รายงานผลการวิจัย

ทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540

เรื่อง

การผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม

เลี้ยงสัตว์

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา

วศ
วท 15
007276

รายงานผลการวิจัย

ทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540

เรื่อง

การผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

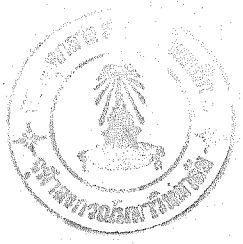
-1 ก.ย. 2543

I18287311

บทคัดย่อ

การผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์

ในการศึกษาการผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์ โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับสัตว์ และเป็นการบำบัดน้ำทิ้งได้ในขณะเดียวกัน จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทิ้งพบว่า น้ำทิ้งมีค่าบีโอดี และค่าซีโอดีเฉลี่ยเท่ากับ 558 และ 941 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีไขมันเป็นองค์ประกอบเฉลี่ยเท่ากับ 3.27 กรัมต่อลิตร มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบเฉลี่ยเท่ากับ 1.44 กรัมต่อลิตร จากการคัดแยกและรวบรวมสายพันธุ์ยีสต์ที่เติบโตได้ในน้ำทิ้งสามารถรวบรวมสายพันธุ์ยีสต์ได้ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *C* 5045 *C* 5046 *S* 0001 *T* 0001 *Y* 8662 *N* 0001 และ *N* 0002 เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้งที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำทิ้งเติมแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลีเซอรอลและกลูโคส พบว่าเชื้อ *Y* 8662 เติบโตได้ดีกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่นๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้งและน้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.58 และ 8.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *S* 0001 เติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้งเติมกลูโคส ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.63 กรัมต่อลิตร จากการเปรียบเทียบองค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ที่รวบรวมได้ พบว่าเชื้อ *Y* 8662 มีปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน รวมทั้งชนิดและปริมาณวิตามินภายในเซลล์ยีสต์ ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับสัตว์มากกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่นๆ นอกจากนั้นยังสามารถลดค่าบีโอดี และค่าซีโอดีในน้ำทิ้งภายหลังนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ 90.7 และ 88.3 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้ง) การเลี้ยงในขวดเขย่าเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Y* 8662 ที่เหมาะสมคือ กล้าเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้ง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.48 กรัมต่อลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.125 ต่อชั่วโมง และกำลังการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์เท่ากับ 0.322 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ *Y* 8662 ในถังหมัก ได้แก่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Y* 8662 แบบ batch ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.58 กรัมต่อลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.140 ต่อชั่วโมง และกำลังการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์เท่ากับ 0.438 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ



บทนำ

ปัจจุบันประชากรโลกได้เผชิญกับปัญหาการขาดแคลนอาหารประเภทโปรตีน นักวิทยาศาสตร์จึงพยายามหาแหล่งอาหารประเภทโปรตีนแหล่งใหม่โดยได้ให้ความสำคัญแก่โปรตีนจากจุลินทรีย์ การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของจุลินทรีย์และการผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์ได้มีการพัฒนามากยิ่งขึ้น ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1955 องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จัดตั้งหน่วยงานหนึ่งเพื่อหาแหล่งโปรตีนใหม่สำหรับมนุษย์ซึ่งต้องมีความปลอดภัยและเหมาะสมสำหรับเป็นอาหารมนุษย์ (Food) หรือเป็นอาหารสัตว์ (Feed) หน่วยงานนี้คือ Protein Advisory Group ต่อมาในปี ค.ศ. 1966 Massachusetts Institute of Technology โดยศาสตราจารย์วิลสัน (C.L. Wilson) ได้บัญญัติคำว่า โปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) หรือ SCP ขึ้นซึ่งหมายถึงโปรตีนจากจุลินทรีย์ ได้แก่ สาหร่าย รา ยีสต์และแบคทีเรีย (Goldberg, 1985) Moo-Young และ Gregory (1986) ได้บัญญัติคำว่า โปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ (microbial biomass protein) หรือ MBP ขึ้น ความต้องการนำมวลชีวภาพของจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์เป็นอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์ ทำให้มีการศึกษาเรื่องการผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์มากยิ่งขึ้น โดยเริ่มมีการใช้กากน้ำตาลสำหรับการผลิตโปรตีนจากยีสต์ในประเทศแถบยุโรปตั้งแต่ต้นศตวรรษที่ 20 และได้มีการผลิตมากขึ้นถึง 15,000 ตันต่อปี ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 1 และ 2 โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศเยอรมันมีการผลิตโปรตีนจากยีสต์เพื่อใช้เป็นอาหารของมนุษย์ประมาณ 16,000 ตันต่อปี หรือ 60 เปอร์เซนต์ของโปรตีนทั้งหมด จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตคือ *Candida utilis* ซึ่งเป็นยีสต์ที่เติบโตได้เร็ว มีปริมาณโปรตีนสูง อุดมด้วยวิตามินบีรวม และเติบโตได้ในวัตถุดิบหลายชนิด (Rose, 1979) ในประเทศอังกฤษใช้ประโยชน์จากยีสต์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการทำเบียร์เป็นอาหารสัตว์ประมาณ 30,000 ตันต่อปี ส่วนประเทศไทยเริ่มมีการทดลองใช้ยีสต์เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ เนื่องจากแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ซึ่งได้จากกากถั่วเหลืองและปลาป่นมีราคาสูงและหายากยิ่งขึ้น ดังนั้นการผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์จึงเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่งที่อาจนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ เพราะมีปริมาณโปรตีนสูงสามารถเลี้ยงได้ในระยะเวลาสั้นจากวัตถุดิบราคาถูก และประหยัดเนื้อที่ในการผลิต (วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2529)

มวลชีวภาพของจุลินทรีย์

ปัญหาการเพิ่มประชากรอย่างรวดเร็ว เป็นสาเหตุทำให้เกิดการขาดแคลนอาหารโปรตีน ขาดแคลนวัตถุดิบที่ใช้ผลิตโปรตีนและปัญหามลภาวะซึ่งเกิดจากน้ำทิ้ง ดังนั้นการนำสารอาหารที่คงเหลืออยู่ในน้ำทิ้งมาใช้ในการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์จึงเป็นหนทางหนึ่งที่ใช้แก้ปัญหาดังกล่าวได้

Moss และ Smith (1977) เสนอว่าโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์เป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญ เนื่องจาก

1) ราคาถูก เพราะใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก สามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด รวมทั้งวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมและการเกษตร

2) การเลี้ยงจุลินทรีย์ใช้ระยะเวลาสั้น เนื่องจากจุลินทรีย์มีอัตราการเติบโตเร็ว พบว่าแบคทีเรียมีอัตราการเติบโตสูงสุดคือประมาณ 0.3-2.0 ชั่วโมง ยีสต์รองลงมาคือประมาณ 1-3 ชั่วโมง ส่วนราและสาหร่ายใช้เวลาในการเพิ่มมวลชีวภาพเป็น 2 เท่า ประมาณ 4-12 ชั่วโมง และ 2-6 ชั่วโมง ตามลำดับ

3) ประหยัดเนื้อที่ในการผลิตถ้าเปรียบเทียบกับพืชหรือสัตว์พบว่าการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ใช้พื้นที่น้อยกว่ามากในการผลิตเพื่อให้ได้โปรตีนปริมาณเท่ากัน

4) มวลชีวภาพของจุลินทรีย์มีโปรตีนสูงประมาณ 7-12 กรัมโปรตีนไนโตรเจนต่อ 100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีกรดอะมิโนจำเป็นคล้ายกับสัตว์ โปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็น เช่น ไลซีน เมไธโอนีน และทริปโตเฟนซึ่งโปรตีนจากพืชมักไม่มี ประการสำคัญคือการสังเคราะห์โปรตีนโดยจุลินทรีย์เร็วกว่าในพืชและสัตว์

การใช้โปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ เพื่อประโยชน์สองประการคือการกำจัดของเสียเพื่อแก้ปัญหามลภาวะและผลตอบแทนจากการใช้ประโยชน์ของวัสดุเหล่านี้ เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ส่วนใหญ่มีส่วนประกอบของสารอินทรีย์สูง เป็นที่ยอมรับของนักเทคโนโลยีชีวภาพว่าการแปรรูปสารอินทรีย์และอื่นๆ ในวัสดุเหลือใช้เป็นสารที่มีประโยชน์และมีราคาโดยใช้จุลินทรีย์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแปรรูปเป็นเซลล์จุลินทรีย์ที่มีปริมาณโปรตีนและคุณค่าทางอาหารอื่นๆ สูง เหมาะสำหรับเป็นอาหารสัตว์หรือ อาหารเสริมในสัตว์ (Goldberg, 1985) ปัจจุบันมีบริษัทผู้ผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในเชิงพาณิชย์และอาหารเสริมในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 บริษัทผู้ผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ (Reed และ Nagodawithana, 1995)

ระดับการผลิต	บริษัท	ประเทศผู้ผลิต	วัตถุดิบ	ชนิดของจุลินทรีย์	ขนาดผลิต (ตันต่อปี)
วิจัยและสาธิต	British Petroleum	อังกฤษ	อัลเคน	ยีสต์	4,000
	Chinese Petroleum	ไต้หวัน	อัลเคน	ยีสต์	1,000
	Dianippon	ญี่ปุ่น	อัลเคน	ยีสต์	-
	Imperial Chemical Industries	อังกฤษ	เมธานอล	แบคทีเรีย	1,000
	Kanegafuchi	ญี่ปุ่น	อัลเคน	ยีสต์	5,000
	Kohjin	ญี่ปุ่น	อัลเคน	ยีสต์	1,500
	Kyowa Hakko	ญี่ปุ่น	-	ยีสต์	2,400
	Milbrew	อังกฤษ	หางนม	ยีสต์	5,000
	Shell	เนเธอร์แลนด์	เมธานอล	แบคทีเรีย	1,000
	Svenska-Socker	สวีเดน	แป้งมันฝรั่ง	ยีสต์	2,000
กึ่งการค้า	British Petroleum	อังกฤษ	น้ำมันก๊าซ	ยีสต์	20,000
	Imperial Chemical Industries	อังกฤษ	เมธานอล	แบคทีเรีย	50,000
	United Paper Mills	ฟินแลนด์	น้ำทิ้งโรงงานทำกระดาษ	ยีสต์	10,000
	USSR State	รัสเซีย	-	ยีสต์	20,000
การค้า	British Petroleum	อังกฤษ	อัลเคน	ยีสต์	100,000
	Liquichimica Biosintesi	อิตาลี	อัลเคน	ยีสต์	100,000

Bhatacharjee (1970) รายงานว่าโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์มีทั้งสาหร่าย รา แบคทีเรีย และยีสต์ โดยรวบรวมคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตเป็นโปรตีน (ตารางที่ 2-3) ดังนี้

1) เติบโตได้เร็วในอาหารที่มีราคาถูก เป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น

2) เติบโตได้ดีในอาหารที่มีส่วนประกอบง่ายๆ มีความต้องการวิตามินและสารสำหรับการเติบโต (growth factor) ต่างๆ น้อย หรือไม่ต้องการเลย

3) คงลักษณะทางพันธุกรรมได้ดี ไม่กลายพันธุ์ง่ายเมื่อเลี้ยงติดต่อกันเป็นเวลานาน

4) การแยกและเก็บเกี่ยวเซลล์ทำได้ง่าย

5) มีความต้านทานต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

6) ทราบคุณสมบัติทางพันธุกรรม สรีรวิทยาและสามารถปรับปรุงทางด้านพันธุกรรมได้

7) ใช้แหล่งพลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

8) หลังจากผ่านกระบวนการเลี้ยงแล้ว มีวัสดุเหลือทิ้งน้อยหรือไม่มีเลย

9) ไม่เป็นพิษ และทำให้เกิดอาการภูมิแพ้

10) ให้ปริมาณโปรตีนสูง โดยเฉพาะโปรตีนต้องมีกรดอะมิโนที่มีคุณค่า

11) เก็บรักษาได้ง่าย เช่น การทำให้แห้งได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 องค์ประกอบภายในเซลล์ของมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตโปรตีน (Litchfield, 1979)

จุลินทรีย์	วัตถุดิบ	องค์ประกอบภายในเซลล์ (g/100g dry wt)			
		ไนโตรเจน	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
สาหร่าย					
Chlorella regularis	คาร์บอนไดออกไซด์	9.3	58	16	6.7
Chlorella sorokiniana	คาร์บอนไดออกไซด์	9.6	60	8	9
Spirulina maxima	คาร์บอนไดออกไซด์	10.0	62	3	-
แบคทีเรีย					
Acinetobacter cerificans	อัลเคน	11	72	-	-
Cellulomonas sp.	ชานอ้อย	14	87	8	7
Methylomonas clara	เมธานอล	12-13	80-85	8-10	8-12
Methylophilus methylotrophus	เมธานอล	13	83	7	8.6
Thermomonospora fusca	เซลลูโลส	4.8-5.6	30-35	-	-
ยีสต์					
Candida lipolytica	อัลเคน	10	65	8.1	6
	น้ำมันก๊าซ	11	69	1.5	8
Candida utilis	เอธานอล	8.3	52	7	8
	น้ำทิ้งโรงงานทำกระดาษ	9	55	9	8
Hansenula polymorpha	เมธานอล	-	50	-	-
Kluyveromyces fragilis	หางนม	9	54	1	9
Saccharomyces cerevisiae	กากน้ำตาล	8.4	53	6.3	7.3
รา					
Agaricus campestris	กลูโคส	-	36	3	4.5
Aspergillus niger	กากน้ำตาล	7.5	50	-	-
Fusarium graminearum	แป้ง	8.7	54	-	-

ตารางที่ 3 กรดอะมิโนภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตโปรตีน เปรียบเทียบกับมาตรฐานของ FAO และแหล่งโปรตีนอื่นๆ (Litchfield, 1979 ; Boze และคณะ, 1992)

แหล่งโปรตีน	วัตถุดิบ	กรดอะมิโน (กรัมต่อ 16 กรัมไนโตรเจน)								
		Cys	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Try	Val
FAO reference	-	2.0	4.2	4.8	4.2	2.2	2.8	2.8	1.0	4.2
ถั่วเหลือง	-	0.7	2.2	3.5	2.8	0.6	2.2	1.9	0.6	2.3
ปลา	-	0.7	3.2	5.0	4.9	1.9	2.9	3.0	0.9	3.7
ไข่	-	2.4	6.7	8.9	6.5	5.1	5.8	5.1	1.6	7.3
สาหร่าย										
Chlorella sorokiniana	คาร์บอนไดออกไซด์	-	3.4	4.0	7.8	1.8	2.7	3.2	1.4	5.1
Spirulina maxima	คาร์บอนไดออกไซด์	0.4	5.8	7.8	4.8	1.5	4.6	4.6	1.3	6.3
แบคทีเรีย										
Cellulomonas alcaligenes	ชานอ้อย	-	5.4	7.4	7.6	2.0	4.7	5.5	-	7.1
Methylophilus methylotrophus	เมธานอล	0.6	4.3	6.8	5.9	2.4	3.4	4.6	0.9	5.2
ยีสต์										
Candida lipolytica	อัลเคน	1.1	4.5	7.0	7.0	1.8	4.4	4.9	1.4	5.4
Candida utilis	เอธานอล	0.4	4.5	7.1	6.6	1.4	4.1	5.5	1.2	5.7
Kluyveromyces fragilis	หางนม	-	4.0	6.1	6.9	1.9	2.8	5.8	1.4	5.4
Saccharomyces cerevisiae	กากน้ำตาล	1.6	5.5	7.9	8.2	2.5	4.5	4.8	1.2	5.5
รา										
Aspergillus niger	กากน้ำตาล	1.1	4.2	5.7	5.9	2.6	3.8	5.0	2.1	5.2
Morchella crassipes	กลูโคส	0.4	2.9	5.6	3.5	1.0	1.9	3.0	1.5	3.0
Paecilomyces variotii	น้ำทิ้งโรงงานทำกระดาษ	1.1	4.3	6.9	6.4	1.5	3.7	4.6	1.2	5.1

ประเภทของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีน

Bhattacharjee (1970) รายงานว่ายีสต์มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดในบรรดาจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีน และใช้กันแพร่หลายมาตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 เนื่องจากขาดแคลนอาหารโปรตีน ยีสต์ที่นิยมใช้คือ *Candida utilis* *Rhodotorola gracilis* *Saccharomyces cerevisiae* *S. carlsbergensis* *C. tropicalis* และ *Trichosporon pullulans* โดยทั่วไปเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยโปรตีน 45-50 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง คาร์โบไฮเดรต 22-23 เปอร์เซนต์ ส่วนไขมันในเซลล์ยีสต์โดยทั่วไปมีประมาณ 2-3 เปอร์เซนต์ มีเกลือแร่ประมาณ 6-8 เปอร์เซนต์ ส่วนมากเป็นโปแตสเซียมและฟอสฟอรัส พบแคลเซียม แมกนีเซียม ซิลิคอน เหล็กและตะกั่วบ้างเล็กน้อย (Boze และคณะ, 1992) คุณค่าทางอาหารของยีสต์ยังขึ้นกับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนหลายชนิด และพบว่ากรดอะมิโนในยีสต์แต่ละชนิดแตกต่างกัน นอกจากนั้นเซลล์ยีสต์ยังประกอบด้วยวิตามินบีชนิดต่างๆ เช่น ไธอะมีน ไรโบเฟลวิน กรดนิโคตินิก กรดแพนโตเธนิก ไพริดอกซิน และไบโอติน (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

วัตถุดิบในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ ควรเป็นแหล่งอาหารและพลังงานที่เหมาะสมต่อการเติบโตของยีสต์ โดยพบว่าวัตถุดิบที่ได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมมีปริมาณมากก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานที่สำคัญ เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ส่วนใหญ่มีส่วนประกอบของสารอินทรีย์สูง เป็นที่ยอมรับของนักเทคโนโลยีชีวภาพว่า การแปรรูปสารอินทรีย์และอื่นๆ ในวัสดุเหลือใช้เป็นสารที่มีประโยชน์และมีราคาโดยใช้จุลินทรีย์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแปรรูปเป็นเซลล์จุลินทรีย์ที่มีโปรตีนและคุณค่าทางอาหารอื่นๆ สูงซึ่งเหมาะสำหรับเป็นอาหารสัตว์ หรืออาหารเสริมให้สัตว์ (Goldberg, 1985)

ปัจจุบันได้มีความพยายามศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้ง ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมจำนวนมากมาใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ เนื่องจากในน้ำทิ้งมีสารอินทรีย์และองค์ประกอบที่สามารถนำไปใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ น้ำทิ้งเหล่านี้มีปริมาณมากและเป็นแหล่งวัตถุดิบขนาดใหญ่ หากปล่อยทิ้งในสิ่งแวดล้อมจะก่อให้เกิดปัญหามลภาวะได้ เนื่องจากมีค่าบีโอดีและซีโอดีสูง ดังนั้นควรนำสารอาหารที่เหลือจากน้ำทิ้งมาก่อให้เกิดประโยชน์โดยนำมาใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์

ความสำคัญและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ขยายตัวอย่างรวดเร็วมากทำให้ความต้องการแหล่งอาหารสำหรับใช้ในการเลี้ยงสัตว์มีมากยิ่งขึ้น จึงหาได้ยากและมีราคาแพงยิ่งขึ้น ขณะเดียวกันก็มีปัญหาสิ่งแวดล้อมอันเกิดจากน้ำทิ้ง จากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบที่ต้องกำจัด การนำสารอาหารที่คงเหลืออยู่ในน้ำทิ้งมาใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์สามารถนำมาเป็นแหล่งอาหารเสริมในอาหารสัตว์ เนื่องจากเซลล์ยีสต์มีปริมาณโปรตีนสูง มีกรดอะมิโนจำเป็นหลายชนิด เช่น ไลซีน เมไธโอนีน และทริปโตเฟน นอกจากนั้นยังมีวิตามินบีที่จำเป็นหลายชนิดซึ่งโดยปกติจำเป็นต้องเติมลงไปในอาหารสัตว์ และการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์จากน้ำทิ้งยังสามารถลดมลภาวะที่เกิดจากน้ำทิ้งได้อีกด้วย โดยการเลือกใช้สายพันธุ์ยีสต์และภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม การวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมในอาหารสัตว์ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนค่าอาหารสัตว์ และเป็นการบำบัดน้ำทิ้งได้ในขณะเดียวกัน

ขั้นตอนการวิจัย

1) เก็บตัวอย่างและหาองค์ประกอบของน้ำทิ้ง ได้แก่ ค่าบีโอดี ซีโอดี โปรตีน ไขมันและน้ำตาลทั้งหมด

2) คัดแยกและการรวบรวมสายพันธุ์ยีสต์ที่เติบโตได้ในน้ำทิ้ง

3) ศึกษาลักษณะการเติบโตและองค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ ได้แก่ โปรตีนภายในเซลล์ กรดนิวคลีอิก วิตามินและกรดอะมิโน เพื่อให้ได้สายพันธุ์ยีสต์ที่มีสมบัติเหมาะสมสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์

4) ศึกษาภาวะการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในขวดเขย่า และในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อการผลิตมวลชีวภาพโดยใช้อาหารที่มีน้ำทิ้งเป็นองค์ประกอบ

5) วิเคราะห์การเติบโตของยีสต์ หาปริมาณชีวมวลและประสิทธิภาพในการผลิตชีวมวล

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

อุปกรณ์

ชื่ออุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychrotherm incubator shaker) รุ่น G-27 แบบหมุน (rotary)	New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P	Kubota ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21	Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P	Sartorius ประเทศเยอรมัน
เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S	Sartorius ประเทศเยอรมัน
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) รุ่น UV-160	Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 240	Corning ประเทศสหรัฐอเมริกา
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124	ISSCO ประเทศสหรัฐอเมริกา
ตู้อบแห้ง (hot air oven) รุ่น UL 60	Memmert ประเทศเยอรมัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่ออุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36	Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W 760	Memmert ประเทศเยอรมัน
เครื่องให้ความร้อน (stirring hot plate) รุ่น DS 201HS	DMS ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องทำให้แห้งระบบสุญญากาศ (lyophillizer) รุ่น Eyela FD-1	Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น
ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubater)	Memmert ประเทศเยอรมัน
เครื่องเพอริสตอลติกปั๊ม รุ่น LKB Microperpex	Bromma ประเทศสวีเดน
เครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ (evaporator) รุ่น RE 52	Yamato ประเทศญี่ปุ่น
ถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300 พร้อมชุดควบคุม	Marubishi ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องอัดอากาศ (air compressor)	Hitachi ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (circulation type handy cooler) รุ่น TRL-108	Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) รุ่น LC-8A ชุดควบคุมระบบ SLC-8A คอลัมน์ชนิด Shim-pack ISC-07/S 1504Na และ เครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac	Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
กรดบอริก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กรดซัลฟามิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดซัลฟิวริกเข้มข้น	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กรดนิโคตินิก	BDH	ประเทศอังกฤษ
กรดปาล์มิติก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดแพนโตเธนิก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กรดโฟลิก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กรดลิโนเลอิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดสเตียริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดโอเลอิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กลีเซอรอล	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
คลอโรฟอร์ม	BAKER	ประเทศสหรัฐอเมริกา
โซเดียมคลอไรด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไธโอซัลเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ทริปโตเฟน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไธอะมีน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไบโอติน	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โปแตสเซียมคลอไรด์	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
พอลีเปปโตน	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไพริดอกซิน	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ฟีนอล	BAKER	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
เมไธโอนีน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เมธานอล	BDH	ประเทศอังกฤษ
แมงกานีสซัลเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
เมอร์คูริกซัลเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ไรโบเฟลวิน	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ไลซีน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
สารสกัดจากยีสต์	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เอธานอล	BDH	ประเทศอังกฤษ
แอมโมเนียมซัลเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
เฮกเซน	AJAX	ประเทศออสเตรเลีย

การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์จากน้ำทิ้ง

การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง

เตรียมอุปกรณ์การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง ได้แก่ ขวดแก้ว มีฝาเกลียวปิดมิดชิด ก่อนใช้ควรล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อก่อนการบำบัดแบบช้วง (grab sampling) เป็นบริเวณ 3 จุด ปิดปากขวดแก้ว นำเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวิเคราะห์ทางกายภาพและทางเคมี ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณไขมัน ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ค่าบีโอดีและค่าซีโอดี สามารถเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ทางกายภาพและทางเคมีไม่ควรเกิน 72 ชั่วโมง (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2535)

การคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์จากน้ำทิ้ง

1. นำปิเปตดูดตัวอย่างน้ำทิ้งปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเชื้ออาหารแข็งสำหรับคัดแยกยีสต์จากน้ำทิ้ง 3 สูตร (ภาคผนวก ก) เกลี่ยน้ำทิ้งให้ทั่ว (spread) บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทั้ง 3 สูตร ด้วยแท่งแก้วงอ (glass spreader)

2. นำเข็มเขี่ยเชื้อ (loop) แตะตัวอย่างน้ำทิ้ง แล้วลาก (streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเช่นเดียวกับข้อ 1

บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดแยกยีสต์ที่เติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทั้ง 3 สูตร จากนั้นทำให้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรวบรวมไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่รวบรวมไว้ โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งลาดเอียง (agar slant) สูตรอาหาร YM (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารแข็งสูตรเดิม (subculture) ทุกๆ 1 เดือน

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่รวบรวมได้บนอาหารแข็งลาดเอียง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำทิ้งและน้ำทิ้งที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนบางชนิด (ภาคผนวก ก) เปรียบเทียบกับการเติบโตของยีสต์ในน้ำทิ้งที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน การเตรียมเซลล์แขวนลอยทำโดยเติมน้ำที่ปราศจากไอออนและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรต่อหลอดอาหารแข็งลาดเอียง ปิเปตเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสูตร YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเติบโตดีแล้ว นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ถ่ายเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ กระจายเชื้อ (resuspend) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.30-0.35 ถ่ายเซลล์แขวนลอยปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำทิ้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร

การศึกษาการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์

1. เปรียบเทียบฉมบัติและองค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ที่รวบรวมได้ เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีฉมบัติเหมาะฉมในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์จากน้ำทิ้ง

เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่รวบรวมได้บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) โปรตีน (กรัมต่อลิตร)

ไขมัน (กรัมต่อลิตร) และน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในน้ำทิ้ง (กรัมต่อลิตร) นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต นำเซลล์ยีสต์แต่ละสายพันธุ์อีกส่วนมาทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ ได้แก่ ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ ปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งหมด ชนิดและปริมาณวิตามิน ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน ตามลำดับ ส่วนน้ำหมักที่เหลือจากการเลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้ง นำมาปั่นแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์หาค่าบีโอดีและค่าซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร) ตามวิธีของสมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2535) เปรียบเทียบค่าบีโอดีและค่าซีโอดีก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ นำข้อมูลทั้งหมดมาคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีสมบัติเหมาะสมในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ ในขั้นตอนต่อไป

2. การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในขวดเขย่า

2.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงเป็นกล้าเชื้อ

เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้บนอาหารแข็งลาดเอียง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก) การเตรียมเซลล์แขวนลอยทำโดยเติมน้ำที่ปราศจากไอออนและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรต่อหลอดอาหารแข็งลาดเอียง ปิเปตเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร วิธีนี้ทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.05 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต แล้วคัดเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเป็นกล้าเชื้อ

2.2 การคัดเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์

ถ่ายกล้าเชื้อที่คัดเลือกอายุในช่วงต่างๆ ลงในน้ำทิ้งซึ่งใช้เป็นอาหารสำหรับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นประมาณ 0.7 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) นำผลที่

ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต คัดเลือกอาขุกล้าเชื้อที่สามารถเติบโตในน้ำทิ้ง โดยใช้ระยะเวลาในช่วงระยะการพักตัวสั้นที่สุด และมีประสิทธิภาพในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์สูงสุด

3. การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในถังหมัก

3.1 เปรียบเทียบการเติบโตและการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ ในขวดเขย่าและในถังหมัก โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ดังที่กล่าวมาแล้ว

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมได้ลงในถังหมักซึ่งมีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 2.7 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีน้ำทิ้งเป็นองค์ประกอบ ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 ตลอดการเลี้ยงเชื้อ เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในขวดเขย่า

3.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมได้ลงในถังหมักซึ่งมีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 2.7 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีน้ำทิ้งเป็นองค์ประกอบ ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แปรผันภาวะในการหมักที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4-6 อัตราการกวนในช่วง 300-600 รอบต่อนาที พร้อมกับอัตราการให้อากาศในช่วง 0.5-1.5 vvm เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และโปรตีนภายในเซลล์ (กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต เลือกภาวะในการหมักที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์สูงสุด

วิธีวิเคราะห์

1. ค่าความเป็นกรดด่าง

ใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)

2. การวัดการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โดยหาค่าความเข้มข้นเซลล์ ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

นำน้ำหมักที่เก็บได้ในแต่ละช่วงเวลา ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่น ละลายเซลล์และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค)

3. การหาปริมาณไขมันในน้ำทิ้งและในน้ำหมัก

โดยใช้วิธีของ Rydin และคณะ (1990) นำตัวอย่างน้ำทิ้งหรือน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเฮกเซนและเอธานอล อย่างละ 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 20 นาที นำส่วนสารประกอบอินทรีย์มาสกัดซ้ำ 2 ครั้งด้วยเฮกเซนปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำส่วนที่ได้จากการสกัดไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศจนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักและคำนวณ เป็นกรัมต่อลิตร

4. การหาปริมาณโปรตีนในน้ำทิ้งและในน้ำหมัก

โดยใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) นำตัวอย่างน้ำทิ้งหรือน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Lowry C (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีน (bovine serum albumin, BSA) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค)

5. การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำทิ้งและในน้ำหมัก

ด้วยวิธี Phenol-sulphuric method นำตัวอย่างน้ำทิ้งหรือน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล เข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เขย่าแรงๆ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคส และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค)

6. การวิเคราะห์ค่าบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD) เป็นการวัดปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้หมดไปใน 15 วัน ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ตามวิธีของสมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2535)

การเตรียมตัวอย่างน้ำก่อนการวิเคราะห์ (Pretreatment)

ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำไม่เป็นกลางต้องให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5-7.5 โดยใช้กรดซัลฟิวริก 0.5 โมลต่อลิตร หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลต่อลิตร กำจัดสารคลอรีนตกค้าง โดยตั้งทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง คลอรีนจะสลายตัวไปเอง น้ำที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างแล้วถ้ายังมีคลอรีนเหลืออยู่ต้องกำจัดออกโดยการเติมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ซึ่งต้องหาปริมาตรโซเดียมซัลไฟต์ที่ใช้ โดยนำตัวอย่างน้ำปริมาตรระหว่าง 100-1,000 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก 50 เปอร์เซนต์ หรือกรดซัลฟิวริก 2 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 10 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ 0.0125 โมลต่อลิตร (ภาคผนวก ข) โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ หลังจากเติมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ตามปริมาตรที่คำนวณได้ลงในตัวอย่างแล้วกวนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10-20 นาที

การวิเคราะห์ค่าบีโอดี

รินตัวอย่างน้ำที่ปรับปรุงแล้วลงใส่ขวดบีโอดีจนเต็ม 3 ขวด ปิดจุกให้แน่นโดยมีน้ำหล่อที่ปากขวด นำขวดหนึ่งมาหาค่าออกซิเจนละลาย (D_1) ก่อน อีกสองขวดนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หลังจาก 5 วันแล้ว นำตัวอย่างมาหาค่าออกซิเจนละลาย (D_2) ที่เหลือ

โดย ค่าบีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร) = $D_1 - D_2$

เมื่อ D_1 = ค่าออกซิเจนละลายที่หาได้ในวันแรก

D_2 = ค่าออกซิเจนละลายที่หาได้ในวันที่ 5

การหาค่าออกซิเจนละลาย

การหาค่าออกซิเจนละลายจากตัวอย่างน้ำ ซึ่งเก็บไว้ในขวดบีโอดีขนาด 250-300 มิลลิลิตร โดยเติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร และสารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร ลงในขวดบีโอดีที่ใส่ตัวอย่างน้ำโดยให้ปลายปิเปตอยู่ใต้ผิวของตัวอย่างน้ำปิดจุกขวดระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ผสมให้เข้ากันโดยคว่ำขวดขึ้นลงอย่างน้อย 15 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนจนได้ปริมาตรน้ำใส เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร โดยให้กรดค่อยๆไหลลงไปข้างๆ คอขวด ปิดจุก ผสมให้เข้ากัน โดยคว่ำขวดขึ้นลงจนกระทั่งตะกอนละลายหมด ตวงสารละลายจากขวดบีโอดี 201 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต (ภาคผนวก ข) 0.0021 โมลต่อลิตร จนกระทั่งสารละลายมีสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้ง 2-3 หยด จะได้สีน้ำเงินเข้ม ไทเทรตต่อไปจนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป อ่านปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้โดยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.0021 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีค่าสมมูลย์พอดีกับค่าออกซิเจนละลาย 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

7. การวิเคราะห์ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD) โดยหาปริมาณออกซิเจนที่ต้องการใช้ในการออกซิไดส์สารอินทรีย์ ด้วยสารเคมีที่มีอำนาจในการออกซิไดส์สูง ในสารละลายที่เป็นกรด วิเคราะห์ตามวิธีของสมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2535)

ใส่เมอร์คูริกซัลเฟต 0.4 กรัมลงในขวดกลั่น เติมตัวอย่างน้ำหรือตัวอย่างน้ำที่เจือจางแล้วปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต (ภาคผนวก ข) เข้มข้น 0.25 นอร์มัล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่มีซิลเวอร์ซัลเฟตผสมอยู่ลงไปปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่ลูกแก้ว 5-10 เม็ด เขย่าให้สารละลายในขวดกลั่นทั้งหมดเข้ากัน ต่อเข้ากับเครื่องควบแน่น กลั่นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นแล้วฉีดล้างส่วนที่ค้างอยู่ในเครื่องควบแน่นด้วยน้ำกลั่น เจือจางสารละลายทั้งหมดเป็น 150 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ไทเทรตสารละลายทั้งหมดด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (ภาคผนวก ข) เพื่อหาปริมาตรของสารละลายโปแตสเซียมไดโครเมตที่เหลือ ใช้เฟอโรอินอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข) 2-3 หยด ไทเทรตจนสีเปลี่ยนจากสีน้ำเงินแกมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง แสดงว่าถึงจุดสมดุลย์ ทำชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างน้ำ

โดยค่าซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร) = [(A-B)xCx8,000] / ปริมาตรของตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)

เมื่อ A = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต
ที่ใช้กับชุดควบคุม (มิลลิลิตร)
B = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต
ที่ใช้กับตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)
C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มัล)

8. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ (cellular protein)

8.1 เจลดาห์ลโปรตีน (Kjeldahl protein) (A.O.A.C., 1975)

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ 0.5 กรัม ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยโปแตสเซียมซัลเฟต 25 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัม ลงไปจำนวน 7 กรัม เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมจนสารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 37 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กลั่นจับก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 100 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข) 3 หยด กลั่นจนสารละลายกรดบอริกเหลือปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดเกลือที่ทราบความเข้มข้นแล้ว โดยที่

เปอร์เซนต์ไนโตรเจน = (ปริมาตรกรดเกลือxความเข้มข้นกรดเกลือx1.4) / น้ำหนักเซลล์แห้ง

เปอร์เซนต์โปรตีน = เปอร์เซนต์ไนโตรเจน x 6.25

8.2 Lowry protein (Lowry และคณะ, 1951 ; Mulchandani และคณะ, 1989)

นำน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นแยกส่วนน้ำใสออก เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตั้งไว้ให้เย็น นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำสารละลายโปรตีนที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Lowry C (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีน (bovine serum albumin, BSA) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค)

9. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งหมดภายในเซลล์ยีสต์ โดยหาได้จากผลรวมของปริมาณกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid, RNA) และกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid, DNA) ภายในเซลล์ยีสต์

9.1 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไรโบนิวคลีอิก วิเคราะห์โดยวิธี Orcinol (Kihlberg, 1972)

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ปริมาณ 0.3 กรัม เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรดเปอร์คลอริกแช่เย็นเข้มข้น 14 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอน 2 ครั้งด้วยกรดเปอร์คลอริกแช่เย็นเข้มข้น 7 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วย โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 นอร์มัล และเติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 14 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แช่เย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายออซินอล (Orcinol reagent) 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของ RNA จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของ RNA มาตรฐานจากยีสต์ (ภาคผนวก ค)

9.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก วิเคราะห์โดยวิธี Diphenylamine (Burton, 1956)

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ปริมาณ 0.3 กรัม เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรดเปอร์คลอริกแช่เย็นเข้มข้น 14 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอน 2 ครั้งด้วยกรดเปอร์คลอริกแช่เย็นเข้มข้น 7 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมโปแตสเซียม

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วย โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 นอร์มัล และเติมกรดกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 14 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แช่เย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนตะกอนมาเติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้มา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายไดฟีนิลลามีน (Diphenylamine reagent) 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของ DNA จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของ DNA มาตรฐานจาก Calf thymus DNA (ภาคผนวก ค)

10. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณวิตามินภายในเซลล์ยีสต์ โดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ปริมาณ 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทำปฏิกิริยา เติมสารละลาย 6 นอร์มัล ไฮโดรคลอริกปริมาตร 3 มิลลิลิตร ย่อยตัวอย่างเซลล์ยีสต์ในหลอดทำปฏิกิริยาภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง นำมาแยกเศษเซลล์ออกด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C เจือจางด้วยสารละลายตัวพาและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Millipore ขนาด สารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยมีภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์ : Shim-pack ISC-07/S 1504 Na (เบอร์ 2)
สารละลายตัวพา : สารละลาย 0.6 นอร์มัลโซเดียมซิเตรท และ 0.2 โมลาร์กรดบอริก มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 10
สารละลายมาตรฐานภายใน : สารละลายมาตรฐานวิตามินแต่ละชนิด 50 ppm ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
อุณหภูมิของคอลัมน์ : 40 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด : flame ionization detector
ปริมาตรฉีด : 20 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณวิตามินภายในเซลล์ยีสต์ โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารละลายตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารละลายมาตรฐาน คำนวณปริมาณวิตามินภายในเซลล์ยีสต์ (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac ในการคำนวณปริมาณวิตามินภายในเซลล์ยีสต์ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน

11. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนภายในเซลล์ยีสต์ โดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ ลิควิดโครมาโตกราฟี

11.1 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนภายในเซลล์ยีสต์

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ปริมาณ 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทำปฏิกิริยา เติมสารละลาย 6 นอร์มัล ไฮโดรคลอริกปริมาตร 3 มิลลิลิตร ย่อยตัวอย่างเซลล์ยีสต์ในหลอดทำปฏิกิริยาภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง นำมาแยกเศษเซลล์ออกด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C เจือจางด้วยสารละลายตัวพาและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Millipore ฉีด สารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยมีภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์ : Shim-pack ISC-07/S 1504 Na (เบอร์ 2)

สารละลายตัวพา : สารละลาย 0.2 นอร์มัลโซเดียมซิเตรทในเอธานอล 7 เปอร์เซนต์ ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3.2

สารละลายมาตรฐานภายใน : สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 50 ppm ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

อุณหภูมิของคอลัมน์ : 55 องศาเซลเซียส

อัตราการไหล : 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด : flame ionization detector

ปริมาตรฉีด : 20 ไมโครลิตร

11.2 การวิเคราะห์ปริมาณทริปโตเฟนภายในเซลล์ยีสต์

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ปริมาณ 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทำปฏิกิริยา เติมสารละลาย 4.2 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ย่อยตัวอย่างเซลล์ยีสต์ในหลอดทำปฏิกิริยาภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกภายใต้เครื่องทำความเย็น ให้มีสภาพเป็นกลาง ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายตัวพา กรองผ่านกระดาษกรอง Millipore ฉีด สารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยมีภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์ : Shim-pack ISC-07/S 1504 Na (เบอร์ 2)

สารละลายตัวพา : สารละลาย 0.6 นอร์มัลโซเดียมซิเตรท
และสารละลายกรดบอริก 25 มิลลิโมลาร์
ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9

สารละลายมาตรฐานภายใน : สารละลายมาตรฐานกรดทริปโตเฟน 28.4 ppm
มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7
ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

อุณหภูมิของคอลัมน์ : 55 องศาเซลเซียส

อัตราการไหล : 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด : flame ionization detector

ปริมาตรฉีด : 20 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนภายในเซลล์ยีสต์ โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารละลายตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารละลายมาตรฐาน คำนวณปริมาณกรดอะมิโนภายในเซลล์ยีสต์ (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac ในการคำนวณปริมาณกรดอะมิโนภายในเซลล์ยีสต์ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน

ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง การวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทิ้ง

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์แห่งหนึ่ง โดยเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อก่อนการบำบัดแบบข้วง เป็นบริเวณ 3 จุด น้ำทิ้งนี้เป็นน้ำทิ้งจากทุกขั้นตอนในกระบวนการผลิต การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งดำเนินการในช่วงมีนาคม 2539 ถึงกุมภาพันธ์ 2540 จำนวน 10 ครั้ง แต่ละครั้งเก็บบริเวณเดียวกันทั้ง 3 จุด นำตัวอย่างน้ำทิ้งมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและทางเคมี ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง บีโอดี ซี โอดี โปรตีน ไขมัน และ น้ำตาลทั้งหมด ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า อุณหภูมิของน้ำทิ้งอยู่ในช่วง 28-31 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่างค่อนข้างเป็นกรดเล็กน้อย โดยอยู่ในช่วง 5.5-6.7 ซึ่งระหว่างการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง 10 ครั้ง อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างของน้ำทิ้งค่อนข้างคงที่ สำหรับการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งทั้ง 10 ครั้ง ค่าบีโอดีและค่าซีโอดีของน้ำทิ้งอยู่ในช่วง 463-645 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 823-1,108 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีค่าบีโอดีเฉลี่ย และค่าซี โอดีเฉลี่ย เท่ากับ 558 และ 941 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้ง ตามประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 กำหนดให้มีค่าบีโอดีไม่เกิน 20-60 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าซีโอดีไม่เกิน 120-400 มิลลิกรัมต่อลิตร (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2539) ค่าบีโอดีและค่าซีโอดีในตัวอย่างน้ำทิ้งขึ้นอยู่กับปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำทิ้ง ถ้ามีสารอินทรีย์อยู่มาก ค่าบีโอดีและค่าซี โอดีจะมาก ถ้ามีสารอินทรีย์ปนอยู่น้อย ค่าบีโอดีและค่าซีโอดีจะน้อย (Chiang, 1986) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำทิ้ง ได้แก่ ปริมาณไขมัน โปรตีน และน้ำตาลทั้งหมด ได้ปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 3.27, 1.44 และ 1.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่า น้ำทิ้งมีไขมันเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดในน้ำทิ้ง

ตารางที่ 1 สมบัติทางเคมีและกายภาพของตัวอย่างน้ำทิ้ง จากบ่อรวมน้ำทิ้งก่อนบำบัด ช่วงมีนาคม 2539 ถึง กุมภาพันธ์ 2540

ครั้งที่	อุณหภูมิเฉลี่ย (องศาเซลเซียส)	ค่าความเป็นกรดด่างเฉลี่ย	ไขมัน (กรัมต่อลิตร)	โปรตีน (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	บีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ซี โอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1	30	6.5	3.13	1.29	1.12	510	836
2	28	6.7	3.35	1.48	1.17	463	962
3	30	5.8	3.14	1.35	1.15	545	881
4	28	6.4	2.88	1.24	1.02	570	823
5	28	5.5	3.38	1.52	1.23	586	977
6	30	6.0	3.41	1.56	1.27	602	1,012
7	31	5.7	2.97	1.28	1.10	491	826
8	30	6.5	3.26	1.43	1.16	550	893
9	28	6.7	3.50	1.62	1.31	618	1,094
10	30	5.5	3.68	1.65	1.38	645	1,108
เฉลี่ย	**29**	**6.1**	**3.27**	**1.44**	**1.19**	**558**	**941**

หมายเหตุ สมบัติทางเคมีและกายภาพของตัวอย่างน้ำทิ้งที่แสดงในตาราง แต่ละค่าเป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างที่เก็บจาก 3 จุด เป็นบริเวณเดียวกันทั้ง 10 ครั้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคัดแยกและการรวบรวมสายพันธุ์ยีสต์ที่เติบโตได้ในน้ำทิ้ง เปรียบเทียบสมบัติการเติบโตและองค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ที่รวบรวมได้ เพื่อคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีสมบัติเหมาะสมในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์จากน้ำทิ้ง

1. การคัดแยกและการรวบรวมสายพันธุ์ยีสต์ที่เติบโตได้ในน้ำทิ้ง ในอาหารแข็งจากน้ำทิ้งที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน

คัดแยกยีสต์ที่เติบโตได้ในน้ำทิ้ง ในอาหารแข็งจากน้ำทิ้ง 3 สูตร คือสูตรอาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน และสูตรอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนบางชนิด ได้แก่ กลีเซอรอลหรือกลูโคส อย่างละ 20 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก) พบว่าสามารถคัดแยกยีสต์ที่เติบโตได้บนอาหารแข็งจากน้ำทิ้งทั้ง 3 สูตร รวบรวมสายพันธุ์ยีสต์ได้ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ดังนี้

1) ยีสต์สายพันธุ์ *C* 5045
2) ยีสต์สายพันธุ์ *C* 5046
3) ยีสต์สายพันธุ์ *S* 0001
4) ยีสต์สายพันธุ์ *T* 0001
5) ยีสต์สายพันธุ์ *Y* 8662
6) ยีสต์สายพันธุ์ *N* 0001
7) ยีสต์สายพันธุ์ *N* 0002

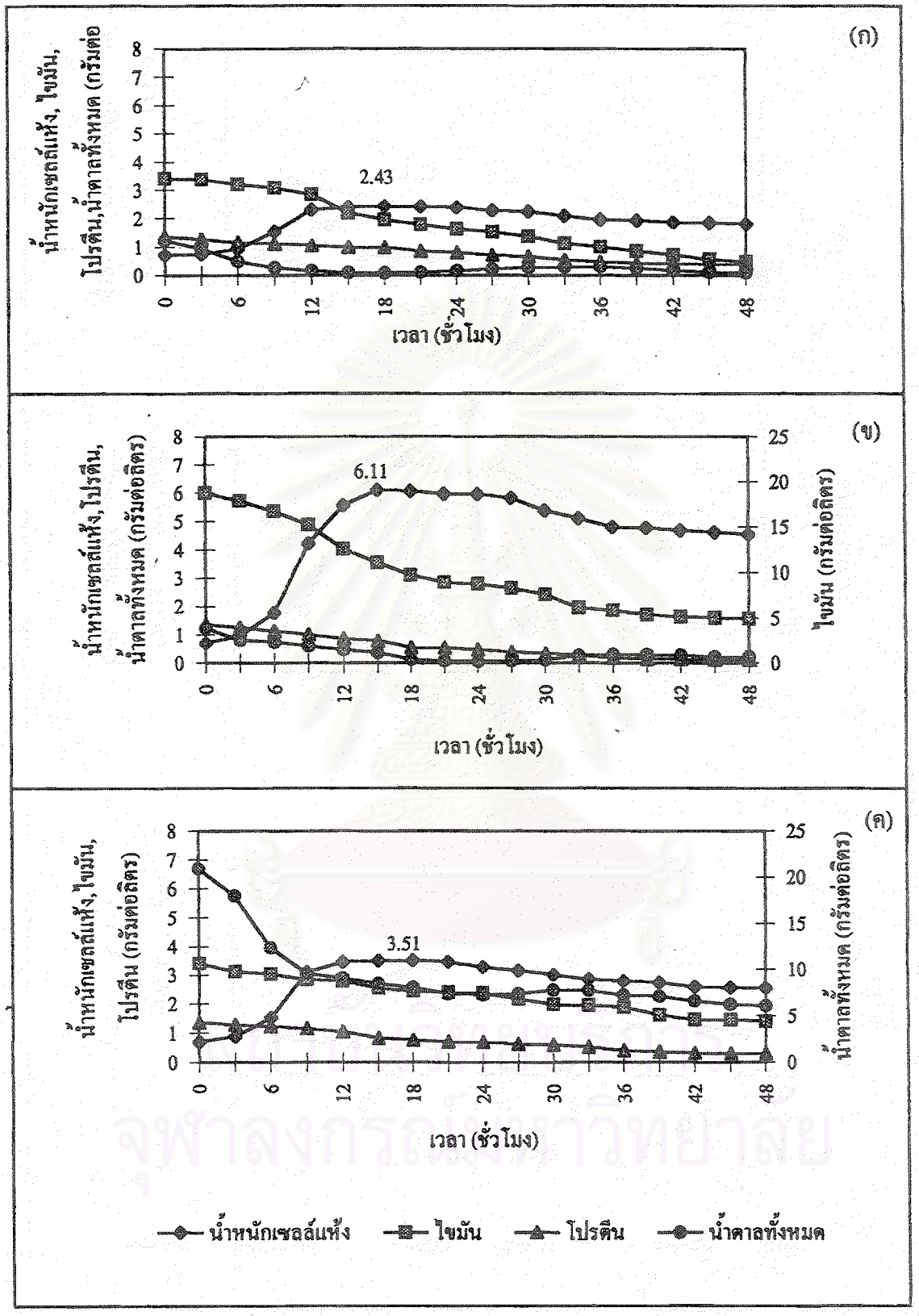
2. เปรียบเทียบการเติบโตในน้ำทิ้ง และองค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ที่รวบรวมได้ เพื่อคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีสมบัติเหมาะสมในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์จากน้ำทิ้ง

2.1 การเติบโตของยีสต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้งและอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้งที่เติมแหล่งคาร์บอน ในขวดเขย่า

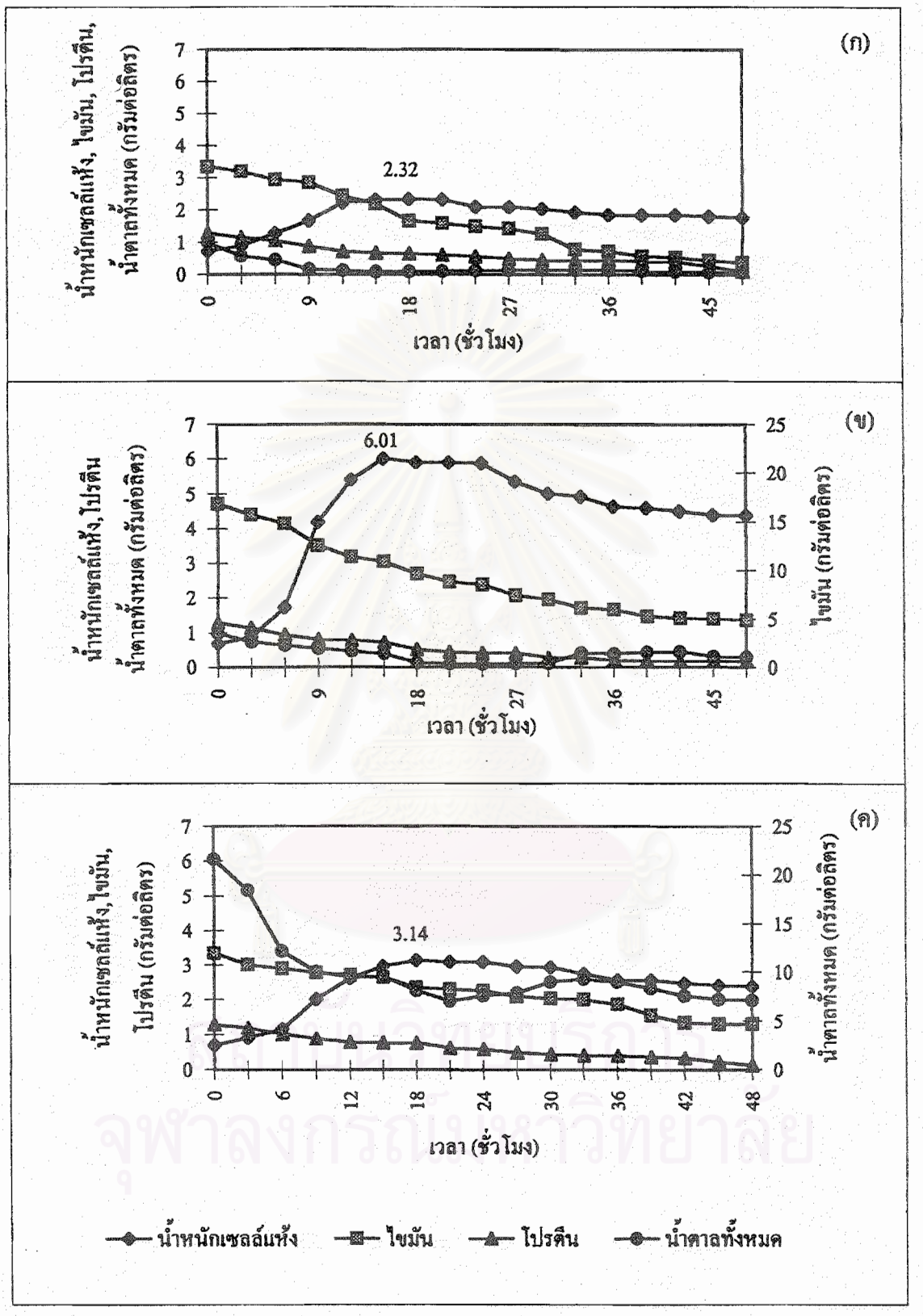
เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่รวบรวมได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้งที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำทิ้งเติมแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลีเซอรอลหรือกลูโคส อย่างละ 20 กรัมต่อลิตร ในขวดเขย่า ติดตามการเติบโตของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณไขมัน โปรตีน และน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ในน้ำทิ้งแต่ละช่วงเวลา ได้ข้อมูลดังแสดงในรูปที่ 1-7 ตามลำดับ โดยพบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Y* 8662 , *C* 5045, *C* 5046 และ *N* 0001 สามารถเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก

น้ำทิ้งทั้ง 3 สูตร เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งพบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Y* 8662 , *C* 5045 , *C* 5046 และ *N* 0001 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.58, 2.43, 2.32 และ 2.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.40, 6.08, 5.91 และ 4.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งเติมกลูโคส มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.79, 3.51, 3.14 และ 2.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่ยีสต์สายพันธุ์ *S* 0001 เติบโตได้ดีในน้ำทิ้งเติมกลูโคส โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.63 กรัมต่อลิตร ส่วนยีสต์สายพันธุ์ *T* 0001 และ *N* 0002 เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้งทั้ง 3 สูตรได้ในปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ ดังนั้นเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความสามารถในการเติบโตของยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้งทั้ง 3 สูตร พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Y* 8662 , *C* 5045 , *C* 5046 และ *N* 0001 เติบโตได้ดีในน้ำทิ้งและน้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล โดยยีสต์ *Y* 8662 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ขณะที่ยีสต์ *S* 0001 เติบโตได้ดีในน้ำทิ้งเติมกลูโคส เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งในแต่ละช่วงเวลาที่เลี้ยงเชื้อยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ (รูปที่ 8)

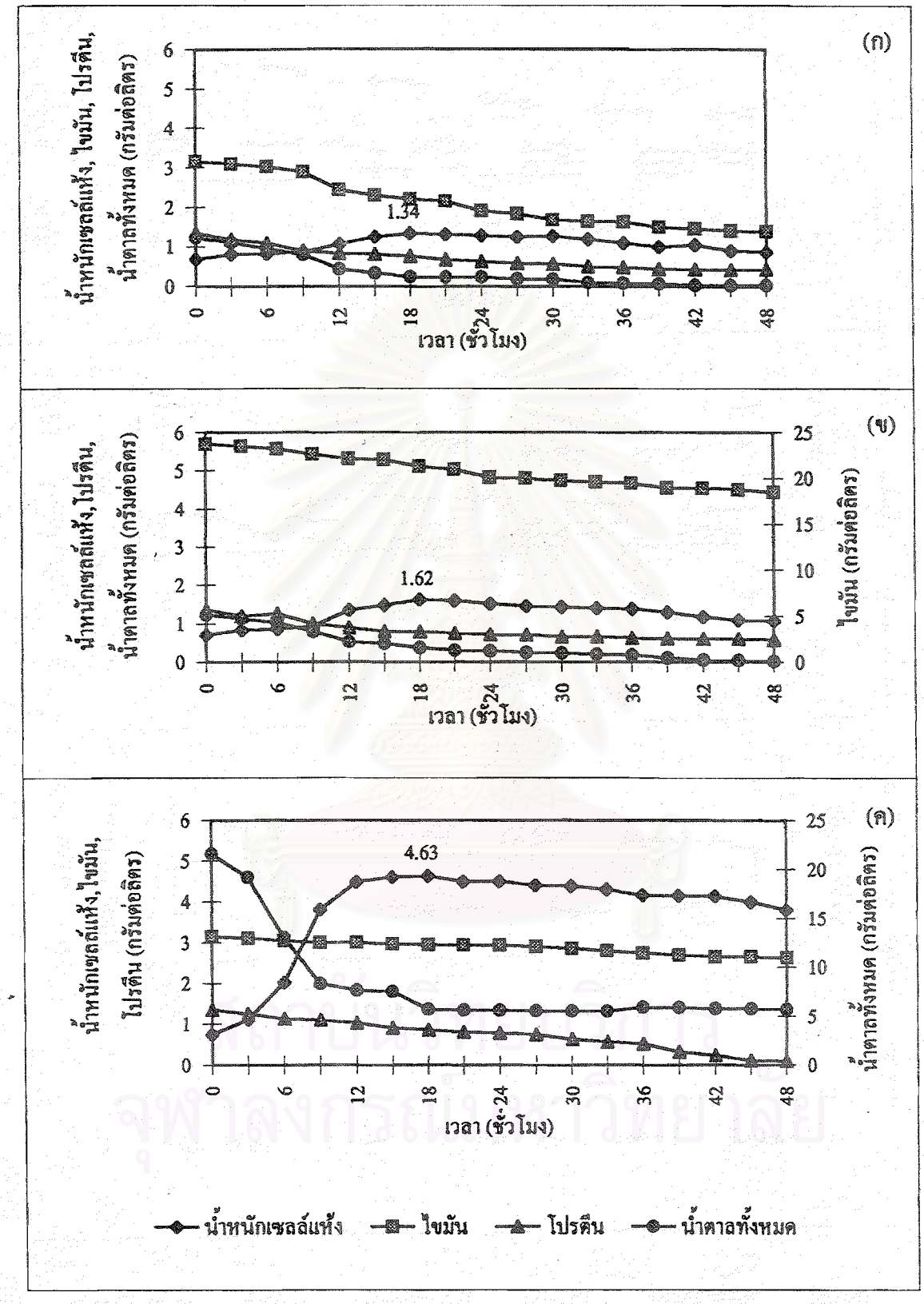
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



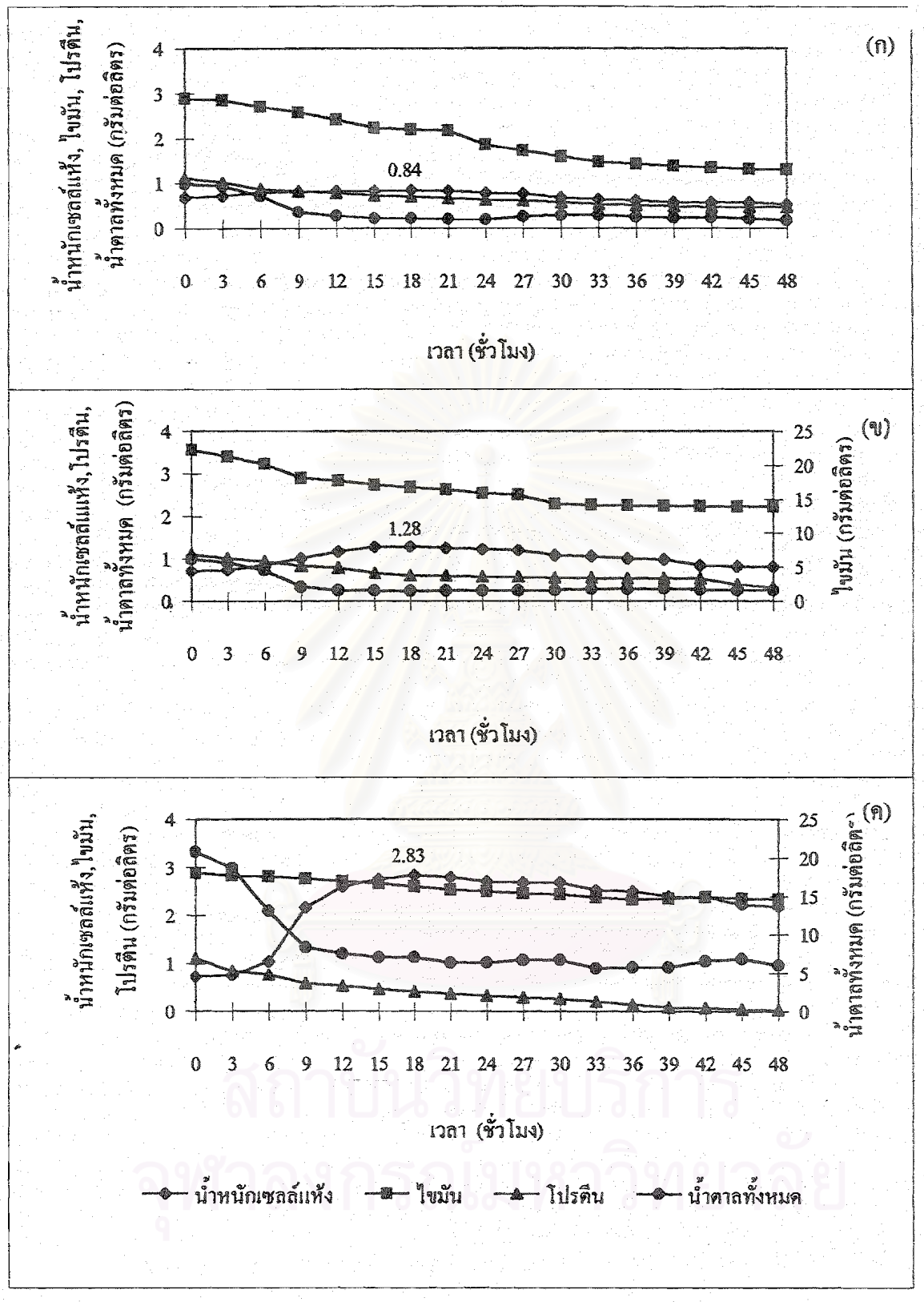
รูปที่ 1 การเติบโตของยีสต์ *C* 5045 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ (ก) น้ำทิ้ง (ข) น้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล และ (ค) น้ำทิ้งเติมกลูโคส ตามลำดับ ในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5



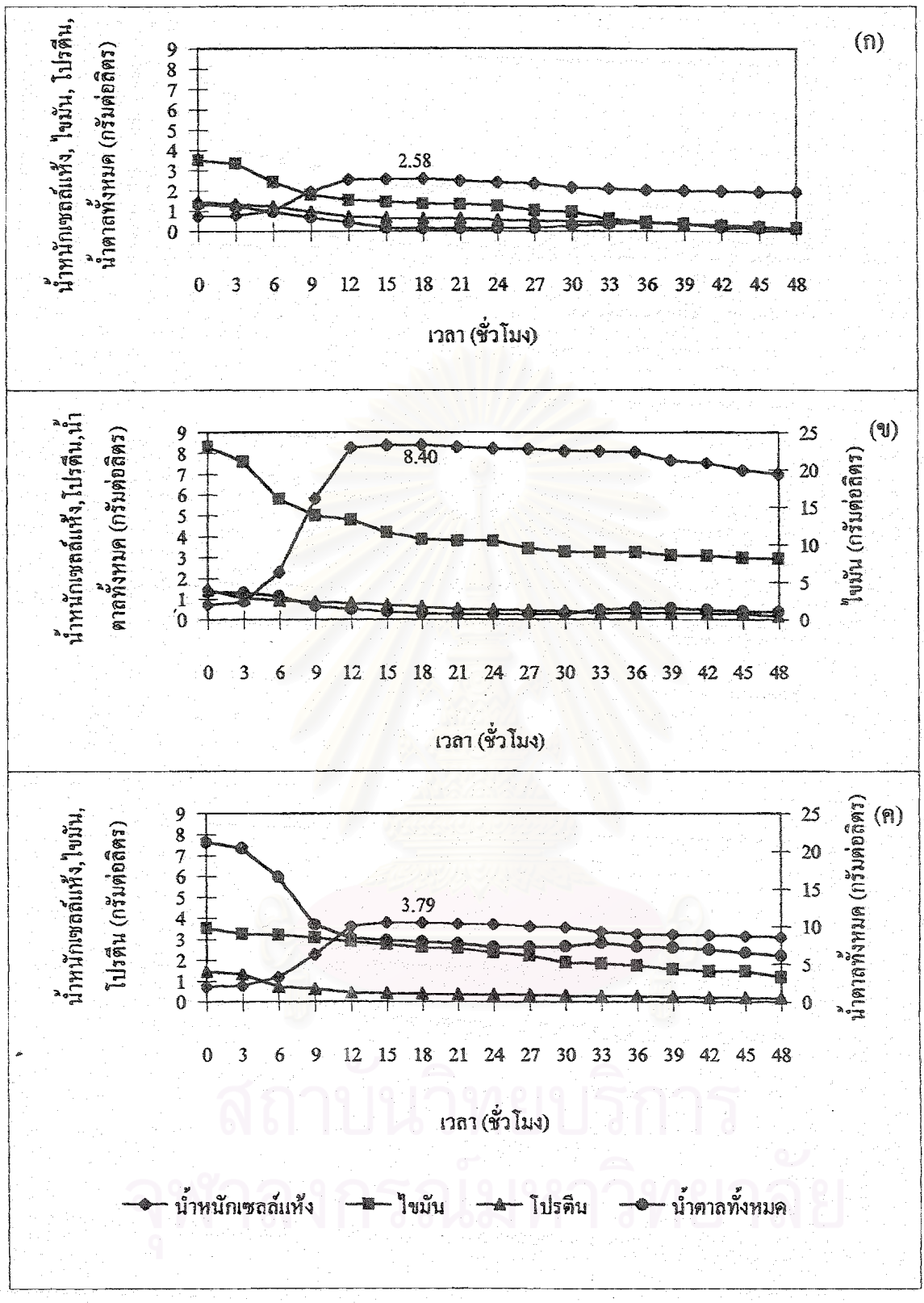
รูปที่ 2 การเติบโตของเชื้อ *C* 5046 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ (ก) น้ำทิ้ง (ข) น้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล และ (ค) น้ำทิ้งเติมกลูโคส ตามลำดับ ในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5



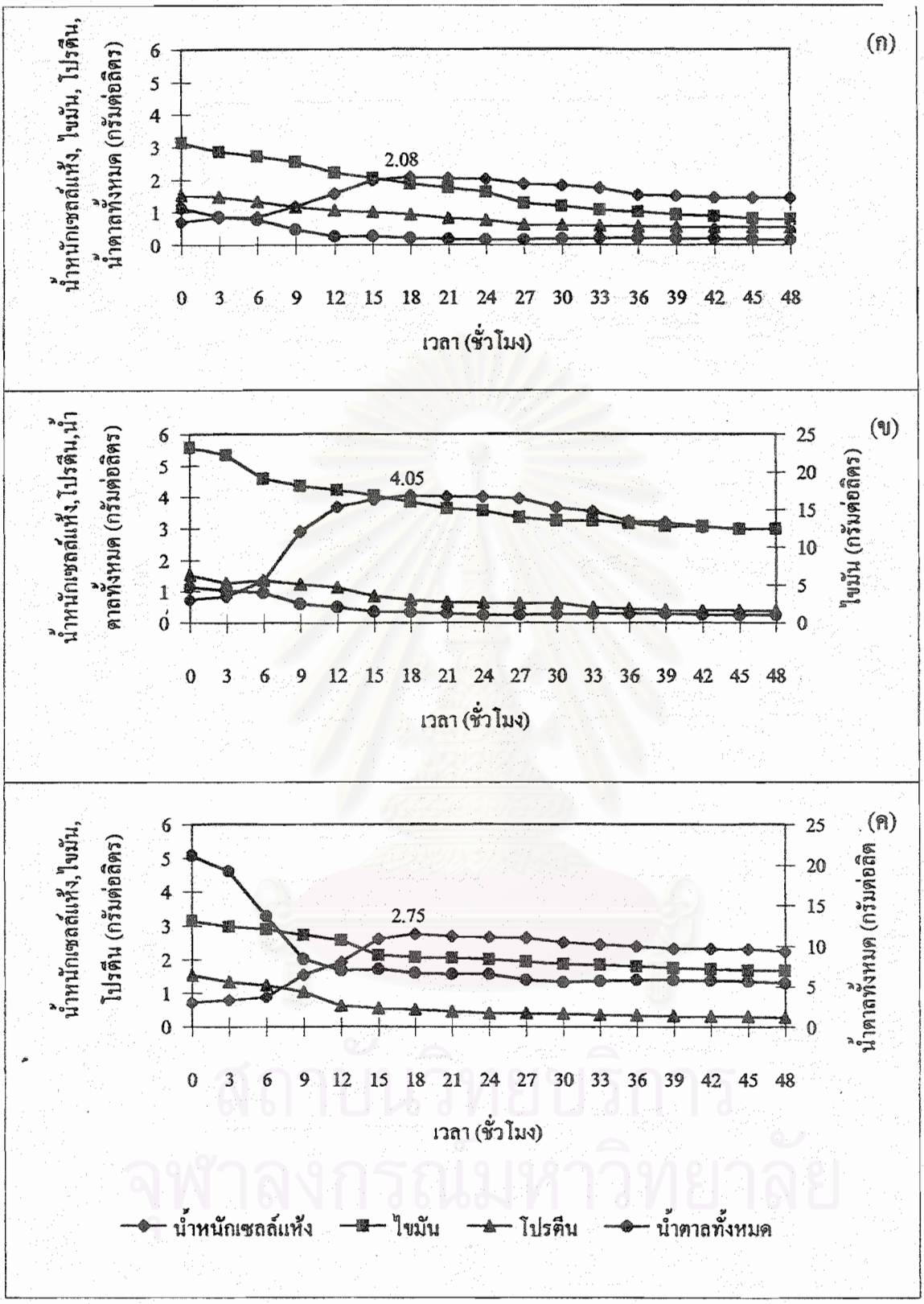
รูปที่ 3 การเติบโตของยีสต์ *S 0001* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ (ก) น้ำทิ้ง (ข) น้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล และ (ค) น้ำทิ้งเติมกลูโคส ตามลำดับ ในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5



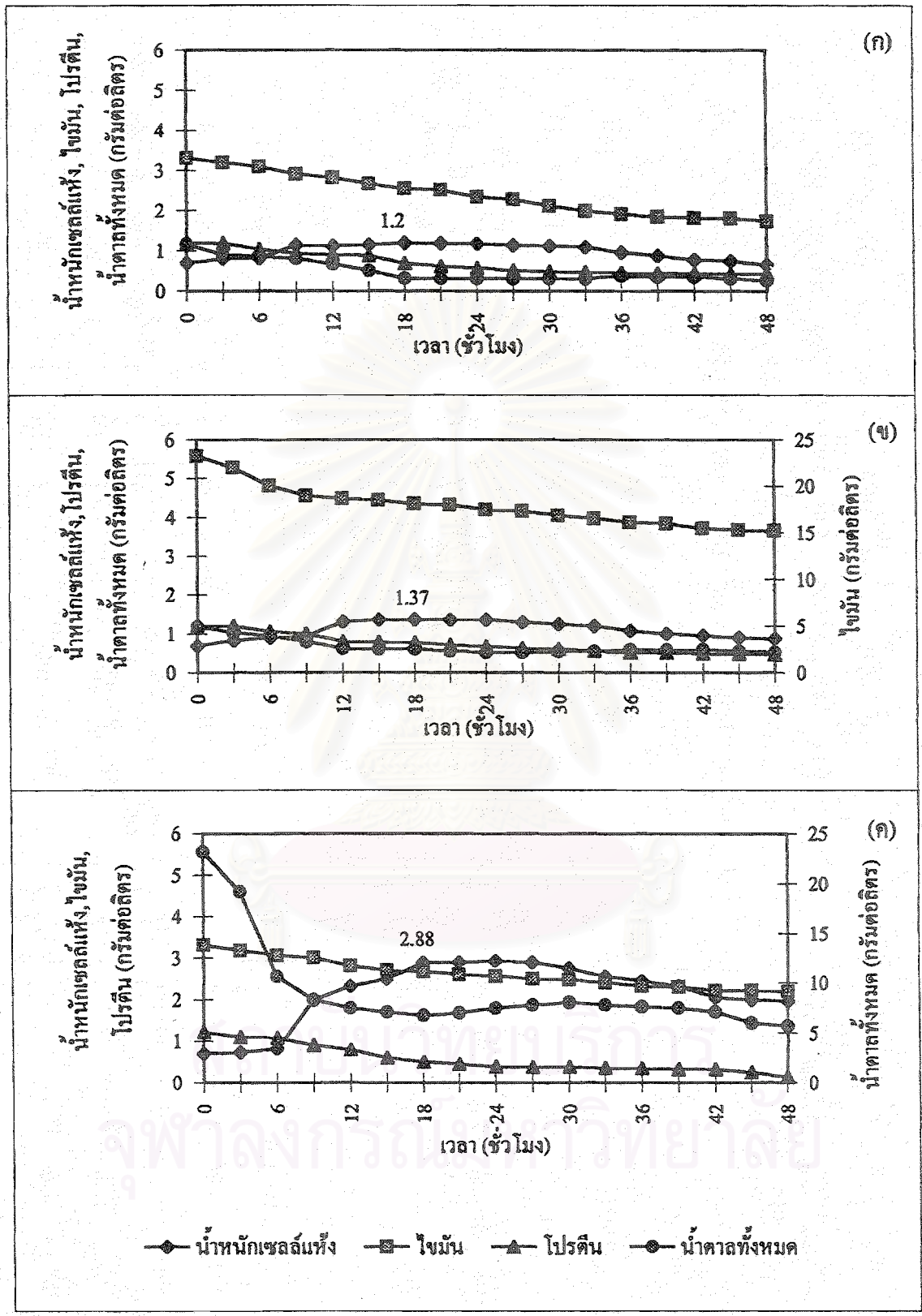
รูปที่ 4 การเติบโตของยีสต์ *T* 0001 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ (ก) น้ำทิ้ง (ข) น้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล และ (ค) น้ำทิ้งเติมกลูโคส ตามลำดับ ในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5



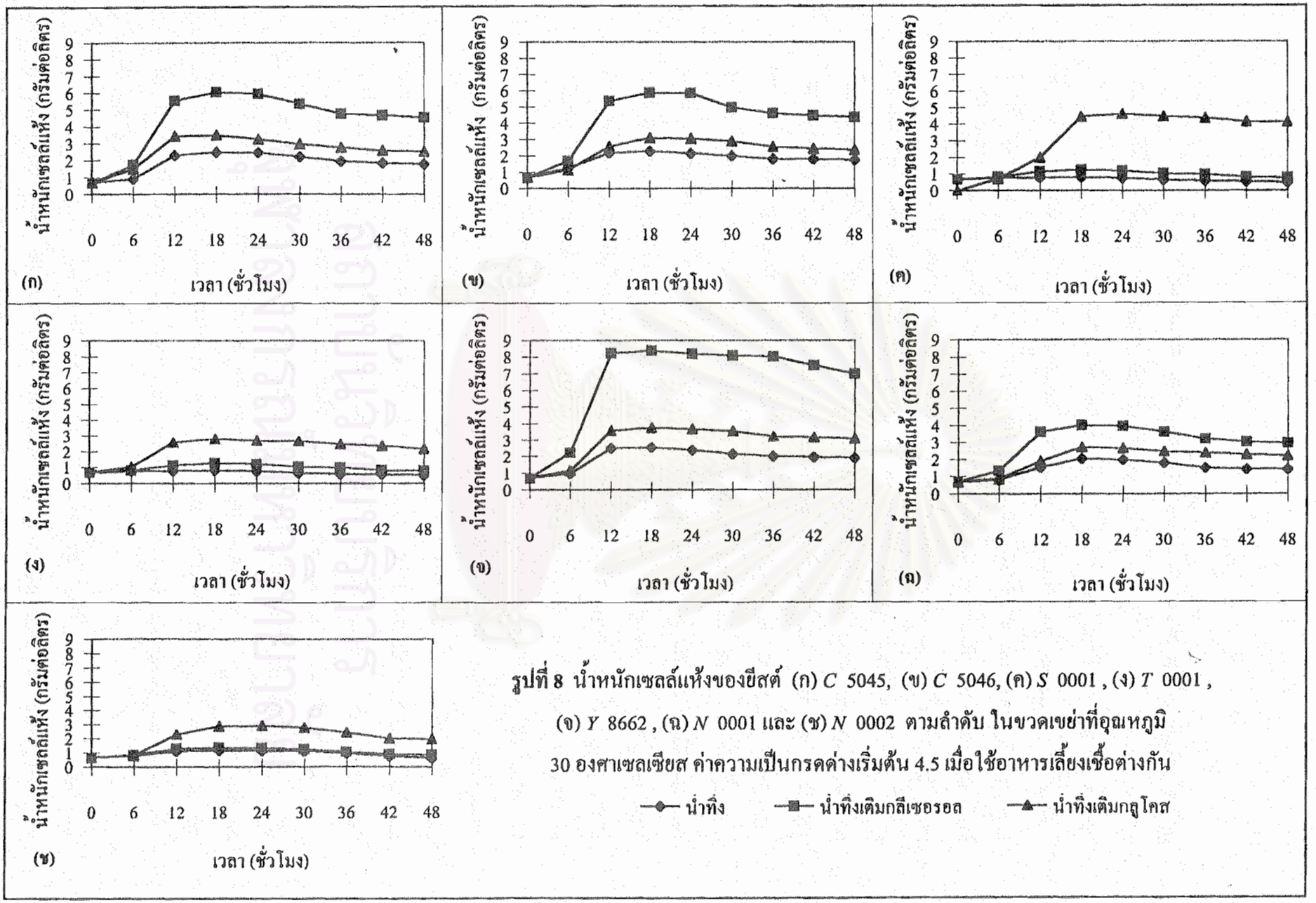
รูปที่ 5 การเติบโตของยีสต์ *Y* 8662 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ (ก) น้ำทิ้ง (ข) น้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล และ (ค) น้ำทิ้งเติมกลูโคส ตามลำดับ ในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5



รูปที่ 6 การเติบโตของยีสต์ *N* 0001 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ (ก) น้ำทิ้ง (ข) น้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล และ (ค) น้ำทิ้งเติมกลูโคส ตามลำดับ ในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5



รูปที่ 7 การเติบโตของยีสต์ *N* 0002 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ (ก) น้ำทิ้ง (ข) น้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล และ (ค) น้ำทิ้งเติมกลูโคส ตามลำดับ ในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5



รูปที่ 8 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ (ก) *C* 5045, (ข) *C* 5046, (ค) *S* 0001 , (ง) *T* 0001 , (จ) *Y* 8662 , (ฉ) *N* 0001 และ (ช) *N* 0002 ตามลำดับ ในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5 เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน

2.2 เปรียบเทียบองค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ที่รวบรวมได้ เพื่อคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีฉมบัติเหมาะสมในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ได้แก่ ปริมาณโปรตีนรวม (crude protein) ด้วยวิธีไมโครเจลดาห์ล (Kjeldahl protein) และปริมาณโปรตีนจริง (true protein) ด้วยวิธีของลาวรี (Lowry protein) ภายในเซลล์ยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ ที่เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้งทั้ง 3 สูตร ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 2 โดยเมื่อเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งและน้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล พบว่ายีสต์ *Y* 8662 มีปริมาณโปรตีนรวมและโปรตีนจริงเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยเมื่อเลี้ยงยีสต์ *Y* 8662 ในน้ำทิ้ง มีปริมาณโปรตีนรวมและโปรตีนจริงเท่ากับ 1.60 และ 1.24 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือเท่ากับ 62.02 และ 48.06 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ รองลงมาคือยีสต์ *C* 5045 มีปริมาณโปรตีนรวมและโปรตีนจริงเท่ากับ 1.43 และ 1.02 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือเท่ากับ 58.84 และ 41.97 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Y* 8662 ในน้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล มีปริมาณโปรตีนรวมและโปรตีนจริงเท่ากับ 5.20 และ 4.03 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือเท่ากับ 61.92 และ 47.98 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ รองลงมาคือยีสต์ *C* 5046 มีปริมาณโปรตีนรวมและโปรตีนจริงเท่ากับ 3.55 และ 2.70 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือเท่ากับ 59.06 และ 44.92 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ขณะที่เมื่อเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งเติมกลูโคส พบว่ายีสต์ *S* 0001 มีปริมาณโปรตีนรวมและโปรตีนจริงเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์สูงสุดเมื่อเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่น โดยมีปริมาณโปรตีนรวมและโปรตีนจริง เท่ากับ 2.80 และ 2.24 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือเท่ากับ 60.48 และ 48.38 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ รองลงมาคือยีสต์ *Y* 8662 มีปริมาณโปรตีนรวมและโปรตีนจริงเท่ากับ 2.25 และ 1.87 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือเท่ากับ 59.37 และ 49.34 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ Peppler (1970) รายงานว่าการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในเชิงพาณิชย์ ควรมีปริมาณโปรตีนรวมและโปรตีนจริงเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ ไม่ต่ำกว่า 50 และ 40 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ขณะที่ International Union of Pure and Applied Chemistry กำหนดให้การผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในเชิงพาณิชย์ควรมีปริมาณโปรตีนจริงเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ ไม่ต่ำกว่า 45 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Peppler, 1970)

เมื่อคำนวณหาค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) และค่าสัมประสิทธิ์ของผลผลิตมวลเซลล์เมื่อเทียบกับสับสเตรททั้งหมดที่ใช้ ($Y_{X/S}$) ของยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ที่เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้งทั้ง 3 สูตร ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งพบ

ว่ายีสต์ *Y* 8662 มีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและค่าสัมประสิทธิ์ของผลผลิตมวลเซลล์เมื่อเทียบกับสับสเตรททั้งหมดในน้ำทิ้งที่ใช้สูงกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่น โดยมีค่าเท่ากับ 0.105 ต่อชั่วโมง และ 0.554 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมสับสเตรททั้งหมด ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล พบว่ายีสต์ *Y* 8662 มีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและค่าสัมประสิทธิ์ของผลผลิตมวลเซลล์เมื่อเทียบกับสับสเตรททั้งหมดที่ใช้สูงกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่น โดยมีค่าเท่ากับ 0.138 ต่อชั่วโมง และ 0.544 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมสับสเตรททั้งหมด ตามลำดับ ขณะที่เมื่อเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งเติมกลูโคสพบว่ายีสต์ *S* 0001 มีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและค่าสัมประสิทธิ์ของผลผลิตมวลเซลล์เมื่อเทียบกับสับสเตรททั้งหมดที่ใช้สูงกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่น โดยมีค่าเท่ากับ 0.150 ต่อชั่วโมง และ 0.235 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมสับสเตรททั้งหมด ตามลำดับ รองลงมาคือยีสต์ *Y* 8662 มีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและค่าสัมประสิทธิ์ของผลผลิตมวลเซลล์เมื่อเทียบกับสับสเตรททั้งหมดที่ใช้เท่ากับ 0.099 ต่อชั่วโมง และ 0.203 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมสับสเตรททั้งหมด ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ยีสต์ 7 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้ง น้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล และน้ำทิ้งเติมกลูโคส ตามลำดับ ในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5

สายพันธุ์ยีสต์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนภายในเซลล์ยีสต์ (กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	
			โปรตีนรวม	โปรตีนจริง
C 5045	น้ำทิ้ง	2.43	1.43	1.02
C 5046		2.32	1.30	0.92
S 0001		1.34	0.68	0.48
T 0001		0.84	0.40	0.30
Y 8662		**2.58**	**1.60**	**1.24**
N 0001		2.08	1.20	0.85
N 0002		1.20	0.60	0.38
C 5045	น้ำทิ้งเติม	6.11	3.50	2.68
C 5046	กลีเซอรอล	6.01	3.55	2.70
S 0001		1.62	0.90	0.70
T 0001		1.28	0.60	0.47
Y 8662		**8.40**	**5.20**	**4.03**
N 0001		4.05	2.30	1.66
N 0002		1.37	0.60	0.44
C 5045	น้ำทิ้งเติม	3.51	2.00	1.54
C 5046	กลูโคส	3.14	1.90	1.44
S 0001		**4.63**	**2.80**	**2.24**
T 0001		2.83	1.30	1.05
Y 8662		3.79	2.25	1.87
N 0001		2.75	1.50	1.13
N 0002		2.93	1.40	0.94

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ และค่าสัมประสิทธิ์ของผลผลิตมวลเซลล์เมื่อเทียบกับสับสเตรททั้งหมดที่ใช้ของยีสต์ 7 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้ง น้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล และน้ำทิ้งเติมกลูโคส ตามลำดับ ในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5

สายพันธุ์ยีสต์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	μ (ต่อชั่วโมง)	$Y_{x/s}$ (กรัมต่อกรัมสับสเตรท)
C 5045	น้ำทิ้ง	2.43	0.068	0.474
C 5046		2.32	0.049	0.419
S 0001		1.34	0.041	0.261
T 0001		0.84	0.016	0.086
Y 8662		**2.58**	**0.105**	**0.554**
N 0001		2.08	0.061	0.468
N 0002		1.20	0.033	0.231
C 5045	น้ำทิ้งเติม	6.08	0.103	0.424
C 5046	กลีเซอรอล	5.91	0.102	0.371
S 0001		1.62	0.053	0.232
T 0001		1.28	0.035	0.085
Y 8662		**8.40**	**0.138**	**0.544**
N 0001		4.05	0.092	0.378
N 0002		1.37	0.036	0.155
C 5045	น้ำทิ้งเติม	3.51	0.069	0.195
C 5046	กลูโคส	3.14	0.083	0.162
S 0001		**4.63**	**0.150**	**0.235**
T 0001		2.83	0.083	0.143
Y 8662		3.79	0.099	0.203
N 0001		2.75	0.094	0.123
N 0002		2.93	0.071	0.129

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งหมดภายในเซลล์ยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่ายีสต์ *C* 5046 และ *Y* 8662 มีปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งหมดภายในเซลล์ยีสต์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยมีปริมาณต่ำกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่น ปริมาณเท่ากับ 10.43 และ 10.56 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ Kihlberg (1972) รายงานว่ายีสต์ที่ใช้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์ ไม่ควรมีปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งหมดภายในเซลล์สูง โดยทั่วไปปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งหมดภายในเซลล์ยีสต์จะอยู่ในช่วง 6 - 12 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อพิจารณาถึงชนิดและปริมาณวิตามินภายในเซลล์ยีสต์ ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่า ภายในเซลล์ยีสต์ *Y* 8662 ประกอบด้วยจำนวนชนิดวิตามินมากที่สุด โดยเฉพาะไรโบเฟลวิน กรดแพนโตเธนิก ไพริดอกซิน และกรดอะมิโนเบนโซอิก เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ในปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีไรโบเฟลวินเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์สูงถึง 160 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งไรโบเฟลวิน หรือวิตามินบี2 เป็นวิตามินที่ใช้ในอุตสาหกรรมยาและอาหารสัตว์จำนวนมาก (Reed และ Nagodawithana, 1995) นอกจากนั้นยีสต์ *Y* 8662 ยังมีกรดแพนโตเธนิกซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นสารเร่งการเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์สูงถึง 117 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (Suomalainen และคณะ, 1971)

จากผลการวิจัยที่กล่าวมา พบว่ายีสต์ *Y* 8662, *C* 5046 และ *C* 5045 สามารถเติบโตได้ดีในน้ำทิ้ง นอกจากนั้นยังมีปริมาณโปรตีน ชนิดและปริมาณวิตามินเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์สูง มีปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งหมดภายในเซลล์ต่ำ ดังนั้นจึงเลือกยีสต์ 3 สายพันธุ์ดังกล่าว มาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนภายในเซลล์ ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่า ยีสต์ *Y* 8662 มีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดภายในเซลล์สูงสุด เท่ากับ 45.65 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยยีสต์ *C* 5046 และ *C* 5045 มีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดภายในเซลล์ปริมาณเท่ากับ 41.83 และ 28.57 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณกรดอะมิโนตามมาตรฐานของ FAO ซึ่งมีกรดอะมิโนจำเป็นปริมาณรวมเท่ากับ 28.6 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง กับ แหล่ง โปรตีนอื่นๆ ได้แก่ ถั่วเหลือง เนื้อปลา และไข่ มีกรดอะมิโนจำเป็นปริมาณรวมเท่ากับ 16.8, 26.2 และ 49.4 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Litchfield, 1979 ; Boze และคณะ, 1992) ในขณะที่ยีสต์ *Y* 8662, *C* 5046 และ *C* 5045 มีกรดอะมิโนจำเป็นปริมาณรวมเท่ากับ 22.05, 20.57 และ 11.99 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ พบว่ายีสต์ *Y* 8662 มีกรดอะมิโนจำเป็นปริมาณรวมสูงกว่าถั่วเหลืองและมีปริมาณรวมใกล้เคียงกับเนื้อปลา Anna (1990) รายงานว่า ในการผลิตอาหารสัตว์จำเป็นต้องเติมกรดอะมิโนบางชนิด เช่น ไลซีน เมไธโอนีน และทริปโตเฟน ลงไปเพื่อเป็นอาหารเสริมแทน

โปรตีนจากพืช ความต้องการปริมาณกรดอะมิโนดังกล่าวจึงมีเพิ่มมากขึ้นตลอดเวลา เนื่องจากการขยายตัวของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่มีสมบัติเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับสัตว์ ควรมีชนิดและปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นภายในเซลล์ครบถ้วนและควรมีในปริมาณสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไลซีน เมไธโอนีน และทริปโตเฟน เพื่อทดแทนแหล่งโปรตีนจากพืช Scrimshaw และ Young (1979) รายงานว่าโปรตีนจากพืชมักขาดกรดอะมิโนดังกล่าว เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่ายีสต์ *Y* 8662 มีไลซีน เมไธโอนีน และทริปโตเฟน เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ปริมาณเท่ากับ 3.60, 0.46 และ 0.52 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ขณะที่ยีสต์ *C* 5046 มีไลซีน เมไธโอนีน และทริปโตเฟน เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ปริมาณเท่ากับ 3.65, 0.45 และ 0.45 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนยีสต์ *C* 5045 มีกรดอะมิโนดังกล่าวในปริมาณต่ำกว่าเมื่อเทียบกับยีสต์อีก 2 สายพันธุ์ ยีสต์ *Y* 8662 และ *C* 5046 มีกรดอะมิโนดังกล่าวในปริมาณใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นและกรดอะมิโนทั้งหมดภายในเซลล์ พบว่ายีสต์ *Y* 8662 มีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นและกรดอะมิโนทั้งหมดภายในเซลล์สูงกว่ายีสต์ *C* 5046

เมื่อวิเคราะห์หาค่าบีโอดีและค่าซีโอดีของน้ำทิ้ง ก่อนและหลังนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อของยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์ตามวิธีของสมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่า น้ำทิ้งมีค่าบีโอดีและค่าซีโอดี เท่ากับ 570 และ 823 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำน้ำทิ้งมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ค่าบีโอดีและค่าซีโอดีของน้ำทิ้งหลังการเลี้ยงเชื้อ *Y* 8662 มีค่าลดลงมากที่สุดเหลือ 53 และ 96 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สามารถลดค่าบีโอดีและค่าซีโอดีของน้ำทิ้งได้คิดเป็น 90.7 เปอร์เซนต์ และ 88.3 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ค่าบีโอดีและค่าซีโอดีของน้ำทิ้งหลังการเลี้ยงเชื้อ *Y* 8662 มีค่าอยู่ในช่วงมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้ง ตามประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 ที่กำหนดให้มีค่าบีโอดีไม่เกิน 20-60 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าซีโอดีไม่เกิน 120-400 มิลลิกรัมต่อลิตร (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2539)

ดังนั้นจากผลการวิจัยที่ได้พบว่า ยีสต์ *Y* 8662 สามารถใช้สารอินทรีย์ในน้ำทิ้งและเติบโตได้ดีที่สุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ ปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งหมดภายในเซลล์ ชนิดและปริมาณวิตามินภายในเซลล์ รวมทั้งชนิดและปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดภายในเซลล์ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับสัตว์ นอกจากนั้นยังสามารถบำบัดน้ำทิ้ง โดยลดค่าบีโอดีและค่าซีโอดีในน้ำทิ้งภายหลังนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยง

เชื้อได้และมีค่าอยู่ในช่วงมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้ง จากเหตุผลดังกล่าวยีสต์ *Y* 8662 จึงมีสมบัติเหมาะสมในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในงานวิจัยนี้ ดังนั้นจึงเลือกยีสต์สายพันธุ์ *Y* 8662 สำหรับการวิจัยขั้นต่อไป

ตารางที่ 4 ปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งหมดภายในเซลล์ยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5

สายพันธุ์ยีสต์	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	RNA (เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก)	DNA (เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก)	กรดนิวคลีอิกทั้งหมด (เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก)
C 5045	2.53	9.43	1.33	10.76
C 5046	2.32	9.25	1.18	10.43
S 0001	1.34	9.83	1.32	11.20
T 0001	0.84	10.34	1.56	11.90
Y 8662	2.58	9.31	1.25	10.56
N 0001	2.08	9.53	1.36	10.89
N 0002	1.20	11.23	1.82	13.05

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณวิตามินภายในเซลล์ยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5

สายพันธุ์ยีสต์	ชนิดและปริมาณวิตามินภายในเซลล์ (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)							
	Thiamine	Riboflavin	Nicotinic acid	Pantothenic acid	Pyridoxin	Folic acid	Biotin	p-Aminobenzoic acid
C 5045	21	34	437	-	-	8	-	-
C 5046	28	42	480	22	-	18	-	-
S 0001	32	46	388	-	-	22	0.54	12
T 0001	5	22	357	-	-	5	-	-
Y 8662	11	160	402	117	18	3.8	-	23
N 0001	24	36	462	-	-	12	-	-
N 0002	4	19	341	-	-	6	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนภายในเซลล์ยีสต์ 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมจากน้ำทิ้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5

กรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)		
	C 5045	*C* 5046	*Y* 8662
กรดอะมิโนจำเป็น			
arginine	1.22	3.51	3.35
cystine	0.11	0.19	0.13
histidine	0.95	1.13	1.08
isoleucine	0.92	1.87	2.12
leucine	1.48	2.83	3.41
lysine	1.88	3.65	3.60
methionine	0.18	0.45	0.46
phenylalanine	2.12	2.04	2.07
threonine	1.60	2.17	2.53
tryptophan	0.23	0.45	0.52
valine	1.30	2.28	2.78
ปริมาณรวม	11.99	20.57	22.05
กรดอะมิโนไม่จำเป็น			
alanine	2.56	2.94	2.94
aspartic acid	2.94	3.89	4.49
glutamic acid	3.73	6.51	7.88
glycine	2.22	2.57	2.39
proline	1.78	1.86	1.77
serine	1.65	2.07	2.44
tyrosine	1.70	1.42	1.69
ปริมาณรวม	16.58	21.26	23.60
ปริมาณทั้งหมด	28.57	41.83	45.65

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบค่าบีโอดีและค่าซีโอดีของน้ำทิ้ง เมื่อนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อของยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5

สายพันธุ์ยีสต์	ค่าบีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ค่าซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	ก่อนเลี้ยงเชื้อ	หลังเลี้ยงเชื้อ	% การลดลง	ก่อนเลี้ยงเชื้อ	หลังเลี้ยงเชื้อ	% การลดลง
C 5045	570	95	83.3	823	132	84.0
C 5046	570	86	84.9	823	116	85.9
S 0001	570	158	72.3	823	219	73.4
T 0001	570	242	57.5	823	407	50.5
Y 8662	570	53	**90.7**	823	96	**88.3**
N 0001	570	126	77.9	823	178	78.4
N 0002	570	186	67.4	823	316	61.6

หมายเหตุ : มาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้ง กำหนดให้มีค่าบีโอดีไม่เกิน 20-60 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าซีโอดีไม่เกิน 120-400 มิลลิกรัมต่อลิตร ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2539)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในขวดเขย่า

จากผลการวิจัยที่ได้จึงคัดเลือกยีสต์ *Y* 8662 ในการผลิตมวลชีวภาพจากน้ำทิ้งและศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าว

1. การเตรียมกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์

เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Y* 8662 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก) ติดตามการเติบโตของเชื้อทุกๆ 3 ชั่วโมง จนครบ 36 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 9 พบว่าเชื้ออยู่ในระยะการพักตัวในช่วงเวลาสั้นๆ และเริ่มเข้าสู่ระยะของการเติบโตแบบทวีคูณตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นเชื้อจะเติบโตเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็วจนเมื่อถึงชั่วโมงที่ 15 เชื้อก็เติบโตเข้าสู่ช่วงท้ายของระยะการเติบโตแบบทวีคูณ และเริ่มเข้าสู่ระยะของการเติบโตแบบคงที่ ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.75 กรัมต่อลิตร รูปแบบการเติบโตในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อของยีสต์ *Y* 8662 มีระยะการเติบโตแบบทวีคูณอยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 6 ถึง 15 ดังนั้นจึงเลือกช่วงเวลาการเลี้ยงเชื้อดังกล่าว เพื่อศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อไป

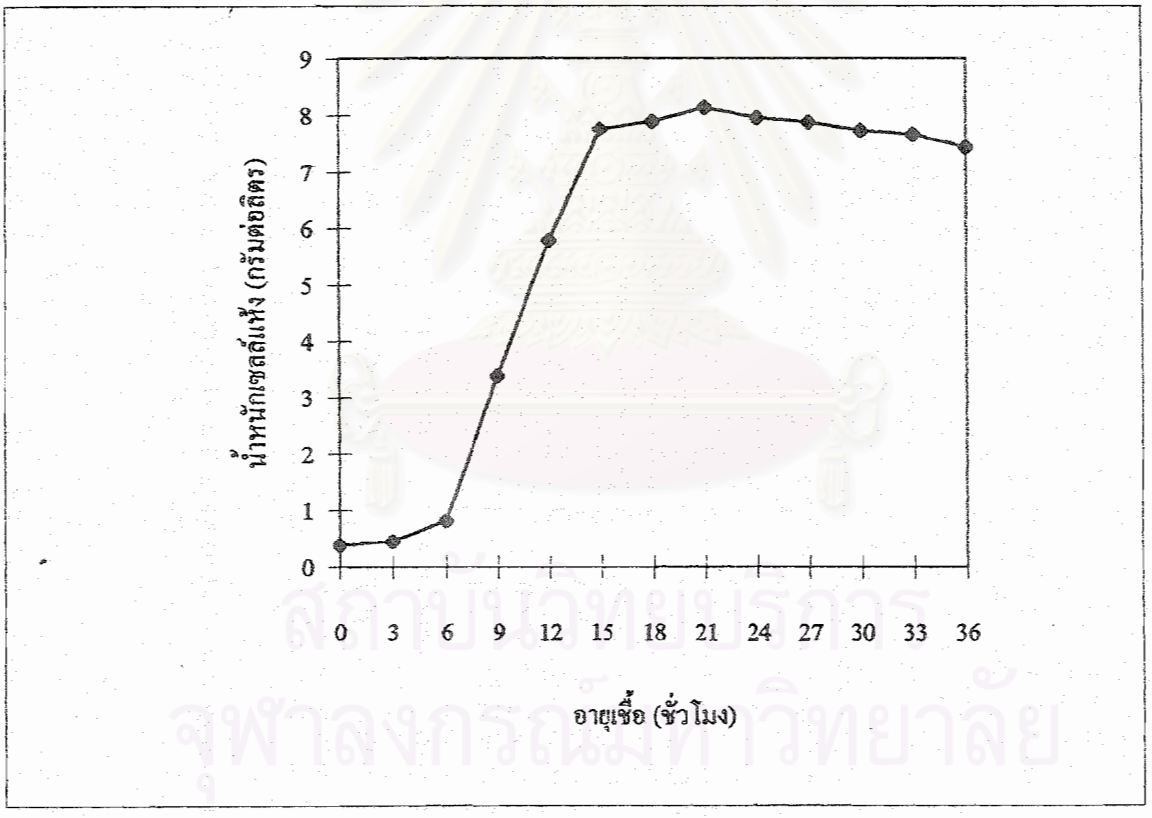
เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Y* 8662 ในน้ำทิ้ง ใช้เป็นอาหารสำหรับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ โดยแปรผันอายุหัวเชื้อชั่วโมงที่ 6, 9, 12 และ 15 ตามลำดับ ติดตามการเติบโตของเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณไขมันที่เหลือในน้ำทิ้ง (กรัมต่อลิตร) ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 10 พบว่า เมื่อใช้กล้าเชื้ออายุ 15, 12, 9 และ 6 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.81, 2.68, 2.66 และ 2.58 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 18, 24, 30 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ และมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.108, 0.095, 0.079 และ 0.061 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ จากรูปแบบการเติบโตของกล้าเชื้อ พบว่ากล้าเชื้ออายุ 6 และ 9 ชั่วโมง อยู่ในระยะการพักตัวนาน และเข้าสู่ระยะของการเติบโตแบบทวีคูณช้ากว่ากล้าเชื้ออายุ 12 และ 15 ชั่วโมง โดยการเติบโตของกล้าเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง อยู่ในระยะการพักตัวในช่วงเวลาสั้นๆ โดยเริ่มเข้าสู่ระยะของการเติบโตแบบทวีคูณตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นเชื้อจะเติบโตเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็ว จนถึงชั่วโมงที่ 12 เชื้ออยู่ในช่วงท้ายของระยะการเติบโตแบบทวีคูณ โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 2.62 กรัมต่อลิตร ขณะที่มีการใช้ไขมันในน้ำทิ้งเป็นสารอาหารอย่างรวดเร็ว และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 18 เชื้อจึงเริ่มเข้าสู่ระยะของการเติบโตแบบคงที่ ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดชั่วโมงที่ 18 เท่ากับ 2.81 กรัมต่อลิตร ขณะที่กล้าเชื้ออายุ 12 ชั่วโมง มีการเติบโตเข้าสู่ในช่วงท้ายของ

ระยะการเติบโตแบบทวีคูณในชั่วโมงที่ 18 ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 2.63 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ระยะของการเติบโตแบบคงที่ในชั่วโมงที่ 24 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 2.78 กรัมต่อลิตร จึงเห็นได้ว่าการเติบโตของกล้าเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง อยู่ในระยะการพักตัวสั้น และเข้าสู่ระยะของการเติบโตแบบทวีคูณเร็วกว่ากล้าเชื้ออายุอื่นๆ ดังนั้นจึงเลือกกล้าเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง ในการเตรียมกล้าเชื้อเพื่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ ในการศึกษาต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *Y* 8662 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	0	3	6	9	12	15	24	30	36
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	0.38	0.44	0.81	3.38	5.78	7.75	7.95	7.72	7.43

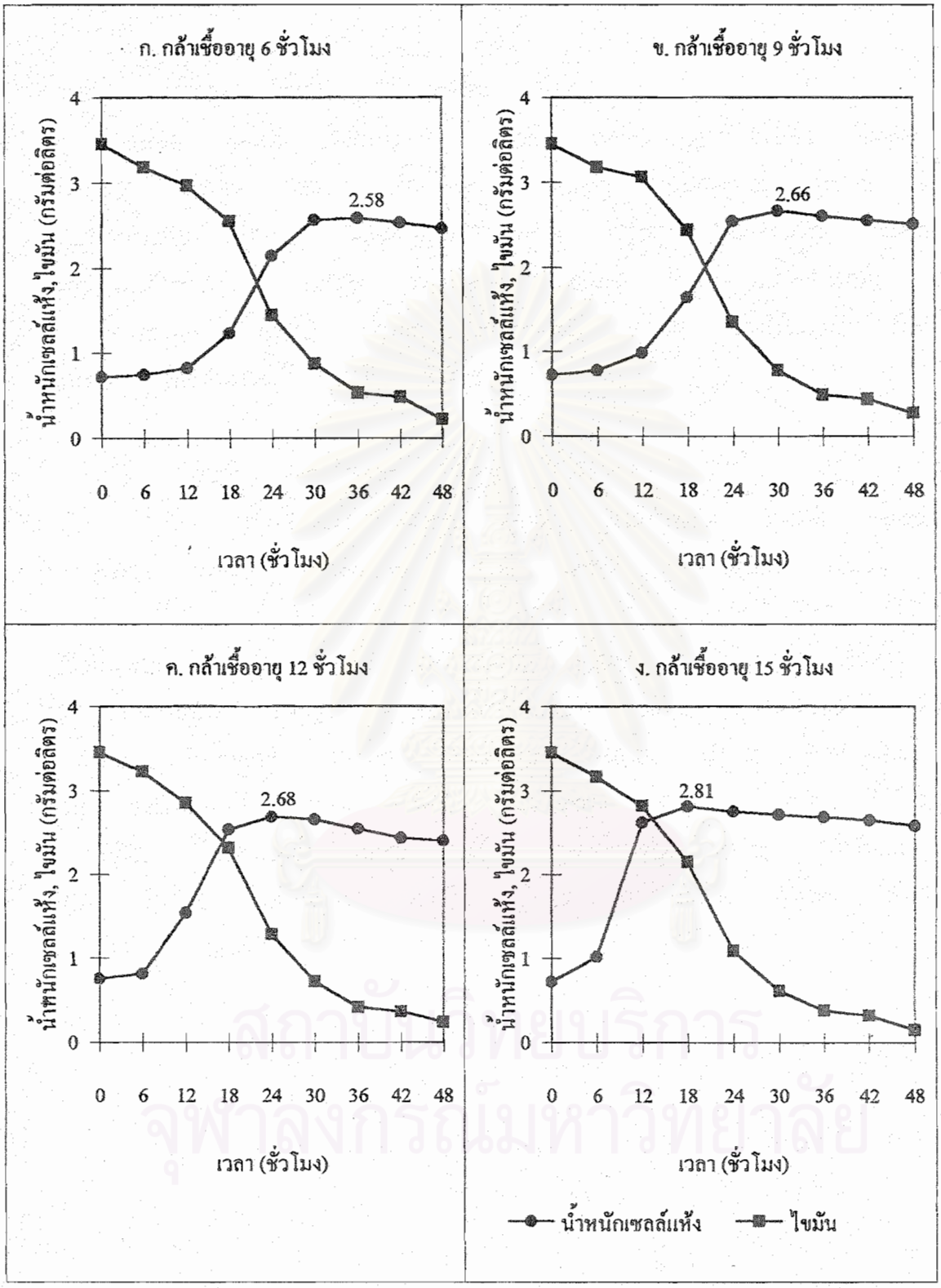


รูปที่ 9 รูปแบบการเติบโตของยีสต์ *Y* 8662 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

ตารางที่ 9 น้ำหนักเซลล์แห้งและไขมันที่เหลือในน้ำทิ้ง เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Y* 8662 กล้าเชื้ออายุ 6, 9, 12 และ 15 ชั่วโมงตามลำดับ

เวลา (ชั่วโมง)	ก. กล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมง		ข. กล้าเชื้ออายุ 9 ชั่วโมง		ค. กล้าเชื้ออายุ 12 ชั่วโมง		ง. กล้าเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง	
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ไขมัน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ไขมัน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ไขมัน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ไขมัน (กรัมต่อลิตร)
0	0.72	3.45	0.73	3.45	0.75	3.45	0.72	3.45
6	0.74	3.18	0.78	3.18	0.81	3.22	1.02	3.16
12	0.82	2.96	0.98	3.06	1.54	2.85	2.62	2.82
18	1.23	2.55	1.64	2.43	2.53	2.31	2.81	2.15
24	2.14	1.44	2.54	1.35	2.68	1.28	2.75	1.09
30	2.56	0.87	2.66	0.78	2.65	0.72	2.71	0.61
36	2.58	0.53	2.60	0.49	2.54	0.41	2.68	0.38
42	2.53	0.48	2.55	0.44	2.43	0.36	2.65	0.32
48	2.46	0.22	2.51	0.28	2.40	0.24	2.58	0.15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 รูปแบบการเติบโตของยีสต์ *Y* 8662 เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้ง ใช้กล้าเชื้ออายุ 6, 9, 12 และ 15 ชั่วโมง ตามลำดับ

การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในถังหมัก

จากผลการทดลองที่ได้ศึกษา ได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์โดยเชื้อ *Y* 8662 ในขวดเขย่าคือ กล้าเชื้อที่เตรียมได้และอายุที่เหมาะสมคือที่ 15 ชั่วโมง จึงได้นำภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว มาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับศึกษาการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในถังหมักโดยปัจจัยต่างๆ ที่ศึกษาได้แก่ การเติบโตและการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในถังหมัก โดยแปรผันภาวะในการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง วิเคราะห์ค่าบีโอดีและค่าซีโอดีในน้ำทิ้งภายหลังนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์

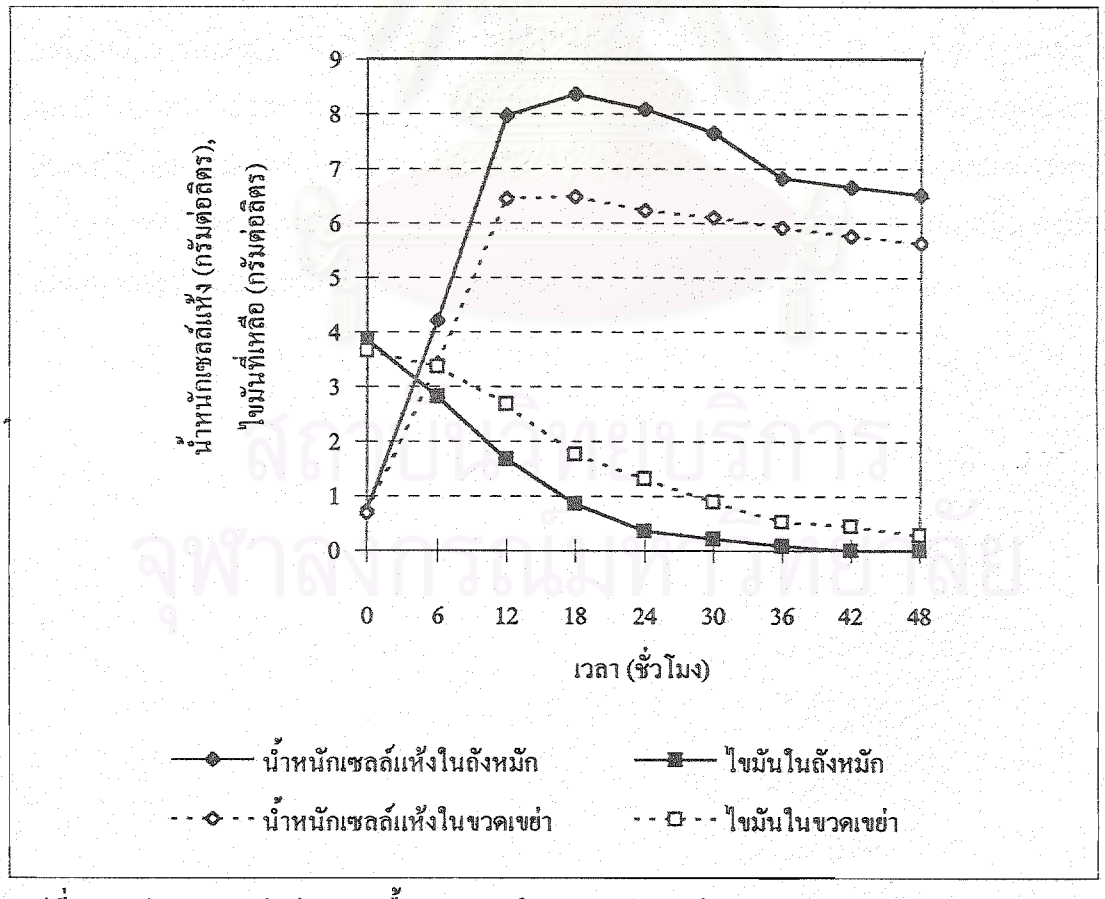
1. การเติบโตและการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในถังหมัก

เลี้ยงเชื้อ *Y* 8662 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำทิ้ง ติดตามการเติบโตของเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และไขมันที่เหลือในน้ำหมัก (กรัมต่อลิตร) นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับการเติบโตและการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในขวดเขย่า ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10 และรูปแบบการเติบโตในรูปที่ 11 พบว่าการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.35 กรัมต่อลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.136 ต่อชั่วโมง และกำลังการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์เท่ากับ 0.424 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าที่ใช้สูตรอาหารเดียวกัน โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.48 กรัมต่อลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.125 ต่อชั่วโมง และกำลังการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์เท่ากับ 0.322 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 การเติบโตของเชื้อ *Y* 8662 ในขวดเขย่าและในถังหมัก อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5

เวลา (ชั่วโมง)	ถังหมัก		ขวดเขย่า	
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ไขมัน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ไขมัน (กรัมต่อลิตร)
0	0.72	3.66	0.68	3.66
6	4.21	2.81	3.42	3.36
12	7.96	1.67	6.45	2.68
18	8.35	0.86	6.48	1.76
24	8.08	0.35	6.23	1.32
30	7.65	0.21	6.11	0.87
36	6.82	0.08	5.92	0.53
42	6.66	0.00	5.77	0.45
48	6.52	0.00	5.63	0.28



รูปที่ 11 รูปแบบการเติบโตของเชื้อ *Y* 8662 ในขวดเขย่าและในถังหมัก

2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ โดยเชื้อ *Y* 8662 ในถังหมัก

เลี้ยงเชื้อ *Y* 8662 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำทิ้งเพื่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในถังหมัก ภาวะในการหมักที่ศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง

2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของเชื้อ *Y* 8662

ในระหว่างกระบวนการหมัก อุณหภูมิมีบทบาทสำคัญต่อการเติบโตและการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ โดยมีผลต่ออัตราการเติบโต กระบวนการเมตาบอลิซึม และองค์ประกอบภายในเซลล์ ยีสต์ส่วนใหญ่ไม่เติบโตที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่นิยมใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์อยู่ในช่วง 25 ถึง 38 องศาเซลเซียส ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ (Boze และคณะ, 1987 อ้างถึงใน Boze และคณะ, 1992) การศึกษานี้แปรผันอุณหภูมิของการหมักที่ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 11 พบว่าอุณหภูมิของการหมักที่ 25, 30และ 37 องศาเซลเซียส ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.18, 8.35 และ 7.89 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.134, 0.136 และ 0.131 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าอุณหภูมิของการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ อุณหภูมิของการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส จึงเหมาะสมสำหรับการเติบโตของยีสต์ *Y* 8662 มากกว่าที่อุณหภูมิอื่น ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิของการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส ในการศึกษาต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของ *Y* 8662 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำทิ้ง ในถังหมักที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ *Y* 8662		
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	25	30	37
0	0.73	0.72	0.74
6	4.18	4.21	3.74
12	7.82	7.96	7.51
18	8.18	8.35	7.89
24	7.93	8.08	7.81
30	7.54	7.65	7.28
36	6.52	6.82	6.57
42	6.42	6.66	6.28
48	6.40	6.52	6.26

2.2 ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการเติบโตของเชื้อ *Y* 8662

ค่าความเป็นกรดด่างขึ้นอยู่กับปริมาณไฮโดรเจนอิออนในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีบทบาทสำคัญต่ออัตราการเติบโต กระบวนการเมตาบอลิซึม และองค์ประกอบภายในเซลล์ โดยทั่วไปยีสต์สามารถเติบโตได้ในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 2.7 ถึง 7.0 อย่างไรก็ดี การเลี้ยงเชื้อที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 4.0 จะช่วยลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย (Boze และคณะ, 1992)การเติมสารควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในการทดลองนี้ใช้แคลเซียมคาร์บอเนต เข้มข้น 0.2 นอร์มัล ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 นอร์มัล (Rydin และคณะ, 1990) และแปรผันค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ตามลำดับ ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 12 พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.18, 8.35, 8.58, 8.28 และ 7.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.136, 0.136, 0.140, 0.138 และ 0.135 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยการเติบโต

ของเชื้อจะลดลงเมื่อค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่าหรือสูงขึ้น ดังนั้นจึงควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักที่ 5.0 ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 12 ผลของค่าความเป็นกรดด่างในน้ำหมักต่อการเติบโตของยีสต์ *Y* 8662 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำทิ้ง ในถังหมักที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ *Y* 8662				
	ค่าความเป็นกรดด่าง				
	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
0	0.70	0.72	0.69	0.68	0.70
6	4.01	4.21	4.48	4.19	3.63
12	7.89	7.96	8.25	7.82	7.61
18	8.18	8.35	8.58	8.28	7.98
24	8.10	8.08	8.22	8.11	7.72
30	7.44	7.65	7.56	7.21	7.02
36	6.80	6.82	7.08	6.72	6.31
42	6.52	6.66	6.72	6.32	6.04
48	6.41	6.52	6.68	6.30	6.04

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปและวิจารณ์ผล

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์จากน้ำทิ้งเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมให้สัตว์ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนค่าอาหารสัตว์ และเป็นการบำบัดน้ำทิ้งได้ในขณะเดียวกัน การผลิตมวลชีวภาพของยีสต์โดยยีสต์สายพันธุ์ที่รวบรวมได้ในอาการที่มีน้ำทิ้งเป็นองค์ประกอบ โดยคัดเลือกยีสต์ที่มีสมบัติเหมาะสมมาใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ ทั้งในขวดเขย่าและถังหมัก ในขั้นแรกเป็นการศึกษาการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในขวดเขย่า เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาในถังหมักต่อไป

การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง การวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทิ้ง

ขั้นตอนแรกได้เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อน้ำทิ้งก่อนการบำบัด และวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทิ้ง พบว่าน้ำทิ้งประกอบด้วยไขมัน โปรตีน และน้ำตาล สำหรับการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งทั้ง 10 ครั้ง ณ บริเวณเดียวกัน พบว่าอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำทิ้งค่อนข้างคงที่ โดยอุณหภูมิของน้ำทิ้งอยู่ในช่วง 28 ถึง 31 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่างค่อนข้างเป็นเป็นกรดเล็กน้อย โดยอยู่ในช่วง 5.5 ถึง 6.7 มีค่าบีโอดีและค่าซีโอดีเฉลี่ยเท่ากับ 558 และ 941 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าบีโอดีและค่าซีโอดีของน้ำทิ้งกับน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารอื่นๆ เช่น น้ำทิ้งจากโรงงานน้ำตาลจากหัวบีท มีค่าบีโอดีและค่าซีโอดีเท่ากับ 850 และ 1,150 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำทิ้งจากโรงงานนมและเนย มีค่าบีโอดีเท่ากับ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน มีค่าบีโอดีและค่าซีโอดีเท่ากับ 350 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Abson และ Todhunter, 1967 อ้างถึงใน Bailey และ Ollis, 1986) น้ำทิ้งจากโรงงานสับปะรดกระป๋อง มีค่าซีโอดีอยู่ในช่วง 4,000 ถึง 7,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำทิ้งประมาณ 20 ถึง 50 กรัมต่อลิตร (Chareonsak และคณะ, 1980) ขณะที่น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ที่ใช้ในการวิจัยนี้มี ค่าบีโอดีและค่าซีโอดีค่อนข้างต่ำกว่าอุตสาหกรรมประเภทอื่น แต่ยังไม่ได้มาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้ง จากข้อมูลผลงานวิจัยที่ผ่านมา การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์จากน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ยังมีน้อยมาก ดังนั้นจึงสนใจศึกษาการนำน้ำทิ้งประเภทดังกล่าวมาใช้ในการผลิตมวล

ชีวภาพของยีสต์ ซึ่งอาจนำมวลชีวภาพของยีสต์ใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมโปรตีนและสารอาหารที่จำเป็นในอาหารสัตว์ ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนค่าอาหารสัตว์และเป็นการบำบัดน้ำทิ้งได้ระดับหนึ่ง

การคัดแยกและการรวบรวมสายพันธุ์ยีสต์ที่เติบโตได้ในน้ำทิ้ง เปรียบเทียบการเติบโตและองค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ที่รวบรวมได้

การนำน้ำทิ้งมาคัดแยกยีสต์ที่เติบโตได้ โดยใช้อาหารแข็งที่เตรียมจากน้ำทิ้งและอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งที่เติมแหล่งคาร์บอน สามารถรวบรวมสายพันธุ์ยีสต์ได้ 7 สายพันธุ์ และได้นำสายพันธุ์ยีสต์ทั้งหมดมาศึกษาการเติบโตในอาหารเหลวที่เตรียมจากน้ำทิ้งและอาหารเหลวที่เตรียมจากน้ำทิ้งที่เติมแหล่งคาร์บอนในขวดเขย่า เพื่อนำมาคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีสมบัติเหมาะสมในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ต่อไป สำหรับแหล่งคาร์บอนที่เติมในน้ำทิ้งได้แก่ กลีเซอรอลหรือกลูโคส เนื่องจากต้องการเปรียบเทียบความสามารถของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ในการนำสารดังกล่าวไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Y* 8662, *C* 5045, *C* 5046 และ *N* 0001 เติบโตได้ดีในน้ำทิ้งและน้ำทิ้งเติมกลีเซอรอล โดยยีสต์ *Y* 8662 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ ขณะที่ *S* 0001 เติบโตได้ดีในน้ำทิ้งเติมกลูโคส การเติมสารดังกล่าวในน้ำทิ้งมีผลทำให้การเติบโตของยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์สูงขึ้น จากผลการวิจัยพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ยีสต์สายพันธุ์ *Y* 8662 เติบโตในน้ำทิ้งได้ดีที่สุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 2.58 กรัมต่อลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะ 0.105 ต่อชั่วโมง ค่าสัมประสิทธิ์ของผลผลิตมวลเซลล์เมื่อเทียบกับสับสเตรททั้งหมดที่ใช้ 0.554 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมสับสเตรททั้งหมด ปริมาณโปรตีนรวมภายในเซลล์ 1.60 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือเท่ากับ 62 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (62 เปอร์เซนต์) และมีปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งหมดภายในเซลล์ 10.56 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก ขณะที่ Chareonsak และคณะ (1980) ศึกษาการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของยีสต์จากน้ำทิ้งโรงงานสับปะรดกระป๋อง โดยเชื้อ *S. cerevisiae* และ *C. utilis* ได้ปริมาณโปรตีนรวมภายในเซลล์ 60.60 และ 60.59 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ มีปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งหมดภายในเซลล์ 11.15 และ 10.78 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยทั่วไปกรดนิวคลีอิกทั้งหมดภายในเซลล์ยีสต์จะอยู่ในช่วง 6 ถึง 12 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์และองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยีสต์ที่ใช้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์ไม่ควรมีปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งหมดภายในเซลล์สูง (Burton, 1956 ; Hedenskog และคณะ, 1973 ; Kihlberg, 1972) นอกจากนั้นภายในเซลล์ *Y* 8662 ยังประกอบด้วยชนิดและปริมาณวิตามินรวมทั้งชนิดและปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดภายในเซลล์ครบถ้วนและเหมาะสมต่อการนำไปใช้

เป็นแหล่งอาหารสำหรับสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีไรโบเฟลวิน กรดแพนโตเธนิก ไลซีน เมไธโอนีน และทริปโตเฟนเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์สูง ซึ่งสารอาหารดังกล่าวมีราคาสูง และมีความต้องการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยาและอาหารสัตว์ในปริมาณมาก ในการผลิตอาหารสัตว์จำเป็นต้องเติมสารอาหารเหล่านี้ลงไปเพื่อเป็นอาหารเสริมแทนโปรตีนจากพืช ความต้องการสารอาหารดังกล่าวมีเพิ่มมากขึ้นตลอดเวลา เนื่องจากการขยายตัวของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ (Suomalainen และคณะ, 1971 ; Anna, 1990 ; Reed และ Nagodawithana, 1995) ยีสต์สายพันธุ์ *Y* 8662 สามารถลดค่าบีโอดีและค่าซีโอดีในน้ำทิ้งภายหลังนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ในปริมาณสูงคือ 90.7 และ 88.3 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และมีค่าอยู่ในช่วงมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้ง ตามประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2539)

การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในขวดเขย่า

หลังจากคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ได้แล้ว จึงศึกษาลักษณะการเติบโตในอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อพบว่า *Y* 8662 อยู่ในระยะการพักตัวในช่วงเวลาสั้นๆ โดยเริ่มเข้าสู่ระยะของการเติบโตแบบทวีคูณตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 และเข้าสู่ระยะของการเติบโตแบบคงที่ในชั่วโมงที่ 15 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.75 กรัมต่อลิตร ซึ่งรูปแบบการเติบโตในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อของ *Y* 8662 มีระยะของการเติบโตแบบทวีคูณอยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 6 ถึง 15 จึงเลือกช่วงเวลาการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนำมาคัดเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมในน้ำทิ้ง ซึ่งใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ พบว่าการเติบโตของกล้าเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง อยู่ในระยะการพักตัวในช่วงเวลาสั้นๆ ระยะเวลาในช่วงการพักตัวนี้ ในกระบวนการหมักระดับอุตสาหกรรมต้องทำให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม หลังจากนั้นเชื้อจึงมีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้นโดยลำดับ โดยเริ่มเข้าสู่ระยะของการเติบโตแบบทวีคูณตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นเชื้อจะเติบโตเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็ว จนถึงชั่วโมงที่ 12 เชื้ออยู่ในช่วงท้ายของระยะการเติบโตแบบทวีคูณ ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.62 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ระยะของการเติบโตแบบคงที่ในชั่วโมงที่ 18 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.81 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกกล้าเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง ซึ่งได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.81 กรัมต่อลิตร เป็นอายุกล้าเชื้อในการเตรียมกล้าเชื้อเพื่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ ในการศึกษาต่อไป

การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในถังหมัก

จากผลการศึกษาการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์จากน้ำทิ้ง โดยเชื้อ *Y* 8662 ในขวดเขย่า สรุปได้ดังนี้ อายุกล้าเชื้อ 15 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5 ภายใต้ภาวะดังกล่าวนี้ ในระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 48 ชั่วโมง เชื้อเติบโตได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.48 กรัมต่อลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.125 ต่อชั่วโมง และกำลังการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์เท่ากับ 0.322 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง หลังจากได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในขวดเขย่าแล้ว จึงได้นำภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวใช้เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในถังหมัก โดยปัจจัยต่างๆ ที่ศึกษาได้แก่ การเติบโตและการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในถังหมัก การแปรผันภาวะในการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่าง รวมทั้งหาค่าบีโอดีและค่าซีโอดีในน้ำทิ้งภายหลังนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Y* 8662 ในถังหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับในขวดเขย่า ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ตลอดเวลาการเลี้ยงเชื้อ อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ภายใต้ภาวะดังกล่าวนี้ ในระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เชื้อเติบโตได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.58 กรัมต่อลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.140 ต่อชั่วโมง และกำลังการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์เท่ากับ 0.438 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลการศึกษานี้พบว่า เชื้อมีการเติบโตได้ดีกว่าการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ดวงพร คันธโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์ 24-32 หน้า.

ธงชัย พรรณสุวัสดิ์. 2535. คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย. สมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย (สวสท.)

วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2529. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์ 11-19 หน้า.

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2539. ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 . เทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมเพื่อธุรกิจ. 2(3) : 3-5 หน้า.

ภาษาอังกฤษ

Abson, J.W., and Todhunter, K.H. 1967. Effluent disposal. In Bailey, J.E., and Ollis, D.F. (eds.). Biochemical Engineering Fundamentals. pp. 923-926

Anna, K.K. 1990. Yeast as source of protein. In Yeast & yeast-like organisms. New York:VCH Publishers pp. 391-401.

Association of Official Analytical Chemists. 1975. Official Methods of Analysis. Washington D.C.,U.S.A. pp. 612-613, 621-622.

Bhattacharjee, J.K. 1970. Advanced in Applied Microbiology. 13: pp. 134-159

Boze, H., Moulin, G., and Galzy, P. 1992. Production of food and fodder yeasts. Critical Reviews In Biotechnology. 12 (1/2):65-86

Burton, K. 1956. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the calorimetric estimation of deoxy-ribonucleic acid. Journal of Biochemistry. 62:314-323

Chareonsak, C., Chareonsiri, K., and Vananvat, P. 1980. Protein production by *Candida utilis* from pineapple wastewater. Journal of the National Research Council of Thailand. 12(1):1-24

Chiang, H.C. 1986. Study of treatment and reuse of aquacultural wastewater in Taiwan. Aquacultural Engineering. 5:301-312

Goldberg, I. 1985. Single Cell Protein. Berlin : Springer-Verlag pp. 11-20.

Hedenskog, G., and Mogren, H. 1973. Some methods for processing of single cell protein. Biotechnology and Bioengineering. 15:129-142

Kihlberg, R. 1972. The microbe as a source of food. In Sikuta, B. (ed.). Method in Industrial Microbiology. Chichester : Ellis Horwood Limited pp. 427-466.

Litchfield, J.H. 1979. Production of single cell protein for use in food or feed. In Peppler, H.J., and Perlman, D. (eds.). Microbial Technology. New York : Academic Press 1: pp. 93.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 244:6049-6055

Moo-Young, M., and Gregory, K.F. 1985. Microbial Biomass Protein. U.S.A.: Elsevier Science pp. 12-96.

Moss, M.O., and Smith, J.E. 1977. Industrial Application of Microbiology. London : Surney University Prees pp. 105-149.

Mulchandani, A., Luong, J.H.T., and Groom, C. 1989. Substrate inhibition kinetic for microbial growth and synthesis of poly-β-hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697. Appl. Microbial. Biotechnol. 30:11-17.

Official Publication. 1992. Association of American Feed Control Officals Incoporated. . In Reed, G., and Nagodawithana, T.W. (eds.). Enzymes, Biomass, food and feed. New York:VCH Publishers pp. 167-221.

Peppler, H.J. 1970. Food yeasts. In Pose, A.H., and Harrison, J.S. (eds.). The Yeasts. Vol 3. technology of yeast. New York : Academic Press pp. 421-462.

Reed, G., and Nagodawithana, T.W. 1995. Enzymes, Biomass, food and feed. In Rehm, H.J., and Reed, G. (eds.). Biotechnology. 9: New York:VCH Publishers pp. 167-221.

Rose, A.H. 1979a. History and scientific basic of large-scale production of microbial biomass. In Rose, A.H. (ed.). Economic Microbiology. London : Academic Press pp.1-29.

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

Scrimshaw, N.S., and Young, V.R. 1979. Soy protein in adult human nutrition : A review with new data. In Wilcke, H.K. (ed.). Soy Protein and Human Nutrition . New York : Academic Press pp. 121-148.

Suomalainen, H., and Oura, E. 1971. Yeast nutrition and solute uptake. In Rose, A.H., and Harrison, J.S. (eds.). The Yeasts Physiology and Biochemistry of yeast New York : Academic Press 2: pp. 3-74.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ (Yeast Extract Malt Extract Medium)

1.1 อาหารเหลวสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 ใส่อาหารในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (ภาวะมาตรฐาน)

1.2 อาหารแข็งสำหรับการเลี้ยงเชื้อ และการเก็บรักษาเชื้อ

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 1.1 และเติมวุ้น 20 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน เทใส่จานเพาะเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และปิเปตใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 6 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้สำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งลาดเอียง (agar slant)

2. อาหารสำหรับการคัดแยก และการเติบโตของสายพันธุ์ยีสต์

อาหารสำหรับการคัดแยก และการเติบโตของสายพันธุ์ยีสต์คือ ตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อก่อนการบำบัด นำตัวอย่างน้ำทิ้งมาปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาใช้สำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะแตกต่างตามปัจจัยที่ต้องการศึกษา โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน

2.1 อาหารแข็งสำหรับการคัดแยกฉายพันธุ์ยีสต์จากน้ำทิ้ง 3 สูตร ในจานเพาะเชื้อ

นำน้ำทิ้งปริมาตร 1 ลิตร มาเตรียมอาหารแข็ง 3 สูตร ดังนี้ สูตรแรกคือ น้ำทิ้งเติมวุ้น 20 กรัม สูตรที่ 2 คือ น้ำทิ้งเติมวุ้น 20 กรัม และกลีเซอรอล 20 กรัม และสูตรที่ 3 คือ น้ำทิ้งเติมวุ้น 20 กรัม และกลูโคส 20 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน

2.2 อาหารเหลวสำหรับการคัดแยกฉายพันธุ์ยีสต์จากน้ำทิ้ง 3 สูตร ในขวดเขย่า

นำน้ำทิ้งปริมาตร 1 ลิตร มาเตรียมอาหารเหลว 3 สูตร โดยมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 โดยไม่เติมวุ้นในอาหารทั้ง 3 สูตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 ใส่อาหารแต่ละสูตรปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

1.1 สารละลาย Lowry A ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต	20.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	4.0	กรัม
โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรท	0.2	กรัม

1.2 สารละลาย Lowry B ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ประกอบด้วย

คอปเปอร์ซัลเฟต	0.5	กรัม

1.3 สารละลาย Lowry C เตรียมจากการผสมสารละลาย Lowry A และสารละลาย Lowry B ในอัตราส่วน 50 ต่อ 1

1.4 สารละลาย Lowry D เตรียมจากการผสมสารละลายฟีนอล และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยเตรียมก่อนการใช้

2. การเตรียมสารละลายในการวิเคราะห์หาค่าบีโอดีและค่าซีโอดี

2.1 สารละลายแมงกานีสซัลเฟต เตรียมจากการละลายแมงกานีสซัลเฟตเตตราไฮเดรต 480 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต 400 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 364 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

2.2 อัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ รีเอเจนท์ เตรียมจากการละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 กรัม และโซเดียมไอโอไดด์ 135 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เติมโซเดียมเอไซด์ 10 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตร

2.3 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต (0.0021 โมลต่อลิตร) เตรียมจากการละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตปริมาร 6.205 กรัม ในน้ำกลั่นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 6 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร สารละลายนี้ต้องนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยสารละลายมาตรฐานไบไอโอเดรท ซึ่งเตรียมจากการละลายโปแตสเซียมไฮโดรเจนไบไอโอเดรท ปริมาณ 812.4 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต

ละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ปริมาณ 2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ถึง 150 มิลลิลิตร ในขวดทดลองรูปกรวย เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2-3 หยด และสารละลายมาตรฐานไบไอโอเดรทปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วทำให้เจือจางเป็น 200 มิลลิลิตร ไทเทรตไอโอดีนซึ่งถูกขับออกมาด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟตที่เตรียมไว้เติมน้ำแป้งเมื่อใกล้จะถึงจุดยุติ สังเกตจากสีของสารละลายมีสีเหลืองอ่อน ถ้าสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต มีความเข้มข้น 0.0021 โมลต่อลิตร ปริมาตรที่ใช้ในการไทเทรตจะเท่ากับ 20 มิลลิลิตร ถ้าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟตไม่ได้ค่าดังกล่าว ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 0.0021 โมลต่อลิตร

2.4 สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต เตรียมจากการละลายแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ปริมาณ 22.5 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

2.5 สารละลายโซเดียมซัลไฟด์ (0.0125 โมลต่อลิตร) เตรียมจากการละลายแอนไฮดรัสโซเดียมซัลไฟด์ ปริมาณ 1.575 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

2.6 สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต (0.0417 โมลต่อลิตร) เตรียมจากการละลายโปแตสเซียมไดโครเมต ซึ่งอบให้แห้งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปริมาณ 12.259 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

2.7 สารละลายเฟอโรอินอินดิเคเตอร์ เตรียมจากการละลาย 1,10-ฟีแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต 1.485 กรัม และไอร์ออน (II) ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.695 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.8 สารละลายมาตรฐานไอร์ออน (II) แอมโมเนียมซัลเฟตไทแทรนท์ (0.25 โมลต่อลิตร) เตรียมจากการละลายไอร์ออน (II) แอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 98 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร สารละลายนี้ต้องนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอน ด้วยสารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต

การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไอร์ออน (II) แอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 30 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วนำมาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานไอร์ออน (II) แอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้สารละลายเฟอโรอินปริมาตร 0.10-0.15 มิลลิลิตร (2-3 หยด) เป็นอินดิเคเตอร์

คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไอร์ออน(II)แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นโมลต่อลิตร

เท่ากับ $\frac{\text{ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต (มิลลิลิตร)} \times 0.25}{\text{ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานไอร์ออน (II) แอมโมเนียมซัลเฟต (มิลลิลิตร)}}$

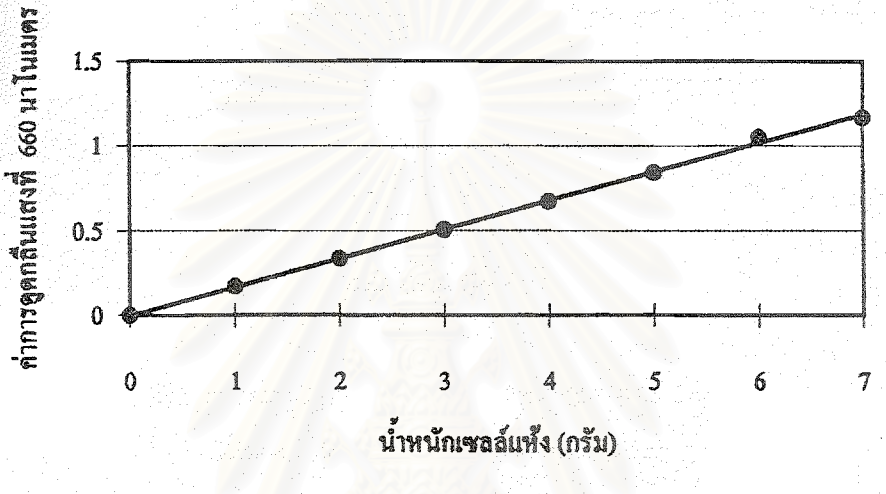
3. สารละลายออซินอล เตรียมจากการละลายออซินอล ปริมาณ 1 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 100 มิลลิลิตร และเติมเปอร์คลอไรค์ ปริมาณ 0.5 กรัม

4. สารละลายไดฟีนิลลามีน เตรียมจากการละลายไดฟีนิลลามีน ปริมาณ 1 กรัม ใน กรดอะซิติกปริมาตร 100 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.75 มิลลิลิตร

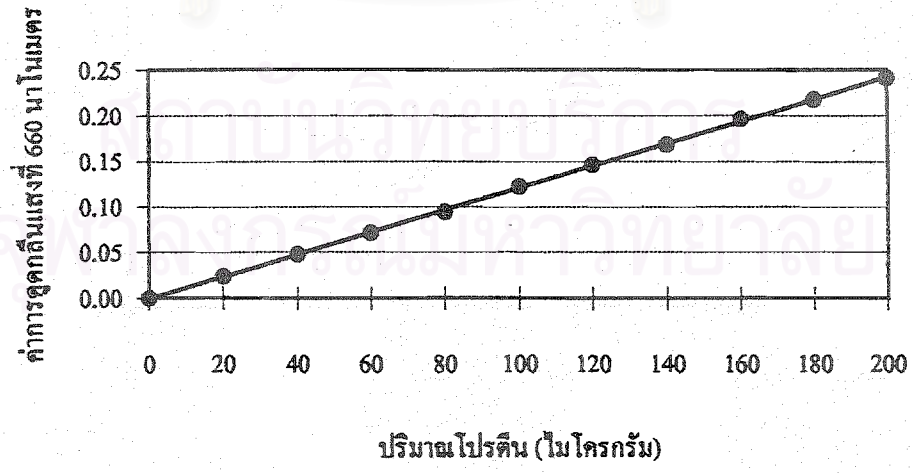
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

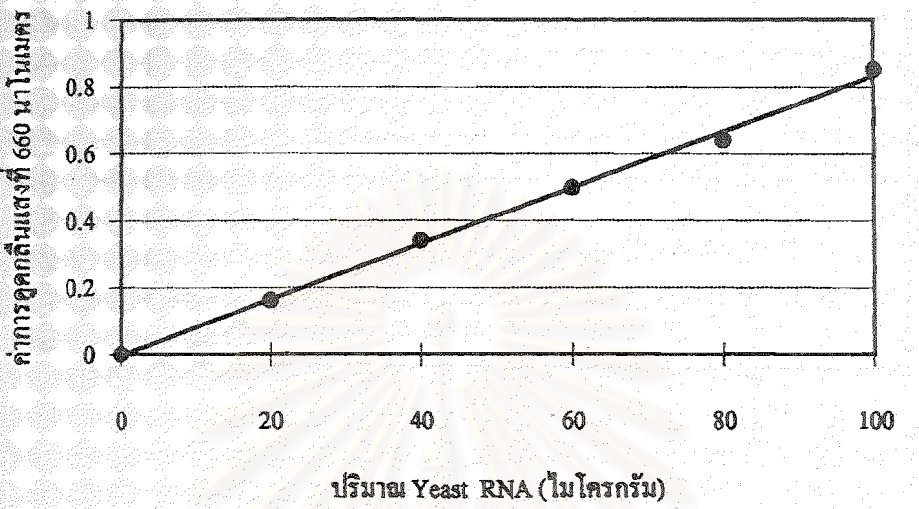
กราฟมาตรฐาน



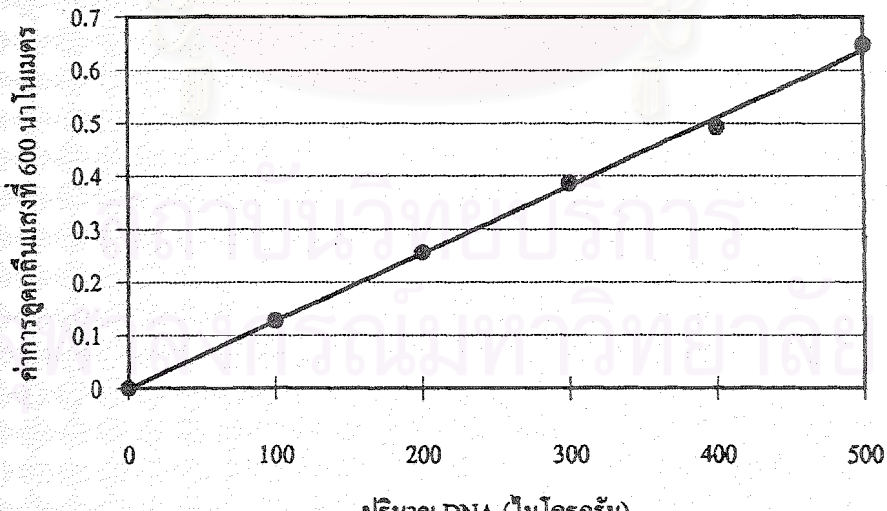
รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของ Y 8662
(ความชันเท่ากับ 0.153)



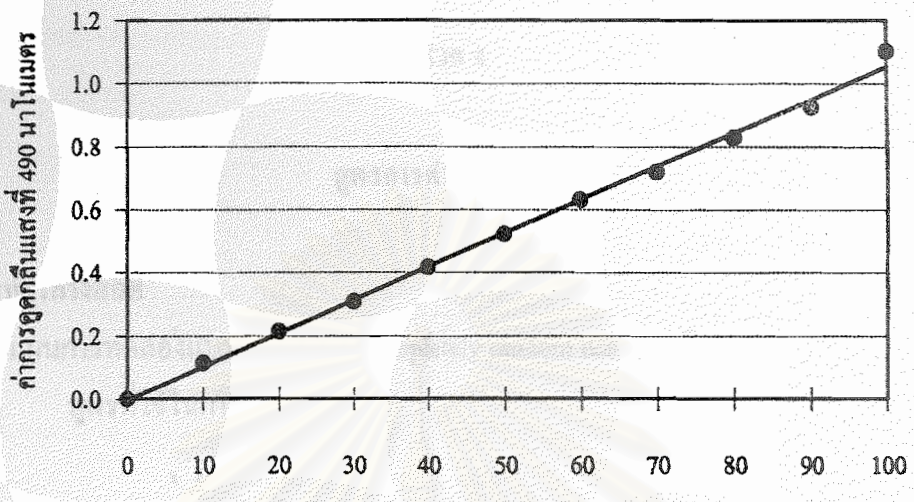
รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (1951)
(ความชันเท่ากับ 1.188x10-3)



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ RNA ด้วยวิธี Orcinol (Kihlberg ,1972) (ความชันเท่ากับ 8.33x10-3)



รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ DNA ด้วยวิธี Diphenylamine (Burton, 1956) (ความชันเท่ากับ 1.275x10-3)



รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulphuric method (ความชันเท่ากับ 1.07×10^{-2})

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

สูตรการคำนวณ

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

1. แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely random design หรือ CRD)

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$SST = \sum_{i=1}^{k}\sum_{j=1}^{n} X_{ij}^2 - \frac{X_{..}^2}{kn}$$

$$SSA = \sum_{I=1}^{k} \frac{X_{j.}^2}{n} - \frac{X_{..}^2}{kn}$$

$$SSE = SST - SSA$$

โดยที่ SST = total sum of squares

SSA = sum squares of treatments

SSE = sum squares of error

X = ค่าสังเกต

n = จำนวนซ้ำ

k = จำนวนชุดทดลอง

แล้วนำผลที่ได้มาเขียนลงในตาราง เรียกว่า ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ดังนี้

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

Source of Variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean Squares	F
Treatments	k - 1	SSA	MSA=SSA/(k-1)	MSA/MSE
Error	k(n - 1)	SSE	MSE=SSE/k(n-1)	
Total	nk - 1	SST		

เปรียบเทียบค่า F ที่ได้กับค่า F ในตารางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01

2. แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดที่เป็นแฟคตอเรียลแบบ 2 ปัจจัย

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$SST = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{n} X^2_{ijk} - \frac{X^2_{...}}{abn}$$

$$SSA = \sum_{i=1}^{a} \frac{X^2_{i..}}{bn} - \frac{X^2_{...}}{abn}$$

$$SSB = \sum_{j=1}^{b} \frac{X^2_{.j.}}{an} - \frac{X^2_{...}}{abn}$$

$$SS(AB) = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} \frac{X^2_{ij.}}{n} - \frac{X^2_{...}}{abn} - SSA - SSB$$

$$SSE = SST - SSA - SSB - SS(AB)$$

โดย SSA และ SSB คือค่าผลบวกของกำลังสอง สำหรับปัจจัยหลัก (main effect) A และ B ตามลำดับ

SS(AB) คือ interaction sum of squares ของ A และ B

a = จำนวนระดับของปัจจัย A

b = จำนวนระดับของปัจจัย B

n = จำนวนซ้ำในแต่ละ $a_i b_j$

X = ค่าสังเกต

แล้วนำผลที่ได้มาเขียนลงในตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ดังนี้

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดที่เป็นแฟคตอเรียลแบบ 2 ปัจจัย

Source of Variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean Squares	F
Treatments	ab-1			
A	a-1	SSA	MSA	MSA/MSE
B	b-1	SSB	MSB	MSB/MSE
AB	(a-1)(b-1)	SS(AB)	MS(AB)	MS(AB)/MSE
Error	ab(n-1)	SSE	MSE	
Total	abn-1	SST		

เปรียบเทียบค่า F ที่ได้กับค่า F ในตารางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย