การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ *Hansenula polymorpha* โดยใช้กลีเซอรอลดิบ
จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน

นางสาว แคทลียา ตาลวงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

SINGLE CELL PROTEIN PRODUCTION BY *Hansenula polymorpha* USING CRUDE GLYCEROL FROM BIODIESEL PROCESSING AS A CARBON SOURCE

Miss Kattaleeya Talwong

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 2007
Copyright of Chulalongkorn University

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ *Hansenula polymorpha* โดยใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน
โดย	นางสาวแคทลียา ตาลวงษ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. ศรินทิพ สุกใส
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. ณัฏฐา ทองจุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ดร. ศรินทิพ สุกใส)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. ณัฏฐา ทองจุล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

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

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

แคทลียา ตาลวงษ์ : การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ *Hansenula polymorpha* โดยใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน (SINGLE CELL PROTEIN PRODUCTION BY *Hansenula polymorpha* USING CRUDE GLYCEROL FROM BIODIESEL PROCESSING AS A CARBON SOURCE)
อ. ที่ปรึกษา: ดร.ศรินทิพ สุกใส, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ดร.ณัฏฐา ทองจุล, 194 หน้า.

ยีสต์ *Hansenula polymorpha* สามารถใช้กลีเซอรอลดิบซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวได้ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักในกลีเซอรอลดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าประกอบด้วย กลีเซอรอล 54.72 % ความชื้น 22.16 % น้ำมัน 7.05 % ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันปาลมิติก โอเลอิก และสเตียริก 41.88, 40.84 และ 4.82 % ตามลำดับ ส่วนชนิดและปริมาณแร่ธาตุที่วิเคราะห์ได้ ได้แก่ คาร์บอน 44.13 % ไฮโดรเจน 9.03 % ไนโตรเจน 1.34 % โซเดียม 1.60 % คลอไรด์ 39 ppm โพแทสเซียม 37 ppm แคลเซียม 15 ppm เหล็ก 12 ppm ทองแดง 8 ppm สังกะสี 4 ppm และพบสารเบต้าแคโรทีน น้อยกว่า 30 ppb จากนั้น ได้ศึกษาภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว ได้แก่ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ตลอดจนอุณหภูมิ ค่าพีเอช และความเร็วรอบในการเขย่า โดยศึกษาในระดับขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่า องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* คือ กลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วนภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 และความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที พบว่าให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 32 g/L, ผลผลิตมวลชีวภาพ (yield) 0.7132 และอัตราการผลิตมวลชีวภาพต่อเวลาที่ใช้ (productivity) 0.5026 g/L.h และเมื่อนำยีสต์ *H. polymorpha* ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนมาวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ในเซลล์ พบว่า ประกอบด้วย โปรตีน 41.67% ไขมัน 16.49 % ความชื้น 72.34% เถ้า 3.08 % คาร์โบไฮเดรตและอื่นๆ 38.74 % เซลล์ยีสต์ประกอบด้วยวิตามิน B_2, B_5, B_8, B_9 ในปริมาณ 0.9, 2.0, 32.5, 84.9 ppm ส่วนวิตามิน B_1, B_3, B_6, B_{12} พบในปริมาณที่น้อยกว่า 0.1 ppm และผลการวิเคราะห์กรดอะมิโน 18 ชนิดในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็น 9 ชนิด (Phenylalanine, Leucine, Isoleucine, Lysine, Valine, Threonine, Tryptophan, Histidine และ Methionine) รวมปริมาณ 2760.81 mg/100g ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งคิดเป็นสัดส่วนสูงถึง 72 % ของกรดอะมิโนทั้งหมดในเซลล์

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา……2550…….. ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

487 22320 23 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD : SINGLE CELL PROTEIN / CRUDE GLYCEROL

KATTALEEYA TALWONG : SINGLE CELL PROTEIN PRODUCTION BY *Hansenula polymorpha* USING CRUDE GLYCEROL FROM BIODIESEL AS A CARBON SOURCE. THESIS ADVISOR : SARINTIP SUKSAI, Ph. D., THESIS CO-ADVISOR : NUTTHA TONGCHUL, Ph. D. 194 pp.

The purpose of this study was to study single cell protein production from crude glycerol by product from biodiesel production plant by Hansenula polymorpha, a yeast capable of utilizing glycerol as a carbon source. Major composition in crude glycerol were determined. It was found that 54.72 % glycerol, 7.05 % oil and 22.16 % moisture (by weight) were present in crude glycerol. Fatty acid profiles in oil present in crude glycerol consisted of 41.88 % palmitic acid (C16:0), 40.84 % stearic acid (C18:0) and 4.82 % oleic acid (C18:1). From elemental analyses, crude glycerol also contained 44.13 % C, 9.03 % H, 1.34 % N, 1.60 % Na, 39 ppm Cl, 37 ppm K, 15 ppm Ca, 12 ppm Fe, 8 ppm Cu and 4 ppm Zn. Less than 30 ppb β-carotene was detected in crude glycerol. Effects of crude glycerol concentration, nitrogen source, temperature, pH and rotational speed on fermentation of *H. polymorpha* were investigated. It was found that the maximum cell concentration was obtained from fermentation using 7.5 % crude glycerol and 2 % yeast extract at 30 ^{0}C, pH 6.0 and 250 rpm. At this condition, the maximum cell concentration of 32 g/L, the biomass yield of 0.7132 and the productivity of 0.5026 g/L.h were obtained. Wet cell biomass contained 72.34 % moisture. The protein, lipid and carbohydrate contents in dry cell biomass were determined. It was found that the obtained cell contained 41.67 % protein, 16.49 % lipid, 3.08 % ash and 38.76 % carbohydrate. Besides, 0.9 ppm vitamin B_2 , 2.0 ppm vitamin B_5, 32.5 ppm Vitamin B_8, 84.9 ppm vitamin B_9 were found in cell sample, where only less than 0.1 ppm vitamins B_1, B_3 B_6, and B_{12} were found. In addition, 9 of 18 essential amino acids were found in cell biomass including Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Threonine, Tryptophan and Valine. Among the amino acids present in the biomass, up to 72 % of essential amino acids were present (2760.81 mg/100 g dry cell mass)

Field of study……Biotechnology……Student's signature……...
Academic year …2007……Advisor's signature……...
Co-advisor's signature……..

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำงานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.ศรินทิพ สุกใส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ณัฏฐา ทองจุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาข้อมูลความรู้ทางวิชาการ การช่วยเหลือในด้านการทำวิจัย รวมทั้งการตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ รศ.ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็น และคำแนะนำการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ นักวิจัย เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และผู้บริหารของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ สำหรับคำแนะนำในการทำการวิจัยตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น ตลอดจนเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่าน พี่ๆทีมช่างเทคนิค สำหรับการช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์และเครื่องมือ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนวิจัย เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยทุกชิ้น และขอขอบคุณหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพสำหรับคำแนะนำตลอดการศึกษา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย และ นพ.จักริน สมบูรณ์จันทร์ ที่คอยให้ความรัก กำลังใจ และสนับสนุนทางด้านการศึกษาตลอดมา

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ณ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... น

บทที่

1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 4

1.3 วิธีดำเนินการวิจัย 4

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 กลีเซอรอล 5

2.2 สมบัติของกลีเซอรอล 5

2.3 ประโยชน์ของกลีเซอรอล 9

2.4 การผลิตกลีเซอรอลและแหล่งที่มา 9

2.5 แนวโน้มปริมาณและราคากลีเซอรอลดิบ 14

2.6 การจัดการกลีเซอรอลดิบในปัจจุบัน 15

2.7 งานวิจัยเกี่ยวกับการนำกลีเซอรอลดิบมาใช้ประโยชน์ 17

2.8 โปรตีนเซลล์เดี่ยว 23

2.9 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว 23

2.10 ปัจจัยที่จำเป็นต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ 26

2.11 แหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ 31

2.12 ยีสต์ *Hansenula polymorpha* 35

2.13 เมแทบอลิซึมของเมทานอลในเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ 37

2.14 เมแทบอลิซึมของกลีเซอรอลในเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ 40

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

บทที่ หน้า
3 วิธีการทดลอง 42
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 42
3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย 45
3.3 ขั้นตอนการวิจัย 45
3.3.1 จุลินทรีย์และวัตถุดิบ 45
3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อ 46
3.3.3 ศึกษาการเจริญของยีสต์ *Hansenula polymorpha* ในอาหารที่มีกลูโคสหรือกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน 46
3.3.4 วิเคราะห์องค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบ และศึกษาวิธีการเตรียสูตรอาหาร 47
3.3.4.1 วิเคราะห์องค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบ 47
3.3.4.2 ศึกษาวิธีการเตรียมสูตรอาหารดัดแปลงที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน 49
3.3.4.3 ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* 50
3.3.5 ศึกษาชนิด ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และความเร็วรอบในการเขย่า ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* 50
3.3.5.1 ศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* 50
3.3.5.2 ศึกษาอุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* 51
3.3.5.3 ศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* 51
3.3.5.4 ศึกษาค่าความเร็วรอบในการเขย่า ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* 51
3.3.6 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly กับ Mineral salt medium 52
3.3.7 วิเคราะห์องค์ประกอบในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* 52
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 54
4.1 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหารที่มีกลูโคส หรือกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน 54
4.1.1 การเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคส

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

บทที่ หน้า
เป็นแหล่งคาร์บอน 54
4.1.2 การเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มี
กลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน 60
4.2 วิเคราะห์องค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบ และศึกษาวิธีการเตรียมสูตรอาหาร 64
4.2.1 วิเคราะห์องค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล .. 64
4.2.1.1 วิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล น้ำมัน ความชื้น ชนิดและปริมาณ
กรดไขมัน 64
4.2.1.2 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณแร่ธาตุในกลีเซอรอลดิบ 67
4.2.1.5 วิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีนในกลีเซอรอลดิบ 70
4.2.2 ศึกษาวิธีการเตรียมสูตรอาหารดัดแปลง YPG โดยใช้กลีเซอรอลดิบจาก
กระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน 71
4.2.3 ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล
เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* 72
4.3 ศึกษาชนิด ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น ความเร็วรอบในการเขย่า และ
อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* 81
4.3.1 ศึกษาชนิด ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์
H. polymorpha 81
4.3.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* 110
4.3.3 ศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์
H. polymorpha 115
4.3.4 ศึกษาค่าความเร็วรอบในการเขย่า ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์
H. polymorpha 125
4.4 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly และ
อาหาร Mineral salt medium 132
4.5 วิเคราะห์องค์ประกอบในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* 133
4.5.1 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า ความชื้น คาร์โบไฮเดรต 135
4.5.2 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน 136
4.5.3 วิเคราะห์กรดอะมิโน และวิตามิน 138
5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ 144
รายการอ้างอิง 148

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

บทที่ หน้า

ภาคผนวก 160
ภาคผนวก ก 161
ภาคผนวก ข 163
ภาคผนวก ค 169
ภาคผนวก ง 172
ภาคผนวก จ 178
ภาคผนวก ฉ 190
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 194

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	ความสัมพันธ์ระหว่างความดันไอกับอุณหภูมิของกลีเซอรอล	6
2.2	สมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล	7
2.3	กำลังการผลิตไบโอดีเซลและปริมาณกลีเซอรอลดิบทั่วโลก ปี ค.ศ.2000-2006	14
2.4	งานวิจัยเกี่ยวกับการนำกลีเซอรอลมาเปลี่ยนรูปด้วยวิธีทางเคมี	19
2.5	งานวิจัยเกี่ยวกับการนำกลีเซอรอลมาเปลี่ยนรูปด้วยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ	22
2.6	ยีสต์ที่สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนและสารจากอุตสาหกรรมผลิตไบโอดีเซล	34
2.7	การผลิตโปรตีนจากแหล่งอื่นในยีสต์ *Hansenula polymorpha*	36
2.8	เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่มีรายงานในปัจจุบัน	37
4.1	สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคส 2 และ 3 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน	58
4.2	สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 1-9 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน	62
4.3	ปริมาณกลีเซอรอล น้ำมัน ความชื้น ที่เป็นองค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบ	65
4.4	ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่สกัดจากกลีเซอรอลดิบ	66
4.5	เปรียบเทียบชนิดและปริมาณ (%) กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่สกัดได้จากกลีเซอรอลดิบ กับน้ำมันชนิดต่างๆ	67
4.6	ชนิดและปริมาณธาตุที่วิเคราะห์ได้ในกลีเซอรอลดิบ	70
4.7	ปริมาณของสารเบต้าแคโรทีนในกลีเซอรอลดิบ	71
4.8	สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG กลีเซอรอลดิบ 1-10 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน	78
4.9	แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 1-10 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน	79
4.10	สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนแทนเพปโทน 2%	84

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตาราง หน้า

4.11 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนแทนเพปโทน 2%..... 85

4.12 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรที่ปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็นครึ่งหนึ่งของไนโตรเจนในเพปโทน 2% 89

4.13 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรที่ปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็นครึ่งหนึ่งของไนโตรเจนในเพปโทน 2% 90

4.14 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของยูเรียในช่วง 0.25-1.00 % แทนการใช้เพปโทน..... 92

4.15 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ในช่วง 0.20-1.33 % แทนการใช้เพปโทน 93

4.16 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในช่วง 0.40-2.16 % แทนการใช้เพปโทน 94

4.17 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ในช่วง 0.30-1.60 % แทนการใช้เพปโทน 95

4.18 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของยูเรียในช่วง 0.25-1.00 % แทนการใช้เพปโทน 96

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตาราง หน้า

4.19 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ในช่วง 0.20-1.33 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) แทนการใช้เพปโทน 96

4.20 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ในช่วง 0.40-2.16 % แทนการใช้เพปโทน 97

4.21 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ในช่วง 0.30-1.60 % แทนการใช้เพปโทน 97

4.22 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ จาก 1 เป็น 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) 100

4.23 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % และสารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเปรียบเทียบกับการเจริญในอาหารสูตรดัดแปลงอื่นๆ 102

4.24 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีสารสกัดจากยีสต์ 2 % เป็นแหล่งไนโตรเจน และผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเป็น 5.0, 7.5 และ 10.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) 106

4.25 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีสารสกัดจากยีสต์ 2 % เป็นแหล่งไนโตรเจน และผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเป็น 5.0, 7.5 และ 10.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) 107

4.26 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) 113

4.27 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรอุณหภูมิ 30, 37 และ 42

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตาราง หน้า

องศาเซลเซียส 114
4.28 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 118
4.29 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 4, 5,6 และ 7 119
4.30 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 5.0, 5.25, 5.50, 5.75 และ 6.0 123
4.31 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 5.0, 5.25, 5.50, 5.75 และ 6.0 124
4.32 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที ... 128
4.33 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200,250 และ 300 รอบต่อนาที 129
4.34 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหาร Mineral salt medium และอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน 133
4.35 องค์ประกอบทางอาหารในยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 135
4.36 เปรียบเทียบองค์ประกอบทางอาหารระหว่างยีสต์จีนัสต่างๆ 136
4.37 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 136
4.38 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 138
4.39 เปรียบเทียบกรดอะมิโนในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 กับกรดอะมิโน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตาราง หน้า

ในสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* 139

4.40 ชนิดและปริมาณวิตามินในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 140

4.41 เปรียบเทียบวิตามินในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 กับวิตามินในสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สายพันธุ์ *S. cerevisiae* 140

4.42 ปริมาณไขมันที่พบใน non-oleaginous yeasts และ oleaginous yeasts 141

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล	5
2.2	กลีเซอรอลบริสุทธิ์	6
2.3	ปฏิกิริยาการทำสบู่	11
2.4	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น	12
2.5	กำลังการผลิตไบโอดีเซลของโลก ปี 2000-2006	13
2.6	ราคากลีเซอรอลบริสุทธิ์ 99.5 % ในตลาดโลก ตั้งแต่ปี ค.ศ.2004- 2006	15
2.7	กลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล	16
2.8	แผนผังแสดงกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตไบโอดีเซลขนาดใหญ่	17
2.9	ตัวอย่างยีสต์สกัด	25
2.10	ลักษณะเซลล์ของยีสต์ในจีนัส *Pichia* ที่เลี้ยงในกลูโคส	35
2.11	วิถีแอสสิมิเลชั่นการเปลี่ยนแปลงเมทานอล โดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์	39
2.12	วิถีแอสสิมิเลชั่นการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอล โดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์	41
4.1	ยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ SH4329 ที่เจริญบนอาหารแข็ง YPD เป็นเวลา 2 วัน	54
4.2	ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคส 2 และ 3 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน	55
4.3	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคส กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคส 2 และ 3 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน	55
4.4	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสต่อปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ในน้ำหมัก ในการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคส 2 และ 3 % เป็นแหล่งคาร์บอน	56
4.5	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ในน้ำหมักกับเวลา ในการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคส 2 และ 3 % เป็นแหล่งคาร์บอน	57
4.6	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า ln น้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคส 2 และ 3 % เป็นแหล่งคาร์บอน	58

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

รูปที่ หน้า

4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 1-9 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน 60
4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 1-9 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน 61
4.9 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 1-9 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน..... 61
4.10 กลีเซอรอลดิบที่ใช้ในการทดลอง 65
4.11 โครมาโตแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่สกัดได้จากกลีเซอรอลดิบที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (Gas Chromatography) 66
4.12 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง NA (CHNS/O Analyzer) 68
4.13 โครมาโตแกรม แสดงธาตุคลอไรด์ (Cl) โพแทสเซียม (K) และ แคลเซียม (Ca) (ก) แสดงธาตุเหล็ก (Fe) ทองแดง (Cu) และ สังกะสี (Zn) (ข) ที่เป็นองค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบวิเคราะห์ด้วยเครื่อง XRF (X-Rayfluorescence)..... 69
4.14 กลีเซอรอลดิบ 5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ละลายในน้ำก่อนปรับพีเอช และหลังปรับพีเอชเป็น 6.0 72
4.15 อาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 5 % เป็นแหล่งคาร์บอน 72
4.16 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในสูตรอาหารดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 1-5 % (ก) และที่มีกลีเซอรอลดิบ 6-10 % (ข) เป็นแหล่งคาร์บอน 73
4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในสูตรอาหารดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 1-5 % (ก) และที่มีกลีเซอรอลดิบ 6-10 % (ข) เป็นแหล่งคาร์บอน 74
4.18 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในสูตรอาหารดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 1-5 % (ก) และที่มีกลีเซอรอลดิบ 6-10 % (ข) เป็นแหล่งคาร์บอน 75
4.19 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329ในสูตรอาหารดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 1-5 % (ก)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

รูปที่ หน้า

และที่มีกลีเซอรอลดิบ 6-10 % (ข) เป็นแหล่งคาร์บอน 76

4.20 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 1-10 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน 77

4.21 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนแทนเพปโทน 2% 82

4.22 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมักแห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนแทนเพปโทน 2% 82

4.23 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมักแห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนแทนเพปโทน2% 83

4.24 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันในน้ำหมักแห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนแทนเพปโทน 2% 83

4.25 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 โดยผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็นครึ่งหนึ่งของไนโตรเจนในเพปโทน 2% 86

4.26 ความสัมพันธ์ระหว่างกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 โดยผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็นครึ่งหนึ่งของไนโตรเจนในเพปโทน 2% 87

4.27 ความสัมพันธ์ระหว่างไนโตรเจนในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 โดยผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็นครึ่งหนึ่งของไนโตรเจนในเพปโทน 2% 87

4.28 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำมันในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 โดยผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็นครึ่งหนึ่งของไนโตรเจนในเพปโทน 2% 88

4.29 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กลีเซอรอลในน้ำหมัก และพีเอช กับเวลาในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % และสารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) 101

4.30 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีสารสกัดจากยีสต์ 2 % เป็นแหล่งไนโตรเจน และผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเป็น 5.0, 7.5 และ 10.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) 103

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

รูปที่ หน้า

4.31 ความสัมพันธ์ระหว่างกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีสารสกัดจากยีสต์ 2 % เป็นแหล่งไนโตรเจน และผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเป็น 5.0, 7.5 และ 10.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) 104

4.32 ความสัมพันธ์ระหว่างไนโตรเจนในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีสารสกัดจากยีสต์ 2 % เป็นแหล่งไนโตรเจน และผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเป็น 5.0, 7.5 และ 10.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) 104

4.33 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำมันในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีสารสกัดจากยีสต์ 2 % เป็นแหล่งไนโตรเจน และผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเป็น 5.0, 7.5 และ 10.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) 105

4.34 การเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เวลา 36 ชั่วโมง ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน 107

4.35 ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 และ *H. polymorpha* SH4329 ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน 108

4.36 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรอุณหภูมิในการเลี้ยง 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส 110

4.37 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรอุณหภูมิในการเลี้ยง 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส 111

4.38 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรอุณหภูมิในการเลี้ยง 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส 111

4.39 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรอุณหภูมิในการเลี้ยง 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส 112

4.40 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

รูปที่ หน้า

7.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน 112
4.41 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 115
4.42 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 116
4.43 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 116
4.44 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 117
4.45 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ที่พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 4, 5, 6 และ 7 ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน 117
4.46 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 5.25, 5.50 และ 5.75 120
4.47 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 5.25, 5.50 และ 5.75 120
4.48 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 5.25, 5.50 และ 5.75 121
4.49 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 5.25, 5.50 และ 5.75 121
4.50 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ที่พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 5.0, 5.25, 5.50, 5.75 และ 6.0 ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

รูปที่		หน้า
	ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร)	122
4.51	ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรค่าความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที	125
4.52	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรค่าความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที	126
4.53	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรค่าความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที	126
4.54	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly โดยผันแปรค่าความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที	127
4.55	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ที่ความเร็วรอบในการเขย่า 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร)	127
4.56	ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลีเซอรอลและพีเอชในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหาร Mineral salt medium ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน	132
4.57	การเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เวลา 36 ชั่วโมงในอาหาร Mineral salt medium ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน	134
4.58	เซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่ทำแห้งด้วยเครื่อง Freez Dryer	135
4.59	โครมาโตรแกรมแสดงองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดต่างๆ จากยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL Y-2214 ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (Gas Chromatography)	137

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	เปอร์เซ็นต์
ml	มิลลิลิตร
L	ลิตร
mg	มิลลิกรัม
g	กรัม
w/v	น้ำหนักต่อปริมาตร
pH	ค่าความเป็นกรดด่าง
h	ชั่วโมง
Pa	ปาสคาล
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
YPG	Yeast Extract Peptone Glycerol
YE-Gly	Yeast Extract Glycerol
PG	กลีเซอรอลบริสุทธิ์
CG	กลีเซอรอลดิบ
ppm	หนึ่งส่วนในล้านส่วน
ppb	หนึ่งส่วนในพันล้านส่วน
K	เคลวิน
°C	องศาเซลเซียส

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในช่วง 30 ปีที่ผ่านมา พบว่า โลกมีวิกฤตพลังงานเกิดขึ้นหลายครั้ง ราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกขยับสูงขึ้นเป็นลำดับ และดูเหมือนจะไม่มีการลดลง ทั่วโลกได้ทำการค้นคว้าวิจัยพลังงานทดแทนกันอย่างกว้างขวาง การผลิตไบโอดีเซลเป็นหนึ่งในงานวิจัยที่ได้ดำเนินการจนเป็นผลสำเร็จและสามารถนำมาทดแทนพลังงานที่ได้จากปิโตรเลียม ทำให้ในปัจจุบันหลายประเทศ มีการผลิตไบโอดีเซลกันอย่างแพร่หลาย สำหรับประเทศไทยนั้น ก็มีการวิจัยและพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลเช่นเดียวกับหลายๆประเทศ โดยกระทรวงพลังงาน ได้จัดทำแผนปฏิบัติการพัฒนาและส่งเสริมการผลิตไบโอดีเซล เป็น 2 ระดับ คือ ไบโอดีเซลระดับชุมชน และไบโอดีเซลเชิงพาณิชย์ และคาดว่าในปี พ.ศ.2555 ประเทศไทยจะมีความต้องการไบโอดีเซลถึงวันละ 8.5 ล้านลิตร ซึ่งแผนปฏิบัติการพัฒนาและส่งเสริมไบโอดีเซลดังกล่าวได้ผ่านความเห็นชอบของ ครม. เมื่อวันที่ 17 พฤษภาคม 2548 [1]

ไบโอดีเซลโดยทั่วไปผลิตโดยปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น (Transesterification) โดยนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ หรือแม้แต่น้ำมันที่เหลือจากการปรุงอาหารมาผ่านกระบวนการทางเคมีทำปฏิกิริยาร่วมกับแอลกอฮอล์ ภายใต้ภาวะที่มีกรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา [2] และให้กลีเซอรอลเป็นผลผลิตพลอยได้ประมาณ 10 % ของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด [3] โดยกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นนี้จะมีสิ่งเจือปน เช่น ตัวเร่งปฏิกิริยา แอลกอฮอล์ ไขมัน กรดไขมันอิสระ ความชื้นและสิ่งเจือปนอื่นๆที่มาจากน้ำมันค่อนข้างสูง ต้องผ่านกระบวนการทำกลีเซอรอลดิบที่ได้นี้ให้มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะสามารถนำไปเป็นส่วนประกอบในยา อาหาร เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมอื่นๆ [4] และเนื่องจากค่าใช้จ่ายในกระบวนการทำกลีเซอรอลดิบที่ได้ให้มีความบริสุทธิ์นั้นค่อนข้างสูง อีกทั้งปริมาณการใช้งานนั้นก็ไม่มากนัก เมื่อเทียบกับปริมาณกลีเซอรอลที่กำลังจะเกิดขึ้นเมื่อกำลังการผลิตไบโอดีเซลภายในประเทศสูงขึ้น จึงก่อให้เกิดปัญหากลีเซอรอลล้นตลาด ราคาตกต่ำ เป็นภาระของผู้ผลิตไบโอดีเซลที่ต้องแสวงหาวิธีจัดการกับผลผลิตพลอยได้นี้ โดยเฉพาะโรงงานขนาดกลางและขนาดเล็กที่ยังไม่สามารถหาวิธีดำเนินการที่เหมาะสมได้ จึงทำได้เพียงแต่นำกลีเซอรอลที่เป็นผลผลิตพลอยได้ ไปเผาทิ้งเป็นเชื้อเพลิง ซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมและยังก่อให้เกิดมลภาวะกับสภาพแวดล้อมได้ โดยการเผากลีเซอรอลจะทำให้กลีเซอรอลเปลี่ยนเป็นอะโครลีน (Acrolein) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ระเหยได้ดี และเป็นอันตรายต่อร่างกาย [5]

จึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มสนใจนำกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนี้ ไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ยิ่งขึ้น ดังเช่นงานวิจัยของ Kimura [6] ได้สังเคราะห์ Dihydroxyacetone เพื่อใช้ใน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเป็นสารฟอกจางสี โดยนำกลีเซอรอลมาทำปฏิกิริยา oxidation มี bismuth และ platinum ในอัตราส่วน 0.2:1 เป็นตัวเร่ง พบว่า ให้ Dihydroxyacetone ถึง 80 % Valliyapan [7] ได้ทำการทดลองผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยนำกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล มาทำปฏิกิริยา Pyrolysis โดยใช้ความร้อนสูง จากการทดลองพบว่าให้ก๊าซไฮโดรเจน 1.71 ลิตรต่อกรัมของกลีเซอรอล ส่วนงานวิจัยอื่นที่นำกลีเซอรอลมาทำปฏิกิริยาเคมีได้เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ การผลิต polyesteramindes (PEAs) จาก adipic acid, hexamethylene diamine, 1,4-butanediol, caprolactam โดยมีกลีเซอรอลเป็น branching agent [8] การผลิต 1,2- propanediol โดยนำกลีเซอรอล และ Raney Ni มาผ่านความร้อนที่ 150 องศาเซลเซียส 20 ชั่วโมง [9] เป็นต้น แม้ว่าส่วนใหญ่ในปัจจุบันยังนิยมนำกลีเซอรอลมาผลิตเป็นสารต่างๆ โดยอาศัยกระบวนการทางเคมี เนื่องจากเป็นวิธีที่ค่อนข้างรวดเร็ว แต่ก็มีข้อเสียคือ ใช้สภาวะที่ค่อนข้างรุนแรงในการสังเคราะห์ อันจะก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม จึงมีนักวิจัยบางกลุ่มหันมาสนใจการผลิตสารจากกลีเซอรอลโดยใช้วิธีทางชีวภาพ เช่น งานวิจัยของ Ito และคณะ [4] ที่ได้ผลิตก๊าซไฮโดรเจน จาก *Enterobacter aerogenes* HU-101 โดยทำการเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังหมักชนิด packed-bed ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่ควบคุมค่าพีเอช อาหารที่ใช้มีกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์และทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าหลังจาก 12 ชั่วโมง ให้อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจน 63 มิลลิโมลต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าการใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นเท่ากัน (12 % น้ำหนักต่อปริมาตร) เนื่องจากกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนั้น มีปริมาณของเกลือค่อนข้างสูง ทำให้ไม่เหมาะต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของแบคทีเรีย Papanikolaou [10] ได้ผลิต 1,3-propanediol เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมพลาสติกและเครื่องสำอาง โดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium butyricum* สายพันธุ์ F2b ทำการเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบต่อเนื่อง โดยใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส โดยช่วงแรกทำการเลี้ยงในสภาพไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 10-14 ชั่วโมง จากนั้นให้อากาศโดยทำการกวนที่ 250 รอบต่อนาที และปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 7±0.05 พบว่าให้อัตราการผลิต1,3-propanediol เป็น 5.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Lee และคณะ [11] ได้รายงานถึงการผลิตกรดซัคซินิกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมสังเคราะห์เรซิน และโพลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้โดยใช้สาหร่าย *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ทำการเลี้ยงในสภาพขาดอากาศ อาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 5 กรัมต่อลิตรของกลูโคส, 2.5 กรัมต่อลิตรของสารสกัดจากยีสต์, 5 กรัมต่อลิตรของโพลีเปปโตน และ 6.5 กรัมต่อลิตรของกลีเซอรอล ทำการปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วยกรดซัลฟิวริก พบว่าให้กรดซัคซินิกสูงถึง 133 % ของกลีเซอรอล และมีสัดส่วนของกรดซัคซินิกต่ออะซีติก เป็น 28.5:1 จากที่ได้ยกตัวอย่างมา จะเห็นว่า การนำกลีเซอรอลมาใช้ประโยชน์ทางชีวภาพจะค่อนข้างเป็นวิธีที่เหมาะสม และก่อให้เกิดมลพิษน้อยกว่าวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ส่วนใหญ่นั้นก็ยังคงนำกลีเซอรอลที่บริสุทธิ์มาใช้ในกระบวนการหมัก ร่วมกับจุลินทรีย์ เนื่องจากการที่มีเมทานอลและตัวเร่งปฏิกิริยาเข้มข้นปะปนอยู่นั้นอาจยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บาง

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

กลุ่มที่สามารถใช้กลีเซอรอลได้ ในงานวิจัยนี้ จึงมีแนวทางในการนำกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพ

และพบว่ายีสต์ *Hansenula polymorpha* ซึ่งเป็นยีสต์ในกลุ่มเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ สามารถใช้ทั้งกลีเซอรอลและเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ glycerol kinase และเอนไซม์ glycerol-3-phosphate dehydrogenase ซึ่งใช้ในกระบวนการย่อยสลายกลีเซอรอล [12] และมีการสังเคราะห์เอนไซม์ methanol oxidase และเอนไซม์ dihydroxyacetone synthase สำหรับการสลายเมทานอล เพื่อนำมาใช้สำหรับการสร้างพลังงานและการเจริญของเซลล์ [13] อีกทั้งยังสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงในช่วง 37 – 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะกับอากาศในประเทศไทย สะสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ มีความต้องการ growth factor ต่างๆน้อย และสามารถปรับปรุงพันธุกรรมได้ง่าย [14] นอกจากนี้ เซลล์ยีสต์ยังมีปริมาณโปรตีนที่สูงถึงร้อยละ 40-50 และมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงถึงร้อยละ 30-35 ของน้ำหนักแห้ง [15] และยังมีรายงานว่า *H. polymorpha* สามารถเลี้ยงให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูงในน้ำหมักได้ (High cells density) เช่น งานวิจัยของ Wegner และ Okla [16] ได้รายงานถึงการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y- 11432 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ในอาหาร Mineral salt medium ที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและทำการเสริมด้วยไบโอติน อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญของเซลล์เป็น 38 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าพีเอชในช่วง 3.7-4.1 และมีค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก 20 % โดยปริมาตร พบว่าให้ความหนาแน่นของเซลล์ในน้ำหมัก 73.3 กรัมต่อลิตร เมื่อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง และให้อัตราการเจริญของเซลล์เป็น 0.31 กรัมของเซลล์ต่อกรัมเมทานอล ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการผลิตโปรตีนจากเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* โดยใช้กลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำไปทำเป็นอาหารสัตว์ โดยอาจจะใช้ในรูปโปรตีนเซลล์เดี่ยว หรือในรูปสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่มีการนำวัสดุเหลือทิ้งมาเพิ่มมูลค่าโดยการเปลี่ยนรูปให้อยู่ในรูปของโปรตีน เพื่อลดปัญหาการกำจัดของเสียที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และยังสามารถสร้างรายได้ให้แก่ผู้ผลิตได้ด้วย

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ *H. polymorpha* โดยใช้กลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญ ในระดับขวดเขย่า

1.3 วิธีดำเนินการวิจัย

1.3.1 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคส หรือกลีเซอรอลบริสุทธิ์ เป็นแหล่งคาร์บอน

1.3.2 ศึกษาองค์ประกอบหลักในกลีเซอรอลดิบ วิธีการเตรียมสูตรอาหารและปริมาณที่เหมาะสมของกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha*

1.3.3 ศึกษาชนิด ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น ความเร็วรอบในการเขย่าและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha*

1.3.4 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG และอาหาร Mineral Salt Medium

1.3.5 ศึกษาและวิเคราะห์องค์ประกอบของยีสต์ *H. polymorpha* ที่ได้จากการเจริญในอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ *H. polymorpha* โดยใช้กลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน

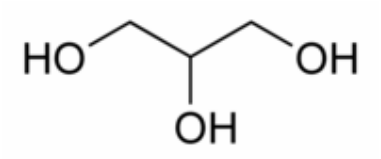
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กลีเซอรอล

กลีเซอรอล (Glycerol) หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กลีเซอรีน (Glycerine หรือ Glycerin) เป็นชื่อเรียกสามัญของสารประกอบอินทรีย์จำพวกพอลิไฮดริกแอลกอฮอล์ (Polyhydric alcohol) ที่มีสูตรเคมี $HOCH_2 CHOHCH_2 OH$ มีชื่อทางเคมีว่า 1,2,3 – โพรเพนไตรออล (1,2,3- Propanetriol) [17] และมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล [18]

2.2 สมบัติของกลีเซอรอล [5]

สมบัติทางกายภาพ

กลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นของเหลว ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่มีพิษ และมีโครงสร้างที่คล้ายน้ำตาล จึงทำให้กลีเซอรอลมีรสหวาน ดังรูปที่ 2.2 และเนื่องจากในโมเลกุลมีพันธะไฮโดรเจนจึงทำให้กลีเซอรอลเป็นของเหลวหนืด กลีเซอรอลมีจุดเดือด 290 องศาเซลเซียส ที่ความดันบรรยากาศ (101.3 kPa) และจุดเดือดจะลดลงตามความดันที่ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และมีสมบัติทางกายภาพอื่นๆที่สำคัญ ดังแสดงตารางที่ 2.2

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

รูปที่ 2.2 กลีเซอรอลบริสุทธิ์[19,20]

ตารางที่ 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันไอกับอุณหภูมิของกลีเซอรอล

อุณหภูมิ (^{o}C)	**ความดันไอ** (kPa)
290	101.3
266	53.3
222	13.3
204	6.67
175	2.00
152	0.67
130	0.18
100	0.03
20	<0.0001

กลีเซอรอลสามารถละลายได้ดีกับน้ำ เมทานอล และไอโซเมอร์ของโพรพานอล บิวทานอล และเพนทานอล ไกลคอล โพรเพนไดออล เอมีน และสารประกอบที่เป็นเฮทเทอโรไซคลิกที่ประกอบด้วยอะตอมของไนโตรเจนในวงแหวน (เช่น ไพริดีน, ควิโนลีน) กลีเซอรอล ไม่สามารถละลายได้ในไฮโดรคาร์บอนเกือบทั้งหมด แอลกอฮอล์ที่มีโซ่ยาว น้ำมันพืชและสัตว์ และตัวทำละลายจำพวกฮาโลเจน เช่น คลอโรฟอร์ม ดังนั้นกลีเซอรอลจึงเป็นตัวทำละลายที่มีประโยชน์ต่อสารหลายชนิด ทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ ซึ่งมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 2.2 สมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล

Property	Value
Molecular weight	92.09
Melting point	18.0 ^{o}C
Boiling point (101.3 kPa)	290.0 ^{o}C
Density (20 ^{o}C)	1.261 g/cm^{3}
Refractive index	1.4740
Dynamic viscosity (20 ^{o}C)	1.410 Pa.s
Compressibility (28.5 ^{o}C)	2.1x10^{-4} MPa^{-1}
Gravity coefficient of thermal expansion (15-20 ^{o}C)	0.000615 K^{-1}
Surfac tension (20 ^{o}C)	63.4 mN/m
Heat of formation	669 kJ/mol
Heat of combusion	1662 kJ/mol
Heat of vaporization (55 ^{o}C)	88.2 kJ/mol
(195 ^{o}C)	76.1 kJ/mol
Heat of fusion (18 ^{o}C)	18.3 kJ/mol
Heat of solution (infinite dilution)	5.8 kJ/mol
Heat capacity (26 ^{o}C)	2.41 kJ kg^{-1} K^{-1}
(-80 ^{o}C)	1.91 kJ kg^{-1} K^{-1}
(-108 ^{o}C)	0.91 kJ kg^{-1} K^{-1}
Thermal conductivity (0 ^{o}C)	0.29 W m^{-1} K^{-1}
Diffusion coefficient of water into glycerol (20 ^{o}C)	1.336x10^{-11} m^{2}/s
Specific electrical conductivity (20 ^{o}C)	0.1 μ S/cm
Relative dielectric constant (25 ^{o}C)	42.48
Flash point	177 ^{o}C
Fire point	204 ^{o}C
Autoignition temperature	429 ^{o}C

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

สมบัติทางเคมี [5]

กลีเซอรอลสามารถเกิดปฏิกิริยาได้เหมือนแอลกอฮอล์ทั่วๆไป โดยที่หมู่ไฮดรอกซีด้านนอกจะมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยามากกว่าหมู่ไฮดรอกซีตรงกลาง ภายใต้ภาวะที่เป็นกลางหรือด่าง กลีเซอรอลสามารถทนความร้อนได้ถึง 275 องศาเซลเซียส โดยไม่เกิดอะโครลีน ในทางตรงข้าม ในสภาวะกรดเล็กน้อยพบว่า ที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส จะมีกลิ่นของอะโครลีน (อยู่ในช่วง 0.2-0.4 ppm) โดยที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส อะโครลีนจะเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นปฏิกิริยาของกลีเซอรอลจึงควรทำในภาวะที่เป็นกลางหรือด่าง และที่อุณหภูมิห้องกลีเซอรอลจะดูดความชื้นอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้กลีเซอรอลยังถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายโดยที่อะตอมคาร์บอนด้านนอกและถูกออกซิไดซ์เป็นหมู่คาร์บอกซิล และอะตอมคาร์บอนตรงกลางจะเกิดเป็นหมู่คาร์บอนิล

การจำแนกคุณภาพและวิเคราะห์ [21, 22]

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมแบ่งกลีเซอรอลออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1 กลีเซอรอลดิบ

2 กลีเซอรอลบริสุทธิ์

กลีเซอรอลดิบ

หมายถึง กลีเซอรอลที่ยังไม่ได้ผ่านกรรมวิธีทำให้บริสุทธิ์ แบ่งเป็น

1 กลีเซอรอลดิบจากการแยกสลายไขมัน (Hydrolyser Crude Glycerol)

หมายถึง กลีเซอรอลดิบที่ได้จากสวีทวอเทอร์ ซึ่งได้จากการแยกสลายไขมันด้วยน้ำ (Hydrolysis) ที่ความดันสูง หรือเมื่อมีตัวเร่งปฏิกิริยา

2 กลีเซอรอลดิบจากอุตสาหกรรมสบู่ (Soap Lye Crude Glycerol)

หมายถึง กลีเซอรอลดิบที่ได้จากสารละลายกลีเซอรอลจากอุตสาหกรรมทำสบู่และผ่านกรรมวิธีขจัดไขมัน และสบู่ออกแล้ว

กลีเซอรอลบริสุทธิ์

หมายถึง การผ่านกรรมวิธีทำให้บริสุทธิ์ จนมีคุณลักษณะเหมาะสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหาร บุหรี่ วัตถุระเบิด และอุตสาหกรรมอื่นๆ แบ่งออกเป็น 4 ชั้นคุณภาพ คือ

1 ชั้นคุณภาพเคมี (Chemical Grade)

2 ชั้นคุณภาพไดนาไมต์ (Dynamite Grade)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3 ชั้นคุณภาพอุตสาหกรรม (Technical Grade)
4 ชั้นคุณภาพยา (Pharmaceutical Grade)

2.3 **ประโยชน์ของกลีเซอรอล** [23, 24]

ในปัจจุบัน กลีเซอรอลสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ดังนี้

- ด้านยา ใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ โดยเป็นส่วนผสมของยาหลายชนิด เช่น ยาระบาย ยาแก้ไอ เป็นต้น

- ด้านเครื่องสำอาง เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์หลายชนิด เพื่อให้ความชุ่มชื้น เช่น ครีมทาผิวหน้าและผิวกาย ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก เป็นต้น

- ด้านอาหาร เป็นสารให้ความหวาน สารที่ช่วยรักษาความชื้นซึ่งทำให้เก็บและถนอมอาหารได้ยาวนานขึ้น นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนประกอบในสารเติมแต่งสีและรสชาติในอาหาร เป็นส่วนประกอบของน้ำเชื่อม (Syrup) ในลูกอมและไอซิ่ง (Icing) ใช้ในการแช่แข็งอาหาร

- ด้านอุตสาหกรรมโพลีอีเทอร์ โพลีออล (Polyether polyols) เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตโพลีออลเพื่อใช้สำหรับผลิต flexible foams และผลิตโพลียูเทนที่มีความอ่อนตัวลง และยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตโพรไพลีน (propylene)

- ด้านอุตสาหกรรมพลาสติก (Alkyd resins) **และเซลโลเฟน** (cellophane) ใช้เป็นส่วนผสมในสารเคลือบผิวและสีต่างๆ เป็นส่วนประกอบในการผลิตพลาสติกเพื่อให้มีความอ่อนตัว และใช้ในการผลิตเซลโลเฟน

- ด้านอุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์ (Absolute alcohol) โดยการนำกลีเซอรอลมาผ่านกระบวนการดีไฮเดรชั่น (dehydration) เพื่อผลิตแอลกอฮอล์

- อื่นๆ เช่น ใช้เป็นสารกันซึมและจุกคอร์ก เนื่องจากมีความเหนียวและมีความดันไอต่ำสัมผัสอาหารได้เพราะไม่เป็นพิษ ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ยางราดถนน (Asphalt) เซรามิก และกาว เป็นต้น

2.4 **การผลิตกลีเซอรอลและแหล่งที่มา** [5, 25, 26]

ในปัจจุบัน กลีเซอรอลได้มาจาก 2 แหล่งหลักๆ คือกลีเซอรอลสังเคราะห์ และกลีเซอรอลธรรมชาติ โดยปริมาณกลีเซอรอลจากทั้ง 2 แหล่ง จะอยู่ที่ประมาณ 25 และ 75 % ตามลำดับ มีรายละเอียดดังนี้

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

กลีเซอรอลสังเคราะห์ (Synthetic Glycerol)

กลีเซอรอลสังเคราะห์โดยส่วนใหญ่จะมาจากการสังเคราะห์โพรพีน ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กระบวนการ คือ

การผลิตจากอัลลิลคลอไรด์ (Allyl Chloride) โดยการทำปฏิกิริยาคลอริเนชั่น (Chlorination) โพรพีนที่อุณหภูมิสูง เกิดเป็นอัลลิลคลอไรด์และถูกออกซิไดซ์ด้วยไฮโปคลอไรท์ (Hypochlorite) เกิดเป็นไดคลอโรไฮดริน (Dichlorohydrin) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นอิพิคลอโรไฮดริน (Epichlorohydrin) จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10-15 % ที่อุณหภูมิ 80-200 องศาเซลเซียส ความดันบรรยากาศหรือเหนือความดันบรรยากาศ เกิดเป็นกลีเซอรอลเจือจาง (10-25 %)

การผลิตจากอะโครลีน (Acrolein) โดยโพรพีนจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นอะโครลีนและถูกรีดิวซ์เป็นอัลลิลแอลกอฮอล์ (Allyl alcohol) จากนั้นจะถูก epoxidized ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ไกลซิดอล (Glycidol) ซึ่งจะถูกไฮโดรไลซ์เป็นกลีเซอรอล

การผลิตจากโพรพีนออกไซด์ (Propene oxide) โดยโพรพีนจะถูก epoxidized ไปเป็นโพรพีนออกไซด์ซึ่งจะถูกจัดรูปใหม่ (isomerise) เป็นอัลลิลแอลกอฮอล์ และใช้ไตรลิเทียมฟอสเฟต (Trilithium phosphate) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 200-250 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิต 80-85 %

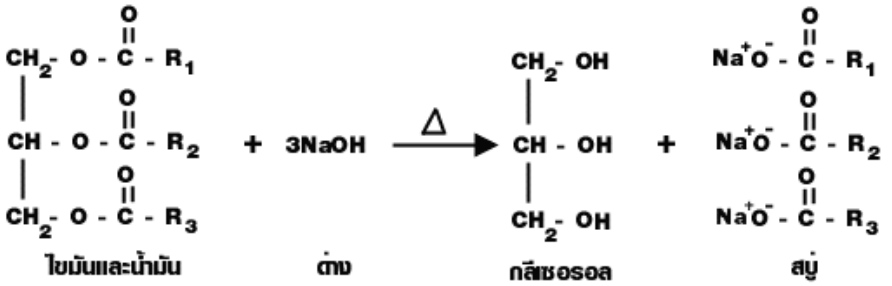
กลีเซอรอลธรรมชาติ (Natural Glycerol) [27,28]

กลีเซอรอลธรรมชาติไม่พบในรูปแบบอิสระในไขมันหรือน้ำมันที่ได้จากพืชและสัตว์ แต่จะอยู่ในรูปเอสเทอร์ของกรดไขมัน โดยหมู่ไฮดรอกซีทั้ง 3 หมู่มักจะเกิดปฏิกิริยาเป็นเอสเทอร์ ปริมาณกลีเซอรอลในไขมันและน้ำมันจะอยู่ระหว่าง 8-14 % โดยน้ำหนัก ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดไขมัน การจะได้กลีเซอรอลนั้น ต้องทำการแตกตัวไขมันและน้ำมัน (Fat splitting) ซึ่งเป็นแหล่งกลีเซอรอลจากธรรมชาติหลักๆ โดยแบ่งเป็นการแตกตัวที่ความดันสูง การทำสบู่จากน้ำมันและการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น ดังนี้

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

การแตกตัวด้วยความดันสูง (high-Pressure Splitting) เป็นการแตกตัวภายใต้ความดัน โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง น้ำและไขมันจะถูกป้อนเข้าไปสู่คอลัมน์แตกตัวแบบการไหลสวนทางที่ความดัน 5-6 MPa และอุณหภูมิ 250-260 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดการแตกตัวจะได้สารละลายกลีเซอรอลในน้ำ 15 % จึงเรียกว่า “สวีทวอเทอร์” (Sweet water) [29]

ปฏิกิริยาการทำสบู่ (Saponification) เป็นการแตกตัวไขมันและน้ำมัน โดยทำปฏิกิริยากับด่างจะได้กลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ร่วม ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีการดั้งเดิม [30] ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาการทำสบู่ [31]

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น (Transesterification) โดยการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น ของน้ำมันหรือไขมันกับเมทานอลได้เป็นเมทิลเอสเทอร์และกลีเซอรอลดิบ (Crude glycerol) ซึ่งกลีเซอรอลดิบที่ได้จะมีความเข้มข้นประมาณ 90-92 % โดยรายละเอียดจะกล่าวในหัวข้อต่อไป [2]

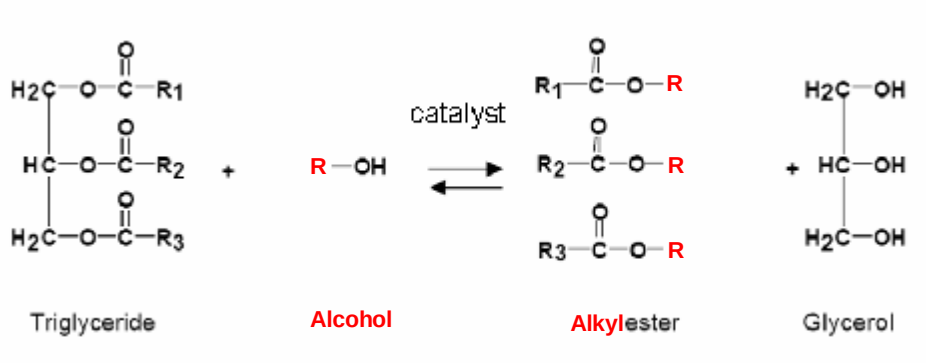
นอกจากนี้ยังมีกระบวนการผลิตอื่นๆอีก เช่น การหมักน้ำตาล และปฏิกิริยาไฮโดจิเนชันของคาร์โบไฮเดรต การสังเคราะห์กลีเซอรอลของสาหร่ายทะเล โดยใช้พลังงานแสงอาทิตย์ เป็นต้น ซึ่งเป็นกระบวนการที่ไม่สำคัญในทางอุตสาหกรรม [5]

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นเป็นปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์ของไขมันสัตว์หรือน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น คือ เอสเทอร์และกลีเซอรอล ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นมักจะใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาและ

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ผลิตภัณฑ์ด้วย เช่น ด่าง กรด หรือเอนไซม์ สำหรับตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นที่เป็นด่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรด เช่น กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) และ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ส่วนตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเอนไซม์ คือ ไลเพส (lipase) [32] โดยทั่วไปแล้ว จะใช้น้ำมันพืชในปริมาณ 100 ส่วน ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ 10 ส่วน โดยมีสารเร่งปฏิกิริยาอยู่ด้วย จะได้ไบโอดีเซล 100 ส่วน และกลีเซอรีน 10 ส่วน [3]

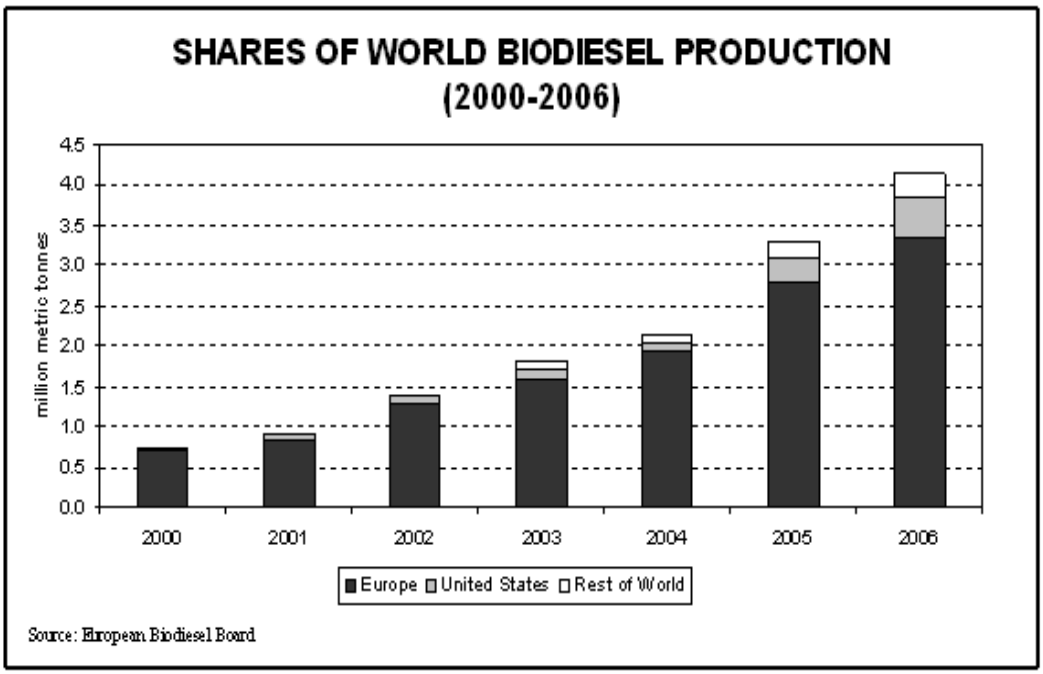


รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน [32]

ซึ่งปฏิกิริยานี้กำลังได้รับความสนใจ เนื่องจากในช่วง 30 ปีที่ผ่านมานั้น โลกมีวิกฤตพลังงานเกิดขึ้นหลายครั้ง ราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกขยับสูงขึ้นเป็นลำดับ และดูเหมือนจะไม่มีการลดลง ราคาน้ำมันของโลกที่ขยับสูงขึ้น ในหลายครั้งขึ้นกับปัญหาทางการเมืองระหว่างประเทศ ล่าสุดคือ ปัญหาความกลัวต่อแผนนิวเคลียร์ของอิหร่าน รวมถึงปัญหาการทดลองยิงขีปนาวุธของประเทศเกาหลีเหนือ ไปยังประเทศญี่ปุ่นเมื่อวันที่ 5 กรกฎคม 2549 ทำให้ราคาน้ำมันโลกพุ่งขึ้น ทำสถิติสูงสุดใหม่ที่ 75.4 ดอลลาร์ต่อบาร์เรล ทั้งโลกจึงได้หันมาสนใจการใช้พลังงานหมุนเวียนรวมถึงไบโอดีเซล เพื่อใช้ทดแทนพลังงานจากปิโตรเลียมกันอย่างจริงจังอีกครั้ง [1]

จากข้อมูลการผลิตไบโอดีเซลทั่วโลก ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000-2006 พบว่าประชาคมยุโรปเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซลที่ใหญ่ที่สุดของโลก โดยมีเยอรมนี ฝรั่งเศส สวีเดน และสเปนเป็นผู้นำในการผลิต ส่วนประเทศในทวีปอื่นๆที่มีกำลังการผลิตไบโอดีเซลสูง ได้แก่ อเมริกา บราซิล ออสเตรเลีย และมีการผลิตในทวีปเอเชียบางส่วน [1] ดังรูปที่ 2.5

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 2.5 กำลังการผลิตไบโอดีเซลของโลก ปี 2000-2006 [33]

น้ำมันดีเซลชีวภาพ หรือเรียกอีกอย่างว่า “น้ำมันไบโอดีเซล” สามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ดีเซล เช่น รถยนต์โดยสารประจำทาง รถบรรทุก รถแทรกเตอร์ เป็นต้น โดยไม่ต้องมีการดัดแปลงหรือปรับแต่งเครื่องยนต์ใหม่ อีกทั้งยังมีคุณสมบัติที่ช่วยให้เครื่องยนต์เผาไหม้ได้สะอาด และมีอายุการใช้งานได้นาน ในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทยจึงได้มีการศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันดีเซลชีวภาพอย่างกว้างขวาง ทั้งนี้เป้าหมายในการส่งเสริมการผลิตน้ำมันดีเซลชีวภาพนั้นมิใช่เพื่อการนำมาทดแทนน้ำมันปิโตรเลียม แต่เป็นการยืดเวลาของการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงได้นานขึ้น โดยการนำน้ำมันดีเซลชีวภาพมาผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงในอัตราส่วนประมาณ 10-30 % ราคาต้นทุนของการใช้น้ำมันผสมดังกล่าวจึงขึ้นกับราคาของน้ำมันดีเซลในตลาดโลก และราคาของน้ำมันพืช

สำหรับประเทศไทยนั้นก็มีการวิจัยและพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลเช่นเดียวกับหลายๆ ประเทศ โดยกระทรวงพลังงานได้จัดทำยุทธศาสตร์พลังงานทดแทนขึ้นในปี พ.ศ.2547 เพื่อเป็นการสร้างความมั่นคงด้านพลังงานและเพิ่มขีดความสามารถทางการแข่งขันของประเทศ โดยคณะรัฐมนตรี (ครม.) ได้ให้ความเห็นชอบในยุทธศาสตร์พลังงานทดแทน ที่กำหนดเป้าหมายการใช้พลังงานทดแทนของไทยเป็น 8% ของการใช้พลังงานทั้งหมด ภายในปี พ.ศ.2554 หรือเทียบเท่ากับน้ำมันดิบถึง 6,540 พันตัน โดยไบโอดีเซลได้ถูกจัดเป็นส่วนหนึ่งของเป้าหมายพลังงานทดแทนด้วย และคาดว่า ในปี พ.ศ.2555 ประเทศไทยจะมีความต้องการไบโอดีเซลถึงวันละ 8.5 ล้านลิตร

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ซึ่งแผนปฏิบัติการพัฒนาและส่งเสริมไบโอดีเซลดังกล่าวได้ผ่านความเห็นชอบของ ครม. เมื่อวันที่ 17 พฤษภาคม 2548 [1]

2.5 แนวโน้มปริมาณและราคากลีเซอรอลดิบ [1, 33]

ปัจจุบันทั่วโลกมีโรงงานผลิตไบโอดีเซลในแต่ละปีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีกำลังการผลิตไบโอดีเซลรวมประมาณ 5.4 ล้านตันต่อปี (ข้อมูลปี ค.ศ.2007) โดยประชาคมยุโรปเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซลที่ใหญ่ที่สุดของโลก โดยมีเยอรมนี ฝรั่งเศส สวีเดน และสเปน เป็นประเทศผู้นำในการผลิต ซึ่งสามารถผลิตไบโอดีเซลได้ประมาณ 3,375,000 ตันต่อปี (ข้อมูลปี ค.ศ.2006) ส่วนประเทศไทยนั้น แม้ว่าจะยังมีกำลังการผลิตไบโอดีเซลไม่มากเมื่อเทียบกับประเทศในแถบยุโรปและอเมริกา แต่ก็มีการผลิตไบโอดีเซลกันอย่างจริงจังหลายแห่ง

เนื่องจากในการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันนั้น จะให้กลีเซอรอลประมาณ 10% ของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด ซึ่งจากข้อมูลในรูปที่ 2.5 การผลิตไบโอดีเซลทั่วโลกตั้งแต่ปี ค.ศ.2000-2006 จะทำให้มีปริมาณกลีเซอรอลดิบที่เป็นผลผลิตพลอยได้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเช่นเดียวปริมาณไบโอดีเซล ซึ่งแสดงค่าในตารางที่ 3

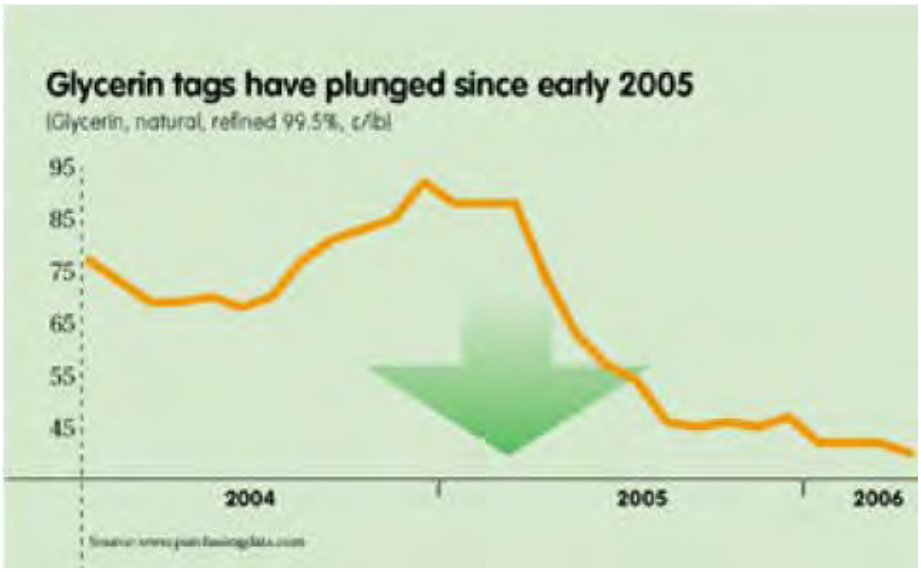
ตารางที่ 2.3 กำลังการผลิตไบโอดีเซลและปริมาณกลีเซอรอลดิบทั่วโลก ปี ค.ศ.2000-2006

ปี ค.ศ.	กำลังการผลิตไบโอดีเซล (ตัน)	กลีเซอรอลดิบที่ได้ (ตัน)
2000	767,800	76,780
2001	935,925	93,592
2002	1,400,775	140,077
2003	1,777,725	177,772
2004	2,098,375	209,837
2005	3,310,675	331,067
2006	4,102,000	410,200

กลีเซอรลดิบที่ได้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างต่ำ และมีค่าใช้จ่ายสูงในการทำให้บริสุทธิ์ (ประมาณ 400 $/ตัน หรือประมาณ 14,000 บาทต่อตัน) และส่วนใหญ่ 97% ของกลีเซอรอลทั้งหมดที่ใช้ในอุตสาหกรรม จะมีความบริสุทธิ์ 95% ขึ้นไป จึงอาจเกิดความไม่คุ้มค่าสำหรับโรงงานผลิต

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ไบโอดีเซลขนาดเล็กและกลาง หรือตลอดจนโรงงานขนาดใหญ่บางแห่ง ที่ต้องทำกลีเซอรอลดิบให้มีความบริสุทธิ์ขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง อาหาร เป็นต้น ทำให้ราคาของกลีเซอรอลลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งข้อมูลราคาของกลีเซอรอลในปี ค.ศ.2006 อยู่ที่กิโลกรัมละประมาณ 24 บาท และคาดว่าแนวโน้มราคากลีเซอรอลในตลาดโลกจะลดลงเรื่อยๆ หากทั่วโลกยังมีการผลิตไบโอดีเซลกันอย่างต่อเนื่อง [34]



รูปที่ 2.6 ราคากลีเซอรอลบริสุทธิ์ 99.5 % ในตลาดโลก ตั้งแต่ปี ค.ศ.2004- 2006 [34]

2.6 การจัดการกลีเซอรอลดิบในปัจจุบัน

กลีเซอรอลที่เป็นผลผลิตพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซลนั้น จะมีน้ำผสมอยู่ด้วย ดังนั้นจากชั้นของกลีเซอรอลที่แยกออกมาจึงเรียกว่ากลีเซอรีน ซึ่งหมายถึงกลีเซอรอลผสมอยู่กับน้ำ อย่างไรก็ตาม กลีเซอรีนดิบที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล มักมีความบริสุทธิ์ต่ำประมาณ 60% นอกจากมีน้ำปะปนอยู่จำนวนมากแล้ว ยังมีสารเร่งปฏิกิริยาที่เหลือจากการใช้ในปฏิกิริยา และมีสบู่ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันปะปนอยู่ด้วย จึงต้องผ่านการบำบัดเบื้องต้นและผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ จึงจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์อื่นๆได้ [1] ซึ่งส่วนใหญ่โรงงานผลิตไบโอดีเซลขนาดเล็กจนถึงโรงงานขนาดใหญ่ มีวิธีจัดการกับกลีเซอรอลที่ได้ดังนี้

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ภาพที่ 2.7 กลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล [35,36]

1. **โรงงานผลิตไบโอดีเซลขนาดเล็กและขนาดกลาง** [5]

โรงงานผลิตไบโอดีเซลขนาดเล็กและขนาดกลางนั้น จะไม่มีระบบหรือขั้นตอนในการคัดแยกแอลกอฮอล์และทำกลีเซอรอลดิบให้บริสุทธิ์เหมือนกับโรงงานผลิตขนาดใหญ่ ดังนั้นกลีเซอรอลดิบส่วนใหญ่จะถูกนำไปขายในราคาที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับกลีเซอรอลที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้บางโรงงานยังนำกลีเซอรอลดิบไปเผาทิ้งเป็นเชื้อเพลิง ซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมและยังก่อให้เกิดมลภาวะกับสภาพแวดล้อมได้ โดยการเผากลีเซอรอลจะทำให้กลีเซอรอลเปลี่ยนเป็นอะโครลีน (Acrolein) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ระเหยได้ดี และเป็นอันตรายต่อร่างกาย

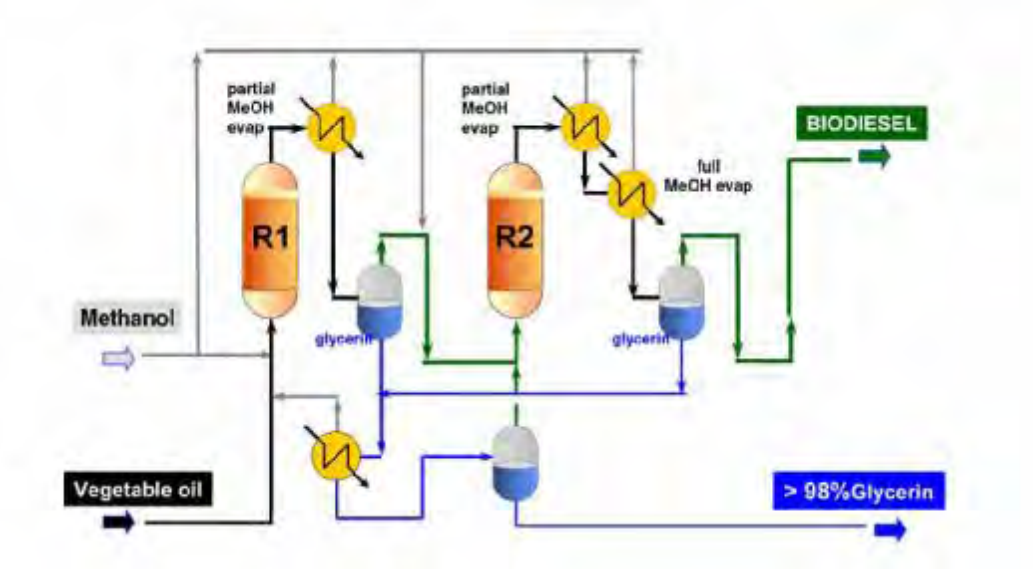
2. **โรงงานผลิตไบโอดีเซลขนาดใหญ่**

โดยทั่วไปแล้วโรงงานผลิตไบโอดีเซลขนาดใหญ่นั้น จะมีระบบและขั้นตอนในการบำบัดกลีเซอรอลดิบโดยทำการคัดแยกแอลกอฮอล์ เอสเทอร์ รวมถึงตัวเร่งปฏิกิริยาออก โดยวิธีที่ใช้คัดแยกสารต่างๆออกจากกลีเซอรอลดิบ เช่น การระเหย โดยการระเหยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จุดเดือดของเมทานอลที่ความดัน 1 บรรยากาศจะมีค่าประมาณ 64 องศาเซลเซียส แต่กลีเซอรอลมีจุดเดือดประมาณ 290 องศาเซลเซียส ดังนั้นเมื่อให้ความร้อน เมทานอลจะระเหยออกไปก่อน จากนั้น ส่วนไขมันและกรดไขมันที่กระจายตัวอยู่สามารถถูกกำจัดได้โดยการตกตะกอน (Settling) หรือการเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifugation) ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นเป็น 70-90% การแก้ไขความเป็นด่างทำได้โดยการเติมกรดเพื่อปรับให้ค่าพีเอช

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ประมาณ 7 ซึ่งการบำบัดเบื้องต้นจะทำให้กลีเซอรอลที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ทำให้มูลค่าของกลีเซอรอลที่จะขายให้กับอุตสาหกรรมต่างๆมีมูลค่าสูงขึ้น ดังรูปที่ 2.8

นอกจากนี้โรงงานผลิตไบโอดีเซลขนาดใหญ่บางแห่ง จะมีขั้นตอนการกลั่นทำให้กลีเซอรอลมีที่ความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น ประมาณ 95-99% เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมด้านยา เครื่องสำอาง อาหาร เป็นต้น



รูปที่ 2.8 แผนผังแสดงกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตไบโอดีเซลขนาดใหญ่ [37]

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวกับการนำกลีเซอรอลดิบมาใช้ประโยชน์

ถึงแม้ว่าโรงงานต่างๆ จะมีวิธีการจัดการกับกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นโดยการทำให้บริสุทธิ์เพียงพอเพื่อนำไปผลิตเป็นสารต่างๆที่มีความสำคัญทางการค้า แต่ก็ยังมีกลีเซอรอลที่ผลิตโดยตรงจากอุตสาหกรรมเคมีอีกมากมาย ทำให้ในอนาคตอาจอาจเกิดภาวะกลีเซอรอลล้นตลาด และราคาตกต่ำ จึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มที่เล็งเห็นความสำคัญของปัญหานี้ และได้ศึกษาวิจัยค้นคว้าหาวิธีทางในการนำกลีเซอรอลมาใช้ประโยชน์ด้วยกระบวนการทั้งทางเคมีและทางเทคโนโลยีชีวภาพ อันจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการแก้ไขปัญหากลีเซอรอลที่จะล้นตลาดในอนาคต และยังเป็นการแปรรูปจากวัตถุดิบที่มีมูลค่าต่ำให้มีมูลค่าสูงได้

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

กระบวนการทางเคมี (Chemical Process)

งานวิจัยเกี่ยวกับการนำกลีเซอรอลมาใช้ประโยชน์โดยการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปสารต่างๆ ด้วยกระบวนการทางเคมีนั้นยังคงมีการศึกษาเรื่อยมา เนื่องจากการใช้กระบวนการทางเคมีในการเปลี่ยนสารหนึ่งไปเป็นอีกสารหนึ่งค่อนข้างทำได้อย่างรวดเร็ว และสามารถควบคุมปฏิกิริยาได้ดี ดังตัวอย่างงานวิจัยต่างๆ ที่จะกล่าวถึง เช่น งานวิจัยของ Kimura [6] ที่ทำการสังเคราะห์ Dihydroxyacetone เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเป็นสารฟอกจางสี โดยนำกลีเซอรอลมาทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยมี bismuth และ platinum ในอัตราส่วน 0.2:1 เป็นตัวเร่ง พบว่าให้ Dihydroxyacetone ถึง 80 % งานวิจัยของ Valliyapan [7] ที่ได้ทำการทดลองผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยนำกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล มาทำปฏิกิริยา Pyrolysis โดยใช้ความร้อนสูง พบว่าให้ก๊าซไฮโดรเจน 1.71 ลิตรต่อกรัมของกลีเซอรอล งานวิจัยของ Perosa และ Tundo [9] ได้ทำการเปลี่ยน glycerol ไปเป็น 1,2-propanediol ซึ่งนิยมใช้เป็นสาร antifreeze โดยนำกลีเซอรอลและนิเกิล (Ni) มาทำปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมงในถัง Steel ภายใต้ความดันของไฮโดรเจน 10 บรรยากาศ ซึ่งจากการทดลองพบว่าสามารถเปลี่ยนไปเป็นสาร 1,2-propanediol ได้ถึง 93 % งานวิจัยของ Dasari และคณะ [3] ได้ทำการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็น 1,2-propanediol โดยใช้ถังที่ออกแบบพิเศษที่เรียกว่า Stainless steel multi-clave reactor ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างต่อเนื่อง 8 ขั้นตอน โดยมีการใช้ไนโตรเจนและไฮโดรเจนในปฏิกิริยา ซึ่งอัตราเร็วของการกวนอยู่ที่ 100 รอบต่อนาที ตลอดการทดลอง ตัวเร่งที่ใช้เป็น copper-chromite และอัตราของผลผลิตที่ได้ประมาณ 73% นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยอื่นๆเกี่ยวกับการนำกลีเซอรอลมาผลิตหรือเปลี่ยนรูปเป็นสารต่างๆ ดังแสดงในตาราง 2.4

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตาราง 2.4 งานวิจัยเกี่ยวกับการนำกลีเซอรอลมาเปลี่ยนรูปด้วยวิธีทางเคมี

Poduct Name	Process Method	Researchers
1,3-propanediol	Selective Hydroxylation Technique involving three stages of Acetalization, Tosylation and Detosylation	Wang และคณะ [38]
Hydrogen	Pyrolysis and steam gasification of glycerol	Valliyapan [7]
	Catalytic reforming operating at moderate temperatures and pressures	Wood [39]
	Steam reforming of glycerol in the gas phase with group 8-10 metals catalysts	Hirai และคณะ [40]
	Aqueous-phase reforming over a tin-promoted Raney-nickel catalyst	Huber และคณะ [41]
1,2-propanediol	Low-pressure hydrogenolysis in multi-clave reactor pressurized with hydrogen	Dasari และคณะ [3]
	Selective hydrogenolysis with raney nickel catalyst in an autoclave with hydrogen	Perosa และ Tundo [9]
Dihydroxyacetone	Chemoselective catalytic oxidation with platinum metals	Garcia และคณะ [42]
	Selective oxidation of glycerol with platinum-bismuth catalyst	Kimura [6]
Polyesters	Reacting glycerol and adipic acid in the presence of tin catalysts	Stumbe และ Bruchmann [43]
	Reacting citric acid and glycerol at different mole ratios	Pramanick และ Ray [44]
	Polycondensation of oxalic acid and glycerol	Alksnis และคณะ [45]
	Reacting glycerol and aliphatic dicarboxylic acids	Nagata และคณะ [46]
Polyglycerols	Selective etherification of glycerol	Koller และคณะ [47]

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

กระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology Process)

ปัจจุบันกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทในงานวิจัยต่างๆ มากขึ้น โดยเฉพาะด้านเกษตรกรรมและสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นกระบวนการที่นำเอาความรู้ทางด้านชีววิทยามาประยุกต์ใช้กับเทคโนโลยี ซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์ในการปฏิบัติและในทางอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง ประกอบกับภาวะการณ์ของโลกในปัจจุบันที่ต้องเผชิญกับวิกฤตการณ์สิ่งแวดล้อมเป็นพิษและภาวะโลกร้อน อันเกิดจากสารพิษจากอุตสาหกรรมต่างๆ นักวิจัยหลายกลุ่มจึงหันมาสนใจเทคโนโลยีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับการนำกลีเซอรอลมาใช้ประโยชน์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ได้มีนักวิจัยและองค์กรหลายกลุ่มนิยมศึกษามากขึ้นเรื่อยมา ดังนี้

Ito และคณะ [4] ได้ผลิตก๊าซไฮโดรเจน จาก *Enterobacter aerogenes* HU-101 โดยทำการเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังหมักชนิด packed-bed ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่คุมค่าพีเอช อาหารที่ใช้มีกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน สารสกัดจากยีสต์และทริปโตน พบว่าหลังจาก 12 ชั่วโมง ให้อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจน 63 มิลลิโมลต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าการใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 15% น้ำหนักต่อปริมาตร เนื่องจากกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนั้น มีปริมาณของเกลือค่อนข้างสูง ทำให้ไม่เหมาะต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ของแบคทีเรีย

Papanikolaou และคณะ [10] ได้ผลิต 1,3-propanediol เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมพลาสติกและเครื่องสำอาง โดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium butyricum* สายพันธุ์ F2b ทำการเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบต่อเนื่อง โดยใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส โดยช่วงแรกทำการเลี้ยงในสภาพไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 10-14 ชั่วโมง จากนั้นให้อากาศโดยทำการกวนที่ 250 รอบต่อนาที และปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 7±0.05 พบว่าให้อัตราการผลิต 1,3-propanediol เป็น 5.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Lee และคณะ [11] ได้รายงานถึงการผลิตกรดซัคซินิกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการสังเคราะห์เรซิน และโพลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้โดยใช้ *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ซึ่งเป็นสาหร่าย ทำการเลี้ยงในสภาพขาดอากาศ อาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 5 กรัมต่อลิตรของกลูโคส, 2.5 กรัมต่อลิตรของสารสกัดจากยีสต์, 5 กรัมต่อลิตรของโพลีเปปโตนและ 6.5 กรัมต่อลิตรของกลีเซอรอล ทำการปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วยกรดซัลฟิวริก พบว่าให้กรดซัคซินิกสูงถึง 133 % ของกลีเซอรอล และมีสัดส่วนของกรดซัคซินิกต่อกรดอะซีติกเป็น 28.5:1

Hellmuth และคณะ [48] ได้รายงานถึงการผลิตเอนไซม์ไฟเทส (Phytase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้มากในอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ ซึ่งจะช่วยการย่อยสลาย phytin ทำให้สัตว์ย่อยได้

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ดีขึ้น โดยทำการหมักด้วยยีสต์ *Hansenula polymorpha* ที่เป็นสายพันธุ์ที่มีการตัดต่อยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ไฟเทส จากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ซึ่งในการทดลองได้ใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch ในถังหมักขนาด 15 ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแบบ Mineral salt medium ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเป็น 10 กรัมต่อลิตร พีเอช 4.6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 5 ลิตรต่อชั่วโมง หลังจากเลี้ยงนาน 18 ชั่วโมง ทำการเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลเป็น 50 กรัมต่อลิตร และทำการเลี้ยงจนถึง 165 ชั่วโมง ภายใต้การให้อากาศและอัตราการกวนอย่างสม่ำเสมอ และเมื่อสิ้นสุดการหมัก พบว่าให้ความเข้มข้นของเอนไซม์ไฟเทสเป็น 5.86 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยอื่นๆเกี่ยวกับการนำกลีเซอรอลมาผลิตหรือเปลี่ยนรูปเป็นสารต่างๆ โดยใช้กระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ดังแสดงในตาราง 2.5

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตาราง 2.5 งานวิจัยเกี่ยวกับการนำกลีเซอรอลมาเปลี่ยนรูปด้วยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ

Poduct Name	Process Method	Researchers
1,3-propanediol	- Continuous fermentation by the microorganisms *Clostridium butyricum*	Papanikolaou และคณะ [10]
	- Batch and continuous glycerol fermentations by *Klebsiella pneumoniae*	Xiu และคณะ [49]
	- Continuous cultures of *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210	Barbirato และคณะ[50]
Hydrogen	-Continuous microbial fermentation by *Enterobacter aerogenes* HU-101	Ito และคณะ [4]
Succinic acid	-Microbial fermentation by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*	Lee และคณะ [11]
Dihydroxyacetone	-Microbial fermentation by *Gluconobacter oxydans* in a batch/ Semi- continuous process	Bauer และคณะ [51]
	- Immobilized *Gluconobacter oxydans* in poly(vinyl alcohol) gel capsules	Raska และคณะ [52]
Polyesters	- fed-batch microaerobic cultures by *Escherichia coli arc A* mutant	Nikel และคณะ [53]
Polyhydroxyalkanoates	- Fermentation of hydrolyzed whey permeate and glycerol liquid phase by osmophilic organism	Nagata และคณะ [46]
Phytase	- Microbial fermentation by *Hansenula polymorpha* in fed-batch reactor	Hellmuth และคณะ [48]
Biomass protein	- Microbial fermentation by *Rhodotorula lactosa* in fed-batch reactor	Matelli และคณะ [54]

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

2.8 โปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single cell protein ; SCP) [55]

โปรตีนเซลล์เดี่ยว

หมายถึง จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารมนุษย์หรือสัตว์ ซึ่งอาจอยู่ในรูปโปรตีนที่สกัดออกมาจากเซลล์แล้ว หรืออาจอยู่ในรูปเซลล์จุลินทรีย์ทั้งเซลล์ก็ได้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันเริ่มมีการใช้คำว่า microbial biomass protein (MBP) เข้ามาแทนที่ SCP เพื่อให้ครอบคลุมฟังไจซึ่งเป็นจุลินทรีย์หลายเซลล์ด้วย

ประวัติการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว

การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวครั้งแรกเริ่มขึ้นในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 ที่ประเทศเยอรมนี เนื่องจากภาวะสงครามทำให้เกิดการขาดแคลนอาหาร จึงได้มีการผลิตเซลล์ยีสต์ขนมปัง (*Saccharomyces cerevisiae*) เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสำหรับมนุษย์ โดยใช้กากน้ำตาลเป็นสับสเตรทหลัก ต่อมาในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ก็ได้มีการพัฒนาการผลิตโดยใช้เชื้อ *Candida utilis* หมักใน sulfite waste liquor ที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ และน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายไม้มาเป็นสับสเตรท หลังจากนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวกันอย่างกว้างขวางและจริงจัง จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1968 ได้มีการก่อตั้งโรงงานผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวขึ้นเป็นจำนวนมากในหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา สวิสเซอร์แลนด์ ไต้หวัน สหภาพโซเวียต ญี่ปุ่น ฟินแลนด์ ฝรั่งเศส อังกฤษและไทย เป็นต้น

2.9 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว [56]

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวมีหลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา สาหร่าย แต่เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปัจจัยประกอบทั้งหลายทั้งในด้านคุณค่าทางอาหาร ทางด้านการผลิต และความคุ้นเคยของผู้บริโภคแล้ว จะพบว่ายีสต์มีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่ดี โดยมีคุณสมบัติที่ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆดังนี้คือ

1. ยีสต์มีอัตราเติบโตเร็ว สามารถเติบโตได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบง่ายๆ ทั้งยังมีความต้องการวิตามิน หรือธาตุอาหารต่างๆน้อย

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

2. เซลล์ยีสต์สามารถคลุกเคล้ากับอาหารเพาะเลี้ยงได้ดี และสามารถแยกเซลล์ยีสต์ออกจากอาหารเพาะเลี้ยงได้ง่าย เนื่องจากเซลล์ยีสต์มีขนาดใหญ่แยกออกจากน้ำหมักได้โดยง่าย จึงเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิตได้เป็นอย่างดี

3. ยีสต์สามารถต้านทานต่อการทำลายของไวรัสและเชื้อชนิดอื่นที่ปนเปื้อน เนื่องจากยีสต์สามารถเติบโตได้ในสภาวะที่เป็นกรด คือ พีเอชประมาณ 3.5-5.0 จึงเป็นการป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ดี ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงยีสต์ได้ทั้งในระบบปลอดเชื้อและระบบที่ไม่ปลอดเชื้อ

4. ยีสต์มีความคงตัวสูงต่อการหมัก เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้แหล่งพลังงานจากสารอาหารที่เพาะเลี้ยงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เราสามารถใช้ยีสต์ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

5. ยีสต์มีคุณลักษณะของกลิ่นรสที่ดี ไม่เป็นพิษ และสามารถถูกย่อยได้ง่าย

6. เซลล์ยีสต์มีองค์ประกอบของโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และเกลือแร่ในปริมาณที่สูง และยังประกอบด้วยวิตามินและกรดอะมิโนที่สำคัญอีกหลายชนิด

7. ยีสต์สามารถถูกปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติที่ดีตามต้องการได้โดยง่าย

8. หลังจากผ่านกระบวนการผลิตที่ใช้ยีสต์แล้ว จะมีวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้อยมากหรือแทบจะไม่มีเลย

ยีสต์ (Yeast) [57]

ยีสต์จัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของรากลุ่มหนึ่งที่มีการดำรงชีวิตเป็นแบบเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่นรูปร่างกลม ทรงรี สามเหลี่ยม รูปร่างคล้ายผลมะนาวแถบประเทศตะวันตก (Lemon) หรือรูปร่างยาว เป็นต้น ยีสต์จะมีการสืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีการแตกหน่อ (budding) หรือแบบอาศัยเพศโดยวิธีการสร้างสปอร์ชนิดแอสโคสปอร์ (ascospore) หรือเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ยีสต์ส่วนใหญ่จะมีการใช้สารอินทรีย์ (organic) เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน

ปัจจุบันยีสต์ถูกใช้เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของอาหารสัตว์ที่เรียกว่า ฟีดยีสต์ (feed yeast) หรือโฟดเดอร์ยีสต์ (fodder yeast) และอาจใช้เป็นแหล่งอาหารเสริม (nutritional supplement) หรือสิ่งเพิ่มรสชาติ (flavour additive) ในอาหารสำหรับคน เซลล์ของยีสต์มีองค์ประกอบทางอาหารที่เป็นประโยชน์หลายอย่าง คือ มีโปรตีน 47-50 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีปริมาณโปรตีนที่แท้จริงซึ่งคำนวณจากกรดอะมิโนทั้งหมดเท่ากับ 36.4-43.6 % และโปรตีนในยีสต์มีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่สำคัญหลายชนิด ซึ่งจะเห็นว่ามีปริมาณไลซีนสูง นอกจากนั้นยังมีอาร์จินีนและ

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ฮิสติดีนซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเด็ก มีคาร์โบไฮเดรตประมาณ 30-35 % ซึ่งประกอบด้วยไกลโคเจนซึ่งเป็นพลังงานของคน มีกลูแคนและแมนแนนซึ่งเป็นแหล่งที่สำคัญของสารเยื่อใยที่ละลายได้ (soluble fibre) สำหรับคน มีไนโตรเจน 7.5-9 % กรดนิวคลีอิก 6-12 % เถ้า 5-9.5 % มีไขมันต่ำ คือ 2-6 % และมีเถ้ามาก นอกจากนั้นยีสต์ประกอบไปด้วยโปรตีนหลายชนิด เช่น วิตามินบีรวม ยิ่งกว่านั้นเซลล์ของยีสต์ยังประกอบด้วยเกลือแร่หลายชนิดที่เป็น trace element สำหรับคนและสัตว์ เช่น โครเมียม (chromium) ซีลีเนียม (selenium) โมลิบดีนัม (molybdenum) และสังกะสี (zinc) (15) นอกจากนั้นยีสต์ยังมีรสชาติดีช่วยเพิ่มความน่ารับประทานของอาหาร ดังนั้นยีสต์จึงถูกใช้เป็นส่วนหนึ่งของหารสัตว์และใช้เป็นแหล่งธาตุอาหารเสริมหรือเพิ่มรสชาติของอาหารคนและสัตว์เป็นเวลานาน โดยสามารถนำไปใช้ในรูปแบต่างๆ ดังนี้

รูปที่ 2.9 ตัวอย่างยีสต์สกัด [58, 59]

1. ยีสต์สกัด (Yeast Extract) เป็นสารสกัดซึ่งเป็นส่วนของของเหลวภายในเซลล์ หรือไซโตพลาสซึม (cytoplasm) มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้มหรือเป็นผงละเอียด ซึ่งอุดมไปด้วยสารอาหารต่างๆ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด โดยสามารถนำไปใช้ได้อย่างหลากหลาย เช่น ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเมตาบอไลท์ (metabolite) ชนิดอื่นๆ ใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในการผลิตขนมขบเคี้ยว ใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในอุตสาหกรรมการแปรรูปเนื้อสัตว์และอาหารสำเร็จรูป รวมทั้งใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ ซึ่งตัวอย่างของยีสต์สกัด ดังแสดงในรูปที่ 2.9

2. เซลล์ยีสต์ (Yeast Cell) โดยใช้ได้ทั้งในรูปแบบที่มีชีวิต (Live Yeasts or Active Yeast) ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ ส่งผลให้สัตว์มีการกินอาหารได้มากขึ้น อีกทั้งยังเป็นแหล่งของวิตามินบีรวม หรืออาจใช้ในรูปแบบเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้ว (Inactive Yeast) ซึ่งอาจจะไม่มีคุณสมบัติเป็นสารเสริมชีวนะ แต่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ของการเป็นแหล่งของสารอาหารเสริม โดยมักใช้เป็นแหล่งของอาหารเสริมโปรตีนที่มีคุณภาพดีเนื่องจาก มีปริมาณ

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

โปรตีนสูง (ร้อยละ 45-50) อีกทั้งยังประกอบไปด้วยกรดอะมิโนอิสระ วิตามินบีรวม แร่ธาตุ และกรดไขมันซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสัตว์หลายชนิด

3. สารสีจากเซลล์ยีสต์ (Colorants derived from yeast) โดยเฉพาะกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ซึ่งมักนิยมนำมาผสมในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มคุณภาพให้สัตว์ เช่น การใช้ผสมในอาหารปลาเพื่อเพิ่มปริมาณเม็ดสีในปลา เป็นต้น

4. ผนังเซลล์ยีสต์ (Yeast Cell Wall) ซึ่งประกอบไปด้วยองค์ประกอบที่สำคัญหลายอย่าง ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการเจริญของสัตว์ โดยมักนิยมใช้เป็นสารพรีไบโอติค (prebiotic) เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ใช้ในการลดพิษจากเชื้อรา และใช้เป็นสารเสริมภูมิคุ้มกัน (เบต้ากลูแคน)

2.10 **ปัจจัยที่จำเป็นต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์** [56]

ปัจจัยที่จำเป็นต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งฟอสฟอรัส ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อผลผลิตสูงสุดที่ควรได้จากกระบวนการผลิต [60]

แหล่งของสารอาหารสำหรับยีสต์

สำหรับการเจริญและพัฒนาของยีสต์นั้น ยีสต์ต้องการสารอาหารซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน รวมทั้งธาตุอาหารหลัก (major element) อื่นๆ ได้แก่ ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส นอกจากนั้นยังต้องการธาตุอาหารบางชนิดในปริมาณค่อนข้างมาก ธาตุอาหารเหล่านั้นจัดเป็น macroelement ประกอบด้วย แมกนีเซียม และโพแทสเซียม ในขณะที่ธาตุอาหารบางชนิดยีสต์ต้องการในปริมาณที่ต่ำ (microelement หรือ trace element) ได้แก่ แคลเซียม เหล็ก ทองแดง แมงกานีส สังกะสี นิเกิล โคบอลต์ และโมลิบดีนัม ยิ่งไปกว่านั้น ยีสต์ยังต้องการสารประกอบบางชนิดเพื่อทำหน้าที่เป็น growth factor เช่น วิตามินพิวรีน ไพริมิดีน และนิวคลีโอไทด์

1. **แหล่งคาร์บอน** (Carbon Source) ภายในเซลล์ยีสต์มีคาร์บอนประมาณ 50 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ยีสต์เป็นคีโมออร์กาโนโทรป (chemoorganotroph) ซึ่งต้องใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนใหญ่สารอินทรีย์ที่ใช้คือน้ำตาล โดยกลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ทุกชนิดสามารถเมแทบอลิซึมได้ แต่กลูโคสอาจไม่ได้เป็นน้ำตาลที่เกิดเมแทบอลิซึมได้มีประสิทธิภาพที่สุดในยีสต์ทุกชนิด สารประกอบอินทรีย์อื่นที่ศึกษากันมากในแง่ที่ใช้เป็นแหล่ง

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

คาร์บอนสำหรับการเจริญของยีสต์คือ ไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) และเมทานอล สำหรับไฮโดรคาร์บอนนั้น n-alkane เป็นไฮโดรคาร์บอนที่ยีสต์หลายสกุลใช้ได้ เช่น *Debaryomyces* spp., *Lodderomyces* spp., *Metschnikowia* spp., *Pichia* spp. และถึงแม้ว่ายีสต์เป็นจุลินทรีย์แบบคีโมออร์แกโนโทรป (chemoorganotroph) แต่มีเพียงยีสต์บางชนิด (ประมาณ 5 % ของยีสต์ทั้งหมด) ที่สามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน

2. **ไนโตรเจน** ยีสต์มีไนโตรเจนภายในเซลล์ประมาณ 10 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่มีปริมาณมากรองลงมาจากคาร์บอน สารหลายชนิดสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยแหล่งไนโตรเจนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและใช้ได้ง่าย เช่น แอมโมเนียมไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต มักใช้ในอุตสาหกรรมการหมักโดยยีสต์ โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟตมักใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงยีสต์ เพราะนอกจากให้ไนโตรเจนแล้วยังให้ซัลเฟอร์ด้วย ยีสต์บางชนิดใช้ไนเตรต เช่น *Citeromyces* และบางสายพันธุ์ของ *Pichia* และ *Candida* ในขณะที่บางชนิดไม่ใช้ไนเตรต เช่น *Derbaryomyces, Kluyveromyces, Saccharomyces* และบางสายพันธุ์ของ *Pichia* และ *Candida* ยีสต์ที่ใช้ไนเตรตได้อาจใช้ไนไตรต์ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นที่เป็นพิษกับยีสต์ได้ นอกจากอนินทรีย์ไนโตรเจนแล้ว อินทรีย์ไนโตรเจนหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ พิวรีน และเอมีน (amine) ส่วนใหญ่สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของยีสต์ได้

ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดี แต่เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นจำเป็นต้องมีการเติมไบโอตินลงในอาหารด้วย นอกจากนั้นการใช้ยูเรียของยีสต์ลดลงเมื่อมีแหล่งไนโตรเจนอื่นที่ยีสต์ใช้ได้ดีกว่าเนื่องจากการกดดันของไนโตรเจน (nitrogen suppression)

ในอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม ถ้ามีแหล่งไนโตรเจนมากกว่า 1 ชนิดอย่างที่ปรากฏเสมอๆ ไนโตรเจนเหล่านั้นจะถูกใช้ในอัตราที่ต่างกัน ยีสต์จะเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดก่อนเป็นอันดับแรก ซึ่งเข้าใจว่าเกิดโดยการกดดันและการแบ่งส่วนของเมแทบอไลต์ (metabolite compartmentation) ดังนั้นการที่มีแหล่งไนโตรเจนที่ดี เช่น กลูทาเมต ในอาหาร เป็นผลให้มีการกำจัดแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ดี (เช่น โพรลีน) จากเซลล์ โดยมีผู้เสนอว่าการที่จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดี สารประกอบนั้น จะต้องนำเข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็ว เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ด้วยขั้นตอนที่น้อยที่สุด และต้องไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นพิษ [61,62,63]

3. **ไฮโดรเจน** (H ion) หรือโปรตอน (proton) สำคัญมากในสรีรวิทยาของยีสต์ โดยพีเอชทั้งภายนอกและภายในเซลล์มีอิทธิพลมากต่อการเจริญ และ เมแทบอลิซึมของยีสต์ มีรายงานว่าพีเอชที่เหมาะสม (optimal pH) สำหรับการเจริญและการหมักกลูโคสคือพีเอชที่ให้

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ไฮโดรเจนไอออนเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (พีเอช 6) และ10 ไมโครโมลาร์ (พีเอช 5) ยีสต์ปกติเจริญดีมากเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 4-6 แต่ยีสต์บางชนิดสามารถเจริญในช่วงพีเอชที่กว้างกว่า คือพีเอช 2-8 และยีสต์ส่วนใหญ่เจริญไม่ดีในพีเอชที่เป็นด่าง ในขณะที่บางชนิดสามารถปรับตัวให้เจริญในสภาพที่เป็นด่างเล็กน้อย เช่น ยีสต์ที่พบในน้ำทะเลสามารถปรับตัวให้เจริญในน้ำทะเลที่เป็นด่างเล็กน้อย การเจริญอย่างว่องไวของยีสต์ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นกรด ซึ่งเป็นผลรวมจากการนำเข้าของไอออนต่างชนิดกัน การปลดปล่อยโปรตอนระหว่างการขนส่งสารอาหาร การปลดปล่อยกรดอินทรีย์และการเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ การผลิตเอทานอลมีผลจากการเปลี่ยนพีเอชของอาหารมากเช่นกัน พีเอชภายในเซลล์ที่กำลังเจริญมีการควบคุมภายในช่วงแคบๆ โดยการทำงานของ ATPase ในโปรตอนปั๊ม (proton pump) ที่พลาสมาเมมเบรนมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการควบคุมการนำเข้าของสารอาหารและ เมแทบอลิซึม การผันแปรของพีเอชภายนอกเซลล์มีผลต่อพีเอชในไซโทพลาสซึม [63,64]

4. **ออกซิเจน** ออกซิเจนมีหน้าที่หลักเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในห่วงโซ่อิเล็กตรอน (electron transport chain, ETC) นอกจากนั้นยังทำหน้าที่เป็น growth factor โดยยีสต์ต้องการออกซิเจนสำหรับการเกิดไฮดรอกซีเลชั่น (hydroxylation) เพื่อรักษาการเจริญ เช่น ใช้ในการสังเคราะห์สเตอรอล และกรดไขมันไม่อิ่มตัว ยีสต์บางชนิดต้องการโมเลกุลออกซิเจนสำหรับเอนไซม์ออกซิเดสชนิดที่มีหน้าที่หลายอย่าง (mixed function oxidase) ที่ช่วยในการทำให้เกิดการปิดวง (cyclization) ของสควอลีน 2,3-epoxide เพื่อสร้างลาโนสเตอรอล (lanosterol) และสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว ดังนั้นออกซิเจนจึงจัดเป็น growth factor ที่สำคัญของยีสต์

5. **ซัลเฟอร์** ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในเซลล์ 0.3 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดย 60 % ของซัลเฟอร์อยู่ในกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีน อีก 5 % เป็นอนินทรีย์ซัลเฟตอิสระ ส่วนที่เหลืออยู่ในรูปของซัลเฟตที่เกาะกัน หรือกรดอะมิโนอิสระ นอกจากนั้นยังพบอยู่ในวิตามินบางชนิด เช่น ไบโอติน และสารที่มีซัลเฟอร์อื่นๆ ยีสต์ต้องการซัลเฟอร์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในอันดับแรก

แหล่งของซัลเฟอร์ได้จากสารประกอบซัลเฟอร์หลายชนิดรวมทั้งซัลเฟต (sulfate) ซัลไฟต์ (sulfite) ไทโอซัลเฟต (thaiosulfate) อนินทรีย์ซัลเฟอร์อยู่ในรูปของซัลเฟตไอออน โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟตหรือโพแทสเซียมซัลเฟตเป็นแหล่งซัลเฟอร์ที่นิยมใช้ในอาหาร โดยยีสต์ทุกชนิดสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์จากซัลเฟตได้ การนำเข้าซัลเฟตที่ว่องไวสัมพันธ์กับการมีเอนไซม์โฮโมซีสทีอีนซินเทส (homocysteine synthase) ซึ่งทำให้ซัลเฟตถูกนำเข้าไปเพื่อสร้างซีสเทอีน โดยซัลเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็นซัลไฟต์ทันทีแล้วจึงถูกเมแทบอไลซ์ต่อไป นอกจากนี้

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

เมไทโอนีนเป็นกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เพียงชนิดเดียวที่ใช้เป็นแหล่งซัลเฟอร์ได้โดยเมไทโอนีนมีผลให้ยีสต์มีการเจริญดีกว่าซัลเฟต [62, 63]

6. **ฟอสฟอรัส** ฟอสฟอรัสถูกแอสซิมิเลต (assimilate)ในรูปของไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน หรือออร์โทฟอสเฟตไอออน (orthophosphate ion, H_2PO_4) เท่านั้น บทบาทหลักของฟอสฟอรัส คือ เป็นองค์ประกอบของน้ำตาลฟอสเฟต (sugar phosphate) ตลอดจนกรดนิวคลีอิก และนิวคลีโอไซด์ไดฟอสเฟต หรือนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต และพบในอนินทรีย์ฟอสเฟตในรูปของพอลิเมอร์สายตรง คือ พอลิฟอสเฟต มีความสำคัญในการควบคุมเมแทบอลิซึมของเซลล์ ให้ฟอสเฟตสะสม และให้พลังงาน ฟอสฟอรัสทำให้มีประจุลบในไซโทพลาสซึมของยีสต์ จากการที่มีอนินทรีย์ฟอสเฟตและกลุ่มฟอสเฟตในสารอินทรีย์ ฟอสเฟตในเซลล์ยีสต์มีอยู่ประมาณ 3-5 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปออร์โทฟอสเฟต (Orthophosphate)

ในอาหารเลี้ยงยีสต์แหล่งฟอสฟอรัสที่สำคัญคือ ออร์โทฟอสเฟต และอนินทรีย์ฟอสเฟต โดยออร์โทฟอสเฟตทำหน้าที่เป็นซับสเตรตและหน่วยปฏิบัติงานของเอนไซม์หลายชนิด ระดับของฟอสเฟตภายในไซโทพลาสซึมของยีสต์ต่ำมากคือประมาณ 0.2 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ระดับของฟอสเฟตจะแปรผันตามกลไกแคแทบอลิซึม (catabolism) ของน้ำตาล ยีสต์สามารถสะสมฟอสเฟตในออร์แกเนล เช่น อาจพบฟอสเฟตในแวคิวโอลมากกว่าในไซโทพลาสซึมถึง 110 เท่า สำหรับอนินทรีย์ฟอสเฟตนั้นทั้งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต สามารถใช้เป็นแหล่งฟอสเฟต และเนื่องจากโพแทสเซียมไอออนสามารถเหนี่ยวนำการนำเข้าฟอสเฟตโดยถูกขนส่งรวมกับฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์ มีผลให้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสเฟตที่ดีว่าแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในที่ขาดแหล่งฟอสเฟตชนิดอื่น และลักษณะของเมแทบอลิซึมของฟอสเฟตอีกอย่างหนึ่งของยีสต์ภายใต้สภาวะที่มีฟอสฟอรัสจำกัด คือ เซลล์จะขับเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ไม่จำเพาะ (non-specific phosphoesterase) และแอซิดฟอสฟาเทส (acid-phosphatase) ไปที่ผิวเซลล์ทำให้เซลล์ได้ฟอสฟอรัสจากฟอสเฟตเอสเทอร์ (phosphate ester) [62, 63]

7. **เกลือแร่** ยีสต์ต้องการเกลือแร่ (mineral elements) เหมือนกับจุลินทรีย์อื่น เกลือแร่ที่ยีสต์ต้องการประกอบด้วยโพแทสเซียม แมกนีเซียม และธาตุที่ต้องการในปริมาณต่ำหลายชนิด สำหรับ โพแทสเซียมและแมกนีเซียมเป็นธาตุอาหาร macroelement ที่ยีสต์ต้องการที่ความเข้มข้นเป็นมิลลิโมลาร์เพื่อทำให้เกิดสภาวะที่มีประจุบวกภายในเซลล์ยีสต์

ปกติยีสต์มีโพแทสเซียมประมาณ 1-2.2 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยปริมาณโพแทสเซียมในเซลล์ผันแปรตามสภาวะของการเจริญ ยีสต์ทุกชนิดต้องการโพแทสเซียมสำหรับการเจริญ โดยโพแทสเซียมทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์สำหรับเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวกับปฏิกิริยา

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ออกซิเดทีฟ ฟอสโฟรีเลชัน (oxidative phosphorylation) การสังเคราะห์โปรตีน และเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต เช่น ไพรูเวตไคเนส (pyruvate kinase) อัลโดเลส (aldolase) อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) และเอทีพีเอส (ATPase) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนั้นยังร่วมในการนำสารอาหารอื่นเข้าเซลล์ เช่น ฟอสเฟต เป็นตัวควบคุมการนำเข้าไอออนที่มีประจุบวกสอง (divalent cation) โดยเมื่อมีการนำเข้าไอออนที่มีประจุบวกสอง ก็จะมีการขับโพแทสเซียมไอออนสองตัว จึงเป็นตัวที่ทำให้ประจุสมดุล ทำให้โมเลกุลใหญ่และไรโบโซมคงตัว ที่พีเอชต่ำโพแทสเซียมกระตุ้นการหมักและการหายใจ เนื่องจากทำให้ระดับของ NADP, ADP และอนินทรีย์ฟอสเฟตในเซลล์เพิ่มขึ้น สารที่ใช้เป็นแหล่งโพแทสเซียม เช่น โพแทสเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

สำหรับแมกนีเซียม เป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของยีสต์เช่นกัน และมีอยู่ในเซลล์ประมาณ 0.3 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำหน้าที่เกี่ยวกับโครงสร้างและเมแทบอลิซึม เช่น การทำงานของเอนไซม์เกี่ยวกับการเคลื่อนย้ายฟอสเฟต (transphosphorylation) ต้องอาศัยแมกนีเซียมไอออน

เกลือแร่อื่นๆที่ยีสต์ต้องการปริมาณต่ำมากในระดับไมโครโมลาร์หรือนาโนโมลาร์ ประกอบด้วยแมงกานีส แคลเซียม เหล็ก สังกะสี ทองแดง นิเกิล โคบอลท์ และโมลิบดีนัม ในขณะที่เกลือแร่อื่น คือ เงิน แบเรียม แคดเมียม ปรอท ลิเทียม และตะกั่ว เป็นสารพิษ เพราะถ้าความเข้มข้นสูงกว่า 100 ไมโครโมลาร์จะมีผลเสียต่อการเจริญ [62,63]

8. Growth factor เป็นสารอินทรีย์ซึ่งยีสต์ต้องการที่ความเข้มข้นต่ำมาก มีบทบาทในการเร่งหรือเป็นส่วนในโครงสร้าง สารที่เป็น growth factor สำหรับยีสต์ คือ วิตามิน พิวรีน ไพริมิดีน นิวคลีโอไทด์ นิวคลีโอไซด์ (nucleoside) กรดอะมิโน กรดไขมัน และอื่นๆ เช่น พอลิเอมีน (polyamine) โคลีน และมีโซอินอซิทอล (meso-inositol) การที่ยีสต์ต้องการ growth factor หมายความว่า ยีสต์นั้นไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง ในบางครั้งความต้องการอาจไม่ใช้ความต้องการที่แท้จริง แต่เมื่อเติม growth factor ลงไปยีสต์จะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้น สำหรับ growth factor แบบนี้เรียกว่า relative growth factor

ยีสต์มักต้องการวิตามินที่ระดับความเข้มข้นไมโครโมล เช่น ไบโอตินซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยาที่เร่งโดยคาร์บอกซีเลส (carboxylase) กรดแพนโททีนิกซึ่งรูปที่ทำหน้าที่คือโคเอนไซม์เอ (coenzyme A) ที่ร่วมในปฏิกิริยารีดอกซ์ และไทเอมีน (thiamine) หรือวิตามินบี 1 ในรูปของ ไทเอมีนไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate) ซึ่งร่วมในปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชั่น (decarboxylation) [63]

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

อิทธิพลของสภาวะแวดล้อมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ [65]

1. **อุณหภูมิ** ปกติจุลินทรีย์จะเจริญเร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ การเลี้ยงยีสต์ส่วนใหญ่มักบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส โดยการเจริญจะลดลงมากที่ 20 องศาเซลเซียส และไม่เจริญที่ 60-70 องศาเซลเซียส

2. **พีเอช** พีเอชมีผลต่อกิจกรรมทางชีววิทยาของเซลล์น้อยกว่าอุณหภูมิ เพราะว่าเซลล์สามารถควบคุมความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนภายในเซลล์ได้อย่างดีเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชภายนอกเซลล์ พีเอชของอาหารภายนอกอาจมีผลต่อโครงสร้างและสภาพให้ซึมผ่านได้ของเซลล์ (cell permeability) พีเอชมีบทบาทช่วลดการปะปนของจุลินทรีย์อื่นในระหว่างการหมัก โดยปกติอาหารที่ใช้สำหรับการเจริญของยีสต์มีพีเอชอยู่ในช่วง 4-5

3. **ออกซิเจนละลาย** ออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้ายในลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน และทำหน้าที่เป็น growth factor ของยีสต์ โดยร่วมในการสังเคราะห์กรดไขมันโอเลอิก (oleic acid) เออร์กอสเตอรอล และกรดนิโคตินิก ซึ่งส่งเสริมการเจริญของยีสต์ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

2.11 แหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์

โปรตีนเซลล์เดี่ยวสามารถผลิตจากแหล่งวัตถุดิบหลายชนิดทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยในการผลิตหลายประการ เช่น ปริมาณของวัตถุดิบ ราคา ชนิดของยีสต์ที่ใช้ กระบวนการปรับสภาพของวัตถุดิบ ลักษณะของกระบวนการผลิต และวิธีเก็บเกี่ยวผลผลิต เป็นต้น ทั้งนี้ปริมาณผลผลิตโดยรวมจำเป็นต้องคุ้มค่าในเชิงเศรษฐศาสตร์ [56] ตัวอย่างของแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ ดังนี้

1. **กากน้ำตาล** (Molasses) [66,67]

กากน้ำตาลเป็นผลผลิตพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทราย มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบประมาณ 50-60 % ยีสต์ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวได้แก่ *Candida utilis*, *C. tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula* spp. ในการใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว จำเป็นต้องทำการเจือจางก่อนใช้เพาะเลี้ยงและหลังเก็บเกี่ยวต้องทำการล้างน้ำตาลออกให้หมดก่อน เพื่อกำจัดสีและกลิ่นของน้ำตาลออก

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

2. **น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตกระดาษ** (Sulfite waste liquor) [68]

ในองค์ประกอบของน้ำทิ้งจะมีน้ำตาลมากกว่า 3% โดยเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอนห้าและหกอะตอม ดังนั้นยีสต์ที่ใช้ในการผลิตคือ *Candida utilis* แต่มีปัญหาในการผลิตคือ ต้องทำการปรับสภาพของวัตถุดิบก่อน และหลักการเก็บเกี่ยวต้องทำการล้างกรด lignosulfonic ออกก่อน

3. **หางนม** (Whey) [69, 70]

ได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็ง ซึ่งมีน้ำตาลแลคโทสเป็นองค์ประกอบประมาณ 5% โดยยีสต์กลุ่มนี้จะมีเอนไซม์ β-galactosidase สำหรับย่อยแลคโทส ซึ่งยีสต์ที่ใช้ในการผลิตคือ *Kluyveromyces fragilis, K. marxianus, K. lactis* และ *Sacharomyces cerevisiae*

4. **น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตรและอาหาร** (Agro and food -industry waste water) [8, 71]

น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร เช่น น้ำทิ้งจากโรงงานผลไม้กระป๋อง น้ำทิ้งจากโรงงานสุรา ซึ่งมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว โดยนอกจากจะได้เซลล์เป็นผลิตภัณฑ์แล้ว ยังช่วยลดค่าใช้จ่ายการบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากจะช่วยลดค่า BOD และ COD ในน้ำทิ้งอีกด้วย เชื้อยีสต์ที่นิยมใช้ในการผลิตคือ *Candida utilis, Yarrowia lipolytica*

5. **วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร** (Agricultural waste) [72]

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ผักตบชวา ชานอ้อย ซังข้าวโพด ผักเน่าเสียต่างๆ เป็นต้น วัสดุเหล่านี้มีเซลลูโลส และลิกนินเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นก่อนการผลิตจำเป็นต้องมีการปรับสภาพของวัตถุดิบก่อน ซึ่งอาจใช้ *Trichoderma viride* ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเพื่อให้ได้น้ำตาลห้าและหกอะตอมก่อนการใช้ ยีสต์ที่สามารถใช้วัสดุเหลือทิ้งจากที่กล่าวมา เช่น เช่น *Candida utilis, Pichia stipitis, Kluyveromyces marxianus*

6. **สารประกอบแป้ง** (Starch material) [73]

ส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบที่เป็นผลผลิตทางการเกษตร เช่น แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด ข้าวโอ๊ต มันสำปะหลัง เป็นต้น ซึ่งมีแป้งที่เป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ โดยยีสต์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวเป็นยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส เช่น *Candida utilis, Saccharomycopsis fibuligera, Saccharomyces cerevisiae* หรือใช้การเพาะเลี้ยงยีสต์เหล่านี้ร่วมกับยีสต์ชนิดอื่น เช่น *S. cerevisiae* ซึ่งจะได้แอลกอฮอล์เป็นผลพลอยได้ เรียกกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบนี้ว่า Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

7. **สารประกอบไฮโดรคาร์บอนและสารจากอุตสาหกรรมผลิตไบโอดีเซล** (Hydrocarbon compounds and waste from biodiesel production) [56]

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ได้จากอุตสาหกรรมการกลั่นน้ำมันดิบ ได้แก่ อัลเคน อัลคีน พาราฟิน เมทานอล เอทานอล และ gas oil ซึ่งการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในการเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดี่ยวนั้นมีมาตั้งแต่ปี ค.ศ.1950 โดยส่วนใหญ่ยีสต์ที่สามารถใช้สารกลุ่มนี้จะเป็นยีสต์ในจีนัส *Candida* spp. เช่น *Candida lipolytica*, *C. paraffinia*, *C. maltosa* รวมถึงจีนัสอื่น เช่น *Saccharomyces* spp., *Torulopsis* spp., *Hansenula* spp. เป็นต้น ดังแสดงตัวอย่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและสารจากอุตสาหกรรมไบโอดีเซลที่ยีสต์สามารถใช้เพื่อการเจริญ ในตารางที่ 2.6 นอกจากนี้ยังมีสารซึ่งเป็นผลิตพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ที่เรียกว่า กลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) และองค์ประกอบหลักๆเป็นกลีเซอรอลและมีเมทานอลปนอยู่ โดยปัจจุบันกลีเซอรอลดิบนั้น กลายเป็นปัญหาหนึ่งของผู้ผลิตไบโอดีเซลที่ต้องจัดการกับผลผลิตพลอยได้นี้ และจากงานวิจัยที่ผ่านมาแม้จะยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์โดยใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนโดยตรง แต่ก็มีรายงานถึงการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์โดยใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ เช่น

Hellmuth และคณะ [48] ได้รายงานถึงการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงแบบ fed-batch ในถังหมักขนาด 15 ลิตร ที่มีอาหาร Minimal medium ปริมาตร 5 ลิตร ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลในอาหารเป็น 1 % อุณหภูมิในการเลี้ยง 30 องศาเซลเซียส พีเอชของอาหารเป็น 4.6 และอัตราการให้อากาศเป็น 5 ลิตรต่อชั่วโมง ในช่วงเริ่มต้นของการหมักจนถึง 18 ชั่วโมง ให้ปริมาณกลีเซอรอลในอาหารด้วยอัตรา 25 กรัมต่อชั่วโมง จากนั้นเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลด้วยอัตรา 50 กรัมต่อลิตร จนถึง 168 ชั่วโมง หลังจากสิ้นสุดการเลี้ยงพบว่า ให้ความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 120 กรัมต่อลิตร เมื่อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง และ d' Anjou และคณะ [75] ได้ศึกษาการเจริญของยีสต์ *Pichia pastoris* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงแบบ Fed-batch ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่มีอาหาร Minimal medium ปริมาตร6 ลิตร ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลในอาหารเป็น 50 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของอาหารเป็น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และหลังจาก 12 ชั่วโมง ทำการเติมเมทานอลเข้าสู่ถังหมัก โดยรักษาระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1-2 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงต่อจนถึง 60 ชั่วโมง พบว่า ให้ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) 0.51 กรัมของเซลล์ต่อกรัมของสับเตรททั้งหมด

ส่วนงานวิจัยการเจริญของยีสต์ในเมทานอล เช่น Wegner และ Okla [16] ได้รายงานถึงการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y- 11432 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ในอาหาร mineral salt medium ที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและทำการเสริมด้วยไบโอติน อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญของเซลล์เป็น 38 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าพีเอชในช่วง

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3.7-4.1 และมีค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก 20 % โดยปริมาตร พบว่าให้ความหนาแน่นของเซลล์ในน้ำหมัก 73.3 กรัมต่อลิตร เมื่อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง และให้อัตราการเจริญของเซลล์เป็น 0.31 กรัมของเซลล์ต่อกรัมเมทานอล

ตารางที่ 2.6 ยีสต์ที่สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนและสารจากอุตสาหกรรมผลิตไบโอดีเซล

Hydrocarbon compounds	Organism(s) used	Ref.
n-alkane	*Candida* spp.	สาวิตรี ลิ่มทอง[56]
	Hansenula spp.	
	Pichia spp.	
	Rhodotorula spp.	
	Sachharomyces spp.	
	Torulopsis spp.	
alkene	*Candida* spp.	สาวิตรี ลิ่มทอง[56]
	Debaryomyces spp.	
	Hansenula spp.	
	Rhodotorula spp.	
paraffin	*Candida* spp.	สาวิตรี ลิ่มทอง[56]
methanol	*Hansenula* spp.	Ridgway และ
	Pichia spp.	คณะ[74]
	Candida spp.	
gas oil	*Candida* spp.	Hellmuth และ
glycerol	*Hansenula* spp.	คณะ[48]; สาวิตรี
	Pichia spp.	ลิ่มทอง[56]

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

2.12 **ยีสต์** *Hansenula polymorpha*

อนุกรมวิธานของ *Hansenula polymorpha*

Phylum	:	Ascomycota
Class	:	Hemiascomycetes
Family	:	Saccharomycetaceae
Genus	:	Pichia

รูปที่ 2.10 ลักษณะเซลล์ของยีสต์ในจีนัส *Pichia* ที่เลี้ยงในกลูโคส [76]

H. polymorpha ปัจจุบันจัดจำแนกใหม่เป็น *Pichia angusta* ลักษณะเซลล์กลมรี (oval shape) ดังแสดงในรูปที่ 10 เป็นยีสต์ที่เจริญในอุณหภูมิสูง 37 – 40 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้สูงถึง 49 องศาเซลเซียส (Thermotolerant yeast) [77, 78] สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญได้ (Methylotrophic yeast) ดังแสดงในตารางที่ 8 และยังมีรายงานเกี่ยวกับศักยภาพในการเจริญของยีสต์ชนิดนี้ว่า “สามารถเลี้ยงให้มีความหนาแน่นสูงในน้ำหมัก” หรือเรียกว่า “High cell density” ซึ่งปัจจุบันได้มีการนำยีสต์ชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีการศึกษากันอย่างแพร่หลายถึงกลไก และวิถีการทำงานของเซลล์ เช่นชีววิถีในเพอร์ออกซิโซม (Peroxisome biogenesis) เมทาบอลิซึมของเมทานอล (Methanol metabolism) เมแทบอลิซึมของกรดไขมัน (Fatty acid metabolism) รวมถึงการศึกษาการผลิตสารชีวภาพต่างๆ [79] นอกจากนี้การนำยีสต์ *H. polymorpha* มาใช้ประโยชน์ในงานทางด้านพันธุวิศวกรรมก็ได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากดีเอ็นเอจากแหล่งอื่นสามารถรวมเข้าไปในโครโมโซมได้หลายชุดและคงตัว โปรตีนที่สร้างได้ไม่มีไกลคอซีเลตมากเกินไป (hyper-glycosylate) สามารถหลั่งโปรตีนและสะสมโปรตีนที่อาจเป็นอันตรายจากเอนไซม์ย่อยโปรตีนภายในเพอร์ออกซิโซม (peroxisome) [56] ดังแสดงตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตโปรตีนจากแหล่งอื่นในยีสต์ *H. polymorpha* ในตารางที่ 2.7

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 2.7 การผลิตโปรตีนจากแหล่งอื่นในยีสต์ *Hansenula polymorpha*

Host/Source of gene (s)	Mode*	References
Host: *Hansenula polymorpha*		
Source of genes: bacteria		
β-Lactamase (E. coli)	I	Janowicz และคณะ, 1998
β - Lactamase (E. coli)	I	Brito และคณะ, 1999
Source of genes: fungi		
Glucoamylase (Schwanniomyces)	S	Gellissen และคณะ, 1991
Invertase (Saccharomyces)	S	Narciandi และคณะ, 1995
Catalase T (Saccharomyces)	I	Gellissen และคณะ, 1996
Glucose oxidase (Aspergillus)	S	Hodgkins และคณะ, 1993
Phytase (Aspergillus)	S	Mayer และคณะ, 1999
Source of genes: plants		
Glucose oxidase (spinach)	I	Gellissen และคณะ, 1996
Seed storage protein	I	Buckholz และ Gellissen, 1991
Malate dehydrogenase (water melon)	I	Faber และคณะ, 1994
Phytochrome (oat)	I	Mozley และคณะ, 1999
Source of genes: animals		
Hirudin (Hirudo)	S	Weydemann และคณะ, 1995
Aprotinin (bovine)	S	Zurek และคณะ, 1996
HbsAg (M)	S	Shen และคณะ, 1989
HbsAg (S, S/L)	I	Janowicz และคณะ, 1991
Hemoglobin	I	Gilbert และคณะ, 1994
h-Lipase	S	Buckholz และ Gellissen , 1991
h-Thyroid peroxidase	S	Wedlock และคณะ, (1993)
h-Urokinase	S	Agaphonov และคณะ, 1995
α_1- Antitrypsin	S	Kang และคณะ, 1998

* I = Intracellular; S = Secretion

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ที่มา: ดัดแปลงจาก Gellissen [79]

ตารางที่ 2.8 เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่มีรายงานในปัจจุบัน [80,81]

Genus	Species
Candida	*C. boidinii, C. cellulolytica, C. maris, C. methanosorbosa, C. nanaspora, C. nemodentra, C. nitratophila, C. ovalis, C. pignaliae, C. pini, C. sonorensis and C. succiphila*
Pichia	*P. angusta, P. capsulate, P. ciferrii, P. finlandica, P. glucozyma, P. henricii, P. kodama, P. methanolica, P. methylivora, P. minuta, P. naganishii, P. ofunaensis, P. pastoris, P. philodendra, P. pini and P. trehalophila*

นอกจากคุณสมบัติที่โดดเด่นในเรื่องทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี และสามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ ยีสต์ *H. polymorpha* ยังสามารถสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว รวมถึงการใช้สับสเตรทอื่นเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลีเซอรอล (ดังแสดงในตารางที่ 2.6) ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

2.13 **เมแทบอลิซึมของเมทานอลในเมทิลโลโทรฟิกยีสต์** [77,82,83,84,85,86]

การเจริญโดยใช้เมทานอลมีความสัมพันธ์กับการสร้างเพอร์ออกซิโซม ซึ่งเป็นออร์กาเนลภายในเซลล์ โดยทำหน้าที่จัดเก็บเอนไซม์ที่จำเป็นต่อเมแทบอลิซึมของเมทานอล

การเปลี่ยนแปลงเมทานอลในเมทิลโลโทรฟิกส์ยีสต์มี 2 กระบวนการที่สำคัญ คือ

1. ดิสสิมิเลชั่น (Dissimilation) เป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเมทานอลเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อผลิต NADH สำหรับสร้างพลังงานในรูป ATP โดยผ่านสารตัวกลางคือฟอร์มาลดีไฮด์และฟอร์เมท โดยมีลำดับขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงดังนี้

1.1 ออกซิเดชั่นของเมทานอล (CH_3OH)เป็นฟอร์มาลดีไฮด์ (HCHO) โดยการเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนนี้เกิดขึ้นในเพอร์ออกซิโซม

$$CH_3OH + O_2 \longrightarrow HCHO + H_2O_2$$

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

1.2 ออกซิเดชั่นของฟอร์มาลดีไฮด์เป็นฟอร์เมท ($HOCH_2$) ซึ่งฟอร์มาลดีไฮด์จัดเป็นสารตัวกลางในเมแทบอลิซึมของเมทานอล โดยจะรวมตัวกับ glutathione ในรูปรีดิวซ์ (GSH) ได้เป็น S-hydroxymethylglutathione ($HOCH_3$-SG) ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่ไม่ใช้เอนไซม์เร่ง และเกิดขึ้นในเพอร์ออกซิโซม

$$HCHO + GSH \longrightarrow HOCH_2\text{-}S\text{-}G$$

ต่อมา S-hydroxymethylglutathione ถูกส่งไปยังไซโทพลาสซึมด้วยกลไกลการขนส่งแบบจำเพาะ จากนั้น S-hydroxymethylglutathione เปลี่ยนเป็น S-formylglutathione (HCO-S-G) และ $NADH + H^+$ โดยมีเอนไซม์ glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase เร่งปฏิกิริยา และมี NAD^+ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน

$$HOCH_2\text{-}S\text{-}G + NAD^+ \longrightarrow HCO\text{-}S\text{-}G + NADH + H^+$$

จากนั้น S-formylglutathione เปลี่ยนเป็นฟอร์เมท (HCOOH) และ GSH โดยมีเอนไซม์ S-formylglutathione hydrolase เร่งปฏิกิริยา

1.3 ออกซิเดชั่นของฟอร์เมทเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

ฟอร์เมทเปลี่ยนเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และ $NADH + H^+$ โดยเอนไซม์ formate dehydrogenase เร่งปฏิกิริยา และมี NAD^+ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน

$$HCOOH + NAD^+ \longrightarrow CO_2 + NADH + H^+$$

วิถีดิสสิมิเลชั่นนี้จะให้พลังงานแก่เซลล์ในรูปของ NADH 2 โมเลกุล ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของฟอร์มาลดีไฮด์และฟอร์เมท อย่างละ 1 โมเลกุล และ NADH ที่ได้ใช้สำหรับสร้างพลังงานในรูป ATP ต่อไป

2. แอสสิมิเลชั่น (Assimilation) เป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับการตรึงสารประกอบคาร์บอน 1 อะตอม รวมเข้ากับน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม เกิดเป็นสารประกอบคาร์บอน 3 อะตอมสองโมเลกุล ได้แก่ dihydroxyacetone และ glyceroldehyde-3-phosphate เนื่องจากเมทานอลเป็นสารประกอบคาร์บอน 1 อะตอมจึงไม่มีพันธะระหว่างคาร์บอนกับคาร์บอน เซลล์ที่เจริญจากเมทานอลจึงต้อง

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

สร้างพันธะนี้ขึ้นมา เพื่อสังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ โดยมีลำดับขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงดังนี้

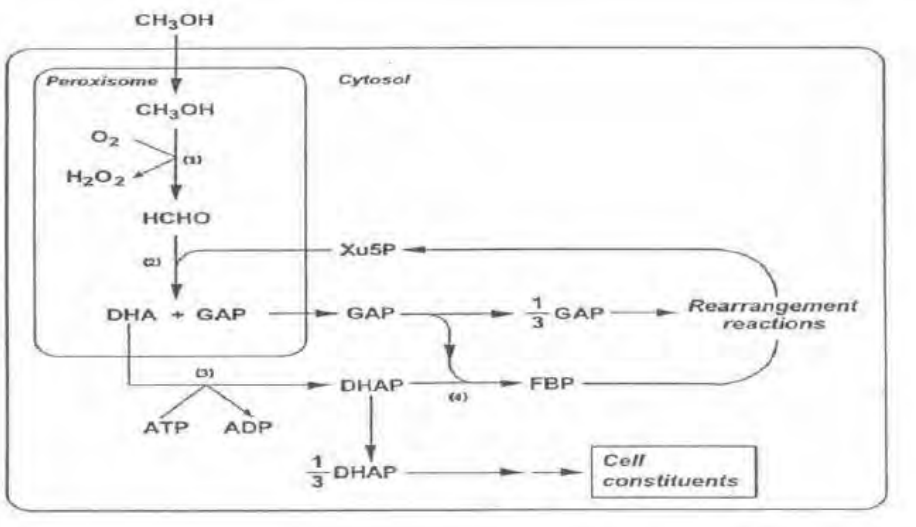
ฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของเมทานอล รวมตัวเข้ากับ xylulose-5-phosphate (Xu5P) เป็น dihydroxyacetone (DHA) และ glyceroldehyde-3-phosphate (GAP) โดยมีเอนไซม์ dihydroxyacetone synthase เร่งปฏิกิริยา และปฏิกิริยานี้เกิดในเพอร์ออกซิโซม

$$C_5H_{11}O_8P + H_2CO \longrightarrow C_3H_7O_6P + C_3H_6O_3$$

จากนั้น GAP และ DHA จะผ่านเยื่อหุ้มเพอร์ออกซิโซมออกสู่ไซโทพลาสซึม ต่อมา DHA เปลี่ยนเป็น dihydroxyacetone phosphate (DHAP, $C_3H_7O_6P$) โดยมีเอนไซม์ dihydroxyacetone kinase เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) และ ATP เป็นตัวให้หมู่ฟอสเฟต

$$C_3H_6O_3 + ATP \longrightarrow C_3H_7O_6P$$

จากนั้น DHAP จะเข้ารวมกับ GAP เป็น fructose 1,6-bisphosphate (FBP) โดยมีเอนไซม์ fructose bisphosphate เร่งปฏิกิริยา ขณะที่ Xu5P เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการจัดเรียงใหม่ในวัฏจักรเพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate cycle) นอกจากนี้พบว่า หนึ่งในสามของโมเลกุลของ DHAP จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กลูโคส (gluconeogenesis) ดังแสดงวิถีแอสสิมิเลชั่นการเปลี่ยนแปลงเมทานอล ในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 วิถีแอสสิมิเลชั่นการเปลี่ยนแปลงเมทานอล โดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ [85]

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

2.14 เมแทบอลิซึมของกลีเซอรอลในเมทิลโลโทรฟิกส์ยีสต์

กลีเซอรอลจัดว่าเป็นสารสำคัญที่ให้พลังงานสำหรับยีสต์หลายชนิด และยังเป็นสารที่สำคัญในการสังเคราะห์ไขมันในเซลล์ด้วย [87,88] นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการควบคุมสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ในเซลล์และวัฏจักรของสารอนินทรีย์จำพวกฟอสเฟต [89,90] และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีนักวิจัยค้นพบว่า กลีเซอรอลเป็นสารเดียวที่สามารถเมแทบอลิซึมและเข้าสู่ gluconeogenesis pathway นอกเหนือจากสารในกลุ่มน้ำตาล [91]

ยีสต์มีการนำกลีเซอรอลเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีแอคทีฟ ทรานส์สปอร์ต (Active transport system) [92] และสามารถแอสสิมิเลชั่นผ่านวิถีหลัก 3 วิถี คือ วิถี Phosphorylative โดยเอนไซม์ Glycerol kinase ส่วนอีก 2 วิถีเป็นวิถี Oxidative โดยเอนไซม์ $NADP^+$-linked glycerol dehydrogenase หรือ $NAD(P^+)$-linked glycerol dehydrogenase [93] สำหรับยีสต์ *H. polymorpha* ซึ่งเป็นยีสต์ในจีนัส *Pichia* นั้นมีการแอสสิมิเลชั่นผ่านวิถี Phosphorylative โดยมีลำดับขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงดังนี้

กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) ที่ผ่านเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีแอคทีฟทรานสปอร์ต จะถูกเปลี่ยนเป็นสาร glycerol-3-phosphate ($C_3H_9O_6P$) โดยเอนไซม์ glycerol kinase เร่งปฏิกิริยา และ ATP ซึ่งขั้นตอนนี้เกิดในส่วนของไซโตซอล (cytosol)

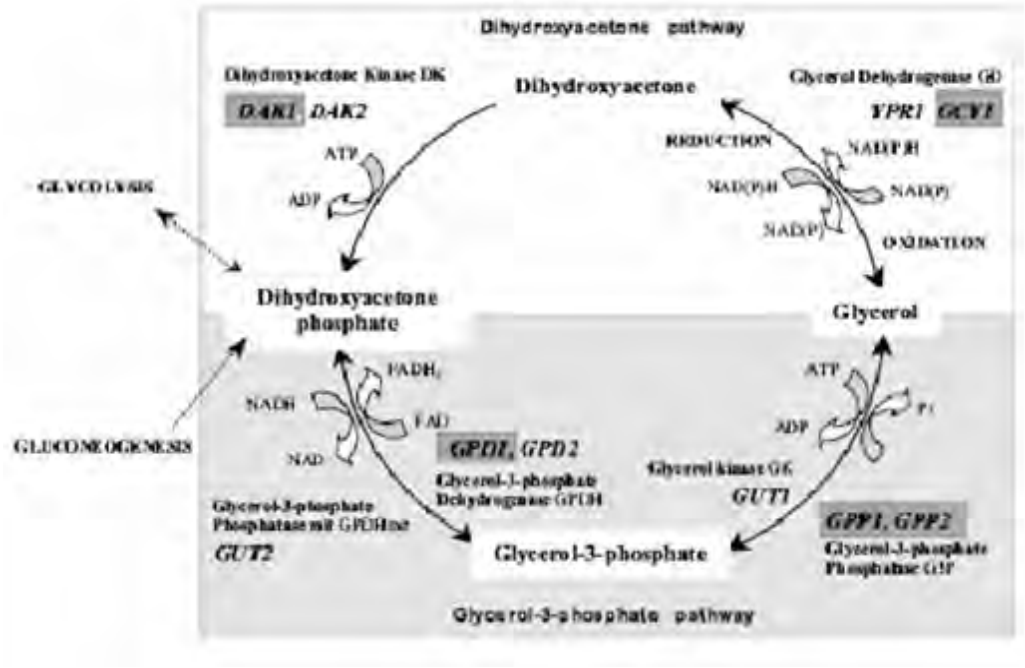
$$C_3H_8O_3 + ATP \longrightarrow C_3H_9O_6P + ADP$$

จากนั้น glycerol-3-phosphate เปลี่ยนเป็น dihydroxyacetone phosphate ($C_3H_7O_6P$) โดยมีเอนไซม์ glycerol-3-phosphate dehydrogenase เร่งปฏิกิริยา โดยขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดในส่วนไมโทคอนเดรีย

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

ซึ่งสาร dihydroxyacetone phosphate ที่ได้จากการแอสสิมิเลชั่นกลีเซอรอล จัดเป็นสารตัวกลาง เหมือนกับการแอสสิมิเลชั่นเมทานอล จากนั้น dihydroxyacetone phosphate จะกลับเข้าสู่ไซโตซอลอีกครั้ง เพื่อเข้าสู่วิถี glycolysis หรือวิถี gluconeogenesis ต่อไป ดังแสดงวิถีแอสสิมิเลชั่นการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอล ในรูปที่ 2.12

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 2.12 วิถีแอสสิมิเลชั่นการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอล โดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์

การนำกลีเซอรอลมาใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ จะค่อนข้างเป็นวิธีที่เหมาะสมและก่อให้เกิดมลพิษน้อยกว่าวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ส่วนใหญ่นั้นก็ยังคงนำกลีเซอรอลที่บริสุทธิ์มาใช้ในกระบวนการหมัก ร่วมกับจุลินทรีย์ เนื่องจากการที่มีเมทานอลและตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดหรือด่างเข้มข้นปะปนอยู่นั้น อาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางกลุ่ม ที่สามารถใช้กลีเซอรอลได้ และจากข้อมูลในตารางที่ 2.8 จะเห็นว่า ยีสต์ *Hansenula polymorpha* นั้นมีความสามารถในการใช้ทั้งเมทานอลและกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบ นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับยีสต์ *H. polymorpha* เป็นยีสต์ที่สามารถทนต่อเกลือซึ่งมักเป็นเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง (salt tolerant yeast) โดยสามารถเจริญในเกลือความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ (10-12 %) [92] และยังสามารถใช้ไขมันหรือน้ำมันเพื่อการเจริญของเซลล์ได้ อันจะเป็นประโยชน์ในการเจริญในอาหารที่มีกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ไปใช้เพื่อผลิตมวลชีวภาพซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญแหล่งหนึ่งในปัจจุบัน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie No.2 ของบริษัท Scientific Industries, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (rotary incubator shaker) รุ่น G-25 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. เครื่องชั่งแบบละเอียด (electronic balance) รุ่น FX-180 ของบริษัท A&D ประเทศญี่ปุ่น
4. เครื่องชั่งแบบหยาบ (electronic balance) รุ่น FX-3000 ของบริษัท A&D ประเทศญี่ปุ่น
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกชนิดควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota Corporation ประเทศญี่ปุ่น
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge) รุ่น TOMY MC-15A ของบริษัท TOMY SEIKO ประเทศญี่ปุ่น
7. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น F-13 ของบริษัท HORIBA ประเทศญี่ปุ่น
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Recording spectrophotometer) รุ่น Model-UV160 ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
9. เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจนรุ่น Buchi 345 Distillation unit และรุ่น Buchi 345 Digestor ของบริษัท Buchi Laboratory Techniques Ltd., ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
10. ตู้อบแห้ง (oven) รุ่น UL-80 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน
11. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น TE-8D ยี่ห้อ Tempette ของบริษัท Techne ประเทศอังกฤษ
12. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน NA2000 และเครื่องบันทึกผล EAGER200 ของบริษัท Fisons Instruments ประเทศอังกฤษ
13. เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ประเทศญี่ปุ่น ที่ประกอบด้วย

Pump (LC-8A)	ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
Detector (RID-6A)	ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Analytical Column (Aminex HPX-87H) ของบริษัท Biorad ประเทศสหรัฐอเมริกา
Controller (SLC-8A) ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

14. เครื่อง GC (Gas Chromatography)

15. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น CHS ของบริษัท Olympus Optical ประเทศญี่ปุ่น

16. เตาอบไมโครเวฟ (Microwave oven) รุ่น NE-767C ของบริษัท Matsushita Electric Industrial ประเทศญี่ปุ่น

17. เตาเผา รุ่น Cabolite CW F1200 ของบริษัท Scientific Promotion ประเทศไทย

18. ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ของบริษัท Sanyo ประเทศญี่ปุ่น

19. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) รุ่น HV-50 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น

20. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) ของบริษัท International Scientific Supply ประเทศไทย

21. ปั๊ม (Pump) รุ่น MPN125 ของบริษัท Thakita Electric Works ประเทศญี่ปุ่น

22. เครื่องกวนควบคุมอุณหภูมิ (hot plate stirrer) รุ่น HS-115 บริษัท หริกุล กรุ๊ป จำกัด ประเทศไทย

3.1.2 **สารเคมี**

สารเคมี	**บริษัท**	**ประเทศ**
Agar (วุ้นผงตรานางเงือก)	พัฒนสินเอนเตอร์ไพรส์	ไทย
Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)	MERCK	Germany
Ammoniumdihydrogenphosphate ($NH_4H_2PO_4$)	MERCK	Germany
Ammonium chloride (NH_4Cl)	FLUKA	Switzerland
Ammonium ferrous sulphate($(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$	MERCK	Germany
Bacto peptone	DIFCO	U.S.A
Boric acid (H_3BO_3)	MERCK	Germany
Biotin	Dr.Ehrenstorfer GmbH	Germany
Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$)	CARLO ERBA	Italy
cis-Methyl Oleate (C18:1 ME)	NuCheck	U.S.A
Chloroform	AJAX LABORATORY CHEMICALS	Australia
Cobalt chloride ($CoCl_2.6H_2O$)	FLUKA	Switzerland
Copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$)	FLUKA	Switzerland

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Diethyl ether	MERCK	Germany
Ethanol	กรมสรรพสามิต	ไทย
Glucose (Dextrose)	สยามชัย เคมิคอล	ไทย
Glycerol	SIGMA	Germany
Heptane	MALLINCKRODT	U.S.A
Hexane	J.T.Baker	U.S.A
Hydrochloric acid (HCl)	MERCK	Germany
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	CARLO ERBA	Italy
Manganese sulfate ($MnSO_4.H_2O$)	MALLINCKRODT	U.S.A
Methanol (CH_3OH)	MALLINCKRODT	U.S.A
Methyl Linoleate (18:2 ME)	NUCHECK	U.S.A
Methyl Palmitate (16:0 ME)	ALDRICH	U.S.A
Methyl Palmitoleate (16:1 ME)	NuCheck	U.S.A
Methyl Sterate (18:0 ME)	ALDRICH	U.S.A
Petroleum ether	J.T. BAKER	U.S.A
Phosphoric acid (H_3PO_4)	CARLO ERBA	Italy
Potassium chloride (KCl)	MERCK	Germany
Potassium hydroxide (KOH)	CARLO ERBA	Italy
Potassium iodide (KI)	J.T. BAKER	U.S.A
Potassium sulfate (KSO_4)	MERCK	Germany
Sodium chloride (NaCl)	CARLO ERBA	Italy
Sodium ethylenediaminetetraacetic acid (Na-EDTA)	MERCK	Germany
Sodium hydroxide (NaOH)	แกรนด์ เคมิคอล	ไทย
Sodium molybdate ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	CARLO ERBA	Italy
Sulfuric acid (H_2SO_4)	MERCK	Germany
Thiamin Hydrochloride	SIGMA	Germany
Urea	MERCK	Germany
Yeast extract	BIO SPRINGER	France
Zinc sulfate ($ZnSO_4.7H_2O$)	MERCK	Germany

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ *Hansenula polymorpha* โดยใช้กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน ในระดับขวดเขย่า โดยเริ่มจากการเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหารที่มีกลูโคสหรือกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน และทำการวิเคราะห์กลีเซอรอลดิบซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของยีสต์ ได้แก่ ปริมาณเนื้อกลีเซอรอล น้ำมัน ความชื้น ตลอดจนธาตุและโลหะต่างๆ จากนั้นทำการทดลองเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งดัดแปลงเป็นสูตรอาหาร YPG โดยทำการศึกษาถึงภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์ คือ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ภาวะทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้นในอาหาร และความเร็วรอบที่ใช้ในการเลี้ยง จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในภาวะที่เหมาะสมในการเจริญในอาหารสูตรดัดแปลง YPG เทียบกับการเจริญในอาหาร Mineral Salt Medium ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน และทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อศึกษาองค์ประกอบต่างๆ คือ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ความชื้น เถ้า กรดไขมัน วิตามิน และกรดอะมิโน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาและแปรรูปเซลล์ยีสต์ในการนำไปใช้ประโยชน์อื่นๆต่อไป

3.3 ขั้นตอนการวิจัย

3.3.1 จุลินทรีย์และวัตถุดิบ

- ยีสต์ *Hansenula polymorpha* สายพันธุ์ SH4329 (*leu 1*) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Satoshi Harashima (มหาวิทยาลัย OSAKA, ประเทศญี่ปุ่น) และ Prof. J.A.K. W. Kiel (มหาวิทยาลัย Groningen, ประเทศเนเธอร์แลนด์) และ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL2214 ได้รับความอนุเคราะห์จาก จาก USDA ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเลี้ยงในอาหาร Yeast exteact Peptone Dextrose agar (YPD agar) (ภาคผนวก ก) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- กลีเซอรอลดิบ (Crude glycerol) จากโรงงานผลิตไบโอดีเซล

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3.3.2. **การเตรียมกล้าเชื้อ**

ถ่ายเชื้อยีสต์ *H. polymorpha* ที่เจริญบนอาหาร YPD agar plate ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ลงในอาหาร YPD broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน (rotary incubator shaker) ความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 5-10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง เตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำปราศจากเชื้อ นำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณกล้าเชื้อที่ต้องใช้ในอาหารสำหรับหมักให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นในอาหารวัดเป็นค่าความขุ่นเท่ากับ 2.0 ตามสูตรคำนวณ

$$V_1 = (N_2 \times V_2)/N_1$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรกล้าเชื้อที่ต้องใช้

V_2 = ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหมัก

N_1 = ค่าความขุ่นของกล้าเชื้อที่เตรียมในน้ำปราศจากเชื้อ

N_2 = ค่าความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นในอาหารสำหรับหมัก

3.3.3 **ศึกษาการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคส หรือกลีเซอรอลบริสุทธิ์ เป็นแหล่งคาร์บอน**

3.3.3.1 **ศึกษาการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน**

โดยถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ที่เตรียมจากข้อ 3.3.2 ลงในอาหาร YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีกลูโคส 2 และ 3 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง หรือ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือจนกว่าเซลล์จะเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่นกับน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข) เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และวิเคราะห์ปริมาณสารที่เหลือในน้ำหมัก ได้แก่ กลูโคส ด้วยเครื่อง HPLC นำผลที่ได้มาเขียนกราฟเพื่อเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคสแตกต่างกัน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3.3.3.2 **ศึกษาการเจริญของยีสต์** *H. polymorpha* **ในอาหารสูตรดัดแปลง** YPG **ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน**

โดยถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ที่เตรียมจากข้อ 3.3.2 ตามปริมาตรตามที่คำนวณจากข้อ 3.3.2 ลงในอาหารสูตรดัดแปลง YPG (ดัดแปลงจากสูตรอาหาร YPD โดยมีกลีเซอรอลแทนกลูโคส) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 9 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 และ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง หรือจนกว่าเซลล์จะเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่นกับน้ำหนักเซลล์แห้ง เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และวิเคราะห์ปริมาณสารที่เหลือในน้ำหมัก ด้วยเครื่อง HPLC นำผลที่ได้มาเขียนกราฟเพื่อเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลแตกต่างกันแตกต่างกัน และเปรียบเทียบกับการเจริญของยีสต์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจากข้อ 3.3.3.1

3.3.4 **วิเคราะห์องค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบ ศึกษาวิธีการเตรียมสูตรอาหารและปริมาณที่เหมาะสมของกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลล์ยีสต์** *H. polymorpha*

3.3.4.1 **วิเคราะห์องค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบ**

3.3.4.1.1 **วิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล**

เตรียมสารละลายกลีเซอรอลดิบความเข้มข้น 10 % โดยชั่งกลีเซอรอลดิบ 1 กรัมละลายในน้ำ DI (Deionized water) 10 มิลลิลิตร ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน และนำไปแยกตะกอนออกโดยการปั่นให้ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที จากนั้นนำมากรองตะกอนออกอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม และทำการฉีดวัดปริมาณกลีเซอรอลด้วยเครื่อง HPLC เทียบกับสารละลายมาตรฐานกลีเซอรอล 2 กรัมต่อลิตร เพื่อคำนวณหาปริมาณกลีเซอรอลที่แท้จริงในกลีเซอรอลดิบ ดังแสดงตัวอย่างโครมาโตแกรม และภาวะที่ใช้วิเคราะห์ ในภาคผนวก ง

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3.3.4.1.2 **วิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน** (AOAC1990)

นำกลีเซอรอลดิบมาทำการสกัดน้ำมันด้วยเอทานอลและเฮกเซน โดยชั่งกลีเซอรอลมา 50 กรัม จากนั้นละลายในเอทานอล 95 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตรและเติมเฮกเซนลงไป 100 มิลลิลิตร ทำการสกัดในกรวยแยก เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ ประมาณ 2 ชั่วโมง เก็บส่วนใสชั้นบนซึ่งเป็นชั้นที่น้ำมันละลายในเฮกเซนเก็บไว้ และนำส่วนล่างมาทำการสกัดด้วยเฮกเซนอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำชั้นน้ำมันที่ละลายในเฮกเซนจากการสกัดทั้ง 3 ครั้ง ไปทำการระเหยเฮกเซนออก ด้วยเครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ (evaporator) และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักและคำนวณหาปริมาณน้ำมันในกลีเซอรอลดิบ

3.3.4.1.3 **วิเคราะห์ปริมาณความชื้น** (AOAC1990)

โดยนำกลีเซอรอลดิบ 3-5 กรัม ใส่ในภาชนะที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกจากตู้อบมาไว้ในภาชนะกันความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น และชั่งน้ำหนัก นำตัวอย่างไปอบซ้ำอีกประมาณ 30 นาที หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้น จากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \times 100$$

W_1 = น้ำหนักกลีเซอรอลดิบก่อนอบ
W_2 = น้ำหนักกลีเซอรอลดิบหลังอบ

3.3.4.1.4 **วิเคราะห์ชนิดและเปอร์เซ็นต์กรดไขมัน**

โดยนำน้ำมันที่สกัดได้จากข้อ 3.3.4.1.2 มาวิเคราะห์ชนิดและเปอร์เซ็นต์กรดไขมันในรูปเมทิลเอสเทอร์ โดยดูดน้ำมันปริมาตร 0.02 – 0.04 กรัมใส่ในขวดก้นกลมขนาดเล็ก เติมสารละลาย 0.5 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และนำมาประกอบเข้ากับชุดรีฟลักซ์ ทำการรีฟลักซ์ 15 นาที เติมสารละลายโบรอนฟลูโอไรด์(BF_3)ในเมทานอล ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และทำการรีฟลักซ์ต่ออีก 3 นาที จากนั้นเติมสารเฮปเทน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และทำการรีฟลักซ์ 1 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง 10-15 นาที ถอดขวดก้นกลมจากชุดรีฟลักซ์ นำมาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัวให้สูงถึงระดับปากขวด และดูดชั้นบนซึ่ง

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

เป็นชั้นที่มีเมทิลเอสเทอร์ละลายอยู่ในเฮปเทน ใส่ในขวดแก้วฝาเกลียวขนาดเล็ก นำไปวิเคราะห์ชนิดและเปอร์เซ็นต์กรดไขมันด้วยเครื่อง GC (Gas Chromatography)

3.3.4.1.5 **วิเคราะห์ชนิดและปริมาณแร่ธาตุในกลีเซอรอลดิบ**

นำกลีเซอรอลดิบมาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแร่ธาตุ โดยวิเคราะห์ธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน ด้วยเครื่อง NA (CHNS/O Analyzer) ที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิเคราะห์ปริมาณโซเดียมด้วยเครื่อง ICP (Inductively Couple Plasma) ที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของธาตุอื่นๆ ด้วยเครื่อง XRF (X-Rayfluorescence) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.4.1.6 **วิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีนในกลีเซอรอลดิบ**

นำกลีเซอรอลดิบมาวิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีนด้วยเครื่อง HPLC เทียบกับสารมาตรฐานเบต้าแคโรทีน โดยสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

3.3.4.2 **ศึกษาวิธีการเตรียมสูตรอาหารดัดแปลงที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน**

โดยใช้อาหารที่ดัดแปลงจากสูตร YPD medium ที่มีสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 1 % และเพปโทน (peptone) 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) และมีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส โดยนำกลีเซอรอลดิบมาละลายในน้ำ DI ตามความเข้มข้นที่ต้องการ ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ความร้อนประมาณ 80 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยให้ละลายได้ดีขึ้น จากนั้นนำไปแยกตะกอนออกโดยการปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที และนำไปกรองตะกอนออกอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 จากนั้นนำมาเติมสารสกัดจากยีสต์และเพปโทน ทำการปรับพีเอช ให้อยู่ในช่วง 6.0-6.05 ด้วยกรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) นำไปผ่านการฆ่าเชื้อภายใต้สภาวะมาตรฐาน ซึ่งอาหารที่เตรียมโดยการใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส ในงานวิจัยนี้จะเรียกว่า สูตรอาหารดัดแปลง YPG

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3.3.4.3 **ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลล์ยีสต์** *H. polymorpha*

โดยถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ตามปริมาตรตามที่คำนวณจากข้อ 3.3.2 ลงในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลากส์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแปรผันปริมาณกลีเซอรอลดิบในช่วง 1-10 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง ที่เวลา 0-60 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมงที่เวลา 60-84 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณสารที่เหลือ ได้แก่ กลีเซอรอลด้วยเครื่อง HPLC ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl Method) และปริมาณน้ำมันด้วยการละลายและสกัดด้วยเอทานอลและเฮกเซน (ภาคผนวก ข) นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต คัดเลือกปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม สำหรับเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวของยีสต์

3.3.5 **ศึกษาชนิด ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และความเร็วรอบในการเขย่า ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์** *H. polymorpha*

3.3.5.1 **ศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์** *H. polymorpha*

โดยถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ที่เตรียมจากข้อ 3.3.2 ลงในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้น 1 % และความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมจากการทดลองในหัวข้อ 3.3.4.3 เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรีย (Urea) แอมโมเนียมคลอไรด์ (Ammonium chloride) แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Ammonium dihydrogenphosphate) และแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate) แทนเพปโทน 2 % ที่เป็นองค์ประกอบเดิมในอาหาร โดยปรับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 4 แหล่ง ให้มีปริมาณของไนโตรเจน (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร) เทียบเท่ากับปริมาณไนโตรเจนในเพปโทน 2% โดยคำนวณจากสูตรทางเคมีและจากการหาปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl Method) (ภาคผนวก ข) ซึ่งความเข้มข้นเริ่มต้นของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 4 แหล่ง ที่คำนวณและวิเคราะห์ได้คือ ยูเรีย 0.92 % แอมโมเนียมคลอไรด์ 1.33 % แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.16 % และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.60 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) จึงทำการผันแปรปริมาณ

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ดังนี้ ยูเรีย 0 - 0.92 % แอมโมเนียมคลอไรด์ 0 - 1.33 % แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0 - 2.16 % และแอมโมเนียมซัลเฟต 0 - 1.60 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 6.0 จากนั้นเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่าง และวิเคราะห์ดังการทดลอง 3.3.4.3 นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต คัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม สำหรับเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวของยีสต์

3.3.5.2 **ศึกษาอุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์** *H. polymorpha*

ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากที่ทดลองมา ทำการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 6.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที โดยผันแปรค่าอุณหภูมิในการเจริญเป็น 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ดังการทดลอง 3.3.4.3

3.3.5.3 **ศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์** *H. polymorpha*

ศึกษาอิทธิพลของพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ตลอดจนอุณหภูมิที่เหมาะสมจากที่ทดลองมา ทำการผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4, 5, 5.25, 5.50, 5.75, 6 และ 7 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ดังการทดลอง 3.3.4.3

3.3.5.4 **ศึกษาค่าความเร็วรอบในการเขย่า ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์** *H. polymorpha*

ศึกษาค่าความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ ตลอดจนพีเอชเริ่มต้นในอาหารที่เหมาะสมจากที่

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ทดลองมา ทำการผันแปรค่าความเร็วรอบในการเขย่า 200 , 250 และ 300 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ดังการทดลอง 3.3.4.3

3.3.6 **เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์** *H. polymorpha* **ในอาหารสูตรดัดแปลง** YPG **และอาหาร** Mineral Salt Medium

โดยทำการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหาร Mineral Salt Medium ที่อ้างอิงจากเอกสารสิทธิบัตรอเมริกา (United States Patent, No. 6,204,012 B1) ซึ่งสูตรอาหารแสดงไว้ในภาคผนวก ก เลี้ยงในอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของยีสต์ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG

3.3.7 **วิเคราะห์องค์ประกอบในเซลล์ยีสต์** *H. polymorpha*

โดยนำเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีปริมาณกลีเซอรอลดิบตลอดจนชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญ มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางอาหารในเซลล์ ดังนี้

3.3.7.1 **วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า ความชื้น คาร์โบไฮเดรต**

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Kjeldahl Method) ไขมัน ความชื้น เถ้า และคาร์โบไฮเดรต (AOAC 2000) ที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* ซึ่งวิธีการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข

3.3.7.2 **วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน**

ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* โดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ (Methyl ester) ดังแสดงในภาคผนวก ข แล้วทำการฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (Gas Chromatography)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3.3.7.3 **วิเคราะห์กรดอะมิโน และวิตามิน**

ทำการวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยวิธี AOAC (2000) และวิเคราะห์วิตามินบี 1, 2,6 ด้วยวิธี JAFC (1984), วิตามินบี 3 ด้วยวิธี JAOAC (1993), วิตามินบี 5 บี12 ด้วยวิธี (AOAC) 2000 วิตามินบี 8 บี 9 ด้วยวิธี (AOAC) 1996 โดยบริษัท ไอคิวเอ แลบอราทอรี จำกัด

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงยีสต์ *Hansenula polymorpha* เพื่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว โดยการใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการแปรผันค่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ในระดับขวดเขย่า เพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพการใช้ประโยชน์ และเพิ่มมูลค่าวัตถุดิบที่มีมูลค่าต่ำ อีกทั้งยังทำการศึกษาองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง YPG เพื่อเป็นข้อมูลในการที่จะพัฒนาและนำไปใช้ประโยชน์ในรูปต่างๆ เช่น สารสกัดจากยีสต์ เบต้ากลูแคนจากยีสต์ เป็นต้น

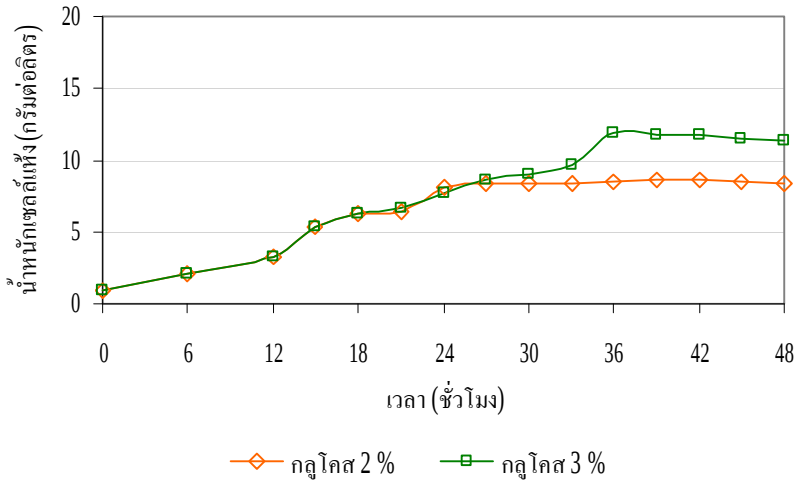
4.1 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหารที่มีกลูโคส หรือกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน

4.1.1 การเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

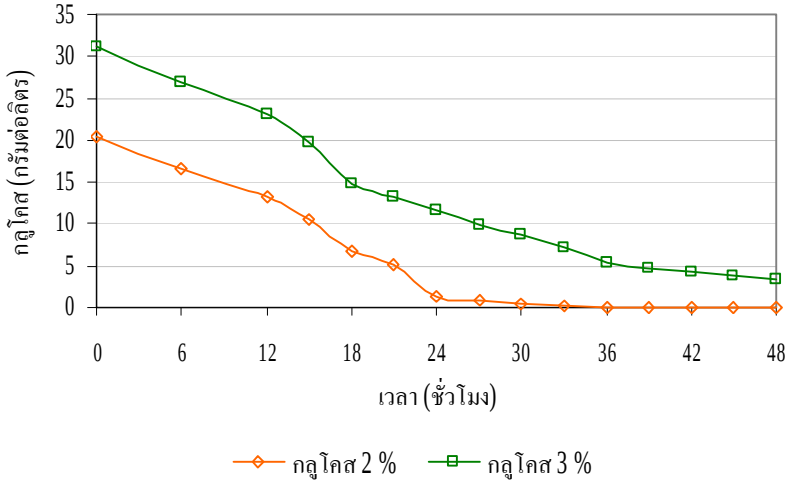
รูปที่ 4.1 ยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ SH4329 ที่เจริญบนอาหารแข็ง YPD เป็นเวลา 2 วัน

ทำการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ SH4329 ในอาหารเหลว YPD ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 2 และ 3 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วติดตามการเจริญของเชื้อทุกๆ 6 และ 3 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง นำมาวัดการเจริญในรูปความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่นกับน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ในภาคผนวก ค ได้ข้อมูลดังแสดงในรูปที่ 4.2-4.6 และตารางที่ 4.1

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



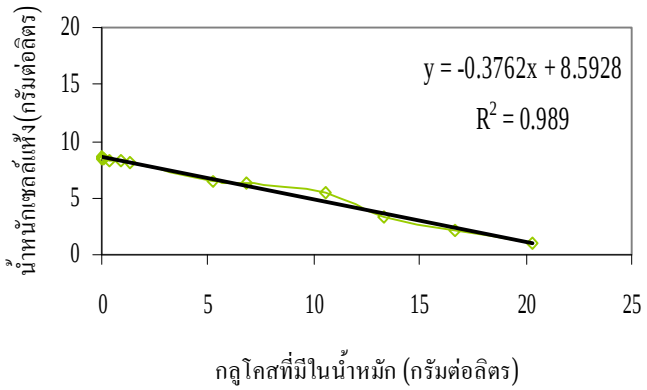
รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคส 2 และ 3 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน



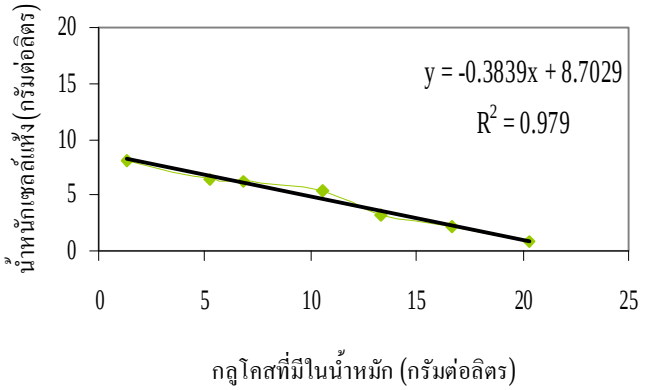
รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคส กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคส 2 และ 3 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

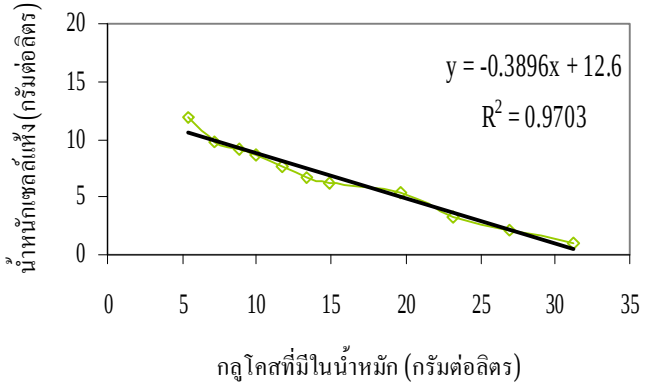
(ก) ตลอดกระบวนการหมักจนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด



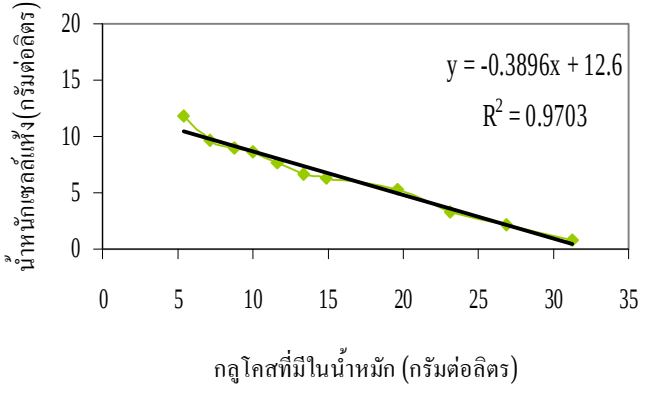
(ข) ช่วง log phase



(ค) ตลอดกระบวนการหมักจนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด



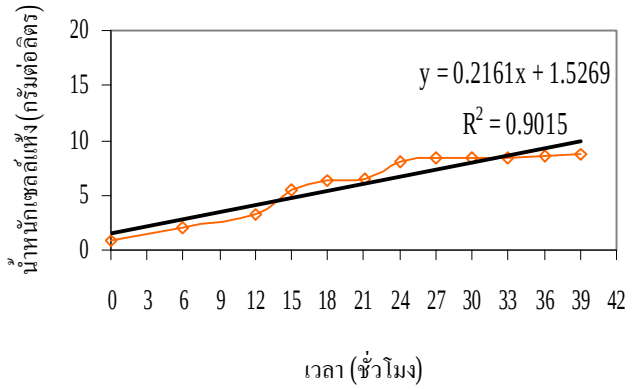
(ง) ช่วง log phase



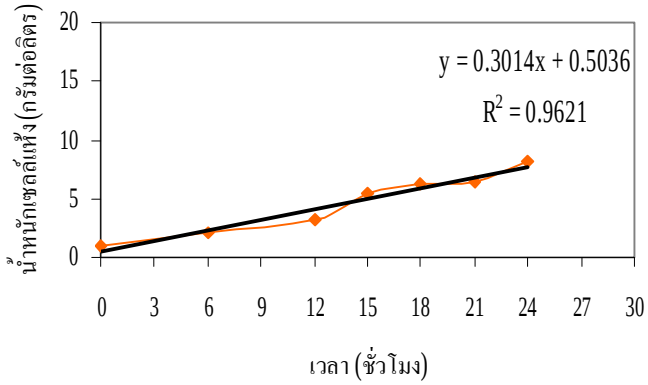
รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสต่อปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ในน้ำหมัก ก, ข ที่กลูโคสเริ่มต้น 2 % ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสต่อปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ในน้ำหมัก ค, ง ที่กลูโคสเริ่มต้น 3 % ในการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

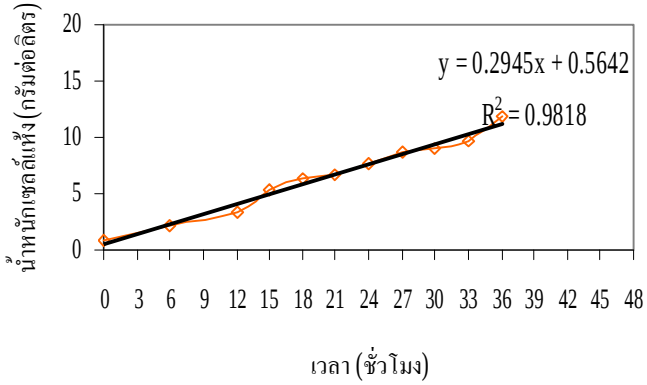
(ก) ตลอดกระบวนการหมักจนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด



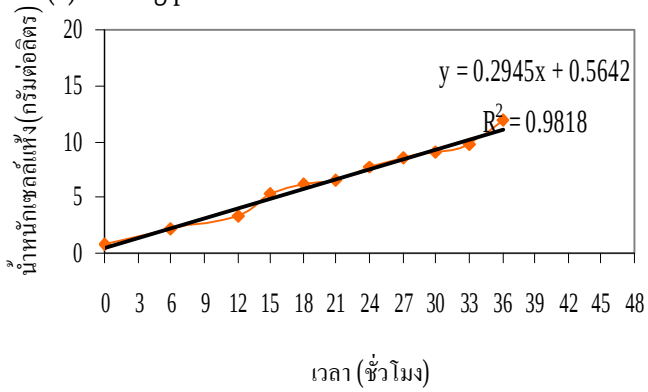
(ข) ช่วง log phase



(ค) ตลอดกระบวนการหมักจนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด

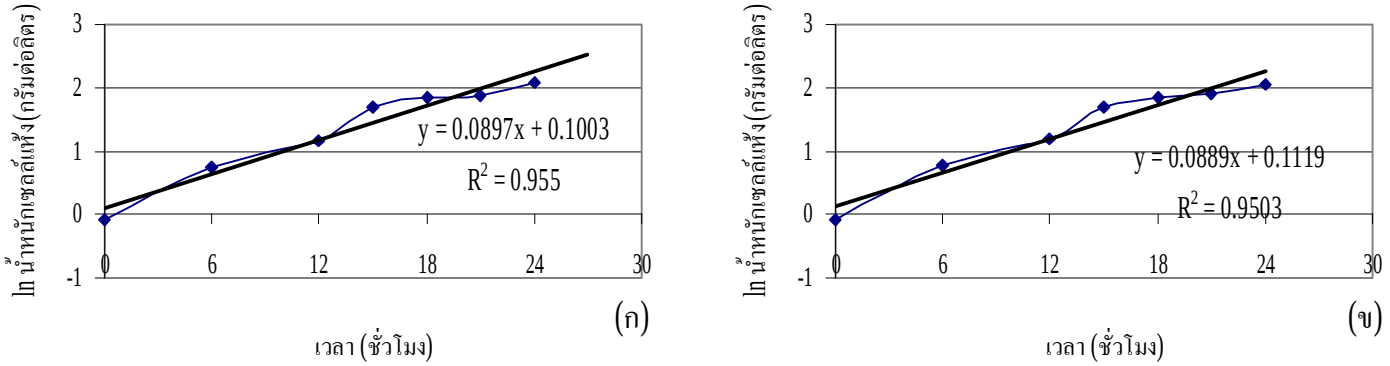


(ง) ช่วง log phase



รูปที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ในน้ำหมัก กับเวลา ก, ข ที่กลูโคสเริ่มต้น 2 %
ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ในน้ำหมัก กับเวลา ค, ง ที่กลูโคสเริ่มต้น 3 %
ในการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอกาลิทึมฐาน e ของน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ที่กลูโคส 2 % (ก) และ ที่กลูโคส 3 % (ข) ในการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคสเป็นแหล่ง

ตารางที่ 4.1 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคส 2 และ 3 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช เริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

กลูโคส (%, w/v)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ต่อชั่วโมง)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$,) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลูโคส)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
2	8.67± 0.18	39	0.0897	0.3762	0.3839	0.2161	0.3014
3	11.85± 0.16	36	0.0889	0.3896	0.3896	0.2945	0.2945

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ในการทดลองกล้าเชื้อที่ใช้มาจากการเลี้ยงเป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง ในอาหาร YPD ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นช่วงที่อยู่ในระยะ log phase เมื่อนำกล้าเชื้อไปใช้ในการศึกษาการเจริญในอาหารที่มีกลูโคส 2 และ 3 % ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเดียวกันกับที่ใช้แตรียมกล้าเชื้อ ยีสต์จะมีความสามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่และเจริญได้ดี ทำให้มีระยะ lag phase ที่สั้นหรืออาจไม่มีระยะ lag phase [56] และจากการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 2 % เชื้อจะเจริญแบบทวีคูณ (log phase) จนถึงชั่วโมงที่ 24 และเริ่มเข้าสู่ระยะของการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.67 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 39 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้นของกลูโคส 3 % เชื้อจะเจริญแบบทวีคูณจนถึงชั่วโมงที่ 36 ซึ่งเป็นจุดที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดคือ 11.85 กรัมต่อลิตร และเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่

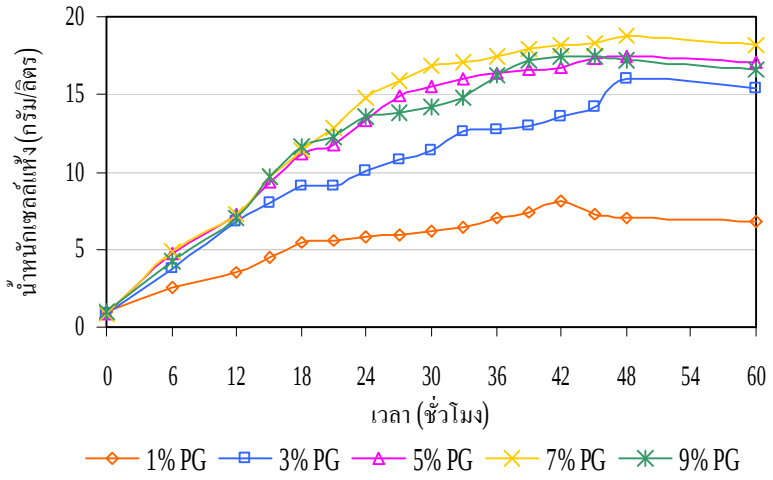
เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ซึ่งคำนวณในช่วงระยะ log phase ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และตารางที่ 4.1 พบว่า การเจริญที่กลูโคส 2 และ 3 % มีค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แม้ว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 3 % จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่า แต่ก็ใช้เวลาในการเข้าสู่ระยะ log phase นานกว่าที่กลูโคส 2 % ดังนั้นค่าอัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ที่กลูโคส 2 และ 3 % จึงมีค่าใกล้เคียงกัน

เมื่อพิจารณาถึงค่าผลผลิตมวลเซลล์ (Yield) ที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสที่ใช้ กับน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ และค่าอัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) ที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา โดยแบ่งการคำนวณเป็น 2 ช่วงคือ ช่วงเริ่มต้นในการเลี้ยงจนได้น้ำหนักเซลล์สูงสุด กับช่วงที่เซลล์อยู่ในระยะ log phase ดังแสดงในรูป 4.4 และ 4.5 โดยค่าผลผลิตมวลเซลล์ และอัตราผลผลิตมวลเซลล์ ทั้ง 2 ช่วงนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญข้อมูลหนึ่งในการเลี้ยงยีสต์ในระดับถังหมัก ซึ่งโดยทั่วไปค่าผลผลิตมวลเซลล์และอัตราผลผลิตมวลเซลล์ เมื่อคำนวณตั้งแต่เริ่มต้นจนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด จะมีค่าต่ำกว่า ที่คำนวณในช่วง log phase เนื่องจากเซลล์มีการเจริญในระยะ lag phase และมีการนำกลูโคสหรือแหล่งคาร์บอนไปใช้ในระยะนี้ แต่หากมีค่าใกล้เคียงกันก็สามารถบ่งบอกถึงการมีระยะ lag phase ที่สั้นหรืออาจไม่มีระยะ lag phase เลย และจากการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ที่กลูโคส 2 % จะเห็นว่าค่าผลผลิตมวลเซลล์เมื่อคำนวณตั้งแต่เริ่มต้นจนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด กับช่วงระยะ log phase มีค่าที่ใกล้เคียงกัน คือ 0.3762 และ 0.3839 ส่วนอัตราผลผลิตมวลเซลล์ เมื่อคำนวณตั้งแต่เริ่มต้นจนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด มีค่าต่ำกว่าช่วงระยะ log phase คือ 0.2161 และ 0.3014 ส่วนที่กลูโคส 3 % ค่าผลิตมวลเซลล์และอัตราผลผลิตมวลเซลล์ เมื่อคำนวณตั้งแต่เริ่มต้นจนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด กับช่วงระยะ log phase มีค่าเท่ากัน คือ 0.3896 และ 0.2945

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

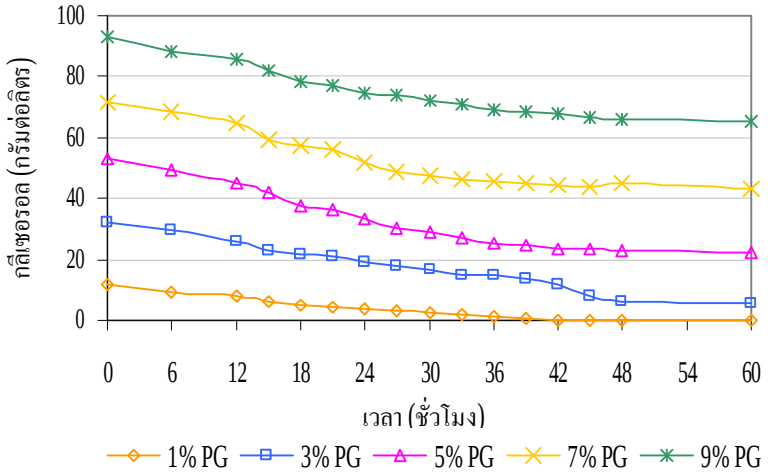
4.1.2 **การเจริญของยีสต์** *H. polymorpha* **ในอาหารสูตรดัดแปลง** YPG **ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน**

ทำการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็น 1, 3, 5, 7 และ 9 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 6.0 แล้วติดตามการเจริญของเชื้อทุกๆ 6 และ 3 ชั่วโมง จนครบ 60 ชั่วโมง นำมาวัดการเจริญในรูปความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่นกับน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ในภาคผนวก ค และวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในน้ำหมัก เพื่อนำข้อมูลมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กับเวลา ดังรูปที่ 4.7, 4.8 และ 4.9 และคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

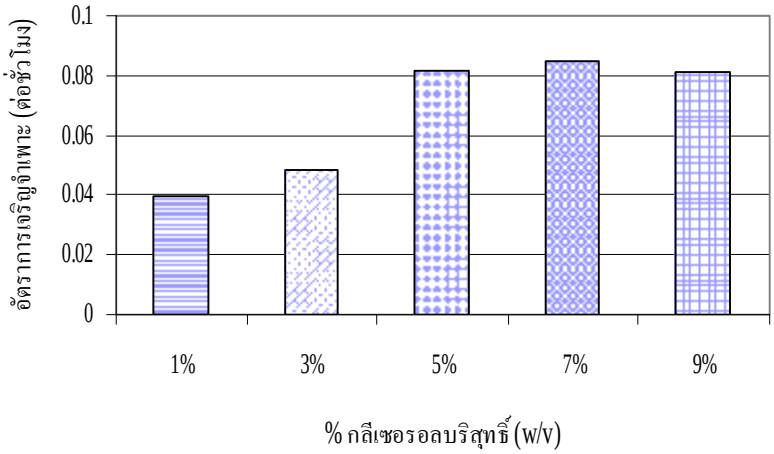


รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 1-9 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 1-9 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.9 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 1-9 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.2 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 1-9 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

กลีเซอรอลบริสุทธิ์ (%, w/v)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ต่อชั่วโมง)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$,) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
1	8.11 ±0.34	42	0.0399	0.5727	0.5727	0.1512	0.1512
3	16.02 ±0.22	48	0.0485	0.5419	0.6058	0.2740	0.2860
5	17.42 ±0.16	48	0.0819	0.5036	0.5744	0.3344	0.4907
7	18.83 ±0.17	48	0.0849	0.5907	0.6199	0.3661	0.5416
9	17.50 ±0.20	42	0.0810	0.6218	0.6476	0.3813	0.4663

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

โดยปกติในการเจริญของยีสต์ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างจากที่ใช้เตรียมกล้าเชื้อ ยีสต์จะมีการปรับตัวเข้ากับภาวะแวดล้อมใหม่ และในการทดลอง กล้าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะมีเมแทบอลิซึมกลูโคสผ่านเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิส และยีสต์ในกลุ่มเมทิลโลโทรฟิกส์ยีสต์จะมีการเมแทบอลิซึมน้ำตาลกลูโคสได้ดีและค่อนข้างรวดเร็ว [56] เมื่อนำกล้าเชื้อยีสต์มาทำการเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์จะมีเมแทบอลิซึมของการใช้กลีเซอรอลที่แตกต่างไป คือ กลีเซอรอลผ่านเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีแอคทีฟทรานสปอร์ต จะถูกเปลี่ยนเป็น glycerol-3- phosphate โดยเอนไซม์ glycerol kinase และเปลี่ยนเป็น dihydroxyacetone phosphate ด้วยเอนไซม์ glycerol-3- phosphate dehydrogenase แล้วเข้าสู่วิถี glycolysis ในขณะที่การเจริญในกลูโคส จะมีเมแทบอลิซึมเข้าสู่วิถี glycolysis ได้โดยตรง ดังนั้นเซลล์จึงต้องใช้เวลาในการปรับตัวเข้ากับภาวะสารอาหารใหม่ แต่ในบางครั้งหากใช้ปริมาณกล้าเชื้อในช่วง 3-10 % ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จะช่วยลดระยะพักตัว (lag phase) ทำให้ใช้เวลาในการเจริญสั้น [56]

จากผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 1-9 % เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ายีสต์สามารถเจริญได้ในทุกความเข้มข้นของกลีเซอรอล และมีแนวโน้มการเจริญเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่สูงขึ้นตั้งแต่ 1-7 % คือให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.11, 16.02, 17.42 และ 18.83 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 42, 48, 48 และ 48 ชั่วโมง ส่วนการเจริญที่กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 9 % น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าลดลงคือ 17.50 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาปริมาณกลีเซอรอลที่ยีสต์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญ พบว่ายีสต์ที่เจริญในกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 1 % นั้นมีการใช้กลีเซอรอลในน้ำหมักได้หมด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 39 ทำให้ขาดแหล่งคาร์บอนในการเจริญ จึงมีการเจริญที่ค่อนข้างต่ำ ส่วนการเจริญของยีสต์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 3-9 % นั้น แม้ว่ายีสต์จะมีแนวโน้มการเจริญที่ค่อนข้างดี แต่ก็พบว่ามีการใช้กลีเซอรอลได้ในช่วง 26.9319 – 30.9990 กรัมต่อลิตร ทำให้มีกลีเซอรอลบางส่วนเหลือในน้ำหมัก

เมื่อคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ซึ่งคำนวณในช่วงระยะ log phase ของการเจริญในกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังรูปที่ 4.9 พบว่า ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ตั้งแต่ 1-7 % อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น คือ 0.0399, 0.0485, 0.0819 และ 0.0849 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และค่าอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าลดลงที่กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 9 % คือ 0.0810 ต่อชั่วโมง

เมื่อพิจารณาถึงค่าผลผลิตมวลเซลล์ (Yield) ที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลีเซอรอลที่ใช้ กับน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329ในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 1-9 % มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก คือ อยู่ในช่วง 0.5036-0.6218 ตลอดการหมักจนได้จนได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด และ 0.5727-0.6476 ในระยะ log phase และเมื่อพิจารณาถึงค่าอัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) พบว่า ที่ความ

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

เข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ ตั้งแต่ 1-7 % ยีสต์จะมีอัตราผลผลิตมวลเซลล์ในแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ส่วนการเจริญที่กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 9 % อัตราผลผลิตมวลเซลล์จะมีค่าลดลง เช่นเดียวกับอัตราการเจริญจำเพาะ

ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 1-9 % เป็นแหล่งคาร์บอน จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการทดลองเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่มีกลีแซอรอลดิบ ซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญ

4.2 วิเคราะห์องค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบ ศึกษาวิธีการเตรียมสูตรอาหารและปริมาณที่เหมาะสมของกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha*

4.2.1 วิเคราะห์องค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

โดยทั่วไปกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล จะมีสิ่งเจือปน เช่น ตัวเร่งปฏิกิริยา (กรดหรือด่าง) แอลกอฮอล์ ไขมัน กรดไขมันอิสระ ความชื้น สบู่ และสิ่งเจือปนอื่นๆ ที่มาจากกระบวนการผลิตค่อนข้างสูง จึงได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบเพื่อทราบถึงองค์ประกอบหลักและปริมาณ ก่อนที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* ดังนี้

4.2.1.1 วิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล น้ำมัน ความชื้น ชนิดและปริมาณกรดไขมัน

กลีเซอรอลดิบที่นำมาใช้ในการทดลอง เป็นผลผลิตพลอยได้จากโรงงานผลิตไบโอดีเซลขนาดเล็ก โดยลักษณะทางกายภาพพบว่า จับตัวเป็นก้อน สีน้ำตาลเข้มอมเหลือง มีไขสบู่และน้ำมันเจือปนมา เมื่อสังเกตุด้วยตาเปล่า และมีกลิ่นของแอลกอฮอล์เล็กน้อย ดังแสดงในรูป 4.10

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

รูปที่ 4.10 กลีเซอรอลดิบที่ใช้ในการทดลอง

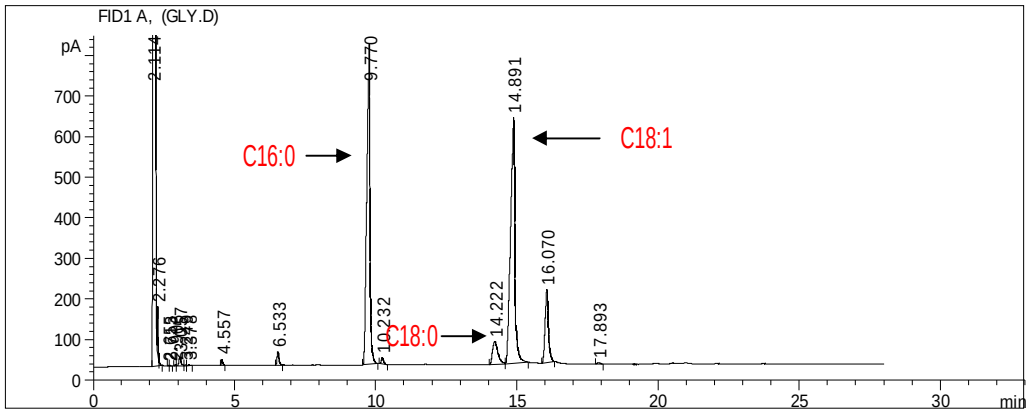
เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณเนื้อกลีเซอรอล น้ำมัน ความชื้น ในกลีเซอรอลดิบตามวิธีในข้อ 3.3.4.1 พบว่า มีปริมาณเนื้อกลีเซอรอลอยู่ 54.72 ±1.13 % ปริมาณน้ำมัน 7.05 ±1.02 % ความชื้น 16.09 ± 1.19 % และอื่นๆ 22.16 % ดังแสดงค่าในตาราง 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณกลีเซอรอล น้ำมัน ความชื้น (% โดยน้ำหนักเปียก) ที่เป็นองค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบ

องค์ประกอบ	เปอร์เซ็นต์ (%)	วิธีวิเคราะห์
กลีเซอรอล (glycerol)	54.72 ±1.13	HPLC
น้ำมัน (Oil)	7.05 ± 1.02	(AOAC1990)
ความชื้น (Moisture)	16.09 ± 1.19	(AOAC1990)
อื่น ๆ (Others)	22.16	-

จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่สกัดได้จากกลีเซอรอลดิบ โดยใช้วิธีการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ และทำการวิเคราะห์โดยเครื่อง GC (Gas Chromatography) ตามวิธีในข้อ 3.3.4.1.4 และภาวะที่ใช้ดังแสดงในภาคผนวก ง รูปที่ ง.5 ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่า มีชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักอยู่ 3 ชนิด คือ กรดไขมันปาลมิติก 41.88 % กรดไขมันโอเลอิก 40.84 % และกรดไขมันสเตียริก 4.82 % ดังแสดงผลในรูปที่ 4.11 และตารางที่ 4.4

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 4.11 โครมาโตแกรมของกรดไขมัน ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่สกัดได้จากกลีเซอรอลดิบที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (Gas Chromatography)

ตารางที่ 4.4 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่สกัดจากกลีเซอรอลดิบ

ชนิดกรดไขมัน	เปอร์เซ็นต์
ปาลมิติก (Palmitic, 16:0)	41.88
สเตียริก (Stearic, 18:0)	4.82
โอเลอิก (Oleic, 18:1)	40.84

และเมื่อทำการเปรียบเทียบชนิดและปริมาณ (%) กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่สกัดได้จากกลีเซอรอลดิบ กับที่มีในน้ำมันชนิดต่างๆพบว่า ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่ทำการวิเคราะห์มีค่าที่ใกล้เคียงกับชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่มีอยู่ในน้ำมันปาล์มมากที่สุด ดังแสดงการเปรียบเทียบในตารางที่ 4.5

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบชนิดและปริมาณ (%) กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่สกัดได้จากกลีเซอรอลดิบ กับน้ำมันชนิดต่างๆ

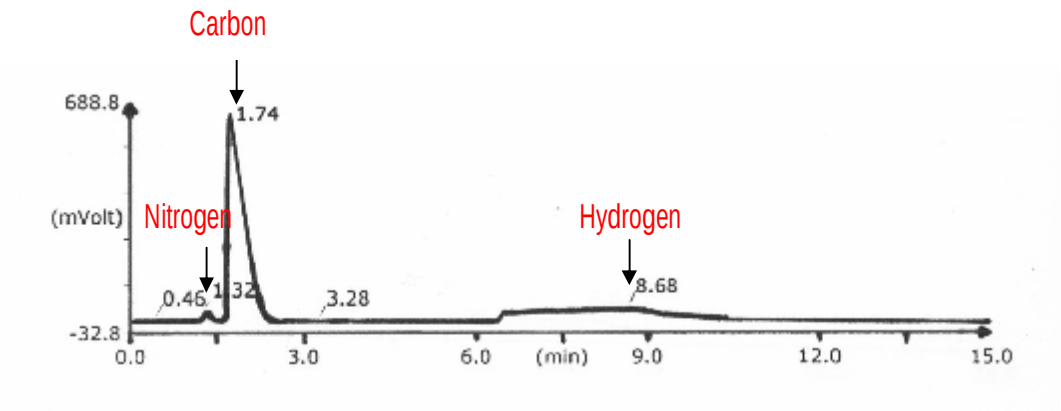
น้ำมัน	เปอร์เซ็นต์กรดไขมัน		
	ปาลมิติก (Palmitic, C16:0)	โอเลอิก (Oleic, C18:1)	สเตียริก (Stearic, C18:0)
น้ำมันจากกลีเซอรอลดิบ	41.88	40.84	4.82
น้ำมันปาล์ม [a]	39.3-47.5	36.0-44.0	3.5-6.0
น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน [a]	5.0-7.6	14-39.4	2.7-6.5
น้ำมันถั่วเหลือง [a]	8.0-13.50	17.0-30.0	2.0-5.4
น้ำมันมะพร้าว [a]	7.5-10.2	5.0-10.0	2.0-4.0

[a] ที่มา Codex Standard for Named Vegetable Oils Codex-Stan 210

4.2.1.2 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณแร่ธาตุในกลีเซอรอลดิบ

ได้ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแร่ธาตุในกลีเซอรอลดิบ โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจนด้วยเครื่อง NA (CHNS/O Analyzer) จากการวิเคราะห์พบว่ามีปริมาณธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน เป็น 44.13, 9.03 และ 1.34 % ตามลำดับ ดังแสดงโครมาโตแกรมในรูปที่ 4.12 และตารางที่ 4.6 โดยคาร์บอน และไฮโดรเจนเป็นธาตุพื้นฐานที่เป็นองค์ประกอบของสารอินทรีย์ โดยมาจากกลีเซอรอล ($C_3H_5(OH)_3$) และน้ำมัน ส่วนธาตุไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้ในกลีเซอรอลดิบนั้น อาจจะมาจากน้ำมันปาล์มที่นำมาใช้ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นเพื่อผลิตไบโอดีเซล ซึ่งการสกัดน้ำมันปาล์มในอุตสาหกรรมโดยส่วนใหญ่นั้น จะนำทะลายปาล์มน้ำมันที่สุกได้ที่แล้ว ผ่านกระบวนการให้ความร้อน เพื่อหยุดขบวนการเมแทบอลิซึม โดยมากใช้การผ่านการอบไอน้ำแบบมีความดัน แล้วนำมาผ่านการบีบเอาน้ำมันจากเปลือกนอก ซึ่งขั้นตอนนี้อาจมีส่วนของโปรตีน (มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ) ที่เป็นองค์ประกอบของผลปาล์มปนมาด้วย น้ำมันที่ได้ผ่านการกรอง แยกน้ำออกด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบต่อเนื่อง จะได้น้ำมันดิบและนำไปกลั่นใสต่อไป [94]

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



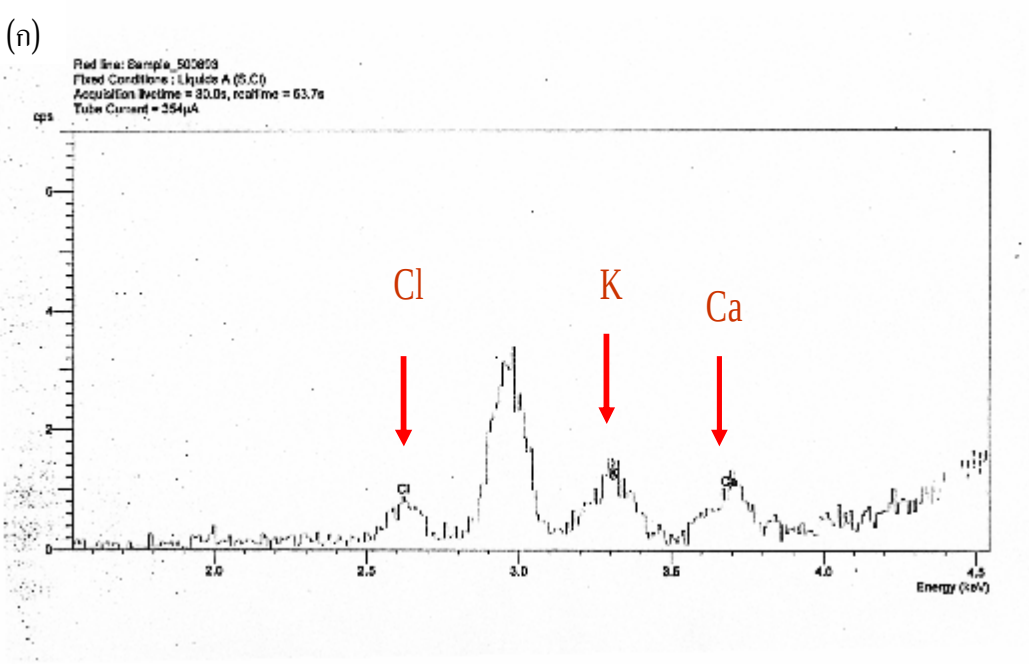
Retention Time (Min)	Component Name	Area (.1*uV*sec)	Area % (%)	Element %	Peak Heigh (uV)
0.46		145327	0.080	0.0000	622
1.33	Nitrogen	1809635	0.999	1.2916	26266
1.74	Carbon	111655900	61.621	48.2030	655890
3.28		24093	0.013	0.0000	213
8.68	Hydrogen	67563630	37.287	9.9148	38008
		181198600		59.4095	3609276

รูปที่ 4.12 โครมาโตแกรม แสดงปริมาณธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง NA (CHNS/O Analyzer)

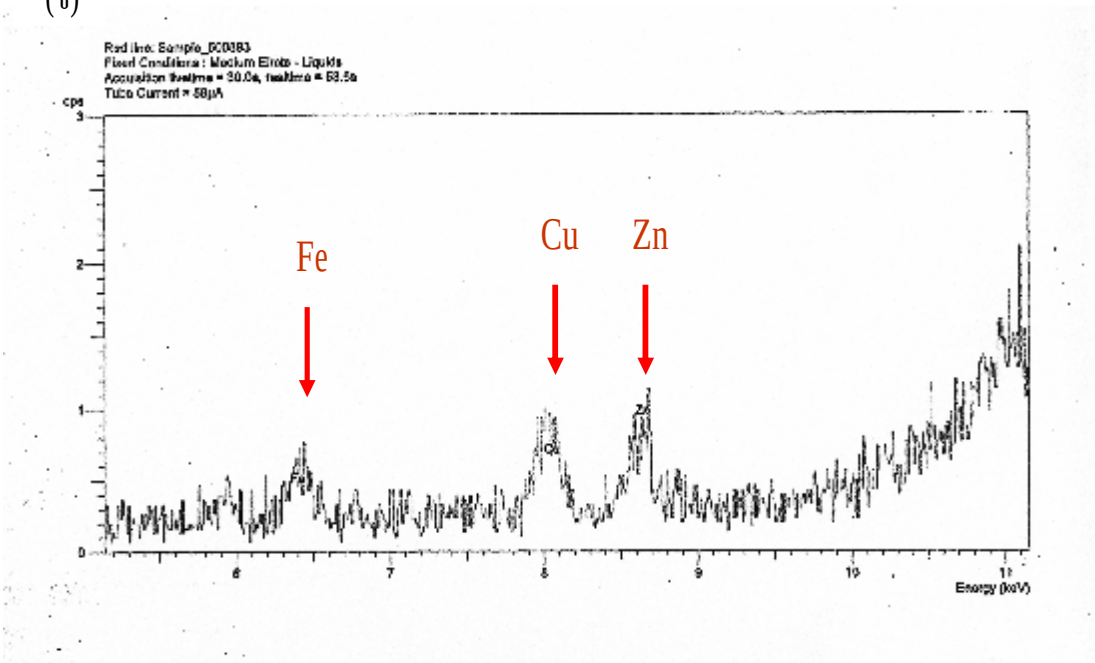
ด้วยข้อจำกัดของเครื่อง NA (CHNS/O Analyzer) ที่ไม่สามารถวิเคราะห์ธาตุออกซิเจนได้ วิเคราะห์ได้เพียงคาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน เท่านั้น จึงได้ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของธาตุอื่นๆในกลีเซอรอลดิบ ด้วยเครื่อง XRF(X-Rayfluorescence) ซึ่งเป็นเครื่องที่สามารถวิเคราะห์ธาตุต่างๆที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าโซเดียมขึ้นไป ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในตัวอย่างได้ ผลการวิเคราะห์พบว่าพบธาตุต่างๆที่เป็นองค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบที่วิเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง XRF คือ คลอไรด์ (Cl) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) เหล็ก (Fe) ทองแดง (Cu) และสังกะสี (Zn) ในปริมาณ 39, 37, 15, 12, 8 และ 4 ppm (parts per million) ตามลำดับ ดังแสดงโครมาโตแกรมในรูปที่ 4.13 และตารางที่ 4.6

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.13 โครมาโตแกรม แสดงธาตุคลอไรด์ (Cl) โพแทสเซียม (K) และ แคลเซียม (Ca) (ก) แสดงธาตุเหล็ก (Fe) ทองแดง (Cu) และ สังกะสี (Zn) (ข) ที่เป็นองค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง XRF (X-Rayfluorescence)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

และเนื่องจากในการผลิตไบโอดีเซลโดยส่วนใหญ่นั้น จะใช้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น ซึ่งมักมีด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จึงได้วิเคราะห์ปริมาณโซเดียมในกลีเซอรอลดิบ โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมด้วยเครื่อง ICP (Inductively Couple Plasma) ซึ่งเป็นเครื่องที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณธาตุหรือโลหะในสารตัวอย่าง เช่น โซเดียม (Na) อะลูมิเนียม (Al) ไอโอดีน (I) เป็นต้น โดยสามารถวิเคราะห์ตั้งแต่ระดับ % จนถึง ppt (parts per trillion) ผลการวิเคราะห์โซเดียมพบว่ามีปริมาณธาตุโซเดียมที่ค่อนข้างสูง คือ 1.60 % ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งธาตุโซเดียมที่พบอาจมาจากตัวเร่งปฏิกิริยาปนเปื้อนมาในกลีเซอรอลดิบ ในขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นเพื่อผลิตไบโอดีเซล ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ชนิดและปริมาณธาตุที่วิเคราะห์ได้ในกลีเซอรอลดิบ

ธาตุที่วิเคราะห์	ปริมาณ	หน่วย
คาร์บอน (Carbon)	44.13	%
ไฮโดรเจน (Hydrogen)	9.03	%
ไนโตรเจน (Nitrogen)	1.34	%
คลอไรด์ (Cl)	39	ppm
โพแทสเซียม (K)	37	ppm
แคลเซียม (Ca)	15	ppm
เหล็ก (Fe)	12	ppm
ทองแดง (Cu)	8	ppm
สังกะสี (Zn)	4	ppm
โซเดียม (Na)	1.60	%

4.2.1.5 วิเคราะห์ปริมาณแบต้าแคโรทีนในกลีเซอรอลดิบ

จากที่ได้กล่าวมาถึงลักษณะทางกายภาพในเรื่องสีของกลีเซอรอลดิบที่ใช้ในการทดลองว่ามีสีน้ำตาลเข้มอมเหลือง ซึ่งสีที่ปรากฏอาจจะมาจากน้ำมันหรือวัตถุดิบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา รวมถึงกระบวนการที่ใช้ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลด้วย และจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลของชนิดและปริมาณกรดไขมันในน้ำมันที่สกัดได้จากกลีเซอรอลดิบพบว่าใกล้เคียงกับน้ำมันปาล์ม

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทยที่นิยมใช้น้ำมันปาล์ม และน้ำมันปาล์มโดยทั่วไปที่ยังไม่ผ่านกระบวนการสกัดหรือฟอกสี จะมีสีเหลืองเข้มเนื่องมาจากสารสีของรงควัตถุเบต้าแคโรทีน (Beta-Carotene) ซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อทั้งคนและสัตว์ จึงวิเคราะห์ปริมาณสารเบต้าแคโรทีนในกลีเซอรอลดิบ ด้วยวิธี T-CM-011 Based on Food Chemistry (2003) จากผลการวิเคราะห์พบว่า มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนที่ต่ำกว่าค่าต่ำสุดที่จะวิเคราะห์ได้ คือ ต่ำกว่า 3 μg/100 g ของกลีเซอรอลดิบ ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ปริมาณของสารเบต้าแคโรทีนในกลีเซอรอลดิบ

สารที่วิเคราะห์	ผลการวิเคราะห์	วิธีการวิเคราะห์
β- carotene (Vitamin A)	< 3.00 μg/100 g	T-CM-011 Based on Food Chemistry (2003)

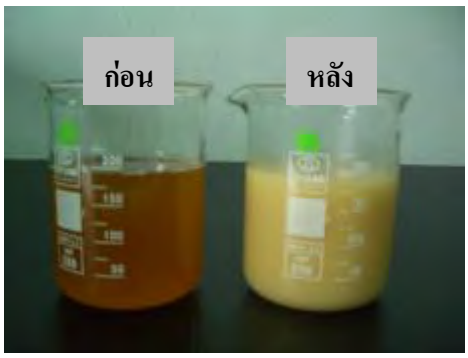
ซึ่งสาเหตุที่พบปริมาณสารเบต้าแคโรทีนที่ต่ำกว่าค่าต่ำสุดที่จะวิเคราะห์ได้ อาจเนื่องมาจากกระบวนการผลิตน้ำมันปล์ม ซึ่งขั้นตอนและกระบวนการที่ใช้โดยส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีการใช้ความร้อนช่วยในการสกัดน้ำมันปาล์ม จึงทำให้สารเบต้าแคโรทีนเกิดการสลายตัว [94] ดังนั้นปริมาณของสารเบต้าแคโรทีนที่พบในน้ำมันปาล์มจึงมีปริมาณที่ค่อนข้างต่ำหรือไม่มีเลย ในปริมาณที่ต่ำมาก

4.2.2 ศึกษาวิธีการเตรียมสูตรอาหารดัดแปลง YPG โดยใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน

นำกลีเซอรอลดิบซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาละลายน้ำตามความเข้มข้นที่ต้องการ ในการละลายกลีเซอรอลดิบในน้ำนั้นค่อนข้างทำได้ยาก จึงต้องใช้ความร้อนช่วยในการละลายที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นคนให้เป็นเนื้อเดียวกัน และนำไปทำการแยกตะกอนออก โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้สารละลายกลีเซอรอลที่มีลักษณะสีน้ำตาล ค่อนข้างใส ดังรูปที่ 4.14 (ซ้าย) เติมสารอาหารอื่นๆ สำหรับการเจริญของยีสต์ ลงไปละลายให้เข้ากัน และนำไปปรับค่าพีเอชตามที่ต้องการ เนื่องจากสารละลายกลีเซอรอลนั้นมีพีเอชในช่วง 8.5-9.5 ซึ่งพบว่า เมื่อทำการปรับค่าพีเอชเป็น 6.0 จะได้สารละลายกลีเซอรอลที่มีลักษณะขุ่น สีเหลืองครีม ดังรูปที่ 4.14 (ขวา) จากนั้นนำไปผ่านการฆ่า

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

เชื้อภายใต้สภาวะมาตรฐาน (นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) จะได้อาหารสูตรดัดแปลง YPG ดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.14 กลีเซอรอลดิบ 5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ละลายในน้ำก่อนปรับพีเอช และหลังปรับพีเอชเป็น 6.0

รูปที่ 4.15 อาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 5 % เป็นแหล่งคาร์บอน

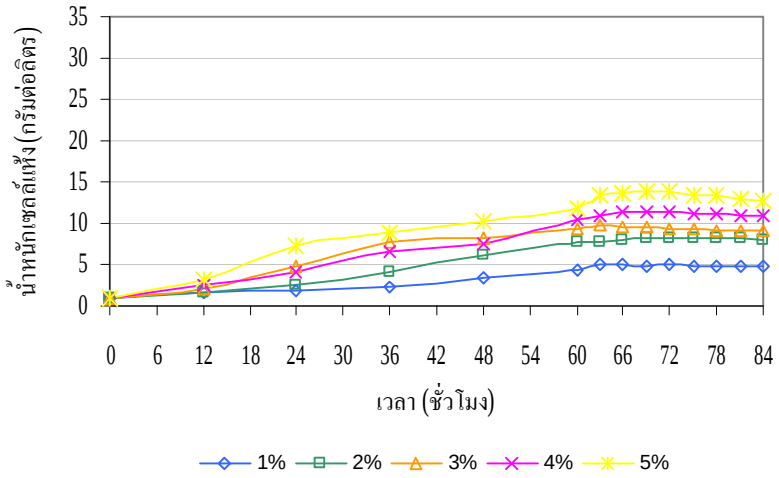
4.2.3 ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha*

ทำการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีการผันแปรปริมาณกลีเซอรอลดิบตั้งแต่ 1-10 % สารสกัดจากยีสต์ 1 % และเพปโทน 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับค่าพีเอชในอาหารเป็น 6.0 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 84 ชั่วโมง แล้ววัดการเจริญในรูปน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจน และน้ำมันที่เหลือในน้ำหมักเพื่อนำข้อมูลที่ได้มาเขียน

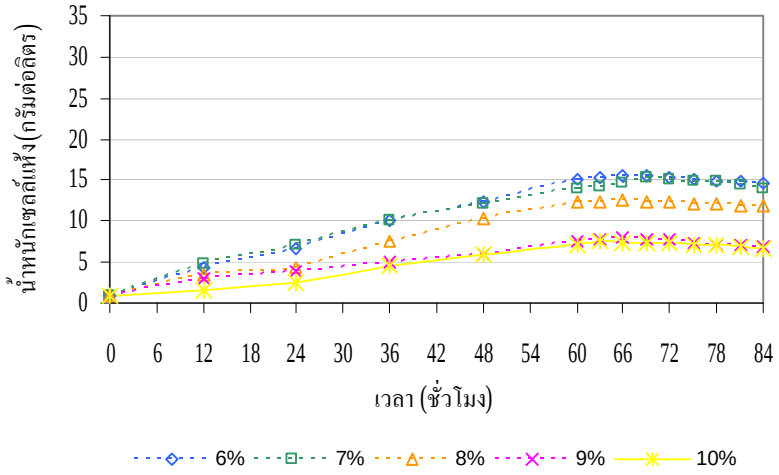
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

กราฟความสัมพันธ์กับเวลา ดังรูปที่ 4.16-4.20 จากนั้นคำนวณค่าผลผลิตมวลชีวภาพ (Biomass Yield) และอัตราการผลิตมวลชีวภาพต่อเวลาที่ใช้ในการหมัก (productivity) ดังแสดงในตารางที่ 4.8

(ก)



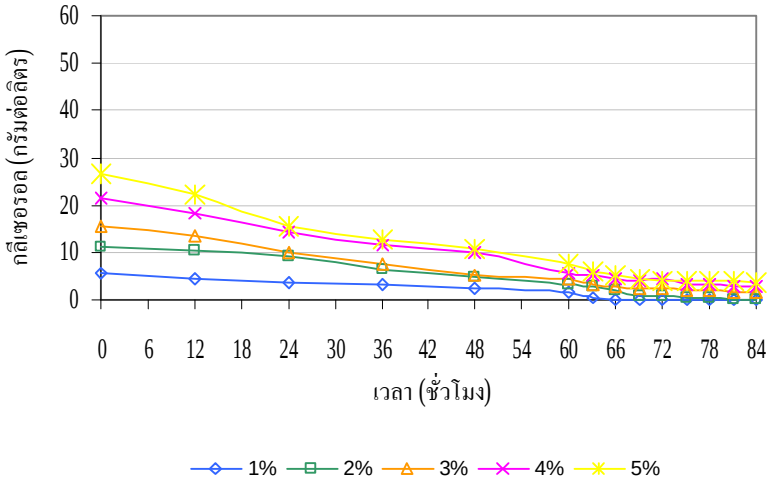
(ข)



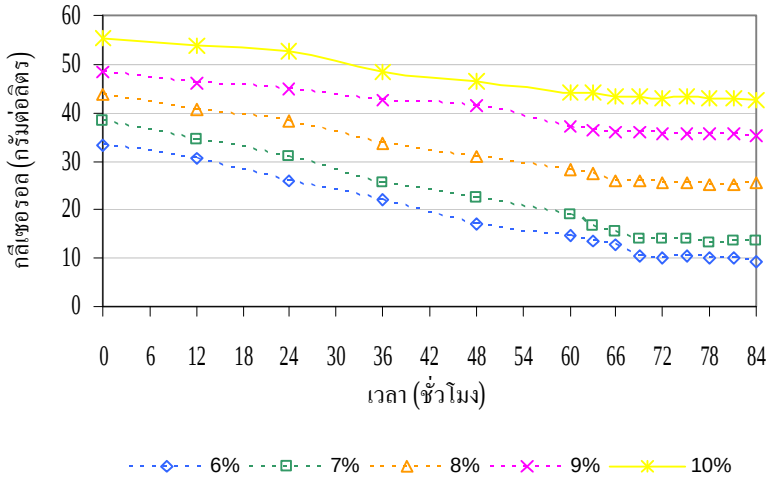
รูปที่ 4.16 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในสูตรอาหารดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 1-5 % (ก) และที่มีกลีเซอรอลดิบ 6-10 % (ข) (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

(ก)



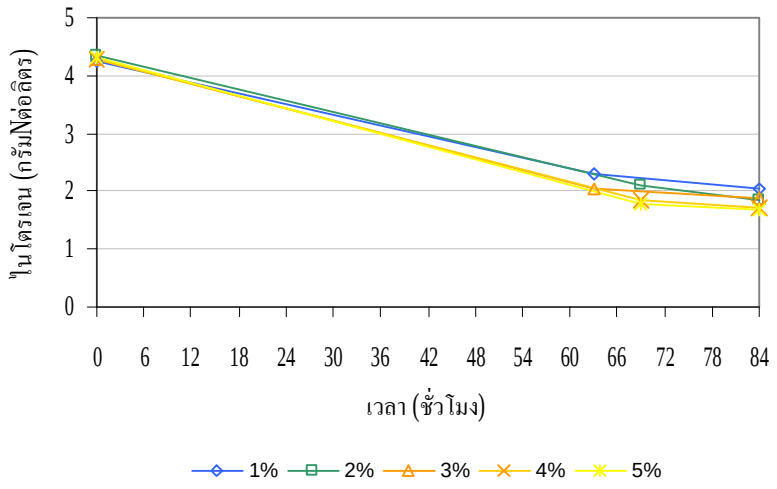
(ข)



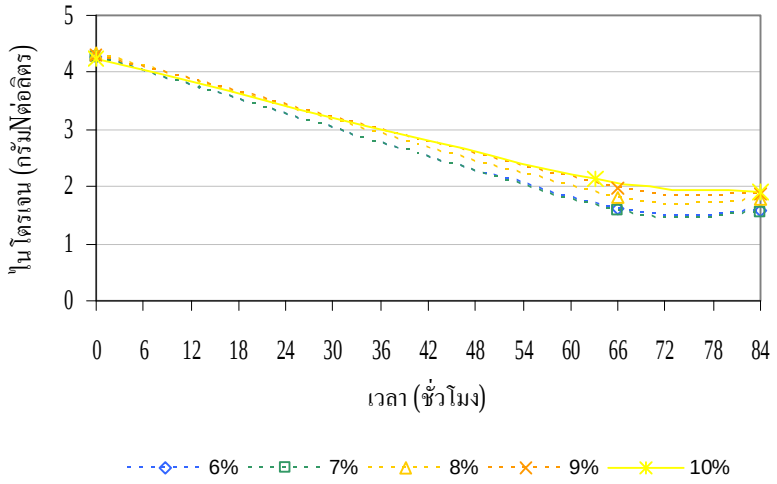
รูปที่ 4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในสูตรอาหารดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 1-5 % (ก) และที่มีกลีเซอรอลดิบ 6-10 % (ข) (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

(ก)



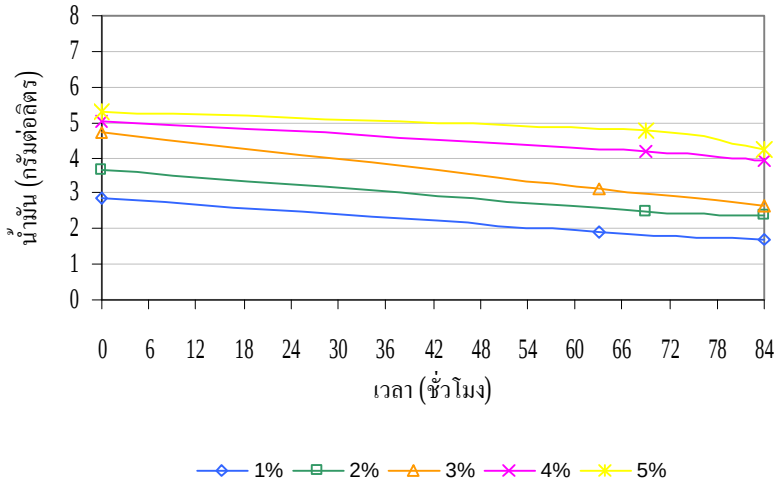
(ข)



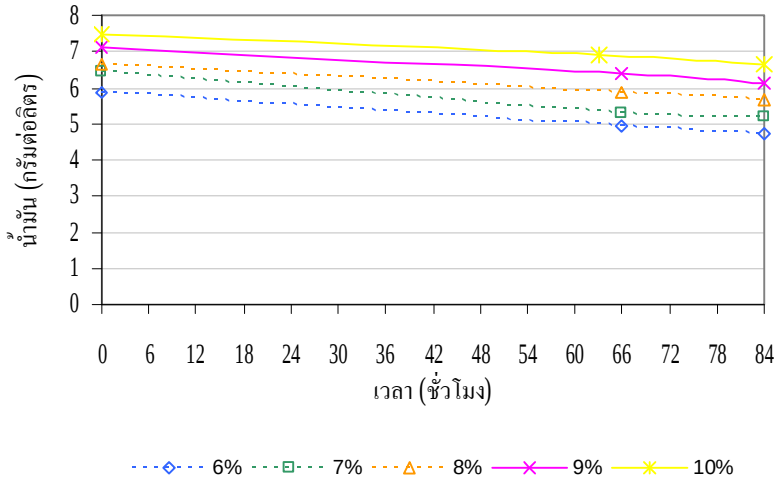
รูปที่ 4.18 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในสูตรอาหารดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 1-5 % (ก) และที่มีกลีเซอรอลดิบ 6-10 % (ข) (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

(ก)

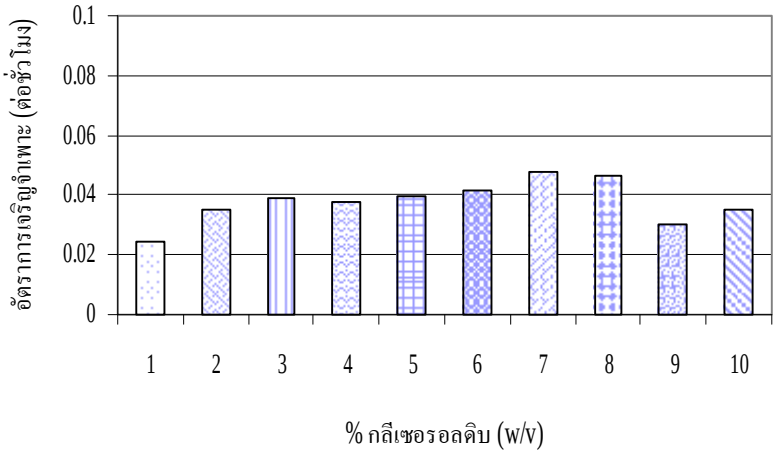


(ข)



รูปที่ 4.19 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในสูตรอาหารดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 1-5 % (ก) และที่มีกลีเซอรอลดิบ 6-10 % (ข) (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 4.20 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 1-10 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.8 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG กลีเซอรอลดิบ 1-10 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

กลีเซอรอลดิบ (%)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ต่อชั่วโมง)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
1	4.94 ±0.12	63	0.0247	0.8326	0.8326	0.0603	0.0603
2	8.15 ±0.09	72	0.0355	0.7469	0.8256	0.1122	0.1161
3	9.48 ±0.13	69	0.0389	0.6974	0.7743	0.1320	0.1518
4	11.42 ±0.03	69	0.0376	0.6145	0.6145	0.1584	0.1542
5	13.96 ±0.06	69	0.0394	0.5983	0.6032	0.1833	0.1864
6	15.63 ± 0.12	66	0.0412	0.6930	0.7017	0.2232	0.2321
7	15.37 ±0.13	69	0.0480	0.5669	0.6116	0.1974	0.2054
8	12.64 ±0.20	66	0.0466	0.6972	0.7014	0.1847	0.1912
9	7.95± 0.12	66	0.0305	0.5306	0.5794	0.1015	0.1024
10	7.24 ±0.04	72	0.0352	0.5896	0.5713	0.1118	0.1109

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

จากการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 1-10 % เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ายีสต์ ให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตรเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบตั้งแต่ 1-6 % โดยวัดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.94, 8.15, 9.48, 11.42, 13.96 และ 15.63 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 63, 72, 69, 69, 69 และ 66 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบตั้งแต่ 7-10 % พบว่ายีสต์มีการเจริญที่ลดลง โดยวัดเป็นน้ำหนักแห้งที่ได้เท่ากับ 15.37, 12.64, 7.95 และ 7.24 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 69, 66, 66 และ 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 1-10 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

กลีเซอรอลดิบ (%)	พีเอช (0- 84 ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)		ไนโตรเจน (กรัม N/ลิตร)		น้ำมัน (กรัมต่อลิตร)	
		เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป
1	5.89-6.04	5.7391	5.7391	4.2509	2.2210	2.8667	1.1667
2	5.92-6.13	11.1617	10.3920	4.3469	2.2314	3.6467	1.2600
3	5.94-6.11	15.4780	13.2452	4.2748	2.3882	3.7266	1.3667
4	5.97-6.13	21.6323	17.8375	4.2987	2.5792	5.0434	1.1234
5	5.98-6.14	26.7111	22.6914	4.3226	2.6270	5.3226	1.0800
6	5.94-6.10	33.3022	20.5130	4.2748	2.6986	5.8830	1.1664
7	5.92-6.16	38.3088	24.2663	4.2855	2.7225	6.4368	1.2634
8	5.95-6.10	43.8076	17.7271	4.3469	2.5793	6.6577	1.0034
9	5.96-6.11	48.4133	12.3610	4.2088	2.4121	7.1100	1.0010
10	5.97-6.14	55.1834	43.1013	4.2500	2.3404	7.4989	0.8367

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมักพบว่า ยีสต์ที่เจริญในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบตั้งแต่ 1-10 % นั้น มีการใช้ไนโตรเจนในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ 2.2210-2.7225 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร จากปริมาณเริ่มต้น 4.2509-4.3469 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยไนโตรเจนในน้ำหมักมาจากสารสกัดจากยีสต์ (yeast extact) และเพปโทน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

(peptone) ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในน้ำหมัก พบว่า ยีสต์ที่เจริญในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบตั้งแต่ 1-10 % นั้น มีการใช้น้ำมันในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ 0.8367- 1.3367 กรัมต่อลิตร จากปริมาณเริ่มต้น 2.86674 -7.4989 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำมันเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของกลีเซอรอลดิบที่สูงขึ้น

เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ซึ่งคำนวณในระยะ log phase ของการเจริญ ดังรูปที่ 4.20 พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในการเลี้ยงที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ 1-6 % คือ 0.0247, 0.0355, 0.0389, 0.0376, 0.0394 และ 0.0412 ต่อชั่วโมง ส่วนการเจริญที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ 7-10 % พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะมีแนวโน้มลดลง คือ 0.0480, 0.0466, 0.0305 และ 0.0352 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาถึงค่าผลผลิตมวลเซลล์ (Biomass Yield) พบว่าการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ 1 % มีค่าผลผลิตมวลเซลล์สูงสุด คือ 0.8326 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเป็น 2-5 % ค่าผลผลิตมวลเซลล์มีแนวโน้มลดลง คือ 0.8256, 0.7743, 0.6145 และ 0.6032 ตามลำดับ จากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบอยู่ในช่วง 6-10 % ค่าผลผลิตมวลเซลล์มีทั้งค่าที่เพิ่มขึ้นและลดลง คือ 0.7017, 0.6116, 0.7014, 0.5794 และ 0.5713 ดังแสดงในตารางที่ 4.8

เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตมวลชีวภาพต่อกระบวนการหมัก (productivity) พบว่าการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ 1-6 % มีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับคือ 0.0603, 0.1161, 0.1518, 0.1584, 0.1864, 0.2232 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนการเจริญที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบตั้งแต่ 7-10 % อัตราการผลิตมวลชีวภาพต่อกระบวนการหมักของยีสต์มีแนวโน้มลดลง คือ 0.2054, 0.1912, 0.1024 และ 0.1118 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.8

และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณธาตุต่างๆที่วิเคราะห์ในกลีเซอรอลดิบ จากข้อ 4.2.1.2 ธาตุส่วนใหญ่ที่วิเคราะห์ได้จะเป็น คาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน (44.13, 9.03 และ 1.34 %) ซึ่งธาตุเหล่านี้เป็นธาตุที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมถึงจุลินทรีย์ ส่วนธาตุคลอไรด์ โพแทสเซียม แคลเซียม ที่พบในระดับ ppm (39, 37, 15 ppm) ก็เป็นธาตุที่สำคัญต่อการเจริญของเซลล์เช่นเดียวกัน โดยทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์สำหรับเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวกับ oxidative phosphorylation การสังเคราะห์โปรตีน และเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น [62, 63] และนอกจากนี้ในกลีเซอรอลดิบยังประกอบด้วย เหล็ก ทองแดง สังกะสี ที่พบในระดับ ppm (12, 8 และ 4 ppm) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์ โดยธาตุต่างๆเหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับขั้นตอน Transcription และ posttranslation ของการเจริญและการเพิ่มจำนวนเซลล์ [95] แต่เมื่อพิจารณาถึง

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ปริมาณโซเดียมในกลีเซอรอลดิบ คือ 1.60 % ซึ่งมีปริมาณค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับธาตุคลอไรด์ โพแทสเซียม แคลเซียม เหล็ก ทองแดง สังกะสี ซึ่งอาจส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ทั่วไปได้ แต่เนื่องจากยีสต์ที่ใช้ในการทดลองเป็นยีสต์ *H. polymorpha* ที่อยู่ในกลุ่มเมทิลโลโทรฟิกส์ยีสต์ที่มีความสามารถในการทนเกลือความเข้มข้น 1 M (5.8 %, w/v) ได้ [92] ดังนั้นเมื่อนำกลีเซอรอลดิบมาละลายน้ำในช่วง 1-10 % จะมีปริมาณโซเดียมในน้ำหมัก 0.16 -1.60 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่ยีสต์ชนิดนี้สามารถเจริญได้

และในการพิจารณาเลือกความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเพื่อใช้ในการทดลองการผันแปรแหล่งไนโตรเจนและอื่นๆ จะเห็นว่า ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ 6 % จึงน่าจะเหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดคือ 15.63 กรัมต่อลิตร ถึงแม้ว่าจะให้ค่าผลผลิตมวลเซลล์ 0.6930 ซึ่งต่ำกว่าที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลดิบ 1-2 % แต่เมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ และอัตราผลผลิตมวลเซลล์พบว่า ให้ค่าที่สูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆของกลีเซอรอลดิบ และ นอกจากนี้เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงที่เวลา 84 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลดิบ 6 % พบว่ามีปริมาณกลีเซอรอลบางส่วนเหลือในน้ำหมัก (ประมาณ 9.44 กรัมต่อลิตร) ซึ่งน่าจะเพียงพอในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญของเซลล์ยีสต์ต่อไป

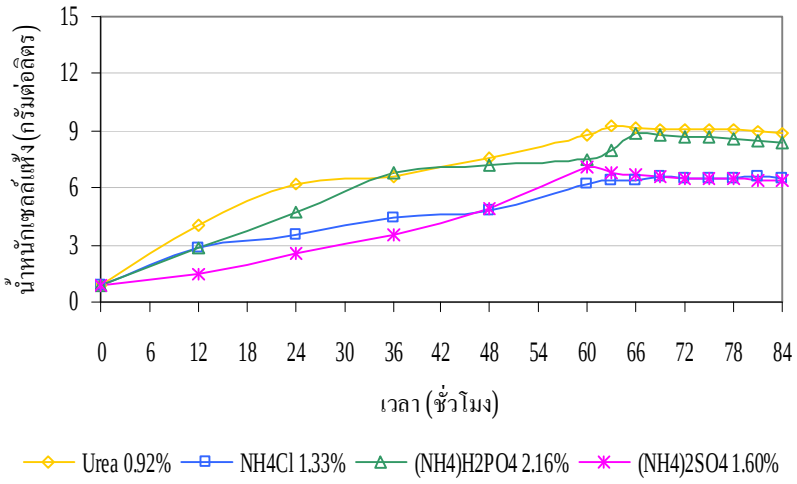
4.3 ศึกษาชนิด ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น ความเร็วรอบในการเขย่า และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha*

4.3.1 ศึกษาชนิด ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha*

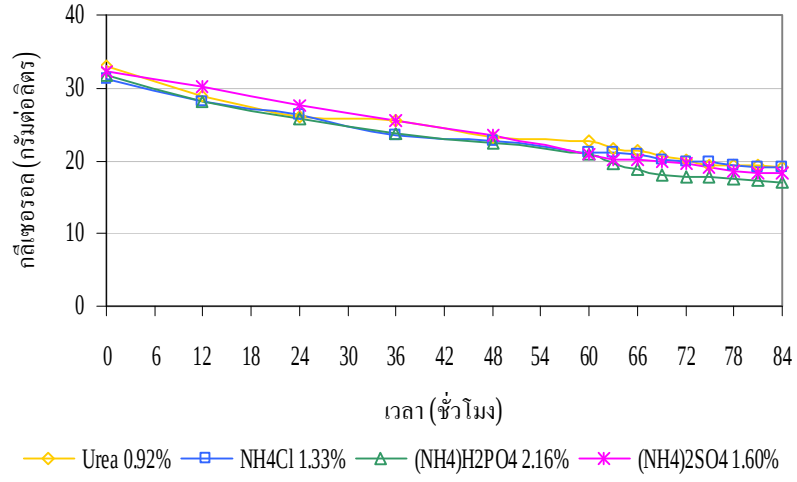
จากผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมจากการทดลองในหัวข้อ 4.2.3 คือ 6 % เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ประกอบด้วยสารสกัดจากยีสต์ 1 % เพปโทน 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรีย (Urea) แอมโมเนียมคลอไรด์ (Ammonium chloride) แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Ammonium dihydrogenphosphate) และแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate) แทนการใช้เพปโทน 2 % ที่เป็นองค์ประกอบเดิมในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยปรับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 4 แหล่ง ให้มีปริมาณของไนโตรเจนเท่ากับปริมาณไนโตรเจนในเพปโทน (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร) โดยที่ยังคงเติมสารสกัดจากยีสต์ 1 % ในอาหารเช่นเดิม ค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 6.0 จากนั้นเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบ

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

หมุน ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.21-4.24 และตารางที่ 4.10-4.11

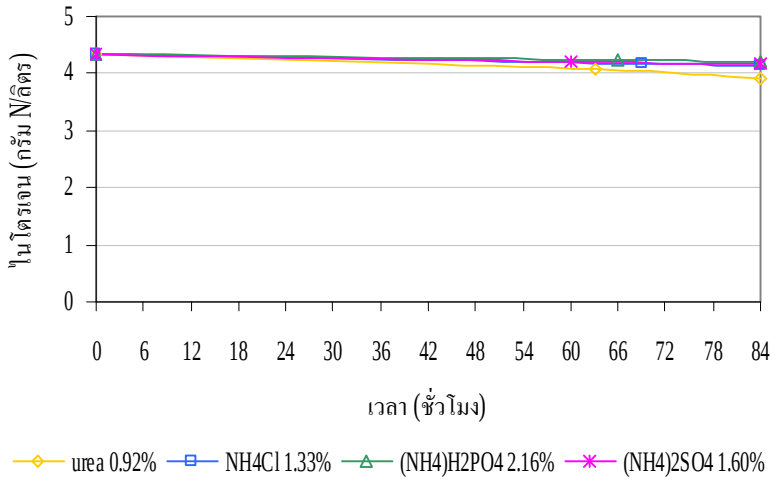


รูปที่ 4.21 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนแทนเพปโทน 2 %

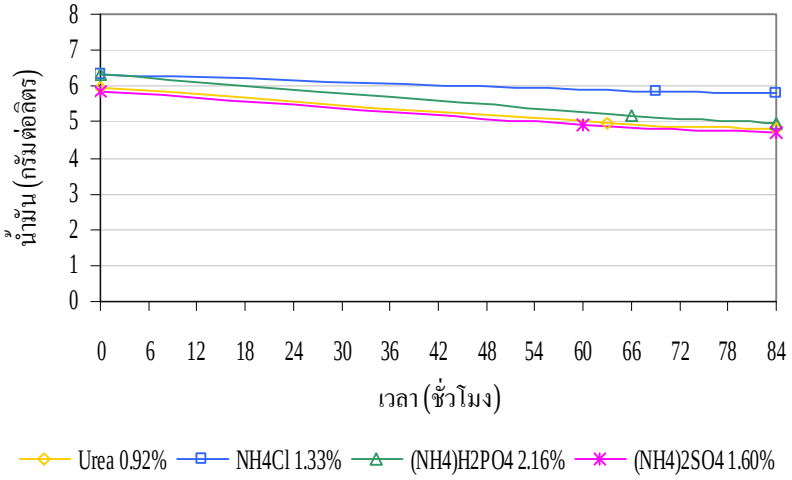


รูปที่ 4.22 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนแทนเพปโทน 2 %

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 4.23 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนแทนเพปโทน 2 %



รูปที่ 4.24 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนแทนเพปโทน 2 %

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.10 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนแทนเพปโทน 2 % พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

แหล่งไนโตรเจน (น้ำหนักต่อปริมาตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ต่อชั่วโมง)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$,) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
Urea 0.92 %	9.24 ±0.18	63	0.0287	0.7252	0.7252	0.1162	0.1162
NH_4Cl 1.33 %	6.57 ±0.26	69	0.0253	0.5017	0.4929	0.0764	0.0789
$(NH_4)H_2PO_4$ 2.16 %	8.84 ±0.37	66	0.0279	0.6109	0.6109	0.1076	0.1076
$(NH_4)_2SO_4$ 1.60 %	7.10 ±0.09	60	0.0339	0.5357	0.5357	0.1007	0.1007

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.11 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมักของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนแทนเพปโทน 2 % พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

แหล่งไนโตรเจน (w/v)	พีเอช (0- 84 ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)		ไนโตรเจน (กรัม N/ลิตร)		น้ำมัน (กรัมต่อลิตร)	
		เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป
Urea 0.92 %	6.01-6.29	32.9944	11.4439	4.3280	0.4175	5.9374	1.1068
NH_4Cl 1.33 %	6.05-6.22	31.2733	11.0852	4.3274	0.1800	5.7358	0.5234
$(NH_4)H_2PO_4$ 2.16 %	6.02-6.34	31.7088	12.9398	4.3280	0.1021	5.5477	1.4015
$(NH_4)_2SO_4$ 1.60 %	6.06-6.27	32.2734	11.2958	4.3280	0.1386	5.8594	1.1515

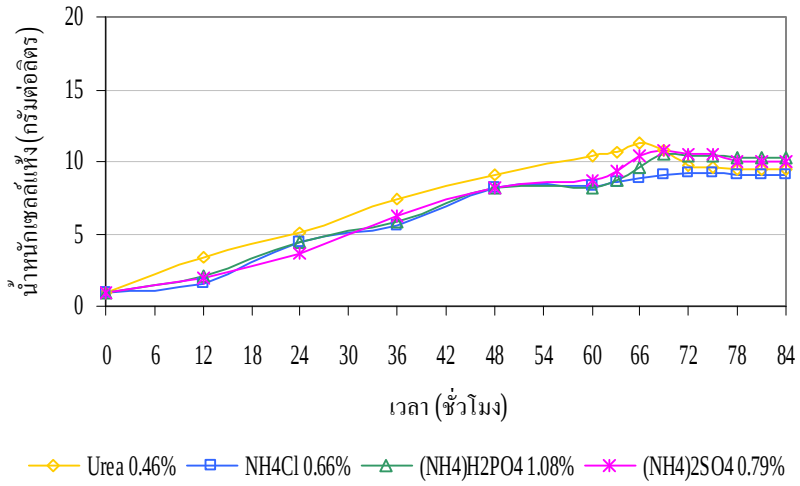
ผลจากการทดลองเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน แทนการใช้เพปโทน 2 % ในอาหาร พบว่า เซลล์มีการเจริญที่ค่อนข้างต่ำ โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งในช่วง 7.10 - 9.24 กรัมต่อลิตร โดยการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนเพปโทนให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ และเมื่อพิจารณาถึงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 0.0253 - 0.0339 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) มีค่าในช่วง 0.4929 - 0.7252 และให้อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) ในช่วง 0.0764 - 0.1162 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณไนโตรเจนที่ยีสต์ใช้ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์มีการใช้ไนโตรเจนไปเพียงเล็กน้อย คือ 0.1021 - 0.1800 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เมื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การใช้มีค่าในช่วงเพียง 2.36 - 4.16 % ส่วนในอาหารที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ยีสต์มีการใช้ไนโตรเจนได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจน 3 แหล่งที่กล่าวมา คือ ใช้ไนโตรเจนไป 0.4175 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร หรือคิดเป็น 9.65 % ส่วนปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ใช้ไปในอาหารที่มีการผันแปรแหล่งไนโตรเจนทั้ง 4 แหล่ง พบว่า ในอาหารที่มียูเรีย แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์ใช้น้ำมันไปในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือในช่วง 1.1068 - 1.1515 กรัมต่อลิตร ส่วนอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน ยีสต์มีการใช้น้ำมันไปค่อนข้างน้อย คือ 0.5234 กรัมต่อลิตร

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

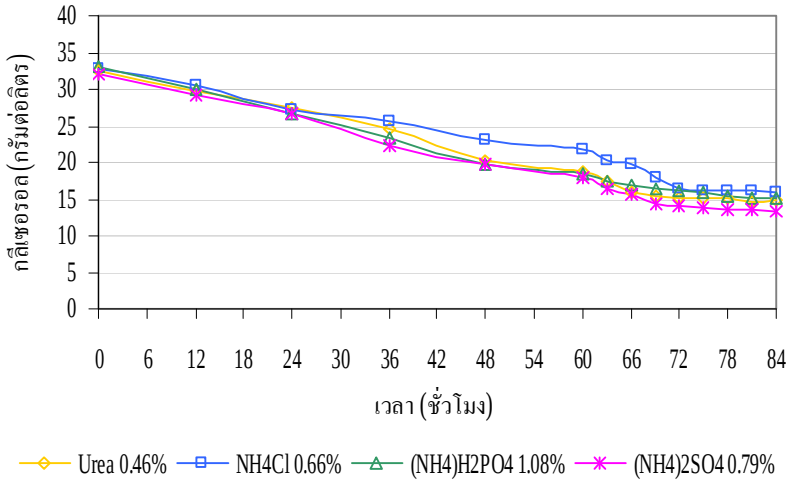
เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ที่เจริญในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีเพปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน กับอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีการผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างแทนเพปโทน จะเห็นว่าเซลล์มีการเจริญที่ค่อนข้างต่ำ คือ 7.10 - 9.24 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อาหารที่มีเพปโทน ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 15.63 กรัมต่อลิตร ซึ่งการที่ยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 เจริญได้ค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 4 แหล่งนั้นสูงเกิน ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ จึงทำให้ไนโตรเจนส่วนใหญ่เหลือในน้ำหมัก (90.35 - 97.64 %) ในขณะที่การเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ 1 % และเพปโทน 2 % มีไนโตรเจนเหลือเหลือในน้ำหมัก 36-48 %

จึงได้ทำการทดลองลดปริมาณของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 4 แหล่ง ได้แก่ ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแอมโมเนียมซัลเฟต แทนเพปโทน และปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนทั้ง 4 แหล่ง ให้มีปริมาณของไนโตรเจนเป็นครึ่งหนึ่งของไนโตรเจนในเพปโทน 2 % เพื่อดูแนวโน้มในการเจริญของเซลล์ยีสต์ โดยยังคงเติมสารสกัดจากยีสต์ 1 % ในอาหารเช่นเดิม ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 6.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.25-4.28 และตารางที่ 4.12-4.13

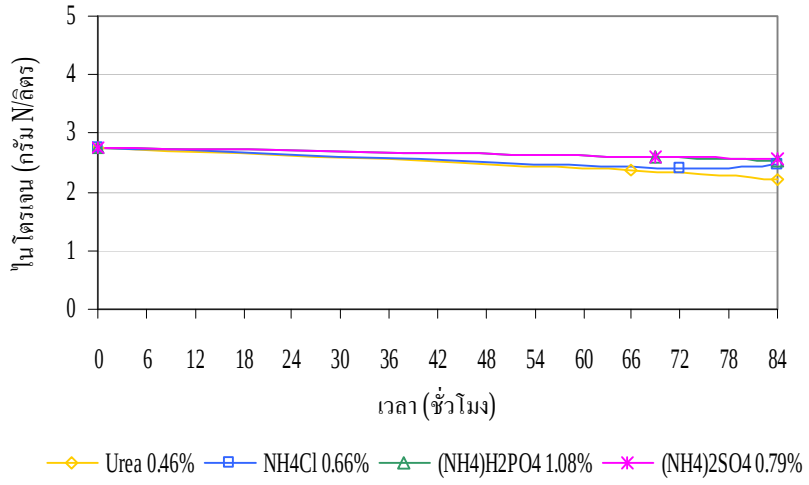


รูปที่ 4.25 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็นครึ่งหนึ่งของไนโตรเจนในเพปโทน 2 %

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

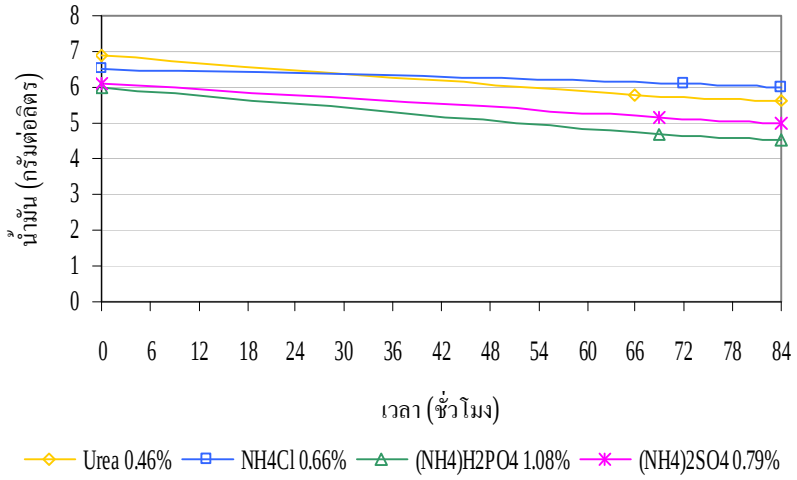


รูปที่ 4.26 ความสัมพันธ์ระหว่างกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็นครึ่งหนึ่งของไนโตรเจนในเพปโทน 2 %



รูปที่ 4.27 ความสัมพันธ์ระหว่างไนโตรเจนในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็นครึ่งหนึ่งของไนโตรเจนในเพปโทน 2 %

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 4.28 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำมันในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็นครึ่งหนึ่งของไนโตรเจนในเพปโทน 2 %

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.12 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันชนิดของแหล่งไนโตรที่ปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็นครึ่งหนึ่งของไนโตรเจนในเพปโทน 2 % พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

แหล่งไนโตรเจน (น้ำหนักต่อปริมาตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ต่อชั่วโมง)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$,) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
Urea 0.46 %	11.28 ±0.08	66	0.0336	0.6132	0.6333	0.1525	0.1539
NH_4Cl 0.66 %	9.21 ±0.06	72	0.0329	0.5691	0.6605	0.1212	0.1273
$(NH_4)H_2PO_4$ 1.08 %	10.46 ±0.13	69	0.0309	0.5444	0.5444	0.1324	0.1324
$(NH_4)_2SO_4$ 0.80 %	10.73 ±0.12	69	0.0340	0.5803	0.5840	0.1450	0.1441

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.13 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็นครึ่งหนึ่งของไนโตรเจนในเพปโทน 2 % พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

แหล่งไนโตรเจน (w/v)	พีเอช (0- 84 ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)		ไนโตรเจน (กรัม N/ลิตร)		น้ำมัน (กรัมต่อลิตร)	
		เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป
Urea 0.46 %	5.99-6.15	32.5963	16.5735	2.7599	0.5597	5.8971	1.2460
NH_4Cl 0.66 %	6.03-6.22	32.7074	16.2004	2.7599	0.2785	5.5482	0.5300
$(NH_4)H_2PO_4$ 1.08 %	6.01-6.21	33.1532	16.8536	2.7599	0.2119	5.9821	1.4646
$(NH_4)_2SO_4$ 0.80 %	6.06-6.24	32.0016	17.5416	2.7599	0.2029	5.7253	1.1645

ผลจากการทดลองเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน พบว่าเมื่อลดปริมาณไนโตรเจนในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ทั้ง 4 แหล่งพบว่า ยีสต์มีการเจริญที่ดีขึ้น โดยในอาหารที่ลดความเข้มข้นยูเรีย ให้น้ำหนักเซลล์แห้งจาก 9.24 เป็น 11.28 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ ให้น้ำหนักเซลล์แห้งจาก 6.57 เป็น 9.21 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ให้น้ำหนักเซลล์แห้งจาก 8.84 เป็น 10.46 กรัมต่อลิตร และในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต ให้น้ำหนักเซลล์แห้งจาก 7.10 เป็น10.73 กรัมต่อลิตร

และเมื่อพิจารณาถึงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) พบว่าเมื่อลดปริมาณไนโตรเจนในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ทั้ง 4 แหล่ง ทำให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงขึ้น โดยให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะเพิ่มจาก 0.0253-0.0339 เป็น 0.0309-0.0340 ต่อชั่วโมง ส่วนผลผลิตมวลเซลล์(yield) และอัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) ก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน คือ ผลผลิตมวลเซลล์เพิ่มจาก 0.4929-0.7252 เป็น 0.5444-0.6605 และอัตราผลผลิตมวลเซลล์เพิ่มจาก 0.0764-0.1162 เป็น 0.1212-0.1539 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

เมื่อพิจารณาปริมาณไนโตรเจนที่ยีสต์ใช้ไปในน้ำหมักนั้น พบว่าเมื่อลดปริมาณไนโตรเจนในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ทั้ง 4 แหล่ง ยีสต์มีการใช้ปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น โดย

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ยูเรีย 0.46 % ยีสต์ใช้ไนโตรเจน 0.5597 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร (จากเดิมใช้ไป 0.4175 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร) แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.66 % ยีสต์ใช้ไนโตรเจน 0.2785 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร (จากเดิมใช้ไป 0.1800 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร) แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ยีสต์ใช้ไนโตรเจน 0.2119 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร (จากเดิมใช้ไป 0.1021 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร) แอมโมเนียมซัลเฟต ใช้ไนโตรเจน 0.2029 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร (จากเดิมใช้ไป 0.1386 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ส่วนปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ใช้ในน้ำหมักนั้น พบว่ามีปริมาณการใช้ไม่แตกต่างจากเดิมมากนัก โดยมีการใช้ในช่วง 0.5300-1.4646 กรัมต่อลิตร

จะเห็นว่าเมื่อลดปริมาณไนโตรเจนในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ทั้ง 4 แหล่ง ยีสต์มีการเจริญได้ดีขึ้นเมื่อวัดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง อีกทั้งยังให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) สูงขึ้น อีกทั้งยังมีการใช้ไนโตรเจนในน้ำหมักได้สูงขึ้นเช่นกัน จึงทำการทดลองผันแปรความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ทั้ง 4 แหล่งแทนการใช้เพปโทน โดยผันแปรความเข้มข้นของยูเรีย ในช่วง 0-1.00 %, แอมโมเนียมคลอไรด์ ในช่วง 0-1.33 %, แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ในช่วง 0-2.16 % และ แอมโมเนียมซัลเฟต ในช่วง 0-1.60 % ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 6.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.14-4.21

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.14 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของยูเรียในช่วง 0.25-1.00 % แทนการใช้เพปโทน พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

แหล่งไนโตรเจน (น้ำหนักต่อปริมาตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ต่อชั่วโมง)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
Urea 0.25 %	8.83 ±0.54	69	0.0241	0.7084	0.7742	0.0994	0.1210
Urea 0.46 %	11.28 ±0.08	66	0.0317	0.6132	0.6333	0.1525	0.1539
Urea 0.50 %	11.68 ±0.10	69	0.0294	0.6307	0.6477	0.1474	0.1491
Urea 0.75 %	9.27 ±0.10	63	0.0296	0.6699	0.7192	0.1240	0.1313
Urea 0.92 %	9.24 ±0.07	63	0.0316	0.7252	0.7252	0.1162	0.1162
Urea 1.00 %	8.03 ±0.12	69	0.0246	0.7638	0.7630	0.0934	0.0946

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.15 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ในช่วง 0.20-1.33 % แทนการใช้เพปโทน พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

แหล่งไนโตรเจน (น้ำหนักต่อปริมาตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ต่อชั่วโมง)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
NH_4Cl 0.20 %	7.17 ±0.08	69	0.0258	0.4684	0.5023	0.0864	0.0879
NH_4Cl 0.40 %	8.93 ±0.22	69	0.0307	0.5710	0.6014	0.1185	0.1210
NH_4Cl 0.66 %	9.21 ±0.15	72	0.0298	0.5691	0.6605	0.1212	0.1273
NH_4Cl 0.80 %	7.20 ±0.07	63	0.0309	0.4603	0.4722	0.1049	0.1106
NH_4Cl 1.00 %	6.63 ±0.04	66	0.0239	0.4206	0.4206	0.0772	0.0772
NH_4Cl 1.33%	6.57 ±0.01	69	0.0230	0.5017	0.4929	0.0764	0.0789

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.16 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในช่วง 0.40-2.16 % แทนการใช้เพปโทน พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

แหล่งไนโตรเจน (น้ำหนักต่อปริมาตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ต่อชั่วโมง)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$,) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
$(NH_4)H_2PO_4$ 0.40 %	9.70 ±0.22	66	0.0330	0.5467	0.5467	0.1347	0.1347
$(NH_4)H_2PO_4$ 0.70 %	9.91 ±0.20	69	0.0306	0.5386	0.5386	0.1255	0.1255
$(NH_4)H_2PO_4$ 1.08 %	10.46 ±0.05	69	0.0309	0.5444	0.5444	0.1324	0.1324
$(NH_4)H_2PO_4$ 1.40 %	9.70 ±0.04	72	0.0322	0.5611	0.5529	0.1267	0.1271
$(NH_4)H_2PO_4$ 1.70 %	9.30 ±0.03	63	0.0342	0.5109	0.5109	0.1296	0.1296
$(NH_4)H_2PO_4$ 2.16 %	8.84 ±0.05	66	0.0279	0.6109	0.6109	0.1076	0.1076

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.17 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ในช่วง 0.30-1.60 % แทนการใช้เพปโทน พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

แหล่งไนโตรเจน (น้ำหนักต่อปริมาตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ต่อชั่วโมง)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$,) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
$(NH_4)_2SO_4$ 0.30 %	8.09 ±0.07	63	0.0331	0.5223	0.5223	0.1177	0.1177
$(NH_4)_2SO_4$ 0.50 %	10.14 ±0.12	69	0.0355	0.5369	0.5242	0.1364	0.1374
$(NH_4)_2SO_4$ 0.80 %	10.73 ±0.14	69	0.0354	0.5803	0.5840	0.1450	0.1441
$(NH_4)_2SO_4$ 1.00 %	10.34 ±0.01	66	0.0390	0.5757	0.5757	0.1477	0.1477
$(NH_4)_2SO_4$ 1.30 %	8.82 ±0.19	69	0.0336	0.5742	0.5804	0.1219	0.1235
$(NH_4)_2SO_4$ 1.60 %	7.10 ±0.10	60	0.0339	0.5357	0.5357	0.1007	0.1007

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.18 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมักของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของยูเรียในช่วง 0.25-1.00 % แทนการใช้เพปโทน พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

แหล่งไนโตรเจน (w/v)	พีเอช (0- 84 ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)		ไนโตรเจน (กรัม N/ลิตร)		น้ำมัน (กรัมต่อลิตร)	
		เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป
Urea 0.25 %	5.93-6.11	32.4273	10.6996	2.0444	0.5183	5.6856	1.2524
Urea 0.46 %	5.91-6.15	32.5963	16.5735	2.7599	0.5597	5.8971	1.2460
Urea 0.50 %	6.01-6.16	32.1937	15.8831	2.8967	0.5362	6.0136	1.0854
Urea 0.75 %	6.03-6.18	32.2894	11.5552	3.7491	0.4630	6.0775	1.1004
Urea 0.92 %	6.01-6.29	32.9944	11.4439	4.3280	0.4175	5.9374	1.1068
Urea 1.00 %	6.04-6.27	31.9688	9.5588	4.6014	0.4224	5.5933	1.1287

ตารางที่ 4.19 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมักของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ในช่วง 0.20-1.33 % แทนการใช้เพปโทน พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

แหล่งไนโตรเจน (w/v)	พีเอช (0- 84 ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)		ไนโตรเจน (กรัม N/ลิตร)		น้ำมัน (กรัมต่อลิตร)	
		เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป
NH_4Cl 0.20 %	5.97-6.15	32.6649	13.5542	1.6650	0.3492	6.0211	0.8108
NH_4Cl 0.40 %	6.01-6.24	33.1495	15.1460	2.1381	0.2122	5.8933	0.5357
NH_4Cl 0.66 %	6.03-6.22	32.7074	16.2004	2.7599	0.2785	5.5482	0.5300
NH_4Cl 0.80 %	6.03-6.23	32.6204	14.6337	3.0842	0.1975	5.9361	0.6468
NH_4Cl 1.00 %	6.05-6.26	31.8392	12.4625	4.0303	0.1777	5.9646	0.5076
NH_4Cl 1.33 %	6.05-6.22	31.2733	11.0852	4.3274	0.1800	5.7358	0.5234

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.20 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมักของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ในช่วง 0.40-2.16 % แทนการใช้เพปโทน พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

แหล่งไนโตรเจน (w/v)	พีเอช (0- 84 ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)		ไนโตรเจน (กรัม N/ลิตร)		น้ำมัน (กรัมต่อลิตร)	
		เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป
$(NH_4)H_2PO_4$ 0.40 %	6.03-6.15	31.4726	16.3998	1.7730	0.2100	5.6933	1.4768
$(NH_4)H_2PO_4$ 0.70 %	6.03-6.21	32.5119	17.3697	2.2088	0.1615	5.4907	1.4036
$(NH_4)H_2PO_4$ 1.08 %	6.01-6.21	33.1532	18.1060	2.7599	0.2119	5.9821	1.4646
$(NH_4)H_2PO_4$ 1.40 %	6.02-6.29	31.9070	16.0234	3.2256	0.1525	6.2149	1.4237
$(NH_4)H_2PO_4$ 1.70 %	6.02-6.31	21.6695	16.6046	3.6614	0.1257	5.8259	1.3316
$(NH_4)H_2PO_4$ 2.16 %	6.02-6.34	31.7088	14.6977	4.3280	0.1021	5.5477	1.4015

ตารางที่ 4.21 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมักของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ในช่วง 0.30-1.60 % แทนการใช้เพปโทน พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

แหล่งไนโตรเจน (w/v)	พีเอช (0- 84 ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)		ไนโตรเจน (กรัม N/ลิตร)		น้ำมัน (กรัมต่อลิตร)	
		เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป
$(NH_4)_2SO_4$ 0.30 %	6.06-6.20	33.3183	16.3070	1.7849	0.2822	5.3749	1.2786
$(NH_4)_2SO_4$ 0.50 %	6.05-6.24	31.6304	18.0953	2.1802	0.2014	5.6839	1.1597
$(NH_4)_2SO_4$ 0.80 %	6.06-6.27	32.0016	18.7730	2.7999	0.2029	5.7253	1.1645
$(NH_4)_2SO_4$ 1.00 %	6.06-6.28	31.6077	18.4602	3.1683	0.2867	6.0678	1.1898
$(NH_4)_2SO_4$ 1.30 %	6.05-6.30	31.7814	15.6910	3.7612	0.2838	5.6390	1.0829
$(NH_4)_2SO_4$ 1.60 %	6.06-6.27	32.2734	14.0598	4.3280	0.1386	5.8594	1.1515

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ผลจากการทดลองเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีผันแปรความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ทั้ง 4 แหล่ง พบว่า เมื่อผันแปรความเข้มข้นของยูเรียเป็น 0.25 %, 0.46 %, 0.50 %, 0.75%, 0.92 % และ 1.00 % พบว่ายีสต์เจริญได้ดีในยูเรีย ความเข้มข้น 0.46-0.50 % โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 11.28-11.68 กรัมต่อลิตร และให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ในช่วง 0.0241- 0.0317 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) มีค่าในช่วง 0.6132 – 0.7742 อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) มีค่าในช่วง 0.0934-0.1539 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อพิจารณาการใช้ไนโตรเจนในน้ำหมักพบว่าที่ความเข้มข้นของยูเรีย 0.46 และ 0.50 % ยีสต์มีการใช้ไนโตรเจนในน้ำหมักได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่นๆ โดยใช้ในไตรเจนในน้ำหมัก 0.5597 และ 0.5326 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ส่วนการใช้น้ำมันในน้ำหมัก พบว่ายีสต์มีการใช้น้ำมันไม่แตกต่างกันมากนัก คืออยู่ในช่วง 1.1004-1.2524 กรัมต่อลิตร

เมื่อผันแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เป็น 0.20%, 0.40 %, 0.66 %, 0.80%, 1.00 % และ 1.33 % พบว่ายีสต์เจริญได้ดีในแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.66 % โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 9.21 กรัมต่อลิตร ส่วนอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) มีค่าในช่วง 0.0230 – 0.0309 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) มีค่าในช่วง 0.4206 – 0.6605 อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) มีค่าในช่วง 0.0764 – 0.1273 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อพิจารณาการใช้ไนโตรเจนในน้ำหมักพบว่าที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.66 % ยีสต์มีการใช้ไนโตรเจนในน้ำหมักได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่นๆ โดยใช้ในไตรเจนในน้ำหมัก 0.2785 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ส่วนการใช้น้ำมันในน้ำหมัก พบว่ายีสต์มีการใช้น้ำมันไม่แตกต่างกันมากนัก คืออยู่ในช่วง 0.5076-0.8108 กรัมต่อลิตร

เมื่อผันแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 0.40%, 0.70 %, 1.08 %, 1.40%, 1.70 % และ 2.16 % พบว่ายีสต์เจริญได้ดีในแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.08 % โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 10.46 กรัมต่อลิตร ส่วนอัตราการเจริญจำเพาะ(μ)ไม่แตกต่างกันมากนัก คืออยู่ในช่วง 0.0279 – 0.0342 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) มีค่าในช่วง 0.5109 – 0.6109 อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) มีค่าในช่วง 0.1076-0.1347 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อพิจารณาการใช้ไนโตรเจนในน้ำหมักพบว่าที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.08 % ยีสต์มีการใช้ไนโตรเจนในน้ำหมักได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่นๆ โดยใช้ในไตรเจนในน้ำหมัก 0.2119 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ส่วนการใช้น้ำมันในน้ำหมัก พบว่า ยีสต์มีการใช้น้ำมันไม่แตกต่างกันมากนัก คืออยู่ในช่วง 1.3316-1.4768 กรัมต่อลิตร

เมื่อผันแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เป็น 0.30 %, 0.50 %, 0.80 %, 1.00 %, 1.30 % และ 1.60 % พบว่ายีสต์เจริญได้ดีในแอมโมเนียมซัลเฟต 0.80 % โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 10.73 กรัมต่อลิตร ส่วนอัตราการเจริญจำเพาะ (μ)ไม่แตกต่างกันมากนัก คืออยู่ในช่วง 0.0331 – 0.0390 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) มีค่าในช่วง 0.5223 – 0.5804 อัตราผลผลิตมวลเซลล์

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

(productivity) มีค่าในช่วง 0.1007-0.1477 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อพิจารณาการใช้ไนโตรเจนในน้ำหมักพบว่าที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 1.00 % ยีสต์มีการใช้ไนโตรเจนในน้ำหมักได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่นๆ โดยใช้ในไตรเจนในน้ำหมัก 0.2867 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ส่วนการใช้น้ำมันในน้ำหมัก พบว่ายีสต์มีการใช้น้ำมันไม่แตกต่างกันมากนัก คืออยู่ในช่วง 1.0829-1.2786 กรัมต่อลิตร

จากการทดลองผันแปรชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 4 ชนิดแทนเพปโทนในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเห็นว่าการใช้ยูเรียความเข้มข้น 0.46-0.50 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) แทนการใช้เพปโทน ยีสต์มีการเจริญค่อนข้างดีกว่า แหล่งไนโตรเจนอื่นๆ คือ ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 11.28-11.68 กรัมต่อลิตร แต่ก็ยังมีการเจริญไม่ดีนัก เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของยีสต์ในอาหารสูตรดัดแปลง ที่มีเฉพาะกลีเซอรอล 6% และสารสกัดจากยีสต์ 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 10.72 กรัมต่อลิตร และถึงแม้ว่าจะมีการเสริมไบโอตินลงไปในอาหารที่มียูเรีย เพื่อให้เซลล์เจริญได้ดีขึ้น ที่แสดงไว้ในรายงานของ Berry และ Brown [62] แต่ก็ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพียง 12.64 กรัมต่อลิตร

การใช้แหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ทั้ง 4 แหล่งในอาหารเลี้ยงเชื้อ แม้จะมีการปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับไนโตรเจนในเพปโทน แต่ก็ทำให้ขาดวิตามิน กรดอะมิโน และแร่ธาตุต่างๆที่สำคัญในเพปโทนไป (ดังแสดงรายละเอียดในภาคผนวก ฉ) ส่งผลให้ยีสต์มีการเจริญที่ค่อนข้างต่ำ อีกทั้งการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแอมโมเนียมซัลเฟต แทนเพปโทนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยังส่งผลให้ยีสต์มีการเจริญที่ลดลงเมื่อเทียบกับการเจริญในอาหารที่มีเฉพาะกลีเซอรอลดิบ และสารสกัดจากยีสต์

นอกจากนี้ยังมีข้อมูลการทดลองเบื้องต้น เกี่ยวกับการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่ประกอบด้วย กลีเซอรอลดิบ 6% สารสกัดจากยีสต์ 2% และเพปโทน 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 อุณหภูมิในการเจริญ 37 องศาเซลเซียส เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 84 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับการเจริญของยีสต์ในอาหารที่ประกอบด้วย กลีเซอรอลดิบ 6% สารสกัดจากยีสต์ 1 % และเพปโทน 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังแสดงในตารางที่ 4.22

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

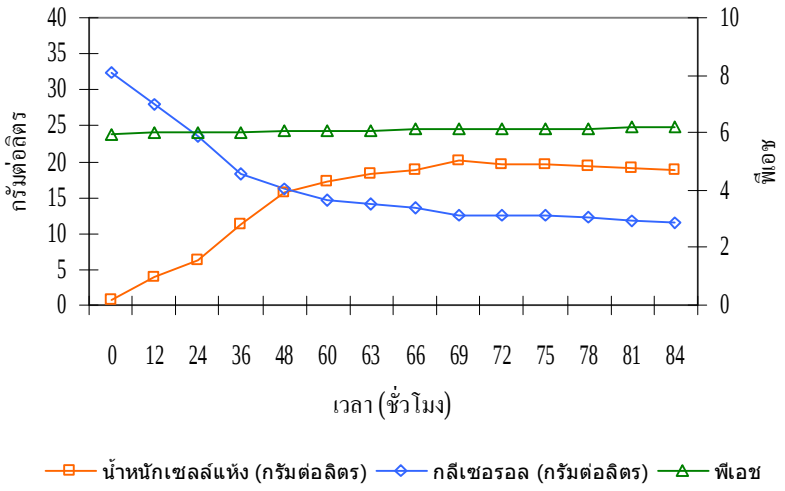
ตารางที่ 4.22 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ จาก 1 เป็น 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)

สูตรอาหาร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลีเซอรอลที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)
6% CG+1%YE+2%Pep	15.63 ±0.12	20.8120
6% CG+2%YE+2%Peptone	24.58 ±0.08	28.5350

ซึ่งจากข้อมูลเบื้องต้นที่เคยทดลองมาถึงการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ จาก 1 เป็น 2 % พบว่าให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจาก 15.63 เป็น 24.58 กรัมต่อลิตร และใช้กลีเซอรอลในน้ำหมักสูงขึ้น จาก 20.8120 เป็น 28.5350 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากการเจริญของยีสต์ที่เพิ่มขึ้นอาจมาจากองค์ประกอบที่เพิ่มขึ้นในสารสกัดจากยีสต์ เนื่องจากในสารสกัดจากยีสต์ประกอบด้วยไนโตรเจน คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ ที่สำคัญต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ โดยวิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ ของเอนไซม์ในวิถีเมแทบอลิซึม ส่งผลให้ยีสต์มีการเจริญได้ดี นอกจากนี้ กรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ ส่วนใหญ่ ในสารสกัดจากยีสต์ จะมีปริมาณที่มากกว่าในเพปโทน ดังแสดงรายละเอียดขององค์ประกอบในในสารสกัดจากยีสต์และในเพปโทน ในภาคผนวก ฉ อีกทั้งสารสกัดจากยีสต์ ยังมีราคาที่ถูกกว่าเพปโทน

จึงทำการทดลองเพิ่มปริมาณสารสกัดจากยีสต์ แทนการใช้เพปโทน รวมถึงแหล่งไนโตรเจนที่เคยทดลองมาทั้ง 4 แหล่ง โดยทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารที่ประกอบด้วยกลีเซอรอลดิบ 6 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 อุณหภูมิในการเจริญ 37 องศาเซลเซียส เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 84 ชั่วโมง ให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.29 และตารางที่ 4.23

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 4.29 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กลีเซอรอลในน้ำหมัก และพีเอช กับเวลาในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

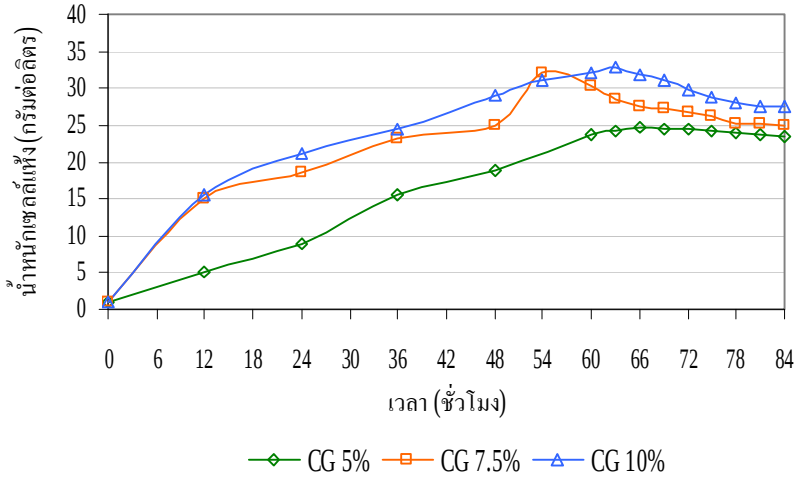
ตารางที่ 4.23 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 6.0 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเปรียบเทียบกับการเจริญในอาหารสูตรดัดแปลงอื่นๆ

สูตรอาหาร	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ต่อชั่วโมง)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$,) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
6% CG+1%YE+2%Pep	15.63 ±0.12	66	0.0412	0.6930	0.7009	0.2232	0.2282
6% CG+1%YE+0.5%Urea	11.68 ±0.10	69	0.0294	0.6307	0.6477	0.1474	0.1491
6%CG+1%YE+0.5%Urea +0.3 mg/l Biotin	12.64 ±0.06	66	0.0370	0.7463	0.7463	0.1725	0.1725
6%CG+2%YE	20.03 ±0.19	69	0.0423	0.9955	0.9955	0.2818	0.2818

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

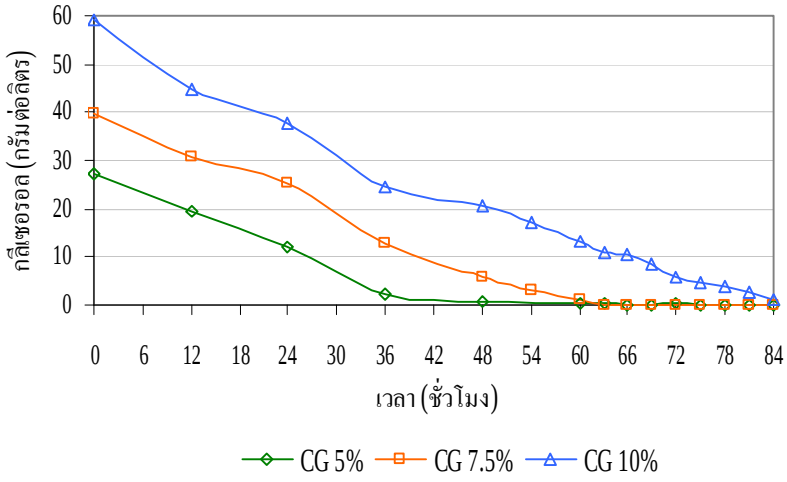
ผลจากการทดลองเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่ประกอบด้วยกลีเซอรอลดิบ 6 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % พบว่า ยีสต์มีการเจริญค่อนข้างดีเมื่อเทียบกับอาหารสูตรดัดแปลงอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.23 โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 20.03 กรัมต่อลิตร ให้อัตราการเจริญจำเพาะ(μ) 0.0423 ต่อชั่วโมง ซึ่งใกล้เคียงกับการเจริญในอาหารสูตรดัดแปลง ที่มีเพปโทน (อัตราการเจริญจำเพาะ 0.0412) อีกทั้งยังให้ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) และอัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) ที่ค่อนข้างสูง คือ 0.9955 และ 0.2818 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ในขณะเดียวกันได้นำยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL Y-2214 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก United State Department of Agriculture (USDA) ประเทศสหรัฐอเมริกา มาทำการทดลองเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิมคือ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ประกอบด้วยกลีเซอรอลดิบ และสารสกัดจากยีสต์ 2% โดยทำการทดลองผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ ในช่วง 5-10 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยอ้างอิงจากการทดลองในหัวข้อ 4.2.3 ถึงการผันแปรความเข้มข้นกลีเซอรอลดิบ ปรับพีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 อุณหภูมิในการเจริญ 37 องศาเซลเซียส เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 84 ชั่วโมง ดังแสดงผลในรูปที่ 4.30-4.33 และตารางที่ 4.24-4.25

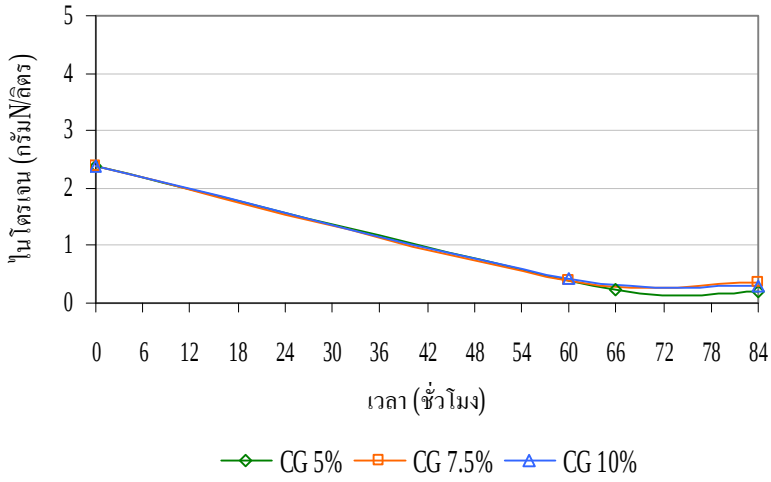


รูปที่ 4.30 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีสารสกัดจากยีสต์ 2 % เป็นแหล่งไนโตรเจน และผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเป็น 5.0, 7.5 และ 10.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

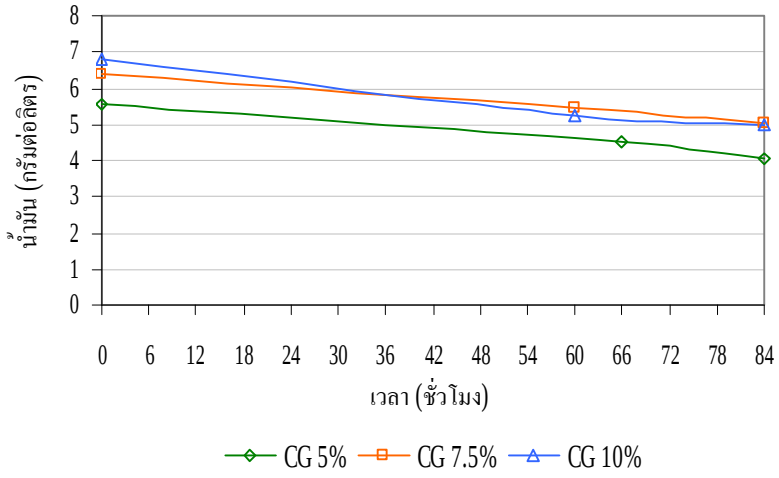


รูปที่ 4.31 ความสัมพันธ์ระหว่างกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีสารสกัดจากยีสต์ 2 % เป็นแหล่งไนโตรเจน และผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเป็น 5.0, 7.5 และ 10.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)



รูปที่ 4.32 ความสัมพันธ์ระหว่างไนโตรเจนในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีสารสกัดจากยีสต์ 2 % เป็นแหล่งไนโตรเจน และผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเป็น 5.0, 7.5 และ 10.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 4.33 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำมันในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีสารสกัดจากยีสต์ 2 % เป็นแหล่งไนโตรเจน และผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเป็น 5.0, 7.5 และ 10.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.24 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีสารสกัดจากยีสต์ 2 % เป็นแหล่งไนโตรเจน และผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเป็น 5.0, 7.5 และ 10.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

กลีเซอรอลดิบ (%)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ต่อชั่วโมง)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$,) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
5.0%	24.68 ±0.47	66	0.0449	0.8258	0.8258	0.3720	0.3720
7.5%	32.00 ±0.48	54	0.0513	0.7132	0.7132	0.5026	0.5026
10%	32.77 ±0.30	63	0.0451	0.6256	0.6256	0.4489	0.4489

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.25 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีสารสกัดจากยีสต์ 2 % เป็นแหล่งไนโตรเจน และผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเป็น 5.0, 7.5 และ 10.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

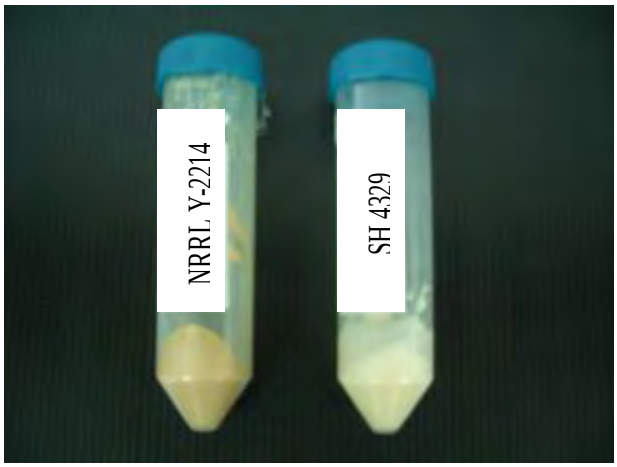
กลีเซอรอลดิบ (%)	พีเอช (0- 84 ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)		ไนโตรเจน (กรัม N/ลิตร)		น้ำมัน (กรัมต่อลิตร)	
		เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป
5.0%	5.92-6.08	27.4582	27.1329	2.3840	2.1933	5.5741	1.5011
7.5%	6.10-5.75	39.6687	36.6898	2.3840	2.0212	6.1400	1.8200
10%	5.94-6.07	59.0343	48.1646	2.3840	2.1680	6.8257	1.2185

รูปที่ 4.34 การเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เวลา 36 ชั่วโมง ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลจากการทดลองเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ เป็น 5.0, 7.5 และ 10 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งแสดงตัวอย่างลักษณะของเซลล์ในอาหารสูตรดัดแปลง ดังรูปที่ 4.34

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

โดยเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ NRRL Y-2214 จะลอยที่ผิวของอาหารในช่วงแรกของการเจริญ จึงต้องทำการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งด้วยการกรองผ่านกระดาษ GF/C แทนการวัดค่าความขุ่นแล้วเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาน้ำหนักเซลล์ นอกจากนี้เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ NRRL Y-2214 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน จะมีสีเข้มกว่าสายพันธุ์ SH4329 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.35 และพบว่าน้ำหมักที่เหลือหลังการเลี้ยงด้วยยีสต์สายพันธุ์ NRRL Y-2214 มีสีอ่อนลง และจากการเจริญของเซลล์ยีสต์พบว่า ยีสต์มีแนวโน้มการเจริญเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ โดยที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ 5 % ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 24.68 กรัมต่อลิตร ที่ 7.5 % ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 32.00 กรัมต่อลิตร และที่ 10 % ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 32.77 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.35 เซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 และ *H. polymorpha* SH4329 ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) พบว่าที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ 7.5 % ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด คือ 0.0513 ต่อชั่วโมง ส่วนที่ 5 และ 10 % ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่ใกล้เคียงกัน คือ 0.0449 และ 0.0451 ต่อชั่วโมง และเมื่อพิจารณาค่าผลผลิตมวลเซลล์ (yield) พบว่า ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลดิบ 5 % ให้ผลผลิตมวลเซลล์ 0.8258 ส่วนที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ 7.5 % ให้ผลผลิตมวลเซลล์ 0.7132 และที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลดิบ 10 % ให้ผลผลิตมวลเซลล์ 0.6256 ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มลดลง เมื่อพิจารณาค่าอัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) พบว่าที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลดิบ 7.5 % ให้อัตราผลผลิตมวลเซลล์สูงสุด คือ

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

0.5026 ส่วนที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ 5 และ 10 % ให้อัตราผลผลิตมวลเซลล์ 0.3720 และ 0.4489 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

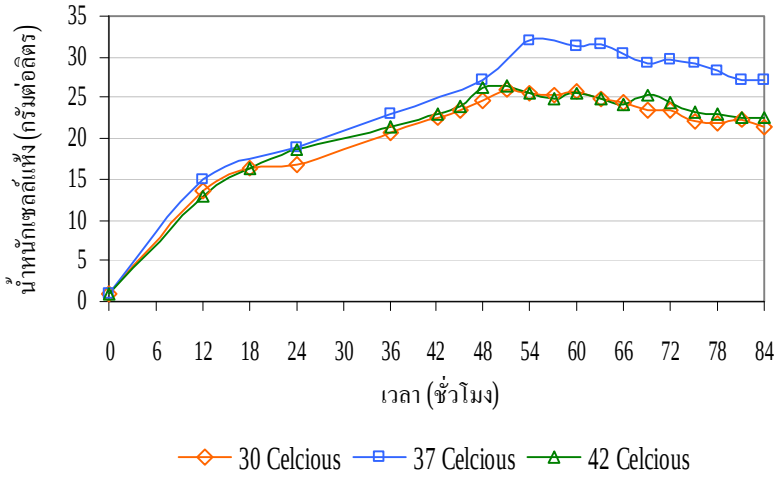
เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมักพบว่า ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เจริญในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีผันแปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ เป็น 5.0, 7.5 และ 10 % มีการใช้ไนโตรเจนในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ 2.1933, 2.0212 และ 2.1680 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร จากปริมาณเริ่มต้น 2.3840 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในน้ำหมักพบว่า ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ 7.5 % ยีสต์มีการใช้น้ำมันในน้ำหมักได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่นๆ คือ 1.8200 กรัมต่อลิตร ส่วนที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลดิบ 5 และ 10 % ยีสต์ใช้น้ำมันในน้ำหมัก 1.5011 และ 1.2185 กรัมต่อลิตร

และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ SH4329 กับ สายพันธุ์ NRRL Y-2214 จะเห็นว่า ยีสต์สายพันธุ์ NRRL Y-2214 มีการเจริญที่ดีกว่า โดยเปรียบเทียบการเจริญในอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบ และสารสกัดจากยีสต์ 2 % ซึ่งสายพันธุ์ NRRL Y-2214 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 32.00 กรัมต่อลิตร (กลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 %) ในขณะที่สายพันธุ์ SH4329 ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 20.03 กรัมต่อลิตร (กลีเซอรอลดิบ 6 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 %) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ผลผลิตมวลเซลล์ อัตราผลผลิตมวลเซลล์ ตลอดจนปริมาณไนโตรเจนและน้ำมันที่ยีสต์ใช้ไป ก็พบว่ายีสต์สายพันธุ์ NRRL Y-2214 ให้ค่าต่างๆดังที่กล่าวมาสูงกว่าสายพันธุ์ SH4329 ดังนั้นจึงได้ทำการเลือกยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL Y-2214 เพื่อทำการทดลองในขั้นตอนต่อไปแทนการใช้ยีสต์สายพันธุ์เดิม

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

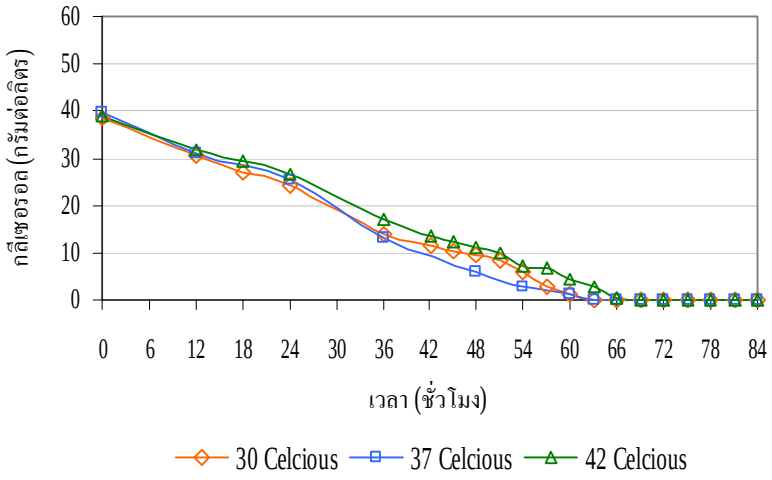
4.3.2 ศึกษาอุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha*

ทำการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 6.0 และทำการผันแปรอุณหภูมิในการเลี้ยง คือ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 84 ชั่วโมง แล้ววัดการเจริญในรูปน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจน และน้ำมันที่เหลือในน้ำหมัก เพื่อนำข้อมูลมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กับเวลา ดังรูปที่ 4.36-4.40 จากนั้นคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) ดังแสดงในตารางที่ 4.26 -4.27

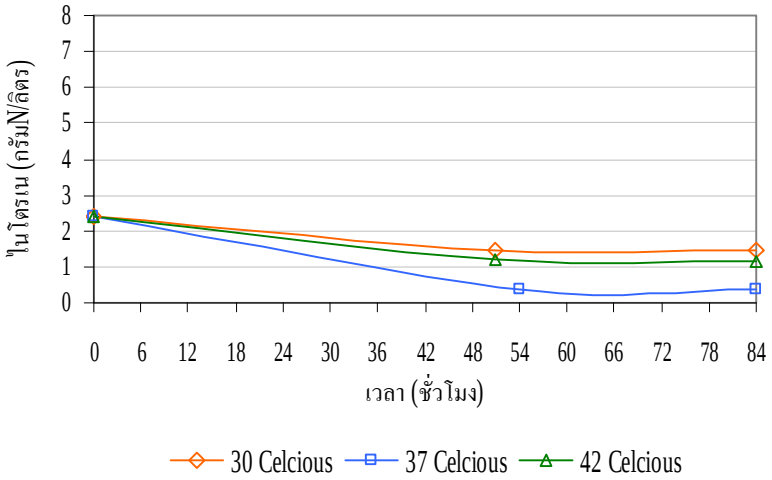


รูปที่ 4.36 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรอุณหภูมิในการเลี้ยง 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

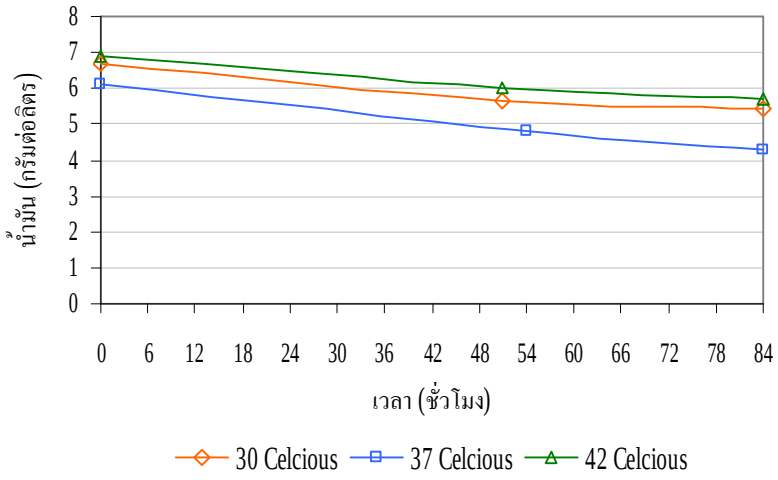


รูปที่ 4.37 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรอุณหภูมิในการเลี้ยง 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส

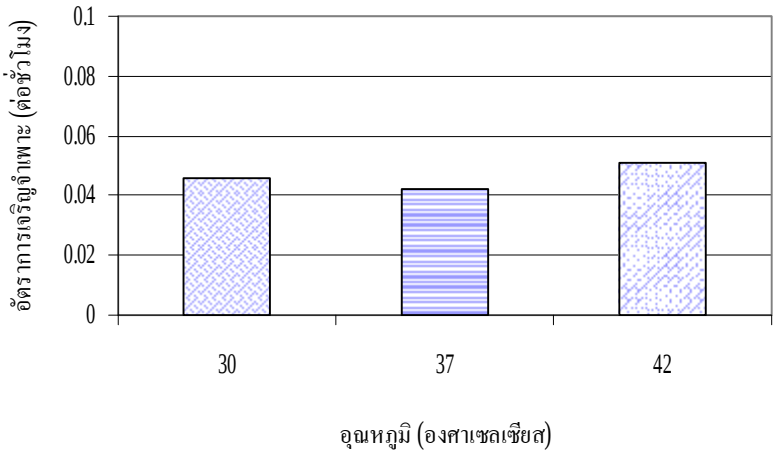


รูปที่ 4.38 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรอุณหภูมิในการเลี้ยง 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 4.39 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรอุณหภูมิในการเลี้ยง 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.40 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.26 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที โดยผันแปรอุณหภูมิ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ต่อชั่วโมง)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$,) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
30	26.03 ±0.23	51	0.0461	0.6724	0.6724	0.4120	0.4120
37	32.00 ±0.48	54	0.0513	0.7132	0.7132	0.5026	0.5026
42	26.43 ±0.27	51	0.0509	0.7223	0.7306	0.4326	0.4462

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.27 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที โดยผันแปรอุณหภูมิ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	พีเอช (0- 84 ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)		ไนโตรเจน (กรัม N/ลิตร)		น้ำมัน (กรัมต่อลิตร)	
		เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป
30	6.08-5.70	38.4198	30.1257	2.4022	0.9419	6.6740	1.2281
37	6.10-5.75	39.6687	36.6898	2.3840	2.0212	6.1400	1.8200
42	6.05-5.71	38.8160	28.7368	2.4147	1.2555	6.8933	1.1860

จากผลการทดลองเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่ผันแปรอุณหภูมิ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยีสต์มีการเจริญได้ดีที่สุดเมื่อวัดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยให้น้ำหนักเซลล์ 32 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 54 ชั่วโมงส่วนการเจริญที่อุณหภูมิ 30 และ 42 องศาเซลเซียสให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ใกล้เคียงกัน คือ 26.03 และ 26.43 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 51 ชั่วโมงเหมือนกัน และเมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) พบว่ามีแนวโน้มเช่นเดียวกับน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เซลล์ยีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.0513 ต่อชั่วโมง ส่วนการเจริญที่ อุณหภูมิ 30 และ 42 องศาเซลเซียส ค่าอัตราการเจริญจำเพาะจะลดลง คือ 0.0461 และ 0.0509 ต่อชั่วโมง

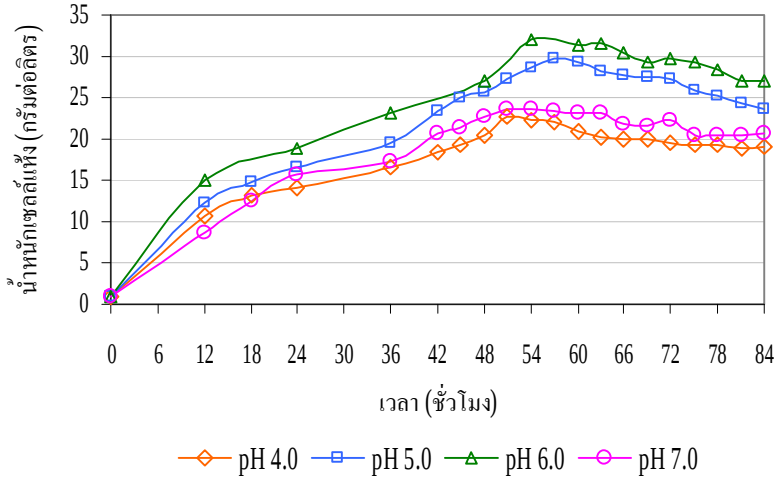
ถึงแม้ว่ายีสต์ *H. polymorpha* จะเป็นยีสต์ที่สามารถเจริญในอุณหภูมิค่อนข้างกว้าง คือ 15-50 องศาเซลเซียส [99] และจัดอยู่ในกลุ่ม Thermophilic yeast แต่อุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการเจริญจะอยู่ในช่วง 37-40 องศาเซลเซียส [14] โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง จะส่งผลโดยตรงต่อโครงสร้างต่างๆและเอนไซม์ในเซลล์ยีสต์ ในการทดลองพบว่ายีสต์ *H. polymorpha* เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยพิจารณาจาก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) และ อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) ปริมาณไนโตรเจนและน้ำมันที่ถูกยีสต์ใช้ไป (ในตารางที่ 4.27) ส่วนการเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส พบว่า มีการเจริญลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจาก ประสิทธิภาพที่ลดลงของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการออกซิไดซ์ต่างๆ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport system) และเอนไซม์ที่เปลี่ยนพลังงานอิสระที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นไปเป็น ATP นอกจากนี้การเจริญที่อุณหภูมิสูงเกินกว่าที่เหมาะสม ส่งผลให้เกิดการลดลงของโปรตีน อาร์เอ็นเอ ดีเอ็นเอ และกรดอะมิโนอิสระในเซลล์

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ยิ่งกว่านั้นอุณหภูมิสูงเพิ่มความแข็งแกร่งของเยื่อหุ้มเซลล์เช่นเดียวกับอิทธิพลของแรงดันออสโมซิส เป็นผลให้การซึมผ่านของตัวถูกละลายและสารอาหารที่จำเป็นเข้าสู่เซลล์ลดลง นอกจากนั้นที่อุณหภูมิสูงทำให้กิจกรรมการหายใจจะลดลงมาก[96] ส่วนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนั้น ก็เป็นช่วงอุณหภูมิที่ยีสต์ *H. polymorpha* สามารถเจริญได้ แต่เป็นช่วงอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญมากนัก เมื่อเทียบกับที่ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้จัดเป็นยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิสูง

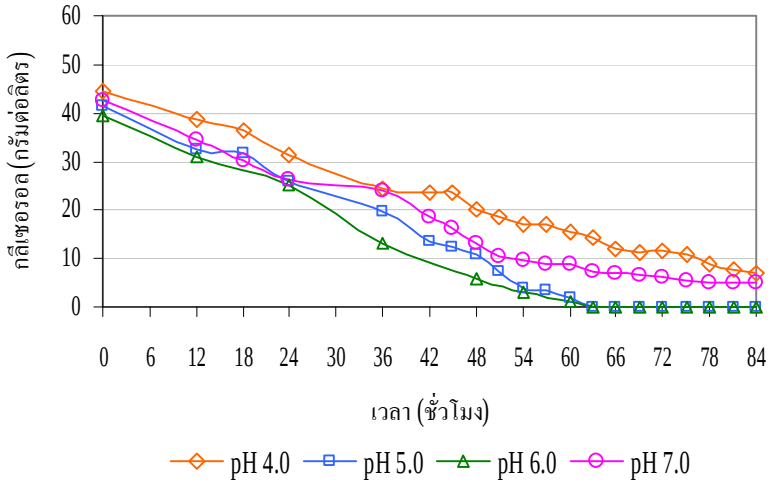
4.3.3 ศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha*

ทำการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น 4, 5, 6 และ 7 อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 84 ชั่วโมง แล้ววัดการเจริญในรูปน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจน และน้ำมันที่เหลือในน้ำหมัก เพื่อนำข้อมูลมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กับเวลา ดังรูปที่ 4.40-4.44 จากนั้นคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) ดังแสดงในตารางที่ 4.28-4.29

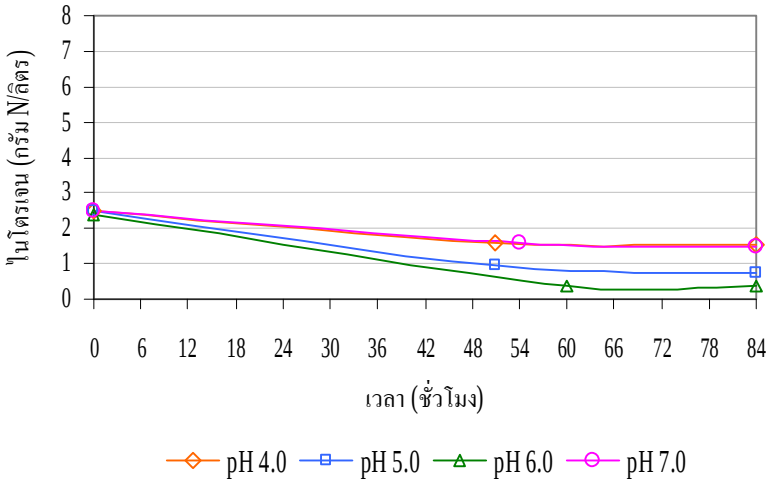


รูปที่ 4.41 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

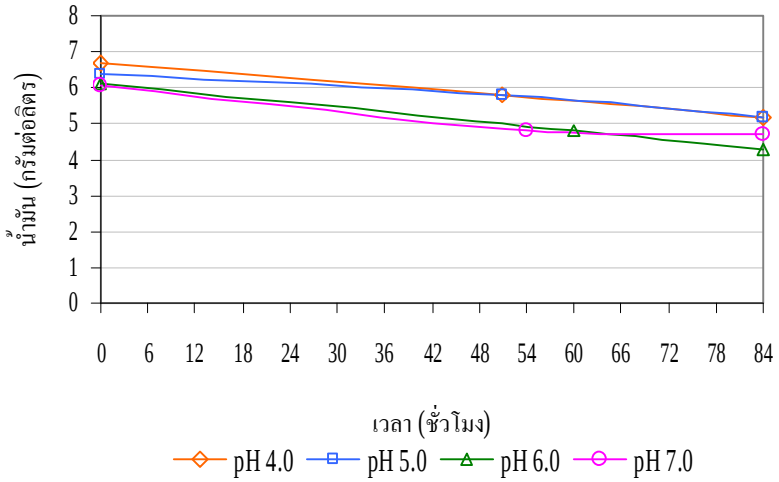


รูปที่ 4.42 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0

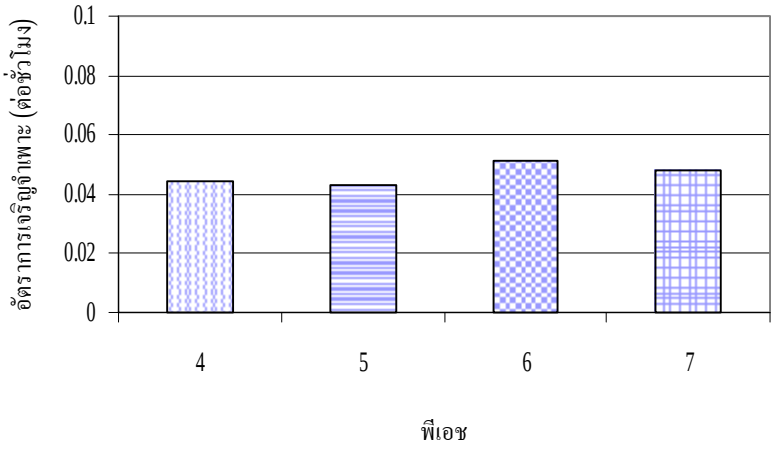


รูปที่ 4.43 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 4.44 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0



รูปที่ 4.45 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ที่พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 4, 5, 6 และ 7 ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.28 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเจริญ 37 องศาเซลเซียส โดยผันแปรพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0

พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ต่อชั่วโมง)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$,) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
4	22.74 ±0.32	51	0.0446	0.6856	0.6856	0.3504	0.3504
5	29.88 ±0.15	57	0.0430	0.6653	0.6653	0.4517	0.4517
6	32.00 ±0.48	54	0.0513	0.7132	0.7132	0.5026	0.5026
7	23.72 ±0.06	54	0.0482	0.6697	0.6967	0.3968	0.4088

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.29 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 4, 5, 6 และ 7

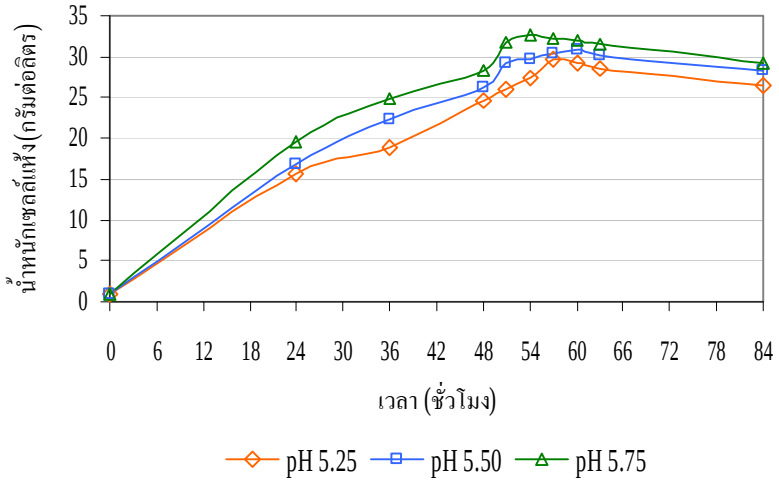
พีเอชเริ่มต้นในอาหาร	พีเอช (0- 84 ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)		ไนโตรเจน (กรัม N/ลิตร)		น้ำมัน (กรัมต่อลิตร)	
		เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป
pH 4.0	3.63-3.91	41.4262	26.0073	2.5004	0.9972	5.6800	1.5050
pH 5.0	4.71-4.95	41.5022	38.0872	2.5004	1.7760	5.3550	1.4600
pH 6.0	6.10-5.75	39.6687	36.6898	2.3840	2.0212	6.1400	1.8200
pH 7.0	6.80-6.98	42.4758	32.8854	2.5004	1.0148	5.0750	1.3650

จากผลการทดลองเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่ผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 4, 5, 6 และ 7 พบว่าการเจริญของยีสต์ในช่วง 4-6 มีแนวโน้มของการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อวัดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ 22.74, 29.88 และ 32.00 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 51, 57 และ 54 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของยีสต์ในช่วง 4-6 ก็มีแนวโน้มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน คือ 0.0446, 0.0430 และ 0.0513 ต่อชั่วโมง แต่เมื่อยีสต์เจริญที่พีเอช 7.0 จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งและ อัตราการเจริญจำเพาะลดลง คือ 23.72 กรัมต่อลิตร และ 0.0482 ต่อชั่วโมง

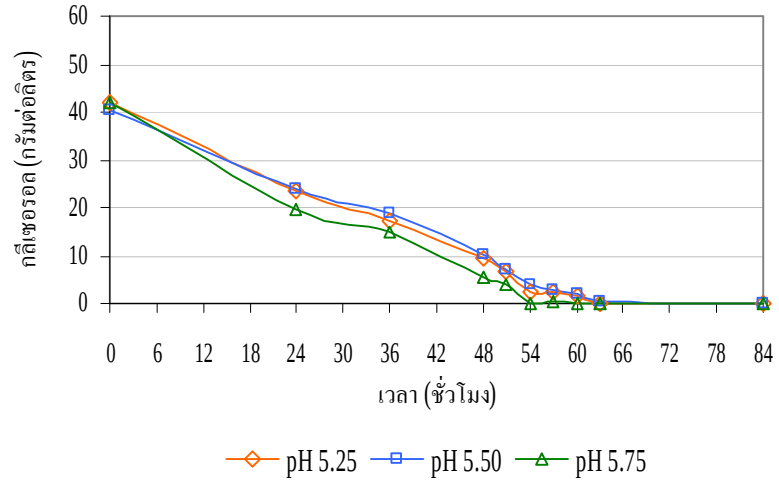
และเมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ รวมถึงค่าอื่นๆ ได้แก่ ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) ปริมาณไนโตรเจนและน้ำมันที่ยีสต์ใช้ (ดังแสดงในตารางที่ 4.28 และ 4.29) จะเห็นว่า พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 5-6 เป็นช่วงที่ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 เจริญได้ค่อนข้างดีเมื่อเปรียบเทียบกับพีเอชอื่นๆ

จึงทำการทดลองเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหาร คือ 5.25, 5.50 และ 5.75 เพื่อศึกษาถึงค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของยีสต์ชนิดนี้ ซึ่งแสดงผลการทดลองดังรูปที่ 4.45-4.49 และตารางที่ 4.30-4.31

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

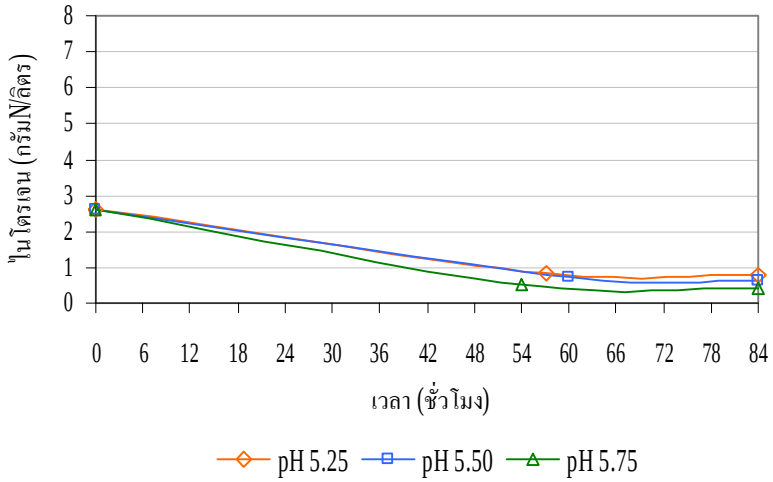


รูปที่ 4.46 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 5.25, 5.50 และ 5.75

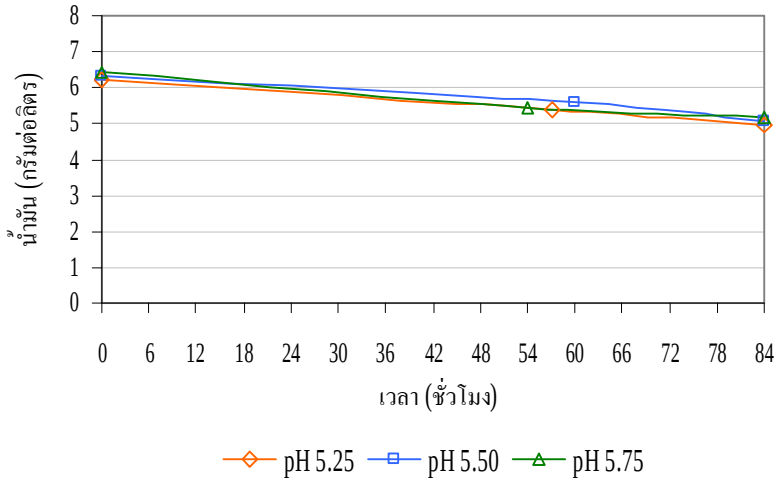


รูปที่ 4.47 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 5.25, 5.50 และ 5.75

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

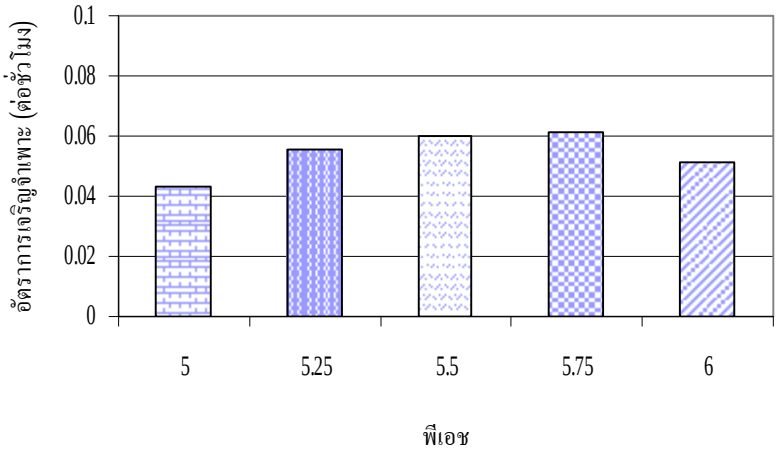


รูปที่ 4.48 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 5.25, 5.50 และ 5.75



รูปที่ 4.49 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 5.25, 5.50 และ 5.75

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 4.50 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ที่พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 5.0, 5.25, 5.50, 5.75 และ 6.0 ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.30 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 5.0, 5.25, 5.50, 5.75 และ 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเจริญ 37 องศาเซลเซียส

พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ต่อชั่วโมง)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$,) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
5.0	29.88 ±0.15	57	0.0430	0.6653	0.6653	0.4517	0.4517
5.25	29.64 ±0.42	57	0.0554	0.6923	0.6923	0.4797	0.4797
5.50	30.76 ±0.17	60	0.0601	0.7536	0.7936	0.4948	0.5235
5.75	32.78 ±0.06	54	0.0613	0.7634	0.7634	0.5664	0.5664
6.0	32.00 ±0.48	54	0.0513	0.7132	0.7132	0.5026	0.5026

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.31 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 5.0, 5.25, 5.50, 5.75 และ 6.0 อุณหภูมิในการเจริญ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที

พีเอชเริ่มต้นในอาหาร	พีเอช (0- 84 ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)		ไนโตรเจน (กรัม N/ลิตร)		น้ำมัน (กรัมต่อลิตร)	
		เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป
pH 5.0	4.71-4.95	41.5022	38.0872	2.5004	1.7760	5.3550	1.4600
pH 5.25	5.10-5.26	41.9108	39.4305	2.6177	1.3743	6.2366	1.2482
pH 5.50	5.20-5.48	40.2418	38.3173	2.6177	1.9841	6.3187	1.2714
pH 5.75	5.40-5.72	42.0231	42.0231	2.6177	2.1861	6.4358	1.2667
pH 6.0	6.10-5.75	39.6687	36.6898	2.3840	2.0212	6.1400	1.8200

จากผลการทดลองเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่ผันแปรค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 5.25, 5.50 และ 5.75 เปรียบเทียบกับพีเอช 5.0 และ 6.0 พบว่าการเจริญของยีสต์ในช่วง 5.50 จนถึง 6.0 เซลล์มีการเจริญที่ใกล้เคียงกันคือ 30.76, 32.78 และ 32.00 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 60, 54 และ 54 ชั่วโมง ตามลำดับ ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ(μ) ของยีสต์ในช่วงพีเอช 5.25 จนถึง 6.0 มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก คือ 0.0554, 0.0601, 0.0613 และ 0.0513 ต่อชั่วโมง ส่วนการเจริญที่พีเอช 5.25 จะให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 29.64 กรัมต่อลิตร

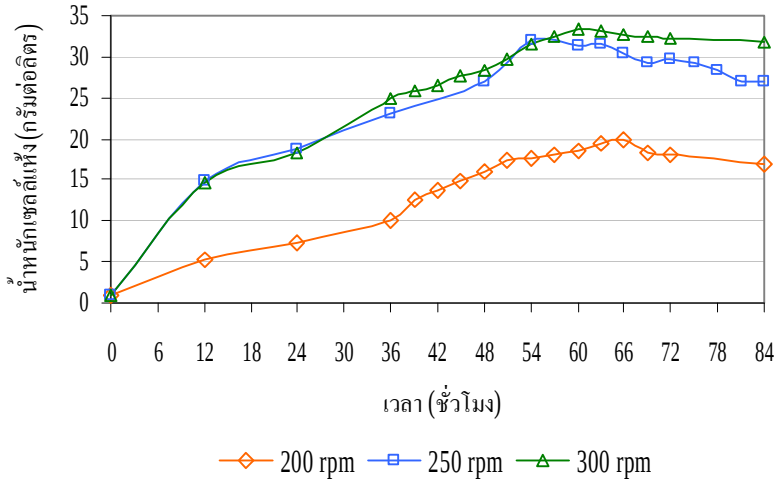
จากการเจริญของยีสต์ในช่วงแคบ คือ พีเอช 5.0-6.0 นั้น จะเห็นว่ายีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 เจริญได้ดีที่พีเอช ตั้งแต่ 5.50-6.0 โดยพิจารณาจากน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) รวมถึงค่าอื่นๆที่แสดงในตารางที่ 4.30 และ 4.31 ได้แก่ ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) และ อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity)ปริมาณไนโตรเจนและน้ำมันที่ยีสต์ใช้ ซึ่งค่าพีเอชในช่วง 5.50-6.0 นี้ น่าจะเป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการนำกลีเซอรอลเข้าสู่เซลล์ผ่านเมมเบรนของยีสต์ในกลุ่มเมทิลโลโทรฟิกส์ ทำให้ยีสต์มีการใช้กลีเซอรอลในน้ำหมัก และเข้าสู่เมแทบอลิซึมต่างๆเพื่อสร้างพลังงานและองค์ประกอบของเซลล์เพื่อการเจริญได้ดีกว่าการเจริญในช่วงพีเอชอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองการเจริญในอาหารพีเอชอื่นๆ คือ พีเอช 4, 5, 5.25 และ 7 ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ก็มีความสามารถในการเจริญได้ เนื่องจากเซลล์มีสามารถควบคุมความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนภายในเซลล์ได้ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชภายนอกเซลล์หรือเจริญในอาหารที่มีค่าพีเอชไม่เหมาะสม แต่หากค่าพีเอชสูงหรือต่ำกว่าช่วงที่เซลล์สามารถเจริญได้

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ก็จะส่งผลต่อโครงสร้างและสภาพให้ซึมได้ของเซลล์ ทำให้มีการเจริญน้อยหรืออาจจะยับยั้งการเจริญ [65]

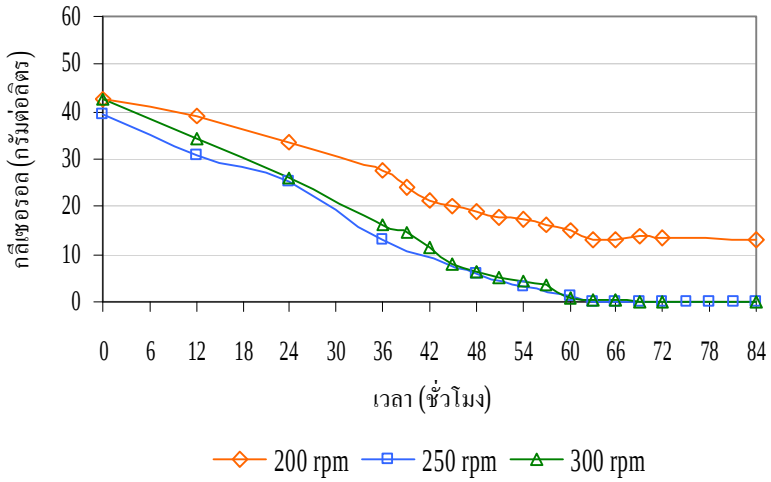
4.3.4 ศึกษาค่าความเร็วรอบในการเขย่า ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha*

ทำการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0 อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส และผันแปรความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 84 ชั่วโมง แล้ววัดการเจริญในรูปน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจน และน้ำมันที่เหลือในน้ำหมัก เพื่อนำข้อมูลมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กับเวลา ดังรูปที่ 4.50-4.54 จากนั้นคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) ดังแสดงในตารางที่ 4.32-4.33

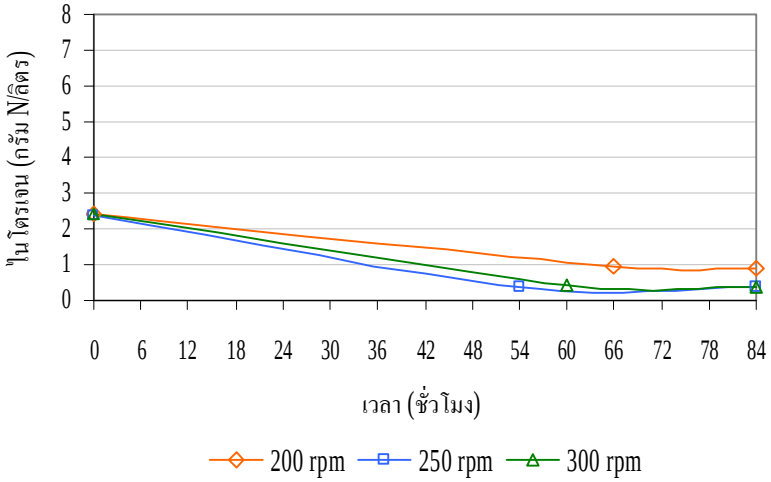


รูปที่ 4.51 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

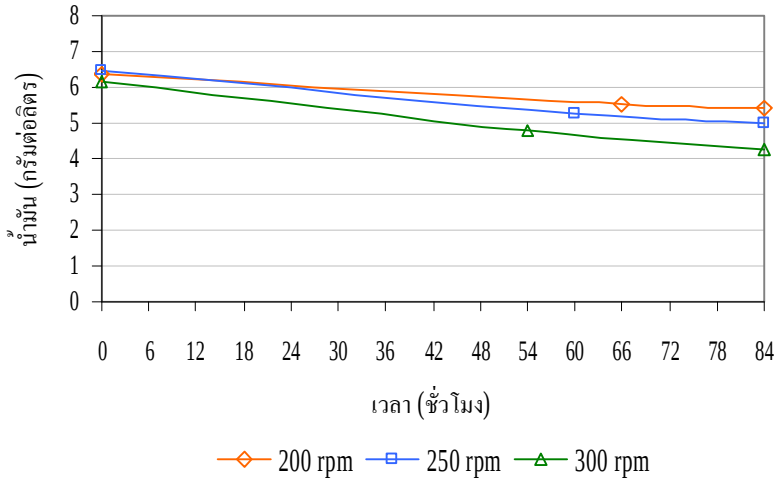


รูปที่ 4.52 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที

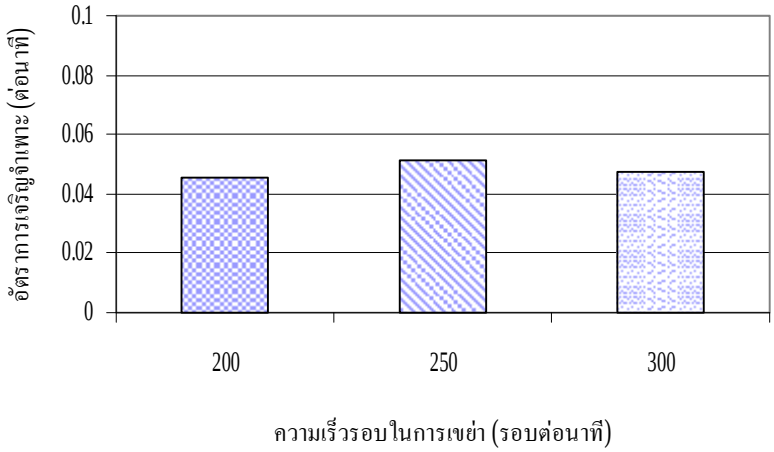


รูปที่ 4.53 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 4.54 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันในน้ำหมัก กับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรค่าความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.55 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ที่ความเร็วรอบในการเขย่า 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.32 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) พีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 6.0 อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส โดยผันแปรความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที

ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบต่อนาที)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ต่อชั่วโมง)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$,) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
200	19.85 ±0.22	66	0.0454	0.6056	0.6035	0.2976	0.3089
250	32.00 ±0.48	54	0.0513	0.7132	0.7132	0.5026	0.5026
300	33.38 ±0.23	60	0.0474	0.6791	0.6837	0.4910	0.5013

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.33 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกลีเซอรอล ไนโตรเจนและน้ำมันในน้ำหมัก ของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผันแปรความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 6.0 อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

ความเร็วรอบในการเข่ยา (rpm)	พีเอช (0- 84 ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)		ไนโตรเจน (กรัม N/ลิตร)		น้ำมัน (กรัมต่อลิตร)	
		เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป	เริ่มต้น	ที่ใช้ไป
200	5.39-5.97	42.6796	29.6046	2.4012	1.5268	6.3577	0.9456
250	6.10-5.75	39.6687	36.6898	2.3840	2.0212	6.1400	1.8200
300	5.69-6.02	42.5149	41.8974	2.4012	2.0484	6.4892	1.4661

จากผลการทดลองเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่ผันแปรค่าความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่า ยีสต์จะมีการเจริญสูงขึ้นเมื่อวัดเป็นน้ำหนักแห้ง คือ 19.85, 32.00 และ 33.38 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 66, 54 และ 60 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของยีสต์ที่ 200 รอบต่อนาที มีค่า 0.0454 ต่อชั่วโมง เมื่อเพิ่มความเร็วรอบเป็น 250 รอบต่อนาที อัตราการเจริญจำเพาะก็มีค่าสูงขึ้น คือ 0.0513 ต่อชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าจนถึง 300 รอบต่อนาที พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าลดลง คือ 0.0474 ต่อชั่วโมง เนื่องจากใช้เวลาในการเจริญจนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด มากกว่าที่ 250 รอบต่อนาที เมื่อคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะมีผลทำให้ลดลง

ความเร็วรอบในการเขย่าเป็นการให้ออกซิเจนแก่เซลล์ในการเจริญ โดยออกซิเจนมีหน้าที่หลักในการเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในห่วงโซ่อิเล็กตรอน (electron transport chain, ETC) นอกจากนั้นยังทำหน้าที่เป็น growth factor โดยยีสต์ต้องการออกซิเจนสำหรับเกิดไฮดรอกซีเลชั่น (hydroxylation) เพื่อรักษาการเจริญ เช่น ใช้ในการสังเคราะห์สเตอรอล และกรดไขมันไม่อิ่มตัว เป็นต้น [63, 65] ซึ่งจากผลการทดลองในตารางที่ 4.32 จะเห็นว่าการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่ความเร็วรอบ 250 และ 300 รอบต่อนาที ดีกว่าการเจริญที่ 200 รอบต่อนาที และการเลี้ยงที่ 250 และ 300 รอบต่อนาที ให้ค่าผลผลิตมวลเซลล์ (yield) อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) ปริมาณไนโตรเจนและน้ำมันที่ยีสต์ใช้ ไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งอาจเนื่องมาจากข้อจำกัดของการให้ออกซิเจนต่อพื้นที่ผิวในฟลาสก์ ทำให้ปริมาณของออกซิเจนในน้ำหมักที่ความเร็ว 250 และ 300 ไม่แตกต่างกันมาก เซลล์จึงมีอัตราการเจริญที่ใกล้เคียงกัน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

จากการศึกษาถึงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งได้แก่ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ตลอดจนภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL Y-2214 ได้แก่อุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้นในอาหาร และค่าความเร็วรอบในการเขย่า พบว่าสูตรอาหารที่เหมาสำหรับการเจริญคือ กลีเซอรอลดิบ 7.5% และสารสกัดจากยีสต์ 2 % ส่วนภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 5.75-6.0 และค่าความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 32.00 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 54 ชั่วโมง และให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.0513 ต่อชั่วโมง ค่าผลผลิตมวลเซลล์ (Yield) 0.7132 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล ค่าอัตราผลผลิตมวลเซลล์ (Productivity) 0.5026 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งค่าต่างๆที่ได้จากการทดลอง แม้ไม่สามารถเปรียบเทียบได้โดยตรงกับงานวิจัยอื่นๆ เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาถึงการนำกลีเซอรอลดิบซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลล์ มาใช้เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ แต่ก็ยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวการนำกลีเซอรอลบริสุทธิ์มาใช้เพื่อการเจริญของยีสต์ เช่น งานวิจัยของ Hellmuth และคณะ [48] ได้รายงานถึงการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงแบบ fed-batch ในถังหมักขนาด 15 ลิตร ที่มีอาหาร minimal medium ปริมาตร 5 ลิตร ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลในอาหารเป็น 1 % อุณหภูมิในการเลี้ยง 30 องศาเซลเซียส พีเอชของอาหารเป็น 4.6 และอัตราการให้อากาศเป็น 5 ลิตรต่อชั่วโมง ในช่วงเริ่มต้นของการหมักจนถึง 18 ชั่วโมง ให้ปริมาณกลีเซอรอลในอาหารด้วยอัตรา 25 กรัมต่อชั่วโมง จากนั้นเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลด้วยอัตรา 50 กรัมต่อลิตรจนถึง 168 ชั่วโมง หลังจากสิ้นสุดการเลี้ยงพบว่า ให้ความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 120 กรัมต่อลิตร เมื่อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง งานวิจัยของ d' Anjou และคณะ [75] ได้ศึกษาการเจริญของยีสต์ *Pichia pastoris* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงแบบ Fed-batch ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่มีอาหาร Minimal medium ปริมาตร6 ลิตร ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลในอาหารเป็น 50 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของอาหารเป็น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจาก 12 ชั่วโมง ทำการเติมเมทานอลเข้าสู่ถังหมัก โดยรักษาระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1-2 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงต่อจนถึง 60 ชั่วโมง พบว่า ให้ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) 0.51 กรัมของเซลล์ต่อกรัมของสับเตรททั้งหมด ซึ่งแม้ว่างานวิจัยที่ได้ทำการทดลองมา จะเป็นการผลิตในระดับขวดเขย่า แต่ก็สามารถใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาถึงความเป็นไปได้ ในการพัฒนางานวิจัยจากระดับขวดเขย่าไปสู่ระดับการหมักที่ใหญ่ขึ้นในถังหมัก

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่นๆ ที่ได้ศึกษาถึงการนำวัสดุเหลือทิ้ง และมีมูลค่าต่ำ มาเปลี่ยนให้มีมูลค่าสูงขึ้นในรูปของโปรตีนเซลล์เดี่ยว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำ ตัวอย่างงานวิจัยต่างๆ ได้แก่ Musial และคณะ [71] ได้ทำการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ *Yarrowia lipolytica* A-

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

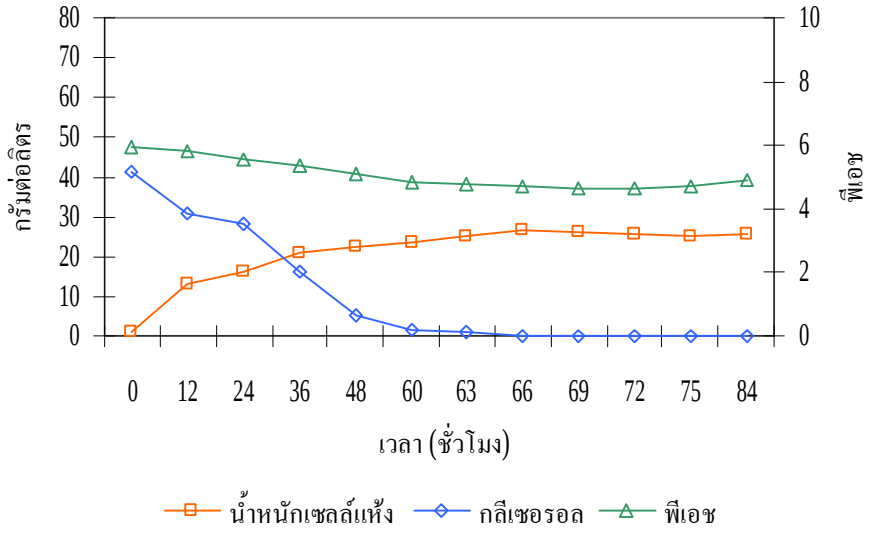
101 โดยใช้น้ำมันเรพสีด (crude rapeseed oil) ความเข้มข้น 25.7 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเติมสารอาหารและธาตุอาหารต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต 4.2 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.12 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.28 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ 2.1 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเป็น 3.5 และทำการเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 3.5 ลิตร ที่มีปริมาตร อาหาร 1 ลิตร ภาวะในการเลี้ยง 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2 vvm เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงที่ 54 ชั่วโมง ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 32.5 กรัมต่อลิตร KURBANOGL'U [97] ได้ทำการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจาก Ram horn hydrolysate โดยใช้ยีสต์ Candida utilis NRRL Y-900 ทำการเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย crude horn hydrolysate 4 % สารสกัดจากยีสต์ 0.1 % กลูโคส 1 % และ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 5.0 ภาวะในการเลี้ยง 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงพบว่า ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 6.8 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง Choi และ Park [72] ได้ทำการผลิตมวลชีวภาพโดยใช้เศษกะหล่ำปลีซึ่งเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเลี้ยงยีสต์ *Pichia stipitis* CBS 5776 ในอาหาร cabbage juice medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มี แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 5.8 ภาวะในการเลี้ยง 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 11.23 กรัมต่อลิตร

ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ทำการศึกษาถึงการใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว กับงานวิจัยที่ได้ยกตัวอย่างมาเกี่ยวกับการนำวัสดุเหลือทิ้ง และมีมูลค่าต่ำ มาเปลี่ยนให้มีมูลค่าสูงขึ้นในรูปของโปรตีนเซลล์เดี่ยว จะเห็นว่า ยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL Y-2214 มีการเจริญที่ค่อนข้างดี คือ 32 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยในระดับขวดเขย่าของ KURBANOGLU และ Choi และ Park ที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพียง 6.8-11.23 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆในระดับถังหมัก ก็พบว่าการเจริญในระดับขวดเขย่าของยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL Y-2214 ที่ศึกษาอยู่ก็ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งไม่ต่างจากงานวิจัยในดับถังหมักของ Musial และคณะ มากนัก ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL Y-2214 น่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาให้เจริญในระดับการผลิตที่สูงขึ้นต่อไปได้

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

4.4 **เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์** *H. polymorpha* **ในอาหารสูตรดัดแปลง** YE-Gly **และอาหาร** Mineral salt medium

ทำการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL Y-2214 ในอาหาร Mineral salt medium ซึ่งอ้างอิงจาก United States Patent No.: US 6,204,012 B1 [48] (แสดงองค์ประกอบของอาหารในภาคผนวก ข) โดยมีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 6.0 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 84 ชั่วโมง แล้ววัดการเจริญในรูปน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในน้ำหมัก เพื่อนำข้อมูลมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ต่างๆกับเวลา ดังรูปที่ 4.55 จากนั้นคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) ดังแสดงในตารางที่ 4.34



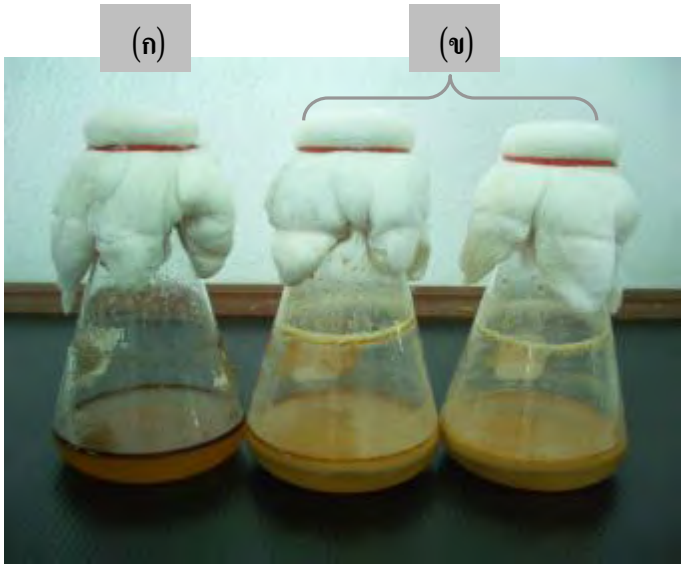
รูปที่ 4.56 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลีเซอรอลและพีเอชในน้ำหมักกับเวลา ในการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหาร Mineral salt medium ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.34 สรุปผลการทดลองการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหาร Mineral salt medium และอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

อาหาร	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)	ผลผลิตมวลเซลล์ (yield, $Y_{x/s}$,) (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมกลีเซอรอล)		อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
				ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase	ในช่วงน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	ในช่วง log phase
Mineral salt medium	26.81 ±0.05	66	0.0353	0.4980	0.5710	0.3217	0.4296
สูตรดัดแปลง YPG	32.00 ±0.48	54	0.0513	0.7132	0.7132	0.5026	0.5026

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 4.57 Mineral salt medium ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (ก) และการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เวลา 36 ชั่วโมงในอาหาร ใน Mineral salt medium (ข)

จากผลการทดลองเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหาร Mineral salt medium ดังตัวอย่างในรูปที่ 4.56 พบว่าให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 26.81 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 66 ชั่วโมง ให้อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เป็น 0.0353 ต่อชั่วโมง ให้ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) เป็น 0.5710 และให้อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) เป็น 0.4296 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ในช่วง log phase) เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการเจริญของยีสต์ในอาหาร Mineral salt medium ให้น้ำหนักเซลล์ ตลอดจนค่าอัตราผลผลิตเซลล์ต่ำกว่า ดังแสดงในตารางที่ 4.34

ซึ่งการที่ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เจริญในอาหาร Mineral salt medium ได้น้ำหนักเซลล์ต่ำกว่าในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly อาจเนื่องมาจากในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly นั้นมีสารสกัดจากยีสต์ซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และในสารสกัดจากยีสต์ยังอุดมไปด้วยวิตามิน แร่ธาตุ กรดอะมิโน ที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ และยังมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบด้วย ดังนั้นในอาหารสูตรดัดแปลงจึงส่งผลให้ยีสต์มีการเจริญที่ค่อนข้างดีกว่าในอาหาร Mineral salt medium

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

4.5 วิเคราะห์องค์ประกอบในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha*

จากการเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มีปริมาณกลีเซอรอล ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ กลีเซอรอล ดิบ 7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) พีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 6.0 อุณหภูมิและความเร็วรอบที่ใช้เขย่าเป็น 37 องศาเซลเซียส และ 250 รอบต่อนาที ทำการเลี้ยงจนการเจริญของยีสต์เข้าสู่ระยะ log phase (ประมาณ 54-60 ชั่วโมง) จากนั้นนำเซลล์ยีสต์มาทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze Dryer จะได้เซลล์ยีสต์ที่มีลักษณะสีเหลืองอ่อน ดังภาพที่ 4.56 และทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางอาหารในเซลล์

รูปที่ 4.58 เซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่ทำแห้งด้วยเครื่อง Freez Dryer

4.5.1 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า ความชื้น คาร์โบไฮเดรต

เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบในเซลล์ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้า ความชื้น และคาร์โบไฮเดรต (ดังแสดงในภาคผนวก ข) ให้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 4.35

ตารางที่ 4.35 องค์ประกอบทางอาหารในยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214

องค์ประกอบ	เปอร์เซ็นต์ (%)	วิธีวิเคราะห์
โปรตีน (Crude Protein)	41.67 ±0.685	Kjeldahl Method
ไขมัน (Lipid)	16.49 ±0.530	AOAC2000
ความชื้น (Moisture)	72.34 ±0.651	AOAC2000
เถ้า (Ash)	3.08 ±0.358	AOAC2000
คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) และอื่นๆ	38.76	AOAC2000

หมายเหตุ วิเคราะห์ผลจากการทดลอง 5 ซ้ำ

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

จากตารางที่ 4.35 แสดงองค์ประกอบทางอาหาร ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ความชื้น เถ้า และคาร์โบไฮเดรต ในยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 แล้วเปรียบเทียบกับยีสต์ที่นิยมใช้ในการผลิตสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ชนิดอื่น หรือนิยมนำไปแปรรูปอื่นๆ เช่น เบต้ากลูแคน สารสีจากยีสต์ เป็นต้น ซึ่งยีสต์เหล่านี้ได้แก่ ยีสต์ในจีนัส *Candida* และ *Saccharomyces* ดังแสดงผลในตารางที่ 4.36

ตารางที่ 4.36 เปรียบเทียบองค์ประกอบทางอาหารระหว่างยีสต์จีนัสต่างๆ (57, 69 และ 73)

องค์ประกอบ	*H. polymorpha* NRRL Y-2214	*Candida utilis* (From Cassava hydrolysate)	*Saccharomyces cerevisiae* (Brewer yeast)	Kluyveromyces maxianus (from Whey)
โปรตีน (%)	41.67	52.25	40.0	52.0
ไขมัน (%)	16.49	0.31	4.0	0.54
ความชื้น (%)	72.34	74.0	ND	72.0
เถ้า %	3.08	2.2	7.5	5.4
คาร์โบไฮเดรต (%)	38.76	ND	34.0	34.9

ND : Not done

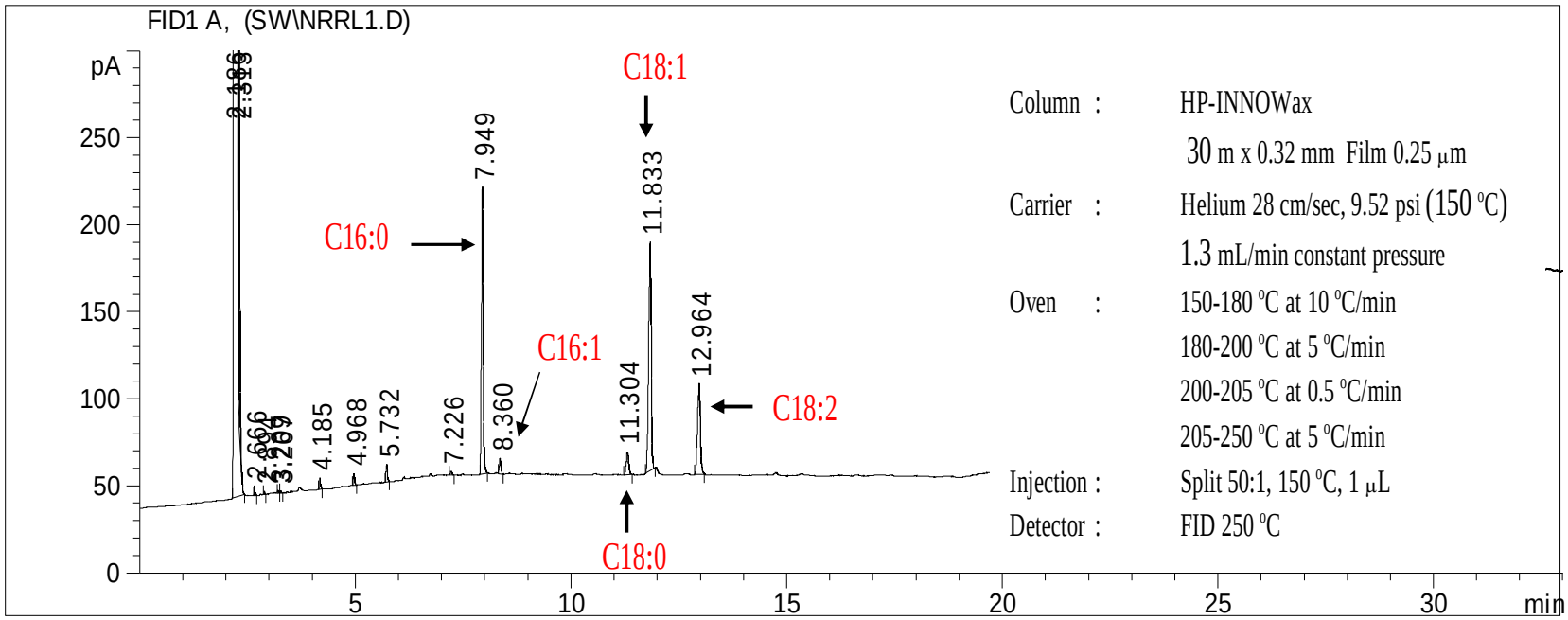
4.5.2 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน

จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 โดยการเปลี่ยนให้อยู่เมทิลเอสเทอร์และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (Gas chromatography) (ดังแสดงในภาคผนวก ข) ให้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 4.37

ตารางที่ 4.37 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214

กรดไขมัน	ปริมาณ (%)
ปาลมิติก (Palmitic acid, C16:0)	34.10
ปาลมิโตเลอิก (Palmitoleic, C16:1)	1.87
สเตียร์ริก (Stearic acid, C18:0)	3.47
โอเลอิก (Oleic acid, C18:1)	37.13
ไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2)	17.37

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ 4.59 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดต่างๆ จากยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL Y-2214 ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (Gas Chromatography) โดยเทียบกับ retention time ของสารมาตรฐาน Fatty acid methyl esters (FAMEs)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

4.5.3 วิเคราะห์กรดอะมิโน และวิตามิน

จากการวิเคราะห์ชนิด ปริมาณกรดอะมิโน และวิตามินในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 โดยบริษัท ไอคิวเอ แลบอราทอรี จำกัด โดยส่งวิเคราะห์ในรูปเซลล์เปียกแช่แข็ง โดยมีความชื้น 43.20 % เมื่อนำมาคำนวณปริมาณกรดอะมิโน ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จะให้ผลดังตารางที่ 4.38 และ 4.40 (ภาคผนวก จ, รูปที่ จ. 11)

ตารางที่ 4.38 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214

กรดอะมิโน (Amino acid)	ปริมาณ (mg/100g)	กรดอะมิโน (Amino acid)	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), วิเคราะห์ด้วยวิธี AOAC (2000)

จากตารางที่ 4.22 แสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 แล้วเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากยีสต์ สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ดังแสดงผลในตารางที่ 4.39

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.39 เปรียบเทียบกรดอะมิโนในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 กับกรดอะมิโนในสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae*

ชนิด	*H. polymorpha* NRRL Y-2214 (ร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง)	*Saccharomyces cerevisiae* [a] (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)
กรดอะมิโนจำเป็น		
Histidine	0.027	0.53
Isoleucine	0.590	1.66
Leucine	0.670	2.99
Lysine	0.331	1.43
Methionine	<0.005	0.68
Phenylalanine	0.72	1.87
Threonine	0.082	0.82
Tryptophan	0.062	1.45
Valine	0.28	2.22
กรดอะมิโนไม่จำเป็น		
Aspartic acid	0.20	1.25
Serine	0.037	1.34
Glutamic acid	0.092	2.70
Glycine	0.16	0.75
Alanine	0.31	2.66
Proline	<0.005	1.12

[a] สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ [57]

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ 4.40 ชนิดและปริมาณวิตามินในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214

วิตามิน (Vitamin)	ปริมาณ (ppm)	วิธีวิเคราะห์
Vitamin B1 (Thiamin)	< 0.1	JAFC (1984)
Vitamin B2 (Riboflavin)	0.9	JAFC (1984)
Vitamin B 3 (Niacin & Niacinamide)	< 0.1	JAOAC (1993)
Vitamin B5 (Panthothenic acid)	2.0	AOAC (2000)
Vitamin B6 (Pyridoxine)	< 0.1	JAFC (1984)
Vitamin B8 (Biotin)	32.5	AOAC (1996)
Vitamin B9 (Folic acid)	84.9	AOAC (1996)
Vitamin B12 (Cyanocobalamine)	< 0.1	AOAC (2000)

จากตารางที่ 4.24 แสดงชนิดและปริมาณวิตามินในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 แล้วเปรียบเทียบกับวิตามินที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ดังแสดงผลในตารางที่ 4.41

ตารางที่ 4.41 เปรียบเทียบวิตามินในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 กับวิตามินในสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* [56]

วิตามิน (Vitamin)	*H. polymorpha* NRRL Y-2214 (ppm)	*S. cerevisiae* (ppm)
Vitamin B1 (Thiamin)	< 0.1	10-18
Vitamin B2 (Riboflavin)	0.9	80-110
Vitamin B 3 (Niacin & Niacinamide)	< 0.1	350-600
Vitamin B5 (Panthothenic acid)	2.0	120-190
Vitamin B6 (Pyridoxine)	< 0.1	45-60
Vitamin B8 (Biotin)	32.5	0.7-1.5
Vitamin B9 (Folic acid)	84.9	25-50
Vitamin B12 (Cyanocobalamine)	< 0.1	1.2-5.0

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

เมื่อพิจารณาผลขององค์ประกอบทางอาหาร ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ความชื้น เถ้า และคาร์โบไฮเดรต และเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่น คือ *Candida utilis*, *Saccharomyces* และ *Kluyveromyces maxianus* ซึ่งยีสต์สายพันธุ์เหล่านี้เป็นยีสต์ที่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) และพบว่า ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 มีปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ไม่ต่างจากยีสต์สายพันธุ์ที่กล่าวมามากนัก ดังแสดงในตารางที่ 4.36 ยกเว้นปริมาณไขมันที่วิเคราะห์ได้ในยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เจริญในอาหารสูตรดัดแปลง YPG พบว่ามีปริมาณไขมันค่อนข้างสูง คือ 16.49 % ในขณะที่ยีสต์ *Candida utilis*, *Saccharomyces* และ *Kluyveromyces maxianus* นั้นมีปริมาณไขมันในเซลล์เพียง 0.31, 4.0 และ 0.54 % ตามลำดับ ทั้งนี้ โดยธรรมชาติของสายพันธุ์ยีสต์ *H. polymorpha* นั้นไม่ใช่ยีสต์ที่สะสมกรดไขมันในเซลล์ (Non-oleaginous yeasts) และมีปริมาณไขมันในเซลล์เพียง 1.4-3.3 % ดังแสดงในตารางที่ 4.42 ดังนั้นปริมาณของไขมันที่ค่อนข้างสูงที่ได้จากการวิเคราะห์ในยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เจริญในอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน อาจมาจากการดูดซับน้ำมันที่เป็นองค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบเข้าไปสะสมในเซลล์ระหว่างการเจริญ และอาจเกิดจากการที่ไม่สามารถขจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนมาออกจากเซลล์ได้หมด

ตารางที่ 4.42 ปริมาณไขมันที่พบใน non-oleaginous yeasts และ oleaginous yeasts [98]

ยีสต์	ปริมาณไขมันในเซลล์ (% น้ำหนักแห้ง)
Non-oleaginous yeasts	
Candida utilis	0.2-18.2
Crytococcus neoformans	9.8
Debaryomyces hansenii	7.0-11.0
Hansenula anomala	7.0-17.0
Hansenula polymorpha	1.4-3.3
Saccharomyces cerevisiae	3.5-20.0
Yarrowia lipolytica	2.7-9.0
Oleaginous yeasts	
Candida diddensiae	37.0
Hansenula ciferri	22.0
Lipomyces tetrasporus	64.0-67.0
Rhodotorula glutinis	40.0-72.0

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

เมื่อพิจารณาผลวิเคราะห์ของชนิดและปริมาณของกรดไขมันในยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 พบว่าประกอบด้วยกรดไขมันหลักๆ 5 ชนิด คือ ปาลมิติก (Palmitic acid, C16:0) ปาลมิโตเลอิก (Palmitoleic, C16:1) สเตียร์ริก (Stearic acid, C18:0)โอเลอิก (Oleic acid, C18:1) ไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2) ซึ่งมีปริมาณ 34.10, 1.87, 3.47, 37.13 และ 17.37 % ของกรดไขมันทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ ตามลำดับ เทียบกับรายงานของ Wijeyaratane และคณะ [99] ที่รายงานถึงองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ *H. polymorpha* ว่า ประกอบด้วย ปาลมิติก 16.3-25.2 % ปาลมิโตเลอิก 1.3-3.5 % สเตียร์ริก 3.3-8.7 % โอเลอิก 23.6-30.6 % และไลโนเลอิก 27.3-43.2 % และเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของกรดไขมันที่วิเคราะห์ได้จากน้ำมันในกลีเซอรอลดิบ พบว่าประกอบด้วยกรดไขมัน ปาลมิติก สเตียร์ริก และโอเลอิก ในปริมาณ 41.88, 4.82 และ 40.84 % จึงสันนิษฐานว่าปริมาณของกรดไขมันปาลมิติก และโอเลอิก ในเซลล์ยีสต์ที่ค่อนข้างสูง อาจเนื่องมาจากยีสต์เมแทบอไลต์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในอาหารและสะสมหรือนำไปสร้างพลังงานให้แก่เซลล์ อีกทั้งยังมีรายงานว่า ยีสต์ *H. polymorpha* CBS1976 มีความสามารถในการนำกรดไขมัน ปาลมิติก โอเลอิก และ ไลโนเลอิก เข้าสู่เซลล์และเกิดการสะสมได้ [56] สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับการสังเคราะห์กรดไขมันในยีสต์จีนัสอื่น เช่น งานวิจัยของ You และคณะ [100] ได้ศึกษาการสังเคราะห์กรดไขมันในยีสต์ *Sachharomyces cerevisiae* ในอาหาร YPD และมีการเติมเมาทานอลลงไป พบว่าสามารถสังเคราะห์กรดไขมันชนิดต่างๆได้แก่ ปาลมิติก 45.5-49.7 % สเตียร์ริก 4.7-12.5 % ปาลมิโตเลอิก 31.7-42.6 % และ โอเลอิก 11.0-14.9 % เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวโอเลอิกระหว่างยีสต์ *S. cerevisiae* กับยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 จะเห็นว่ายีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 มีสัดส่วนกรดไขมันโอเลอิกสูงกว่า คือ 37.13 % ซึ่งปัจจุบันได้มีการนำกรดไขมันมากรดไขมันไม่อิ่มตัวตัวมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ในทางการค้า ซึ่งมีประโยชน์ในเรื่องช่วยลดระบบของแอลดีแอล (คอเรสเทอรอลที่ไม่ดี)ในร่างกายได้ จึงช่วยป้องกันหลอดเลือดตีบตัน และป้องกันการอักเสบของเนื้อเยื่อ [99]

เมื่อพิจารณาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนต่างๆ 18 ชนิด และพบกรดอะมิโนจำเป็นครบทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Threonine, Tryptophan และ Valine รวมปริมาณ 2760.81 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อนำกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้ มาเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนในสารสกัดจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่ามีชนิดของกรดอะมิโนเหมือนกัน ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง เนื่องจากกรดอะมิโนที่พบใน *H. polymorpha* NRRL Y-2214 เป็นกรดอะมิโนที่วิเคราะห์จากตัวเซลล์ ส่วนกรดอะมิโนจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่นำมาเปรียบเทียบ ได้มาจากสารสกัดจากเซลล์ (yeast extract) ซึ่งเป็นส่วนของของเหลวภายในเซลล์หรือไซโตพลาสซึม (cytoplasm) อันอุดมไป

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ด้วยสารอาหารต่างๆ ทั้ง โปรตีน ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิดมากกว่าในเซลล์ยีสต์ (เมื่อคิดเป็นปริมาณต่อน้ำหนักแห้ง) แต่เมื่อคิดเป็นสัดส่วนของกรดอะมิโนจำเป็นต่อกรดอะมิโนทั้งหมดภายในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 พบว่ามีสัดส่วนของกรดอะมิโนจำเป็นสูงถึง 72 % ของกรดอะมิโนทั้งหมดในเซลล์ ในขณะที่สัดส่วนของกรดอะมิโนจำเป็นต่อกรดอะมิโนทั้งหมดในสารสกัดจากยีสต์ มีเพียง 45.7 % ซึ่งข้อมูลที่วิเคราะห์ได้เป็นข้อมูลสำคัญอีกข้อมูลหนึ่งในการพัฒนาเซลล์ยีสต์ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น แปรรูปเป็นสารสกัดจากยีสต์ นำไปเป็นอาหารสัตว์ซึ่งอาจอยู่ในรูปเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต (Live yeasts or Active yeast) หรือในรูปเซลล์ที่ตายแล้ว (Inactive yeast)

และเมื่อพิจารณาชนิดและปริมาณของวิตามินที่วิเคราะห์ได้จากเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 โดยทำการวิเคราะห์เฉพาะกลุ่มวิตามินบี เนื่องจากข้อมูลวิตามินที่รายงานในสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) นิยมรายงานในกลุ่มวิตามินบี (B-complex) ดังแสดงในภาคผนวก ฉ พบว่าเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ประกอบด้วยวิตามินบี 8 (Biotin) และวิตามินบี 9 (Folic acid) อยู่ในปริมาณที่มากกว่าที่พบในสารสกัดจากยีสต์ที่ผลิตในทางการค้า คือ 32.5 และ 84.9 ppm (ดังแสดงในตารางที่ 4.41) นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตโฟเลต หรือวิตามินบี 9 ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดย Hjortmo และคณะ[101] พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* ที่เจริญในอาหาร YPD จะมีการสังเคราะห์โฟเลต (15-40 ppm) ต่ำกว่าเมื่อเจริญในอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) ที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับแร่ธาตุต่างๆแทนสารสกัดจากยีสต์และเพปโทน โดยการเลี้ยงแบบแบตช์ (Batch fermentation) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ด้วยอาหารสังเคราะห์ ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตรอาหาร 1.3 ลิตร ภาวะในการเลี้ยง คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 5.5 อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* สามารถสังเคราะห์โฟเลตได้ถึง 125 ppm ในช่วง 0 ถึง 10 ชั่วโมงแรก แต่ปริมาณโฟเลตในเซลล์จะลดลงเรื่อยๆเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase จากงานวิจัยของ Hjortmo และคณะ ที่ได้กล่าวมา เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลวิเคราะห์วิตามินบี 9 จากยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ายีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 มีปริมาณโฟเลตค่อนข้างสูง (84.9 ppm) ทั้งที่เป็นเซลล์ที่เข้าสู่ระยะ stationary phase แล้ว ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจในการนำยีสต์ *H. polymorpha* นี้ มาพัฒนาเป็นอาหารที่มีโฟเลตสูง ได้แก่ โยเกิร์ต ขนมปัง และอาหารที่ผ่านการหมัก (fermented foods) หรือเพื่อการผลิตวิตามินโฟเลตธรรมชาติ(natural-folates)จากยีสต์

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *Hansenula polymorpha* SH4329 ในอาหารที่มีกลูโคส หรือกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การเจริญของยีสต์ในอาหารที่มีกลูโคส 2 และ 3 % ยีสต์จะเข้าสู่ระยะ stationary phase ได้เร็วกว่า คือที่เวลา 24-36 ชั่วโมง โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.67 และ 11.85 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเจริญของยีสต์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน จะเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลา 42-48 ชั่วโมง โดยการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่ผันกลีเซอรอลบริสุทธิ์ในช่วง 1-9 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า ยีสต์เจริญได้ดีที่สุด ที่กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 7 % โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 18.83 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) 0.0849 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) 0.6199 อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) 0.5416 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส และกลีเซอรอลบริสุทธิ์เท่ากัน คือ 3 % พบว่า การเจริญของยีสต์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 3 % ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่า คือ 16.02 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเจริญในกลูโคส 3 % ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 11.85 กรัมต่อลิตร

จากนั้น ได้ทำการวิเคราะห์กลีเซอรอลดิบที่เป็นผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ประกอบด้วยกลีเซอรอล 54.72 %, น้ำมัน 7.05 % ความชื้น 16.09 % ต่อน้ำหนักเปียก และน้ำมันในกลีเซอรอลดิบประกอบด้วยกรดไขมันหลักๆ คือ ปาลมิติก โอเลอิก และสเตียร์ริก 41.88, 40.84 และ 4.82 % ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ และเนื่องจากในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนั้น มีการใช้กรด และด่างเข้มข้นเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุที่มีอยู่ในกลีเซอรอลดิบที่จะนำมาใช้เลี้ยงยีสต์ด้วย โดยนำกลีเซอรอลดิบมาวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง NA (CHNS/O Analyzer) เครื่อง XRF (X-Rayfluorescence) และเครื่อง ICP (Inductively Couple Plasma) พบว่า ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน เท่ากับ 44.13, 9.03, 1.34% ตามลำดับ โดยพบธาตุโซเดียมสูง 1.60 % ส่วนแร่ธาตุอื่นๆ พบในปริมาณน้อย คือ คลอไรด์ โพแทสเซียม แคลเซียม เหล็ก ทองแดง และสังกะสี (4-39 ppm) ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่เซลล์ยีสต์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

การเตรียมอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อใช้เลี้ยงยีสต์ โดยแปรผันความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบในช่วง 1-10 %, สารสกัดจากยีสต์ 1% และเพปโทน 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบที่ 6 % ให้การเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ดีที่สุด คือให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 15.63 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 66 ชั่วโมง ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) 0.0412 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) 0.7017 และอัตรา

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) 0.2321 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ และกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบการเจริญในอาหารที่มีปริมาณกลีเซอรอลที่แท้จริงใกล้เคียงกันคือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 1, 3 และ 5 % กับกลีเซอรอลดิบ 2, 6 และ 10 % (เนื่องจากกลีเซอรอลดิบ มีปริมาณกลีเซอรอลประมาณ 54.72 %) พบว่าการเจริญของยีสต์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 1 และ 3 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้น้ำหนักเซลล์ใกล้เคียงกับการเจริญในกลีเซอรอลดิบ 2 และ 6 % ส่วนการเจริญของยีสต์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 5 % จะให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 17.42 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการเจริญของยีสต์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบ 10 % โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพียง 7.24 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากการที่ยีสต์เจริญได้ค่อนข้างต่ำในอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบ 10 % เมื่อเทียบกับที่กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 5 % อาจเนื่องจาก ปริมาณที่ค่อนข้างสูงของไขสบู่ที่เป็นองค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบ ทำให้ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบ 10 % น้อยกว่าในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 5 % ทำให้เซลล์มีการเจริญได้ไม่เต็มที่ เนื่องจากปริมาณของออกซิเจนที่มีจำกัด

และทำการแปรผันแหล่งไนโตรเจนเป็นอนินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อนำมาใช้แทนเพปโทน ได้แก่ ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า อนินทรีย์ไนโตรเจนทั้ง 4 แหล่ง เมื่อนำมาใช้แทนเพปโทนในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้ยีสต์มีการเจริญที่ค่อนข้างต่ำ คือ ให้ปริมาณเซลล์ที่ประมาณ 9-12 กรัมต่อลิตร ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) 0.0230-0.0355 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) 0.4206-0.7742 อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) 0.0764-0.1539 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อทดลองเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* SH4329 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่มี กลีเซอรอลดิบ 6 % และเพิ่มสารสกัดจากยีสต์เป็น 2 % พบว่าเซลล์มีการเจริญได้ดีขึ้น โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 20.03 กรัมต่อลิตรที่เวลา 69 ชั่วโมง ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) 0.0423 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) 0.9955 อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) 0.2818 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

เนื่องจากยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ SH4329 เป็นยีสต์ที่ใช้ประโยชน์ในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ มีจีโนไทป์เป็น *leu 1* คือ บกพร่องในกระบวนการสังเคราะห์ลูซีน จึงอาจทำให้ความสามารถในการเจริญต่ำ เมื่อได้ความอนุเคราะห์จาก USDA ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่งยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL Y-2214 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type) ที่ไม่มีความบกพร่องทางพันธุกรรมมา จึงนำมาทดลองศึกษาการเจริญในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 5-10 % และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ NRRL Y-2214 มีการเจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์ SH4329 และความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ NRRL Y-2214 คือ 7.5 % โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 32.00 กรัมต่อลิตรที่เวลา 54 ชั่วโมง ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) 0.0513 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) 0.7132 อัตรา

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) 0.5026 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จึงเลือกใช้สายพันธุ์ NRRL Y-2214 ในการทดลองแทนสายพันธุ์เดิม

เมื่อผันแปรภาวะแวดล้อมทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 พบว่า ภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 5.50-6.0 และอัตราความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 250 รอบต่อนาที และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ในอาหารสูตรดัดแปลง YE-Gly ที่มี กลีเซอรอลดิบ7.5 % และสารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เทียบกับอาหาร Mineral salt medium ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % และแร่ธาตุต่างๆ พบว่า การเจริญของยีสต์ในอาหาร Mineral salt medium ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 26.81 กรัมต่อลิตรที่เวลา 66 ชั่วโมง ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) 0.0353 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ (yield) 0.5710 อัตราผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) 0.4296 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แสดงว่า ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 สามารถใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนร่วมกับแร่ธาตุอื่นๆ แทนสารสกัดจากยีสต์ และเพปโทนได้

เมื่อนำเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เจริญในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนมาวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ในเซลล์พบว่า ประกอบด้วยโปรตีน 41.67 % ไขมัน 16.49 % ความชื้น 72.34 % เถ้า 3.08 % คาร์โบไฮเดรตและอื่นๆ 38.76 % ซึ่งพบว่า ปริมาณไขมันที่วิเคราะห์ได้ค่อนข้างสูง โดยธรรมชาติของสายพันธุ์ยีสต์ *H. polymorpha* จัดเป็น non-oleaginous yeast คือ ไม่ใช่ยีสต์ที่สะสมไขมันในเซลล์ ดังนั้น ปริมาณไขมันที่ค่อนข้างสูงในเซลล์ของยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เจริญในอาหาร ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน อาจมาจากการดูดซับน้ำมันที่เป็นองค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบเข้าไปสะสมในเซลล์ระหว่างการเจริญเติบโต หรืออาจเป็นน้ำมันที่ติดอยู่ที่ผนังเซลล์เนื่องจากไม่สามารถล้างออกได้หมด ซึ่งไขมันในยีสต์นี้ ประกอบด้วยกรดไขมันปาลมิติก ปาลมิโตเลอิก สเตียร์ริก โอเลอิก และไลโนเลอิก 34.10, 1.87, 3.47, 37.13 และ 17.37 %ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ และจากผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนชนิดต่างๆ 18 ชนิด ในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็น 9 ชนิด คือ Phenylalanine (716.48 mg/100g), Leucine (670.42 mg/100g), Isoleucine (590.24 mg/100g), Lysine (330.94 mg/100g), Valine (281.47mg/100g), Threonine (81.88 mg/100g), Tryptophan (61.92 mg/100g), Histidine (27.46 mg/100g) และ Methionine (<5.00 mg/100g) และมีกรดอะมิโนไม่จำเป็น 9 ชนิด คือ Alanine (312.18 mg/100g), Aspartic acid (201.30 mg/100g), Glycine (158.31 mg/100g), Arginine (123.17 mg/100g), Tyrosine (106.11 mg/100g), Glutamic acid (92.29 mg/100g), Serine (60.22 mg/100g), Cystine (36.68 mg/100g) และ Proline (<5.00 mg/100g) ซึ่งพบว่า กรดอะมิโนในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนจำเป็นเมื่อคิดเป็นสัดส่วนสูงถึง 72 %ของกรดอะมิโนทั้งหมดในเซลล์ ส่วนผลการวิเคราะห์วิตามินบี พบว่า เซลล์ยีสต์ประกอบด้วยวิตามินบีต่างๆ คือ บี

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

1 (<0.1 ppm) บี 2 (0.9 ppm) บี 3 (<0.1 ppm) บี 5 (2.0 ppm) บี 6 (<0.1 ppm) บี 8 (32.5 ppm) บี 9 (84.9 ppm) และ บี 12 (<0.1 ppm) ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่า เมื่อนำไปเทียบกับวิตามินบี ที่มีในสารสกัดจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า เซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 มีปริมาณวิตามินบี 8 (Biotin) และวิตามินบี 9 (Folic acid) ในปริมาณที่สูงกว่าที่พบในสารสกัดจากยีสต์มาก

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากการทดลอง แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ *H. polymorpha* สามารถเจริญได้ดีในอาหาร Mineral salt medium ดังนั้นในการศึกษาการเจริญของยีสต์ *H. polymorpha* เพื่อให้มีความหนาแน่นสูงในน้ำหมัก สามารถผันแปรชนิดและปริมาณของวิตามินและแร่ธาตุต่างๆ ใน Mineral salt medium เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญ แทนการใช้อาหารสูตรดัดแปลง YPG และ YE-Gly
2. ยีสต์ *H. polymorpha* เป็นยีสต์ที่มีการศึกษาถึงโครงสร้างเซลล์ตลอดจนลักษณะทางพันธุกรรมอย่างแพร่หลาย และในการเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญของยีสต์ อาจใช้วิธีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของยีสต์ เช่น การกลายพันธุ์ เพื่อให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูงในน้ำหมัก
3. จากการวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ในเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเจริญในอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีสัดส่วนของกรดอะมิโนจำเป็นสูงถึงประมาณ 70 % ของกรดอะมิโนทั้งหมดในเซลล์ และยังมีปริมาณวิตามินบี 8 และบี 9 ที่ค่อนข้างสูงกว่าที่พบในสารสกัดจากยีสต์ ดังนั้นในการนำเซลล์ยีสต์ที่ได้มาใช้ประโยชน์นอกเหนือจากการใช้ในรูปโปรตีนเซลล์เดี่ยวแล้ว ยังสามารถทำการสกัดกรดอะมิโน และวิตามินต่างๆ ในเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ประโยชน์ในการเป็นธาตุอาหารเสริมสำหรับคนและสัตว์ นอกจากนี้ ส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ที่เหลือ เช่น ผนังเซลล์ยีสต์ ยังสามารถใช้เป็นสารพรีไบโอติค (prebiotic) ในอาหารสัตว์เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ใช้ในการลดพิษจากเชื้อรา และใช้เป็นสารเสริมภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

รายการอ้างอิง

1. พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล และ ลลิตา อัตนโถ. 2549. รอบรู้เรื่องราวไบโอดีเซล. 1000 เล่ม ,พิมพ์ครั้งที่ 1. สมุทรปราการ: พิมพ์พินิจ การพิมพ์.

2. Canakci, M. and Van Gerpen, J. 2001. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. Trans ASAE, 44(6):1429-36.

3. Dasari, M. A., Kiatsimkul, P. P., Sutterlin, W. R. and Suppes, J. G. 2005. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. Applied Catalysis A: General. 281(1-2): 225-231.

4. Ito, T., Nakashimada, Y. and Senba, K. 2005. Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. Bioscience and Bioengineering. 100(3): 260-265.

5. ปิยนาฏ อินทนกูล. 2547. การทำกลีเซอรอลที่ได้จากการผลิตน้ำมันดีเซลชีวภาพให้บริสุทธิ์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมปิโตรเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง.

6. Kimura, H. 2001. Oxidation assisted new reaction of glycerol. Polymers for Advanced Technologies. 12(11-12): 697-710.

7. Valliyapan, T. 2004. Hydrogen of syn gas production from glycerol using pyrolysis and steam. Master' s Thesis. Department of Chemical Engineering. Graduate School, University of Saskatchewan.

8. Zhang, H., He, Y., Li, S. and Lui, X. 2005. Synthesis and hydrolytic degradation of aliphatic polyesteramide branched by glycerol. Polymer Degradation and Stability. 88(2): 309-316.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

9. Perosa, A. and Tundo, P. 2005. Selective hydrogenolysis of glycerol with raney nickel. Industrial and Engineering Chemistry Research. 44(23): 8535-8537.

10. Papanikolaou, S., Ruiz-Sanchez. P., Pariset, B., Blanchard, F. and Fick, M. 2000. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. Journal of Biotechnology. 77(2): 191-208.

11. Lee, P. C., Lee, W. G., Lee, S. Y. and Chang, H. N. 2001. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon. Biotechnology and Bioengineering. 72(1): 41-48.

12. Koning, de. W., Harder, W. and Dijkhuizen L. 1987. Glycerol metabolism in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: phosphorylation as the initial step. Archives of Microbiology. 148(4): 314-320.

13. Jones, G. J. and Bellion, E. 1991. Methanol oxidation and assimilation in *Hansenula polymorpha*. Journal of Biochemistry. (280): 475-481.

14. Laoteng, K., Ruenwai, R., Tanticharoen, M. and Cheevadhanarak, S. 2005. Genetic modification of essential fatty acids biosynthesis in *Hansenula polymorpha*. FEMS Microbiology Letters. 245: 169-176.

15. Reed, G. and Nagodawithana, T. W. 1991. Yeast Technology: Yeast derived products. 2nd ed. New York: Van Nustrand Reinhold.

16. Wegner, H. E. and Okla, B. 1983. Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell densities. United States Patent. 19: 1-16.

17. กิตติยา อัลภาชน์. 2545. กลีเซอรีนบริสุทธิ์. สมอ สาร 326 (สิงหาคม 2545): 1-9.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

18. SIDS Initial Assessment Report For SIAM 14. 2002. UNEP Plublications: Glycerol France. 1-10.

19. Available from: http://www.fromnaturewithlove.com/images/GlycerinUSP.jpg [2007, October 20]

20. Available from: http://www.transmacro.com/products/glycerine.jpg [2007, October 20]

21. มอก. 336 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกลีเซอรีนดิบ. 2523. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม.

22. มอก. 337 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกลีเซอรีนบริสุทธิ์. 2538. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม.

23. Available from: http://dictionary.laborlawtalk.com/glycerine [2007, October 20]

24. Pachauri, N. and He, B. 2006. Value-added Utilization of crude glycerol from Biodiesel production: A survey of current research activities. An ASABE Meeting presentation. ASABE Annual International Meeting. Paper Number:066223., 1-16.

25. Werpy, T. and Petersen, G. 2004. Top value added chemicals from biomass. Pacific Northwest National Laboratory. 52-55.

26. Extract of Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. vol. A12. 5th. Edpara 3.2.

27. Scrimgeour Charie. 2002. Chemistry of fatty acids. [Online]. Available from: http://media.wiley.com/product_data [2007, December 29]

28. Glycerol esters of fatty acids. [Online]. Available from: http://www.ffcr.or.jp [2007, December 29]

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

29. Fat splitting, Fatty acid and glycerine distillation. [Online]. Available from: http://www.mectech.co.in/fat.htm [2007, December 29]

30. NPCS Board of consultants and Engineers. Soaps, Detergents and Disinfectants Technology Handbook. [Online]. Available from: http://www.niir.org/books. [2007, December 29]

31. ไขมันและน้ำมัน [Online]. Available from: http://www.montfort.ac.th. [2007, December 20]

32. Meher, C.L., Sagar, V.D. and Naik, N.S. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 10: 248-268.

33. Biofuels and the European Union. [Online]. Available from: http://www.agr.gc.ca [2007, December 20]

34. Miller Klein. Impact of biodiesel production on the glycerol market. [Online]. Available from: http://www.hgca.com [2007, December 18]

35. Fuel for the future, Glycerol Extraction from Biodiesel Waste. [Online]. Available from: http://www.ezbiodiesel.com/Raw_glycerin.jpg [2007, December 18]

36. Glycerol Extraction from Biodiesel Waste. [Online]. Available from: http://www.engr.wisc.edu/studentorgs/uwfec/website/projects/images/ [2007, December 18]

37. Bournay, L., Casanave, D., Delfort, B., Hillion, G. and Chodorge, A.J. 2005. New heterogenous process for biodiesel production: A way to improve the quality and the value of the crude glycerin produced by biodiesel plants. Catalysis Today. 106: 190-192.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

38. Wang, K., Hawley, M. C. and Deathos, J. S. 2003. Conversion of glycerol to 1,3-propanediol via selective dehydroxylation. Industrial and Engineering Chemistry Research. 42(13): 2913-2923.

39. Wood, A. 2002. Novel reforming process converts biomass molecules to hydrogen. Chemical Week. 164(34): 30.

40. Hirai, T., Ikenaga, O. N., Miyake, T. and Suzuki, T. 2005. Production of hydrogen by steam reforming of glycerin on ruthenium catalyst. Energy and Fuels. 9: 1761-1762.

41. Huber, G. W., Shabaker, W. J. and Dumesic, A. J. 2003. Raney Ni-Sn catalyst for H_2 production from biomass-derived hydrocarbons. Science. 300(5628): 2075-2077.

42. Garcia, R., Besson, M. and Gallezot, P. 1995. Chemoselective catalytic oxidation of glycerol with air on platinum metals. Applied Catalysis A: General. 127(1-2): 165.

43. Stumbe, J. F. and Bruchmann, B. 2004. Hyperbranched polyesters based on adipic acid and glycerol. Macromolecular Rapid Communications. 25(9): 921-924.

44. Pramanick, D. and Ray, T. T. 1988. Synthesis and biodegradation of co-polyesters from citric acid and glycerol. Polymer Bulletin (Berlin). 19(4): 365-370.

45. Alksnis, A. F., Gruzin, V. I. and Surma, A. Y. 1976. Synthesis of oligoesters from oxalic acid and glycerol. Journal of Polymer Science, Polymer Chemistry Edition. 14(11): 2631-2638.

46. Nagata, M., Kiyotsukuri, T., Ibuki, H., Tsutsumi, N. and Sakai, W. 1996. Synthesis and enzymatic degradation or regular network aliphatic polyesters. Reactive and Functional Polymers. 30(1-3): 165-171.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

47. Koller, M., Bona, R., Braunegg, G., Hermann, C., Horvat, P., Kroutil, M., Martinz, J., Neto, J., Pereira, L. and Varila, P. 2005. Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. Biomacromolecules. 5(2): 561-565.

48. Hellmuth, K., Lopez-Ulibarri, R., Mayer, F. A., Schlieker, W. H. and Loon, A. 2001. United States Patent. No: US 6,204,012 B1.

49. Xiu, Z-L., Song, B-H., Wang, Z-T., Sun, L-H., Feng, E-M. and Zeng, A-P. 2004. Optimization of dissimilation of glycerol to 1,3-propanediol by by *Klebsiella pneumoniae* in one-and two-stage anaerobic cultures. Biochemical Engineering Journal.19(3): 189-197.

50. Barbirato, F., Astruc, S., Soucaille, P., Camarasa, C., Salmon, M. J. and Bories, A. 1997. Anaerobic pathways of glycerol dissimilation by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210: limitations and regulations.Microbiology. 143: 2423-2432.

51. Bauer, R., Katsikis, N., Varga, S. And Hekmat, D. 2005. Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. Bioprocess and Biosystems Engineering. 28(1): 37-43.

52. Raska, J., Skopal, F., Komers, K. and Marchek, J. 2007. Kinetics of glycerol biotransformation to dihydroxyacetone by immobilized *Gluconobacter oxydans* and effect of reaction conditions. Czechoslovak Chemical Communications. 72(9): 1269-1283.

53. Nikel, I. P., Pettinari, J. M., Galvagno, A. M. and Mendez, S. B. 2007. Poly (3-hydroxybutylrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli*

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

arc A mutant in fed-batch microaerobic cultures. Applied Microbiology and Biotechnology. 77: 1337-1343.

54. Matelli, L. H., da Silva, M. I., Souza, O. N. and Pomeroy, D. 1992. Glycerol as substrate for Biomass and β-carotene production by *Rhodotorula lactosa*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8 :635-637.

55. Available from: http://www.agro.cmu.ac.th/e_books [2007, October 20]

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

57. สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ. ยีสต์ คุณประโยชน์ในอุตสาหกรรม. 2000 เล่ม, พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: งานส่งเสริมภาพลักษณ์องค์กร สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

58. Available from: http://www.fuzing.com/qrx/yeast-extract. [2007, October 16]

59. Available from: http://kaima.en.alibaba.com/product. [2007, October 16]

60. พรเทพ ถนนแก้ว, คณิต วิชิตพันธุ์, พัฒนา เหล่าไพบูลย์, ไวกูณฐ์ ฤทธิรุฒม์. 2541. รายงานการวิจัยและพัฒนาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวไปเป็นอาหารสัตว์. ขอนแก่น: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

61. Cooper, T.G. 1982. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In J.N. Strathurn, E.W. Jones and J.R. Broach (eds). The Molecular Biology of The Yeast *Saccharomyces*. Cold Spring Habor Monograph Series. Cold Spring Habor Laboratories, Cold Spring. 39-99.

62. Berry, D.R. and Brown, C. 1987. Growth of yeast. In Berry, D.R., Russel, I. and Stewart, G.G. Stewart (eds). Yeast Biotechnology. Alen and Unwin, London. 157-199.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

63. Walker, G.M. 1998. Yeast Physiology and Biotechnology. John Wiley and Sons, Chichester.

64. Issaac, S. and Jenning, D. 1995. Microbial Cultures. Bios Scientific Phublishers, Oxford.

65. Halasz, A. and Lasztity, R. 1991. Use of yeast biomass in food production. CRC Press, Boca Raton.

66. 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 respiro-fermentative metabolism. Applied microbiology and biotechnology. 57(3): 374-378.

67. Shojaosadati, A. S., Khalilzadeh, R. and Sanaei, H. R. 1998. Optimizing of SCP production from sugar beet stillage using isolated yeast. Iran. J. Chem. Chem. Eng. 17: 73-80.

68. Litchfield, H.J. 1980. Microbial protein production. Bioscience. 30(6): 387-396.

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

70. Moeini, H., Nahvi, I. and Tavassoli, M. 2004. Improvement of SCP production and BOD removal of whey with mixed yeast culture. Journal of Biotechnology. 7(3): 249-255.

71. Musial, I., Rymowicz, W. and Cibis, E. 2004. Optimization of single cell biomass production by *Yarrowia lipolytica* using response surface methodology and pulse method. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Biotechnology.7(1): 1-10.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

72. Choi, H. M. and Park, H. Y. 2003. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. Biomass Bioenergy. 25: 221-226.

73. Musenge, M.H., Anderson, G.J. and Holdom, S.R. 1980. Growth of *Candida utilis* on enzymatically hydrolysed cassava. Biotechnology Letters. 2(1): 35-40.

74. Ridgway, Jr., Lappin, A.T., Bejamin, M.B., Corns, B.J. and Akin, C. 1973. Single cell protein materials from ethanol. United States Patent. No. 355346.

75. d' Anjou, C.M. and Daugulis, J.A. 2000. Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. Biotechnology Letters. 22: 341-346.

76. Available from: http://genome.jgi-psf.org/img /pichia.jpg [2007, October 16]

77. Harder, W. and Venhuis, M. 1989. Metabolism of one-carbon compounds. The Yeast Metabolism and Physiology of Yeast. In Rose, A.H. and Harrison, J.S. (eds). Vol.3. 2nd ed. Academic Press, SanDiega. 289-316.

78. Lahtchev, K.L., Semenova, V.D., Tolstorukov, I.I., van de Klei, I. and Veenhuis, M. 2002. Isolation and properties of genetically defined stain of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* CBS4732. Archives of Microbiology. 177: 150-158.

79. Gellissen, G. 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. Appl. Microbiology Biotechnology. 54: 741-750.

80. Kurtzman, C.P. and Fell, W.J. 1998. The Yeasts: A Taxonomic Study. 4th ed. Elsevier Science, Amsterdam.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

81. Barnett, J.A., Payne, W.R. and Yarrow, D. 2000. Yeasts: Characteristics and Identification. 3th ed. Cambridge University Perss, Cambridge.

82. Anthony, C. 1982. The Biochemistry of Methylotrophics. Academic Press, London.

83. Tani, Y., Sakai, Y. and Yamada, H. 1985. Isolation and characterization of the mutant of a methanol yeast *Candida biodinii* S2, with higher formaldehyde productivity. Agricultural Biolology and Chemistry. 49: 2699-2706.

84. Sakai, Y., Tani, Y. and Kato, N. 1999. Biochemical application of cellular functions of the methylotrophic yeast. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 6: 161:173.

85. Yurimoto, H., Sakai, Y. and Kato, N. 2002. Methanol metabolism. In G. Gellissen (ed). *Hansenula polymorpha*: Biology and Applications. Weleg-VCH Verlag GmbH, Weinhein. 61-75.

86. Harder, W. and Brooke, G.A. 1990. Methylotrophic yeast. In De Mot, H.V.R. Yeast: Biotechnology and Biocatalysis. Marcel dekker, New York. 395-428.

87. Bortz, W.M., Paul, P., Haff, A.C. and Holms, W.L. 1972. Glycerol turnover and oxidation in man. Journal of Clin. Invest. 51: 1537-1546.

88. Nevoigt, E. and Stahl, U. 1987. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. 21: 231-241.

89. Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J., Sanchez, M. and Nombela, C. 1999. Role of the mitogen-activated protein kinase Hog 1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. Journal of Bacteriol. 181: 3058-3068.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

90. Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M. and Alder, L. 1997. The two isoenzymes for yeast NAD^+ -dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaption and redox regulation. Journal of EMBO. 16: 2179-2187.

91. Baba, H., Zhang, X.J. and Wolfe, R.R. 1995. Glycerol gluconeogenesis in fastinf humans. Nutrition. 11:149-153.

92. Lages, F., Silva-Graca, M. and Lucas, C. 1999. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeast: a study of 42 species. Microbiology. 145: 2577-2585.

93. Babel, W. amd Hofman K.H. 1982. The relation between the assimilation of methanol and glycerol in yeasts. Archives Microbiology. 132: 179-184.

94. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Palm_oil. [2007, October 16]

95. Van, H.A., Ward, M.D. and Kaplan, J. 2002. Transition metal transport in yeast. Annual review of Mocrobiology. 56: 237-261.

96. Panchal, C.J. and Tavares, A.C.F. 1990. Yeast strain selection for ethanol production. In C.J. Panchal (ed). Yeast strain selection. Marcel Dekker, New York.

97. KURBANOGL'U, B.E. 2001. Production of single-cell protein from Ram Horn hydrolysate. Turkish Journal of Biology. 25: 371-377.

98. อุทัยพร อัครานุภาพพงษ์. 2547. การปรับปรุงพันธุกรรมยีสต์สำหรับการผลิตไขมันสควอลีน และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

99. Wijeyaratne, C.S., Ohta, K., Chavanich, S., Mahamontri, V. and Nilubol, N. 1986. Lipid composition of a Thermotolerant yeast, *Hansenula polymorpha*. Biology and Chemistry. 50(4): 827-832.

100. You, M.K., Rosenfield, C-L. and Knipple, C.D. 2003. Ethanol Tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is Dependent on Cellular oleic acid content. Applied and Environmental Microbiology. 69(3): 1499-1503.

101. Hjortmo, S., Patring, J. and Andlid, T. 2008. Growth rate and medium composition strongly affect folate content in *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology. 123: 93-100.

102. Rydin, S., Molin, G., and Nilsson, I. 1990. Conversion of fat into yeast biomass in protein containing wastewater. Applied Microbiology and Biotechnology. 33:473-476.

103. Domergue, F., Abbadi, A., Ott, C., Zank, K.T., Zahringer, U. and Heinz, E. 2003. Acyl carriers used as substrate by the desaturase and elongase involved in very long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis reconstituted in yeast. Journal of Biological Chemistry. 278(37): 35115-35126.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ภาคผนวก

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YPD agar)

Yeast Extract	10	กรัม
Peptone	20	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น อาจใช้ความร้อนช่วยในการละลายด้วย จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

2. Yeast Extract Peptone Dextrose Broth (YPD broth)

Yeast Extract	10	กรัม
Peptone	20	กรัม
Dextrose	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

3. Yeast Extract Peptone Glycerol broth (Modified YPG)

Yeast Extract	10	กรัม
Peptone	20	กรัม
Glycerol	ตามความเข้มข้นที่ต้องการ	
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น อาจใช้ความร้อนช่วยในการละลายด้วย จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

4. Mineral Salt Medium broth

KH_2PO_4	5.0	กรัม	$ZnSO_4.7H_2O$	30	มิลลิกรัม
$NH_4H_2PO_4$	10.0	กรัม	$MnSO_4 H_2O$	40	มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	4.50	กรัม	Na-EDTA	0.10	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5.0	กรัม	$NiSO_4. 6H_2O$	1.0	มิลลิกรัม
KCl	2.30	กรัม	$CoCl_2. 6H_2O$	1.0	มิลลิกรัม
NaCl	0.50	กรัม	$Na_2MoO_4.2H_2O$	1.0	มิลลิกรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.75	กรัม	KI	1.0	มิลลิกรัม
H_3BO_3	0.50	มิลลิกรัม	Thiamin.HCl	0.10	กรัม
$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$	0.10	กรัม	Biotin	0.30	มิลลิกรัม
$CuSO_4.5H_2O$	8	มิลลิกรัม	Glycerol	ตามความเข้มข้นที่ต้องการ	
น้ำกลั่น	1	ลิตร			

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ภาคผนวก ข

1. การหากราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสง

เลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหาร YPD broth ที่ไม่ปรับพีเอช (6.32) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง เตรียมเซลล์แขวนลอยแล้วเจือจางให้มีค่าความขุ่นอยู่ในช่วง 0.05-0.50 โดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำเซลล์แขวนลอยที่ระดับความเจือจางต่างๆ 10-50 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน (GFC) ซึ่งหาน้ำหนักเริ่มต้นไว้ก่อนแล้ว โดยการนำแผ่นกรองเมมเบรนใส่ในจานเพาะเชื้อ อบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปเก็บในโถดูดความชื้น (desicator) จนความร้อนลดลงถึงระดับอุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปชั่งน้ำหนักแผ่นกรองเมมเบรนและจานเพาะเชื้อ เมื่อนำเซลล์แขวนลอยที่เตรียมได้มากรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรนแล้ว ล้างเซลล์บนแผ่นกรองเมมเบรนด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้งๆละ 50 มิลลิลิตร ใช้ปากคีบหยิบแผ่นเยื่อกรองออกจากชุดกรองใส่กลับลงในจานเพาะเชื้อเดิม นำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง นำไปเก็บในโถดูดความชื้น จนความร้อนลดลงถึงระดับอุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปชั่งหาน้ำหนักรวมของเซลล์แห้งแผ่นกรองเมมและจานเพาะเชื้อ และนำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสูตร

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{Wf - Wi}{V} \times 1000$$

โดยที่ Wf คือ น้ำหนักของเซลล์แห้ง แผ่นกรองเมมเบรนและจานเพาะเชื้อ (กรัม)
Wi คือ น้ำหนักแผ่นกรองเมมเบรน และจานเพาะเชื้อ (กรัม)
V คือ ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

2. การหาน้ำหนักแห้งจากค่าความขุ่นของเซลล์

โดยนำค่าความขุ่นและน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่ได้มาจากข้อ 1 มาเขียนกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับน้ำหนักแห้ง หาค่า cell factor จากความชันของกราฟ สำหรับค่า cell factor ที่หาได้ใช้คำนวณค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อวัดความขุ่นของเซลล์ได้จากสูตร

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \text{ความขุ่นของเซลล์} \times \text{cell factor}$$

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3. **การิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในน้ำหมัก** (Rydin และคณะ [102])

นำตัวอย่างน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว จากนั้นเติมเฮกเซนและเอทานอล อย่างละ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 20 นาที นำส่วนสารประกอบอินทรีย์ มาสกัดซ้ำ 2 ครั้ง ด้วยเฮกเซนปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำส่วนที่ได้จากการสกัดไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ จนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักและคำนวณเป็นกรัมต่อลิตร

4. **การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีเจลดาห์ล** (Kjeldahl protein, A.O.A.C., 1975)

ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม สำหรับตัวอย่างเซลล์ หรือดูดปริมาตร 1 มิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างน้ำหมัก ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วยโปรแตสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟตอัตราส่วน 95 : 5 ลงไปจำนวน 7 กรัม จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมจนสารละลายใส เป็นเวลา 45 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปประกอบเข้ากับเครื่องกลั่นไนโตรเจน และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50-60 มิลลิลิตร หรือจนสารละลายเป็นสีดำ แล้วกลั่นจับก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 100 มิลลิลิตร ที่เติมอินดิเคเตอร์ 3 หยด ซึ่งเป็นเมทิลเรดเมทิลลีนบลู (methyl red methylene blue) กลั่นจนสารละลายบอริกมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่กลั่นได้มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรตแล้วคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน หรือปริมาณโปรตีน

เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน = (ปริมาณกรดเกลือ x ความเข้มข้นกรดเกลือ x 1.4) / น้ำหนักเซลล์แห้ง
เปอร์เซ็นต์โปรตีน = เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน x 6.25

5. **การเตรียมสารสำหรับวิเคราะห์วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน**

5.1 **การเตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์** 0.1 N

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 M (1 N)	=	40	กรัม
ถ้าสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N	=	(40 x 0.1)/1 = 4	กรัม

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

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

5.2 **การเตรียมสารละลาย** Potassium hydrogen phosphate (KHP)

KHP มีมวลโมเลกุล (M.W.) 204.23 (1 N)

ดังนั้นสารละลาย KHP 0.1 N จะมีสาร KHP อยู่ = 0.1 x 204.23 = 20.423 กรัม ละลายสาร KHP 20.4 กรัม ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 1 ลิตร หรือหากต้องการเตรียมสารละลาย KHP 25 มิลลิลิตร ต้องละลายสาร KHP 0.51 กรัม

5.3 **การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์**

โดยนำสารละลาย KHP ที่เตรียมจากข้อ 4.2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตรใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์ฟีนอฟทาลีน (Phenophthalein) ลงไป 3 หยด จากนั้นนำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมได้จากข้อ 4.1 เมื่อถึงจุดยุติ สาระลายในฟลาสก์จะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต แล้วคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังนี้

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

5.4 **การเตรียมสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก** (HCl) 0.1 N

เตรียมจากกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 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
แต่ในการเตรียม ต้องเตรียมจาก HCl 37%
เนื้อสาร HCl 37 g มาจากสารละลาย HCl = 100 g

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

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

ดังนั้นในการเตรียมสารละลาย 0.1 N HCl ปริมาตร 1 ลิตร ต้องดูด HCl เข้มข้น 37% มาปริมาตร 8.1762 มิลลิลิตร ละลายในน้ำบริสุทธิ์ 1 ลิตร

5.5 **การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก** 0.1 N

โดยนำ HCl 0.1 N ที่เตรียมจากข้อ 4.4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร มาไทเทรตกับ 0.1 N NaOH ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจากข้อ 4.3 โดยใช้ Phenophthalein เป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู โดยสูตรคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ HCl ดังนี้

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นที่แน่นอนของสาร NaOH
V_2 = ปริมาตรของสาร NaOH ที่ใช้ไทเทรต
N_2 = ความเข้มข้นที่แท้จริงของ HCl ที่ต้องการทราบ
V_2 = ปริมาตรของ HCl ที่นำมาไทเทรต

5.6 **การเตรียมสารละลายกรดบอริก** (Boric acid) 4 %

ละลายกรดบอริก 40 กรัม ในน้ำบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 ลิตร อาจใช้ความร้อนช่วยในการละลาย

5.7 **การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์** (NaOH) 40 %

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 400 กรัม ในน้ำบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 ลิตร

5.8 **การเตรียมอินดิเคเตอร์** (Mixed Indicator)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

นำ methyl red 0.001 g ละลายในแอลกอฮอล์ 10 ml และนำ bromcresol green 0.001 g ละลายในแอลกอฮอล์ 10 ml แล้วนำสารละลายทั้งสองมาผสมกัน ในอัตราส่วน 1:5

6. **การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในเซลล์** (Domergue **และคณะ** [103])

นำเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีองค์ประกอบและปริมาณที่เหมาะสมจากที่ทดลองมาทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 5-6 รอบ และ 0.1 M $NaHCO_3$ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นชั่งน้ำหนักเซลล์เปียก 1-2 กรัม ใส่ในหลอดหลอดทดลองฝาเกลียว เติมสารคลอโรฟอร์ม/ เมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 ลงไปปริมาตร 15 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดชั้นบนซึ่งเป็นชั้นน้ำมันละลายในคลอโรฟอร์มใส่ในหลอดที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นนำเซลล์ยีสต์มาทำการสกัดต่อด้วย คลอโรฟอร์ม/ เมทานอล ในอัตราส่วน 2:1 อีกครั้ง แล้วทำการบ่มต่ออีก 20 ชั่วโมง นำส่วนคลอโรฟอร์มมาระเหยให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจนจนแห้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง และนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักของไขมันในเซลล์

7. **การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าในเซลล์** (AOAC 1990)

ชั่งเซลล์ยีสต์ 2 กรัมใส่ใน crucible ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปเผาในตู้ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเป็นเถ้าสีขาว และนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักเถ้าโดยคำนวณดังนี้

ปริมาณเถ้า (ร้อยละ) $= W_2 \times W_1 / 100$

โดย W_1 = น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)
W_2 = น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา (กรัม)

8. **การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในเซลล์** (AOAC 1990)

ชั่งตัวอย่างเซลล์ยีสต์ 2-3 กรัม ในภาชนะที่อบและทราบน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นนำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกจากตู้อบมาไว้ในภาชนะกันความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น และชั่งน้ำหนักนำตัวอย่างไปอบซ้ำอีกประมาณ 15-30 นาที หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้น

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ปริมาณความชื้น (ร้อยละ) $= (W_1 - W_2)/W_1 \times 100$

โดย W1 = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)
W2 = น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

9. **การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต และอื่นๆ ในเซลล์**

โดยคำนวณจาก
คาร์โบไฮเดรตและอื่นๆ = 100 – % โปรตีน- % ไขมัน – % เถ้า

10. **การวิเคราะห์ชนิดและเปอร์เซ็นต์กรดไขมันในเซลล์**

โดยชั่งเซลล์ยีสต์เปียก 1 กรัม ในหลอดทดลองฝาเกลียว จากนั้นเติมสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10-15 นาที และนำมาเติมสารปิโตรเลียมอีเธอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายชั้นบนซึ่งเป็นชั้นกลีเซอรอลละลายในอีเธอร์ทิ้ง และนำมาเติมสารปิโตรเลียมอีเธอร์อีกครั้ง และทำตามขั้นตอนดังที่ได้กล่าวมา จะได้ส่วนของสารละลายเมทานอลที่มีกรดไขมันอิสระละลายอยู่จากนั้น เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มอล ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และสารไดเอทิลอีเธอร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขยาให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ดูดชั้นบนซึ่งเป็นชั้นสารละลายไดเอทิลอีเธอร์ ใส่หลอดฝาเกลียวใหม่ จากนั้นนำไประเหยสารละลายไดเอทิลอีเธอร์ด้วยก๊าซไนโตรเจนจนกระทั่งแห้ง และเติมสารละลายโบรอนฟลูอไรด์ในเทานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10- 15 นาที นำมาเติมสารฮปเทน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำมาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูชั้นบนซึ่งเป็นชั้นเฮปเทนที่มีเมทิลเอสเทอร์ละลายอยู่ใส่ในขวดแก้วฝาเกลียวขนาดเล็ก นำไปวิเคราะห์ชนิดและเปอร์เซ็นต์กรดไขมันด้วยเครื่อง GC (Gas Chromatography)

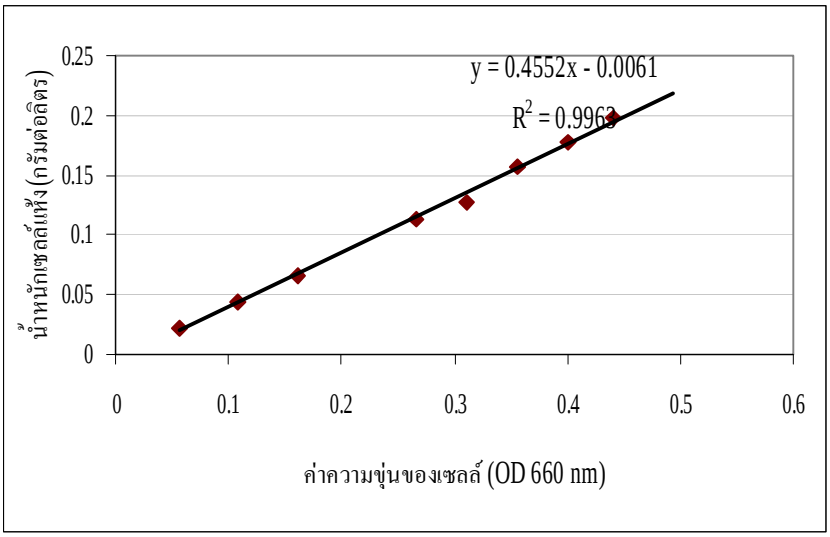
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ภาคผนวก ค

1. กราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ ค. 1 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) กับค่าความขุ่นเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

ค่าความขุ่นเซลล์ (OD 660 nm)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0.05	0.0220
0.10	0.0444
0.15	0.0660
0.20	0.0844
0.25	0.1133
0.30	0.1267
0.35	0.1578
0.40	0.1778
0.45	0.1980
0.50	0.2222



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับน้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ ค.1 ข้อมูลวิเคราะห์องค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

จำนวนซ้ำ	เปอร์เซ็นต์ (%)		
	กลีเซอรอล	น้ำมัน	ความชื้น
1	53.8	6.3550	17.0818
2	57.4	5.3766	15.8672
3	56.4	7.2147	15.0843
4	55.1	8.0353	14.4963
5	54.8	8.4479	17.6793
6	54.2	6.8989	16.0912
7	53.4	7.0071	-
8	53.4	-	-
9	55.5	-	-
10	53.8	-	-
11	53.7	-	-
12	54.7	-	-
13	54.7	-	-
14	54.5	-	-
15	55.5	-	-
ค่าเฉลี่ย	54.73 ±1.131	7.05 ± 1.021	16.09 ± 1.190

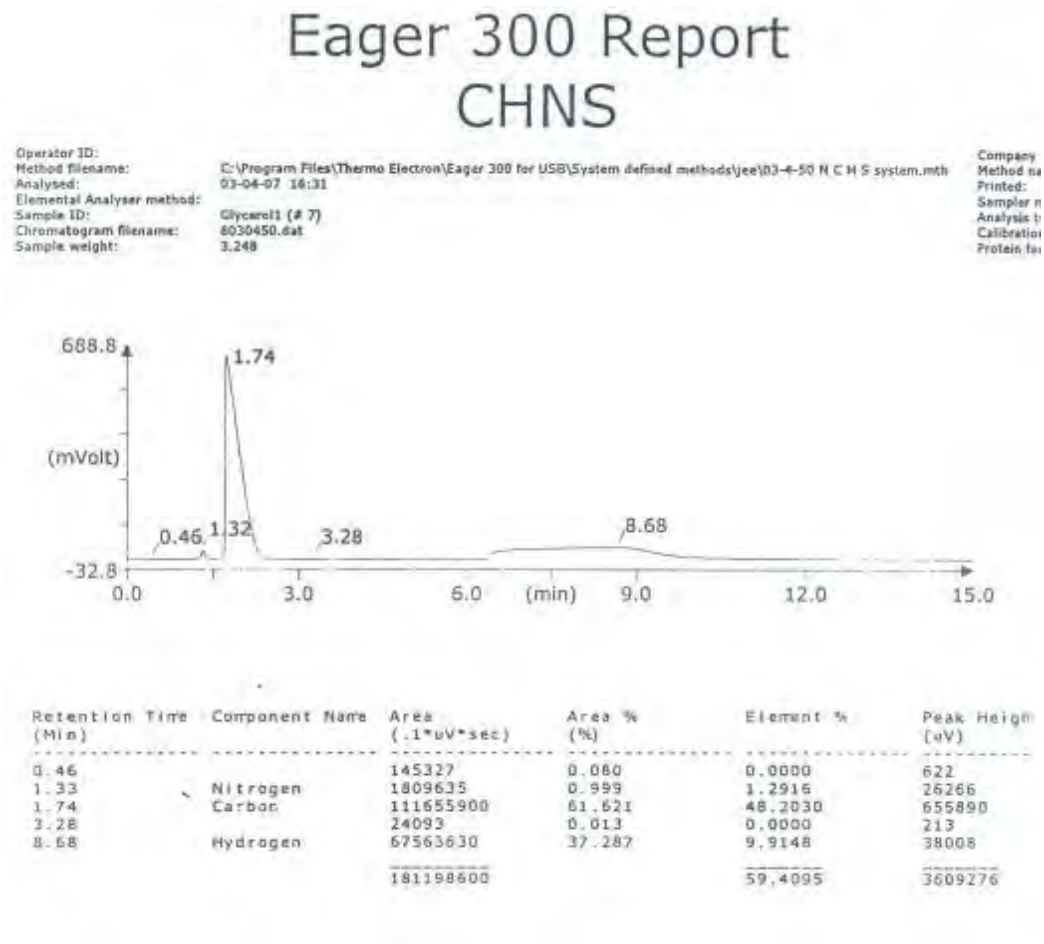
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ตารางที่ ค. 2 ข้อมูลวิเคราะห์องค์ประกอบในเซลล์ยีสต์ *Hansenula polymorpha* NRRL2214 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบ 7.5 % เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน

จำนวนซ้ำ	เปอร์เซ็นต์ (%)				
	โปรตีน	ไขมัน	ความชื้น	เถ้า	คาร์โบไฮเดรต
1	41.10	16.38	72.80	3.22	39.30
2	42.59	15.65	73.12	3.10	38.66
3	42.2	17.03	72.30	2.86	37.91
4	41.35	16.57	71.46	2.64	39.44
5	41.10	16.82	72.02	3.58	38.50
ค่าเฉลี่ย	41.67±0.685	16.49±0.530	72.34±0.651	3.08±0.358	38.76±0.623

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ภาคผนวก ง



Retention Time (Min)	Component Name	Area (.1*uV*sec)	Area % (%)	Element %	Peak Height (uV)
0.46		145327	0.080	0.0000	622
1.33	Nitrogen	1809635	0.999	1.2916	26266
1.74	Carbon	111655900	61.621	48.2030	655890
3.28		24093	0.013	0.0000	213
8.68	Hydrogen	67563630	37.287	9.9148	38008
		181198600		59.4095	3609276

รูปที่ ง.1 โครมาโตแกรมแสดงการวิเคราะห์ธาตุไนโตรเจน คาร์บอน และไฮโดรเจน จากเครื่อง NA-2000 โดย สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้

อุณหภูมิเตาเผาสารตัวอย่าง : Left furnace : 900 °C

Right furnace : 780 °C

ก๊าซเชื้อเพลิง : ออกซิเจน

ชนิดสารที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ (column) : Activated Carbon

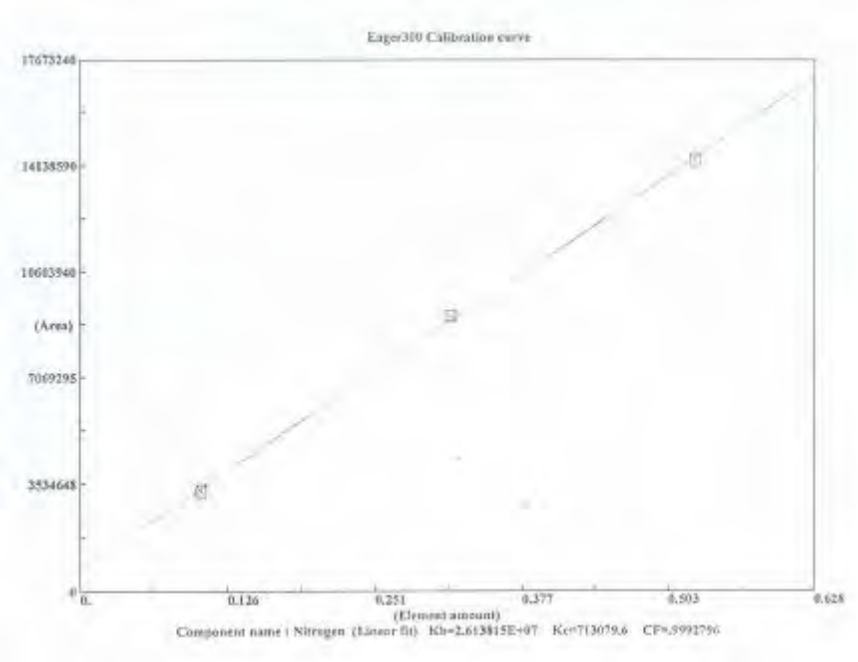
อุณหภูมิคอลัมน์ : 80 °C

อุณหภูมิอินเจกเตอร์ (injector) : 190 °C

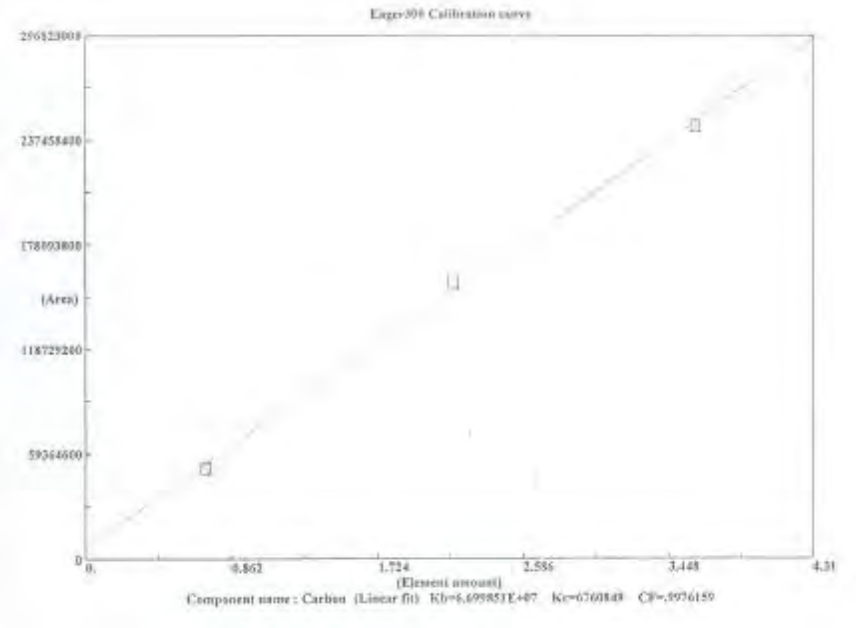
เครื่องตรวจหา (detector) : TCD (Thermal conductivity detector)

ก๊าซพา (carrier gas) : ฮีเลียม

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

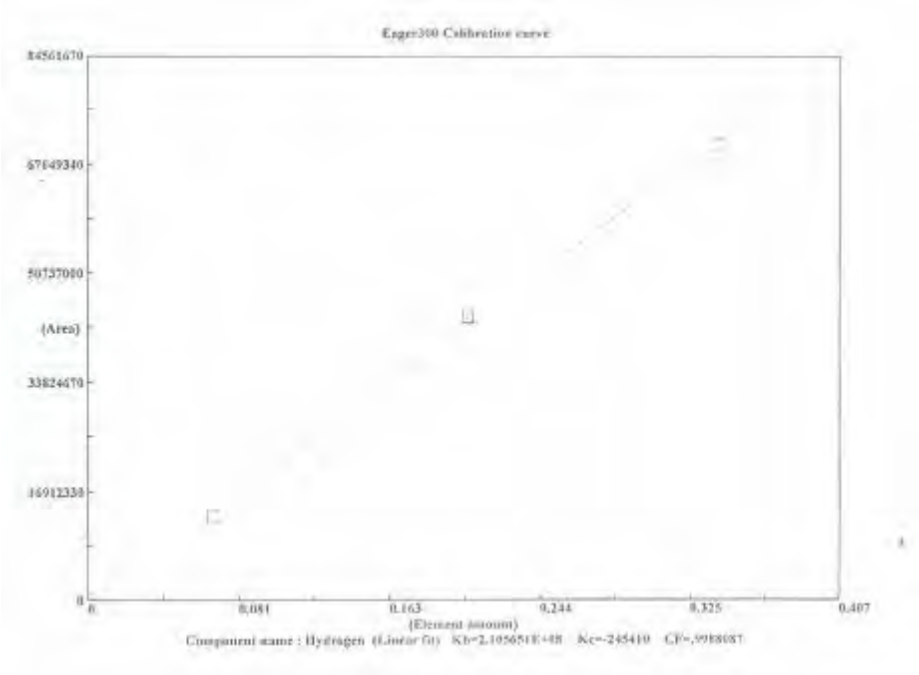


รูปที่ ง.2 กราฟมาตรฐานไนโตรเจน จากเครื่อง NA-2000



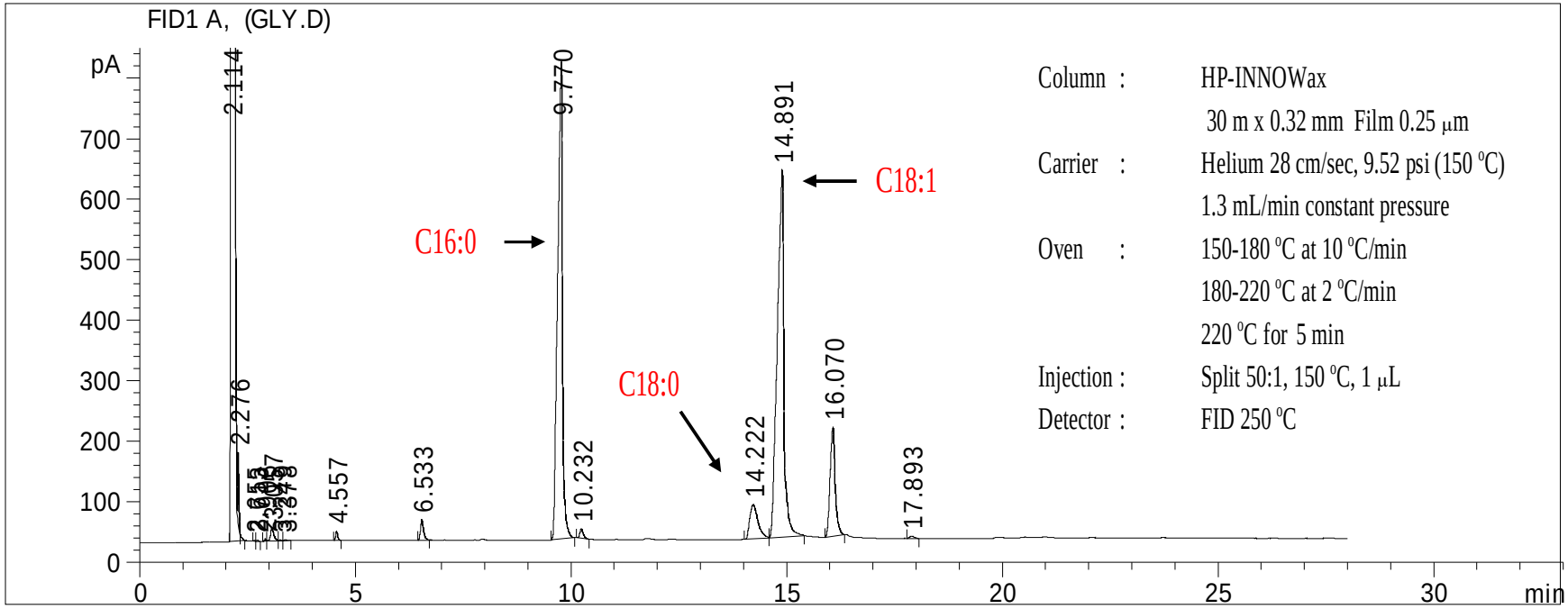
รูปที่ ง.3 กราฟมาตรฐานคาร์บอน จากเครื่อง NA-2000

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



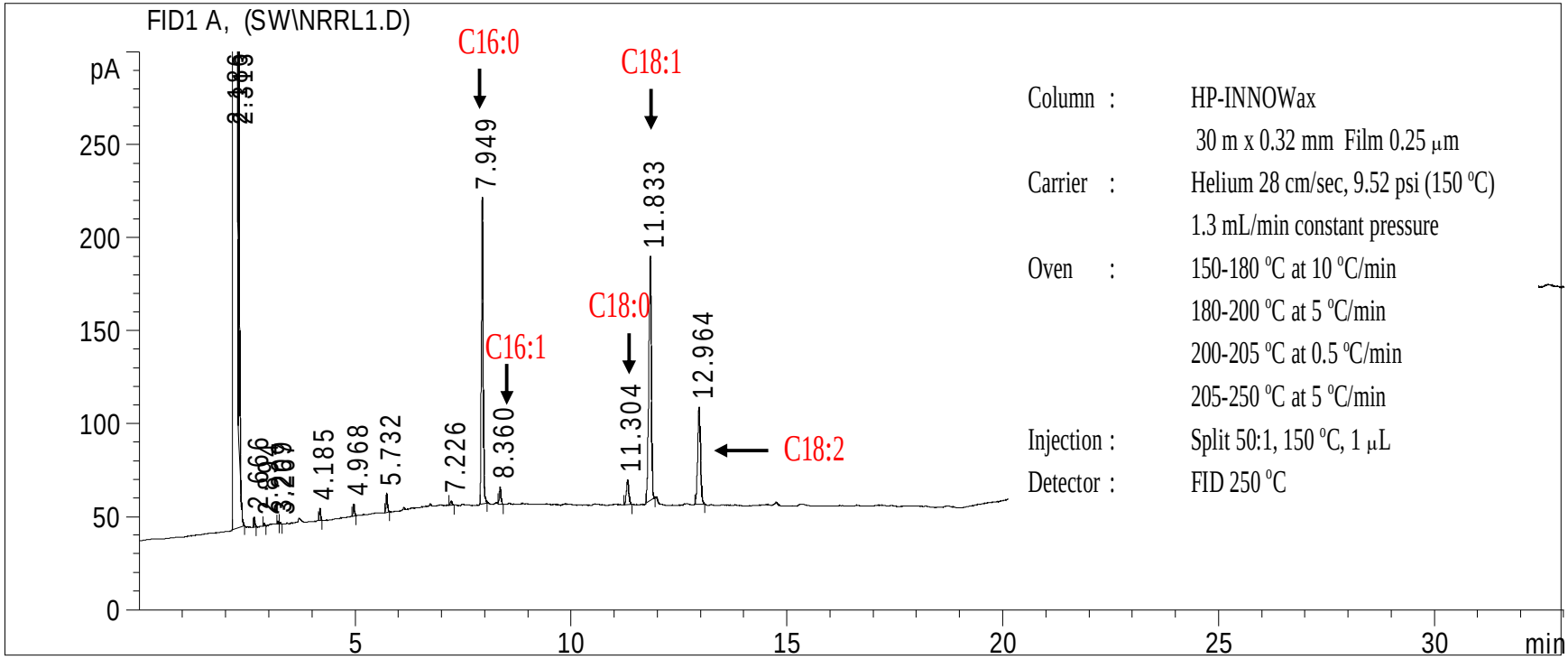
รูปที่ ง.4 กราฟมาตรฐานไฮโดรเจน จากเครื่อง NA-2000

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ ง.5 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดต่างๆ ในน้ำมันที่สกัดได้จากกลีเซอรอลดิบ ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (Gas Chromatography)โดยเทียบกับ retention time ของสารมาตรฐาน Fatty acid methyl esters (FAMEs)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ ง.6 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดต่างๆ จากยีสต์ *H. polymorpha* สายพันธุ์ NRRL Y-2214 ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (Gas Chromatography) โดยเทียบกับ retention time ของสารมาตรฐาน Fatty acid methyl esters (FAMEs)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

รูปที่ ง. 7 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานกลูโคส และกลีเซอรอล ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยใช้กรดซัลฟิวริก 0.005 นอร์มอล เป็นตัวพา (mobile phase) ด้วยอัตรา 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที และอุณหภูมิคอลัมน์ 45 องศาเซลเซียส

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ภาคผนวก จ

ที่ ศธ0513.12201/510647

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
50 พหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์ 0 2942 8629-35 โทรสาร 0 2940 6455

รายงานผลการทดสอบ

คำขอบริการเลขที่ : 510647 วันที่ 28 มกราคม 2551
ผู้ขอรับบริการ : คุณแพรลีย์ หาลวงษ์
สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ อาคารสถาบัน 3
ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
โทรศัพท์ 08 9665 1142 โทรสาร 0 2253 3543
ชื่อตัวอย่าง : กรีเซอรอลดิน
ชนิดตัวอย่าง : วัตถุดิบ
ภาชนะบรรจุ : ถุงพลาสติกไฮ ปิดสนิท
ขนาดบรรจุต่อหน่วย : 80 กรัม
ลักษณะตัวอย่าง : ผลึกสีน้ำตาลอ่อนปนกับผลึกสีน้ำตาลเข้ม
วันที่รับตัวอย่าง : 12 ธันวาคม 2550
วันที่ทำการทดสอบ : 21-23 มกราคม 2551

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	วิธีทดสอบ	หมายเหตุ
Vitamin A (β - carotene), µg/100 g	<3.00	T-CM-011 Based on Food Chemistry (2003) ; 83(2) ; 205-212	*

หมายเหตุ : * LOQ = 3.00 µg/100 g

ผู้ทดสอบ
ลงชื่อ.....
(นางจันทร์สุดา จริยวัฒนวิจิตร)
นักวิจัย ระดับ 7

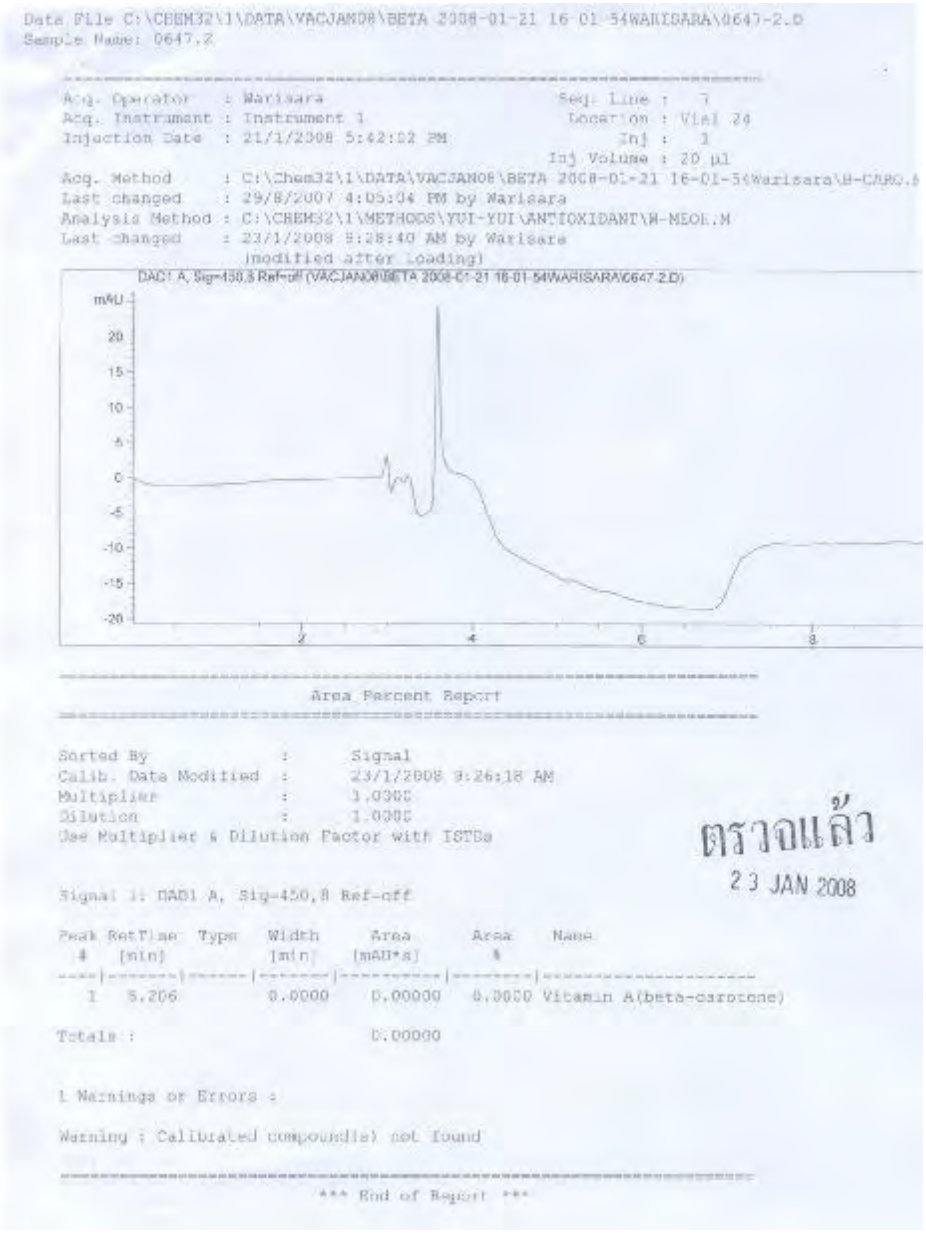
ผู้รับรอง
ลงชื่อ.....
(นางมาลัย บุญรัศมีกรกิจ)
หัวหน้าศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร

ลงชื่อ.....
(นาง[illegible])
ผู้อำนวยการ

รายงานผลการวิเคราะห์นี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้รับเท่านั้น และห้ามนำไปใช้ประโยชน์ในการโฆษณา
เอกสารทุกฉบับต้องมีตราประทับของสถาบันฯ และลงนามกำกับโดยผู้มีอำนาจ
ศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร โทร. 0 2942 8629-35 ต่อ 800, 811 โทรสาร 0 2942 7601

รูปที่ จ.1 ข้อมูลผลการวิเคราะห์เบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) ด้วยเครื่อง HPLC ที่วิเคราะห์โดยสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



Data File C:\CHEM32\1\DATA\VACJAN08\BETA 2008-01-21 16-01-54WARISARA\0647-2.D
Sample Name: 0647.2

Acq. Operator : Warisara
Seq. Line : 7
Acq. Instrument : Instrument 1
Location : Vial 24
Injection Date : 21/1/2008 5:42:22 PM
Inj : 1
Inj Volume : 20 µl
Acq. Method : C:\Chem32\1\DATA\VACJAN08\BETA 2008-01-21 16-01-54Warisara\W-CARO.
Last changed : 29/8/2007 4:05:04 PM by Warisara
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\YUI-YUI\ANTIOXIDANT\W-MEOH.M
Last changed : 23/1/2008 5:28:40 AM by Warisara
(modified after loading)

DAD1 A, Sig=450,8 Ref=off (VACJAN08\BETA 2008-01-21 16-01-54WARISARA\0647-2.D)

mAU
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
2
4
6
8

Area Percent Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 23/1/2008 9:26:18 AM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

ตรวจแล้ว
23 JAN 2008

Signal 1: DAD1 A, Sig=450,8 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	5.206		0.0000	0.00000	0.0000	Vitamin A(beta-carotene)

Totals : 0.00000

1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

*** End of Report ***

รูปที่ จ.2 โครมาโตแกรมแสดงการวิเคราะห์เบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) ด้วยเครื่อง HPLC ที่วิเคราะห์โดยสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ที่ ทธ0513.12201/502632

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
50 พหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์ 0 2942 8629-35 โทรสาร 0 2940 6455

รายงานผลการทดสอบ

คำขอบริการเลขที่ : 502632 วันที่ 20 มิถุนายน 2550
ผู้ขอรับบริการ : สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
อาคารสถาบัน 3 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท
แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
โทรศัพท์ 0 2218 8055 โทรสาร 0 2253 3543
ชื่อตัวอย่าง : กลีเซอรอลดิบ
ชนิดตัวอย่าง : วัตถุดิบ
ภาชนะบรรจุ : ถุงพลาสติกใส ปิดสนิท
ขนาดบรรจุต่อหน่วย : 30 กรัม
ลักษณะตัวอย่าง : ก้อนเหนียวสีน้ำตาล
วันที่รับตัวอย่าง : 12 มิถุนายน2550
วันที่ทำการทดสอบ : 13 - 19 มิถุนายน 2550

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	วิธีทดสอบ	หมายเหตุ
Sodium, g/100 g	1.60	T-CM-019 Based on AOAC (2000) 999.10	-

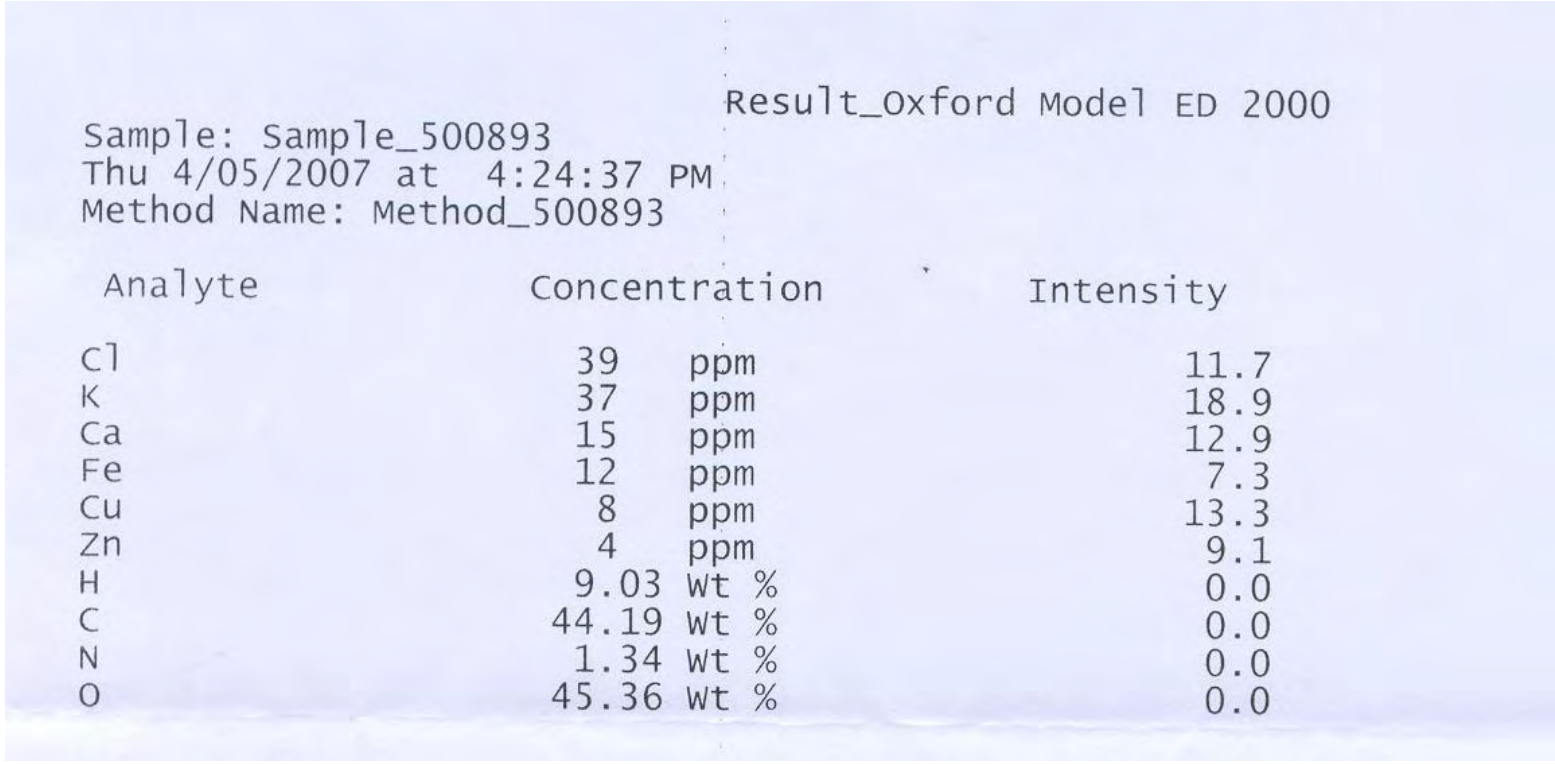
ผู้ทดสอบ
ลงชื่อ.....
(นางจันทร์ฉุด์ จริยวัฒนวิจิตร)
นักวิจัย ระดับ 7

ผู้รับรอง
ลงชื่อ.....
(นางมาลัย บุญรัตนกรกิจ)
หัวหน้าศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร
ลงชื่อ.....
(น[illegible])
ผู้อำนวยการ

ผลงานตามการวิเคราะห์นี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้รับเท่านั้น และห้ามนำไปใช้ประโยชน์ในการโฆษณา
เอกสารทุกฉบับต้องมีตราประทับของสถาบันฯ และลงนามกำกับโดยผู้มีอำนาจ
ศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร โทร. 0 2942 8629-35 ต่อ 800, 811 โทรสาร 0 2942 7601

รูปที่ จ.3 ข้อมูลผลการวิเคราะห์ธาตุโซดียม (Sodium) ด้วยเครื่อง ICP (Inductively Coupled Plasma) ที่วิเคราะห์โดยสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



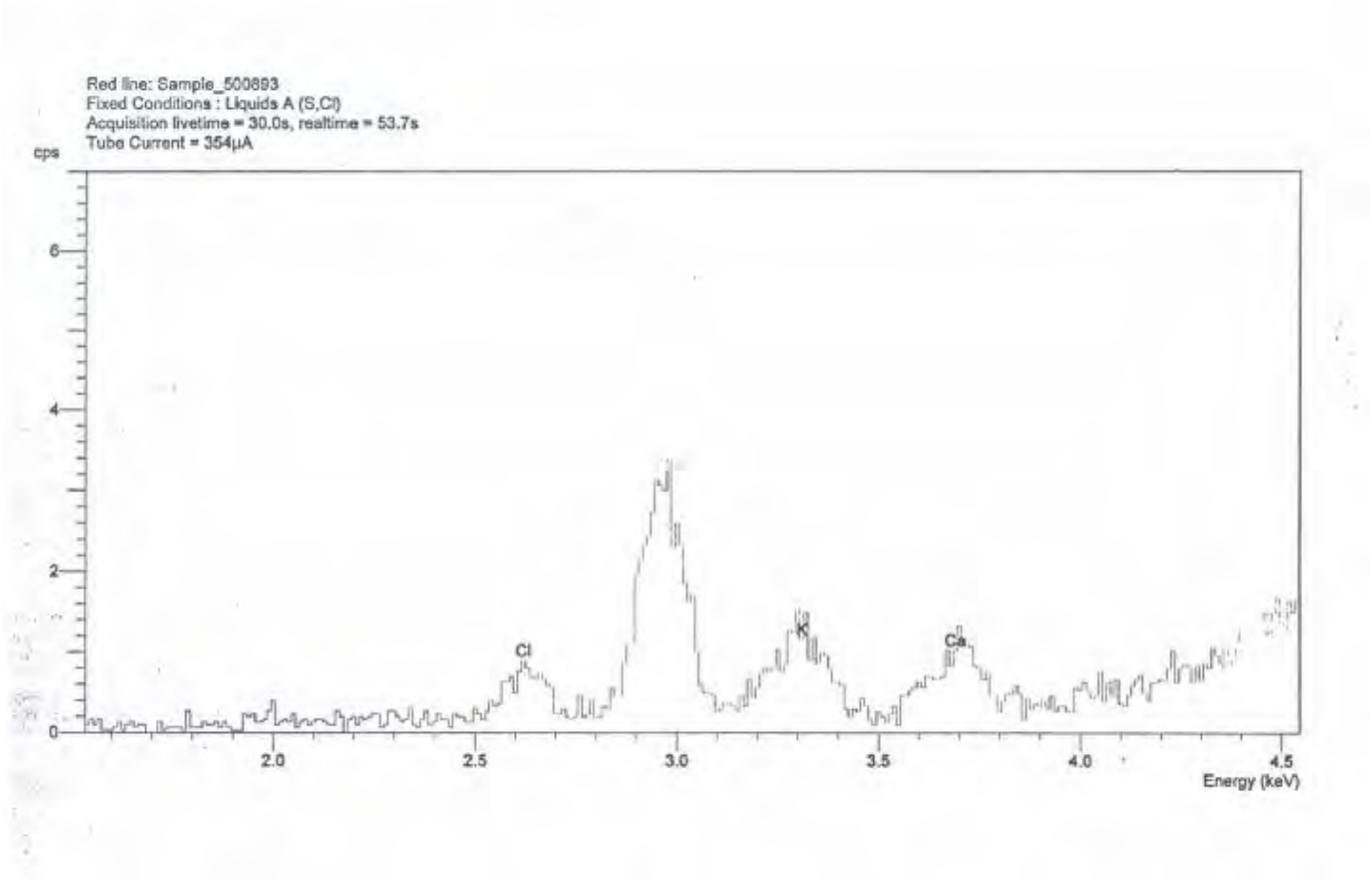
Result_Oxford Model ED 2000

Sample: Sample_500893
Thu 4/05/2007 at 4:24:37 PM
Method Name: Method_500893

Analyte	Concentration		Intensity
Cl	39	ppm	11.7
K	37	ppm	18.9
Ca	15	ppm	12.9
Fe	12	ppm	7.3
Cu	8	ppm	13.3
Zn	4	ppm	9.1
H	9.03	Wt %	0.0
C	44.19	Wt %	0.0
N	1.34	Wt %	0.0
O	45.36	Wt %	0.0

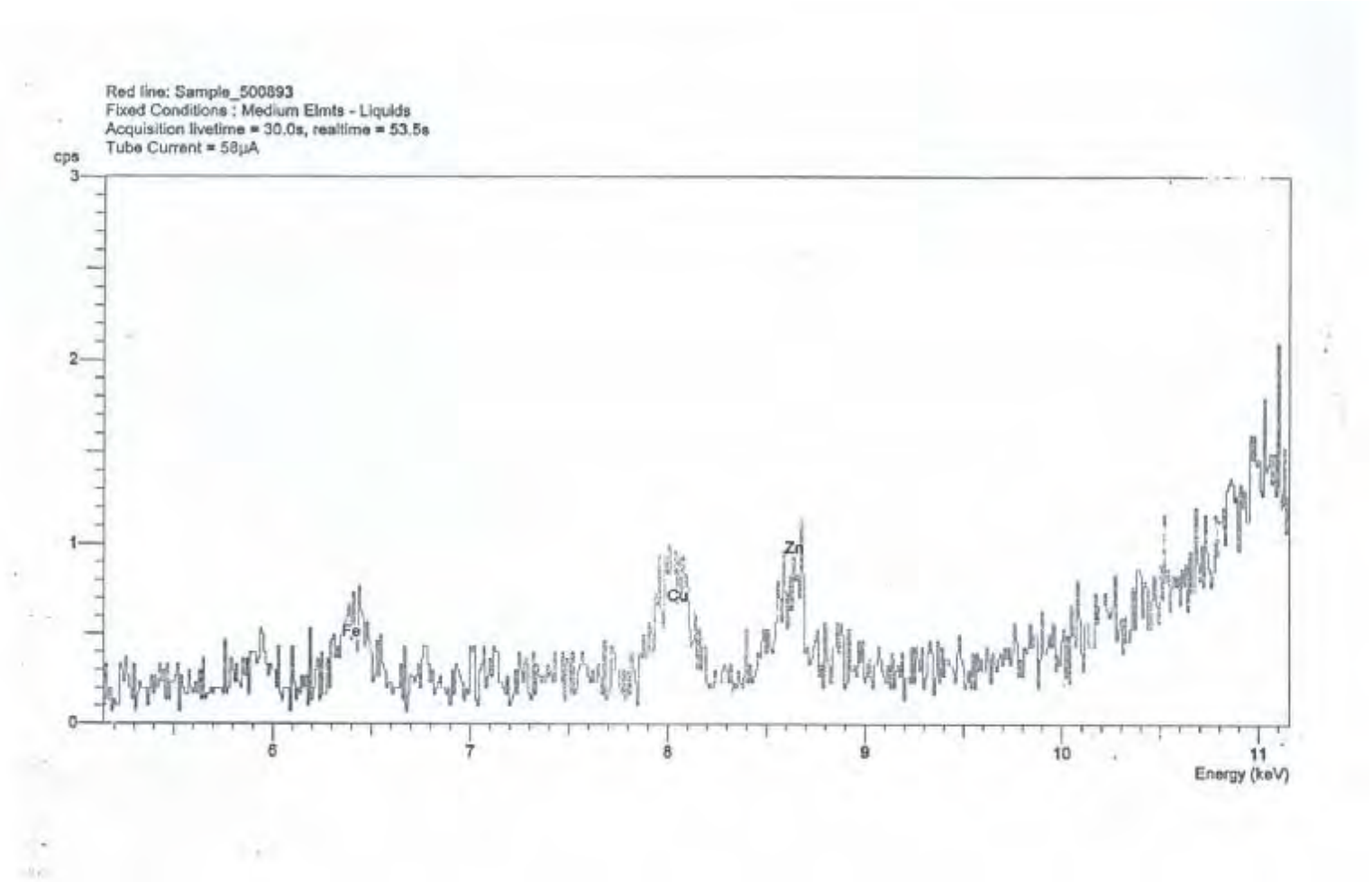
รูปที่ จ.4 ข้อมูลผลการวิเคราะห์ธาตุต่างๆในกลีเซอรอลดิบ ด้วยเครื่อง XRF (X-Ray Fluorescence) ที่วิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์ มหาวิยาลัย

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ จ.5 โครมาโตแกรมแสดงการวิเคราะห์ธาตุต่างๆในกลีเซอรอลดิบ ด้วยเครื่อง XRF (X-Ray Fluorescence) ที่วิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์ มหาวิยาลัย

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



รูปที่ จ.6 โครมาโตแกรมแสดงการวิเคราะห์ธาตุต่างๆในกลีเซอรอลดิบ ด้วยเครื่อง XRF (X-Ray Fluorescence) ที่วิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์ มหาวิยาลัย

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ก

IQALAB

ORIGINAL

Analysis / Test Report

IQA Laboratory Co., Ltd.
613 Jitt-Athon Bld., Ramkhamhaeng Rd., Huamark, Bangkapi, Bangkok. 10240
Phone: (662) 719-6720
Fax: (662) 374-4040

Bill to: Kittaleeya Tatwong
Report to: Kittaleeya Tatwong
Biotechnology Science Faculty,
Chulalongkorn University
Phayathai Rd.
Patumwan, Bangkok Thailand.
10330
Attn: Kittaleeya Tatwong
Sampled By
Company:

Project
ID:
Name:
Location:
PO: 6331904800(WPC)
Acct. Code:

Lot ID: 92230

Date Received: Feb 01, 2009 05:00 PM
Date Reported: Feb 11, 2009 04:05 PM
Report Number: 10232

Phone: (662) 218-8071
Fax: (662) 253-3543 Email: n.malai72@hotmail.com
Email/Fax cc:

Page: 1 of 1

IQA Number 92230-1
Sample Date February 1, 2009 05:30 PM
Sample Description Yeast Cell (Wet Weight)
Condition of Sample packed in one plastic bag, refrigerated
Date of Analysis February 4, 2009

Analyte	Units	Result(s)	Method
Food Testing			
Pantothenic acid	mg/100g	0.20	AOAC(2000)
Vitamin B1	mg/100g	<0.01	JAFC(1984)
Vitamin B2	mg/100g	0.09	JAFC(1984)
Vitamin B6	mg/100g	<0.1	JAFC(1984)

ข

IQALAB

ORIGINAL

Analysis / Test Report

IQA Laboratory Co., Ltd.
613 Jitt-Athon Bld., Ramkhamhaeng Rd., Huamark, Bangkapi, Bangkok. 10240
Phone: (662) 719-6720
Fax: (662) 374-4040

Bill to: Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University
Report to: Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University
Biotechnology Science Faculty,
Chulalongkorn University
Phayathai Rd.
Patumwan, Bangkok Thailand
10330
Attn: Institute of Biotechnology and Gene Chul
Sampled By
Company:

Project
ID:
Name:
Location:
PO: 6331904800(WPC)
Acct. Code:

Lot ID: 92216

Date Received: Feb 01, 2009 05:00 PM
Date Reported: Feb 12, 2009 09:49 PM
Report Number: 10277

Phone: (662) 218-8071
Fax: (662) 253-3543
Email/Fax cc:

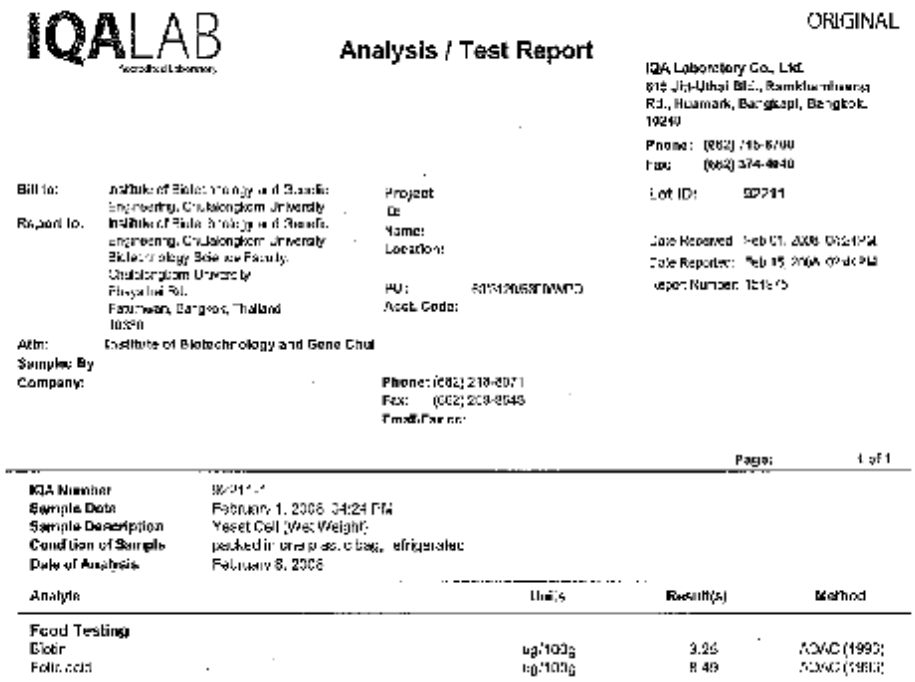
Page: 1 of 1

IQA Number 92216-1
Sample Date February 1, 2009 05:24 PM
Sample Description Yeast Cell (Wet Weight)
Condition of Sample packed in one plastic bag, refrigerated
Date of Analysis February 4, 2009

Analyte	Units	Result(s)	Method
Food Testing			
Vitamin B12	µg/100g	<0.1	AOAC(2000)
Niacin	mg/100g	<0.10	JAOAC (1992)
Niacinamide	mg/100g	<0.10	JAOAC (1992)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ค



IQALAB

Analysis / Test Report

ORIGINAL

IQA Laboratory Co., Ltd.
818 Jit-Uthai Bldg., Ramkhamhaeng Rd., Huamark, Bangkapi, Bangkok 10240
Phone: (662) 719-8700
Fax: (662) 374-4840

Bill to: Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University
Report to: Institute of Biotechnology and Genetic engineering, Chulalongkorn University Biotechnology Science Faculty Chulalongkorn University Phayathai Rd. Patumwan, Bangkok, Thailand 10330
Attn: Institute of Biotechnology and Gene Chul
Sample By Company:

Project ID: Name: Location:
PO: [illegible]
Acct. Code:

Phone: (662) 218-8071
Fax: (662) 209-8648
Email/Pager:

Lot ID: [illegible]
Date Received: Feb 01, 2008 [illegible]
Date Reported: Feb 15, 2008 [illegible]
Report Number: [illegible]

Page: 1 of 1

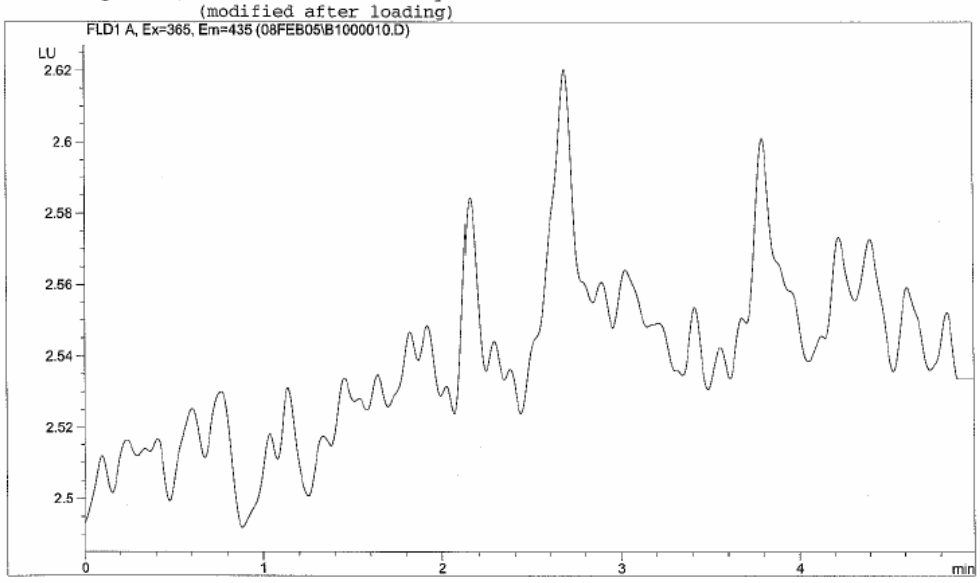
IQA Number	[illegible]
Sample Date	February 1, 2008 04:24 PM
Sample Description	Yeast Cell (Wet Weight)
Condition of Sample	packed in [illegible] bag, refrigerated
Date of Analysis	February 8, 2008

Analyte	Units	Result(s)	Method
Food Testing			
Biotin	ug/100g	3.26	AOAC (1990)
Folic acid	ug/100g	8.49	AOAC (1990)

รูปที่ จ.7 ข้อมูลผลการวิเคราะห์วิตามิน B_1, B_2, B_5 และ B_6 (ก) B_3 และ B_{12} (ข) B_8 และ B_9 (ค) ในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เจริญในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน วิเคราะห์โดยบริษัท ไอคิวเอ แลบอราทอรี จำกัด

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

```
Injection Date  : 2/5/2008 1:15:18 PM            Seq. Line :   9
Sample Name     : 92230-1                       Location : Vial 59
Acq. Operator   : KH                               Inj :   1
Acq. Instrument : Instrument 1                 Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM_1\1\METHODS\VITB1.M
Last changed    : 2/2/2008 10:44:21 AM by SPY
Analysis Method : C:\HPCHEM_1\1\METHODS\CAL_2008\080206B1.M
Last changed    : 2/14/2008 4:26:56 PM by SPY
                  (modified after loading)
```

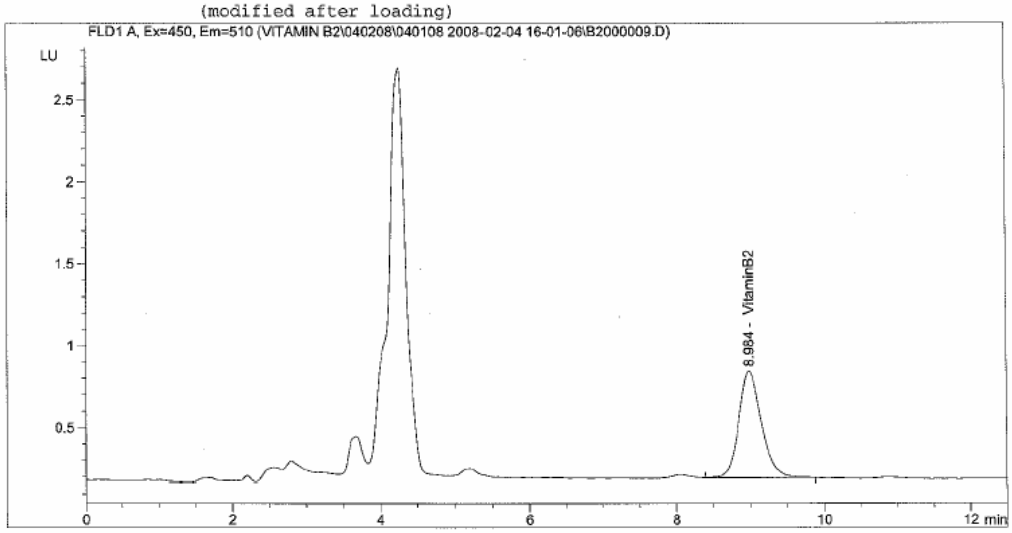



```
                    External Standard Report

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      Wednesday, February 06, 2008 8:35:42 AM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=365, Em=435

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount   Grp   Name
 [min]         LU    *s                [ng/ul]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  3.807           -          -          -         VitaminB1

Totals :                                0.00000

 Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found
```

รูปที่ จ.8 โครมาโตแกรมแสดงการวิเคราะห์วิตามินบี 1 (B_1) ในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เจริญในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน วิเคราะห์โดย บริษัท ไอคิวเอ แลบอราทอรี จำกัด

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

```
Acq. Operator   : KH                                  Seq. Line :   9
Acq. Instrument : Instrument 1                        Location : Vial 9
Injection Date  : 2/4/2008 5:59:52 PM                      Inj :   1
                                                    Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\Chem32\1\DATA\Vitamin B2\040108\040108 2008-02-04 16-01-06\VITAMINB2.M
Last changed    : 2/4/2008 4:00:40 PM by KH
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA\VITAMIN B2\040208\040108 2008-02-04 16-01-06\VITAMINB2.M
Last changed    : 2/14/2008 4:29:17 PM by KH
                  (modified after loading)
```

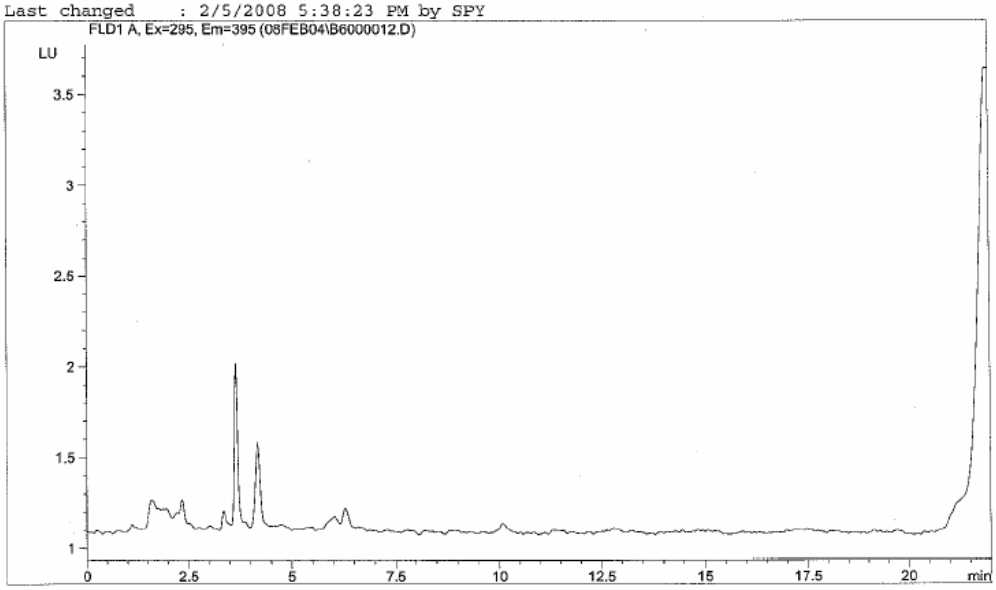



```
                    External Standard Report

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      Wednesday, February 06, 2008 3:44:53 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=450, Em=510

RetTime  Type      Area      Amt/Area    Amount    Grp   Name
 [min]          LU    *s                [ng/ul]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  8.984 BB       13.69709    3.37773   46.26510     VitaminB2

Totals :                                 46.26510
```

รูปที่ จ.9 โครมาโตแกรมแสดงการวิเคราะห์วิตามินบี 2 (B_2) ในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เจริญในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน วิเคราะห์โดย บริษัท ไอคิวเอ แลบอราทอรี จำกัด

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

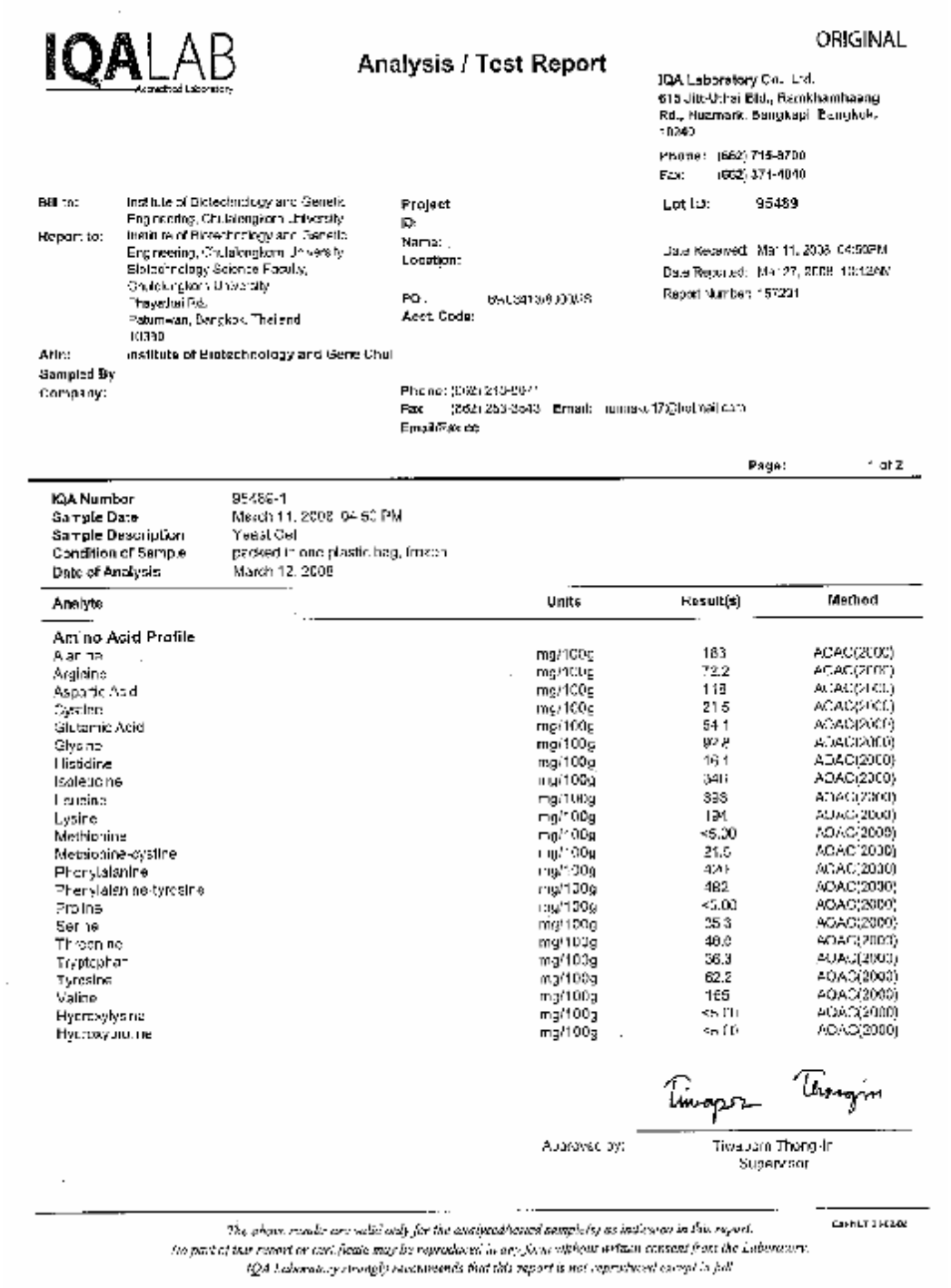
```
Injection Date  : 2/4/2008 7:40:18 PM            Seq. Line :  10
Sample Name     : 92230-1                       Location : Vial 10
Acq. Operator   : KH                               Inj :   1
Acq. Instrument : Instrument 1                 Inj Volume : 50 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM_1\1\METHODS\VITB6.M
Last changed    : 1/28/2008 4:46:05 PM by SPY
Analysis Method : C:\HPCHEM_1\1\METHODS\CAL_2008\080205B6.M
Last changed    : 2/5/2008 5:38:23 PM by SPY
```




```
                    External Standard Report

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      Tuesday, February 05, 2008 5:37:02 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=295, Em=395

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount    Grp   Name
 [min]          LU    *s                [ng/ul]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  5.620           -          -          -          VitaminB6

Totals :                                 0.00000

 Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found
```

รูปที่ จ.10 โครมาโตแกรมแสดงการวิเคราะห์วิตามินบี 6 (B_6) ในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เจริญในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน วิเคราะห์โดย บริษัท ไอคิวเอ แลบอราทอรี จำกัด

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



IQALAB
Accredited Laboratory

Analysis / Test Report

ORIGINAL

IQA Laboratory Co., Ltd.
615 Jitt-Uthai Bldg., Ramkhamhaeng Rd., Huamark, Bangkapi, Bangkok 10240
Phone: (662) 715-8700
Fax: (662) 374-4010

Bill to: Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University
Report to: Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, Biotechnology Science Faculty, Chulalongkorn University, Phayathai Rd., Patumwan, Bangkok, Thailand 10330
Attn: Institute of Biotechnology and Gene Chul
Sampled By:
Company:

Project ID:
Name:
Location:
PO.
Acct. Code:

Lot ID: 95489
Date Received: Mar 11, 2008 04:50PM
Date Reported: Mar 27, 2008 10:12AM
Report Number: 57231

Phone: (662) 218-5577
Fax: (662) 253-3643 Email:
Email/Fax to:

Page: 1 of 2

IQA Number	95489-1
Sample Date	March 11, 2008 04:50 PM
Sample Description	Yeast Cell
Condition of Sample	packed in one plastic bag, frozen
Date of Analysis	March 12, 2008

Analyte	Units	Result(s)	Method
Amino Acid Profile			
Alanine	mg/100g	183	AOAC(2000)
Arginine	mg/100g	72.2	AOAC(2000)
Aspartic Acid	mg/100g	118	AOAC(2000)
Cystine	mg/100g	21.5	AOAC(2000)
Glutamic Acid	mg/100g	54.1	AOAC(2000)
Glycine	mg/100g	92.8	AOAC(2000)
Histidine	mg/100g	16.1	AOAC(2000)
Isoleucine	mg/100g	34.6	AOAC(2000)
Leucine	mg/100g	53.5	AOAC(2000)
Lysine	mg/100g	134	AOAC(2000)
Methionine	mg/100g	<5.00	AOAC(2000)
Methionine-cystine	mg/100g	21.5	AOAC(2000)
Phenylalanine	mg/100g	404	AOAC(2000)
Phenylalanine-tyrosine	mg/100g	482	AOAC(2000)
Proline	mg/100g	<5.00	AOAC(2000)
Serine	mg/100g	35.3	AOAC(2000)
Threonine	mg/100g	48.0	AOAC(2000)
Tryptophan	mg/100g	36.3	AOAC(2000)
Tyrosine	mg/100g	62.2	AOAC(2000)
Valine	mg/100g	165	AOAC(2000)
Hydroxylysine	mg/100g	<5.00	AOAC(2000)
Hydroxyproline	mg/100g	<5.00	AOAC(2000)

Approved by: Tiwaporn Thong-in
Supervisor

The above results are valid only for the analyzed/tested sample(s) as indicated in this report.
No part of this report or certificate may be reproduced in any form without written consent from the Laboratory.
IQA Laboratory strongly recommends that this report is not reproduced except in full.

รูปที่ จ.11 ข้อมูลผลการวิเคราะห์กรดอะมิโน ในเซลล์ยีสต์ *H. polymorpha* NRRL Y-2214 ที่เจริญในอาหารสูตรดัดแปลง YPG ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน วิเคราะห์โดยบริษัท ไอคิวเอ แลบอราทอรี จำกัด

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ภาคผนวก ฉ

Springer®

FERMENTATION & CULTURE MEDIA Biotec

SPRINGER® STANDARD

BAKER'S YEAST EXTRACT

		Old product codes
Springer® 0207 / 0 – PW – L	Powder	
Springer® 0207 / 0 – MG – L	Microgranultated powder	182

DESCRIPTION

Springer® 0207 / 0 is a primary yeast extract obtained by the autolysis of a selected strain of *Saccharomyces cerevisiae* yeast, especially grown on a molasses based media.

CERTIFICATION

This product is guaranteed to be Non-GM, free of animal origin ingredient and Kosher.

APPLICATIONS

Recommended for most fermentation processes and laboratory media formulations :
High quality source of readily available soluble, amino acids, peptides, vitamins and essential elements.

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS

Solubility	Totally soluble
Colour of commercial product	Light beige
Colour in 10 % solution	Clear light yellow

Composition in g per 100 g of product as is:

Dry matter	94.0	-	98.0
Total nitrogen	10.7	-	12.2
Amino nitrogen	5.2	-	6.7
pH	6.8	-	7.2
Sodium chloride		<	0.5
Proteins (Nitrogen x 6.25)	66.8	-	76.3
Total carbohydrates	2.0	-	6.0
Ash	11.5	-	16.0

MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS

CFU per g of product

Total plate count	<	5 000
Coliforms	<	5
Spores of Clostridium perfringens	<	10
Yeasts	<	50
Moulds	<	50
Salmonella *(per 25 g)*		Negative
E.coli		Negative
Staphylococcus aureus		Negative

Bio Springer

103, rue Jean Jaurès - 94704 Maisons-Alfort cedex (France)
Tél. : +33 (0)1 49 77 68 45/46 - Fax : +33 (0)1 49 77 03 58
www.springer.fr - biotec@springer.fr

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

B_02070PW-MGL 230904

(Guaranteed values are listed in bold / other values are given for indication only)

AVERAGE AMINO ACID COMPOSITION *expressed in 100 g of raw proteins*

Alanine	10.5	Lysine	5.7
Arginine	4.0	Methionine	2.2
Aspartic acid	4.4	Phenylalanine	6.0
Cystine	0.6	Proline	3.6
Glutamic acid	18.7	Serine	6.5
Glycine	3.8	Threonine	4.6
Histidine	1.9	Tyrosine	2.2
Isoleucine	6.1	Tryptophan	1.6
Leucine	10	Valine	7.6

AVERAGE VITAMIN COMPOSITION *in mg per kg (ppm) (dry matter)*

B1 (Thiamine)	50	-	120
B2 (Riboflavic)	80	-	105
B5 (Calcium Pantothenate)	150	-	300
B6 (Pyridoxine)	40	-	80
B8 (biotin)	1	-	3.5
B9 (folic acid)	15	-	30
B12 (Cyanocobalamin) (µg/kg)	1	-	5.5
Choline	1200	-	2150
Inositol	1000	-	1500
PP (Niacin)	800	-	1100

MINERALS *in g per 100 g of product as is*

Sodium		<	0.4
Potassium	4.5	-	6.8
Phosphorus	1.0	-	2.7
Calcium (ppm)	55	-	210
Magnesium (ppm)	300	-	600
Selenium (ppm)	0.04	-	0.09
Zinc (ppm)	50	-	90

HEAVY METALS *in mg per kg (ppm)*

Arsenic	< 0.5
Cadmium	< 0.1
Mercury	< 0.05
Lead	< 0.2

PACKAGING

Powder :
- 25 kg sealed paper bags with polyethylene liner / pallets of 750 or 1000 kg,
- 25 kg carboard boxes with polyethylene liner / pallets of 900 kg,
- 500 kg big bags.

Microgranulated powder :
- 25 kg sealed paper bags with polyethylene liner / pallets of 500 or 600 kg,
- 25 kg carboard boxes with polyethylene liner / pallets of 720 kg,
- 500 or 700 kg big bags.

SHELF LIFE & STORAGE 3 years in their original packaging, stored in a cool and dry place protected from direct sun-light.

The information contained in this data sheet is accurate to the best of our knowledge at the indicated date and remains our property. It is the user's responsibility to ensure that the conditions and possible uses of the product conform in particular to current laws and regulations.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

References

1. United States Pharmacopeial Convention. 1995. The United States pharmacopeia, 23rd ed. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
2. Association of Official Analytical Chemists. 1995. Bacteriological analytical manual, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
3. Association of Official Analytical Chemists. 1995. Official methods of analysis of AOAC International, 16th ed. AOAC International, Arlington, VA.
4. Vanderzant, C., and D. F. Splittstoesser (ed.). 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of food, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Packaging

Peptamin	500 g	0905-17

Bacto Peptone
Bacto Peptone Bacteriological Technical

Intended Use

Bacto Peptone and Bacto Peptone Bacteriological Technical are used in preparing microbiological culture media.

Summary and Explanation

Bacto Peptone, an enzymatic digest of protein, was first introduced commercially in 1914 and became the standard Peptone for the preparation of bacteriological culture media. The importance of Peptone as a nutritive source in culture media was demonstrated by studies of Klinger.[1] The nutritive value of Peptone is largely dependent upon the amino acid content that supplies essential nitrogen.

Many studies have used Bacto Peptone in culture media preparation.[2,3,4] In a study by Morton, Smith and Leberman,[16] Bacto Peptone was reported to be superior to other peptones in a medium recommended for the isolation and cultivation of pleuropneumonia-like organisms. Bacto Peptone has been shown to be a satisfactory enrichment, replacing serum, for cell proliferation.[11] Peptone is routinely recommended for culture media preparation. Several media containing Peptone are specified in standard methods[2,3,4] for multiple applications.

Peptone Bacteriological Technical can be used as the nitrogen source in microbiological culture media when a standardized peptone is not essential. Although it has not been as carefully standardized as other peptones, certain parameters such as solubility, clarity, pH and other

Carbohydrate (%)			
Total	6.9		
Nitrogen Content (%)			
Total Nitrogen	13.5	AN/TN	28.0
Amino Nitrogen	3.1		
Amino Acids (%)			
Alanine	8.67	Lysine	3.42
Arginine	6.76	Methionine	1.19
Aspartic Acid	5.60	Phenylalanine	1.81
Cystine	0.20	Proline	8.80
Glutamic Acid	10.21	Serine	2.87
Glycine	15.59	Threonine	1.81
Histidine	0.58	Tryptophan	0.26
Isoleucine	1.45	Tyrosine	0.64
Leucine	3.01	Valine	2.35
Inorganics (%)			
Calcium	0.008	Phosphate	0.445
Chloride	1.086	Potassium	0.203
Cobalt	<0.001	Sodium	1.759
Copper	<0.001	Sulfate	0.244
Iron	0.004	Sulfur	0.410
Lead	<0.001	Tin	<0.001
Magnesium	0.007	Zinc	0.001
Manganese	<0.001		

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

growth supporting properties are monitored to permit its use as a nitrogen source.

Principles of the Procedure

Bacto Peptone and Peptone Bacteriological Technical are enzymatic digests of protein. Bacto Peptone contains nitrogen in a form that is readily available for bacterial growth. Both products have a high peptone and amino acids content and only a negligible quantity of proteoses and more complex nitrogenous constituents.

Typical Analysis

Bacto Peptone

Physical Characteristics

Ash (%)	4.4	Loss on Drying (%)	3.0
Clarity, 1% Solution (NTU)	0.5	pH, 1% Solution	7.0
Filterability (g/cm²)	0.5		

Vitamins (µg/g)

Biotin	0.2	PABA	<0.5
Choline (as Choline Chloride)	2660.0	Pantothenic Acid	3.9
Cyanocobalamin	<0.1	Pyridoxine	1.7
Folic Acid	0.3	Riboflavin	3.9
Inositol	2400.0	Thiamine	<0.1
Nicotinic Acid	21.9	Thymidine	413.0

Biological Testing (CFU/g)

Coliform	negative	Standard Plate Count	273
Salmonella	negative	Thermophilic Count	13
Spore Count	90		

Precautions

1. For Laboratory Use.
2. Follow proper established laboratory procedures in handling and disposing of infectious materials.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาสาวแคทลียา ตาลวงษ์ เกิดวันที่ 17 พฤศจิกายน 2525 ที่จังหวัดกาฬสินธุ์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน เมื่อปีการศึกษา 2548 และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com