อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตชีวมวลของ *Candida tropicalis* จากน้ำเสีย เพื่อใช้เป็นแหล่งของเบตากลูแคน

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ และคณะ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน - 5 JUL 2011
เลขทะเบียน 15664032
เลขเรียกหนังสือ ว QK
625
.C75
T394S
2553

กรกฎาคม 2553

สัญญาเลขที่ MS-AR-018/2552

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตชีวมวลของ *Candida tropicalis* จากน้ำเสีย เพื่อใช้เป็นแหล่งของเบตากลูแคน

คณะผู้วิจัยและสังกัด

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

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

ชื่อเรื่อง การผลิตชีวมวลของ *Candida tropicalis* จากน้ำเสียเพื่อใช้เป็นแหล่งของเบตากลูแคน

หัวหน้าโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ

คำสำคัญ *Candida tropicalis*, เบตากลูแคน, น้ำเสีย, *Candida*

บทคัดย่อ

เพาะเลี้ยงยีสต์ *Candida tropicalis* CT1-01 ในน้ำเสียของกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์-แทร็กซ์ที่เจือจางด้วยน้ำประปาในอัตราส่วน 1:1.5 ปรับพีเอชเป็น 6.0 โดยไม่เติมสารอาหารอื่นลงไป เพื่อผลิตชีวมวลที่ใช้เป็นแหล่งของเบตากลูแคนผสมในอาหารสัตว์ จากผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลใน baffled-flask ขนาด 500 มิลลิลิตร คือ การบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 4.3 กรัมต่อลิตร มีปริมาณเบตากลูแคนเท่ากับ 5.6 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยใช้อาหารชนิดเดียวกัน พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวล คือ อัตราการกวน 180 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 บาร์ต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 4.93 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเบตากลูแคนเท่ากับ 6.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ และจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้อาหารชนิดเดียวกัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวล คือ อัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 บาร์ต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ชีวมวลสูงเท่ากับ 5.21 กรัมต่อลิตร

Title	Biomass Production of *Candida tropicalis* from Wastewater for Beta-Glucan Source
Head of research	Assistant Professor Tawatchai Sumpradit, Ph.D.
Keywords	*Candida tropicalis*, Beta-glucan, Wastewater, *Candida*

ABSTRACT

Yeast extract manufacturing wastewater diluted with tap water at ratio 1:1.5, which was adjusted pH to 6.0 without addition of all available yeast nutrients, was used for biomass production of *Candida tropicalis* CT1-01 using as beta-glucan source supplemented in animal feeds. The optimum condition for biomass production in 500 ml of baffled flask was cultivation of yeast in diluted wastewater on rotary shaker at 160 rpm and 35 °C. Biomass obtained was 4.3 g/l and beta-glucan content was 5.6 mg/g cell. The optimum condition for biomass production in 1l of fermentor was cultivation of yeast in diluted wastewater with agitation rate at 180 rpm and aeration rate at 1 vvm at 35 °C. Biomass of *C. tropicalis* CT1-01 produced was 4.93 g/l and beta-glucan content was 6.0 mg/g cell. For biomass production in 10l of fermentor, the optimum condition was cultivation in diluted wastewater and operated agitation rate at 220 rpm, aeration rate at 1.2 vvm and at 35 °C. *C. tropicalis* CT1-01 biomass obtained was 5.21 g/l.

Executive Summary

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ของประเทศไทย ทั้งที่ตั้งอยู่ในเขตและนอกเขตนิคมอุตสาหกรรม คือ การบำบัดน้ำเสีย (Wastewater treatment) ที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมาก นับหลายแสนหรือเกินกว่าล้านบาทต่อปี โดยที่ไม่มีการนำน้ำเสียเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางเทคโนโลยีชีวภาพที่มีมูลค่าเชิงพาณิชย์ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถนำไปทำการตลาด และจัดจำหน่ายเพื่อเพิ่มยอดขายให้แก่บริษัท นอกจากนี้ยังช่วยลดภาระค่าใช้จ่ายในส่วนของการบำบัดน้ำเสียที่เป็นต้นทุนการผลิตของโรงงาน รวมทั้งช่วยรักษาสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติให้ปลอดภัยจากมลพิษของน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม

บริษัท สเปเชี่ยลตี้ไบโอเทค จำกัด ผู้ผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์เพื่อจำหน่ายภายในประเทศ และส่งออกยังต่างประเทศ เป็นบริษัทหนึ่งในหลายบริษัทที่ยังไม่มีแผนการใช้ประโยชน์จากน้ำเสียเป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ ปริมาณน้ำเสียจากกระบวนการผลิตของบริษัทมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์เป็นน้ำล้างเซลล์ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์ หรือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ของบริษัท จากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าในน้ำเสียดังกล่าวมีสารอาหารที่ *Candida tropicalis* ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่แยกจากดินที่เก็บจากป่าดิบเขาของอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว สามารถใช้เพื่อการเจริญและให้ปริมาณชีวมวลสูง โดยไม่ต้องเติมสารอาหารอื่นใดลงไป ปริมาณชีวมวลของ *C. tropicalis* มีปริมาณของ เบตากลูแคนเป็นองค์ประกอบสูงใกล้เคียงกับที่พบเป็นองค์ประกอบของเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งบริษัทใช้ผลิตเบตากลูแคน ดังนั้นแนวทางที่ดีที่สุด คือ การใช้น้ำเสียจากกระบวนการผลิตของบริษัทเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* เพื่อใช้เป็นแหล่งของเบตากลูแคนผสมในอาหารสัตว์ นอกจากจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตยีสต์เอ็กซ์-แทร็กซ์ ของบริษัทจากค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย ยังเป็นแนวทางที่ดีในการนำน้ำเสียซึ่งไม่มีมูลค่าเชิงพาณิชย์มาใช้เป็น วัตถุดิบในการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* เพื่อใช้เป็นแหล่งของเบตากลูแคน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* จากน้ำเสีย เพื่อใช้เป็นแหล่งของเบตากลูแคนผสมในอาหารสัตว์

ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาแนวทางการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* จากน้ำเสีย เพื่อใช้เป็นแหล่งของเบตา-กลูแคนผสมในอาหารสัตว์ โดยศึกษาในระดับ lab and large scales

คุณลักษณะโดยทั่วไปของยีสต์

ยีสต์เป็นเชื้อราที่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว ขนาดของเซลล์แตกต่างกันขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของยีสต์ โดยทั่วไปเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์มีขนาด 1-2 ไมโครเมตร รูปร่างของเซลล์มีหลายแบบ เช่น กลม ค่อนข้างกลม รี รูปไข่ ทรงกระบอก ยาว เส้นสาย หัวและท้ายแหลม มะนาว-ฝรั่ง สามเหลี่ยม และคนโท เป็นต้น (Yarrow, 1998, pp.77-100)

ยีสต์ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบเฮทเทอโรโทรป ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ยีสต์บางสายพันธุ์ดำรงชีวิตแบบซาโพรไฟต์ และพาราไซต์ พบได้โดยทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ และอากาศ นอกจากนี้พบยีสต์ตามส่วนประกอบต่างๆ ของพืช อาจพบยีสต์อยู่ร่วมกับสัตว์ เช่น แมลงบางชนิด ยีสต์ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20 – 30 องศาเซลเซียส พีเอช 3.7 - 3.8 ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจน อย่างไรก็ตามบางสายพันธุ์มีความสามารถในการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับ anaerobic yeasts (Lachance et al., 1999, pp.172-177)

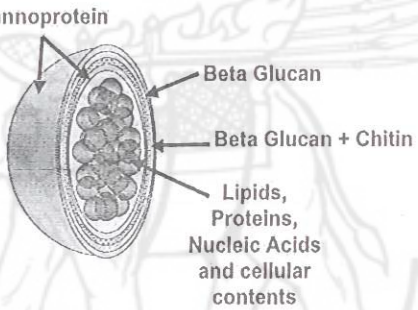
ผนังเซลล์ยีสต์

ผนังเซลล์ของยีสต์เป็นส่วนที่มีความแข็งแรงที่สุดของเซลล์ เป็นส่วนที่ปกป้องเซลล์ และทำให้เซลล์คงรูปร่าง ผนังเซลล์ของยีสต์มีน้ำหนักประมาณ 15-25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ กลูแคน แมนแนน โปรตีน และไลปิด (ตาราง 1 และภาพ 1) ซึ่งมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิด และสายพันธุ์ของยีสต์ (Tomoko et al., 2004, pp. 571-580) ผนังเซลล์ของยีสต์แบ่งออกเป็น 2 ชั้น โดยผนังเซลล์ชั้นนอกประกอบด้วยแมนโนโปรตีน ต่างจากผนังเซลล์ชั้นในที่ประกอบด้วยกลูแคน และไคติน (Kim et al., 2006, pp. 496-500)

ตาราง 1 ปริมาณและองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ยีสต์

องค์ประกอบ	ร้อยละของน้ำหนักแห้ง
แมนแนน	31.0
กลูแคน	30.8
โปรตีน	13.0
ไขมัน	8.5

ที่มา: Lipke et al., 1998, pp. 3735-3740

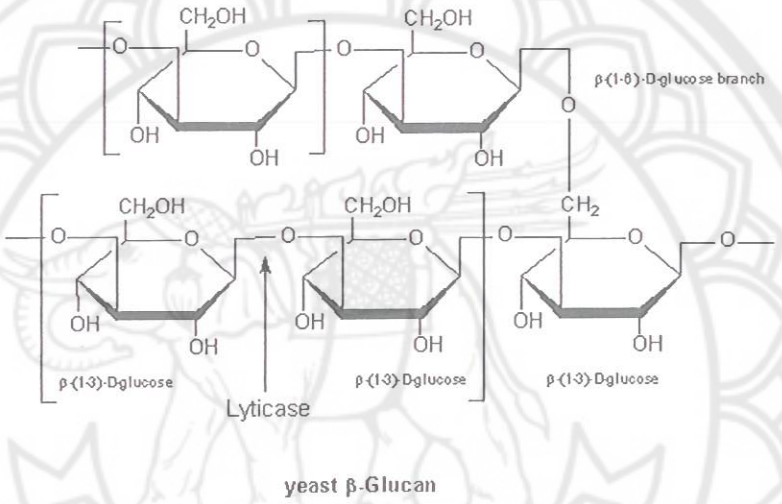


ภาพ 1 โครงสร้างและองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์
ที่มา: http://images.google.co.th

เบตากลูแคน

เบตากลูแคนเป็นองค์ประกอบทางเคมีสำคัญที่พบในผนังเซลล์ของยีสต์ โดยพบประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผนังเซลล์แห้ง เบตากลูแคนแบ่งออกเป็น 2 ชนิด (ภาพ 2) ตามลักษณะของโครงสร้างทางเคมี คือ β-1,3- glucan และ β-1,6- glucan ซึ่งพบประมาณ 85 และ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเบตากลูแคนทั้งหมดของผนังเซลล์ (Nguyen et al., 1998, pp. 206-212) โครงสร้างของ β-1,3- glucan เกิดจากการเชื่อมต่อกันของกลูโคสหลายๆ โมเลกุลด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด β-1,3 ที่บริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 การสังเคราะห์ β-1,3- glucan อาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3- glucan synthase ซึ่งมีกิจกรรมที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทั้งนี้เมื่อสังเคราะห์เสร็จจะเกิดการสานกันเป็นโครงสร้างเส้นใยตาข่ายที่มีการเรียงตัวของ single helix สลับกับ triple helix ของ β-1,3- glucan ซึ่งโครงสร้างนี้มีหน้าที่ให้

ความแข็งแรงต่อผนังเซลล์ และควบคุมการเปลี่ยนแปลงทางด้านสัณฐานวิทยาของเซลล์ยีสต์ สำหรับ β-1,6- glucan เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของกลูโคสหลายๆ โมเลกุล ด้วยพันธะไกลโคซิดิก ชนิด β- 1,6 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กระบวนการสังเคราะห์ β-1,6- glucan ภายในเซลล์ของยีสต์ยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด หน้าที่สำคัญของ β -1,6- glucan เป็นส่วนที่ช่วยเชื่อมองค์ประกอบต่างๆ ของผนังเซลล์เข้าด้วยกันเกิดเป็นโครงสร้างผนังเซลล์ที่มีความแข็งแรง (Kim and Yun, 2006, pp. 496-500)



ภาพ 2 โครงสร้างทางเคมีของเบตากลูแคนของผนังเซลล์ยีสต์

ที่มา: http://images.google.co.th/imgres?imgurl

คุณสมบัติและประโยชน์ของเบตากลูแคน

เบตากลูแคนสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะสัตว์ จากการติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส นอกจากนี้พบว่า เบตากลูแคนมีคุณสมบัติในการต่อต้านการเกิดเซลล์มะเร็ง การเกิดเนื้องอก และต่อต้านกระบวนการกดภูมิคุ้มกันของร่างกายสิ่งมีชีวิต เบตากลูแคนมีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ และสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลประเภท LDL ในร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเบตากลูแคนที่ได้จากผนังเซลล์ของยีสต์สามารถใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เนื่องจากมีคุณสมบัติช่วยเพิ่มความข้น และช่วยในการจับยึดของน้ำและน้ำมันที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร เป็นต้น (Thammakiti et al., 2004, pp. 21-29; Worrasinchai et al., 2006, pp. 68-78) แหล่งที่พบเบตากลูแคน สรุปในตาราง 2

ตาราง 2 แหล่งและปริมาณของเบตากลูแคน

แหล่งของเบตากลูแคน	ปริมาณเบตากลูแคน
แป้งจากข้าวบาร์เลย์	3-7%
แป้งจากข้าวสาลี	น้อย
แป้ง	น้อย
เมล็ดข้าว	< 1%
แป้งจากข้าวโอ๊ต / ข้าวโอ๊ตบด	4%
แป้งจากข้าวโอ๊ตที่ผ่านการไฮโดรไลซ์	5%
เมล็ดข้าวโอ๊ต	> 5.5%
ข้าวโอ๊ตบด	4%
ผนังเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae*	Variable

ที่มา: Valerie, 1998, pp. 361-364

Candida tropicalis และการประยุกต์ใช้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ

C. tropicalis เป็นยีสต์ในกลุ่ม anamorphic ascomycetous yeast ยีสต์ชนิดนี้เป็น type species ของยีสต์สกุล *Candida* แหล่งอาศัยของ *C. tropicalis* คือ ดิน น้ำเสีย ส่วนต่างๆ ของพืชและสัตว์ เป็นต้น ยีสต์ชนิดนี้สามารถใช้วัตถุดิบหลายชนิดเป็นแหล่งอาหารเพื่อการเจริญ เนื่องจากมีเอนไซม์หลายชนิดทั้งที่เป็น extracellular และ intracellular enzymes เช่น carbohydrases, proteases และ lipases เป็นต้น *C. tropicalis* เป็นยีสต์ชนิดหนึ่งในจำนวนยีสต์หลายชนิดที่มนุษย์นำมาใช้ประโยชน์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ (ตาราง 3) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักของ *C. tropicalis* เช่น โปรตีนเซลล์เดียว (Azoulay et al., 1980, pp. 41-47; Adhikari et al., 1990, pp. 72-76; Gupta, Pathak and Tawari, 1990, pp. 55-62) และสารปฏิชีวนะ (Abbasi, Razzaki and Zaidi, 1985, pp. 265-268) เป็นต้น นอกจากนี้ *C. tropicalis* สามารถใช้ในการบำบัดน้ำเสีย โดยเฉพาะน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบ (Zhang et al., 2005, pp. 857-863; Martinez-Garcia et al., 2009, pp. 1398-1405) มีรายงานการใช้ *C. tropicalis* ในการบำบัดน้ำเสียที่มี formaldehyde, phenols, cyanide, thiocyanate, sulfate และ ammonia เป็นองค์ประกอบ (Kumaran, 1984, 112-122) รวมถึงใช้ใน

การย่อยสลายปิโตรเลียม และช่วยย่อยสลายคราบน้ำมันในแหล่งน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ijah, 1998, pp. 293-299)

ตาราง 3 การประยุกต์ใช้ *C. tropicalis* ทางเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลิตภัณฑ์/การนำไปใช้	วัตถุดิบ	อ้างอิง
โปรตีนเซลล์เดียว	กากแอปเปิ้ล	Gupta, Pathak and Tawari, 1990, pp. 55-62
	มันสำปะหลัง	Jamuna and Ramakrishna, 1989, pp. 126-131
	ข้าวโพด	Azoulay et al., 1980, pp. 41-47
	สารประกอบไฮโดรคาร์บอน	Otsuka, Ishii and Katsuya, 1966, pp. 1-11
การบำบัดน้ำเสีย	น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมัน	Ettayebi et al., 2003, pp. 215-219; Fadil et al., 2003, pp. 37-41
	น้ำทิ้งที่มีส่วนประกอบของฟีนอล	Kim et al., 1987, pp. 401-408; Kumaran and Parhad, 1984, pp. 123-135
เอทานอล	ไซโลส	Jeffries, 2004, pp. 213-218
ไซลิทอล	ไซโลส	Walther, Hensirisak, and Agblevor, 2001, pp. 213-220

นอกจากวัตถุดิบที่กล่าวมาข้างต้น *C. tropicalis* สามารถเจริญในน้ำเสียหลายชนิด โดยเฉพาะน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบ (Zhang et al., 2005, pp. 857-863) ตัวอย่างเช่น น้ำเสียจากการผลิตน้ำมันสลัด น้ำเสียจากโรงงานผงชูรส น้ำเสียจากการผลิตน้ำมันพืช และน้ำเสียที่มีฟีนอลและไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ

Zheng et al., 2003, pp. 235-237 ศึกษาประสิทธิภาพของยีสต์ 5 ชนิด คือ *Rhodotorula rubra*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Candida boidinii* และ *Trichosporon cutaneum* ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันสลัด พบว่า *C. tropicalis* สามารถลดค่า COD และลดปริมาณไขมันในน้ำทิ้งดังกล่าวได้ 68 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Ettayebi et al., 2003, pp. 215-219 ใช้ *C. tropicalis* YMEC14 บำบัดน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำมันพืช พบว่า *C. tropicalis* YMEC14 สามารถลดค่า COD ค่าปริมาณโมโน-ฟีนอล (monophenol) และโพลีฟีนอล (polyphenol) เท่ากับ 69.7, 69.2 และ 55.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวนาน 24 ชั่วโมง

Fadil et al., 2003, pp. 37-41 ศึกษาการบำบัดน้ำเสียที่มีโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ โดยใช้ *C. tropicalis* พบว่าภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ค่า COD และ ปริมาณโพลี-ฟีนอล ลดลง 62.8 และ 51.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการบำบัดน้ำเสียชนิดเดียวกันโดยใช้ *Geotrichum* sp. และ *Aspergillus* sp.

Zhang et al., 2005, pp. 857-863 ทดสอบประสิทธิภาพของ *C. tropicalis* ในรูปของเซลล์ที่ถูกตรึง (immobilized cells) ที่แผ่นเซรามิครูปรังผึ้ง เพื่อบำบัดน้ำเสียที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูง โดยเพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมักแบบใช้อากาศ จากผลการศึกษาพบว่าภายหลังการเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* สามารถลดค่า COD ของน้ำเสียลงได้สูงสุด 55 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณชีวมวลที่ได้เท่ากับ 2.6 กรัมต่อลิตร

Martizez-Garcia et al., 2009, pp. 1398–1405 ศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากกระบวน-การผลิตน้ำมันมะกอกโดยใช้ *C. tropicallis* ร่วมกับการใช้หางนมเป็น co-substrate จากผลการทดลองพบว่า น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดด้วย *C. tropicallis* มีค่าซีโอดีลดลง 93 เปอร์เซ็นต์ ในขั้นตอน aerobic pretreatment และหลังจากการบำบัดโดยใช้ anaerobic digestor พบว่า ค่าซีโอดีของน้ำเสียลดลง 83 เปอร์เซ็นต์จากค่าซีโอดีเดิมหลังจากบำบัดด้วย aerobic pretreatment

การผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* และปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตชีวมวล

การผลิตชีวมวลจากยีสต์เพื่อให้ได้ผลผลิตสูง ต้องเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งฟอสฟอรัส ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ เป็นต้น

1. แหล่งคาร์บอนและพลังงาน

ยีสต์เป็นคีโมออร์กาโนโทรฟ ซึ่งต้องใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน สารอินทรีย์ที่ใช้คือน้ำตาล เช่น กลูโคส ฟรุคโตส และแมนโนส นอกจากที่กล่าวมายีสต์ยังสามารถ

ใช้สารประกอบอินทรีย์อื่น เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ยีสต์บางชนิดใช้อัลเคน เช่น *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomycopsis* และ *Schwanniomyces* ส่วนเมทานอลพบว่ามียีสต์บางชนิดโดยเฉพาะ *C. tropicalis* สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้

2. ปริมาณออกซิเจน

ยีสต์จัดเป็น facultative anaerobes คือ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยสภาวะที่มีออกซิเจน ยีสต์สามารถออกซิไดซ์แหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานได้เป็นพลังงานในรูปของ 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

อุณหภูมิเป็นปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญต่อการเจริญของยีสต์ ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ คือ 30-35 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของยีสต์ หากอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึงระดับอุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์เจริญได้การเจริญจะลดลง เนื่องจากอุณหภูมิสูงมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ยีสต์

4. พีเอช

พีเอชมีผลต่อกิจกรรมของเซลล์ยีสต์ เนื่องจากเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนภายในเซลล์ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชภายนอกเซลล์ อาจมีผลต่อโครงสร้างและสภาพซึมผ่านได้ของเซลล์ยีสต์ (Yeast cell permeability) อย่างไรก็ตามพีเอชต่ำมีผลช่วยลดหรือป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์กลุ่มอื่น โดยเฉพาะแบคทีเรียหลายชนิดระหว่างการผลิตชีวมวลของยีสต์ โดยปกติพีเอชที่เหมาะสมของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงยีสต์อยู่ในช่วง 4.0-5.0 (Danilov and Ekelund, 2001, pp. 549-554; Zhang et al., 2005, pp. 857-863)

5. การเกิดฟอง

การเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มีอัตราการกวนสูง มีผลต่อการเกิดฟองอากาศบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ประสิทธิภาพในการแพร่ซึมผ่านของออกซิเจนสู่เซลล์ยีสต์ลดลง

ระเบียบวิธีวิจัย

1. ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา คือ *Candida tropicalis* CT1-01 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 *C. tropicalis* CT1-01

4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01 ในอาหาร YM (yeast extract malt extract) agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อดังกล่าวลงในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์รูปกรวยบาฟเฟิลขนาด 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, 1:1.5 และ 1:2 ปรับพีเอชเป็น 3.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 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 และคำนวณค่าผลผลิตต่อหน่วยเวลาจำเพาะ (Specific productivity)

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 และ 200 รอบต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง และคำนวณค่าผลผลิตต่อหน่วยหน่วยเวลาจำเพาะ

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, 37, 40 และ 42 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเหมาะสม (พิจารณาจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 4.3) นาน 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง และคำนวณค่าผลผลิตต่อหน่วยเวลาจำเพาะ

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 เก็บ

ตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง และคำนวณค่าผลผลิตต่อหน่วยเวลาจำเพาะ

5. การผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 จากน้ำเสียโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบงวดเดียว 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 วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณเบตากลูแคนตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Thammakiti et al., 2004, pp. 21-29 และ Megazyme, 2008

6. การผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 จากน้ำเสียโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบงวดเดียว 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 และปริมาณ เบตากลูแคนตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Thammakiti et al., 2004, pp. 21-29 และ Megazyme, 2008

7. การผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 จากน้ำเสียโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบงวดเดียว 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 และปริมาณ เบตากลูแคนตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Thammakiti et al., 2004, pp. 21-29 และ Megazyme, 2008

8. การวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย หลังการเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01

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

เนื้อหางานวิจัย

การวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย

ผลการวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ พบว่า น้ำเสียมีค่าพีเอช 5.5 ค่าซีโอดี 108,928 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าบีโอดี 38,973 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งแขวนลอย 159.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณสารประกอบไนโตรเจน 23.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 1.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 3.2 กรัมต่อลิตร และค่า C:N ratio เท่ากับ 14.2:1 (ตาราง 4) ซึ่งค่าพารามิเตอร์ของน้ำเสียดังกล่าว โดยเฉพาะค่าซีโอดีและบีโอดี มีค่าสูงมากกว่าค่ามาตรฐานน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม (กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำเสียจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม พ.ศ. 2539, 13 กุมภาพันธ์ 2539, หน้า 85-89)

ตาราง 4 คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย

พารามิเตอร์	หน่วย	ผลวิเคราะห์
พีเอช	-	5.5
ซีโอดี	มิลลิกรัมต่อลิตร	108,928
บีโอดี	มิลลิกรัมต่อลิตร	38,973
ปริมาณของแข็งแขวนลอย	มิลลิกรัมต่อลิตร	159.1
ปริมาณสารประกอบไนโตรเจน	มิลลิกรัมต่อลิตร	23.9
ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด	มิลลิกรัมต่อลิตร	1.3
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	กรัมต่อลิตร	3.2
C:N ratio	-	14.2:1

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 จากน้ำเสียโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบงวดเดียว (batch culture)

1. อัตราการเจือจางน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล

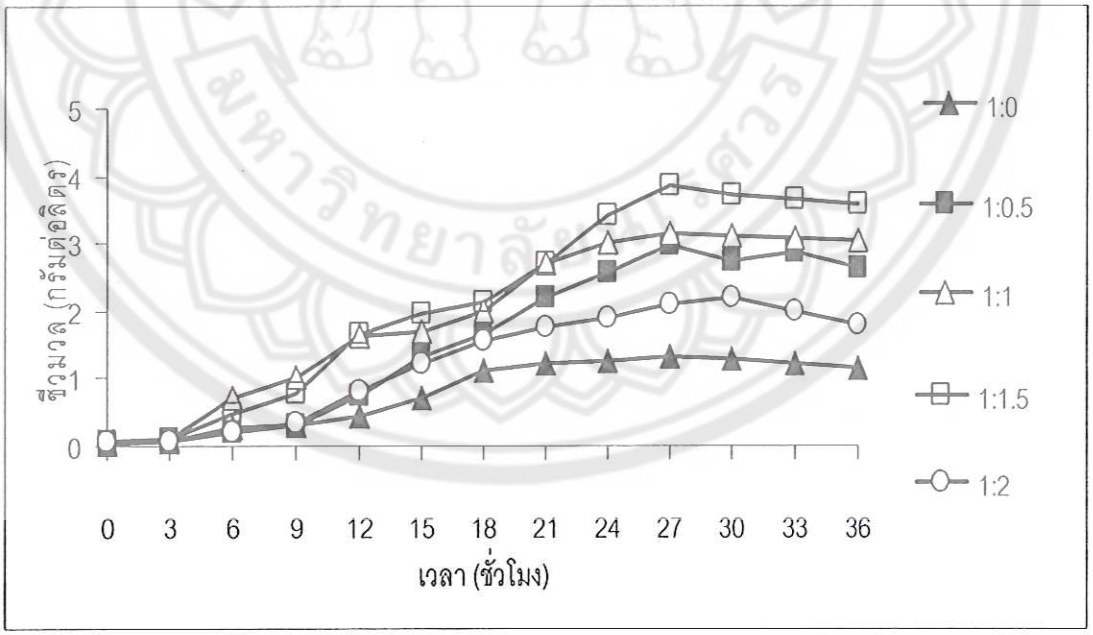
จากผลการทดลอง พบว่า *C. tropicalis* CT1-01 เจริญได้สูงสุด (พิจารณาจากอัตราการเจริญสูงสุด และปริมาณชีวมวลสูงสุดที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักแห้งต่อหนึ่งหน่วยเวลา) เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ที่เจือจางด้วยน้ำประปา อัตราการเจือจางเท่ากับ 1:1.5 โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.31 ต่อชั่วโมง ค่าผลผลิตต่อหน่วยเวลาจำเพาะ 2.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 3.84 กรัมต่อลิตร (ตาราง 5 และภาพ 3) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า หากความเข้มข้นของปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียต่ำเกินไป ปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้จะลดลงเนื่องจากปริมาณสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญของ *C. tropicalis* หากความเข้มข้นของปริมาณสารอินทรีย์สูงเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญของ *C. tropicalis* ทำให้ปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ลดลงเช่นกัน

ตาราง 5 พารามิเตอร์จากการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ในน้ำเสียที่อัตราการเจือจางแตกต่างกัน

อัตราการเจือจาง	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	ผลผลิตต่อหน่วยเวลาจำเพาะ*	ปริมาณชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	พีเอช**
1:0	0.12	0.9	1.32	3.8
1:0.5	0.20	1.5	2.97	3.7
1:1	0.10	1.4	3.13	3.2
1:1.5	0.31	2.3	3.84	2.9
1:2	0.21	1.3	2.20	2.7

* หน่วย คือ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

** พีเอชของน้ำเสียที่ผ่านการเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01 นาน 36 ชั่วโมง



ภาพ 3 ปริมาณชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ผลิตจากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:0, 1:0.5, 1:1, 1:1.5 และ 1:2 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง

2. ความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล

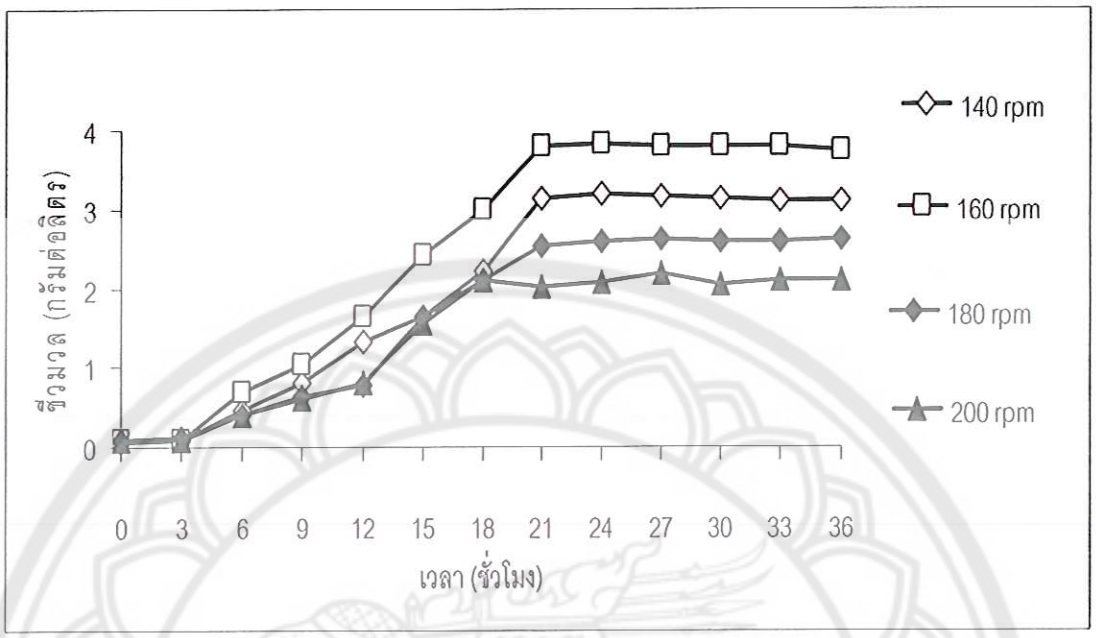
จากผลการทดลอง พบว่า *C. tropicalis* CT1-01 เจริญได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 1:1.5 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที โดยค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.43 ต่อชั่วโมง ค่าผลผลิตต่อหน่วยเวลาจำเพาะ 2.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 3.89 กรัมต่อลิตร (ตาราง 6 และภาพ 4) ซึ่งอัตราความเร็วรอบที่ใช้มีผลในการเพิ่มอัตราการดูดซึมออกซิเจนให้แก่ *C. tropicalis* โดยยีสต์ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน ของกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ทำให้ได้ปริมาณ ATP สูง ซึ่งเหมาะสมและพอเพียงต่อการสังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆของเซลล์ยีสต์ผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ต่างๆภายในเซลล์ (Rydin, Molin, and Nilsson, 1990, pp. 473-476)

ตาราง 6 พารามิเตอร์จากการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ในน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:1.5 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบแตกต่างกัน

ความเร็ว (รอบต่อนาที)	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	ผลผลิตต่อหน่วยเวลาจำเพาะ*	ปริมาณชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	พีเอช**
140	0.30	2.0	3.19	2.5
160	0.43	2.1	3.89	2.9
180	0.33	1.03	2.61	2.4
200	0.33	0.95	2.19	2.4

* หน่วย คือ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

** พีเอชของน้ำเสียที่ผ่านการเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01 นาน 36 ชั่วโมง



ภาพ 4 ปริมาณชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ผลิตจากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปา อัตราส่วน 1:1.5 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 140, 160, 180 และ 200 รอบต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง

3. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล

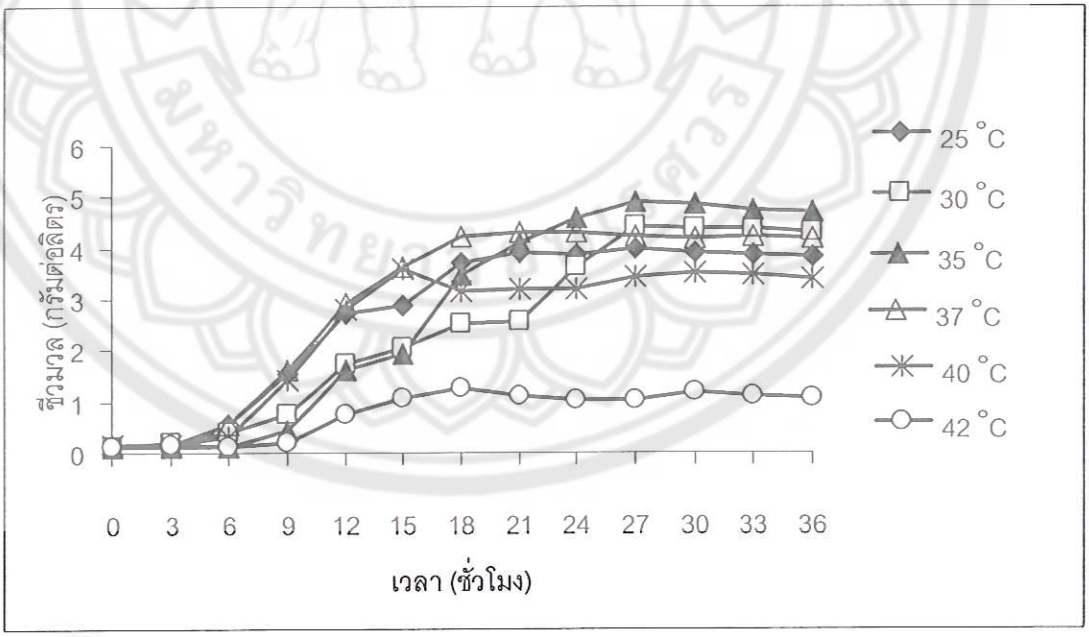
จากผลการทดลอง พบว่า *C. tropicalis* CT1-01 เจริญได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปา ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 1:1.5 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.64 ต่อชั่วโมง ค่าผลผลิตต่อหน่วยเวลาจำเพาะ 1.7 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 4.88 กรัมต่อลิตร (ตาราง 7 และภาพ 5) เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *C. tropicalis* CT1-01 โดยเอนไซม์ภายในเซลล์ยีสต์ที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอไลซ์สารอาหารที่พบในน้ำเสียที่ใช้เพาะเลี้ยง มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ของ *C. tropicalis* (Kurtzman and Fell, 1998, pp. 563-564)

ตาราง 7 พารามิเตอร์จากการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ในน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปา อัตราส่วน 1:1.5 ควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	ผลผลิตต่อหน่วยเวลาจำเพาะ*	ปริมาณชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	พีเอช**
25	0.61	1.1	3.98	3.2
30	0.41	1.6	4.42	2.9
35	0.64	1.7	4.88	3.8
37	0.61	0.9	4.31	3.2
40	0.54	0.7	3.61	3.1
42	0.21	0.3	1.19	4.0

* หน่วย คือ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

** พีเอชของน้ำเสียที่ผ่านการเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01 นาน 36 ชั่วโมง



ภาพ 5 ปริมาณชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ผลิตจากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปา อัตราส่วน 1:1.5 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 25, 30, 35, 40 และ 42 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง

4. พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล

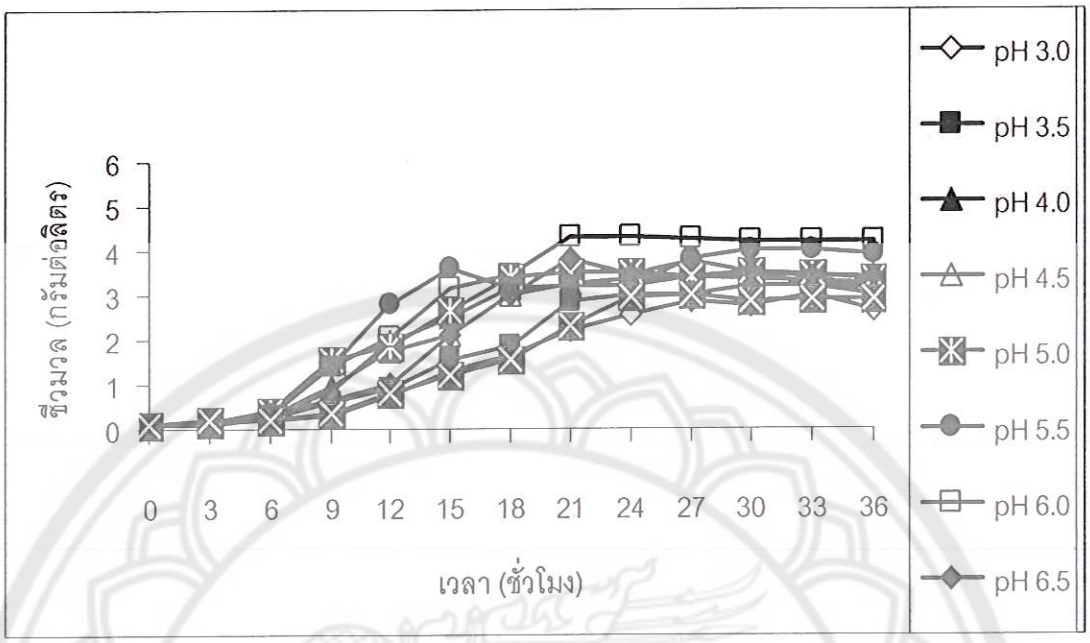
จากผลการทดลอง พบว่า *C. tropicalis* CT1-01 เจริญได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปา ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 1:1.5 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที โดยค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียที่เหมาะสม คือ 6.0 ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.61 ต่อชั่วโมง ค่าผลผลิตต่อหน่วยเวลาจำเพาะ 2.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 4.31 กรัมต่อลิตร (ตาราง 8 และภาพ 6) โดยพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียที่สูงหรือต่ำกว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์มีผลยับยั้งกิจกรรมในเอนไซม์ในเซลล์ยีสต์ เนื่องจากสภาพความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์โดยเฉพาะบริเวณโปรโตพลาสซึมเปลี่ยนแปลงไป (Zhang, et al., 2005, pp. 857-863)

ตาราง 8 พารามิเตอร์จากการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ในน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:1.5 ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

พีเอช	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	ผลผลิตต่อหน่วยเวลาจำเพาะ*	ปริมาณชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	พีเอช**
3.0	0.28	0.9	2.98	2.5
3.5	0.31	1.2	3.22	2.9
4.0	0.55	1.4	3.51	4.4
4.5	0.52	1.3	3.41	4.5
5.0	0.60	1.6	3.52	4.9
5.5	0.55	1.5	3.99	5.6
6.0	0.61	2.0	4.31	5.8
6.5	0.51	1.8	3.81	6.2
7.0	0.26	1.1	2.98	6.1

* หน่วย คือ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

** พีเอชของน้ำเสียที่ผ่านการเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01 นาน 36 ชั่วโมง

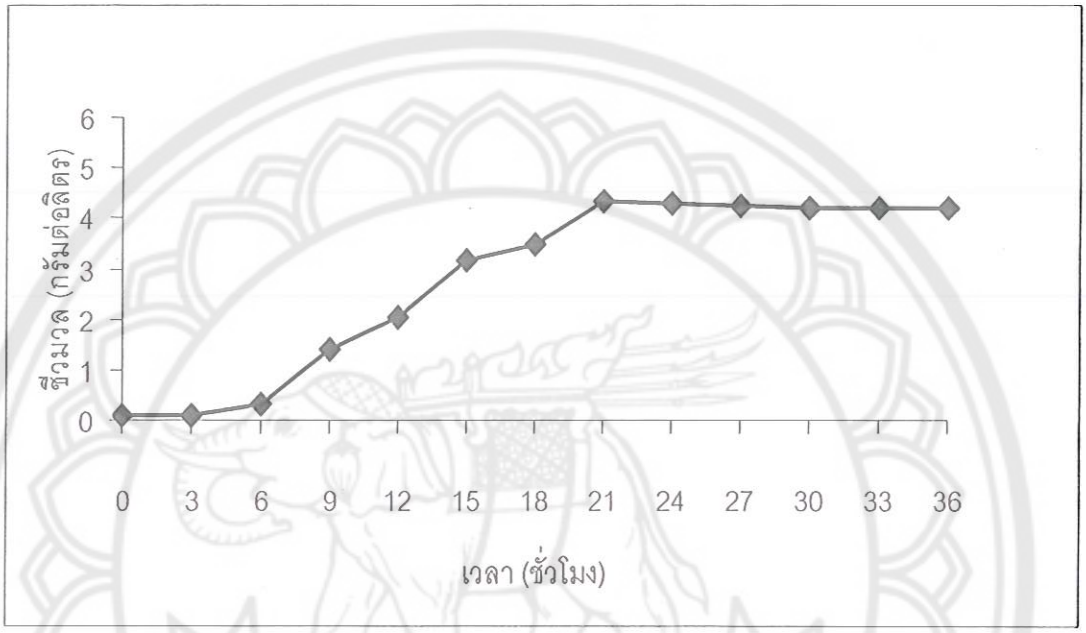


ภาพ 6 ปริมาณชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ผลิตจากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปา อัตราส่วน 1:1.5 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง

การผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 จากน้ำเสียโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบงวด-เดียวในฟลาสก์รูปกรวยบาฟเฟิล ขนาด 500 มิลลิลิตร

จากผลการทดลอง พบว่า ปริมาณชีวมวลสูงสุดของ *C. tropicalis* CT1-01 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:1.5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์รูปกรวยบาฟเฟิล บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที นาน 18 ชั่วโมง มีปริมาณชีวมวลเท่ากับ 2.84 กรัมต่อลิตร (ภาพ 7) โดยมีปริมาณเบตากลูแคนเท่ากับ 5.6 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ โดยระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง เซลล์ยีสต์เข้าสู่ early stationary phase ซึ่งระยะดังกล่าวเป็นระยะที่เซลล์ยีสต์มีปริมาณเบตากลูแคนสูงสุด เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์เบตากลูโคไคเนสอยู่ในระดับต่ำ หากพ้นเข้าสู่ระยะ mid stationary phase ประกอบกับปริมาณกลูโคสในอาหารมีน้อยมาก ทำให้การแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างสร้างเอนไซม์เบตากลูโคไคเนสสูงขึ้น มีผลทำให้เซลล์มีกิจกรรมของเอนไซม์เบตากลูโคไค-เนสสูงขึ้น ส่งผลต่อปริมาณเบตากลูแคนที่ผนังเซลล์จะลดลง เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวจะย่อยเบตากลูแคนที่ผนังเซลล์ สำหรับเซลล์ยีสต์ที่เจริญในระยะ exponential phase แม้จะมีอัตราการ

เจริญจำเพาะสูงสุด เนื่องจากเป็นระยะที่เซลล์กำลังเจริญ มีการนำสารเข้าสู่เซลล์ และมีการแตกหน่อเพื่อเพิ่มจำนวน ดังนั้นผนังเซลล์ของยีสต์ในระยะนี้จะยังไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้เบตากลูแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์มีความไม่สมบูรณ์ และมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับระยะ early stationary phase (Kim et al.,2006, pp. 496-500)



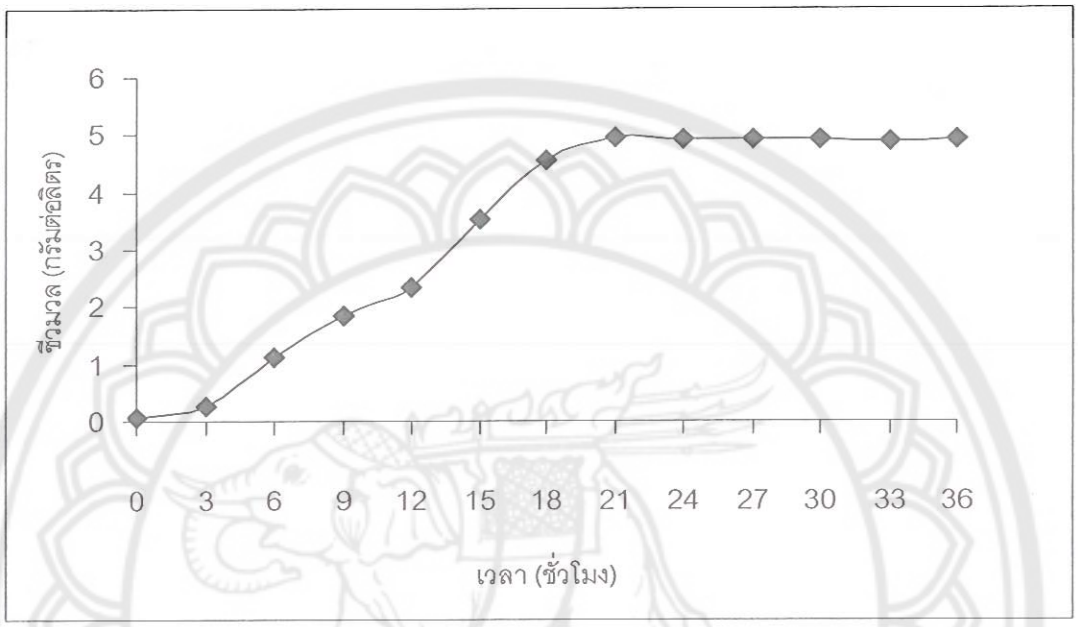
ภาพ 7 ปริมาณชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ผลิตจากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:1.5 พีเอช 6.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 ต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง

การผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 จากน้ำเสียโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบงวดเดียวในถังหมักขนาด 1 และ 10 ลิตร

1. การผลิตชีวมวลในถังหมักขนาด 1 ลิตร

จากผลการทดลองพบว่า การผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงในน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:1.5 อัตราการกวน 180 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.69 ต่อชั่วโมง ค่าผลผลิตต่อหน่วยเวลาจำเพาะ 2.7 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้ปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 4.93 กรัมต่อลิตร (ภาพ 8) ปริมาณเบตากลูแคนสูงสุด เท่ากับ 6.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงใน baffled-flask เนื่องจากการให้อากาศ และอัตราการกวนเหมาะสม ทำให้ oxygen transfer rate มีค่าสูง

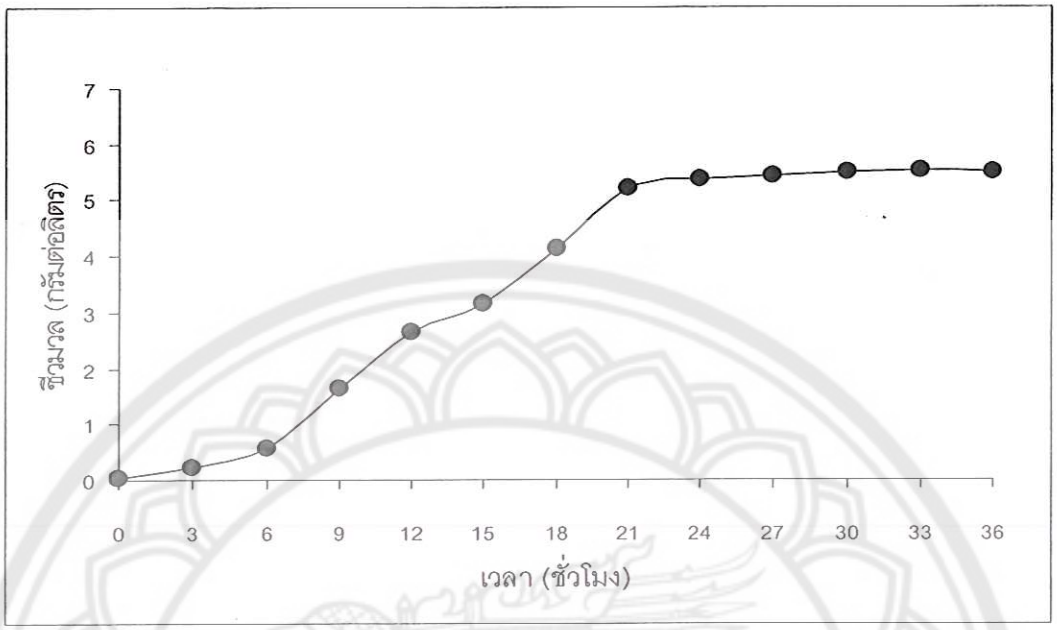
ส่งผลให้ยีสต์ได้รับปริมาณออกซิเจนมากเพียงพอในการสังเคราะห์ ATP จากกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ซึ่ง ATP ที่ได้รับมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆของเซลล์ผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ของเซลล์ *C. tropicalis* CT1-01



ภาพ 8 ปริมาณชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ผลิตจากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:1.5 พีเอช 6.0 เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 1 ลิตร อัตราการกวน 180 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง

2. การผลิตชีวมวลในถังหมักขนาด 10 ลิตร

จากการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ในน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:1.5 อัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 vvm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.78 ต่อชั่วโมง ค่าผลผลิตต่อหน่วยเวลาจำเพาะ 3.9 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 5.21 กรัมต่อลิตร (ภาพ 9) ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงใน baffled-flask และถังหมักขนาด 1 ลิตร เนื่องจากการให้อากาศ และอัตราการกวนเหมาะสม ทำให้ oxygen transfer rate มีค่าสูง ส่งผลให้ยีสต์สังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆของเซลล์ผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ของเซลล์ *C. tropicalis* CT1-01 ได้สูง ส่งผลให้ปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้เพิ่มขึ้น



ภาพ 9 ปริมาณชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ผลิตจากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:1.5 พีเอช 6.0 เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร อัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 vvm ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง

การผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 จากน้ำเสียโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบงวดเดียว ในถังหมักขนาด 1,000 และ 8,500 ลิตร

ทดลองผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 จากน้ำเสียเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:1.5 ในถังหมักขนาด 1,000 และ 8,500 ลิตร ภายในโรงงานของบริษัท สเปเชี่ยลตี้ไบโอเทค จำกัด พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวในถังหมักขนาด 1,000 และ 8,500 ลิตร นาน 6 ชั่วโมง จะมีการสะสมของความร้อนภายในถังหมัก วัดอุณหภูมิภายในถังหมักได้ 45 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ นาน 12 ชั่วโมง อุณหภูมิภายในถังหมักขนาด1,000 ลิตร เพิ่มสูงถึง 60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้จากการวัดการเจริญของยีสต์ในรูปของชีวมวลที่ผลิตได้ พบว่าเกิดการลดลงของปริมาณชีวมวลอย่างต่อเนื่อง กล่าวอีกนัยหนึ่ง คือ อัตราการเจริญของยีสต์ลดลง ทั้งนี้ถังหมักขนาด 1,000 และ 8,500 ลิตร ขาดระบบหล่อเย็น (Cooling system) ทำให้เกิดปัญหาในการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 เพราะมีการสะสมของความร้อนภายในถังหมักสูงมากกว่าระดับอุณหภูมิสูงสุดที่ *C. tropicalis* CT1-01 สามารถเจริญได้

คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย หลังการเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01

ผลการวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ หลังจากเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01 นาน 36 ชั่วโมง พบว่า น้ำเสียมีค่าพีเอช 5.8 ค่าซีโอดี 17,280 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าบีโอดี 4,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็ง-แขวนลอย 22 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณสารประกอบไนโตรเจน 8.28 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.4 กรัมต่อลิตร และ C:N ratio เท่ากับ 9:1 (ตาราง 9) และจากการเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ ก่อนใช้เพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01 (ตาราง 10) พบว่า *C. tropicalis* CT1-01 เป็นยีสต์ที่มีศักยภาพสูงในการบำบัดน้ำเสียดังกล่าว พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ที่ลดลงของค่าซีโอดี และบีโอดี เท่ากับ 83.1 และ 88.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตาราง 9 คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย หลังการเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01 นาน 36 ชั่วโมง

พารามิเตอร์	หน่วย	ผลวิเคราะห์
พีเอช	-	5.8
ซีโอดี	มิลลิกรัมต่อลิตร	17,280
บีโอดี	มิลลิกรัมต่อลิตร	4,500
ปริมาณของแข็งแขวนลอย	มิลลิกรัมต่อลิตร	22
ปริมาณสารประกอบไนโตรเจน	มิลลิกรัมต่อลิตร	8.28
ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด	มิลลิกรัมต่อลิตร	0.60
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	กรัมต่อลิตร	0.40
C:N ratio	-	9:1

ตาราง 10 คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย ก่อนและหลังการเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01 นาน 36 ชั่วโมง

พารามิเตอร์	ก่อนเพาะเลี้ยง	หลังเพาะเลี้ยง
พีเอช	5.5	5.8
ซีโอดี[a]	108,928	17,280
บีโอดี[a]	38,973	4,500
ปริมาณของแข็งแขวนลอย[a]	159.1	22
ปริมาณสารประกอบไนโตรเจน[a]	23.9	8.28
ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด[a]	1.3	0.60
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์[b]	3.2	0.40
C:N ratio	14.2:1	9:1

หมายเหตุ: [a] หน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร , [b] หน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

สรุปผลการวิจัย

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ในฟลาสก์รูปกรวยบาฟเฟิล ขนาด 500 มิลลิลิตร คือ เพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่เจือจางด้วยน้ำประปาในอัตราส่วน 1:1.5 พีเอช 6.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ได้ปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 4.3 กรัมต่อลิตร มีปริมาณเบตากลูแคน 5.6 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ในถังหมักขนาด 1 ลิตร คือ เพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่เจือจางด้วยน้ำประปาในอัตราส่วน 1:1.5 พีเอช 6.0 ควบคุมอัตราการกวน 180 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 4.93 กรัมต่อลิตร พบปริมาณเบตากลูแคน 6.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร คือ เพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่เจือจางด้วยน้ำประปาในอัตราส่วน 1:1.5 พีเอช 6.0 ควบคุมอัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 vvm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 5.21 กรัมต่อลิตร

การผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 จากน้ำเสียของกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์-แทร็กซ์ เพื่อใช้เป็นแหล่งของเบตากลูแคน เป็นทางเลือกที่ค่อนข้างเหมาะสมต่อ บริษัท สเปเชี่ยลตี้-ไบโอเทค จำกัด เนื่องจากสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีค่าเชิงพาณิชย์ คือ เบตากลูแคนจากน้ำเสียที่ปราศจากมูลค่า และไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการบำบัดค่อนข้างสูง โดยสามารถลดค่าซีโอดี และบีโอดี ลงได้ร้อยละ 83.1 และ 88.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

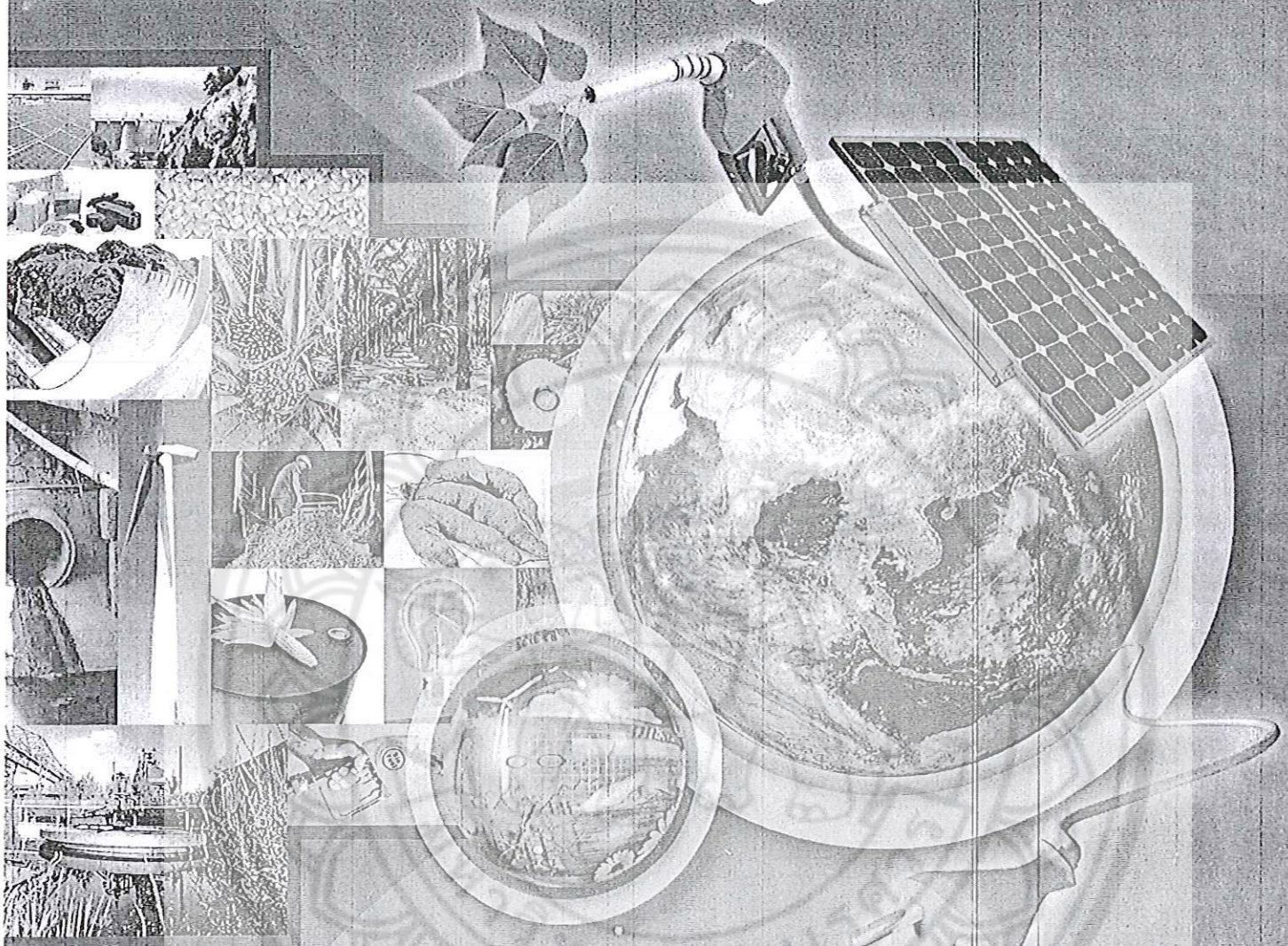
1. ควรศึกษาวิจัยโดยเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01 ร่วมกับยีสต์ชนิดอื่น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย
2. ควรวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีก่อนและหลังการใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ ภายใต้ความร่วมมือกับหน่วยงานวิจัยอื่น

Output ที่ได้จากโครงการ

ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* ในระดับ Lab-scale ซึ่งพร้อมขยายสู่ภาคอุตสาหกรรมที่สนใจร่วมโครงการวิจัยในอนาคต

ภาคผนวก

รายละเอียดของงานวิจัยบางส่วนได้รับการนำเสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติ เรื่อง การจัดการของเสีย และพลังงานทางเลือกในสภาวะโลกร้อน ระหว่างวันที่ 11-12 กุมภาพันธ์ 2553 ณ. โรงแรม เจ บี หาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จัดโดยคณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ร่วมกับศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย หัวข้อการนำเสนอด้วยวาจา (Oral presentation) คือ การผลิตชีวมวลของ *Candida tropicalis* จากน้ำ-ทิ้งของกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์เพื่อใช้เป็นแหล่งของเบตากลูแคน



เอกสารประกอบการประชุมวิชาการระดับชาติ

การจัดการของเสียและพลังงานทางเลือก
ในสภาวะโลกร้อน : โอกาสและความท้าทาย

วันที่ 11-12 กุมภาพันธ์ 2553

ณ โรงแรม เจ พี อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

จัดโดย คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ร่วมกับ
ศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย

การผลิตชีวมวลของ *Candida tropicalis* จากน้ำทิ้งของกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์เพื่อใช้เป็นแหล่งของเบตากลูแคน

Production of *Candida tropicalis* Biomass from Yeast Extract Manufacturing Wastewater for Using as Beta-Glucan Source

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

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

บทคัดย่อ

เพาะเลี้ยง *Candida tropicalis* CT1-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำทิ้งของกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ เจือจางด้วยน้ำประปาในอัตราส่วน 1:1.5 โดยไม่เติมสารอาหารอื่นลงไป เพื่อผลิตชีวมวลที่ใช้เป็นแหล่งของเบตากลูแคนผสมในอาหารสัตว์ จากผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลของยีสต์ใน baffled-flask ขนาด 500 มิลลิลิตร คือ การเพาะเลี้ยงและบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 4.31 กรัมต่อลิตร พบปริมาณเบตากลูแคนเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 56 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้น้ำทิ้งชนิดเดียวกัน พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวล คือ อัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 บาร์ต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 5.21 กรัมต่อลิตร พบปริมาณเบตากลูแคนเท่ากับ 61 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้ยังสามารถลดค่าซีโอดีและบีโอดีได้ 84.1 และ 88.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

คำหลัก: เบตากลูแคน, *Candida tropicalis*, ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์, น้ำทิ้ง

Abstract

To produce yeast biomass for using as beta-glucan source that will be added in animal feed, a strain of *Candida tropicalis*, CT1-01, was cultivated in yeast extract manufacturing wastewater diluted with tap water (1:1.5). The highest yeast biomass produced in 500 mL of baffled flask was 4.31 g/l and its beta-glucan was 56 mg/g cell dry weight when the experimental flasks were incubated on rotary shaker at 160 rpm and at 35 °C. For biomass production in 10 L of fermentor, fermentation temperature was controlled at 35 °C combined with agitation rate at 220 rpm and aeration rate at 1.2 vvm, the highest yeast biomass produced was 5.21 g/l and its beta-glucan was 61 mg/g cell dry weight.

Keywords: Beta-glucan, *Candida tropicalis*, Yeast extract, Wastewater

1. บทนำ

ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ของประเทศไทย ทั้งที่ตั้งอยู่ในเขตและนอกเขตนิคมอุตสาหกรรม คือ การบำบัดน้ำทิ้งที่มีค่าใช้จ่ายสูง โดยที่ไม่มีการนำน้ำทิ้งเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางเทคโนโลยีชีวภาพที่มีมูลค่าเชิงพาณิชย์ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้นอกจากสามารถนำไปทำการตลาดและจัดจำหน่ายเพื่อเพิ่มยอดขายให้แก่บริษัท ยังช่วยลดภาระค่าใช้จ่ายในส่วนของการบำบัดน้ำทิ้งที่เป็นต้นทุนการผลิตของโรงงาน รวมทั้งช่วยรักษาสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติให้ปลอดภัยจากมลพิษของน้ำทิ้งที่มาจากโรงงานอุตสาหกรรม จากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่า น้ำทิ้งของกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์มีสารอาหารที่ *Candida tropicalis* CT1-01 สามารถใช้เพื่อการเจริญ โดยไม่ต้องเติมสารอาหารอื่นใดลงในน้ำทิ้ง ชีวมวลของยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีปริมาณของเบตากลูแคนเป็นองค์ประกอบบริเวณผนังเซลล์ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งของเบตากลูแคนผสมในอาหารสัตว์ เบตากลูแคนเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ยีสต์ พบมากถึง 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของยีสต์ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ตลอดจนสภาวะที่ใช้ในกระบวนการเพาะเลี้ยง (Nguyen *et al.*, 1998) ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา มีรายงานการใช้ประโยชน์เบตากลูแคนจำนวนมาก เนื่องจากเบตากลูแคนมีคุณสมบัติกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสิ่งมีชีวิต โดยป้องกันการติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส นอกจากนี้ เบตากลูแคนมีคุณสมบัติต่อต้านการเกิดเซลล์มะเร็งและเนื้องอก ตลอดจนต่อต้านกระบวนการกด

ภูมิคุ้มกันของร่างกายสิ่งมีชีวิต (Bohn *et al.*, 1995) รวมทั้งมีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูล-อิสระ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ และสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลประเภท LDL ในร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเบตากลูแคนที่ได้จากผนังเซลล์ของยีสต์มีประสิทธิภาพมากกว่าเบตากลูแคนที่ได้จากแหล่งอื่น (Kim *et al.*, 2006)

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา

Candida tropicalis CT1-01 สายพันธุ์ที่แยกจากดินป่าไม้ของอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ จากโรงงานผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ ที่ตั้งอยู่ในเขตนิคมอุตสาหกรรมอมตะนคร จังหวัดชลบุรี

2.3 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้ง

วิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้ง ก่อนใช้เตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ และหลังจากการเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01 โดยวิเคราะห์พารามิเตอร์ที่สำคัญ คือ Chemical oxygen demand (COD), Biological oxygen demand (BOD), ปริมาณของแข็งแขวนลอย (Suspended Solids, SS), ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total phosphorus, TP) และพีเอช โดยใช้วิธีการใน Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA *et al.*, 1985)

2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 จากน้ำทิ้ง

2.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะเชื้อยีสต์ *C. tropicalis* CT1-01 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 อัตราการเจือจางน้ำทิ้งที่เหมาะสม

เพาะกล้าเชื้อยีสต์ที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 2.4.1 ในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ที่เจือจางด้วยน้ำประปาที่อัตราส่วน 1:0.5, 1:1, 1:1.5 และ 1:2 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุใน baffled flask ขนาด 500 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการกำจัดเชื้อโดยเทคนิค sterilization) โดยให้ค่าความขุ่นเริ่มต้นของน้ำทิ้งที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 1.0 ปริมาณ 5% บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ปริมาณชีวมวลที่ได้เป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ทุก 3 ชั่วโมง นาน 36 ชั่วโมง

2.4.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม

เพาะกล้าเชื้อที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 2.4.1 ในน้ำทิ้งเจือจางปริมาตร 200 มิลลิลิตร (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 2.4.2) 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, 40 และ 42 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ปริมาณชีวมวลที่ได้เป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ทุก 3 ชั่วโมง นาน 36 ชั่วโมง

2.4.4 ความเร็วรอบที่เหมาะสม

เพาะกล้าเชื้อที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 2.4.1 ในน้ำทิ้งเจือจาง (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 2.4.2) ปริมาตร 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 และ 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 2.4.3) เก็บตัวอย่าง และวิเคราะห์ปริมาณชีวมวลที่ได้เป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ทุก 3 ชั่วโมง นาน 36 ชั่วโมง

2.5 การผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* ใน baffled flask และถังหมัก

2.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมตามวิธีการในข้อ 2.4.1

2.5.2 การผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* ใน baffled flask ขนาด 500 มิลลิลิตร

เพาะกล้าเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ 2.5.1 ในน้ำทิ้งเจือจาง (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 2.4.2) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 บรรจุใน baffled flask ขนาด 500 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยเทคนิค sterilization) โดยให้ค่าความขุ่นเริ่มต้นของน้ำทิ้งที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 1.0 ปริมาณ 5% บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ และความเร็วรอบให้เหมาะสม (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 2.4.3 และ 2.4.4) เก็บตัวอย่าง วิเคราะห์ปริมาณชีวมวลที่ได้เป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ทุก 3 ชั่วโมง นาน 36 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณเบตากลูแคนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์

2.5.3 การผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

เพาะกล้าเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ 2.5.1 ในน้ำทิ้งปริมาตร 4 ลิตร บรรจุในถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยเทคนิค sterilization นาน 30 นาที โดยให้ค่าความขุ่นเริ่มต้นของน้ำทิ้งที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 1.0 ปริมาณ 5% ควบคุมอัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 บาร์ต่อนาที และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง และวิเคราะห์ปริมาณชีวมวลที่ได้เป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ทุก 3 ชั่วโมง นาน 36 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณเบตากลูแคนที่

เป็นองค์ประกอบของเซลล์

2.6 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียที่ผ่านการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis*

วิเคราะห์การเจริญของยีสต์ *C. tropicalis* CT1-01ในรูปของชีวมวลที่ผลิตได้จากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามวิธีการของ Mrvčić *et al.*, (2007) และวิเคราะห์ปริมาณเบตากลูแคนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ ตามวิธีของ Thammakiti *et al.* (2004)

3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งก่อนใช้เพาะเลี้ยงยีสต์

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ (ตารางที่ 1) พบว่า น้ำทิ้งมีค่าพีเอช 5.4 ค่าบีโอดี 38,973 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าซีโอดี 108,928 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าปริมาณของแข็งแขวนลอย 35 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 1.3 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการวิเคราะห์ชี้ให้เห็นว่าน้ำทิ้งมีสารอินทรีย์ และอนินทรีย์เป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง สารอินทรีย์สำคัญที่พบในน้ำทิ้ง คือ แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ เอสเทอร์ สารประกอบฟีนอล และฟลาโวนอยด์ (Barker *et al.*, 1982; Ćeslova *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตาม สารอินทรีย์กลุ่มดังกล่าว *C. tropicalis* CT1-01 น่าจะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีสำหรับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *C. tropicalis*

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำทิ้งก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ *C. tropicalis* CT1-01

พารามิเตอร์	หน่วย	ก่อน*	หลัง**
พีเอช	-	5.4	5.8
COD	มิลลิกรัมต่อลิตร	108,928	17,280
BOD	มิลลิกรัมต่อลิตร	38,973	4,500
SS	มิลลิกรัมต่อลิตร	35	22
TP	มิลลิกรัมต่อลิตร	1.3	0.6

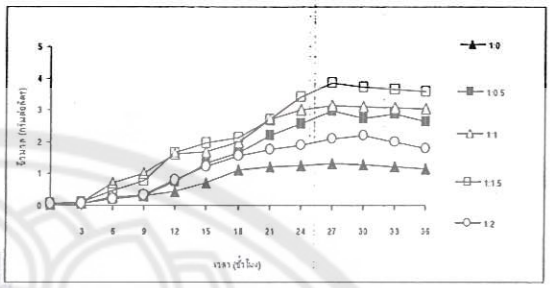
* คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำทิ้งก่อนการเพาะเลี้ยง

** คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำทิ้งเพาะเลี้ยงยีสต์ *C. tropicalis* CT1-01 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 จากน้ำทิ้ง

3.2.1 อัตราการเจือจางน้ำทิ้งที่เหมาะสม

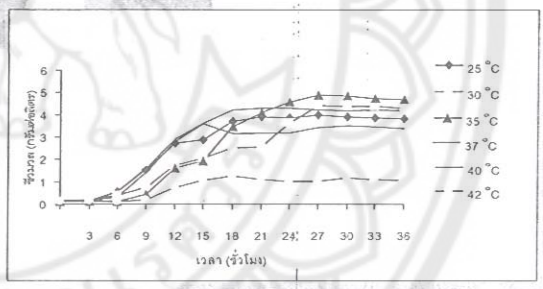
จากผลการทดลองพบว่า อัตราการเจือจางน้ำทิ้งด้วยน้ำประปาที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 เท่ากับ 1:1.5 (รูปที่ 1) ทั้งนี้อัตราการเจือจางที่สูงเกินไปมีผลต่อความเข้มข้นของสารอาหารที่ลดลงในน้ำทิ้ง ส่วนอัตราการเจือจางที่ต่ำเกินไป มีผลทำให้ปริมาณของสารอินทรีย์บางชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอล มีความเข้มข้นสูงพอที่จะยับยั้งเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ 2 การเจริญของยีสต์ โดยจากการทดลองพบว่า ยีสต์ *C. tropicalis* CT1-01 มีอัตราการเจริญลดลงอย่างมีนัยสำคัญ หากปริมาณของสารประกอบฟีนอลในอาหารสูงมากกว่า 1 กรัมต่อลิตร (Neujahr, 1978)



รูปที่ 1 ปริมาณชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ผลิตจากน้ำทิ้งเจือจางด้วยน้ำประปา (อัตราส่วนเท่ากับ 1:0, 1:0.5, 1:1, 1:1.5 และ 1:2) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง

3.2.2 อุณหภูมิ

จากผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 คือ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 2)



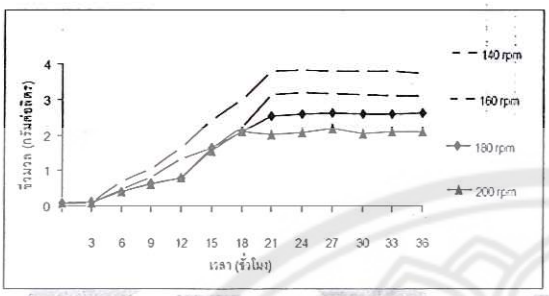
รูปที่ 2 ปริมาณชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ที่ผลิตจากน้ำทิ้งเจือจางด้วยน้ำประปา (1:1.5) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40 และ 42 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง

3.2.3 ความเร็วรอบที่เหมาะสม

จากผลการทดลองพบว่า ความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 คือ 160 รอบต่อนาที (รูปที่ 3) ทั้งนี้ความเร็วรอบดังกล่าวมีผลในการเพิ่มอัตราการแพร่ซึมผ่านของออกซิเจนสู่เซลล์ยีสต์ให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ โดยยีสต์ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ทำให้เกิดการสังเคราะห์ ATP ปริมาณสูงภายในเซลล์ ซึ่งเหมาะสมและพอเพียงต่อการสังเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆของเซลล์ยีสต์ผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ อย่างไรก็ตาม หากความเร็วรอบที่ใช้สูงมากเกินไป จะส่งผลให้เกิดฟองอากาศสะสมปริมาณมาก ซึ่งจะยับยั้ง

สำนักหอสมุด
- 5 JUL 2011

อัตราการแพร่ซึมผ่านของออกซิเจนสู่เซลล์ยีสต์ ทำให้อัตราการหายใจแบบใช้ออกซิเจนลดลง ส่งผลให้ปริมาณ ATP ภายในเซลล์มีจำกัด เกิดผลกระทบเชิงลบต่อปริมาณชีวมวลของยีสต์ที่ผลิตได้ (Walker, 1997)

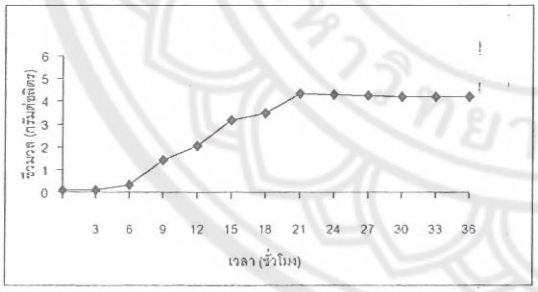


รูปที่ 3 ปริมาณชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ผลิตจากน้ำทิ้งเจือจางด้วยน้ำประปา (1:1.5) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 140, 160, 180 และ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง

3.3 การผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* ใน baffled flask และถังหมัก

3.3.1 การผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* ใน baffled flask ขนาด 500 มิลลิลิตร

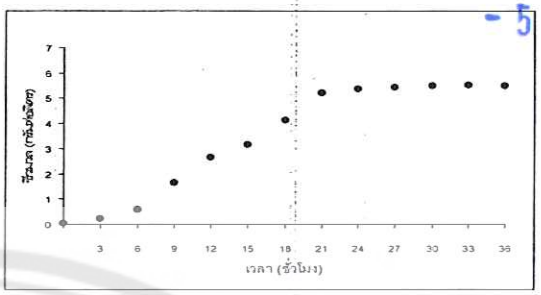
จากผลการเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01 ในน้ำทิ้งเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:1.5 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 21 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณชีวมวลสูงสุดที่ผลิตได้เท่ากับ 4.31 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4) และพบปริมาณเบตากลูแคนเป็นองค์ประกอบ 56 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง



รูปที่ 4 ปริมาณชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ผลิตจากน้ำทิ้งเจือจางด้วยน้ำประปา (1:1.5) ใน baffled flask ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง

3.3.2 การผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

จากผลการเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01 ในน้ำทิ้งเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:1.5 อัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 บาร์ต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณชีวมวลสูงสุดที่ผลิตได้ เท่ากับ 5.21 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 5) พบปริมาณเบตากลูแคนเป็นองค์ประกอบ 61 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง



รูปที่ 5 ปริมาณชีวมวลของ *C. tropicalis* ผลิตจากน้ำทิ้งเจือจางด้วยน้ำประปา (1:1.5) เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร อัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 บาร์ต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง

3.5 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งที่ผ่านการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01

จากผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งของกระบวนการผลิตยีสต์-เอ็กซ์แทร็กซ์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร (ตารางที่ 1) พบว่า น้ำทิ้งที่ผ่านการเพาะเลี้ยงยีสต์ดังกล่าว นาน 36 ชั่วโมง มีค่าพีเอช 5.8 ค่าบีโอดี 4,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าซีโอดี 17,280 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าปริมาณของแข็งแขวนลอย 22 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 0.61 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจากการเปรียบเทียบกับพารามิเตอร์เดียวกันของน้ำทิ้งก่อนการเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* CT1-01 พบว่า คุณภาพของน้ำทิ้งภายหลังจากการผลิตชีวมวลของยีสต์มีคุณภาพดีขึ้น พิจารณาจากค่าซีโอดีลดลง 84.1 เปอร์เซ็นต์ และ ค่าบีโอดีลดลง 88.5 เปอร์เซ็นต์ ค่าปริมาณของแข็งแขวนลอยลดลง 86.2 เปอร์เซ็นต์ และค่าปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดลดลง 53.1 เปอร์เซ็นต์

4. สรุปผลการทดลอง

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01 ใน baffled flask ขนาด 500 มิลลิลิตร คือ เพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:1.5 พีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งเท่ากับ 6.0 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 160 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยปริมาณชีวมวลสูงสุดที่ผลิตได้เท่ากับ 4.31 กรัมต่อลิตร ปริมาณเบตากลูแคนเท่ากับ 56 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลของ *C. tropicalis* CT1-01ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ในน้ำทิ้งเจือจางด้วยน้ำประปาอัตราส่วน 1:1.5 พีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งเท่ากับ 6.0 คือ อัตราการกวน 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.2 บาร์ต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยปริมาณชีวมวลสูงสุดที่ผลิตได้

เท่ากับ 5.21 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณเบตากลูแคนเท่ากับ 61 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนทุนวิจัยผ่านงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปี 2552 รหัสโครงการ MS-AR-018/2552 และขอขอบคุณโครงการ IRPUS ประจำปี 2552 ที่สนับสนุนทุนการศึกษาของนางสาวจิริฐิติกาล ศรีปราบหล่ม นิสิตปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา และหน่วยปฏิบัติการกลางเพื่อส่งเสริมงานวิจัย คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่สนับสนุนครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์และสถานที่ในการดำเนินการวิจัย

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.

Bohn, J. A. and Miller, J. N. 1995. Beta-glucan as biological response modifiers: a review of structure and functional activity relationships, Carbohydrate Polymers. 28: 3-14.

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.

Kim, K. S. and Yun, H. S. 2006. Production of soluble beta-glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*, Enzyme and Microbial Technology. 39: 496-500.

Neujahr, H.Y. 1978. Degradation of phenols by yeast, Process Biochemistry. 13: 3-7.

Nguyen, T. H., Fleet, G. H. and Rogers, P.L. 1998. Composition of the cell walls of several yeast species, Apply Microbiology and Biotechnology. 50: 206-212.

Thammakiti, S., Suphantharika, M., Phaesuwan, T. and Verduyn, C. 2004. Preparation of spent brewer's yeast beta-glucan for potential applications in the food industry, International Journal of Food Science and Technology. 39: 21-29.

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