อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตชีวมวลของ *Geotrichum candidum* จากน้ำเสีย เพื่อใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียว

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 29 ส.ค. 2554
เลขทะเบียน 1561041
เลขเรียกหนังสือ ว TP
248
.65
.S56
ว394ด
2553

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ และคณะ

กรกฎาคม 2553

สัญญาเลขที่ MS-AR-033/2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตชีวมวลของ *Geotrichum candidum* จากน้ำเสีย เพื่อใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียว

คณะผู้วิจัยสังกัด

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ
2. รองศาสตราจารย์ ดร.ดาวัลย์ ฉิมภู่
3. นางสาว ศิรินทิพย์ แก้วลำยวง

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

ชื่อเรื่อง	การผลิตชีวมวลของ *Geotrichum candidum* จากน้ำเสียเพื่อใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียว
หัวหน้าโครงการวิจัย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ
คำสำคัญ	*Geotrichum candidum*, โปรตีนเซลล์เดียว, น้ำเสีย

บทคัดย่อ

น้ำเสียจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ พบสารอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์และเอสเทอร์ เป็นองค์ประกอบ สารอินทรีย์ดังกล่าว *Geotrichum candidum* สายพันธุ์ที่แยกจากดินป่าไม้ของอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญ จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวในน้ำเสียของกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์เพื่อผลิตชีวมวลที่ใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียวผสมในอาหารสัตว์ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลในฟลาสก์รูปกรวยบาฟเฟิลขนาด 500 มิลลิลิตร คือ เพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่เจือจางด้วยน้ำประปาในอัตราส่วน 1:0 ปรับพีเอชเป็น 6.0 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 7.3 กรัมต่อลิตร พบปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.2 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยใช้อาหารชนิดเดียวกัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวล คือ อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 8.2 กรัมต่อลิตร พบปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.37 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้อาหารชนิดเดียวกัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวล คือ อัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 vvm ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ชีวมวลสูงเท่ากับ 9.2 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.42 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

Title	Biomass Production of *Geotrichum candidum* from Wastewater for Using as Single Cell Protein
Project Leader	Assistant Professor Tawatchai Sumpradit, Ph.D.
Keywords	*Geotrichum candidum*, Single cell protein, Wastewater

ABSTRACT

Yeast extract manufacturing wastewater contains various kinds of organic compounds, such as alcohols, organic acids and esters, which were assimilated as sole sources of carbon and energy by *Geotrichum candidum* isolated from forest soils of Nam Nao National Park. Based on results obtained, the optimum condition for *G. candidum* biomass production in 500 ml of baffled flask was cultivation of yeast strain in undiluted yeast extract manufacturing wastewater which was adjusted pH to 6.0, and incubated on incubator shaker at 200 rpm and at 35 °C. Yeast biomass obtained was 7.3 g/l and its protein content was 0.2 g/g cell dry weight. The optimum condition for biomass production in 1l of fermentor was cultivation of the yeast in undiluted wastewater with agitation rate at 200 rpm, aeration rate at 1 vvm and at 35 °C. Biomass of *G. candidum* produced was 8.2 g/l. The content of protein in yeast cells was 0.37 g/g cell dry weight. For biomass production in 10l of fermentor, the optimum condition was yeast cultivation in undiluted wastewater which were operated agitation rate at 220 rpm, aeration rate at 1.2 vvm and at 35 °C. The *G. candidum* biomass obtained was 9.2 g/l and its protein content was 0.42 g/g cell dry weight.

ตาราง 1 อัตราการสร้างโปรตีนของสิ่งมีชีวิต

สิ่งมีชีวิต (1,000 kg)	ผลผลิตโปรตีน (kg/day)	Daily yield (%)
Beef cattle	1	0.1
Soya	10	1
Yeast	10^5	10^4
Bacteria	10^{11}	10^{10}

1. จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนเซลล์เดียว

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนเซลล์เดียว คือ แบคทีเรีย ยีสต์ รา และสาหร่าย (ตาราง 2) จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบของเซลล์ในปริมาณที่ต่างกัน โดยทั่วไปพบว่า เซลล์ยีสต์และรามีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 31-55 เปอร์เซ็นต์ ต่างจากเซลล์แบคทีเรียบางชนิดที่พบโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูงถึง 83 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีของสาหร่ายที่ปัจจุบันใช้เป็นอาหารของมนุษย์เป็นส่วนใหญ่พบโปรตีนเป็นองค์ประกอบของเซลล์ 47-63 เปอร์เซ็นต์ (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547, หน้า 54) อย่างไรก็ตามการใช้เซลล์จุลินทรีย์เป็นแหล่งของโปรตีนเซลล์เดียวนอกจากปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบของเซลล์แล้ว ต้องพิจารณาคุณสมบัติอื่นเป็นองค์ประกอบด้วย เช่น ปริมาณกรดนิวคลีอิกที่พบในเซลล์ สารพิษจากเซลล์จุลินทรีย์ และความต้องการสารอาหารของจุลินทรีย์ กระบวนการเพาะเลี้ยงและสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง และลักษณะทางกายภาพของโปรตีนเซลล์เดียว เป็นต้น (Anupama and Ravindra, 2000, pp. 459-479)

ตาราง 2 ชนิดของแบคทีเรีย ยีสต์ รา และสาหร่ายที่ใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียว

จุลินทรีย์	ชนิด
แบคทีเรีย	*Cellulomonas* sp.
	Alcaligenes sp.
	Methylophilus methylotrophus
	Methylococcus capsulatus
	Brevibacterium sp.
	Methanomonas methanica

ตาราง 2 (ต่อ)

จุลินทรีย์	ชนิด
สาหร่าย	*Scenedesmus acutus*
	Spirulina maxima
	Caulerpa rocemosa
	Durvillea antartica
	Rhodomenia palmata
	Porphyra tenera
	Chlorella salina
ยีสต์	*Candida tropicalis*
	Candida utilis
	Candida lipolytica
	Kluyveromyces fragilis
	Kluyveromyces marxianus
	Saccharomyces cerevisiae
รา	*Cephalosporium eichorniae*
	Paecilomyces varioti
	Penicilomyces cyclopium
	Chaetomium cellulolyticum

ที่มา: Anderson and Jack, 1957, pp. 369-373; Bhattacharjee, 1970, pp. 139-169

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีอัตราการเจริญและปริมาณโปรตีนสูง นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นคือ methionine, tryptophan และ cystine ภายในเซลล์ ซึ่งพบน้อยในราและยีสต์ แบคทีเรียมีข้อเสียในแง่ที่มีขนาดเล็กเก็บเกี่ยวได้ยากและง่ายต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยแบคทีเรียที่นิยมนำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้แก่

Corynebacterium sp., *Rhodopseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Methylomonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น (Vrati, 2004, pp. 199-202; Honda, Fukushi, and Yamamoto, 2006, pp. 565-573)

ราเป็นจุลินทรีย์ที่มีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่ายีสต์และแบคทีเรียมาก (ตาราง 3) อีกทั้งปัญหา จากเส้นใยในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งจะทำให้เส้นใยจับกันเป็นกลุ่มก้อนทำให้เกิดปัญหาในการให้ออกซิเจนแก่เซลล์ และเส้นใยยังเจริญและเกาะติดในถังหมักซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการทำความสะอาด โดยส่วนประกอบของกรดอะมิโนในเชื้อราจะมีปริมาณกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ (Sulfur amino acid) และวิตามินบีในระดับต่ำ ดังนั้นการใช้เชื้อราเป็นอาหารสัตว์จึงจำเป็นต้องมีการเติมสารอาหาร และวิตามินบีชนิดต่างๆ ลงไปด้วย เชื้อราที่นิยมใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้แก่*Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Fusarium* sp. และ *Rhizopus* sp. เป็นต้น (Gabriel et al., 1981, pp. 229-240; Zayed, and Mostafa, 1992, pp. 363-367; Scerra, et al., 1999, pp. 169-176; Chiou, Chiu, and Chen, 2001, pp. 171-182)

สาหร่ายพบโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 50 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม และมีวิตามินซีและบีรวมสูง สามารถเพาะเลี้ยงง่ายเนื่องจากใช้พลังงานแสงอาทิตย์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน อาหารที่ใช้เลี้ยงมีเพียงเกลืออนินทรีย์เท่านั้น ทนทานต่อการปนเปื้อนและสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ง่าย แต่สาหร่ายมีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ มีการตกตะกอนของเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง และโปรตีนในสาหร่ายมีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบต่ำ อีกทั้งยังมีกลิ่นรสที่ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค รวมถึงปัญหาของการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และแสงสว่างในถังหมัก สาหร่ายที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวเช่น *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Spirulina* sp., *Uronema* sp., *Dunaliella* sp. เป็นต้น (Ogbonda, Aminigo, and Abu, 2007, pp. 2207–2211; Colla et al., 2007, pp. 1489–1493)

2. คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549, หน้า 302 กำหนดคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียวในอาหารคนและสัตว์ ดังนี้

2.1 เจริญได้เร็วในอาหารที่มีราคาถูก ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่าย และมีปริมาณมากในแต่ละท้องถิ่น

2.2 เจริญได้ดีในอาหารที่มีส่วนประกอบง่าย มีความต้องการวิตามินและสารส่งเสริมการเจริญชนิดต่างๆน้อย หรือไม่ต้องการเลย

2.3 มีความคงตัวทางพันธุกรรม ไม่กลายพันธุ์ง่ายเมื่อเลี้ยงติดต่อกันเป็นเวลานาน

2.4 การแยกและเก็บเกี่ยวเซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยงทำได้ง่าย

2.5 มีความต้านทานต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ

2.6 ทราบคุณสมบัติทางพันธุกรรม สรีรวิทยา และสามารถปรับปรุงพันธุกรรมได้ง่าย

2.7 ใช้แหล่งอาหารและพลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.8 หลังจากเพาะเลี้ยง มีวัสดุเหลือทิ้งน้อยหรือไม่มีเลย

2.9 ไม่เป็นพิษและทำให้เกิดอาการภูมิแพ้

2.10 ให้ปริมาณโปรตีนสูง และมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของมนุษย์และสัตว์

2.11 เก็บรักษาได้ง่ายและนาน

ในอนาคตโปรตีนเซลล์เดียวเป็นแหล่งโปรตีนทางเลือกของมนุษย์และสัตว์ที่สำคัญ เนื่องจากมีราคาถูก สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบที่หาได้ง่าย ระยะเวลาเพาะเลี้ยงสั้น เนื่องจากจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูงเมื่อเทียบกับพืชและสัตว์ นอกจากนี้จุลินทรีย์ใช้เนื้อที่น้อยในการเพาะเลี้ยง โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้ถังหมัก เซลล์จุลินทรีย์มีปริมาณโปรตีนสูง พบชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของสัตว์สูงกว่าโปรตีนจากพืช (Anupama and Ravindra, 2000, pp. 459-479)

ตาราง 4 องค์ประกอบของโปรตีนเซลล์เดียวจากสาหร่าย เชื้อรา และแบคทีเรีย

องค์ประกอบ	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)		
	สาหร่าย	เชื้อรา	แบคทีเรีย
โปรตีน	40-60[a]	30-70[a]	50-83[a]
ไนโตรเจนทั้งหมด	45-65[a]	35-50[a]	60-80[a]
ไลซีน	4.6-7[a]	6.5-7.8[a]	4.3-5.8[a]
เมธไทโอนิน	1.4-2.6[a]	1.5-1.8[a]	2.2-3[a]
ไขมัน	5-10[a]	5-13[a]	8-10[a]
คาร์โบไฮเดรต	9	NA	NA
กรดนิวคลีอิก	4-6[a]	9.7	15-16[a]
แร่ธาตุ	7	6.6	8.6
กรดอะมิโน	NA	54	65
เถ้า	3	NA	NA
ความชื้น	6	4.5-6[a]	2.8
เส้นใย	3	NA	NA

ที่มา: Powar and Daginawala, 1995, pp. 88-131; Ziino et al., 1999, pp. 7-11

หมายเหตุ: NA ไม่มีข้อมูล

[a] เปอร์เซ็นต์ที่พบแตกต่างกันตามชนิดของวัตถุดิบที่ใช้เพาะเลี้ยง ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง

ยีสต์ที่ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว และกระบวนการผลิต

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย เพื่อใช้ผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวทดแทนโปรตีนจากพืชและสัตว์ (ตาราง 5) ยีสต์มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นแหล่งโปรตีนของมนุษย์และสัตว์ เนื่องจากเพาะเลี้ยงได้ง่าย มีอัตราการเจริญสูงกว่าราและสาหร่าย เซลล์ยีสต์พบปริมาณกรดนิวคลีอิกน้อยกว่าเซลล์แบคทีเรีย ขั้นตอนเก็บเกี่ยวเซลล์ทำได้ง่ายกว่าราเส้นใย รวมทั้งไม่พบการสร้างสารพิษบางชนิด เช่น aflatoxin, citrinin, trichothecenes, zearalanone, ergotamine และ ochratoxins ซึ่งพบในเซลล์ของราที่ใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียว นอกจากนี้เซลล์ยีสต์

ประกอบด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันปริมาณสูง นอกจากนี้เซลล์ยีสต์มีวิตามินบีในปริมาณสูงมากกว่าโปรตีนเซลล์เดียวจากจุลินทรีย์กลุ่มอื่น (Bennett and Keller, 1997, pp. 265-273; Kerkadi et al., 1998, pp. 231-250; Varga et al., 1996, pp. 4461-4464.; Ziino et al., 1999, pp. 7-11) นอกจากคุณสมบัติที่กล่าวมาข้างต้น สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547, หน้า 54 อธิบายถึงคุณสมบัติอื่นที่เป็นจุดเด่น และดีของยีสต์ที่ใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียว คือ

1. ยีสต์สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อน มีความต้องการวิตามิน และธาตุอาหารอื่นน้อย

2. เซลล์ยีสต์เมื่อเจริญสามารถคลุกเคล้ากับอาหารเพาะเลี้ยงได้ดี เซลล์ยีสต์มีขนาดใหญ่แยกออกจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงได้ง่าย

3. ยีสต์สามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของไวรัส และเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนอื่น เนื่องจากยีสต์สามารถเจริญได้ดีที่พีเอชประมาณ 3.5-5.0 จึงป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ดี ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงยีสต์ได้ทั้งในระบบที่ปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ

4. ยีสต์มีความคงตัวสูงต่อการหมัก เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้พลังงานจากสารอาหารที่เพาะเลี้ยงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้สามารถใช้ยีสต์ในกระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวในระดับอุตสาหกรรมได้ดี

5. ยีสต์มีลักษณะของกลิ่นรสที่ดี ไม่เป็นพิษ และสามารถถูกย่อยได้ง่าย

6. เซลล์ยีสต์มีองค์ประกอบของโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และเกลือแร่ในปริมาณสูง รวมถึงพบวิตามินและกรดอะมิโนที่สำคัญหลายชนิดภายในเซลล์

7. การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ให้มีคุณสมบัติที่ดีตามต้องการทำได้ง่าย

8. หลังจากกระบวนการผลิต มีวัสดุเหลือทิ้งน้อยมาก

ตาราง 5 สกุลและชนิดของยีสต์ที่ใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียว

สกุล	ชนิด	เอกสารอ้างอิง
Candida	*C. utilis*	Gelinas and Barrette, 2007, pp. 1138-1143
	C. tropicalis	Taniguchi , et al., 1982, pp. 74-80
Trichosporon	*T. cutaneum*	Taniguchi , et al., 1982, pp. 74-80
Schwanniomyces	*S. castellii*	Hongpattarakere and Kittikun, 1995, pp. 607-609
	S. alluvius	Calleja, et al. 1968, pp. 71-75
Kluyveromyces	*K. marxianus*	Schultz et al., 2006, pp. 515–520
	S. cerevisiae	Boez, Moulin, and Galzy, 1994, pp. 65-86

สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549, หน้า 541 กล่าวว่า เซลล์ยีสต์มีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงได้รับความสนใจในการใช้เป็นอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น วัว ม้า สัตว์กระเพาะเดี่ยว เช่น สุกร สัตว์ปีก เช่น ไก่ ตลอดจนสัตว์เลี้ยงในบ้าน เช่น สุนัข เป็นต้น (Reed and Nagodawithana, 1991, pp. 124-186)

Association of America Feed Control Office (AAFCO) แบ่งชนิดยีสต์ที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ออกเป็น 8 ชนิด (Pepper and Stone, 1976, pp.17-18) คือ

1. ยีสต์แห้ง (Dried yeast) เป็นยีสต์ที่ถูกเพาะเลี้ยง แยกเซลล์ และทำให้แห้งเพื่อเป็นอาหารสัตว์โดยเฉพาะ แต่ความนิยมในการใช้ยีสต์ชนิดนี้เป็นอาหารสัตว์มีไม่มากนัก เนื่องจากมีราคาแพง ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ประกอบด้วยเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้ว ไม่มีกิจกรรมการหมัก และพบโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่ผลิตโดยใช้ยีสต์สกุล *Saccharomyces*

2. ยีสต์แห้งว่องไว (Active dried yeast) เป็นผลิตภัณฑ์ในรูปเซลล์ยีสต์ที่ยังคงมีกิจกรรมการหมัก ประกอบด้วยเซลล์ยีสต์มีชีวิตประมาณ 15×10^{9} เซลล์ต่อกรัม ผลิตโดยใช้ยีสต์หลายสกุล แต่ส่วนใหญ่ใช้ยีสต์สกุล *Saccharomyces* ปริมาณโปรตีนมาตรฐานไม่ได้กำหนดแน่นอน มีราคาแพง และอาจขายในรูปของยีสต์อาหารสัตว์ หรือใช้สำหรับผลิตยีสต์คัลเจอร์ (yeast culture)

3. ยีสต์แห้งฉายรังสี (Irradiated dried yeast) ใช้กันมากในระยะหลายทศวรรษที่ผ่านมา โดยเป็นอาหารสัตว์ที่มีวิตามินดี 2 ค่อนข้างสูง

4. บริวเวอร์ยีสต์แห้ง (Brewer's dried yeast) ได้จากการนำเซลล์ยีสต์ที่ผลิตเบียร์มาทำแห้ง ไม่มีกิจกรรมการหมักเนื่องจากไม่มีเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต พบปริมาณโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์

5. ยีสต์แห้งจากการผลิตสุรากลั่นโดยใช้ธัญพืชเป็นวัตถุดิบ (Grain distiller's dried yeast) ยีสต์อาหารสัตว์ชนิดนี้ไม่มีกิจกรรมการหมัก เป็นผลิตภัณฑ์ของยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* ที่ใช้ในกระบวนการผลิตสุรากลั่นชนิดต่างๆ ซึ่งใช้ธัญพืชเป็นวัตถุดิบ พบปริมาณโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์

6. ยีสต์แห้งจากการผลิตสุรากลั่นโดยใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ (Molasses distiller's dried yeast) ยีสต์อาหารสัตว์ชนิดนี้มีลักษณะเหมือนยีสต์แห้งจากการผลิตสุรากลั่นโดยใช้ธัญพืชเป็นวัตถุดิบ คือ ไม่มีกิจกรรมการหมัก ใช้ยีสต์สกุล *Saccharomyces* ในกระบวนการผลิตสุรากลั่นจากกากน้ำตาล

7. โทรูลายีสต์แห้ง (Torula dried yeast) ยีสต์แห้งชนิดนี้ไม่มีกิจกรรมการหมัก ใช้ยีสต์ในสกุล *Candida* พบปริมาณโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ และมีคุณค่าทางอาหารเท่ากับบริวเวอร์สยีสต์แห้ง

8. ยีสต์คัลเจอร์ (Yeast culture) ใช้ยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* พบปริมาณโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์คัลเจอร์เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะจำเพาะ มีลักษณะแห้ง ประกอบด้วยยีสต์และอาหารที่ใช้เลี้ยง วิธีการทำแห้งที่ใช้มีผลให้ความสามารถในการหมักของยีสต์ยังคงอยู่ ผลิตภัณฑ์ประเภทนี้บนฉลากต้องระบุชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงยีสต์นั้น การผลิตยีสต์คัลเจอร์อาจทำได้โดยการเลี้ยงยีสต์ในสับสเตรทที่เป็นกากน้ำตาลหรือธัญพืชหรือทั้งสองอย่าง ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ จากนั้นนำไปทำแห้งจนถึงระดับที่ต้องการโดยใช้อุณหภูมิค่อนข้างต่ำ ซึ่งไม่ทำลายเอนไซม์และวิตามินบีของยีสต์ ตลอดจนผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมักอื่นที่สามารถถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน

ตัวอย่างงานวิจัยที่เพาะเลี้ยงยีสต์ในวัตถุดิบต่างๆ เพื่อผลิตเป็นชีวมวลที่ใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียว เช่น

Calleja et al., 1986, pp. 71-75 ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากแป้งมันฝรั่งโดยยีสต์ *S. alluvius* พบว่าที่ความเข้มข้นของแป้งมันฝรั่ง 4 เปอร์เซ็นต์ ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.51 กรัมต่อ 1 กรัมแป้ง และให้โปรตีนเท่ากับ 52.75 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง

Jamuna, and Ramakrishna, 1989, pp. 126-131 ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวและการกำจัดสารอินทรีย์ตกค้างในของเสียจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังโดยการใช้ยีสต์ *Candida tropicalis, Schwanniomyces occidentalis, Torulopsis wickerham, Endomycopsis*

*fibuliger*a และ *C. utilis* ด้วยการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์จากความสามารถในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวที่ได้จากค่ามวลชีวภาพและความสามารถในการลดค่า Chemical Oxygen Demand (COD) พบว่าในสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์แบบเดี่ยว ยีสต์ *C. tropicalis* ให้ผลผลิตโปรตีนเซลล์เดียวสูงเป็น 4 เท่าและสามารถลดค่า COD ได้ถึง 50% และในส่วนของการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบผสม พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบผสมสามารถลดค่า COD ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยว และให้ปริมาณโปรตีนเซลล์เดียวเพิ่มขึ้น สำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบผสมจะทำได้ดีในถังปฏิกรณ์ที่มีการควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงที่แน่นอน

Chanda and Chakrabarti, 1996, pp. 51-54 เพาะเลี้ยง *S. cerevisiae*, *C. utilis* และ *C. lipolytica* ในน้ำเสียของการหมักหัวผักกาดขาว หัวผักกาดแดง และกะหล่ำดอก พบว่า ชีวมวลที่ได้มีปริมาณโปรตีนและวิตามินสูง

Hang and Hang, 2003, pp. 305-307 เพาะเลี้ยง *C. utilis* ในน้ำเสียจากการหมักกะหล่ำปลี พบว่า *C. utilis* สามารถใช้กรดอินทรีย์จากน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานภายใน 36 ชั่วโมง ลดค่าบีโอดีของน้ำเสียลง 60 เปอร์เซ็นต์ และชีวมวลที่ได้มีปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนจำเป็นค่อนข้างสูง นอกจากนี้คณะผู้วิจัยศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจาก *K. marxianus* โดยเพาะเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวในน้ำหมักไซเลตของข้าวโพด ซึ่งมีกรดอะซิติก กรดแลกติก เอทานอล กลูโคสและมอลโทสเข้มข้นสูง พีเอชของน้ำหมักเท่ากับ 3.6 ผลการทดลองพบว่า ได้ชีวมวล 13.3 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลผลิตต่อหน่วยเวลา (volumetric productivity) เท่ากับ 0.28 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Yang et al., 2005, pp. 2483-2488 เพาะเลี้ยง *C. halophila* และ *Rh. glutinis* ในน้ำเสียของโรงงานผลิตผงชูรส ได้ชีวมวลปริมาณสูงจากการเพาะเลี้ยง และสามารถลดค่าซีโอดีของน้ำเสียได้ 95 เปอร์เซ็นต์

Ziino et al., 1999, pp. 7-11 เพาะเลี้ยง *Geotricum candidum* บนเปลือกส้มเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวที่มีปริมาณโปรตีนสูงและไขมันต่ำ เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ พบว่ามีปริมาณโปรตีนและไขมัน 42 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากยีสต์

การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากยีสต์เพื่อให้ได้ผลผลิตสูง ต้องเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งฟอสฟอรัส ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ เป็นต้น โดยที่เซลล์ยีสต์สามารถนำสารอาหาร

ดังกล่าวไปใช้ในการเจริญเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ และได้ปริมาณชีวมวลที่ใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียว (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547, หน้า 56; สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549, หน้า 236) ดังสมการ คือ

คาร์บอน + ไนโตรเจน + เกลือแร่ + ออกซิเจน ⟶ โปรตีนเซลล์เดียว +คาร์บอนไดออกไซด์ + น้ำ + พลังงานความร้อน

1. แหล่งคาร์บอนและพลังงาน

ยีสต์ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและปราศจากออกซิเจน ยีสต์ส่วนมากใช้น้ำตาลที่สามารถแอสสิมิเลทและหมัก เช่น ดี-กลูโคส (D-glucose), ดี-ฟรุคโตส (D-fructose) และ ดี-แมนโนส (D-mannose) ได้ดี ยีสต์บางชนิดสามารถใช้แป้ง เช่น *Endomycopsis fibuligera* ยีสต์บางชนิดใช้อินูลิน (inulin) เช่น *K. fragilis* บางชนิดใช้น้ำตาลเพนโตส เช่น *C. utilis* นอกจากนี้ยีสต์บางชนิดใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เช่น *C. tropicalis* (Forage, 1979, p. 289)

2. ปริมาณออกซิเจน

ยีสต์จัดเป็น facultative anaerobes คือ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยสภาวะที่มีออกซิเจน ยีสต์สามารถออกซิไดซ์แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้เป็นพลังงานในรูปของ ATP คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ทำให้ปริมาณเซลล์หรือชีวมวลที่ได้รับจากการเจริญต่อหน่วยวัตถุดิบที่ใช้สูง เนื่องจากมีปริมาณ ATP มาก ทำให้วิถีชีวสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ แต่ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เมตาบอลิซึมของยีสต์มีความแตกต่างจากสภาวะที่มีออกซิเจน คือ วิถีเมตาบอลิซึมที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เป็นวิถีการหมัก พลังงานในรูปของ ATP เกิดขึ้นน้อย แต่มีการสะสมของสารอินทรีย์ที่เป็นเมตาบอไลซ์บางชนิด เช่น เอทานอล ทำให้ชีวมวลที่ได้รับจากการเจริญต่อหน่วยวัตถุดิบที่ใช้มีปริมาณต่ำ (Grba, Vesna, and Stanzer, 1998, pp. 24–32; Schultz et al., 2006, pp. 515-520; Zafar and Owais, 2006, pp. 295-298)

3. อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากยีสต์ในระดับอุตสาหกรรม คือ 28-35 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของยีสต์ หากอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึงระดับอุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์เจริญได้ การเจริญจะลดลง เนื่องจากอุณหภูมิสูงมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ยีสต์ ดังนั้นในการผลิตระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องมีการระบายความร้อนของถังหมักเพื่อรักษาระดับอุณหภูมิในระหว่างการเพาะเลี้ยงยีสต์ หรืออาจใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่เจริญได้ดีหรือทนอุณหภูมิสูง

เพื่อผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว เช่น *S. cerevisiae* บางสายพันธุ์เจริญได้ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส หรือ *S. fragilis* เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Kurtzman and Fell, 1998)

4. พีเอช

พีเอชมีผลต่อกิจกรรมของเซลล์ยีสต์ เนื่องจากเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนภายในเซลล์ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชภายนอกเซลล์ อาจมีผลต่อโครงสร้างและสภาพซึมผ่านได้ของเซลล์ยีสต์ (Yeast cell permeability) อย่างไรก็ตามพีเอชต่ำมีผลช่วยลดหรือป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์กลุ่มอื่น โดยเฉพาะแบคทีเรียหลายชนิดระหว่างการผลิตชีวมวลของยีสต์ โดยปกติพีเอชที่เหมาะสมของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงยีสต์อยู่ในช่วง 4.0-6.5 (Danilov and Ekelund, 2001, pp. 549-554; Zhang et al., 2005, pp. 857-863)

5. การเกิดฟอง

การเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มีอัตราการกวนสูง มีผลต่อการเกิดฟองอากาศบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ประสิทธิภาพในการแพร่ซึมผ่านของออกซิเจนสู่เซลล์ยีสต์ลดลง ดังนั้นต้องใช้สารกำจัดฟอง (antifoams) เช่น กรดไขมัน และ กลีเซอรอล หรือใช้เครื่องกำจัดฟองอากาศเชิงกลในการควบคุมปริมาณฟองอากาศ

คุณค่าทางโภชนาการของเซลล์ยีสต์

เซลล์ยีสต์ประกอบด้วยสารชีวโมเลกุลหลายชนิด เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดนิวคลีอิก รวมทั้งแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ โดยเฉพาะวิตามินบี องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์แตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ของยีสต์ ชนิดและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น การใช้เซลล์ยีสต์เป็นโปรตีนเซลล์เดียวทดแทนแหล่งโปรตีนจากพืชและสัตว์ จำเป็นอย่างยิ่งต้องพิจารณาถึงคุณค่าทางโภชนาการของเซลล์ยีสต์ ซึ่งขึ้นกับชนิดและคุณภาพของโปรตีนและกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์ยีสต์ นอกจากนี้ต้องพิจารณาค่า digestibility และ biological value ด้วย โดย *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่ใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียวมีค่า digestibility และ biological value เท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์ (Bhattacharjee, 1979, pp. 139-159)

โดยทั่วไปเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 45-55 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง กรดนิวคลีอิคประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ในรูปของแอมโมเนีย) ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ (Anupama and Ravindra, 2000, 459-479) และกรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของยีสต์ (ตาราง 6) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในเซลล์ยีสต์พบประมาณ 22-34 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่พบมากภายในเซลล์ คือ ทรีฮาโลส

(trehalose) 33 เปอร์เซ็นต์ กลูแคน (glucan) 27 เปอร์เซ็นต์ แมนแนน (mannan) 21 เปอร์เซ็นต์ และไกลโคเจน (glycogen) 12 เปอร์เซ็นต์ สำหรับไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ โดยทั่วไปพบประมาณ 2-3 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนใหญ่เป็นพวกไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เลซิทิน (lecithin) และเออร์โกสเตอรอล (ergosterol) (Boez, Moulin, and Galzy, 1994, pp. 65-86)

ตาราง 6 ปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ที่ใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียว เทียบกับค่ามาตรฐานของ FAO

กรดอะมิโน	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีน)				
	FAO	*C. utilis*	*K. fragilis*	*C. lipolytica*	*S. cerevisiae*
ไลซีน	4.2	7.1	6.9	7.8	8.2
ทรีโอนีน	2.8	4.7	5.8	5.4	4.8
ซีสทีอีน	2.8	0.6	-	0.9	1.6
เมธไทโอนีน	2.2	1	1.9	1.6	2.5
ไอโซลิวซีน	4.2	4.3	4	5.3	5.5
ฟีนิลอะลานีน	2.8	3.0	2.8	4.8	4.5
ทริปโตเฟน	1.0	0.04	1.4	1.3	1.2

ที่มา: Boez, Moulin, and Galzy, 1994, pp. 65-86

ระเบียบวิธีวิจัย

1. ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา คือ *G. candidum* สายพันธุ์ที่แยกจากดินป่าเบญจพรรณ ของอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว

2. น้ำเสียจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ จากบริษัท สเปเชี่ยลตี้ไบโอเทค จำกัด นิคมอุตสาหกรรมอมตะนคร จังหวัดชลบุรี ที่ผ่านการกรองเพื่อแยกตะกอนออก และเก็บรักษาไว้ในตู้แช่ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส

3. การวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย

วิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียตามวิธีมาตรฐาน โดยวิเคราะห์ค่าซีโอดี (chemical oxygen demand, COD) โดยใช้วิธี closed reflux ค่าบีโอดี (biochemical oxygen demand, BOD) โดยใช้วิธี azide modification ปริมาณของแข็งแขวนลอย (suspended

solid) โดยใช้วิธีกรองด้วยกระดาษกรอง ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (total phosphorus) ใช้วิธีย่อยด้วยกรดซัลฟูริกและกรดไนตริก ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen compound) และพีเอช วิเคราะห์ตาม Standard Methods for Examination of Water and Wastewater รวบรวมโดย คณะกรรมการวิชาการสาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม, 2545, หน้า 37-172 และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธี DNS (Miller, 1959, pp. 426-428)

4. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลของ *G. candidum*

4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะเลี้ยง *G. candidum* ในอาหาร YM (yeast extract malt extract) agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อดังกล่าวลงในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์รูปกรวยบาฟเฟิล ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที นาน 18 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

4.2 อัตราการเจือจางน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล

เจือจางน้ำเสียด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:0, 1:0.5, 1:1 และ 1:1.5 ปรับพีเอชเป็น 6.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล นำน้ำเสียที่ได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ปริมาตรทรงกรวยบาฟเฟิลขนาด 500 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 ลงในน้ำเสีย โดยคำนวณให้ค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง

4.3 ความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล

นำน้ำเสียที่เจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วนเหมาะสม (พิจารณาจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 4.2) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์รูปกรวยบาฟเฟิล ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง เพาะกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 4.1 ลงในน้ำเสีย คำนวณให้ค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 140, 160, 180, 200 และ 220 รอบต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง

4.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล

นำน้ำเสียที่เจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วนเหมาะสม (พิจารณาจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 4.2) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์รูปกรวยบาฟเฟิลขนาด 500 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง เพาะกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 4.1 ลงในน้ำเสีย คำนวณให้ค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 37องศาเซลเซียส ความเร็วเหมาะสม (พิจารณาจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 4.3) นาน 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง

4.5 พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล

นำน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วนเหมาะสม (พิจารณาจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 4.2) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 บรรจุในฟลาสก์รูปกรวยบาฟเฟิล ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง เพาะกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 4.1 ลงในน้ำเสีย คำนวณให้ค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ และความเร็วรอบที่เหมาะสม (พิจารณาจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 4.4 และ 4.3) นาน 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง

5. การผลิตชีวมวลของ *G. candidum* จากน้ำเสียโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบงวด-เดียว ในฟลาสก์รูปกรวยบาฟเฟิล ขนาด 500 มิลลิลิตร

นำน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วนเหมาะสม (พิจารณาจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 4.2) ปรับพีเอชให้เหมาะสม (อ้างอิงข้อมูลจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 4.5) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์รูปกรวยบาฟเฟิล ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง เพาะกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 4.1 ลงในน้ำเสีย คำนวณให้ค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ และความเร็วที่เหมาะสม (ซึ่งได้จากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 4.4 และ 4.3) นาน 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้งและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธีของลาวรี (Lowry, Rosebrough, and Randall, 1951, 265-275)

6. การผลิตชีวมวลของ *G. candidum* จากน้ำเสียโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบงวด-เดียว ในถังหมักขนาด 1 และ 10 ลิตร

นำน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วนเหมาะสม (พิจารณาจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 4.2) ปรับพีเอชให้เหมาะสม (อ้างอิงข้อมูลจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 4.5) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และ 5 ลิตร บรรจุในถังหมักขนาด 1 และ 10 ลิตร ตามลำดับ ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ตารางนิ้ว นาน 20 และ 45 นาที ตามลำดับ เพาะกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 4.1 ลงในน้ำเสีย โดยคำนวณให้ค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 ควบคุมอุณหภูมิ อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศอย่างเหมาะสม เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง นาน 36 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธีของลาวรี (Lowry, Rosebrough, and Randall, 1951, 265-275)

7. การผลิตชีวมวลของ *G. candidum* จากน้ำเสียโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบงวด-เดียว ในถังหมักขนาด 1,000 และ 8,500 ลิตร

นำน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วนเหมาะสม (พิจารณาจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 4.2) ปรับพีเอชให้เหมาะสม (อ้างอิงข้อมูลจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 4.5) ปริมาตร 500 ลิตร และ 4,000 ลิตร บรรจุในถังหมักขนาด 1,000 และ 8,500 ลิตร ตามลำดับ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง (ทำ 2 ซ้ำ) จากนั้นเพาะกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 4.1 โดยขยายปริมาณกล้าเชื้อตามลำดับอย่างเหมาะสม ลงในน้ำเสีย ควบคุมอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศอย่างเหมาะสม เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง นาน 36 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธีของลาวรี (Lowry, Rosebrough, and Randall, 1951, 265-275)

8. การวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย หลังการเพาะเลี้ยง *G. candidum*

วิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียตามวิธีมาตรฐาน โดยวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ เช่น ค่าซีโอดี ค่าบีโอดี ปริมาณของแข็ง ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และพีเอช ตามวิธีเดียวกันกับที่ใช้ในข้อ 3

เนื้อหางานวิจัย

การวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย

ผลการวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ พบว่า น้ำเสียมีค่าพีเอช 5.4 ค่าซีโอดี 49,120 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าบีโอดี 38,550 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งแขวนลอย 36 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณสารประกอบไนโตรเจน 1,142 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 1.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 1.7 กรัมต่อลิตร และค่า C:N ratio เท่ากับ 14.2:1 (ตาราง 7) ซึ่งพารามิเตอร์ดังกล่าวมีปริมาณที่สูงเกินมาตรฐานน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม โดยเฉพาะค่าบีโอดี และซีโอดี แสดงว่าในน้ำเสียดังกล่าวมีสารอินทรีย์และอนินทรีย์เป็นองค์ประกอบสูง และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำเสียเบื้องต้น พบว่ามีสารอาหาร เช่น กลูโคส ไซโลส แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ โปรตีน และเอสเทอร์ เป็นต้น ซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้เป็นแหล่งของธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองซึ่ง *G. candidum* ใช้เพื่อการเจริญและผลิตชีวมวลได้ (Kurtzman, and Fell, 1998, pp. 210-212)

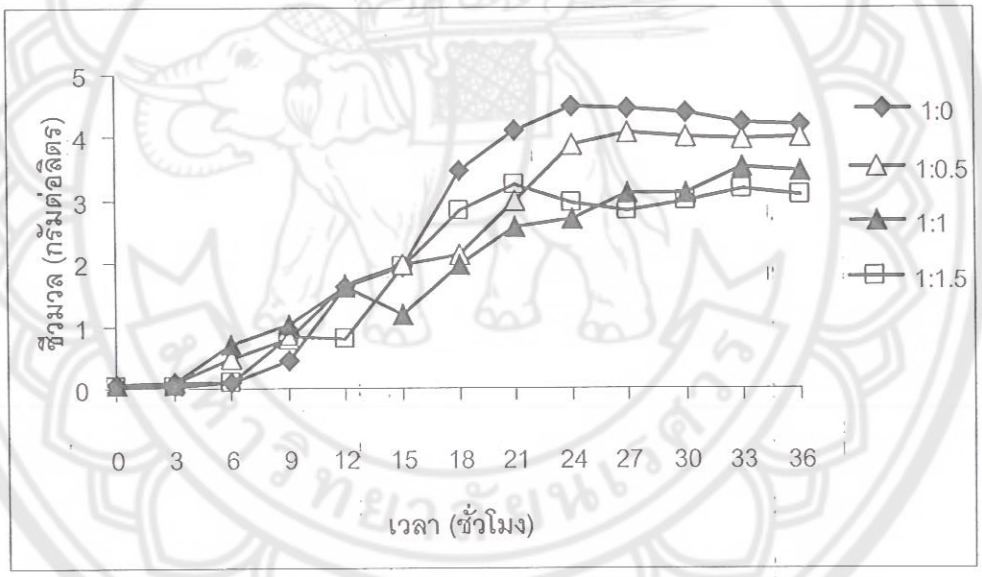
ตาราง 7 คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย

พารามิเตอร์	หน่วย	ผลวิเคราะห์
พีเอช	-	5.4
ซีโอดี	มิลลิกรัมต่อลิตร	49,120
บีโอดี	มิลลิกรัมต่อลิตร	38,973
ปริมาณของแข็งแขวนลอย	มิลลิกรัมต่อลิตร	36
ปริมาณสารประกอบไนโตรเจน	มิลลิกรัมต่อลิตร	1,142
ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด	มิลลิกรัมต่อลิตร	1.8
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	กรัมต่อลิตร	1.7
C:N ratio	-	14.2:1

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลของ *G. candidum* จากน้ำเสียโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบงวดเดียว (batch culture)

1. อัตราการเจือจางน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล

จากผลการทดลอง พบว่า *G. candidum* เจริญได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ที่เจือจางด้วยน้ำประปา อัตราการเจือจางเท่ากับ 1:0 โดยมีปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 3.84 กรัมต่อลิตร (ภาพ 1) แสดงว่า หากความเข้มข้นของปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียสูงเกินไปจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *G. candidum* ทำให้ปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ลดลง และหากความเข้มข้นของปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียต่ำ จะมีผลต่อการผลิตชีวมวลที่ลดลงของยีสต์ดังกล่าว (Gancedo and Serrano, 1989, pp. 237-251)

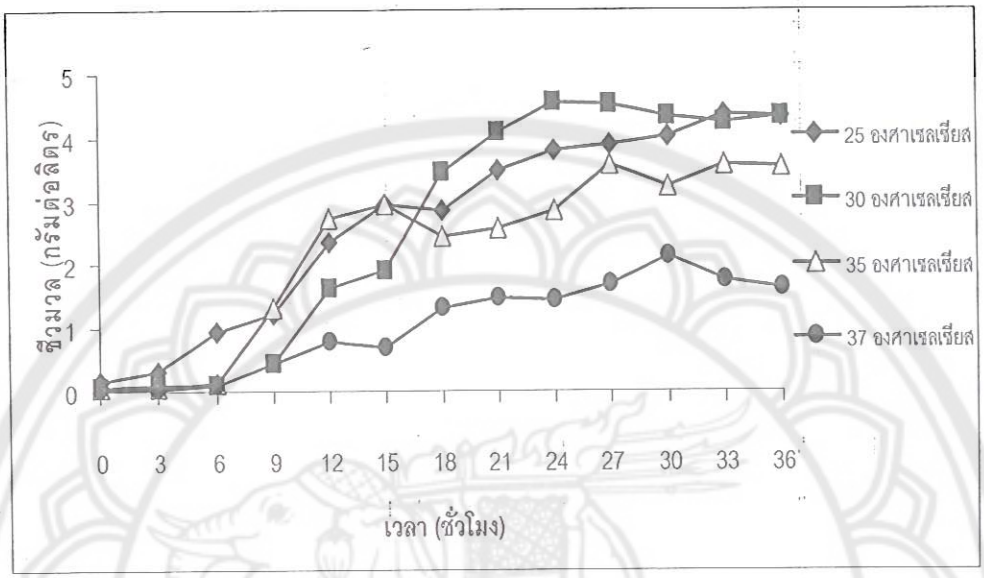


ภาพ 1 ปริมาณชีวมวลของ *G. candidum* ผลิตจากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปา อัตราส่วน 1:0, 1:0.5, 1:1 และ 1:1.5 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง

2. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล

จากผลการทดลอง พบว่า *G. candidum* เจริญได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปา ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 1:0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที โดยมีปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 4.5 กรัมต่อลิตร (ภาพ 2) อย่างไรก็ตามปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างมากนัก เมื่อเทียบ

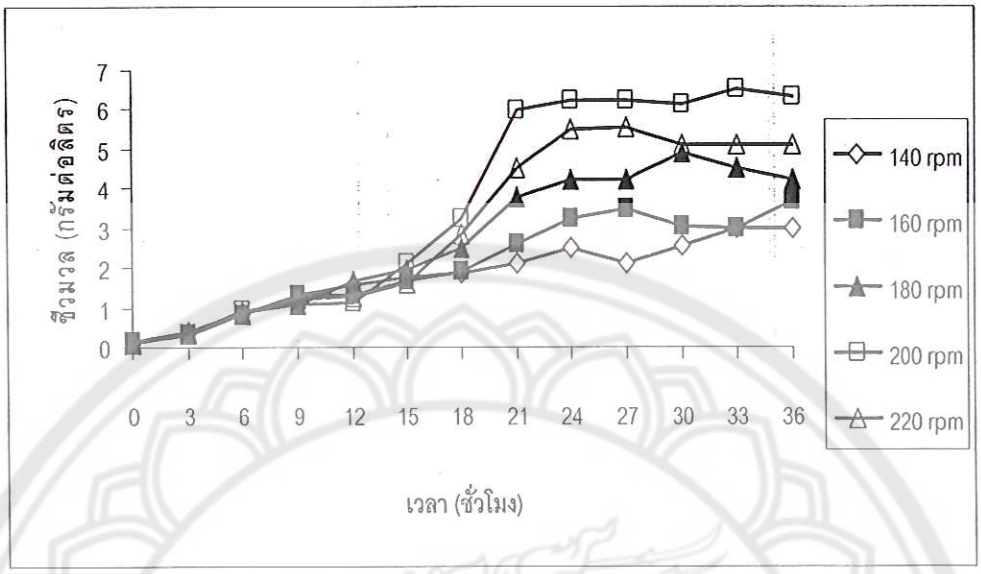
กับการเพาะเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพื่อให้เหมาะสมกับการผลิตในเชิงอุตสาหกรรมจึงกำหนดการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในการทดลองต่อไป



ภาพ 2 ปริมาณชีวมวลของ *G. candidum* ผลิตจากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปา อัตราส่วน 1:0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง

3. ความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล

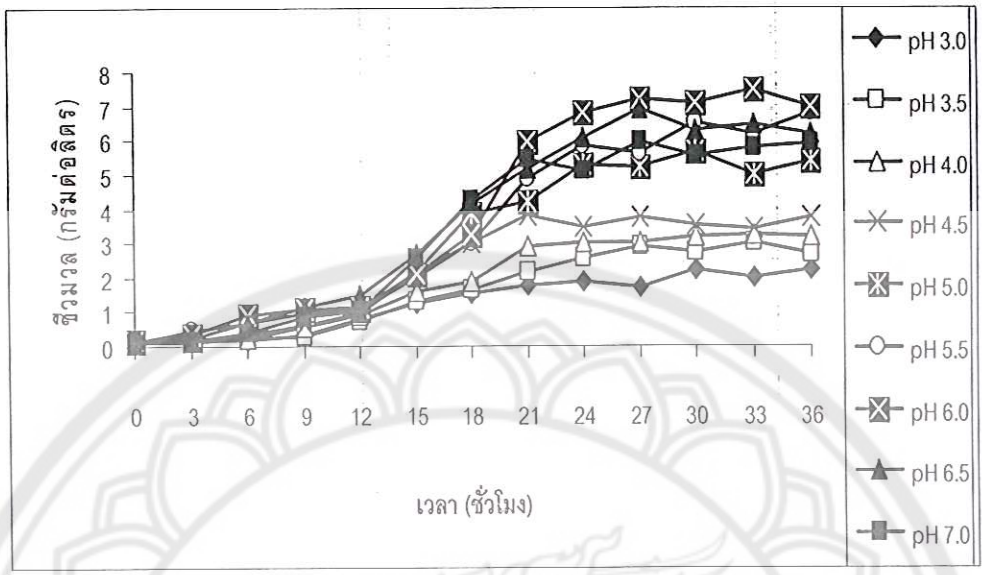
จากผลการทดลอง พบว่า *G. candidum* เจริญได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 1:0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 6.5 กรัมต่อลิตร (ภาพ 3) ซึ่งความเร็วรอบที่ใช้มีผลในการเพิ่มอัตราการดูดซึมออกซิเจนให้แก่ *G. candidum* โดยยีสต์ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน ของกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ทำให้ได้ปริมาณ ATP สูง ซึ่งเหมาะสมและพอเพียงต่อการสังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ยีสต์ผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ต่างๆ ภายในเซลล์ (Rydin, Molin, and Nilsson, 1990, pp. 473-476)



ภาพ 3 ปริมาณชีวมวลของ *G. candidum* ผลิตจากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปา อัตราส่วน 1:0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 140, 160, 180, 200 และ 220 รอบต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง

4. พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล

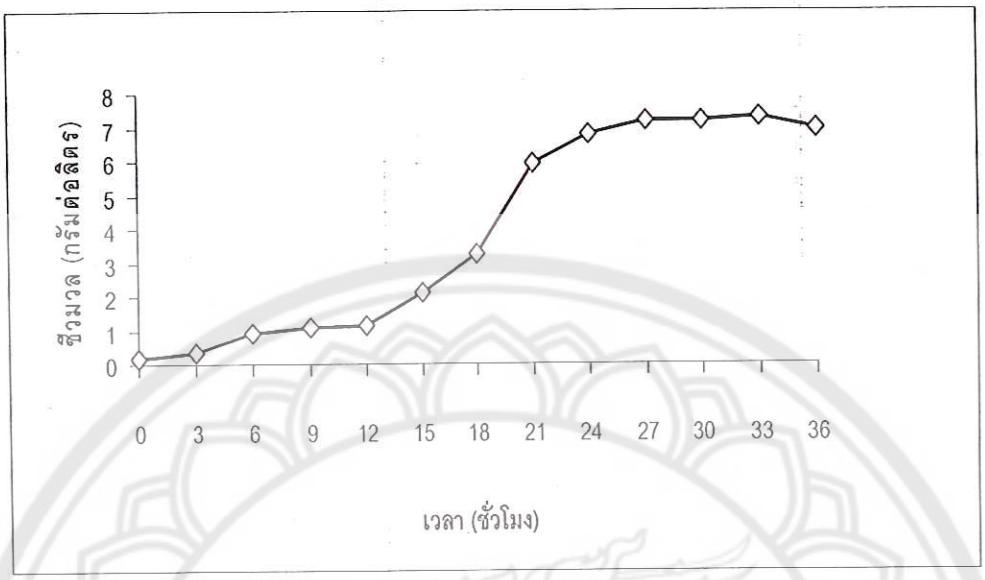
จากผลการทดลอง พบว่า *G. candidum* เจริญได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปา ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 1:0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียที่เหมาะสม คือ 6.0 ให้ปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 7.2 กรัมต่อลิตร (ภาพ 4) โดยพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียที่สูงหรือต่ำกว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ มีผลยับยั้งกิจกรรมในเอนไซม์ในเซลล์ยีสต์ เนื่องจากสภาพความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์ โดยเฉพาะบริเวณโปรโตพลาสซึมเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ส่วนที่ห่อหุ้มเซลล์หรือ cell envelopes ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิด และโปรตีนพาหะ (carrier proteins) จะได้รับผลกระทบจากสภาวะที่มี H^+ สูง หรือต่ำมากกว่าสภาวะที่เหมาะสม โดยเอนไซม์และโปรตีนดังกล่าวจะเสียสภาพในการทำหน้าที่ มีผลต่อสภาพซึมผ่านได้ของเซลล์ (cell permeability) (Zhang, et al., 2005, pp. 857-863)



ภาพ 4 ปริมาณชีวมวลของ *G. candidum* ผลิตจากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปา อัตราส่วน 1:0 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง

การผลิตชีวมวลของ *G. candidum* จากน้ำเสียโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบงวดเดียวในฟลาสก์รูปกรวยบาฟเฟิล ขนาด 500 มิลลิลิตร

จากผลการทดลอง พบว่า ปริมาณชีวมวลสูงสุดของ *G. candidum* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:0 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์รูปกรวย-บาฟเฟิล บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง มีปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 7.3 กรัมต่อลิตร (ภาพ 5) โดยมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.21 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง



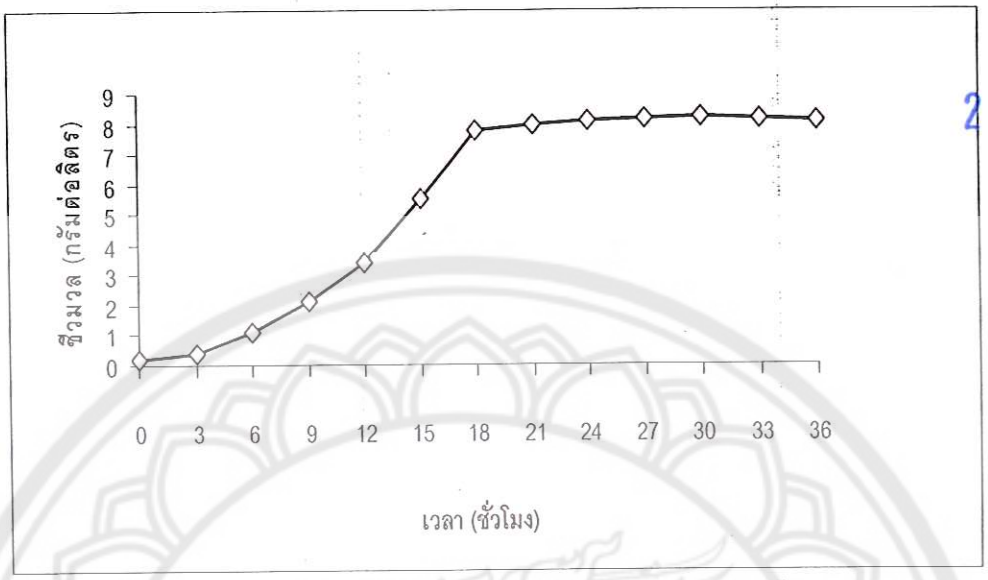
ภาพ 5 ปริมาณชีวมวลของ *G. candidum* ผลิตจากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปา อัตราส่วน 1:0 พีเอช 6.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 ต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง

การผลิตชีวมวลของ *G. candidum* จากน้ำเสียโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบงวดเดียวในถังหมักขนาด 1 และ 10 ลิตร

1. การผลิตชีวมวลในถังหมักขนาด 1 ลิตร

จากผลการทดลองพบว่า การผลิตชีวมวลของ *G. candidum* ในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงในน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง ได้ปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 8.2 กรัมต่อลิตร (ภาพ 6) โดยมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.37 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงใน baffled-flask เนื่องจากการให้อากาศ และอัตราการกวนเหมาะสม ทำให้ oxygen transfer rate มีค่าสูง ส่งผลให้ยีสต์ได้รับปริมาณออกซิเจนมากเพียงพอในการสังเคราะห์ ATP จากกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ซึ่ง ATP ที่ได้รับมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆของเซลล์ผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ของเซลล์ *G. candidum* (Gancedo and Serrano, 1989, pp. 205-251)

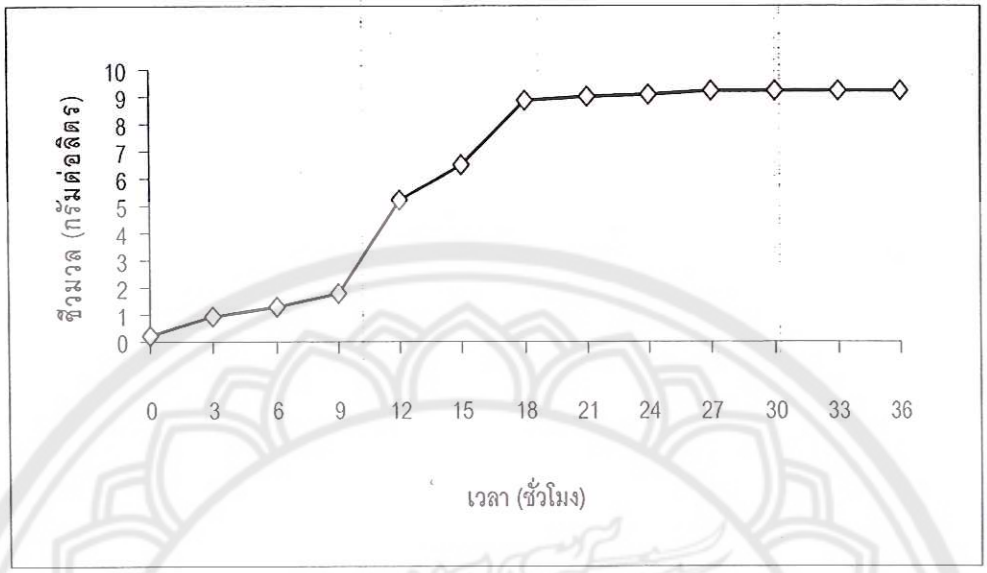
1561094
สำนักหอสมุด
29 ส.ค. 2554



ภาพ 6 ปริมาณชีวมวลของ *G. candidum* ผลิตจากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปา อัตราส่วน 1:0 พีเอช 6.0 เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 1 ลิตร อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง

2. การผลิตชีวมวลในถังหมักขนาด 10 ลิตร

จากการผลิตชีวมวลของ *G. candidum* ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ในน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:0 อัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 vvm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 9.2 กรัมต่อลิตร (ภาพ 7) โดยมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.42 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงใน baffled-flask และถังหมักขนาด 1 ลิตร เนื่องจากการให้อากาศ และอัตราการกวนเหมาะสม ทำให้ oxygen transfer rate มีค่าสูง ส่งผลให้ยีสต์สังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆของเซลล์ผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ของเซลล์ *G. candidum* ได้สูง ส่งผลให้ปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้เพิ่มขึ้น



ภาพ 7 ปริมาณชีวมวลของ *G. candidum* ผลิตจากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปา อัตราส่วน 1:0 พีเอช 6.0 เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร อัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 vvm ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง

การผลิตชีวมวลของ *G. candidum* จากน้ำเสียโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบงวดเดียว ในถังหมักขนาด 1,000 และ 8,500 ลิตร

ทดลองผลิตชีวมวลของ *G. candidum* จากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:0 ในถังหมักขนาด 1,000 และ 8,500 ลิตร ภายในโรงงานของบริษัท สเปเชี่ยลตี้ไบโอเทค จำกัด พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวในถังหมักขนาด 1,000 และ 8,500 ลิตร นาน 6 ชั่วโมง จะมีการสะสมของความร้อนภายในถังหมัก วัดอุณหภูมิภายในถังหมักได้ 52 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ นาน 12 ชั่วโมง อุณหภูมิภายในถังหมักขนาด 1,000 ลิตร เพิ่มสูงถึง 75 องศาเซลเซียส นอกจากนี้จากการวัดการเจริญของยีสต์ในรูปของชีวมวลที่ผลิตได้พบว่า เกิดการลดลงของปริมาณชีวมวลอย่างต่อเนื่อง กล่าวอีกนัยหนึ่ง คือ อัตราการเจริญของยีสต์ลดลง ทั้งนี้ถังหมักขนาด 1,000 และ 8,500 ลิตร ขาดระบบหล่อเย็น (Cooling system) ทำให้เกิดปัญหาในการผลิตชีวมวลของ *G. candidum* เพราะมีการสะสมของความร้อนภายในถังหมักสูงมากกว่าระดับอุณหภูมิสูงสุดที่ *G. candidum* สามารถเจริญได้

คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย หลังการเพาะเลี้ยง *G. candidum*

ผลการวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ หลังจากเพาะเลี้ยง *G. candidum* นาน 36 ชั่วโมง พบว่า น้ำเสียมีค่าพีเอช 6.6 ค่าซีโอดี 19,480 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าบีโอดี 13,980 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งแขวนลอย 29 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณสารประกอบไนโตรเจน 543.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.3 กรัมต่อลิตร และ C:N ratio เท่ากับ 9:1 (ตาราง 8) และจากการเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ ก่อนใช้เพาะเลี้ยง *G. candidum* (ตาราง 9) พบว่า *G. candidum* เป็นยีสต์ที่มีศักยภาพสูงในการบำบัดน้ำเสียดังกล่าว พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ที่ลดลงของค่าซีโอดี และบีโอดี เท่ากับ 60.3 และ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตาราง 8 คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย หลังการเพาะเลี้ยง *G. candidum* นาน 36 ชั่วโมง

พารามิเตอร์	หน่วย	ผลวิเคราะห์
พีเอช	-	6.6
ซีโอดี	มิลลิกรัมต่อลิตร	19,480
บีโอดี	มิลลิกรัมต่อลิตร	13,980
ปริมาณของแข็งแขวนลอย	มิลลิกรัมต่อลิตร	29
ปริมาณสารประกอบไนโตรเจน	มิลลิกรัมต่อลิตร	543.2
ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด	มิลลิกรัมต่อลิตร	1.6
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	กรัมต่อลิตร	0.3
C:N ratio	-	9:1

เอกสารประกอบการประชุมวิชาการระดับชาติ

การจัดการของเสียและพลังงานทางเลือก ในสภาวะโลกร้อน : โอกาสและความท้าทาย

วันที่ 11-12 กุมภาพันธ์ 2553

ณ โรงแรม เจ บี อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

จัดโดย คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ร่วมกับ
ศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย

การผลิตชีวมวลของ *Geotrichum candidum* จากน้ำทิ้งของกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ เพื่อใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียว

Production of *Geotrichum candidum* Biomass from Yeast Extract Manufacturing Wastewater for Using as Single Cell Protein

ศิรินทิพย์ แก้วลำยวง ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ์
ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ต. ท่าโพธิ์ อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000
E-mail: tawatchais@nu.ac.th

Sirintip Kaewlumyaung Tawatchai Sumpradit
Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000
E-mail: tawatchais@nu.ac.th

บทคัดย่อ

เพาะเลี้ยงยีสต์ *Geotrichum candidum* GC1-01 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากดินป่าไม้ของอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว ในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ โดยไม่เติมสารอาหารอื่นลงไป เพื่อผลิตชีวมวลที่สามารถใช้เป็นแหล่งของโปรตีนเซลล์เดียวผสมในอาหารสัตว์ จากการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลใน baffled flask ขนาด 500 มิลลิลิตร คือ เพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งพีเอชเริ่มต้น 6.0 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปริมาณชีวมวลสูงสุดของยีสต์ที่ผลิตได้ คือ 7.42 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์เท่ากับ 0.21 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวในน้ำทิ้งพีเอชเริ่มต้น 6.0 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลของยีสต์ คือ ควบคุมอัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 บาร์ต่อนาที และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปริมาณชีวมวลสูงสุดของยีสต์ที่ผลิตได้ คือ 9.25 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนของเซลล์ยีสต์เท่ากับ 0.42 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

คำหลัก: น้ำเสีย, ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์, โปรตีนเซลล์เดียว, *Geotrichum*

Abstract

Geotrichum candidum GC1-01 isolated from forest soil of Nam Nao national park was cultivated in yeast extract manufacturing wastewater without addition of other yeast nutrients in order to produce the yeast biomass of which will be used as alternative protein sources in animal feed. The optimum condition for the yeast biomass production in 200 mL of wastewater, adjusted initial pH to 6.0, in 500 mL of baffled-flask was incubation the experimental flasks on rotary shaker at 200 rpm and 35 °C. The highest yeast biomass and its protein content were 7.52 g/L and 0.21 g/g cell dry weight, respectively. To increase the yeast biomass produced from this wastewater, the strain was cultivated in wastewater (pH 6.0) in 10L of fermentor controlled the fermentation condition at 35 °C with agitation rate at 220 rpm and aeration rate at 1.2 vvm. The highest *G. candidum* biomass gained from the fermentation process was 9.25 g/l and its protein content was 0.42 g protein/g cell dry weight.

Keywords: Wastewater, Yeast extract, Single cell protein, *Geotrichum*

1. บทนำ

ปัจจุบันน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เป็นวัตถุดิบที่ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นในการใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ทางเทคโนโลยีชีวภาพจากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ (microbial fermentation process) เนื่องจากในน้ำทิ้งพบสารอินทรีย์หลายชนิดที่เป็นธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Zhang *et al.*, 2005) น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ที่ใช้เซลล์ยีสต์ซึ่งผ่านการผลิตเบียร์เป็นวัตถุดิบ ประกอบด้วยสารอินทรีย์หลายชนิด เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ เอสเทอร์ สารประกอบฟีนอล และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น (Česlová *et al.*, 2009) ทั้งนี้สารกลุ่มดังกล่าวยีสต์ *Geotrichum candidum* GC1-01 สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญซึ่งให้ผลผลิตเป็นชีวมวล โดยชีวมวลของ *G. candidum* ได้รับการประเมินว่าเป็นโปรตีนเซลล์เดียวที่สามารถใช้ผสมในอาหารสัตว์ เนื่องจากมีกรดอะมิโนหลายชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญของสัตว์ เช่น ไลซีน และเมไธโอนีน เป็นต้น นอกเหนือจากไขมันที่พบเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง (Ziino *et*

al., 1999) นอกจากนี้ชีวมวลของยีสต์ *G. candidum* มีข้อดีหลายประการในการใช้เป็นแหล่งโปรตีนผสมในอาหารสัตว์ คือ สามารถย่อยได้ง่ายภายในกระเพาะอาหารของสัตว์หลายชนิด ภายในเซลล์ของยีสต์พบการสะสมของ hesperidin ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ที่จำเป็นต่อการเจริญของสัตว์เศรษฐกิจ เช่น สุกร โค และกระบือ เป็นต้น (Zadrazil and Puniya, 1995) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ คือ ศึกษาการผลิตชีวมวลของยีสต์ *G. candidum* GC1-01 จากน้ำทิ้งของกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ ซึ่งเป็นของเสียจากการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ที่โดยปกติปราศจากมูลค่า และต้องเสียค่าใช้จ่ายในการบำบัดให้ได้คุณภาพที่เหมาะสมก่อนปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา

G. candidum GC1-01 สายพันธุ์ที่แยกจากดินป่าสนสองใบของอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ของโรงงานอุตสาหกรรม ภายในนิคมอุตสาหกรรมอมตะนคร จังหวัดชลบุรี

2.3 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้ง

วิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งก่อนใช้เตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและหลังจากใช้เป็นวัตถุดิบเพาะเลี้ยงยีสต์ *G. candidum* GC1-01 โดยวิเคราะห์พารามิเตอร์ที่สำคัญ คือ Chemical oxygen demand (COD), Biological oxygen demand (BOD), ปริมาณของแข็งแขวนลอย (Suspended Solids, SS), ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total phosphorus, TP) และพีเอชโดยใช้ Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA *et al.*, 1985)

2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01 จากน้ำทิ้ง

2.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะเชื้อยีสต์ *G. candidum* GC1-01 อายุ 24 ชั่วโมง ซึ่งเจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง YM (yeast extract malt extract) ลงในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุใน baffled flask ขนาด 250 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆที่ปนเปื้อนมากับน้ำทิ้ง โดยใช้เทคนิค sterilization ที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

2.4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

เพาะกล้าเชื้อที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 2.4.1 ในน้ำทิ้งปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุใน baffled flask ขนาด 500 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยเทคนิค sterilization) โดยให้ค่าความขุ่นเริ่มต้นของน้ำทิ้งที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 1.0 ปริมาณ 5% บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 160 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ คือ 25, 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง และวิเคราะห์ปริมาณชีวมวลที่ได้เป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ทุก 3 ชั่วโมง นาน 36 ชั่วโมง

2.4.3 ความเร็วรอบที่เหมาะสม

เพาะกล้าเชื้อที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 2.4.1 ในน้ำทิ้งปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุใน baffled flask ขนาด 500 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยเทคนิค sterilization) โดยให้ค่าความขุ่นเริ่มต้นของน้ำทิ้งที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 1.0 ปริมาณ 5% บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วระดับต่างๆ คือ 140, 160, 180, 200 และ 220 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 2.4.2) เก็บตัวอย่าง และวิเคราะห์ปริมาณชีวมวลที่ได้เป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ทุก 3 ชั่วโมง นาน 36 ชั่วโมง

2.4.4 พีเอชที่เหมาะสม

เพาะกล้าเชื้อที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 2.4.1 ในน้ำทิ้งปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุใน baffled flask ขนาด 500 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยเทคนิค sterilization) โดยให้ค่าความขุ่นเริ่มต้นของน้ำทิ้งที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 1.0 ปริมาณ 5% ปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งก่อนการเพาะเลี้ยงยีสต์เท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ บ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิและความเร็วรอบให้เหมาะสม (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 2.4.2 และ 2.4.3) เก็บตัวอย่าง และวิเคราะห์ปริมาณชีวมวลที่ได้เป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ทุก 3 ชั่วโมง นาน 36 ชั่วโมง

2.5 การผลิตชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01 ใน baffled flask และถังหมัก ที่ควบคุมสภาวะในการผลิตให้เหมาะสม

2.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อตามวิธีการในข้อ 2.4.1 และเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อให้เหมาะสมกับการผลิตชีวมวลในถังหมักขนาด 10 ลิตร

2.5.2 การผลิตชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01 ใน baffled flask ขนาด 500 มิลลิลิตร

เพาะกล้าเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ 2.5.1 ในน้ำทิ้งปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เหมาะสม (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 2.4.4) บรรจุใน baffled flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยเทคนิค sterilization โดยให้ค่าความขุ่นเริ่มต้นของน้ำทิ้งที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 1.0 ปริมาณ 5% บ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิและความเร็วรอบให้เหมาะสม (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 2.4.2 และ 2.4.3) เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ปริมาณชีวมวลที่ได้เป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ทุก 3 ชั่วโมง นาน 36 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์

2.5.3 การผลิตชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

เพาะกล้าเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ 2.5.1 ในน้ำทิ้งปริมาตร 4 ลิตร บรรจุในถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยเทคนิค sterilization นาน 30 นาที โดยให้ค่าความขุ่นเริ่มต้นของ

น้ำทิ้งที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 1.0 ปริมาณ 5% ควบคุมอัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 บาร์ต่อนาที และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ปริมาณชีวมวลที่ได้เป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้งทุก 3 ชั่วโมง นาน 36 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์

2.6 การวิเคราะห์

วิเคราะห์การเจริญของยีสต์ *G. candidum* GC1-01ในรูปของชีวมวลที่ผลิตได้ จากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามวิธีการของ Mrvčić *et al.* (2007) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ โดยใช้วิธีของ Kjeldah (Choi and Park, 2003)

3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งก่อนใช้เพาะเลี้ยงยีสต์

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ (ตารางที่ 1) พบว่า ค่าพารามิเตอร์ของน้ำทิ้งมีค่าสูง เนื่องจากน้ำทิ้งดังกล่าวมีสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ในปริมาณมาก สารอินทรีย์สำคัญที่พบในน้ำทิ้ง คือ แอลกอฮอล์ กรด-อินทรีย์ เอสเทอร์ สารประกอบฟีนอล และฟลาโวนอยด์ (Barker *et al.*, 1982; Česlova *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตามสารอินทรีย์กลุ่มดังกล่าว *G. candidum* GC1-01 อาจจะใช้เพื่อเป็นแหล่งอาหารและพลังงานของจุลินทรีย์ได้

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำทิ้งก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ *G. candidum* GC1-01

พารามิเตอร์	หน่วย	ก่อน*	หลัง**
พีเอช	-	5.4	6.6
COD	มิลลิกรัมต่อลิตร	49,120	19,480
BOD	มิลลิกรัมต่อลิตร	38,550	14,000
SS	มิลลิกรัมต่อลิตร	36	29
TN	มิลลิกรัมต่อลิตร	1,142	543.2
TP	มิลลิกรัมต่อลิตร	1.8	1.6

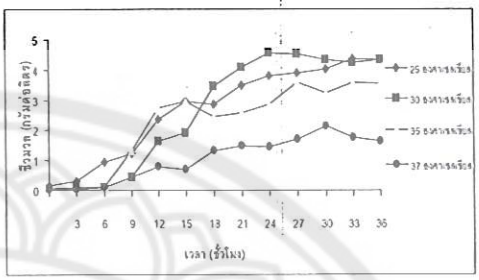
* คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำทิ้งก่อนการเพาะเลี้ยง

** คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำทิ้งเพาะเลี้ยงยีสต์ *G. candidum* GC1-01 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

3.2 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01 จากน้ำทิ้ง

3.2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสม

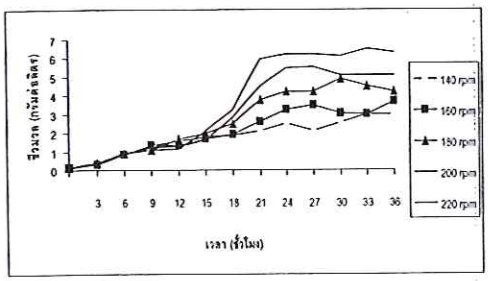
จากผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01 จากน้ำทิ้ง คือ 30 องศาเซลเซียส (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ปริมาณชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01 ที่ผลิตได้จากน้ำทิ้งปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปั่นบนเครื่องเขย่าความเร็ว 160 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 25, 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง

3.2.2 ความเร็วรอบที่เหมาะสม

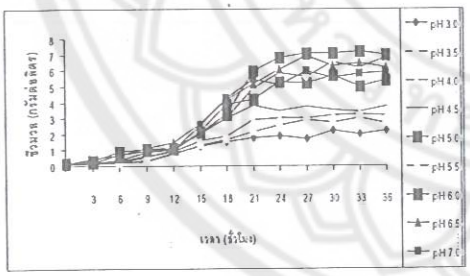
จากผลการทดลองพบว่า ความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01จากน้ำทิ้ง คือ 200 รอบต่อนาที (รูปที่ 2) ทั้งนี้ความเร็วรอบดังกล่าวมีผลในการเพิ่มอัตราการแพร่ซึมผ่านของออกซิเจนสู่เซลล์ยีสต์ให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ โดยยีสต์ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ทำให้เกิดการสังเคราะห์ ATP ปริมาณสูงภายในเซลล์ ซึ่งเหมาะสมและพอเพียงต่อการสังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆของเซลล์ยีสต์ผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ อย่างไรก็ตามหากความเร็วรอบที่ใช้สูงมากเกินไป จะส่งผลให้เกิดฟองอากาศสะสมปริมาณมาก ซึ่งจะยับยั้งอัตราการแพร่ซึมผ่านของออกซิเจนสู่เซลล์ยีสต์ ทำให้อัตราการหายใจแบบใช้ออกซิเจนลดลง ส่งผลให้ปริมาณ ATP ภายในเซลล์มีจำกัด เกิดผลกระทบเชิงลบต่อปริมาณชีวมวลของยีสต์ที่ผลิตได้ (Walker, 1997)



รูปที่ 2 ปริมาณชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01 ที่ผลิตได้จากน้ำทิ้งปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 140, 160, 180, 200 และ 220 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง

3.2.3 พีเอชที่เหมาะสม

จากผลการทดลองพบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01 จากน้ำทิ้ง คือ พีเอช 6.0 (รูปที่ 3) โดยพีเอชที่มีค่าสูงหรือต่ำกว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ มีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ยีสต์ในการใช้สารประกอบอินทรีย์เพื่อการเจริญของเซลล์ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และโปรตีนสำคัญที่พบบริเวณผิวเซลล์ (cell envelope) กล่าวคือ มีผลกระทบต่อสภาพซึมผ่านได้ของเซลล์ (Cell permeability) (Zhang, *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ยีสต์ ซึ่งส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการคาตาบอไลซ์ และแอนาบอไลซ์สารอาหาร ทำให้ระดับของ ATP และ precursor metabolites ที่สำคัญต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ มีปริมาณลดลง โดยเฉพาะสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ผ่านกระบวนการแตกหน่อ (budding)

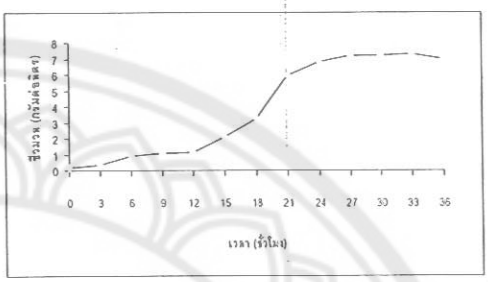


รูปที่ 3 ปริมาณชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01 ที่ผลิตได้จากน้ำทิ้งปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง

3.3 การผลิตชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01 ใน baffled flask และถังหมัก ที่ควบคุมสภาวะในการผลิตให้เหมาะสม

3.3.1 การผลิตชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01 ใน baffled flask ขนาด 500 มิลลิลิตร

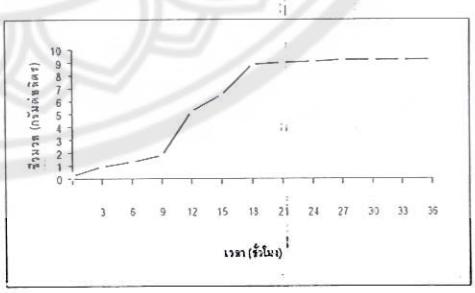
จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณชีวมวลสูงสุดของยีสต์ *G. candidum* GC1-01 ที่ชั่วโมงที่ 33 ผลิตได้เท่ากับ 7.42 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4) ปริมาณโปรตีนที่พบเป็นองค์ประกอบของเซลล์ เท่ากับ 0.21 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการทดลองของ Ziino, *et al.*, (1999) เพาะเลี้ยง *Geotricum candidum* บนเปลือกส้มเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวที่มีปริมาณโปรตีนสูง พบว่ามีปริมาณโปรตีน 42 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4 ปริมาณชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01ผลิตจากน้ำทิ้งปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใน baffled flask ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง

3.3.2 การผลิตชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

จากผลการทดลองผลิตชีวมวลของยีสต์ *G. candidum* GC1-01 จากน้ำทิ้ง โดยใช้ถังหมักขนาด 10 ลิตร อัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 บาร์ต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิระหว่างการหมักที่ 35 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณชีวมวลสูงสุดที่ได้รับ เท่ากับ 9.25 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 5) ปริมาณโปรตีนของเซลล์ยีสต์เท่ากับ 0.42 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการชีวสังเคราะห์โปรตีนที่พบในเซลล์ของยีสต์ เกิดได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน เพราะการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ยีสต์ ต้องใช้พลังงานที่ได้จากกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (Walker, 1997; Campbell, 1999)



รูปที่ 5 ปริมาณชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01 ผลิตจากน้ำทิ้งโดยใช้ถังหมักขนาด 10 ลิตร (ปริมาณชีวมวลคิดจากปริมาตรน้ำทิ้ง 1 ลิตร) อัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 บาร์ต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิระหว่างหมักที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง

3.4 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งที่ผ่านการผลิตชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01

ผลการวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ หลังจากเพาะเลี้ยง *G. candidum* GC1-01 นาน 36 ชั่วโมง ในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่า น้ำเสียมีค่าพีเอช 6.6 ค่าซีโอดี 19,480 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าบีโอดี 14,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งแขวนลอย 29 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณสารประกอบไนโตรเจน 543.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1) พบว่า ค่าซีโอดีและค่าบีโอดีของน้ำทิ้งลดลง 60.34 และ 63.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงยีสต์ *G. candidum* GC1-01 เพื่อผลิตชีวมวลจากน้ำทิ้งของกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพของน้ำทิ้งดังกล่าวได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งช่วยลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อการลดต้นทุนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ของบริษัทในระดับที่น่าพอใจ นอกจากนี้ชีวมวลดังกล่าว จะได้รับการประเมินการใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียวผสมในอาหารสัตว์ทดแทนโปรตีนจากพืชและสัตว์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

4. สรุปผลการทดลอง

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01 จากน้ำทิ้งปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใน baffled flask ขนาด 500 มิลลิลิตร คือ บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งเท่ากับ 6.0 ปริมาณชีวมวลสูงสุดที่ผลิตได้เท่ากับ 7.52 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนของเซลล์เท่ากับ 0.21 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลของ *G. candidum* GC1-01จากน้ำทิ้ง โดยใช้ถังหมักขนาด 10 ลิตร คือ เพาะเลี้ยงยีสต์โดยควบคุมอัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 บาร์ต่อนาที และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปริมาณชีวมวลสูงสุดที่ผลิตได้เท่ากับ 9.25 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนของเซลล์เท่ากับ 0.42 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่สนับสนุนทุนวิจัยผ่านงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยนเรศวร รหัสโครงการ MS-AR-033/2552

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา และหน่วยปฏิบัติการกลางเพื่อส่งเสริมงานวิจัย คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรที่สนับสนุนครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ และสถานที่ในการดำเนินการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

APHA, AWWA and WPCF. 1985. Standard Methods for Examnination of Water and Wastewater, American Public Health Association. New York.

Barker, T. W., Quinn, J. P. and Marchant, R. 1982. The use of a mixed culture of *Geotrichum candidum*, *Candida krusei* and *Hansenula anomala* for microbial protein production from whiskey distillery spent wash, Applied Microbiology and Biotechnology. 82: 247-153.

Campbell, M. K. 1999. Biochemistry, Harcourt & Company. America.

Česlová, L., Holčapek, M., Fidler, M., Drštičková, J. and Lísa, M. 2009. Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beer and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, Journal of Chromatography A. 1216: 7249-7257.

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

Mrvčić, J., Stanzer, D., Stehlik-Tomas, V., Škevin, D. and Grba, S. 2007. Optimization of bioprocess for production of copper-enriched biomass of industrially important microorganism *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Bioscience and Bioengineering. 103: 331-337.

Walker, G. M. 1997. Yeast Physiology and Biotechnology, John Wiley and Sons. Chichester.

Zadrazil, F. and Puniya, A. K. 1995. Studies on effect of particle size on solid state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white rot fungi, Bioresource Technology. 67: 7-11.

Zhang, Y., Rittmann, B. E., Wang, J., Sheng, Y., Yu, J., Shi, H. and Qian, Y. 2005. High-carbohydrate wastewater treatment by IAL-CHS with immobilized *Candida tropicalis*, Process Biochemistry. 40: 857-863.

Ziino, M., Lo Corto, R. B., Salvo, F., Signorino, D., Chiofalo, B. and Giuffrida, D. 1999. Lipid composition of *Geotrichum candidum* single cell protein grown in continuous submerged culture, Bioresource Technology. 67: 7-11.