichia pastoris*. Industrial and Engineering Chemistry Research. 47: 2985 – 2990.

Chen, Z., Wang, Z., He, X., Guo, X., Li, W. and Zhang, B. 2008. Uricase production by recombinant *Hansenula polymorpha* strain harboring *Candida utilis* uricase gene. Applied Microbiology and Biotechnology. 79: 545 – 554.

Chiruvolu, V., Eskridge, K., Cregg, J. and Meagher, M. 1998. Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast. Applied Biochemistry and Biotechnology. 75: 163 -173

Claret, C. Bories, A. and Soucaille, P. 1992. Glycerol inhibition of growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. Current Microbiology. 25: 149 – 155.

Danesi, E. D. G., Miguel, A. S. M., de Oliveira Rangel-Yagui, C., de Carvalho, J. C. M. and Jr. Pessoa, A. 2006. Effect of carbon : nitrogen ratio (C:N) and substrate source on glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) production by recombinant *Saccharomyces cerevisiea.* Journal of Food Engineering. 75: 96 – 103.

Hang, H., Ye, X., Guo, M., Chu J., Zhuang, Y., Zhang, M. and Zhang S. 2009. A simple fermentation strategy for high – level production of recombinant phytase by *Pichia pastoris* using glucose as the growth substrate. Enzyme and Microbial Technology. 44: 185 – 188.

Harris, E. E., Saeman, J. F., Marquardt, R. R., Hannan, M. L. and Rogers, S. C. 1948. Fodder yeast from wood hydrolyzation and still residues. Industrial and Engineering Chemistry Research. 40(7): 1220 – 1223.

Heijtink, R. A., Bergen, P. van, Melber, K., Janowicz, Z. A. and Osterhaus, A. D. M. E. 2002. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) derived from yeast cells (*Hansenula polymorpha*) used to estabilish an influence of antigentic subtype (adw_2, adr, ayw_3) in measuring the immune response after vaccination. Vaccine. 20: 2191 – 2196.

Hellmuth, K., Lopez – Ulibarri, R., Mayer, A. F., Schlieker, H. W. and Loon, A. V. 2001. Protein production process. Patent US6,204,012 B1.

Heo, J. H., Ananin, V., Kang, H. A., Rhee, S. K. and Kim, C. H. 2008. Feeding strategies for the enhanced production of recombinant human serum albumin in the fed – batch cultivation of *Hansenula polymorpha*. Process Biochemistry. 43: 918 – 924.

Jahic, M., Rotticci – Mulder, J. C., Martinelle, M., Hult, K. and Enfors, S – O. 2002. Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. Bioprocess and Biosystems Engineering. 24: 385 – 393.

Karinen, R. S. and Krause, A. O. I. 2006. New biocomponents from glycerol. Applied Catalysis A: General. 306: 128 – 133.

Khanna, S. and Srivastava, K. A. 2008. Continuous production of poly–β–hydroxybutyrate by high-cell-density cultivation of *Wautersia eutropha*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 83: 799 – 805.

Khongto, B., Laoteng, K. and Tongta, A. 2010. Fermentation process development of recombinant *Hansenula polymorpha* for gamma–linoenic acid production. Journal of Microbiology and Biotechnology. 20(11): 1555 – 1562.

Kim, C. H., Seo, H. W., Sohn, J. H., Choi, E. S. and Rhee, S. K. 1998. Production of recombinant hirudin in *Hansenula polymorpha*: variation of gene expression level depends on methanol oxidase and fermentation strategies. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 21: 1 – 5.

Kleman, G. L. and Strohl, W. R. 1992, High cell density and high-productivity microbial fermentation. Current Opinion in Biotechnology. 3: 93 – 98.

Knoll, A., Bartsch, S., Husemann, B., Engel, P. and Schroer. 2007. High cell density cultivation of recombinant yeast and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactor. Journal of Biotechnology. 132: 167 – 179.

Kyu, Y. J., Shang, L., Kim, M. II., Jeong, C. M., Chang, H. N., Hahm, M. S., Rhee, S. K. and Kang, H. A. 2010. Enhanced production of human serum albumin by fed-batch culture of *Hansenula polymorpha* with high-purity oxygen. Journal of Microbiology and Biotechnology. 20(11): 1534 – 1538.

Lee, J., Lee, S. Y., Park, S. and Middelberg, A. P. J. 1999. Control of fed-batch fermentations. Biotechnology Advance. 17: 29 – 48.

Li, Y., Zhao, Z. K. and Bai, F. 2007. High – density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed – batch culture. Enzyme and Microbial Technology. 41: 312 – 317.

Liu, Y. and Liu D. 2004. Kinetic study on glycerol production by repeated batch fermentation using free *Candida krusei*. Process Biochemistry. 39: 1507 – 1510.

Miller, B. M. and Litsky, W. 1976. Single cell protein in industrial microbiology. McGrow – Hill Book Co., New York.

Moeller, L., Grunberg, M., Zehnsdorf, A., Aurich, A., Bley, T. and Strehlitz, B. 2011. Repeated fed-batch fermentation using biosensor online control of citric acid production by *Yarrowia lipolttica*. Journal of Biotechnology. 153: 133 – 137.

Moon, H., Kim, H., Rhee, S. K., Choi, E. S., Kim, I. H. and Hong, S. I. 2002. Optimal strategy of pH control in the production of recombinant human epidermal growth factor by *Hansenula polymorpha*. Process Biochemistry. 38: 487 – 495.

Muller, F. II., Tieke, A., Waschk, D., Muhle, C., Muller, F. I., Seigelchifer, M., Pesce, A., Jenzelewski, V. and Gellissen, G. 2002. Production of IFNα-2a in *Hansenula polymorpha*. Process Biochemistry. 38: 15 – 25.

Nasseri, A. T., Rasoul – Amini, S., Morowvat, M. H. and Ghasemi, Y. 2011. Single cell protein: production and process. American Journal of Food Technology. 6(2): 103 -116.

Ordaz, L., Lopez, R., Melchy, O. and de la Torre, M. 2001. Effect of high-cell-density fermentation of *Candida utilis* on kinetic parameters and the shift to respire-fermentative metabolism. Applied Microbiology and Biotechnology. 57(3): 374 – 378.

Revillion, Jean P. de Palma, Brandelli, A. and Ayub, Marco A. Zachia. 2003 Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus.* Brazilian Archives of Biology and Technology. 46(1): 121 – 127.

Satyanayana, T. and Kunze, G. 2009. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. Springer Science. : 47 – 64.

Shang, L., Tian, P.Y., Kim, N.J., Chang, H.N. and Hahm, S.M. 2009. Effects of oxygen supply modes on the production of human growth hormone in different scale bioreactors. Chemical Engineering and Technology. 32: 600 – 605.

Sun, Z., Ramsay, J. A., Guay, M. and Ramsay, B. A. 2006. Automated feeding strategies for high-cell-density fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440. Applied Microbiology and Biotechnology. 71: 423 – 431.

Tang, S., Boehme, L., Lam, H. and Zhang, Z. 2009. *Pichia pastoris* fermentation for phytase production using crude glycerol from biodiesel production as the sole carbon source. Biochemical Engineering Journal. 43: 157 – 162.

Wang, Y. H., Fang, X. L., Li, Y. P. and Zhang, X. 2010. Effect of constant and shifting dissolved oxygen concentration on the growth and antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila.* Bioresource Technology. 101: 7529 – 7536.

Wu, Q., Xu, W., Ying, H. and Ouyang, P. 2010. Kinetic analysis and pH-shift control strategy for Poly (δ - glutamic acid) production with *Bacillus subtilis* CGMCC 0833. Biochemical Engineering Journal. 50: 24 – 28.

Youn, J. K., Shang, L., Kim, M., Jeong, C. M., Chang, H. N., Hahm, M. S., Rhee, S. K. and Kang, H. A. 2010. Enhanced production of human serum albumin be fed-batch culture of *Hansenula polymorpha* with high-purity oxygen. Journal of Microbiology and Biotechnology. 20(11): 1534 – 1538.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมสารสำหรับวิเคราะห์ปริมาตรไนโตรเจน

1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N = 40 กรัม

ถ้าสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N = (40 x 0.1) / 1

= 4 กรัม

นำสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร หรือหากต้องการเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 100 มิลลิลิตร ต้องละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม

1.2 การเตรียมสารละลาย Potassium hydrogen phosphate (KHP)

KHP มีมวลโมเลกุล (M.W.) เท่ากับ 204.23 (1 N)

ดังนั้นสารละลาย KHP 0.1 N จะมีสาร KHP อยู่ = 204.23 x 0.1 = 20.423 กรัม สารละลาย KPH 20.4 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร หรือหากต้องการเตรียมสารละลาย KPH 25 มิลลิลิตร ต้องละลายสาร KHP 0.51 กรัม

1.3 การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

โดยนำสารละลาย KHP ที่เตรียมจากข้อ 1.2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์ฟีนอลทาลีน (phenophthalein) 3 หยด จากนั้นนำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมจากข้อ 1.1 เมื่อถึงจุดยุติ สารละลายในขวดทดลองจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต แล้วคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังนี้

N ของ NaOH = (ปริมาตรของ KHP x 1000) / M.W. x ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไทเทรต

1.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1N

เตรียมจากกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% (w/w)

โดย HCl 1 ลิตร = 1.19 kg

ความหนาแน่น = มวล / ปริมาตร = 1.19 kg/1000 ml ;1 ml = 1.19 g

น้ำหนักโมเลกุลของ HCl = 36; 1 N = 36 g

1 N HCl มีเนื้อ HCl อยู่ = 36 g

ถ้า 0.1 N HCl มีเนื้อ HCl อยู่ = 36 x 0.1 = 3.6 g

แต่ทำการเตรียมจาก HCl 37%

เนื้อสาร HCl 37 g มาจากสารละลาย = 100 g

ถ้าเนื้อสาร HCl 3.6 g มาจากสารละลาย HCl = 100 x 3.6/37 = 9.7297 g

HCl 1190 g มาจากสารละลาย HCl = 1000 ml

ถ้า HCl 9.7297 g มาจากสารละลาย HCl = 1000 x 9.7297/1190 = 8.1762 ml

ดังนั้น ในการเตรียมสารละลาย 0.1 N HCl ปริมาตร 1 ลิตร ต้องใช้ HCl เข้มข้น 37% ปริมาตร 8.1762 มิลลิลิตร ละลายในน้ำบริสุทธิ์ 1 ลิตร

1.5 การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก 0.1 N

โดยนำ HCl 0.1 N ที่เตรียมจากข้อ 1.4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร มาไทเทรตกับ 0.1 N NaOH ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจากข้อ 1.3 โดยใช้ Phenopthalein เป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู โดยสูตรคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ HCl ดังนี้

$$V_1 N_1 = N_2 V_2$$

เมื่อ V_1 = ความเข้มข้นที่แน่นอนของสาร NaOH

V_2 = ปริมาตรของสาร NaOH ที่ใช้ไทเทรต

N_1 = ความเข้มข้นที่แท้จริงของ HCl ที่ต้องการทราบ

N_2 = ปริมาตรของ HCl ที่นำมาไทเทรต

1.6 การเตรียมสารละลายกรดบอริก (Boric acid) 4%

ละลายกรดบอริก 40 กรัม ในน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 1 ลิตร อาจใช้ความร้อนช่วยในการละลาย

1.7 การเตรียมอินดิเคเตอร์ (Mixed Indicator)

นำ methyl red 0.001 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 10 มิลลิลิตร และนำ bromcresol green 0.001 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 10 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายทั้งสองมาผสมกันในอัตราส่วน 1:5

ภาคผนวก ข

1. ตัวอย่างการคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมง (specific growth rate), ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) และอัตราการผลิต (productivity)

ในการหาอัตราการเจริญเติบโตอาศัยสมการการเจริญเติบโตของ Monod (Monod's growth equation) โดยกำหนดว่าในสภาพที่ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของสารอาหารที่มีอยู่จำกัด อัตราการเจริญเติบโตจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของมวลเซลล์ และความเข้มข้นของสับสเตรท ดังนั้น

$$\frac{dx}{dt} = f(x, s)$$

เมื่อ x = มวลของเซลล์ต่อหน่วยปริมาตร

s = ความเข้มข้นของสารอาหารที่มีจำกัด

$\frac{dx}{dt}$ = อัตราการเจริญเติบโต

- **อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมง** (specific growth rate, **ต่อชั่วโมง**) หมายถึง อัตราการเพิ่มมวลของเซลล์ต่อหน่วยเวลาต่อหน่วยมวลของเซลล์ ดังนั้น

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt}$$

หรือ สามารถหาอัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงได้จากการเขียนกราฟระหว่าง ln x และ t จะได้กราฟเส้นตรงที่มีความชัน เท่ากับ μ

- **ผลผลิตมวลเซลล์**(yield, **กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล**) หมายถึง สัดส่วนระหว่างปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (ΔX) ต่อสารอาหารตั้งต้นที่ถูกใช้ไป (ΔS) ดังนั้นจะได้ว่า

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta s} = \frac{X - X0}{S0 - S}$$

หรือ สามารถหาผลผลิตมวลเซลล์ได้จากการเขียนกราฟระหว่าง X และ S จะได้กราฟเส้นตรงที่มีความชัน เท่ากับ $-Y_{x/s}$

- **อัตราการผลิต** (productivity, **กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง**) หมายถึง ผลผลิตที่ได้จากการหมักต่อระยะเวลาที่ใช้ ตั้งแต่เริ่มใส่กล้าเชื้อจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก ซึ่งมีหน่วย

เป็นมวลของผลผลิตต่อหน่วยปริมาตรต่อหน่วยเวลา ค่าที่ได้เป็นอัตราโดยเฉลี่ยของการผลิต ซึ่งสามารคำนวณได้จากสมการ

$$\frac{X - X_0}{t - t_0}$$

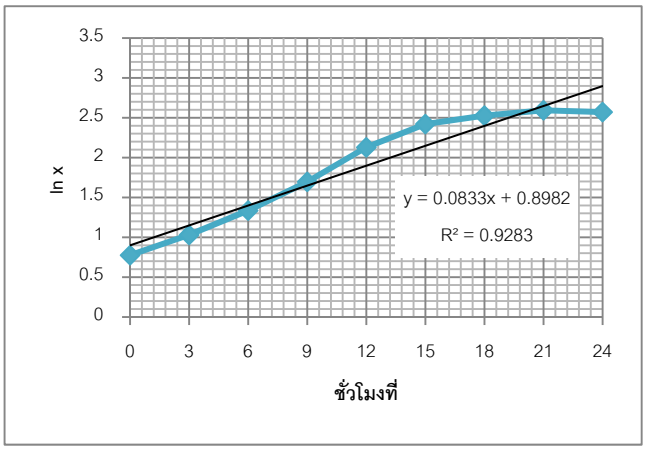
หรือ สามารถหาผลผลิตมวลเซลล์ได้จากการเขียนกราฟระหว่าง X และ t จะได้กราฟเส้นตรงที่มีความชัน เท่ากับ อัตราการผลิต

ตาราง ข.1 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ระหว่างการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
0	2.17	10.870
3	2.80	10.850
6	3.80	9.326
9	5.45	8.857
12	8.40	6.938
15	11.25	6.250
18	12.51	4.300
21	13.38	2.028
24	13.08	0.492

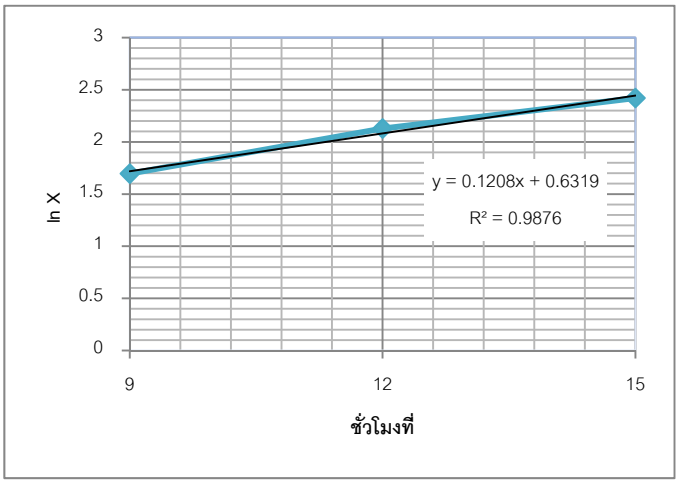
(1) ตารางการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)

(1.1) อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงตลอดกระบวนการหมัก เท่ากับ 0.083 ต่อชั่วโมง



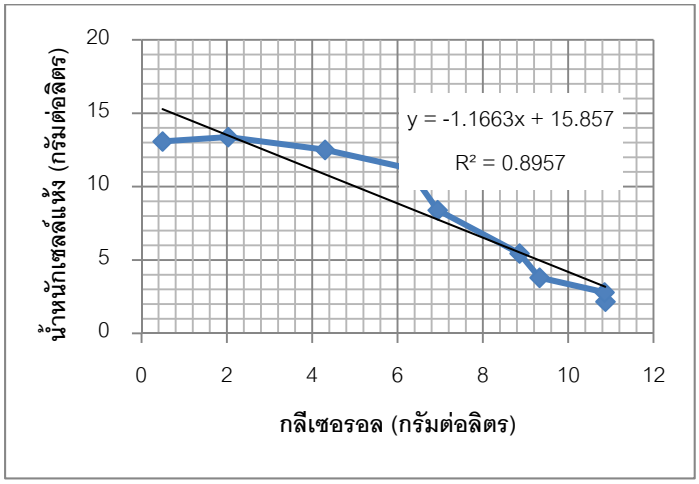
ภาพที่ ข.1 อัตราการเจริญจำเพาะตลอดกระบวนการหมักของ *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(1.2) อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงในช่วง log phase เท่ากับ 0.120 ต่อชั่วโมง



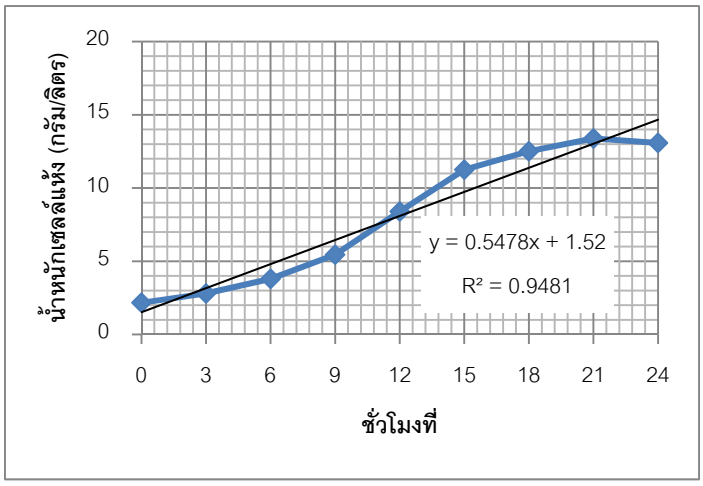
ภาพที่ ข.2 อัตราการเจริญจำเพาะในช่วง log phase ของการหมักของ *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(2) ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) เท่ากับ 1.166 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล



ภาพที่ ข.3 ผลผลิตมวลเซลล์ของการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(3) อัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.547 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง)



ภาพที่ ข.4 อัตราการผลิตของการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. ตัวอย่างการคำนวณหาความเข้มข้นของกลีเซอรอลในน้ำหมัก (กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ ข.2 แสดงพื้นที่ได้กราฟและปริมาณกลีเซอรอลที่ชั่วโมงต่าง ๆ

ชั่วโมงที่	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	
	พื้นที่ใต้กราฟ	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
Std.	11,700	2
0	7,159	12.238
3	6,418	10.971
6	6.083	10.398
9	5,872	10.038
12	4,532	7.747
15	2,883	4.928
18	0	0
21	0	0
24	0	0

สารละลายมาตรฐานกลีเซอรอลความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC มีพื้นที่ใต้กราฟ เท่ากับ 11,700 จากตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 (ทำการเจือจางตัวอย่าง 10 เท่า) มีพื้นที่ใต้กราฟ เท่ากับ 7,159 ดังนั้น สามารถคำนวณความเข้มข้นของกลีเซอรอล ได้จากสมการ

$$= \frac{\text{ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน x อัตราการเจือจาง x พื้นที่ใต้กราฟของสารตัวอย่าง}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐาน}}$$

$$= \frac{2 \times 10 \times 7{,}159}{11{,}700}$$

= 12.238 กรัมต่อลิตร

ภาคผนวก ค

การคำนวณหาอัตราการเติมสารอาหารแบบเอ็กโพเนนเชียล

อัตราการเติมสารอาหารแบบเอ็กโพเนนเชียลในกระบวนการหมักแบบเฟด – แบตช์ สามารถคำนวณได้โดยอาศัยสมดุลมวลของสารอาหารตั้งต้น จากสมการ

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V}(Si - S) - \frac{\mu X}{Yx/s}$$

เมื่อ

S = ความเข้มข้นของสารอาหาร (กรัมต่อลิตร)

t = ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มทำการเติมสารอาหาร (ชั่วโมง)

F = อัตราการเติมสารอาหาร (ลิตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตรน้ำหมัก (ลิตร)

S^i = ความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารที่ใช้เติม (กรัมต่อลิตร)

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

Yx/s = ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (กรัมเซลล์ต่อกรัมสารอาหาร)

X = ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)

ภายใต้ภาวะที่สารอาหารมีอยู่อย่างจำกัดจะทำให้ค่า $S \approx 0$ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาให้ความเข้มข้นของสารอาหารในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพคงที่จะได้ $dS/dt = 0$ จากภาวะดังกว่าทำให้เราสามารถหาอัตราการเติมสารอาหารเริ่มต้น (F_0) ได้ดังสมการ

$$F_0 = \frac{\mu X_0 V_0}{Yx/s\ S^i}$$

เมื่อ

F_0 = อัตราการเติมสารอาหารเมื่อเริ่มต้นการเติม (ลิตรต่อชั่วโมง)

V_0 = ปริมาตรน้ำหมักเมื่อเริ่มต้นการเติมสารอาหาร (ลิตร)

X_0 = ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์เริ่มต้น

ตัวอย่างการคำนวณ

จากการหมักแบบแบตช์ ได้ข้อมูลดังนี้

V_0 = 2 ลิตร

μ = 0.127 ต่อชั่วโมง

Yx/s = 1.75 กรัมเซลล์ต่อกรัมกลีเซอรอล

X_0 = 12.9 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้เติมมีค่า100 กรัมต่อลิตร หรือ S_i = 100 กรัมต่อลิตร

ดังนั้น $F_0 = \frac{0.127*12.9*2}{1.75*100} = 0.0187$ ลิตรต่อชั่วโมง

เนื่องจากในกระบวนการหมักแบบเฟด – แบตช์ ทั้งปริมาตรและความเข้มข้นของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ซึ่งทำให้อัตราการเติมสารอาหารเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาด้วย หรืออาจกล่าวได้ว่าอัตราการเติมสารอาหารเป็นฟังก์ชันของเวลา ซึ่งสามารถคำนวณอัตราการเติมสารอาหารได้จากสมการ

$$F(t) = F_0 e^{\mu t}$$

ตาราง ค.1 อัตราการเติมสารอาหารแบบเอ็กโพเนนเชียลที่เวลาใด ๆ

h	VT (L)	F(t) (mL/min)	h	VT (L)	F(t) (mL/min)
0		0.312	5.5	2.15	0.627
0.5	2.01	0.332	6	2.17	0.668
1	2.02	0.354	6.5	2.19	0.711
1.5	2.03	0.377	7	2.22	0.758
2	2.04	0.402	7.5	2.24	0.808
2.5	2.06	0.428	8	2.27	0.861
3	2.07	0.456	8.5	2.30	0.917
3.5	2.09	0.486	9	2.32	0.977
4	2.10	0.518	9.5	2.36	1.041
4.5	2.12	0.552	10	2.39	1.110
5	2.13	0.588	10.5	2.42	1.182

ตาราง ค.1 อัตราการเติมสารอาหารแบบเอ็กโพเนนเชียลที่เวลาใด ๆ (ต่อ)

h	VT (L)	F(t) (mL/min)	h	VT (L)	F(t) (mL/min)
11	2.46	1.260	16.5	3.08	2.533
11.5	2.50	1.343	17	3.16	2.699
12	2.55	1.431	17.5	3.25	2.876
12.5	2.59	1.524	18	3.34	3.065
13	2.64	1.624	18.5	3.44	3.266
13.5	2.69	1.731	19	3.54	3.480
14	2.75	1.844	19.5	3.66	3.708
14.5	2.81	1.965	20	3.77	3.951
15	2.87	2.094	20.5	3.90	4.210
15.5	2.94	2.231	21	4.04	4.486
16	3.01	2.378	21.5	4.18	4.781

ภาคผนวก ง

1. การเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบแบตช์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร เมื่อทำการแปรผันปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญในระหว่างกระบวนการหมักที่ภาวะต่าง ๆ

1.1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5

ตารางที่ ง.1.1 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ค่ากรด-เบส	ค่าออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (%)	อุณหภูมิ (^{0}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)
0	3.65	46.2	37.0	21	1.0
3	3.52	35.6	37.0	333	1.0
6	3.52	39.4	37.0	586	1.0
9	3.52	39.4	37.0	660	1.0
12	3.51	40.8	37.0	758	1.0
15	3.50	39.7	37.0	800	1.0
18	3.53	37.1	37.0	661	1.0
21	3.50	42.6	37.0	770	1.0
24	3.52	39.4	37.0	870	1.0

ตารางที่ ง.1.2 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย			
0	2.24	2.18	2.10	2.17 ± 0.07	1.68	10.870	2.190
3	2.74	2.91	2.75	2.80 ± 0.10	1.80	10.850	2.120
6	3.80	3.79	3.82	3.80 ± 0.02	2.08	9.326	2.080
9	5.56	5.53	5.25	5.45 ± 0.17	10.95	8.857	1.900
12	8.42	8.37	8.40	8.40 ± 0.03	21.15	6.938	1.690
15	11.42	10.95	11.39	11.25 ± 0.26	64.00	6.250	1.580
18	12.54	12.53	12.46	12.51 ± 0.04	67.10	4.300	1.290
21	13.42	13.25	13.48	13.38 ± 0.12	74.20	2.028	1.250
24	13.12	13.09	13.04	13.08 ± 0.04	76.10	0.492	1.220

จากการทดลองพบว่า (ตัวอย่างการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ข.)

1. น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 13.38 กรัมต่อลิตร
2. เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดต่อชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 21
3. อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมง (specific growth rate, μ)
   3.1 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงตลอดกระบวนการหมัก เท่ากับ 0.083 ต่อชั่วโมง
   3.2 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงในช่วง log phase เท่ากับ 0.120 ต่อชั่วโมง
4. ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) เท่ากับ 1.166 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล
5. อัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.547 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง)
6. ชั่วโมงที่ 24 พบกลีเซอรอลคงเหลือ เท่ากับ 0.492 กรัมต่อลิตร และไนโตรเจนคงเหลือ เท่ากับ 1.220 กรัมต่อลิตร

1.2 ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5

ตารางที่ ง.1.3 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ค่ากรด-เบส	ค่าออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (%)	อุณหภูมิ (^{0}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)
0	3.50	78.2	37.2	349	1.0
3	3.50	79.3	37.0	601	1.0
6	3.52	79.4	37.0	824	1.0
9	3.50	77.7	37.0	792	1.0
12	3.50	82.1	37.0	806	1.0
15	3.50	77.3	37.0	807	1.0
18	3.50	71.3	37.1	806	1.0
21	3.50	75.7	37.1	806	1.0
24	3.50	87.6	37.0	806	1.0

ตารางที่ ง.1.4 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย			
0	1.60	1.50	1.30	1.47 ± 0.15	1.46	12.131	2.550
3	1.78	1.69	1.73	1.73 ± 0.05	1.54	11.405	2.450
6	2.56	2.54	2.61	2.57 ± 0.04	4.30	10.211	2.410
9	5.04	5.01	5.23	5.09 ± 0.12	12.20	8.273	2.050
12	9.32	9.28	9.31	9.30 ± 0.02	32.00	3.970	1.760
15	11.92	11.54	11.90	11.79 ± 0.21	33.30	0	1.620
18	12.74	12.50	12.75	12.66 ± 0.14	41.10	0	1.440
21	13.56	13.26	13.42	13.41 ± 0.15	47.30	0	1.370
24	14.16	15.59	14.25	14.67 ± 0.80	71.70	0	1.330

จากการทดลองพบว่า (ตัวอย่างการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค.)

1. น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 14.67 กรัมต่อลิตร
2. เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดต่อชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 24
3. อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมง (specific growth rate, μ)
   3.1 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงตลอดกระบวนการหมัก เท่ากับ 0.107 ต่อชั่วโมง
   3.2 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงในช่วง log phase เท่ากับ 0.140 ต่อชั่วโมง
4. ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) เท่ากับ 0.991 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล
5. อัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.637 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง)
6. ชั่วโมงที่ 15 กลีเซอรอล เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร และชั่วโมงที่ 24ไนโตรเจนคงเหลือ เท่ากับ 1.330 กรัมต่อลิตร

1.3 ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5

ตารางที่ ง.1.5 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ค่ากรด-เบส	ออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (%)	อุณหภูมิ (^{0}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)
0	5.54	37.9	35.9	233	1.0
3	5.50	39.5	37.0	587	1.0
6	5.50	39.3	37.0	762	1.0
9	5.50	39.1	37.0	486	1.0
12	5.52	37.4	37.0	581	1.0
15	5.60	37.7	37.0	901	1.0
18	5.67	48.5	37.0	601	1.0
21	5.56	44.3	37.0	501	1.0
24	5.50	36.2	37.0	468	1.0

ตารางที่ ง.1.6 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย			
0	1.84	1.56	1.73	1.71 ± 0.14	1.68	10.038	2.190
3	3.54	2.92	3.23	3.23 ± 0.31	3.70	10.971	2.400
6	5.90	4.79	5.45	5.38 ± 0.56	10.35	10.398	2.330
9	7.96	7.52	7.23	7.57 ± 0.37	21.25	7.747	2.330
12	12.90	11.26	12.50	12.22 ± 0.86	49.60	4.928	1.910
15	16.60	15.57	15.43	15.87 ± 0.64	56.30	0	1.600
18	16.94	15.83	15.80	16.19 ± 0.65	57.20	0	1.390
21	16.70	16.89	16.19	16.59 ± 0.36	58.50	0	1.560
24	17.04	16.93	16.42	16.80 ± 0.33	60.05	0	1.320

จากการทดลองพบว่า (ตัวอย่างการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค.)

1. น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 16.80 กรัมต่อลิตร
2. เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดต่อชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 24
3. อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมง (specific growth rate, μ)
   3.1 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงตลอดกระบวนการหมัก เท่ากับ 0.094 ต่อชั่วโมง
   3.2 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงในช่วง log phase เท่ากับ 0.123 ต่อชั่วโมง
4. ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) เท่ากับ 1.217 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล
5. อัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.724 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง)
6. ชั่วโมงที่ 12 กลีเซอรอล เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร และชั่วโมงที่ 24ไนโตรเจนคงเหลือ เท่ากับ 1.320 กรัมต่อลิตร

1.4 ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5

ตารางที่ ง.1.7 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ค่ากรด-เบส	ค่าออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (%)	อุณหภูมิ (^{0}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)
0	5.50	86.2	36.4	21	1.0
3	5.49	79.2	37.0	617	1.0
6	5.54	79.3	37.0	850	1.0
9	5.53	86.3	37.0	816	1.0
12	5.54	80.5	37.0	816	1.0
15	5.52	98.0	37.0	780	1.0
18	5.54	80.9	37.0	761	1.0
21	5.50	87.6	37.0	761	1.0
24	5.55	88.9	37.1	761	1.0

ตารางที่ ง.1.8 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย			
0	2.50	3.48	3.00	3.00 ± 0.49	1.24	10.508	2.440
3	3.20	3.62	3.58	3.47 ± 0.23	3.42	10.066	2.050
6	4.80	5.74	5.52	5.35 ± 0.49	9.60	8.758	1.990
9	7.20	8.52	8.57	8.10 ± 0.78	20.55	6.680	1.700
12	10.26	14.24	12.35	12.28 ± 1.99	36.90	1.362	1.120
15	14.60	14.50	14.28	14.46 ± 0.16	49.00	0	0.990
18	16.22	14.78	16.50	15.83 ± 0.92	50.80	0	0.930
21	16.58	16.46	16.82	16.62 ± 0.18	57.40	0	0.870
24	18.02	17.36	18.25	17.88 ± 0.46	74.00	0	0.770

จากการทดลองพบว่า (ตัวอย่างการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค.)

1. น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 17.88 กรัมต่อลิตร
2. เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดต่อชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 24
3. อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมง (specific growth rate, μ)
   3.1 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงตลอดกระบวนการหมัก เท่ากับ 0.081 ต่อชั่วโมง
   3.2 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงในช่วง log phase เท่ากับ 0.138 ต่อชั่วโมง
4. ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) เท่ากับ 1.216 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล
5. อัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.701 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง)
6. ชั่วโมงที่ 15 กลีเซอรอล เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร และชั่วโมงที่ 24ไนโตรเจนคงเหลือเท่ากับ 0.770 กรัมต่อลิตร

1.5 ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5

ตารางที่ ง.1.9 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ค่ากรด-เบส	ค่าออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (%)	อุณหภูมิ (^{0}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)
0	3.51	63.0	36.8	21	1.0
3	3.51	43.2	37.0	137	1.0
6	3.52	39.4	37.0	495	1.0
9	3.52	39.7	37.0	629	1.0
12	3.52	38.8	37.0	771	1.0
15	3.50	37.4	37.0	802	1.0
18	3.49	40.5	37.0	825	1.0
21	3.50	40.2	37.0	829	1.0
24	3.49	40.6	37.0	810	1.0

ตารางที่ ง.1.10 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย			
0	4.48	3.99	4.12	4.20 ± 0.25	1.36	32.262	18.930
3	5.34	5.20	5.35	5.30 ± 0.08	2.05	31.460	18.930
6	5.50	5.35	5.49	5.45 ± 0.08	2.60	31.389	2.630
9	6.00	5.98	5.76	5.91 ± 0.13	7.10	31.096	2.590
12	8.56	7.54	8.43	8.18 ± 0.56	18.90	30.713	2.370
15	11.94	10.58	11.52	11.35 ± 0.70	33.60	24.209	2.120
18	15.32	15.22	15.46	15.33 ± 0.12	61.50	19.047	1.940
21	17.18	17.24	17.00	17.14 ± 0.12	64.10	10.984	1.730
24	18.76	17.94	18.56	18.42 ± 0.43	67.05	4.356	1.730

จากการทดลองพบว่า (ตัวอย่างการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค.)

1. น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 18.42 กรัมต่อลิตร
2. เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดต่อชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 24
3. อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมง (specific growth rate, μ)
   3.1 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงตลอดกระบวนการหมัก เท่ากับ 0.067 ต่อชั่วโมง
   3.2 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงในช่วง log phase เท่ากับ 0.106 ต่อชั่วโมง
4. ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) เท่ากับ 0.518 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล
5. อัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.653 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง)
6. ชั่วโมงที่ 24 พบกลีเซอรอลคงเหลือ เท่ากับ 4.356 กรัมต่อลิตร และไนโตรเจนคงเหลือ เท่ากับ 1.730 กรัมต่อลิตร

1.6 ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5

ตารางที่ ง.1.11 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ค่ากรด-เบส	ค่าออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (%)	อุณหภูมิ (^{0}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)
0	3.50	78.5	37.2	300	1.0
3	3.49	79.5	37.0	526	1.0
6	3.50	79.4	37.0	730	1.0
9	3.51	85.2	37.0	696	1.0
12	3.51	84.3	37.0	701	1.0
15	3.51	82.5	37.0	701	1.0
18	3.51	83.9	37.1	701	1.0
21	3.49	85.1	37.1	671	1.0
24	3.51	78.6	37.0	651	1.0

ตารางที่ ง.1.12 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย			
0	6.42	6.32	6.41	6.38 ± 0.06	5.70	30.704	3.050
3	6.84	6.65	6.73	6.74 ± 0.10	5.05	29.647	3.010
6	7.24	7.22	6.95	7.14 ± 0.16	9.70	28.139	2.940
9	8.66	8.64	7.99	8.43 ± 0.38	30.80	27.945	2.690
12	11.20	11.00	10.58	10.93 ± 0.32	47.20	26.525	2.320
15	12.86	12.73	12.05	12.55 ± 0.44	63.70	17.381	2.250
18	17.90	17.75	16.32	17.32 ± 0.87	69.00	11.119	2.180
21	18.80	18.96	18.99	18.92 ± 0.10	61.50	5.839	2.030
24	20.08	20.05	19.89	20.00 ± 0.10	67.30	0.877	1.890

จากการทดลองพบว่า (ตัวอย่างการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค.)

1. น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 20.00 กรัมต่อลิตร
2. เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดต่อชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 24
3. อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมง (specific growth rate, μ)
   3.1 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงตลอดกระบวนการหมัก เท่ากับ 0.054 ต่อชั่วโมง
   3.2 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงในช่วง log phase เท่ากับ 0.076 ต่อชั่วโมง
4. ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) เท่ากับ 0.470 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล
5. อัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.641 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง)
6. ชั่วโมงที่ 24 พบกลีเซอรอลคงเหลือ เท่ากับ 0.877 กรัมต่อลิตร และไนโตรเจนคงเหลือ เท่ากับ 1.890 กรัมต่อลิตร

1.7 ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิแจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5

ตารางที่ ง.1.13 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ค่ากรด-เบส	ค่าออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (%)	อุณหภูมิ (^{0}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)
0	5.54	34.0	37.2	120	1.0
3	5.48	39.2	37.0	561	1.0
6	5.50	39.1	37.0	737	1.0
9	5.50	38.6	37.0	740	1.0
12	5.51	38.4	37.0	746	1.0
15	5.49	50.1	37.0	711	1.0
18	5.50	46.1	37.1	491	1.0
21	5.51	42.4	37.1	821	1.0
24	5.50	41.5	37.0	846	1.0

ตารางที่ ง.1.14บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย			
0	5.86	5.34	5.24	5.48 ± 0.33	1.40	33.707	2.690
3	5.60	5.55	5.67	5.61 ± 0.06	3.40	33.402	2.310
6	7.92	6.79	6.38	7.03 ± 0.80	10.70	31.754	2.150
9	9.92	8.67	8.97	9.19 ± 0.65	21.35	26.038	2.020
12	15.36	16.17	14.68	15.40 ± 0.75	39.10	23.337	1.600
15	21.38	21.36	20.00	20.91 ± 0.79	60.70	11.853	1.350
18	23.56	23.00	21.89	22.82 ± 0.85	72.90	2.192	1.090
21	23.20	23.45	22.98	23.21 ± 0.24	74.80	0	1.030
24	23.42	23.30	22.85	23.19 ± 0.30	76.40	0	0.930

จากการทดลองพบว่า (ตัวอย่างการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค.)

1. น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 23.21 กรัมต่อลิตร
2. เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดต่อชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 21
3. อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมง (specific growth rate, μ)
   3.1 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงตลอดกระบวนการหมัก เท่ากับ 0.073 ต่อชั่วโมง
   3.2 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงในช่วง log phase เท่ากับ 0.126 ต่อชั่วโมง
4. ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) เท่ากับ 0.530 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล
5. อัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.927 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง)
6. ชั่วโมงที่ 21 กลีเซอรอล เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร และชั่วโมงที่ 24 ไนโตรเจนคงเหลือเท่ากับ 0.930 กรัมต่อลิตร

1.8 ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5

ตารางที่ ง.1.15 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ค่ากรด-เบส	ค่าออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (%)	อุณหภูมิ (^{0}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)
0	5.52	84.3	36.8	21	1.0
3	5.51	79.3	37.0	728	1.0
6	5.49	82.3	37.0	821	1.0
9	5.50	83.5	37.0	826	1.0
12	5.49	76.7	37.0	871	1.0
15	5.50	81.4	37.0	851	1.0
18	5.53	80.8	37.0	901	1.0
21	5.50	73.1	37.1	901	1.0
24	5.49	85.2	36.9	881	1.0

ตารางที่ ง.1.16 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย			
0	3.66	4.00	3.42	3.69 ± 0.29	1.72	31.104	2.440
3	4.88	4.20	3.48	4.19 ± 0.70	3.60	29.019	2.340
6	6.14	5.98	5.48	5.87 ± 0.34	11.85	28.973	2.180
9	7.52	9.62	6.64	7.93 ± 1.53	19.85	27.275	1.960
12	16.34	15.26	15.20	15.60 ± 0.64	38.40	18.547	1.610
15	21.56	18.88	19.50	19.98 ± 1.40	71.60	6.093	1.280
18	25.00	22.08	23.64	23.57 ± 1.46	73.20	0.459	1.090
21	25.62	23.64	23.86	24.37 ± 1.09	73.20	0	0.900
24	24.88	23.34	23.54	23.92 ± 0.84	81.90	0	0.800

จากการทดลองพบว่า (ตัวอย่างการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค.)

1. น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 24.37 กรัมต่อลิตร
2. เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดต่อชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 21
3. อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมง (specific growth rate, μ)
   3.1 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงตลอดกระบวนการหมัก เท่ากับ 0.091 ต่อชั่วโมง
   3.2 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงในช่วง log phase เท่ากับ 0.117 ต่อชั่วโมง
4. ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) เท่ากับ 0.635 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล
5. อัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 1.049 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง)
6. ชั่วโมงที่ 21 กลีเซอรอล เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร และชั่วโมงที่ 24 ไนโตรเจนคงเหลือเท่ากับ 0.800 กรัมต่อลิตร

1.9 ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5

ตารางที่ ง.1.17 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ค่ากรด-เบส	ออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (%)	อุณหภูมิ (^{0}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)
0	3.57	43.9	36.8	21	1.0
3	3.49	39.1	37.0	622	1.0
6	3.48	39.3	37.0	771	1.0
9	3.52	40.3	37.0	671	1.0
12	3.49	40.4	37.0	671	1.0
15	3.47	40.4	37.0	681	1.0
18	3.47	40.5	37.0	681	1.0
21	3.48	43.7	37.0	661	1.0
24	3.52	45.2	37.0	651	1.0
27	3.51	56.3	37.0	646	1.0
30	3.52	46.3	37.0	636	1.0
33	3.51	57.5	37.0	681	1.0
36	3.53	48.8	37.0	706	1.0
39	3.54	41.2	37.0	751	1.0
42	3.54	30.3	37.0	770	1.0
45	3.54	30.3	37.0	791	1.0
48	3.54	48.0	37.0	791	1.0

ตารางที่ ง.1.18 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย			
0	9.42	9.35	9.48	9.42 ± 0.07	1.90	53.007	3.010
3	9.34	9.83	9.95	9.71 ± 0.32	2.80	52.839	2.650
6	9.72	10.25	10.08	10.02 ± 0.27	5.25	52.706	2.540
9	12.24	12.28	11.96	12.16 ± 0.17	17.40	50.299	2.380
12	14.14	14.24	14.03	14.14 ± 0.11	29.10	45.91	2.320
15	14.62	14.85	14.25	14.57 ± 0.30	40.50	42.157	2.140
18	18.80	19.24	18.95	19.00 ± 0.22	44.00	36.158	2.100
21	20.16	20.00	19.83	20.00 ± 0.17	71.40	28.482	1.740
24	20.04	20.08	20.04	20.05 ± 0.02	78.40	23.683	1.710
27	20.86	20.79	20.64	20.76 ± 0.11	78.60	19.374	1.710
30	21.48	21.83	21.45	21.79 ± 0.21	86.80	12.892	1.890
33	22.26	22.39	22.00	22.22 ± 0.20	88.20	6.985	1.890
36	22.32	22.48	22.29	22.36 ± 0.10	91.00	2.98	1.880
39	22.62	22.60	22.58	22.60 ± 0.02	93.00	1.418	1.880
42	22.18	22.36	21.86	22.13 ± 0.25	95.80	0	1.880
45	22.22	22.44	22.09	22.25 ± 0.18	105.60	0	1.880
48	23.28	23.53	23.30	23.37 ± 0.14	114.40	0	1.880

จากการทดลองพบว่า (ตัวอย่างการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค.)

1. น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 23.37 กรัมต่อลิตร
2. เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดต่อชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 48
3. อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมง (specific growth rate, μ)
   3.1 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงตลอดกระบวนการหมัก เท่ากับ 0.019 ต่อชั่วโมง
   3.2 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงในช่วง log phase เท่ากับ 0.045 ต่อชั่วโมง
4. ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) เท่ากับ 0.227 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล
5. อัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.315 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง)
6. ชั่วโมงที่ 24 กลีเซอรอลคงเหลือ เท่ากับ 23.683 กรัมต่อลิตร และไนโตรเจนคงเหลือ เท่ากับ 0.171 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักต่อจนกระทั่ง ชั่วโมงที่ 48 พบว่า ชั่วโมงที่ 42 กลีเซอรอล เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร และชั่วโมงที่ 48 ไนโตรเจนคงเหลือ 1.880 กรัมต่อลิตร

1.10 ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5

ตารางที่ ง.1.19 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ค่ากรด-เบส	ออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (%)	อุณหภูมิ (^{0}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)
0	3.53	89.1	37.2	21	1.0
3	3.51	79.2	37.0	410	1.0
6	3.53	79.6	37.0	533	1.0
9	3.52	88.7	37.0	685	1.0
12	3.49	82.4	37.0	771	1.0
15	3.49	87.7	37.0	804	1.0
18	3.50	81.1	37.0	857	1.0
21	3.47	81.7	37.0	851	1.0
24	3.53	86.2	37.0	656	1.0
27	3.48	93.2	37.6	661	1.0
30	3.46	82.8	37.0	640	1.0
33	3.55	89.9	37.0	641	1.0
36	3.47	80.9	37.0	641	1.0
39	3.52	66.7	37.0	621	1.0
42	3.52	77.5	37.0	726	1.0
45	3.52	88.8	37.0	726	1.0
48	3.53	83.2	37.0	646	1.0

ตารางที่ ง.1.20 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 3.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย			
0	8.16	7.95	8.05	8.05 ± 0.11	1.90	51.707	3.300
3	9.18	8.12	8.17	8.49 ± 0.60	2.80	47.832	3.120
6	9.24	8.98	9.03	9.08 ± 0.14	5.25	46.729	2.720
9	10.32	9.17	9.25	9.58 ± 0.64	17.40	44.789	2.540
12	13.76	13.89	14.00	13.88 ± 0.12	29.10	43.916	2.320
15	16.20	16.50	16.73	16.48 ± 0.27	40.50	43.517	2.180
18	18.90	18.76	19.17	18.94 ± 0.21	44.00	35.418	1.850
21	20.96	20.32	21.49	20.92 ± 0.59	69.60	24.230	1.810
24	22.90	21.58	22.87	22.45 ± 0.75	73.00	21.507	1.870
27	23.22	23.00	23.25	23.16 ± 0.14	73.40	16.006	2.030
30	23.82	23.53	23.89	23.75 ± 0.19	79.00	13.178	1.600
33	26.50	25.37	24.50	25.46 ± 1.00	85.80	8.692	1.960
36	26.14	26.12	26.30	26.19 ± 0.10	90.80	4.427	1.960
39	26.12	26.15	26.45	26.24 ± 0.18	93.00	1.297	1.670
42	26.30	25.98	26.58	26.29 ± 0.30	96.00	0	1.960
45	27.20	27.50	27.38	27.36 ± 0.15	105.60	0	1.960
48	25.60	26.95	27.55	26.70 ± 1.00	98.40	0	1.450

จากการทดลองพบว่า (ตัวอย่างการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค.)

1. น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 27.36 กรัมต่อลิตร
2. เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดต่อชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 45
3. อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมง (specific growth rate, μ)
   3.1 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงตลอดกระบวนการหมัก เท่ากับ 0.027 ต่อชั่วโมง
   3.2 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงในช่วง log phase เท่ากับ 0.053 ต่อชั่วโมง
4. ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) เท่ากับ 0.349 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล
5. อัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.454 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง)
6. ชั่วโมงที่ 24 กลีเซอรอลคงเหลือ เท่ากับ 21.507 กรัมต่อลิตร และไนโตรเจนคงเหลือ เท่ากับ 0.187 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักต่อจนกระทั่ง ชั่วโมงที่ 48 พบว่า ชั่วโมงที่ 42 กลีเซอรอล เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร และชั่วโมงที่ 48 ไนโตรเจนคงเหลือ 1.450 กรัมต่อลิตร

1.11 ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5

ตารางที่ ง.1.21 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลาย เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ค่ากรด-เบส	ออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (%)	อุณหภูมิ (^{0}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)
0	5.49	58.1	37.1	21	1.0
3	5.47	39.9	37.0	568	1.0
6	5.46	39.0	37.0	791	1.0
9	5.51	39.8	37.0	844	1.0
12	5.47	36.4	37.0	841	1.0
15	5.47	37.7	37.0	851	1.0
18	5.47	38.5	37.0	851	1.0
21	5.47	39.9	37.0	851	1.0
24	5.46	38.6	37.0	851	1.0
27	5.47	40.5	37.0	701	1.0
30	5.54	56.0	37.0	701	1.0
33	5.53	36.3	37.0	701	1.0
36	5.54	43.3	37.0	701	1.0
39	5.54	39.6	37.0	701	1.0
42	5.54	43.2	37.0	701	1.0
45	5.54	35.3	37.0	701	1.0
48	5.54	36.2	37.0	701	1.0

ตารางที่ ง.1.22 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย			
0	3.16	9.06	8.60	6.94 ± 3.28	1.80	55.778	2.440
3	5.64	9.34	9.35	8.11 ± 2.14	4.12	51.071	2.340
6	8.46	10.46	10.25	9.72 ± 1.10	9.15	50.258	2.310
9	11.44	12.04	12.46	11.98 ± 0.51	19.50	48.282	2.150
12	17.18	13.78	13.39	14.78 ± 2.08	30.60	44.202	1.670
15	23.12	19.26	19.21	20.53 ± 2.24	50.55	26.561	1.250
18	28.74	21.14	22.47	24.12 ± 4.06	63.20	6.927	0.580
21	28.82	24.72	25.32	26.29 ± 2.21	74.70	0.931	0.510
24	28.54	27.94	28.56	28.35 ± 0.35	83.10	0	0.380
27	30.89	30.82	30.95	30.89 ± 0.06	136.80	0	0.340
30	30.68	30.72	30.64	30.68 ± 0.04	127.00	0	0.280
33	30.71	30.66	30.75	30.71 ± 0.04	116.60	0	0.050
36	30.73	30.70	30.98	30.84 ± 0.14	126.80	0	0.490
39	31.27	31.28	31.26	31.27 ± 0.01	122.80	0	0.490
42	31.31	31.08	31.54	31.31 ± 0.23	131.40	0	0.420
45	31.68	31.36	32.00	31.68 ± 0.32	123.00	0	0.370
48	31.92	31.88	31.95	31.92 ± 0.04	128.20	0	0.370

จากการทดลองพบว่า (ตัวอย่างการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค.)

1. น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 31.92 กรัมต่อลิตร
2. เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดต่อชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 48
3. อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมง (specific growth rate, μ)
   3.1 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงตลอดกระบวนการหมัก เท่ากับ 0.031 ต่อชั่วโมง
   3.2 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงในช่วง log phase เท่ากับ 0.045 ต่อชั่วโมง
4. ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) เท่ากับ 0.401 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล
5. อัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.574 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง)
6. ชั่วโมงที่ 24 กลีเซอรอล เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร และไนโตรเจนคงเหลือ เท่ากับ 0.038 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักต่อจนกระทั่ง ชั่วโมงที่ 48 พบว่า ชั่วโมงที่ 48 ไนโตรเจนคงเหลือ 0.370 กรัมต่อลิตร

1.12 ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5

ตารางที่ ง.1.23 ภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก *H. polymorpha* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำหมัก เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ค่ากรด-เบส	ออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (%)	อุณหภูมิ (^{0}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)
0	5.52	70.4	36.8	191	1.0
3	5.51	79.3	37.0	901	1.0
6	5.50	88.1	37.0	881	1.0
9	5.49	75.0	37.0	891	1.0
12	5.50	78.4	37.0	891	1.0
15	5.52	78.8	37.0	891	1.0
18	5.48	79.1	37.0	891	1.0
21	5.50	76.4	37.0	871	1.0
24	5.50	80.3	37.0	866	1.0
27	5.49	72.1	37.0	891	1.0
30	5.48	68.7	37.0	891	1.0
33	5.48	87.8	37.0	891	1.0
36	5.52	83.0	37.0	881	1.0
39	5.52	76.2	37.0	881	1.0
42	5.35	80.7	37.0	871	1.0
45	5.48	75.1	37.0	881	1.0
48	5.55	83.2	37.0	881	1.0

ตารางที่ ง.1.24 บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักระหว่างการหมัก *H. polymorpha* เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร, ค่าออกซิเจนละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด-เบสของน้ำหมักเท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				ค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย			
0	4.26	3.32	7.26	4.95 ± 2.06	2.48	50.825	2.310
3	7.82	5.04	7.80	6.89 ± 1.60	4.28	49.991	2.250
6	9.30	6.10	9.28	8.23 ± 1.84	12.75	45.613	2.180
9	13.04	9.64	13.04	11.91 ± 1.96	23.95	45.465	1.890
12	18.10	16.26	20.00	18.12 ± 1.87	41.45	43.491	1.760
15	22.52	18.22	22.12	20.95 ± 2.38	71.20	40.173	1.730
18	28.68	23.86	25.08	25.87 ± 2.51	89.20	29.014	0.670
21	31.44	30.36	29.78	30.53 ± 0.84	90.60	15.585	0.640
24	31.16	29.56	31.12	30.62 ± 0.91	100.70	1.327	0.550
27	31.60	29.34	28.60	29.85 ± 1.56	96.60	0	0.480
30	33.96	30.08	30.66	31.57 ± 2.09	105.40	0	0.450
33	33.52	29.52	30.20	31.08 ± 2.14	103.50	0	0.380
36	35.34	27.22	31.48	31.35 ± 4.06	108.10	0	0.320
39	36.66	31.52	35.92	34.70 ± 2.78	114.30	0	0.260
42	36.04	32.40	32.14	33.53 ± 2.18	103.60	0	0.030
45	34.76	31.00	34.06	33.27 ± 2.00	108.90	0	0.640
48	36.06	33.80	33.22	34.36 ± 1.50	105.10	0	0.260

จากการทดลองพบว่า (ตัวอย่างการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค.)

1. น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 34.70 กรัมต่อลิตร
2. เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดต่อชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 39
3. อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมง (specific growth rate, μ)
   3.1 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงตลอดกระบวนการหมัก เท่ากับ 0.036 ต่อชั่วโมง
   3.2 อัตราการเจริญจำเพาะต่อชั่วโมงในช่วง log phase เท่ากับ 0.059 ต่อชั่วโมง
4. ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) เท่ากับ 0.450 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล
5. อัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.637 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง)
6. ชั่วโมงที่ 24 กลีเซอรอลคงเหลือ เท่ากับ 1.327 กรัมต่อลิตร และไนโตรเจนคงเหลือ เท่ากับ 0.055 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักต่อจนกระทั่ง ชั่วโมงที่ 48 พบว่า ชั่วโมงที่ 27 กลีเซอรอล เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร และชั่วโมงที่ 48 ไนโตรเจนคงเหลือ 0.260 กรัมต่อลิตร

2. การเจริญของ *H. polymorpha* ในการหมักแบบเฟด-แบตช์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร เมื่อทำการแปรผันปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญในระหว่างกระบวนการหมักที่ภาวะต่าง ๆ

2.1 การหมักแบบเฟดแบตช์ ทำการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3116 มิลลิลิตรต่อนาที

ตารางที่ ง.2.1 ผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ทำการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3116 มิลลิลิตรต่อนาที

ชั่วโมงที่	ชั่วโมงที่ (เฟด-แบตช์)	ค่ากรด-เบส	ออกซิเจนละลายในน้ำหมัก(%)	อุณหภูมิ (^{o}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	กลีเซอรอล (g/L)	ไนโตรเจน (g/L)
0	-	5.49	74.6	36.9	21	1.0	2.94	10.765	2.59
3	-	5.52	39.4	37	400	1.0	3.94	10.123	2.56
6	-	5.54	39.9	37	584	1.0	5.56	8.765	2.45
9	-	5.54	39.1	37	688	1.0	7.98	5.759	2.45
12	0	5.55	54.9	37	706	1.0	14.08	1.671	2.19
15	3	5.53	57.3	37	601	1.0	17.04	0	1.93
18	6	5.47	50.2	37	616	1.0	17.56	0	1.47
21	9	5.47	43.4	37	631	1.0	20.06	1.114	1.75
24	12	5.47	46.1	37	641	1.0	20.74	3.645	1.47
27	15	5.46	41.8	37	646	1.0	21.76	7.086	2.07
30	18	5.46	38.7	37	651	1.0	23.60	12.44	1.25
33	21	5.46	48.8	37	651	1.0	22.78	16.143	1.14
36	-	5.45	36.4	37	651	1.0	26.02	16.212	1.23

2.2 การหมักแบบเฟดแบตช์ ทำการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที

ตารางที่ ง.2.2 ผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ทำการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที

ชั่วโมงที่	ชั่วโมงที่ (เฟด-แบตช์)	ค่ากรด-เบส	ออกซิเจนละลายในน้ำหมัก(%)	อุณหภูมิ (^{o}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	กลีเซอรอล (g/L)	ไนโตรเจน (g/L)
0	-	5.46	96.4	36.3	501	1.0	2.98	9.822	2.664
3	-	5.53	39.4	37	417	1.0	3.42	9.589	2.629
6	-	5.54	38.5	37	545	1.0	4.5	8.878	2.559
9	-	5.54	39.5	37	716	1.0	8.46	6.909	2.173
12	0	5.54	38.2	37	646	1.0	11.22	2.928	2.103
15	3	5.47	53.9	37	621	1.0	16.2	0	1.893
18	6	5.46	34.7	37	631	1.0	16.64	0	1.753
21	9	5.46	41.9	37	636	1.0	18.66	1.129	1.928
24	12	5.46	42.7	37	641	1.0	19.16	3.188	1.542
27	15	5.47	35.9	37	651	1.0	19.36	5.642	1.577
30	18	5.46	51.8	37	651	1.0	23.86	10.157	1.297
33	21	5.46	57.4	37	661	1.0	23.84	15.916	1.157
36	-	5.47	38.9	37	661	1.0	26.96	3.413	1.017
39	-	5.46	50.6	37	661	1.0	31.7	11.723	0.946

2.3 การหมักแบบเฟดแบตช์ ทำการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 9 ด้วยอัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที

ตารางที่ ง.2.3 ผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ทำการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 9 ด้วยอัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที

ชั่วโมงที่	ชั่วโมงที่ (เฟด-แบตช์)	ค่ากรด-เบส	ออกซิเจนละลายในน้ำหมัก(%)	อุณหภูมิ (^{o}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	กลีเซอรอล (g/L)	ไนโตรเจน (g/L)
0	-	5.55	85.2	36.6	21	1.0	3.12	10.432	2.734
3	-	5.53	40.3	37	487	1.0	3.78	10.021	2.629
6	-	5.54	39.1	37	661	1.0	5.22	8.747	2.629
9	0	5.54	54.2	37	671	1.0	8.68	5.698	2.489
12	3	5.46	46.2	37	681	1.0	14.38	2.669	1.718
15	6	5.47	40.3	37	611	1.0	17.62	0	1.437
18	9	5.47	43.2	37	621	1.0	21.08	0.733	1.577
21	12	5.47	43.4	37	671	1.0	22.14	1.182	1.122
24	15	5.46	45.1	37	701	1.0	24.82	2.151	0.981
27	18	5.46	65.9	37	701	1.0	25.8	5.418	0.911
30	21	5.47	47.9	37	701	1.0	26.82	12.041	0.911
33	-	5.46	57.2	37	701	1.0	28.1	5.027	0.841
36	-	5.46	57.2	37	701	1.0	32.72	0.408	0.911

2.4 การหมักแบบเฟดแบตช์ ทำการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที และควบคุมค่า C:N ratio เท่ากับ 1.75

ตารางที่ ง.2.4 ผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ทำการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมค่า C:N ratio เท่ากับ 1.75

ชั่วโมงที่	ชั่วโมงที่ (เฟด-แบตช์)	ค่ากรด-เบส	ออกซิเจนละลายในน้ำหมัก(%)	อุณหภูมิ (^{o}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	กลีเซอรอล (g/L)	ไนโตรเจน (g/L)
0	-	5.53	63.1	36.9	21	1.0	2.34	10.553	3.085
3	-	5.54	40.5	37	496	1.0	3.79	8.341	3.015
6	-	5.54	38.6	37	687	1.0	5.24	7.160	3.059
9	-	5.54	40.7	37	711	1.0	7.64	5.524	2.243
12	0	5.51	52.7	37	701	1.0	9.99	1.506	2.384
15	3	5.53	48.3	37	701	1.0	13.69	1.162	3.050
18	6	5.52	52.4	37	711	1.0	19.14	0.707	3.856
21	9	5.48	54.6	37	711	1.0	25.44	0	5.258
24	12	5.47	59.3	37	711	1.0	32.54	0	7.536
27	15	5.47	40.5	37	721	1.0	41.14	0.441	10.316
30	18	5.47	45.0	37	721	1.0	50.29	0.842	13.398
33	21	5.47	52.4	37	701	1.0	55.94	2.186	14.652
36	-	5.48	57.1	37	611	1.0	56.00	0.786	16.040

ตารางที่ ง.2.4 ผลการเจริญของ *H. polymorpha* ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ ทำการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 12 ด้วยอัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ด้วยอัตราการเติมเริ่มต้น เท่ากับ 0.3321 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมค่า C:N ratio เท่ากับ 1.75 (ต่อ)

ชั่วโมงที่	ชั่วโมงที่ (เฟด-แบตช์)	ค่ากรด-เบส	ออกซิเจนละลายในน้ำหมัก(%)	อุณหภูมิ (^{o}C)	รอบการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	กลีเซอรอล (g/L)	ไนโตรเจน (g/L)
39	-	5.48	62.4	37	586	1.0	56.09	0	12.970
42	-	5.48	65.0	37	521	1.0	59.34	0	15.143
45	-	5.48	70.0	37	480	1.0	66.39	0	14.022
48	-	5.48	60.6	37	431	1.0	60.64	0	15.723
51	-	5.48	61.2	37	431	1.0	59.54	0	20.282

ภาคผนวก จ

การคำนวณทางสถิติ

ตัวอย่างการคำนวณการทดลองแบบ 2-level factorial design ของความเข้มข้นของกลีเซอรอล 10 g/L กับ 30 g/L

ตาราง จ.1 ปัจจัยและระดับการทดลองแบบ 2-level factorial design ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 10 g/L และ 30 g/L

ความเข้มข้นของกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)		ค่าออกซิเจนละลาย (เปอร์เซ็นต์)		ค่ากรด-เบส	
-1	+1	-1	+1	-1	+1
10	30	40	80	3.5	5.5

ตาราง จ.2 การทดองแบบ 2-level factorial design ของความเข้มข้นของกลีเซอรอล 10 g/L และ 30 g/L

ลำดับที่	ภาวะในการหมัก	กลีเซอรอล		pH		% DO		DCW (g/L)
1	1% gly, pH 3.5, 40%DO	10	-1	3.5	-1	40	-1	13.38
2	1% gly, pH 3.5, 80%DO	10	-1	3.5	-1	80	+1	14.67
3	1% gly, pH 5.5, 40%DO	10	-1	5.5	+1	40	-1	16.80
4	1% gly, pH 5.5, 80%DO	10	-1	5.5	+1	80	+1	17.88
9	3% gly, pH 3.5, 40% DO	30	+1	3.5	-1	40	-1	18.42
10	3% gly, pH 3.5, 80% DO	30	+1	3.5	-1	80	+1	20.00
11	3% gly, pH 5.5, 40% DO	30	+1	5.5	+1	40	-1	23.21
12	3% gly, pH 5.5, 80% DO	30	+1	5.5	+1	80	+1	24.37

1.1 การคำนวณผลของปัจจัย (effect)

ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอล

= (-13.38 - 14.67 - 16.80 - 17.88 + 18.42 + 20.00 + 23.21 + 24.37)/4 = 5.82

ผลของค่ากรด-เบส

= (-13.38 - 14.67 + 16.80 + 17.88 - 18.42 - 20.00 + 23.21 + 24.37)/4 = 3.83

ผลของออกซิเจนละลาย

= (-13.38 + 14.67 - 16.80 + 17.88 - 18.42 + 20.00 - 23.21 + 24.37)/4 = 1.28

1.2 การคำนวณหาผลของปัจจัยร่วม (Interaction effect)

ตาราง จ.3 Table of Contrast ของ การทดองแบบ 2-level factorial design ของความเข้มข้นของกลีเซอรอล 10 g/L และ 30 g/L

ลำดับที่	I	G	P	D	GP	GD	DP	GDP	DCW(g/L)
1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	13.38
2	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	14.67
3	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	16.80
4	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	17.88
5	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	18.42
6	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	20.00
7	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	23.21
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	24.37

หมายเหตุ I คือ Interaction effect

G คือ ความเข้มข้นของกลีเซอรอล (g/L)

P คือ ค่ากรด-เบส

D คือ ค่าออกซิเจนละลาย (%)

DCW คือ น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (g/L)

Effect ของ GP เท่ากับ

(+ 13.38 + 14.67 - 16.80 - 17.88 - 18.42 - 20.00 + 23.21 + 24.37)/4 = 0.63

Effect ของ GD เท่ากับ

(+13.38 - 14.67 + 16.80 - 17.88 - 18.42 + 20.00 - 23.21 + 24.37)/4 = 0.09

Effect ของ DP เท่ากับ

(+13.38 - 14.67 - 16.80 + 17.88 + 18.42 - 20.00 - 23.21 + 24.37)/4 = -0.16

Effect ของ GDP เท่ากับ

(-13.38 + 14.67 + 16.80 - 17.88 + 18.42 – 20.00 - 23.21 + 24.37)/4 = -0.05

ซึ่งสามารถสรุปประเด็นความสำคัญของแต่ละปัจจัยได้ดังตาราง จ.4

ตาราง จ.4 สรุปผลของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *H. polymorpha*

1%-3%Gly	
Factor	Effect on DCW
G	5.82
P	3.83
D	1.28
GP	0.63
GD	0.09
DP	-0.16
GDP	-0.05

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวลลิตา อุปสัน เกิดวันที่ 28 กรกฎาคม พ.ศ.2528 ภูมิลำเนาจังหวัดอุทัยธานี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเทคโนโลยีการหมัก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปีการศึกษา 2549 ต่อมาได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551

การเสนอผลงานวิจัย

Lalita Upason, Nuttha Thongchul and Sarintip Sooksai, Effect of glycerol concentration, dissolved oxygen and pH on fermentation of *Hansenua polymotpha* in a stirred tank bioreactor. The 22nd Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology TSB2010: Biotechnology for Healthy Living, 20-22 October, 2010, Songkla University, Trang, Thailand.