วว.

โครงการวิจัยที่ ภ. 49-03 / ย. 2 / รายงานฉบับที่ 1 (รายงานฉบับสมบูรณ์)

การใช้จุลินทรีย์โปรตีน สำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ. 49-03
การใช้จุลินทรีย์โปรตีนสำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

โครงการย่อยที่ 2
การใช้จุลินทรีย์โปรตีนสำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)
การใช้จุลินทรีย์โปรตีนสำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

โดย

บัณฑิต ฝั่งสินชุ่ม **อภินันท์ ศรีช่วย**
ลาวัลย์ ชตานนท์ **วรรณลักษณ์ บัวบาน**
สมาน เกิดประทุม **สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์**

บรรณาธิการ
ลิขิต หาญจางสิทธิ์
บุญเรียม น้อยชุมแพ
พิสุทธิ์ พลับสวาท

วว., กรุงเทพฯ 2554

สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(นางเกษมศรี หอมชื่น)
ผู้ว่าการ

กิตติกรรมประกาศ

ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ขอขอบคุณคณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ (วช) ที่ได้สนับสนุนงบประมาณในการทำงานวิจัยของโครงการวิจัย “การใช้จุลินทรีย์โปรตีนสำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์” นี้ตลอดระยะเวลา 2 ปี ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2549- เดือนกันยายน พ.ศ. 2551, จนทำให้การดำเนินงานของโครงการสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี.

ขอขอบคุณท่านผู้บริหาร วว. ที่ได้สนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานของโครงการ ได้แก่อดีตท่านผู้ว่าการ วว. ดร. นงลักษณ์ ปานเกิดดี, นางสาวพิศมัย เจนวนิชปัญจกุล รองผู้ว่าการวิจัยและพัฒนาด้านพัฒนาอย่างยั่งยืน, นางอัญชลี กมลรัตนกุล รองผู้ว่าการวิจัยและพัฒนาด้านอุตสาหกรรมชีวภาพ และพนักงานและลูกจ้างของฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพทุกท่านที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยนี้.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญตาราง	ค
สารบัญรูป	ง
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
1. บทนำ	3
2. วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ	8
3. ผลการทดลอง และวิจารณ์	22
4. สรุปผลการทดลอง	52
5. เอกสารอ้างอิง	54
ภาคผนวก	56

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. รายละเอียดตัวอย่างเพื่อนำมาใช้สำหรับการแยกยีสต์ 10
ตารางที่ 2. จำนวนและสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกมาจากตัวอย่างผลไม้และอาหารหมักดอง 22
ตารางที่ 3. สายพันธุ์ยีสต์จากศูนย์จุลินทรีย์ที่นำมาศึกษาการเจริญเติบโต 25
ตารางที่ 4. ปริมาณน้ำหนักเปียกของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างธรรมชาติ 27
ตารางที่ 5. น้ำหนักเปียกของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ที่จากศูนย์จุลินทรีย์ วว. 29
ตารางที่ 6. ปริมาณโปรตีนแท้ (true protein) ของเซลล์แห้งของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ 30
ตารางที่ 7. ชื่อสายพันธุ์ยีสต์ที่สร้างปริมาณเซลล์สูงจากการวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอ ของไรโบโซมดีเอ็นเอ 31
ตารางที่ 8. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างยีสต์สายพันธุ์ที่สร้างปริมาณเซลล์สูง 32
ตารางที่ 9 ปริมาณการเจริญของเซลล์ยีสต์ในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของกากน้ำตาล 34
ตารางที่ 10. ปริมาณของเซลล์ยีสต์ที่เจริญในอาหารที่มีแหล่งของไนโตรเจนต่างชนิดกัน 36
ตารางที่ 11. ปริมาณของเซลล์ยีสต์ที่เจริญในอาหารที่มีปริมาณความเข้มข้นของกัน 37
ตารางที่ 12. การเจริญและปริมาณการสร้างเซลล์ของยีสต์ที่แปรผันปริมาณของกล้าเชื้อ 39
ตารางที่ 13. การเจริญของยีสต์เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยแปรผันอัตราเร็วของการกวน 40
ตารางที่ 14. การเจริญของยีสต์เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยแปรผันการควบคุมค่าพีเอช 42
ตารางที่ 15. การเจริญของยีสต์เลี้ยงในถังหมักขนาด 300 ลิตร โดยสภาวะการควบคุมพีเอชที่ 4.5 45
ตารางที่ 16. การผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีน 48
ตารางที่ 17 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของปลาในชุดการทดลองต่างๆ 49
ตารางที่ 18 ปริมาณการกินอาหารสะสมเฉลี่ยของปลาในแต่ละสัปดาห์ 50
ตารางที่ 19 ค่าอัตราการแลกเนื้อ (Feed conversion rate) และการสูญเสียของปลา 51

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.	ลักษณะโคโลนีของยีสต์และลักษณะของเซลล์ยีสต์	33
รูปที่ 2.	จำนวนเซลล์ยีสต์ในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นกากน้ำตาล	35
รูปที่ 3.	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน	36
รูปที่ 4.	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ที่แปรผันความเข้มข้น KH_2PO_4	38
รูปที่ 5.	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเซลล์ยีสต์แปรผันขนาดของกล้าเชื้อ	39
รูปที่ 6.	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของยีสต์เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยแปรผันอัตราเร็วของการกวน	41
รูปที่ 7.	การเจริญและปริมาณการสร้างเซลล์ของยีสต์เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยแปรผันการควบคุมค่าพีเอช	43
รูปที่ 8	ถังหมักขนาด 5 ลิตร ในการเลี้ยงยีสต์โดยใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ	43
รูปที่ 9.	การเจริญและปริมาณการสร้างเซลล์ของยีสต์เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ควบคุมพีเอช 4.5 ในสภาวะการเลี้ยง Fed-batch เปรียบเทียบกับสภาวะการเลี้ยงแบบรุ่นผลิต	44
รูปที่ 10.	การเจริญและปริมาณการสร้างเซลล์ของยีสต์เลี้ยงในถังหมักขนาด 300 ลิตร ที่ควบคุมพีเอช 4.5 ในสภาวะการเลี้ยง Batch	46
รูปที่ 11.	ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีนจากยีสต์	47
รูปที่ 12.	การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของปลาในชุดการทดลองต่างๆ	51

UTILIZATION OF SINGLE CELL PROTEIN FOR ANIMAL CULTURE

Bundit Fungsin, Aphinan Srichuai, Lawan Chatanon, Wannaluk Buaban, Sman Kerdprathum, and Suparp Artjariyasripong.

ABSTRACT

One hundred yeast strains were isolated from 44 samples of decayed fruits and fermented food and the other 15 yeast strains were obtained from TISTR culture collection. Total of 115 yeasts strains were used to conduct on single cell protein screening. Five yeast strains were found to have the high efficiency on biomass production namely, 4 strains of *Candida tropicalis*, 15-C-1, 19-H-1, 27-C-1 and 43-C-1 and a strain of *Candida utilis* TISTR 5001. *Candida utilis* TISTR 5001 was selected as a yeast strain for further study on single cell protein production. The study results on production medium of yeast using sugarcane molasses as substrate showed that an appropriate initial molass concentration 10%(w/v) was supplemented with $(NH4)_2HPO_4$ and KH_2PO_4 in 0.6% and 0.01%(w/v), respectively. The optimum conditions for batch cultivation of yeast in 5 litre fermenter were as follows: 2% yeast inoculum size (10^8 cell/ml), agitation speed 450 rpm., pH 4.5 to 5.5, temperature 30 ^oC., and aeration rate 1 vvm. By following these cultivation conditions, the maximum yeast biomass was obtained at 89.47 g/l. within 24 hours. In fed-batch cultivation in the same conditions as in batch cultivation which the fresh production medium was added after 12 hour cultivation, the maximum of yeast biomass was obtained at 90.54 g/l at 36 hours. In testing of yeast single cell protein as subsidized protein source to cultivate fish, *Tilapia nilotica*, the results revealed that fish group cultivated with single cell protein showed the higher body weight and better feed conversion rate [FCR] value than that cultivated with supplemented protein source from soybean and the control experiment. The product of single cell protein was verified as safe which showed the lowering amount of undesired substances below the standard level following the E.U. regulations. Furthermore, the product was composed of high nutrition values of high protein content, amino acids, vitamins and minerals practically required for animal growth.

การใช้จุลินทรีย์โปรตีนสำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

บัณฑิต ฝั่งสินธุ์[1], อภินันท์ ศรีช่วย[1], ลาวัลย์ ชตานนท์[1], วรรณลักษณ์ บัวบาน[1], สมาน เกิดประทุม[1] และสุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์[1]

บทคัดย่อ

ยีสต์ที่ได้จากตัวอย่างผลไม้เน่าเสียและอาหารหมักดองจำนวน 44 ตัวอย่าง สามารถแยกยีสต์ได้ทั้งสิ้น 100 สายพันธุ์ และรวมกับยีสต์จากศูนย์จุลินทรีย์จำนวน 15 สายพันธุ์รวมทั้งสิ้น 115 สายพันธุ์. การคัดเลือกยีสต์ที่มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์โปรตีนได้ยีสต์ที่มีการสร้างปริมาณเซลล์สูงจำนวน 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Candida tropicalis* 4 สายพันธุ์คือ 15-C-1, 19-H-1, 27-C-1 และ 43-C-1 และ *Candida utilis* 1 สายพันธุ์คือ TISTR 5001. ได้คัดเลือกยีสต์ *Candida utilis* TISTR 5001 เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ในการศึกษาจุลินทรีย์โปรตีน. การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ พบว่า ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้นอยู่ที่ร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร). แหล่งอาหารเสริมชนิดต่างๆ ได้แก่ ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต, โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาณร้อยละ 0.6 และ 0.01 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ. สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อยีสต์แบบรุ่นผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร คือ ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 2 (ปริมาตร/ปริมาตร), อัตราการกวน 450 รอบ/นาที, ควบคุมพีเอชที่ 4.5 -5.5 อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ., อัตราให้อากาศ 1 วีวีเอ็ม, สามารถผลิตยีสต์เซลล์เปียกได้ 89.47 กรัม/ลิตร ภายในเวลา 24 ชั่วโมง. การเลี้ยงยีสต์ในถังหมักแบบ Fed-batch โดยการเติมอาหารใหม่ลงไปหลังการเลี้ยง 12 ชั่วโมง, ได้ผลผลิตเซลล์ยีสต์เปียก 90.54 กรัม/ลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง. ผลการนำผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีนยีสต์มาเป็นแหล่งโปรตีนในการเลี้ยงปลา พบว่า ชุดปลาทดลองที่เลี้ยงด้วยจุลินทรีย์โปรตีนจากยีสต์มีการเจริญเติบโตดีกว่าชุดที่ใช้ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนและชุดควบคุม, ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีนเพิ่มจากยีสต์ที่ได้มีความปลอดภัย, โดยมีค่าของสารที่ไม่พึงประสงค์ต่ำกว่าค่ามาตรฐานตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรป มีคุณค่าทางโภชนาการสูง, มีโปรตีน, ปริมาณกรดแอมิโน, วิตามิน และแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตสูง.

---

[1] ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

1. บทนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ของประเทศไทยมีการเจริญเติบโตอย่างมากและต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญที่ทำรายได้เข้าประเทศ เช่น ไก่, สุกร, โค และกุ้ง. อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เหล่านี้สามารถทำรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมาก, ช่วยกระตุ้นภาวะเศรษฐกิจของประเทศให้มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว. จากข้อมูลผลผลิตของอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ สามารถทำรายได้นำเงินตราเข้าประเทศ จากการส่งออกสินค้าประเภทนี้มูลค่าโดยรวมในปี พ.ศ. 2550 สูงถึงกว่า 61,982 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจทางการเกษตร 2550). จากการที่ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ได้มีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง, จึงมีผลทำให้มีความต้องการอาหารเลี้ยงสัตว์ สำหรับนำมาใช้ในอุตสาหกรรมประเภทนี้มีความต้องการเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่องด้วยเช่นกัน. จากข้อมูลของผู้ประกอบการอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ พบว่า ในปัจจุบันวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนของอาหารสัตว์ ที่สำคัญได้แก่ ปลาป่น จะมีปริมาณน้อยลงและหายากขึ้นเรื่อยๆ ดังเช่นจากข้อมูลของกรมเศรษฐกิจการเกษตร ในปี พ.ศ. 2545 ประเทศไทยนำเข้าปลาป่นปริมาณสูงถึง 17,917 ตัน มูลค่าประมาณ 118 ล้านบาท. ดังนั้นการค้นหาแหล่งโปรตีนแหล่งอื่นเพื่อมาเป็นทางเลือกที่จะนำมาทดแทนในภาวะที่อาจขาดแคลนแหล่งโปรตีนในอนาคตจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นที่จะมีการศึกษาวิจัย.

แหล่งโปรตีนที่มีศักยภาพอีกแหล่งหนึ่ง ที่มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ในภาวะที่แหล่งโปรตีนขาดแคลนไม่เพียงพอ คือแหล่งโปรตีนที่ได้มาจากจุลินทรีย์ ซึ่งเรียกว่า จุลินทรีย์โปรตีน (Single cell protein). ในเซลล์ของจุลินทรีย์นั้นประกอบโปรตีนที่มีปริมาณที่ใกล้เคียงกับปริมาณโปรตีนจากปลาป่น และประกอบด้วยกรดแอมิโนที่สำคัญอยู่หลายชนิด. นอกจากนี้จุลินทรีย์โปรตีนยังมีวิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตอยู่หลายชนิด (นัยบุตร 2532).

ดังนั้น จุลินทรีย์โปรตีนจึงเป็นแหล่งโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพที่จะนำมาเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนสำหรับการเลี้ยงสัตว์ได้.

จุลินทรีย์โปรตีนที่ได้มาจากเซลล์ของจุลินทรีย์นั้น มีคุณค่าทางโภชนาการสูง กล่าวคือมีปริมาณโปรตีนสูงประกอบด้วยกรดแอมิโนที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตในสิ่งมีชีวิตอยู่

หลายชนิด และนอกจากนี้ยังอุดมไปด้วยวิตามินที่สำคัญอีกหลายชนิดเช่นกัน. ในอดีตได้เคยมีการนำเอาจุลินทรีย์โปรตีนมาใช้เป็นแหล่งเป็นโปรตีนชดเชยของมนุษย์ ในยามภาวะขาดแคลนอาหารมาแล้วในช่วงสงครามโลก ซึ่งสามารถที่จะผลิตจุลินทรีย์โปรตีนได้ในปริมาณมากเพียงพอสำหรับรองการบริโภคของประกรจำนวนมากมาแล้ว (ศิริโรจน์ 2521). ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะใช้จุลินทรีย์โปรตีนมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนในการเลี้ยงสัตว์.

จุลินทรีย์โปรตีน คือโปรตีนที่ได้มาจากจุลินทรีย์ชนิดเซลล์เดี่ยว ซึ่งมีปริมาณโปรตีนสูง. ชนิดของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรตีนได้อย่างมีศักยภาพได้แก่ แบคทีเรีย, ยีสต์, รา และสาหร่าย (Bhattacharee 1970). จุลินทรีย์โปรตีนสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนทดแทนหรือเป็นแหล่งโปรตีนเสริม โดยสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนของมนุษย์และสัตว์เป็นเวลาเกือบหนึ่งศตวรรษแล้ว. นักวิทยาศาสตร์ที่ได้ทำการศึกษาทดลองผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นทางเลือกของโปรตีนแหล่งใหม่ ที่นอกเหนือจากโปรตีนที่ได้มาจากสัตว์และพืชมีวัตถุประสงค์ในขณะนั้นก็เพื่อไว้ใช้ในภาวะที่เกิดปัญหาการขาดแคลนอาหารบริโภค เช่น ในภาวะสงคราม. ในปี ค.ศ. 1922 ได้มีการผลิตจุลินทรีย์โปรตีนในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 โดยประเทศเยอรมนีได้ใช้เทคโนโลยีการผลิตจุลินทรีย์โปรตีน เพื่อใช้เป็นอาหารของมนุษย์ โดยสามารถผลิตเป็นปริมาณมากถึง 16,000 ตันต่อปี. ในปัจจุบัน ยังคงมีการผลิตจุลินทรีย์โปรตีนเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนเสริมอยู่ในประเทศรัสเซีย ซึ่งได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีด้านการผลิตจุลินทรีย์โปรตีนอย่างกว้างขวาง.

จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรตีน ได้แก่ แบคทีเรีย, ยีสต์, รา และสาหร่ายเซลล์เดี่ยว. โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ได้นำมาผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรตีนเช่น *Aeromonas aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Hydrogenomonas eutropa*, *Methylmonas albus*, *Propionibacterium freudenreichii*. ยีสต์สายพันธุ์ที่ได้นำมาผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรตีนเช่น *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Candida lipolytica*, *Endomycopsis fibuligera*, *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*. ราที่ได้นำมาผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรตีนเช่น *Agaricus compestris*, *Aspergillus sydowi*, *Cantharellus cibarus*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium notatum-chrysogenum*. สาหร่ายที่ได้นำมาผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรตีนเช่น *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella pyrenoidosa, Scenedesmus obligues*, *Spirulina maxima* เป็นต้น (Davis 1974).

ข้อได้เปรียบของจุลินทรีย์โปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ได้มาจากสัตว์และพืช คือ จุลินทรีย์โปรตีนสามารถผลิตได้ในระยะเวลาอันสั้น เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว, ใช้เนื้อที่ในการผลิตน้อย เมื่อเทียบกับการเลี้ยงสัตว์หรือเพาะปลูกต้องใช้เนื้อที่มากในการทำฟาร์มหรือทำไร่.

คุณค่าทางโภชนาการของจุลินทรีย์โปรตีน จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของจุลินทรีย์โปรตีน พบว่า มีปริมาณโปรตีนสูง ประกอบด้วย กรดแอมิโนที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย เช่น ไลซีน, เวลีน, ลูซีน, ไอโซ-ลูซีน, ทรีโอนีน, ไทโอนีน และเฟนนิล-อลานีน (Shacklady 1974). นอกจากจะประกอบด้วยโปรตีนแล้ว ยังประกอบด้วยวิตามินที่สำคัญและมีประโยชน์ในปริมาณสูงเช่นกัน ได้แก่ วิตามินบี 1, บี 2, บี 6 และ บี 12. เมื่อเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนากับแหล่งโปรตีนชนิดอื่น พบว่า จุลินทรีย์โปรตีน มีปริมาณโปรตีนที่ใกล้เคียงกับแหล่งโปรตีนจากปลาป่นและกากถั่วเหลือง.

ในบรรดาจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งโปรตีนนั้น พบว่า ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีความได้เปรียบกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่จะนำมาทำเป็นแหล่งโปรตีน (Humphrey 1968). ยีสต์มีคุณสมบัติที่ดีกว่าจุลินทรีย์อื่น (Matales and Tannenbaum 1968 ; Bhattacharee 1970) มีอัตราการเจริญเร็วในอาหารที่มีส่วนประกอบง่ายๆ, สามารถคลุกเคล้ากับอาหารได้ดีและเซลล์สามารถแยกจากอาหารได้ง่าย, มีปริมาณโปรตีน, คาร์โบไฮเดรต และไขมันสูง, สามารถต้านทานต่อการทำลายของไวรัสและเชื้อปนเปื้อน, มีรสกลิ่นดี สามารถย่อยได้ง่ายและไม่มีพิษ. มนุษย์มีความคุ้นเคยกับยีสต์มาเป็นเวลายาวนานปี, เครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ต่างๆ ซึ่งได้จากการหมักของยีสต์มากว่าสองพันปีแล้ว และบริโภคขนมปังซึ่งเกิดจากการหมักของยีสต์เป็นประจำวันมาเป็นเวลานานเช่นกัน ดังนั้นยีสต์จึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย.

คุณสมบัติของยีสต์ที่จะคัดเลือกเพื่อใช้เป็นสายพันธุ์จุลินทรีย์โปรตีน (ศิริโรจน์ 2521) ได้แก่ :

1. มีอัตราการเจริญเร็ว
2. สามารถเลี้ยงในอาหารอย่างง่ายได้
3. เซลล์ของยีสต์สามารถคลุกเคล้ากับอาหารได้ดี
4. แยกเซลล์ยีสต์ออกจากอาหารที่เลี้ยงได้ง่าย
5. มีความต้านทานต่อการทำลายของฟากจ์หรือไวรัส

6. มีประสิทธิภาพในการใช้แหล่งพลังงานได้ดี
7. สามารถลดค่าบีโอดีในอาหารเลี้ยงได้สูง
8. สามารถปรับปรุงพันธุ์ได้
9. ไม่เป็นพิษ
10. มีกลิ่น รสที่ดี
11. ย่อยง่าย
12. มีปริมาณโปรตีน, คาร์โบไฮเดรต และไขมันสูง

ได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการทดลองใช้ยีสต์มาผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรตีนอย่างหลากหลาย เช่น ยีสต์ที่ได้รับการคัดเลือกเป็นอาหารเสริมโปรตีนมีหลายชนิด *Candida utilis* เป็นยีสต์ชนิดหนึ่งที่มีโปรตีนสูง. มีผู้กล่าวถึงยีสต์ในครั้งแรกว่าหมายถึง mineral yeast และเคยใช้ชื่อว่า *Torulopsis utilis* อยู่ระยะหนึ่ง จนกระทั่ง Lodder and Kreg-Van Rij (1952) ตรวจพบว่ายีสต์มีการสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) จึงจัดเข้าไว้ในจีนัส Candida. โดยทั่วไปยีสต์เรียกว่า Torula yeast และเป็นยีสต์ที่เลี้ยงเพื่อต้องการเซลล์มากกว่าผลของการหมักของยีสต์. เมื่อสงครามโลกครั้งที่สอง ประเทศเยอรมนีผลิตโปรตีนเป็นปริมาณมาก เนื่องจากยีสต์นี้สามารถใช้เป็นสารอาหารอย่างง่ายๆ เช่น พวก Sulfite waste liquor, wood hydrolysate นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำตาล เพนโทส (pentose) เป็นอาหารได้. ข้อดีอื่นๆ ได้แก่ ต้องการปัจจัยเร่งการเจริญเติบโต (growth factor) น้อยมากและสามารถเจริญแข่งขันกับแบคทีเรียได้. ดังนั้นจึงไม่มีปัญหาเรื่องการปะปนของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเลี้ยง *Candida utilis.*

ศิริโรจน์ (2521) ได้ทดลองเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรตีน โดยใช้น้ำต้มถั่วเหลืองเติมน้ำตาลเป็นอาหารเลี้ยงยีสต์ 3 ชนิด คือ *Debaryomyces hansenii*, *Candida intermedia*, *Candida utilis* ซึ่งจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เป็น 28.28, 18.6 และ 13.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบร้อยละ 38.9, 49.6 และ 52.2 ตามลำดับ. เชี่ยวธีรสกุล (2519)ได้ทดลองเลี้ยงยีสต์โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังมาเลี้ยงยีสต์ *Schwanniomyces alluvius* และ *Candida utilis* ได้ผลผลิตของเซลล์ที่มีโปรตีนร้อยละ 40-45. Sundhagul (1972) ได้ทดลองเลี้ยงยีสต์ *Candida utilis* NRRL-900 ในน้ำทิ้งโรงงานแป้งมัน พบว่า พีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญคือ 4.0-4.5 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่ป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรียได้, ได้ผลผลิตประมาณร้อยละ 40 ของปริมาณของแข็งทั้งหมด. *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์อีกสายพันธุ์หนึ่งที่ใช้ผลิตจุลินทรีย์โปรตีน โดยให้โปรตีนร้อยละ 42.5-53.1

โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงในกากน้ำตาล (Prescott and Dunn 1959). ว่องสุวรรณเลิศ (2523) ได้ทดลองเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 281 ร่วมกับเชื้อรา *Rhizopus oryzae* MB67 โดยใช้มันสำปะหลังในอาหารเหลว, เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ได้น้ำหนักแห้ง 41.2 กรัมต่อลิตร, โดยมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 43.31. นัยบุตร (2532) ได้คัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถย่อยแป้งที่ทนความร้อนเพื่อผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรตีน พบยีสต์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวที่ดีคือ *Kloeckera javanica*. Pual *et al.* (2002) ได้ทดลองเลี้ยงยีสต์ *Kluyveromyces fragilis* เพื่อผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรตีน โดยใช้หางนม (whey) เป็นส่วนประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ได้ปริมาณโปรตีนร้อยละ 37 Konlani *et al*. (1996) ได้ทดลองใช้อาหารเหลวที่ได้จากการย่อยข้าวฟ่างด้วยเอนไซม์มาเลี้ยงยีสต์ 2 สายพันธุ์คือ *Candida krusei* และ *Sacchromyces* sp. LK3G ในถังหมัก พบว่า การเติมเอนไซม์ลงไปย่อยในข้าวฟ่างทำให้ปริมาณเซลล์ยีสต์ทั้งสองมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 64 และ 70, ตามลำดับ และผลผลิตยีสต์ที่ได้มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 47-50. Olvera-Novoa *et al*. (2002) ได้ทดลองใช้ยีสต์ *Candida utilis* เป็นแหล่งโปรตีนในการเลี้ยงปลาหมอเทศ (tilapia) แทนแหล่งโปรตีนจากปลาป่น. ผลการทดลองพบว่า การเจริญของปลาเจริญเติบโตดี เช่นเดียวกับใช้โปรตีนจากปลาป่น.

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีผลผลิตทางการเกษตรหลากหลายชนิด ดังนั้นจึงมีวัตถุดิบทางการเกษตรและผลพลอยจากโรงงานอุตสาหกรรมที่แปรรูปวัตถุดิบทางการเกษตร ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรตีน อาทิเช่น อ้อย, ข้าวฟ่าง, มันสำปะหลัง, กากน้ำตาล, น้ำทิ้งจากโรงงานแป้ง, น้ำต้มถั่วจากโรงงานแปรรูปอาหารถั่วเหลือง เป็นต้น.

จากข้อมูลของการวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์โปรตีนที่ผ่านมา พบว่า ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์โปรตีน คือ กลุ่มยีสต์ เนื่องจากยีสต์นั้นเลี้ยงง่ายเจริญดีให้ปริมาณเซลล์ที่ดี และสามารถแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงได้ง่าย, มีปริมาณโปรตีนที่สูงและมีความปลอดภัยต่อมนุษย์ เนื่องจากมนุษย์ได้บริโภคยีสต์มาเป็นเวลานานแล้ว. สำหรับอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ได้มีการสังเคราะห์สูตรขึ้นมา โดยใช้วัตถุดิบเหลือทิ้งจากภาคการเกษตรที่ใช้ ได้แก่ น้ำต้มถั่วเหลือง, กากน้ำตาล, น้ำเสียจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง, และหางนม. ส่วนสายพันธุ์ยีสต์ที่ได้มีการทดลองมาผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรตีน เช่น *Candida utilis, Candida intermedia*, *Candida krusei, Debaryomyces hansenii*, *Sacchromyces cerevisiae* และ *Schwanniomyces alluvius* เป็นต้น.

2. วัสดุ อุปกรณ์และ วิธีการ

2.1 วัสดุ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเหลววายเอ็ม (Yeast Malt broth, YM broth)
2. กากน้ำตาล (Molass)
3. น้ำตาลทราย
4. รำข้าว
5. กากถั่วเหลือง
6. น้ำตาลกลูโคสโมโนไฮเดรต (Commercial grade)
7. กรดบอริก (Boric acid)
8. วุ้น (Agar)
9. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)
10. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(Dipotassium hydrogen phosphate, (K_2HPO_4))
11. ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Diammonium hydrogen hydrogen phosphate, $(NH_4)_2HPO_4$))
12. ยูเรีย (Urea)
13. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate)
14. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
15. โพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulfate)
16. กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid)
17. โบวินซีรัมแอลบูมิน (Bovine serum albumin)
18. สารละลายโฟลิน (Folin reagent)

2.2 อุปกรณ์

1. ลูปเขี่ยเชื้อ
2. ตะเกียง
3. หลอดแก้ว
4. เครื่องชั่ง (Shimadzu, Japan)
5. เครื่องเขย่า (Vortex mixer)

6. หลอดไมโครทิวบ์พลาสติก (Plastic microtube)
7. บ่มเลี้ยงเชื้อ (Incubator)
8. ถังเลี้ยงเชื้อ (Fermenter) ขนาด 300 ลิตร (Marubishi, Japan)
9. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (Yamato, Japan)
10. เพลตเลี้ยงเชื้อพลาสติก (Plastic Petri-dish)
11. เตาไมโตรเวฟหลอมอาหาร
12. อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath)
13. เครื่องวัดพีเอช (pH Meter)
14. ปิเปตต์อัตโนมัติ (Auto pipette)
15. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectophotometer) (UVIKON XS, สวิตเซอร์แลนด์)
16. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Jouan, France)
17. ตู้ปลอดเชื้อ Laminar Air Flow V6 (Lab Service, USA)
18. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Polymerase Chain Reaction, PCR)
19. เครื่องหาลำดับดีเอ็นเออัตโนมัติ (Automated DNA sequencer)

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อทำการแยกจุลินทรีย์

ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากผลไม้ที่สุกเต็มที่หรือเน่าเสียและตัวอย่างอาหารหมักพื้นบ้าน จำนวน 44 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1.

ตารางที่ 1. รายละเอียดตัวอย่างเพื่อนำมาใช้สำหรับการแยกยีสต์

หมายเลขตัวอย่าง	ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	วันที่เก็บ	หมายเหตุ
1	ส้ม	ตลาด อ.เมือง จ.ปทุมธานี	13 ธ.ค. 2549	
2	มะละกอ	ตลาดไทย จ. ปทุมธานี	14 ธ.ค. 2549	
3	สตรอเบอรี	ตลาดคลองหนึ่ง จ. ปทุมธานี	15 ธ.ค. 2549	
4	แตงโม	ตลาดไทย จ. ปทุมธานี	14 ธ.ค. 2549	
5	มะเขือเทศ	ตลาดไทย จ. ปทุมธานี	14 ธ.ค. 2549	
6	ขนุน	ตลาด อ.เมือง จ.ปทุมธานี	13 ธ.ค. 2549	
7	มะเฟือง	ตลาด อ.เมือง จ.ปทุมธานี	13 ธ.ค. 2549	
8	องุ่น	ตลาดไทย จ. ปทุมธานี	14 ธ.ค. 2549	
9	พุทรา	ตลาดไทย จ. ปทุมธานี	14 ธ.ค. 2549	
10	ละมุด	อำเภอ อ. จ. ปทุมธานี	13 ธ.ค. 2549	
11	มะขามหวาน	ตลาดไทย จ. ปทุมธานี	14 ธ.ค. 2549	
12	ฝรั่ง	ตลาดไทย จ. ปทุมธานี	14 ธ.ค. 2549	
13	สับปะรด	ตลาดไทย จ. ปทุมธานี	14 ธ.ค. 2549	
14	กล้วย	ม. เกษตรศาสตร์ จ. กรุงเทพฯ	14 ธ.ค. 2549	
15	อ้อย	ตลาดสี่มุมเมือง จ. ปทุมธานี	13 ธ.ค. 2549	
16	กากน้ำตาล	คลองเก้า จ. ปทุมธานี	14 ธ.ค. 2549	
17	ข้าวหมาก	เขตบางกะปิ กรุงเทพ	11 ม.ค. 2550	
18	ข้าวหมาก	ตลาด อ.เมือง จ.อยุธยา	11 ม.ค. 2550	
19	ข้าวหมาก	จ. เพชรบุรี	11 ม.ค. 2550	
20	พุทราดอง	ตลาด อ.เมือง จ.อยุธยา	11 ม.ค. 2550	
21	ผักกุ่มดอง	ตลาด อ.เมือง จ.อยุธยา	11 ม.ค. 2550	
22	ผักกาดดอง	ตลาด อ.เมือง จ.อยุธยา	11 ม.ค. 2550	
23	น้ำตาลสด	จ. ปราจีนบุรี	11 ม.ค. 2550	
24	น้ำตาลสด	ตลาด อ.เมือง จ.อยุธยา	11 ม.ค. 2550	
25	แอปเปิล	สะพานใหม่ กรุงเทพ	11 ม.ค. 2550	

หมายเลขตัวอย่าง	ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	วันที่เก็บ	หมายเหตุ
26	จาวตาล	จ. ปราจีนบุรี	11 ม.ค. 2550	
27	น้ำมะพร้าว	ตลาด อ.เมือง จ.อยุธยา	11 ม.ค. 2550	
28	สับปะรด	ตลาดไทย จ. ปทุมธานี	11 ม.ค. 2550	
29	มะยมเชื่อม	จ. พิษณุโลก	11 ม.ค. 2550	
30	ข้าวหมาก	จ. สุพรรณบุรี	11 ม.ค. 2550	
31	เนื้อตาล	ตลาดไทย จ. ปทุมธานี	11 ม.ค. 2550	
32	ลูกน้ำเต้าต้น	เขื่อนเขาแหลม จ.กาญจนบุรี	11 ก.พ. 2550	
33	ลุกท้อสุก	ตลาดท่ามะกา จ.กาญจนบุรี	11 ก.พ. 2550	
34	น้ำอ้อย	อ.เมือง จ.กาญจนบุรี	9 ก.พ. 2550	
35	สตอร์รี่สุก	อ. ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	9 ก.พ. 2550	
36	ขนุนสุก	อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	9 ก.พ. 2550	
37	ข้าวหมาก	อ.ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี	10 ก.พ. 2550	
38	ลูกตาลสุก	อ. เมือง จ. เพชรบุรี	11 ก.พ. 2550	
39	ชมพู่เพชร	อ. เมือง จ. เพชรบุรี	10 ก.พ. 2550	
40	ลุกหมากสุก	อ. เมือง จ. ประจวบคีรีขันธ์	10 ก.พ. 2550	
41	หอยดอง	อ. เมือง จ. ประจวบคีรีขันธ์	10 ก.พ. 2550	
42	สับปะรด	อ. เมือง จ. ประจวบคีรีขันธ์	11 ก.พ. 2550	
43	กากมันสำปะหลังเน่าเสีย	โรงงานสงวนวงศ์ จ.นครราชสีมา	19 มิ.ย. 2550	

2.3.2 ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

2.3.2.1 ยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างธรรมชาติและจากศูนย์จุลินทรีย์

ก) การแยกจุลินทรีย์ (ยีสต์) จากตัวอย่างที่เก็บ

การดำเนินการแยกยีสต์จากตัวอย่างผลไม้เน่าเสียและอาหารหมักดองที่เก็บรวบรวม ได้ทำการแยกจุลินทรีย์ 2 วิธี คือ :

ก) การแยกด้วยการใช้ความร้อนเพื่อทำลายแบคทีเรียบางกลุ่มที่ไม่สร้างสปอร์

นำตัวอย่างไปไว้ที่น้ำอุ่นอุณหภูมิ 70°ซ. เป็นเวลา 5 นาที, จากนั้นทำการเจือจางในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% (w/v) (normal saline 0.85% w/v) ที่เจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1}. แล้วทำการเทเพลทด้วยอาหารแข็งวายเอ็ม (YM agar), นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 2-3 วัน, สังเกตการเจริญของโคโลนีของยีสต์, ทำการเลือกโคโลนียีสต์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ.

ข) การแยกด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลเพื่อกำจัดแบคทีเรีย

เตรียมอาหารแข็งวายเอ็ม โดยการเติมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) ปริมาณ 0.001 กรัมต่ออาหาร 100 มล. ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากตัวอย่างนำมา streak บนอาหารแข็งวายเอ็มที่ผสมคลอแรมเฟนิคอล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ . เป็นเวลา 2-3 วัน, สังเกตการเจริญของโคโลนียีสต์และเลือกโคโลนียีสต์ที่แตกต่างๆ กัน.

ข) ยีสต์จากแหล่งเก็บรวบรวมจุลินทรีย์ ศูนย์จุลินทรีย์ วว.

ได้นำสายพันธุ์ยีสต์จากศูนย์จุลินทรีย์ที่มีการรายงานว่า มีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ดีมาศึกษาทดสอบการเจริญเติบโตของยีสต์ จำนวน 15 สายพันธุ์ มาศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโต โดยแบ่งเป็น สายพันธุ์ *Candida tropicalis* 4 สายพันธุ์, *Candida utilis* 2 สายพันธุ์, *Pichia farinose* 2 สายพันธุ์, *Saccharomyces cerevisiae* 3 สายพันธุ์ และ *Saccharomyces fiburigera* 4 สายพันธุ์.

2.3.2.2 การเก็บจุลินทรีย์ (ยีสต์) ด้วยวิธีเก็บด้วยสารละลายกลีเซอรอลอุณหภูมิ -70°ซ.

หลังจากการเลือกโคโลนียีสต์จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการสตรีกซ้ำ (re-streak) บนอาหารแข็งวายเอ็มแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 2-3 วัน สังเกตการณ์เจริญของโคโลนียีสต์ ว่าเป็นโคโลนีเดี่ยวซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์ไม่มีจุลินทรีย์ชนิดอื่นปนเปื้อน แล้วเลือกโคโลนีนั้นมาใส่ในอาหารเหลวปลอดเชื้อวายเอ็ม (YM broth) ที่ผสมด้วยกลีเซอรอล 10% (w/v) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ . เป็นเวลา 15 นาที. ทำการกระจายโคโลนีของยีสต์ให้ทั่วในอาหารเหลวแล้วนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็งเก็บเชื้อ (Deep freezer) ที่อุณหภูมิ -80°ซ.

2.3.3 การศึกษาเปรียบเทียบการสร้างปริมาณมวลเซลล์ของยีสต์

ยีสต์ที่ได้จากการแยกจากตัวอย่างธรรมชาติ ได้แก่ ผลไม้เน่าเสียและอาหารหมักดอง จำนวน 93 สายพันธุ์ และยีสต์จากศูนย์จุลินทรีย์จำนวน 15 สายพันธุ์ รวมทั้งสิ้น 108 สายพันธุ์ นำมาศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโต โดยนำเชื้อมาเพาะบนอาหารวุ้นแข็งวายเอ็ม (YM agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 2 วัน. สังเกตโคโลนีของยีสต์ที่เจริญเติบโตดี แล้วเขี่ยโคโลนีของยีสต์ที่กำลังเจริญเติบโตดีปริมาณ 1 ลูปเข็มเขี่ยเชื้อลงมาใส่ลงในฟลาสก์อาหารเหลววายเอ็ม (YM broth) ปลอดเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร. นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (rotary shaker) ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (28-30°ซ.) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ (seed culture). ตรวจนับปริมาณเซลล์ของยีสต์ด้วยชุดนับเซลล์ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer). เมื่อทราบปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ของกล้าเชื้อแล้ว, ใช้ปิเปตต์ปลอดเชื้อดูดกล้าเชื้อ คำนวณปริมาตรกล้าเชื้อที่จะต้องนำมาใส่ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลววายเอ็มปลอดเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ทำให้มีเซลล์ยีสต์เริ่มต้นอยู่ในปริมาณที่เท่ากันคือ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลววายเอ็ม 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์, นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (28-30°ซ.) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง. นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น, ปั่นซ้ำอีกครั้ง. นำเซลล์ยีสต์ที่ได้ไปหาน้ำหนักเปียก (Wet weight) และนำไปอบหานำหนักแห้ง (Dry weight) โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 65°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตจากปริมาณน้ำหนักเซลล์ที่คงที่. นำไปชั่งหาน้ำหนักแห้ง และหลังจากทราบปริมาณน้ำหนักแห้งแล้ว. เมื่อทราบว่าสายพันธุ์ยีสต์ใดที่มีปริมาณการสร้างเซลล์มาก นำเซลล์แห้งมาหาปริมาณโปรตีนแท้ (true protein)

2.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนแท้ด้วยวิธี Lowry (1951)

ทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ bovine serum albumin (ของ Sigma Chemical Company) เป็น standard protein ตามปริมาณดังนี้คือ 25, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัม ในปริมาตรนำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร นำไปใส่ในหลอดทดสอบที่สะอาด เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 นอร์แมล ลงไปในหลอด 0.5 มิลลิลิตร. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็น, เติมสารละลาย alkaline copper solution 2.5 มิลลิลิตร. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วรีบเติม diluted folin reagent มิลลิลิตร (เจือจางด้วยน้ำ 1 เท่า) ผสมให้เข้ากันอย่างดีแล้ว. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำมาวัด O.D. ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร.

สำหรับ Blank ใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร. เขียนกราฟระหว่างค่า O.D. และไมโครกรัมของ standard protein. ทำการวิเคราะห์โปรตีนในเซลล์ยีสต์ โดยการนำเซลล์ยีสต์แห้งมาปริมาณ 100 ไมโครกรัม, เติมสารทุกอย่างเช่นเดียวกับการทำ standard curve เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของเซลล์ จาก standard curve.

2.3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอเพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์ที่มีอัตราการเจริญดี

การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของยีสต์ แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ การสกัดดีเอ็นเอ, การเพิ่มปริมาณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) และการตรวจหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing).

1) การสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอของยีสต์ โดยการใช้เซลล์ยีสต์จากโคโลนียีสต์ที่เจริญดีแล้วบนอาหารแข็งวายเอ็มปริมาณ 1 ลูปเขี่ยเชื้อ. นำเซลล์ยีสต์มากระจายในหลอดเอพเพนดอร์ฟ (eppendorft tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งมีสารละลายย่อยเซลล์ยีสต์ (Lysis buffer) ที่ประกอบด้วย 100 mM Tris (pH 8.0), 30 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS ปริมาณ 200 ไมโครลิตร. จากนั้นนำหลอดแช่ไปในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที, แล้วนำหลอดนี้ไปวางในกล่องน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที. เติมสารละลาย 2.5 โมลาร์ โพแทสเซียมแอซีเทต, แล้ววางบนนำแข็งต่ออีกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง. นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายเข้มข้นเอทานอล (absolute ethanol) ที่เย็นจัดปริมาณ 200 ไมโครลิตร. นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ. เป็นเวลา 30 นาที. นำปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย สารละลายเย็น 70% เอทานอล, นำดีเอ็นเอไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง.

2) การเพิ่มปริมาณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

จากดีเอ็นเอแห้งที่สกัดได้จากขั้นตอนแรก นำ มาเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร, นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายโดยสมบูรณ์. จากนั้น นำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณไรโบโซมดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ (Primer) 934F (5′-CTG CGA AAG CAT TTG CCA AGG-3′) และ LR6 (5′-CGC CAG TTC TGC TTA CC-3′). โดยใช้ชุดเพิ่มดีเอ็นสำเร็จรูป (PCR kit) ของบริษัท Takara Co. Ltd, Otsu, Japan โดยมีส่วนประกอบของพีซีอาร์ (Mixer in PCR reaction) ดังนี้ :

10X reaction buffer	10 µl.
d NTP mixture	8 µl.
Primers (each)	5 µl.
Template DNA	100 ng.
Taq polymerase	0.5 µl.
Mili Q water	x µl.
Total	100 µl.

อย่างไรก็ตาม อาจจะลดส่วนผสมของปฏิกิริยาของพีซีอาร์ลงไปได้เป็น 4 เท่า คือ มีปริมาตรรวมลดลงเหลือเป็น 25 ไมโครลิตร เพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมีที่มีราคาสูง.

สำหรับวงจรของการเพิ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR cycling parameters) ดังนี้ :

- เริ่มต้นเพื่อแยกสายดีเอ็นเอ (Initial denaturation step) อุณหภูมิ 94 °ซ., 5 นาทีแล้วตามด้วย 30 รอบวงจรของ

- อุณหภูมิ 94 °ซ. 1 นาที สำหรับแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation).

- อุณหภูมิ 55 °ซ. 1 นาที 30 วินาที สำหรับ annealing คือการเกาะของดีเอ็นเอไพรเมอร์.

- อุณหภูมิ 72°ซ. 2 นาที 30 วินาที สำหรับการสร้างสายดีเอ็นเอ และสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 10 นาที.

3) การตรวจหาลำดับดีเอ็นเอ

หลังจากได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณโดยวิธีการพีซีอาร์แล้ว ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำความสะอาดดีเอ็นเอสำเร็จรูป PCR purification kit (Qiagen, Germany). จากดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์นำมาทำปฏิกิริยาการหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือไพรเมอร์สังเคราะห์ดีเอ็นเอไปข้างหน้า (forward primer) คือ F63 (5′-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3′) และไพรเมอร์สังเคราะห์ดีเอ็นเอไปข้างหลัง (reverse primer) คือ LR3 (5′-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3′) โดยการใช้ชุดปฏิกิริยาสำเร็จรูปของ ABI BigDye cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster) ซึ่งมีส่วนประกอบปฏิกิริยาของการหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing reaction) คือ :

Big dye terminator	2	ul.
10x buffer	1	ul.
Primer	1	ul.
Purified DNA template	2	ul.
Mili Q water	4	ul.
รวมปริมาตร	10	ul.

จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาหาลำดับดีเอ็นเอมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอลที่เย็น, นำตะกอนดีเอ็นเอมาละลายในสารละลายดีเอ็นเอ TSI (template suppression inhibitor), นำมาวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอด้วยเครื่องหาลำดับดีเอ็นเออัตโนมัติ ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Stafford).

เมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอแล้ว นำมาวิเคราะห์จัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วย BLAST analysis ในเว็บไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/.

2.3.6 การศึกษาการเจริญเติบของยีสต์ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาล (molass) เป็นวัตถุดิบโดยแปรผันหาปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสม

การศึกษาหาปริมาณกากน้ำตาลที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงยีสต์ โดยการแปรผันปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลในอาหารเลี้ยงยีสต์ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลเป็น 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 และ 18% (w/v). อาหารเลี้ยงเชื้อมีส่วนประกอบที่นอกเหนือจากกากน้ำตาล ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ 0.01% (w/v), โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.01% (w/v) และยูเรีย 0.6% (w/v). ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร และทำการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที, ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง. แล้วทำการวัดการเจริญเติบของเซลล์ยีสต์ โดยนับปริมาณเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรงด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (Heamacytometer).

2.3.7 การศึกษาการเจริญเติบของยีสต์ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลโดยแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาเปรียบเทียบหาชนิดของแหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงยีสต์ โดยการแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4]$, ไดแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$, โพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) และยูเรีย

$(NH_2)_2CO$. โดยอาหารเลี้ยงยีสต์นอกจากจะมีแหล่งไนโตรเจนที่ต่างชนิดกันแล้ว ยังมีกากน้ำตาล 10% (w/v) และโพแทสเซียมไดไฮโดเจนฟอสเฟต 0.01% (w/v). เลี้ยงเชื้อยีสต์ในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที, ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง. แล้ววัดการเจริญเติบของเซลล์ยีสต์โดยดูจากน้ำหนักเซลเปียก (wet weight) และน้ำหนักแห้ง (dry weight).

2.3.8 การศึกษาการเจริญเติบของยีสต์ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลโดยแปรผันปริมาณแหล่งของฟอสฟอรัส

การศึกษาปริมาณของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ซึ่งเป็นแหล่งฟอสเฟตที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงยีสต์ โดยการแปรผันปริมาณของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.01%, 0.03% และ 0.05% (w/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่มีส่วนประกอบของกากน้ำตาลปริมาณ 10%(w/v) และ 0.6% (w/v) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$, ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร และทำการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที, ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง, แล้วทำการวัดการเจริญเติบของเซลล์ยีสต์โดยดูจากน้ำหนักเซลล์เปียก และน้ำหนักแห้ง.

2.3.9 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อ (seed inoculum) ต่อการเจริญเติบของยีสต์

ศึกษาปริมาณกล้าเชื้อที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม โดยการเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของกากน้ำตาลปริมาณ 10%(w/v) และ 0.6% (w/v) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$] และ 0.01% (w/v) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4). ใส่ปริมาณกล้าเชื้อที่ปริมาณต่างๆ กันคือ 1, 2, 3, 5, 7 และ 10% (w/v) ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และทำการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที, ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง, แล้วทำการวัดการเจริญเติบของเซลล์ยีสต์โดยดูจากน้ำหนักเซลเปียกและน้ำหนักแห้ง.

2.3.10 การศึกษาการเจริญเติบของยีสต์ในถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร ด้วยระบบ Batch fermentation

2.3.10.1 การศึกษาความเร็วของการกวน (agitation speed) ต่อการเจริญเติบของยีสต์ในถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร

การศึกษาความเร็วของการกวนต่อการเจริญของยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยการเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงปริมาตร 2 ลิตร ที่มีส่วนประกอบของกากน้ำตาลปริมาณ 10% (w/v) และ 0.6% (w/v) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$] และ 0.01% (w/v) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ใส่ปริมาณกล้าเชื้อ 2% (w/v) สภาวะการเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบ batch culture โดยแปรผันอัตราการกวนต่างๆ กัน คือ 250, 450 และ 550 รอบต่อนาที, ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ^{o}ซ.) อัตราการให้อากาศ 1 vvm (2 ลิตร/นาที) และไม่ควบคุมพีเอช เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, แล้วทำการวัดการเจริญเติบของเซลล์ยีสต์โดยดูจากน้ำหนักเซลล์เปียกและน้ำหนักแห้ง.

2.3.10.2 การศึกษาการเจริญเติบของยีสต์ในถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร โดยแปรผันการควบคุมค่าพีเอช (pH) ในถังหมัก

การศึกษาค่าพีเอชต่อการเจริญของยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยการเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงปริมาตร 2 ลิตร ที่มีส่วนประกอบของกากน้ำตาลปริมาณ 10% (w/v) และ 0.6% (w/v) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$] และ 0.01% (w/v) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4). ใส่ปริมาณกล้าเชื้อ 2% (w/v) โดยแปรผันการควบคุมค่าพีเอชต่างๆ กัน คือ 4.5, 5.5 และแบบไม่ควบคุมพีเอช (non-control pH). สภาวะการเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบ batch culture คือ อัตราการกวน 450 รอบต่อนาที, ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ^{o}ซ.), อัตราการให้อากาศ 1 vvm (2 ลิตร/นาที) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, แล้วทำการวัดการเจริญเติบของเซลล์ยีสต์โดยดูจากน้ำหนักเซลล์เปียกและน้ำหนักแห้ง.

2.3.10.3 การศึกษาการเจริญเติบของยีสต์ในถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร ด้วยระบบ Fed-batch fermentation

การศึกษาผลิตเซลล์ยีสต์โดยใช้การเลี้ยงแบบ Fed batch ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยการเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงปริมาตรเริ่มต้นที่ 1 ลิตรที่มีส่วนประกอบของกากน้ำตาลปริมาณ 10% (w/v) และ 0.6% (w/v) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$] และ 0.01% (w/v)

โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4). ใส่ปริมาณกล้าเชื้อ 2% (w/v) สภาวะการเลี้ยง อัตราการกวน 450 รอบต่อนาที, ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °ซ.), ควบคุมค่าพีเอชที่ 4.5 อัตราการให้อากาศ 1 vvm (2 ลิตร/นาที) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง. หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปเพิ่มอีก 1 ลิตร แล้วเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 48 ชั่วโมง, ทำการวัดการเจริญเติบของเซลล์ยีสต์โดยดูจากน้ำหนักเซลเปียกและน้ำหนักแห้ง.

2.3.10.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์ในถังหมัก (Fermenter) ขนาด 300 ลิตร โดยการเลี้ยงแบบ Batch fermentation

การศึกษาผลิตเซลล์ยีสต์ในถังหมักขนาด 300 ลิตร โดยการเลี้ยงยีสต์แบบรุ่นผลิต (Batch) ในอาหารเลี้ยงปริมาตร 100 ลิตร ที่มีส่วนประกอบของกากน้ำตาลปริมาณ 10% (w/v) และ 0.6% (w/v) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$] และ 0.01% (w/v) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ใส่ปริมาณกล้าเชื้อ 2% (w/v) สภาวะการเลี้ยง อัตราการกวน 450 รอบต่อนาที, ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 30 °ซ., ควบคุมค่าพีเอชที่ 4.5, อัตราการให้อากาศ 1 vvm (100 ลิตร/นาที), ทำการเลี้ยงเวลา 48 ชั่วโมง, ทำการวัดการเจริญเติบของเซลล์ยีสต์โดยดูจากน้ำหนักเซลเปียกและน้ำตาลในอาหารเลี้ยงยีสต์.

2.3.11 การตรวจหาความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีน

การตรวจหาความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีนโดยการนำเซลล์ยีสต์ที่อบแห้งมาทำการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก (Acute Oral Toxicity Test) โดยใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar ทั้งเพศผู้และเพศเมีย. เมื่อป้อนตัวอย่างทดสอบทางปากในขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว สังเกตอาการผิดปกติของหนูที่เวลา 1/2, 1 และ 3 ชั่วโมง หลังป้อนตัวอย่างทดสอบ และอย่างน้อยวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 14 วัน. ผลการทดสอบไม่พบการตายหรืออาการผิดปกติใดๆ หรือไม่.

2.3.12 การวิเคราะห์องค์ประกอบของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีน

ทำการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบด้านโภชนาการและสารที่เป็นพิษในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีน. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการได้แก่ โปรตีน ไขมันรวม กรดแอมิโน, วิตามิน, เหล็ก (Ferrous), สังกะสี (Zinc), ทองแดง. ส่วนประกอบของกรดแอมิโน และสารที่

เป็นพิษตามมาตรฐานอาหารสัตว์ได้แก่ ปรอท (Mercury), ตะกั่ว (Lead), แคดเมียม (Cadmium) และสารอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin).

2.3.13 การทดลองใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีนเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนในการเลี้ยงปลา

ทำการทดลองการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีนมาทดลองใช้ในการเลี้ยงปลานิล โดยนำมาใช้ทดแทนแหล่งโปรตีนในอาหารสำหรับเลี้ยงปลา. การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลองในการเลี้ยงปลา คือ :

1) ใช้ถั่วเหลืองเป็นโปรตีนเสริม.
2) ใช้จุลินทรีย์โปรตีนจากยีสต์เป็นแหล่งโปรตีนเสริม.
3) ใช้จุลินทรีย์โปรตีนจากยีสต์ที่ผ่านการทำ pretreatment เป็นแหล่งโปรตีนเสริม.
4) ควบคุมโดยไม่มีแหล่งโปรตีนเสริม มีเฉพาะแหล่งโปรตีนพื้นฐาน (protein basis).

สูตรอาหารเลี้ยงปลาที่มีแหล่งโปรตีนพื้นฐาน 10% (w/w) และมีโปรตีนเสริมจากถั่วเหลือง หรือจากจุลินทรีย์โปรตีนจากยีสต์ 10% (w/w) จะมีปริมาณโปรตีนรวมในสูตรอาหารเท่ากันคือ 20%(w/v). ส่วนสูตรอาหารชุดควบคุมจะมีเฉพาะโปรตีนพื้นฐาน (protein basis) ในปริมาณ 10%(w/v).

สูตรอาหารที่มีแหล่งโปรตีนเสริมจากยีสต์หรือถั่วเหลือง

- ถั่วเหลือง/ ยีสต์	22	กรัม
- รำละเอียด	43	กรัม
- ปลายข้าว	16	กรัม
- ข้าวโพด	12	กรัม
- ถั่วลิสง	7	กรัม
รวม	100	กรัม

สูตรควบคุม

- รำละเอียด	55	กรัม
- ปลายข้าว	21	กรัม
- ข้าวโพด	15	กรัม
- ถั่วลิสง	9	กรัม
รวม	100	กรัม

หมายเหตุ : ส่วนประกอบของโปรตีน

-	ถั่วเหลือง	ปริมาณโปรตีน	48%	(w/w)
-	จุลินทรีย์โปรตีนจากยีสต์	ปริมาณโปรตีน	48%	(w/w)
-	รำข้าว	ปริมาณโปรตีน	12%	(w/w)
-	ข้าวโพด	ปริมาณโปรตีน	7%	(w/w)
-	ถั่วลิสง	ปริมาณโปรตีน	50%	(w/w)

การเตรียมอาหารเลี้ยงปลา

ชั่งส่วนประกอบของอาหาร แล้วเติมน้ำเย็นลงไปประมาณ 1 ใน 5 ส่วนโดยปริมาตร ในภาชนะแล้วคนให้เข้ากัน. แล้วไปตั้งไฟให้อุณหภูมิประมาณ 85-90 °ซ. เพื่อให้ส่วนประกอบของอาหารสุกและน้ำงวดขึ้น ให้มีความลักษณะเนื้อเกาะตัวเหนียวพอประมาณ เพื่อให้สะดวกสำหรับการอัดฉีดเป็นเส้น ด้วย Syringe เพื่อให้อาหารเป็นเส้นคล้ายกับเส้นบะหมี่. แล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 55- 60 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนแห้งมีความชื้นไม่เกิน 5%.

สภาวะการเลี้ยงปลา

- ตู้เลี้ยงปลา มีขนาด กว้าง x ยาว x สูง = 30x 60x 35 เซนติเมตร.
- การให้อาหารปลาให้ปริมาณวันละ 2% ของน้ำหนักตัวปลาต่อวัน.
- เลี้ยงปลาเป็นเวลาประมาณ 2 เดือน (7 สัปดาห์).

การวัดการเจริญเติบโตของปลา

ชั่งน้ำหนักปลาเริ่มต้นที่วันที่ 1 แล้วทำการชั่งนำหนักปลาทุกสัปดาห์ โดยชั่งน้ำหนักเป็นรายตัว.

ทำการพรีทรีต (pretreat) ยีสต์

- เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ลงในเซลล์ยีสต์เปียกปรับจนสารละลายมีค่า pH = 10.
- อุ่นให้ความร้อน 60 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที.
- แล้วปล่อยไว้เย็นทำให้เป็นกลาง ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก.
- เติมน้ำล้างเพื่อละลายเกลือที่ตกตะกอนออก.
- นำไปปั่นเพื่อให้เซลล์ยีสต์ตกตะกอน แล้วนำเซลล์เปียกไปอบแห้งแล้วนำมาบด.

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ยีสต์ที่นำมาใช้ศึกษาหาคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โปรตีน

3.1.1 ยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างธรรมชาติ

การแยกยีสต์จากตัวอย่างผลไม้เน่าเสียและอาหารหมักดองที่เก็บรวบรวม จำนวน 44 ตัวอย่าง ได้ทำการแยกจุลินทรีย์ 2 วิธีคือ ก) การแยกด้วยการใช้ความร้อนเพื่อทำลายแบคทีเรียบางกลุ่มที่ไม่สร้างสปอร์ ข) การแยกด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลเพื่อกำจัดแบคทีเรีย. สามารถแยกยีสต์จากตัวอย่างได้จำนวน 93 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2.

ตารางที่ 2. จำนวนและสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกมาจากตัวอย่างผลไม้และอาหารหมักดอง

ลำดับ	สายพันธุ์	แหล่งตัวอย่าง	วิธีการแยก	สีโคโลนีของยีสต์
1	1-C-1	ส้ม	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีมขาว
2	1-H-1	ส้ม	ใช้ความร้อน	สีครีม
3	2-H-1	มะละกอ	ใช้ความร้อน	สีครีมขาว
4	3-C-1	สตรอเบอรี	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
5	3-H-1	สตรอเบอรี	ใช้ความร้อน	สีชมพูอ่อน
6	4-C-3	แตงโม	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
7	4-C-4	แตงโม	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
8	4-H-1	แตงโม	ใช้ความร้อน	สีครีม
9	4-H-2	แตงโม	ใช้ความร้อน	สีครีม
10	5-H-1	มะเขือเทศ	ใช้ความร้อน	สีครีม
11	6-H-1	ขนุน	ใช้ความร้อน	สีครีม
12	7-C-1	มะเฟือง	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีมขาว
13	8-C-1	องุ่น	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีมขาว
14	8-C-2	องุ่น	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
15	9-C-1	พุทรา	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีมขาว
16	9-C-2	พุทรา	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
17	9-H-1	พุทรา	ใช้ความร้อน	สีครีม
18	9-H-2	พุทรา	ใช้ความร้อน	สีครีม
19	10-C-2	ละมุด	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม

ลำดับ	สายพันธุ์	แหล่งตัวอย่าง	วิธีการแยก	สีโคโลนีของยีสต์
20	10-H-1	ละมุด	ใช้ความร้อน	สีครีม
21	10-H-2	ละมุด	ใช้ความร้อน	สีครีม
22	11-H-1	มะขามหวาน	ใช้ความร้อน	สีครีม
23	12-C-1	ฝรั่ง	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
24	12-C-2	ฝรั่ง	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
25	12-H-1	ฝรั่ง	ใช้ความร้อน	สีครีมขาว
26	14-C-1	กล้วย	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีมขาว
27	14-C-2	กล้วย	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
28	14-H-1	กล้วย	ใช้ความร้อน	สีครีม
29	14-H-2	กล้วย	ใช้ความร้อน	สีครีม
30	15-C-1	อ้อย	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
31	15-C-2	อ้อย	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
32	15-H-1	อ้อย	ใช้ความร้อน	สีครีมขาว
33	16-C-1	โมลาส	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
34	16-H-1	โมลาส	ใช้ความร้อน	สีครีม
35	17-C-1	ข้าวหมาก	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
36	17-C-2	ข้าวหมาก	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
37	18-C-1	ข้าวหมาก	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
38	18-H-1	ข้าวหมาก	ใช้ความร้อน	สีครีม
39	19-H-1	ข้าวหมาก	ใช้ความร้อน	สีครีม
40	20-C-1	พุทราดอง	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
41	20-C-2	พุทราดอง	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
42	21-C-1	ผักกุ่มดอง	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
43	21-C-2	ผักกุ่มดอง	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีมขาว
44	23-C-1	น้ำตาลสด	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีมขาว
45	23-C-2	น้ำตาลสด	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
46	23-C-3	น้ำตาลสด	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
47	23-H-1	น้ำตาลสด	ใช้ความร้อน	สีครีมขาว
48	23-H-2	น้ำตาลสด	ใช้ความร้อน	สีครีม
49	24-C-1	น้ำตาลสด	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
50	24-C-2	น้ำตาลสด	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
51	24-C-3	น้ำตาลสด	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม

ลำดับ	สายพันธุ์	แหล่งตัวอย่าง	วิธีการแยก	สีโคโลนีของยีสต์
52	24-C-4	น้ำตาลสด	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีมขาว
53	24-H-1	น้ำตาลสด	ใช้ความร้อน	สีครีม
54	24-H-2	น้ำตาลสด	ใช้ความร้อน	สีครีม
55	24-H-3	น้ำตาลสด	ใช้ความร้อน	สีครีมขาว
56	25-C-1	แอปเปิล	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
57	25-C-2	แอปเปิล	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
58	25-H-1	แอปเปิล	ใช้ความร้อน	สีครีม
59	25-H-2	แอปเปิล	ใช้ความร้อน	สีครีม
60	25-H-3	แอปเปิล	ใช้ความร้อน	สีครีม
61	26-C-1	จาวตาล	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
62	26-C-2	จาวตาล	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
63	26-H-1	จาวตาล	ใช้ความร้อน	สีครีม
64	26-H-2	จาวตาล	ใช้ความร้อน	สีครีม
65	26-H-3	จาวตาล	ใช้ความร้อน	สีครีมขาว
66	27-C-1	น้ำมะพร้าว	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
67	27-C-3	น้ำมะพร้าว	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีมขาว
68	27-H-1	น้ำมะพร้าว	ใช้ความร้อน	สีครีม
69	27-H-2	น้ำมะพร้าว	ใช้ความร้อน	สีครีม
70	28-C-1	สับปะรด	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
71	28-C-2	สับปะรด	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
72	28-H-1	สับปะรด	ใช้ความร้อน	สีครีม
73	28-H-2	สับปะรด	ใช้ความร้อน	สีครีม
74	29-H-1	มะยมเชื่อม	ใช้ความร้อน	สีครีม
75	29-H-2	มะยมเชื่อม	ใช้ความร้อน	สีครีม
76	30-C-1	ข้าวหมาก	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
77	30-H-1	ข้าวหมาก	ใช้ความร้อน	สีครีม
78	30-H-3	ข้าวหมาก	ใช้ความร้อน	สีครีม
79	31-C-1	เนื้อลูกตาล	ใช้สารปฏิชีวนะ	สีครีม
80	31-C-2	เนื้อลูกตาล	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
81	31-C-3	เนื้อลูกตาล	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
82	31-H-1	เนื้อลูกตาล	ใช้ความร้อน	สีครีม
83	31-H-2	เนื้อลูกตาล	ใช้ความร้อน	สีครีม

ตารางที่ 2 (ต่อ).

ลำดับ	สายพันธุ์	แหล่งตัวอย่าง	วิธีการแยก	สีโคโลนีของยีสต์
84	32-C-1	ลูกน้ำเต้าต้น	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
85	33-C-1	ลูกท้อสุก	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
86	34-C-1	น้ำอ้อย	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
87	34-C-2	น้ำอ้อย	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
88	35-C-1	สตรอเบอรีสุก	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีชมพูเข้ม
89	38-C-1	ลูกตาลสุก	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
90	38-C-2	ลูกตาลสุก	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
91	38-C-3	ลูกตาลสุก	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีมขาว
92	39-C-1	ชมพู่เพชร	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
93	39-C-2	ชมพู่เพชร	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
94	42-C-1	สับปะรด	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีมขาว
95	43-C-1	กากมันสำปะหลังเน่าเสีย	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
96	43-C-4	กากมันสำปะหลังเน่าเสีย	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
97	43-H-1	กากมันสำปะหลังเน่าเสีย	ใช้ความร้อน	สีครีม
98	44-C-2	กากมันสำปะหลังเน่าเสีย	ใช้สารยาปฏิชีวนะ	สีครีม
99	44-H-1	กากมันสำปะหลังเน่าเสีย	ใช้ความร้อน	สีครีม
100	44-H-2	กากมันสำปะหลังเน่าเสีย	ใช้ความร้อน	สีครีม

3.1.2 ยีสต์จากแหล่งเก็บรวบรวมศูนย์จุลินทรีย์ วว.

ได้นำสายพันธุ์ยีสต์จากศูนย์จุลินทรีย์ที่มีการรายงานว่า มีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ดีมาศึกษาทดสอบการเจริญเติบโตของยีสต์ จำนวน 15 สายพันธุ์ มาศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโต ดังแสดงในตารางที่ 3.

ตารางที่ 3. สายพันธุ์ยีสต์จากศูนย์จุลินทรีย์ที่นำมาศึกษาการเจริญเติบโต

ลำดับ	รหัส TISTR	สายพันธุ์
1	TISTR 5136	*Candida tropicalis*
2	TISTR 5144	*Candida tropicalis*
3	TISTR 5145	*Candida tropicalis*
4	TISTR 5146	*Candida tropicalis*

ตารางที่ 3 (ต่อ).

ลำดับ	รหัส TISTR	สายพันธุ์
5	TISTR 5001	*Candida utilis*
6	TISTR 5046	*Candida utilis*
7	TISTR 5105	*Pichia farinose*
8	TISTR 5106	*Pichia farinose*
9	TISTR 5020	*Saccharomyces cerevisiae*
10	TISTR 5027	*Saccharomyces cerevisiae*
11	TISTR 5047	*Saccharomyces cerevisiae*
12	TISTR 5040	*Saccharomycopsis fibuligera*
13	TISTR 5097	*Saccharomycopsis fibuligera*
14	TISTR 5304	*Saccharomycopsis fibuligera*
15	TISTR 5330	*Saccharomycopsis fibuligera*

3.2 การเก็บจุลินทรีย์(ยีสต์) ด้วยวิธีเก็บด้วยสารละลายกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -70°ซ.

เชื้อยีสต์ที่ได้จากการแยกจากตัวอย่างธรรมชาติคือ ผลไม้สุกเน่าเสียและอาหารหมักดอง จำนวน 100 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ยีสต์ที่ได้ขอมาจากศูนย์จุลินทรีย์ วว. จำนวน 15 สายพันธุ์ ได้นำมาเก็บด้วยวิธีเก็บที่อุณหภูมิต่ำในอาหารเหลววายเอ็มที่มีสารละลายกลีเซอรอล 10% และเก็บที่อุณหภูมิ -70 °ซ. จำนวนรวมทั้งสิ้น 115 สายพันธุ์.

3.3 การศึกษาเปรียบเทียบการสร้างปริมาณมวลเซลล์ของยีสต์

ผลการศึกษาการเจริญเติบของยีสต์ความสามารถในการสร้างเซลล์ จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารเหลววายเอ็ม 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์, เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที, ที่อุณหภูมิห้อง (28-30°ซ.), เป็นเวลา 48 ชั่วโมง. หาน้ำหนักเปียกของเซลล์ของยีสต์, น้ำหนักเปียกเซลล์ยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างแสดงในตารางที่ 4. น้ำหนักเปียกเซลล์ยีสต์จากศูนย์จุลินทรีย์แสดงในตารางที่ 5.

ตารางที่ 4. ปริมาณน้ำหนักเปียกของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างธรรมชาติ

ลำดับ	สายพันธุ์	น้ำหนักเซลล์เหลวเฉลี่ย (กรัม)/อาหารเหลว 100 มล.	ลำดับ	สายพันธุ์	น้ำหนักเซลล์เหลวเฉลี่ย (กรัม)/อาหารเหลว 100 มล.
1	1-C-1	2.1	51	24-C-3	1.32
2	1-H-1	1.91	52	24-C-4	1.65
3	2-H-1	1.50	53	24-H-1	2.31
4	3-C-1	1.45	54	24-H-2	2.3
5	3-H-1	1.95	55	24-H-3	1.61
6	4-C-3	1.51	56	25-C-1	1.2
7	4-C-4	1.71	57	25-C-2	2.07
8	4-H-1	2.37	58	25-H-1	1.34
9	4-H-2	1.92	59	25-H-2	1.94
10	5-H-1	1.92	60	25-H-3	1.07
11	6-H-1	2.03	61	26-C-1	1.88
12	7-C-1	1.91	62	26-C-2	1.0
13	8-C-1	1.91	63	26-H-1	1.95
14	8-C-2	1.3	64	26-H-2	2.04
15	9-C-1	1.68	65	26-H-3	2.02
16	9-C-2	1.29	66	27-C-1	2.94
17	9-H-1	1.87	67	27-C-3	1.94
18	9-H-2	1.92	68	27-H-1	2.56
19	10-C-2	1.75	69	27-H-2	2.58
20	10-H-1	2.8	70	28-C-1	1.81
21	10-H-2	1.83	71	28-C-2	1.83
22	11-H-1	0.8	72	28-H-1	1.23
23	12-C-1	2.21	73	28-H-2	1.15
24	12-C-2	1.79	74	29-H-1	1.61
25	12-H-1	2.01	75	29-H-2	1.78
26	14-C-1	2.07	76	30-C-1	2.57
27	14-C-2	1.76	77	30-H-1	1.86
28	14-H-1	2.15	78	30-H-3	1.88
29	14-H-2	1.99	79	31-C-1	1.92

ตารางที่ 4 (ต่อ).

ลำดับ	สายพันธุ์	น้ำหนักเซลล์เหลวเฉลี่ย (กรัม)/ อาหารเหลว 100 มล.	ลำดับ	สายพันธุ์	น้ำหนักเซลล์เหลวเฉลี่ย (กรัม)/ อาหารเหลว 100 มล.
30	15-C-1	2.77	80	31-C-2	2.03
31	15-C-2	2.53	81	31-C-3	1.87
32	15-H-1	2.73	82	31-H-1	1.90
33	16-C-1	1.63	83	31-H-2	1.74
34	16-H-1	1.93	84	32-C-1	2.0
35	17-C-1	1.66	85	33-C-1	1.82
36	17-C-2	2.61	86	34-C-1	1.75
37	18-C-1	1.62	87	34-C-2	1.66
38	18-H-1	1.72	88	35-C-1	3.02
39	19-H-1	2.79	89	38-C-1	2.28
40	20-C-1	2.17	90	38-C-2	1.94
41	20-C-2	2.19	91	38-C-3	2.08
42	21-C-1	2.08	92	39-C-1	1.66
43	21-C-2	1.78	93	39-C-2	1.73
44	23-C-1	2.09	94	42-C-1	1.86
45	23-C-2	1.72	95	43-C-1	2.71
46	23-C-3	2.7	96	43-C-4	1.92
47	23-H-1	1.85	97	43-H-1	2.29
48	23-H-2	1.92	98	44-C-2	2.26
49	24-C-1	1.91	99	44-H-1	2.62
50	24-C-2	2.0	100	44-H-2	2.64

ตารางที่ 5. น้ำหนักเปียกของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ที่จากศูนย์จุลินทรีย์ วว.

ลำดับ	สายพันธุ์	น้ำหนักเซลล์เหลวเฉลี่ย (กรัม)/อาหารวายเอ็มเหลว 100 มล.	ลำดับ	สายพันธุ์	น้ำหนักเซลล์เหลวเฉลี่ย (กรัม)/อาหารวายเอ็มเหลว100 มล.
1	TISTR 5001	2.53	9	TISTR 5020	1.82
2	TISTR 5046	2.22	10	TISTR 5027	1.76
3	TISTR 5105	1.98	11	TISTR 5041	1.90
4	TISTR 5106	1.87	12	TISTR 5047	1.85
5	TISTR 5136	2.77	13	TISTR 5097	2.44
6	TISTR 5144	2.53	*14	TISTR 5304	-
7	TISTR 5145	2.83	*15	TISTR 5330	-
8	TISTR 5146	2.58			

หมายเหตุ * ไม่สามารถหาน้ำหนักเปียกได้เนื่องจากเซลล์ไม่ตกตะกอนหลังทำการปั่นเหวี่ยง

การศึกษาหาปริมาณการสร้างเซลล์ยีสต์จากน้ำหนักเปียกจากยีสต์แหล่งธรรมชาติ 100 สายพันธุ์และจากศูนย์จุลินทรีย์ 15 สายพันธุ์ รวมทั้งหมด 115 สายพันธุ์. จากข้อมูลน้ำหนักเปียกของเซลล์ยีสต์เมื่อทำการเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีการสร้างปริมาณเซลล์ยีสต์สูง โดยเลือกจากการสร้างปริมาณเซลยีสต์มากกว่า 2.5 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิตร พบว่า มีจำนวน 20 สายพันธุ์ มาจากยีสต์ที่แยกจากธรรมชาติ 15 สายพันธุ์ และจากศูนย์จุลินทรีย์ 5 สายพันธุ์. ได้นำยีสต์เหล่านี้มาทำการศึกษาต่อไปคือการนำมาหาปริมาณโปรตีนในการผลิตภัณฑ์ยีสต์ผงแห้ง และการเลือกมาจัดจำแนกด้วยวิธีชีวโมเลกุล.

3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนแท้ (True protein)

สายพันธุ์ยีสต์ที่ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างเซลล์จากสายพันธุ์ที่แยกจากแหล่งธรรมชาติ 100 สายพันธุ์ และจากศูนย์จุลินทรีย์จำนวน 15 สายพันธุ์. ได้คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีการเจริญเติบโตที่ดีโดยมีการสร้างเซลล์ในปริมาณที่สูงกว่า 1.8 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวน 50 สายพันธุ์. นำเซลล์มาอบแห้งและทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนแท้ (true protein) ซึ่งผลของค่าปริมาณโปรตีนแท้ในยีสต์ผงแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 6.

ตารางที่ 6. ปริมาณโปรตีนแท้ (true protein) ของเซลล์แห้งของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ

ลำดับ	สายพันธุ์	ปริมาณโปรตีนแท้	ลำดับ	สายพันธุ์	ปริมาณโปรตีนแท้
1	1-C-1	40.04	26	26-H-3	34.47
2	3-H-1	24.22	27	27-H-1	40.04
3	4-H-1	36.37	28	27-H-2	41.26
4	5-H-1	41.65	29	27-C-1	36.37
5	6-H-1	42.39	30	27-C-3	36.77
6	7-H-1	42.72	31	30-C-1	34.28
7	9-H-2	45.54	32	30-H-1	42.14
8	10-H-1	46.48	33	31-C-1	45.14
9	12-C-1	40.10	34	31.-C-2	44.17
10	14-C-1	40.44	35	31-H-1	31.56
11	14-H-1	41.62	36	32-C-1	45.72
12	14-H-2	36.06	37	35-C-1	33.81
13	15-C-1	39.92	38	38-C-1	38.60
14	15-C-2	32.07	39	32-C-2	44.05
15	15-H-1	36.20	40	38-C-3	42.87
16	17-C-2	38.72	41	43-C-1	36.06
17	19-H-1	36.06	42	43-C-4	37.69
18	20-C-1	44.57	43	44-C-2	37.93
19	20-C-2	42.16	44	44-H-1	35.60
20	23-C-3	43.98	45	44-H-2	33.43
21	24-H-1	44.48	46	TISTR 5001	38.43
22	24-H-2	39.61	47	TISTR 5136	32.70
23	25-C-2	41.94	48	TISTR 5144	40.01
24	25-H-2	45.63	49	TISTR 5145	27.65
25	26-H-2	42.12	50	TISTR 5146	36.40

3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ของไรโบโซมดีเอ็นเอเพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์ที่มีอัตราการเจริญดี

จากข้อมูลการเจริญเติบโตของยีสต์ในการสร้างปริมาณเซลล์ของยีสต์ ได้คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์มีการสร้างปริมาณเซลล์ได้สูงคือ มากกว่า 2.50 กรัมของน้ำหนักเซลล์เปียกต่ออาหารเหลว

100 มิลลิลิตร ไปจัดจำแนกหาชื่อสายพันธุ์, ด้วยการวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA). ผลของการจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์ที่มีการสร้างปริมาณเซลล์ยีสต์สูงด้วยการวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอ แสดงในตารางที่ 7.

ตารางที่ 7. ชื่อสายพันธุ์ยีสต์ที่สร้างปริมาณเซลล์สูงจากการวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอของไรโบโซมดีเอ็นเอ

ลำดับ	สายพันธุ์	น้ำหนักเซลล์เปียก เฉลี่ย (กรัม)/ อาหารวายเอ็มเหลว 100 มล.	ชื่อสายพันธุ์ที่จัดจำแนก
1	10-H-1	2.80	*Issatchenkia hanoiensis*
2	15-C-1	2.77	*Candida tropicalis*
3	15-C-2	2.53	*Candida tropicalis*
4	15-H-1	2.73	*Candida tropicalis*
5	17-C-2	2.61	*Candida tropicalis*
6	19-H-1	2.79	*Candida tropicalis*
7	23-C-3	2.70	*Candida tropicalis*
8	24-H-1	2.31	*Issatchenkia orientalis*
9	27-C-1	2.94	*Candida tropicalis*
10	27-H-1	2.56	*Candida tropicalis*
11	27-H-2	2.58	*Candida tropicalis*
12	30-C-1	2.57	*Pichia farinosa*
13	35-C-1	3.05	*Sporidiobolus pararoseus*
14	43-C-1	2.71	*Candida tropicalis*
15	44-H-1	2.62	*Candida tropicalis*
16	44-H-2	2.64	*Candida tropicalis*
17	TISTR 5001	2.53	*Candida utilis*
18	TISTR 5136	2.77	*Candida tropicalis*
19	TISTR 5144	2.53	*Candida tropicalis*
20	TISTR 5145	2.83	*Candida tropicalis*
21	TISTR 5146	2.58	*Candida tropicalis*

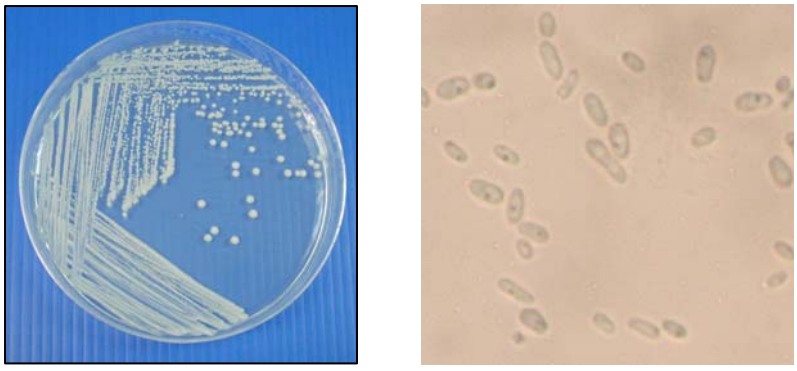
3.6 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างยีสต์สายพันธุ์ที่สร้างปริมาณเซลล์สูง

ได้นำยีสต์สายพันธุ์ที่มีการสร้างปริมาณเซลล์สูงมาทดลองเลี้ยงในอาหารเหลววายเอ็ม ปริมาณ 100 มิลลิลิตร, เปรียบระหว่างกันอีกครั้งโดยวัดปริมาณเซลล์เปียกและปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง. นำมาเปรียบเทียบกัน เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสายพันธุ์ผลิตจุลินทรีย์โปรตีน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 8.

ตารางที่ 8. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างยีสต์สายพันธุ์ที่สร้างปริมาณเซลล์สูง

ลำดับ	สายพันธุ์	ชื่อสายพันธุ์ที่จัดจำแนก	น้ำหนักเซลล์เปียกเฉลี่ย (กรัม)/อาหารวายเอ็มเหลว 100 มล.	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัม)/อาหารวายเอ็มเหลว 100 มล.	ความชื้น (%)
1	10-H-1	*Issatchenkia hanoiensis*	2.75	0.343	87.52
2	15-C-1	*Candida tropicalis*	2.535	0.655	74.16
3	15-C-2	*Candida tropicalis*	2.49	0.523	78.99
4	15-H-1	*Candida tropicalis*	2.47	0.60	75.70
5	17-C-2	*Candida tropicalis*	2.61	0.473	81.87
6	19-H-1	*Candida tropicalis*	2.68	0.60	78.73
7	23-C-3	*Candida tropicalis*	2.34	0.49	79.05
8	24-H-1	*Issatchenkia orientalis*	2.21	0.36	83.71
9	27-C-1	*Candida tropicalis*	2.48	0.595	76.00
10	27-H-1	*Candida tropicalis*	2.15	0.556	74.13
11	27-H-2	*Candida tropicalis*	2.11	0.552	75.26
12	30-C-1	*Pichia farinosa*	1.87	0.56	70.00
13	35-C-1	*Sporidiobolus pararoseus*	2.52	0.54	78.57
14	43-C-1	*Candida tropicalis*	2.495	0.64	74.34
15	44-H-1	*Candida tropicalis*	2.0	0.456	77.20
16	44-H-2	*Candida tropicalis*	2.07	0.57	72.46
17	TISTR 5001	*Candida utilis*	2.47	0.61	75.30
18	TISTR 5136	*Candida tropicalis*	2.06	0.513	75.09
19	TISTR 5144	*Candida tropicalis*	2.17	0.518	76.12
20	TISTR 5145	*Candida tropicalis*	2.15	0.511	76.23
21	TISTR 5146	*Candida tropicalis*	2.21	0.520	76.47

จากข้อมูลเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการสร้างปริมาณเซลล์ ดังในตารางที่ 8, เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลปริมาณการสร้างน้ำหนักเซลล์เปียกและน้ำหนักเซลล์แห้ง จากข้อมูลของน้ำหนักแห้งประกอบ พบว่า มีสายพันธุ์ยีสต์ที่สร้างเซลล์แห้งได้สูง 5 สายพันธุ์ โดยเป็น *Candida tropicalis* 4 สายพันธุ์ คือ 15-C-1, 19-H-1, 27-C-1 และ 43-C-1 โดยมีการสร้างปริมาณเซลล์น้ำหนักเปียกและน้ำหนักแห้งเป็น 2.535, 0.655; 2.68, 0.57; 2.48, 0.598 และ 2.495, 0.61 กรัม/อาหารเหลว 100 มล. ตามลำดับ และเป็น *Candida utilis* 1 สายพันธุ์ คือ TISTR 5001 มีการสร้างปริมาณเซลล์น้ำหนักเปียกและน้ำหนักแห้งเป็น 2.47 และ 0.61 กรัม/ อาหารเหลว 100 มล. เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างปริมาณเซลล์ พบว่า สายพันธุ์ยีสต์กลุ่มของ *Candida tropicalis* มีปริมาณการสร้างเซลล์ที่สูงกว่ายีสต์สายพันธุ์ *Candida utilis* เล็กน้อย. แต่เมื่อดูจากข้อมูลโดยทั่วไปพบว่า *Candida tropicalis* บางสายพันธุ์มีโอกาสที่จะทำให้เกิดโรคเกี่ยวทางเดินหายใจได้. แต่ไม่ได้เป็นทุกกรณีเสมอไป ขึ้นอยู่กับว่า ร่างกายของบุคคลนั้นจะอ่อนแอหรือไม่. ถ้าร่างกายแข็งแรงก็จะไม่ทำให้เกิดโรค จึงเป็นลักษณะของโรคที่เรียกว่า opportunistic disease. ดังนั้น จึงเลือกยีสต์สายพันธุ์ *Candida utilis* มาใช้เป็นสายพันธุ์ยีสต์ในการผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรตีน เพื่อความมั่นใจในความปลอดภัยของนำไปใช้เพื่อการผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรตีนในระดับอุตสาหกรรม. ลักษณะของโคโลนีและเซลล์ยีสต์แสดงในรูปที่ 1.



ก ข

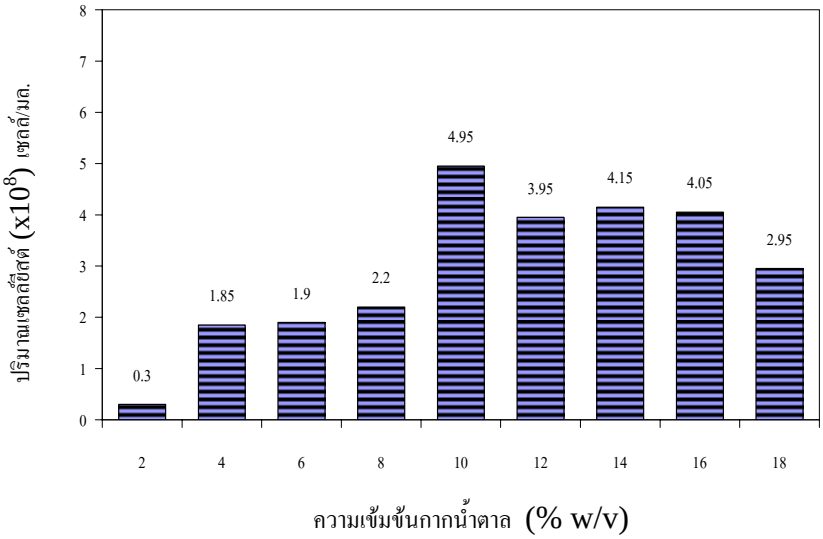
รูปที่ 1. ลักษณะโคโลนีของยีสต์ (ก) และลักษณะของเซลล์ยีสต์ (ข).

3.7 การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสม การเจริญเติบของยีสต์

การศึกษาหาปริมาณกากน้ำตาลที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงยีสต์ ซึ่งได้แปรผันปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลในอาหารเลี้ยงยีสต์มีค่าปริมาณ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 และ18% (w/v). โดยทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในฟลาสก์มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร. ทำการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที, ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง. แล้วทำการวัดการเจริญเติบของเซลล์ยีสต์ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณเซลล์ยีสต์ในทุกความเข้มข้นของกากน้ำตาลมีปริมาณสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง. โดยพบว่าปริมาณเซลล์ยีสต์เจริญสูงสุดในอาหารเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลเท่ากับ 10% (w/v), โดยมีปริมาณเซลล์เท่ากับ $5.95x10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร. โดยอาหารที่มีปริมาณกากน้ำตาลสูงมากกว่า 10% (w/v) ปริมาณของเซลล์ยีสต์ ไม่ได้เพิ่มขึ้น คงที่และลดลง ที่ความเข้มข้นสูง ผลดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 2.

ตารางที่ 9. ปริมาณการเจริญของเซลล์ยีสต์ในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของกากน้ำตาล

เวลา (ชม.)	ปริมาณเซลล์ยีสต์ (เซลล์/มิลลิลิตร) อาหารที่มีความเข้นของกากน้ำตาลต่างๆ								
	2%	4%	6%	8%	10%	12%	14%	16%	18%
0	$8.0x10^6$	$8.0x10^6$	$8.0x10^6$	$8.0x10^6$	$8.0x10^6$	$8.0x10^6$	$8.0x10^6$	$8.0x10^6$	$8.0x10^6$
24	$0.3x10^8$	$1.85x10^8$	$1.90 x10^8$	$2.20 x10^8$	$4.95 x10^8$	$4.15 x10^8$	$4.0 x10^8$	$4.05 x10^8$	$2.95 x10^8$
48	$1.5 x10^7$	$1.55 x10^8$	$1.95 x10^8$	$1.55 x10^8$	$4.5 x10^8$	$2.8 x10^8$	$3.3 x10^8$	$3.35 x10^8$	$2.4 x10^8$



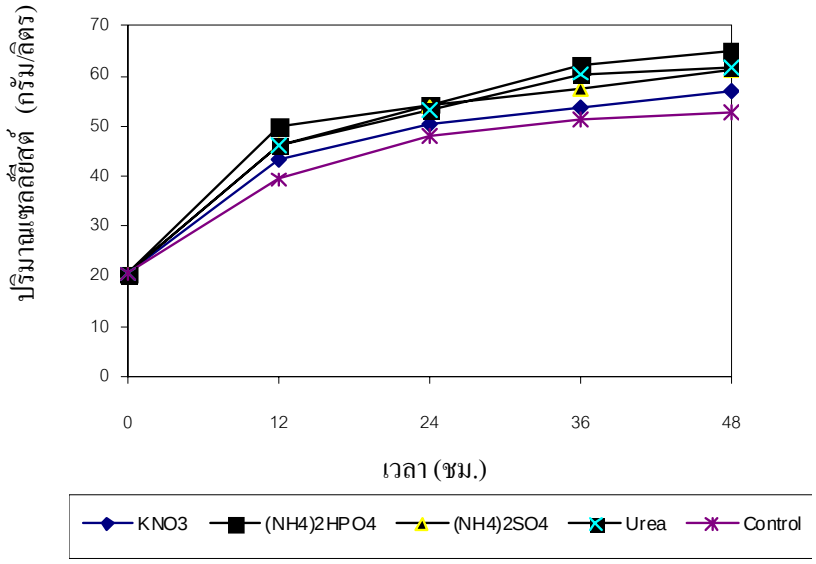
รูปที่ 2. จำนวนเซลล์ยีสต์ในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นกากน้ำตาล.

3.8 การศึกษาการเจริญเติบของยีสต์ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลโดยแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาเปรียบเทียบหาชนิดของแหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงยีสต์ โดยการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$], ไดแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$, โพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) และยูเรีย $(NH_2)_2CO$. โดยอาหารที่มีกากน้ำตาล 10% (w/v) และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.01% (w/v) เลี้ยงเชื้อยีสต์ในฟลาสก์ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร และเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที, ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง. ผลการทดลองพบว่า ปริมาณการสร้างเซลล์ยีสต์ในอาหารที่ใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน มีปริมาณการสร้างเซลล์ที่ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ, โดยที่ปริมาณของเซลล์ยีสต์สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง ของอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$], ไดแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$, โพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) และยูเรีย $(NH_2)_2CO$ และชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนมีค่าเป็น 57.17, 65.0, 61.33, 61.83 และ 52.67 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ. ดังแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 3.

ตารางที่ 10. ปริมาณของเซลล์ยีสต์ที่เจริญในอาหารที่มีแหล่งของไนโตรเจนต่างชนิดกัน

เวลา (ชม.)	ปริมาณเซลล์ยีสต์น้ำหนักเปียก (กรัม/ลิตร)				
	KNO_3	$(NH4)_2HPO_4$	$(NH4)_2SO_4$	Urea	Control
0	20.5	20.5	20.5	20.50	20.50
12	43.33	49.83	46.17	46.0	39.33
24	50.50	54.33	54.0	53.33	48.16
36	53.67	62.17	57.33	60.50	51.5
48	57.17	65.0	61.33	61.83	52.67



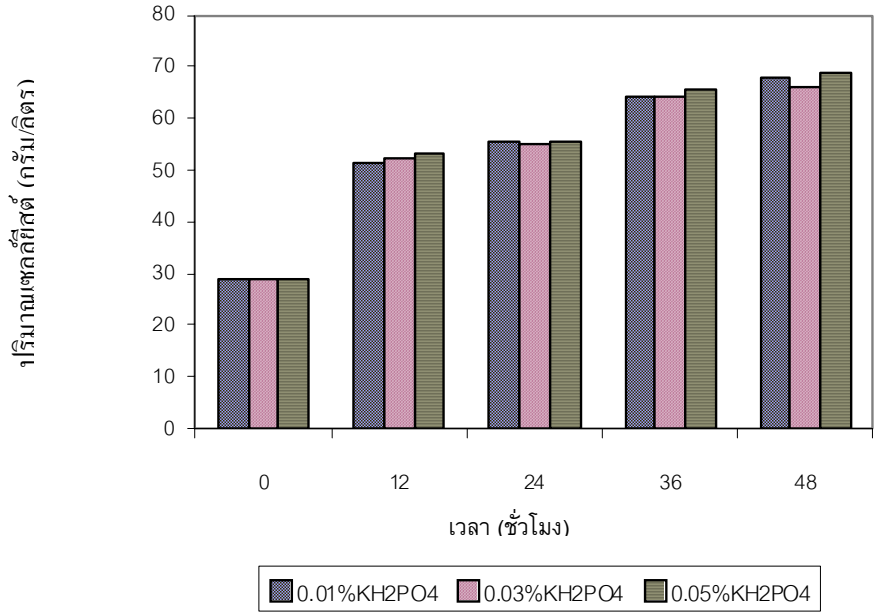
รูปที่ 3. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน.

3.9 การศึกษาการเจริญเติบของยีสต์ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลโดยแปรผันปริมาณแหล่งของฟอสฟอรัส

การศึกษาปริมาณของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ซึ่งเป็นแหล่งฟอสเฟตที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงยีสต์ ซึ่งแปรผันปริมาณของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.01%, 0.03% และ 0.05% (w/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่มีส่วนประกอบของกากน้ำตาลปริมาณ 10%(w/v) และ 0.6% (w/v) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$. ผลการทดลอง พบว่าที่การเจริญเติบโตของยีสต์ ปริมาณการสร้างเซลล์ของทุกความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตให้ผลที่ใกล้เคียงกันไม่มีความแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 4.

ตารางที่ 11. ปริมาณของเซลล์ยีสต์ที่เจริญในอาหารที่มีปริมาณความเข้มข้นของกัน

เวลา (ชม.)	ปริมาณเซลล์ยีสต์น้ำหนักเปียก (กรัม/ลิตร)		
	0.01%KH_2PO_4	**0.03%KH_2PO_4**	**0.05%KH_2PO_4**
0	28.83	28.83	28.83
12	51.51	52.17	53.33
24	55.5	55.17	55.68
36	64.33	64.5	65.5
48	67.83	66.0	68.83



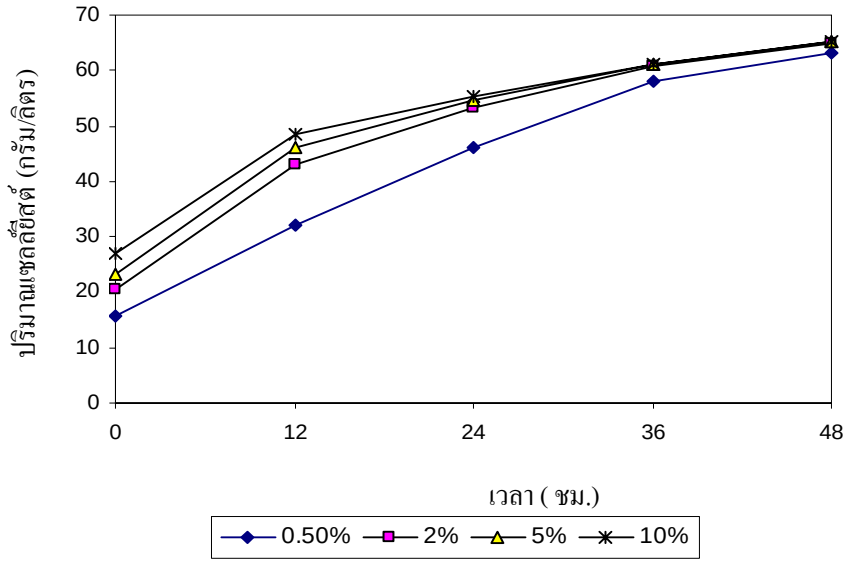
รูปที่ 4. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ที่แปรผันความเข้มข้น KH_2PO_4.

3.10 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อต่อการเจริญเติบโตของยีสต์

การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม โดยการเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของกากน้ำตาลปริมาณ 10% (w/v) และ 0.6% (w/v) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$] และ 0.01% (w/v) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และใส่ปริมาณกล้าเชื้อที่ปริมาณต่างๆ กัน คือ 0.5, 2, 5, และ 10% (v/v). ผลการทดลองพบว่า ปริมาณกล้าเชื้อที่ 2, 5, และ 10% (v/v) มีการเจริญเติบโตของยีสต์ที่ใกล้เคียงกัน โดยปริมาณของกล้าเชื้อที่น้อยกว่าจะทำให้ค่าช่วง Lag phase ที่ยาวกว่าเล็กน้อย แต่จะมีค่าที่ใกล้กันเมื่อเวลาผ่านไปที่ 24 ชั่วโมง และมีค่าปริมาณการเจริญของเซลล์ยีสต์ที่ทันกันที่เวลา 36 ชั่วโมง. ส่วนที่ปริมาณกล้าเชื้อ 0.5% (v/v) นั้น จะมีช่วงของ Lag phase ที่ยาวมากกว่า 24 ชั่วโมง และพบว่า ปริมาณการเจริญเติบช้ากว่าและได้ปริมาณเซลล์ยีสต์น้อยกว่า ขนาดกล้าเชื้ออื่นดังแสดงในตารางที่ 12 และรูปที่ 5.

ตารางที่ 12. การเจริญและปริมาณการสร้างเซลล์ของยีสต์ที่แปรผันปริมาณของกล้าเชื้อ.

เวลา (ชม.)	ปริมาณของกล้าเชื้อ (Inoculum size) (% v/v)			
	0.5%	**2%**	**5%**	**10%**
0	15.8	20.57	23.18	26.89
12	31.98	42.93	46.23	48.42
24	45.95	53.22	54.57	55.22
36	58.08	60.72	61.17	60.98
48	63.22	64.82	65.12	65.35



รูปที่ 5. ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเซลล์ยีสต์แปรผันขนาดของกล้าเชื้อ.

3.11 การศึกษาการเจริญเติบของยีสต์ในถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร ด้วยระบบ Batch fermentation

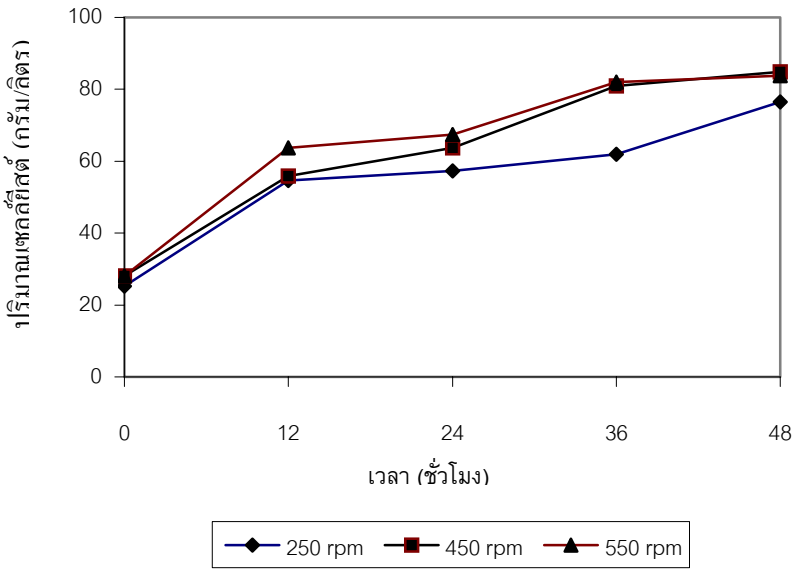
3.11.1 การศึกษาความเร็วของการกวนต่อการเจริญเติบของยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ผลการศึกษาอัตราเร็วของการกวนต่อการเจริญของยีสต์ในการเลี้ยงด้วยถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยการเลี้ยงในอาหารปริมาตร 2 ลิตร ประกอบของกากน้ำตาลปริมาณ 10% (w/v)

และ 0.6% (w/v) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$ และ 0.01% (w/v) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4). ใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 2% (w/v) สภาวะการเลี้ยงแบบรุ่นผลิตที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °ซ.) อัตราการให้อากาศ 1 vvm (2 ลิตร/นาที) และไม่ควบคุมพีเอช (non-control pH), โดยแปรผันอัตราการกวนต่างๆ กัน คือ 250, 450 และ 550 รอบต่อนาที. พบว่าที่ความเร็วรอบต่ำคือ 250 รอบต่อนาที อัตราการเจริญของยีสต์น้อยกว่าการใช้ความเร็วรอบสูงขึ้น. ที่ความเร็วรอบ 450 และ 550 รอบต่อนาที อัตราการเจริญของยีสต์ ปริมาณการสร้างเซลล์ของยีสต์มีค่าที่ใกล้เคียงกัน, โดยพบว่าสภาวะอัตราการกวน 250, 450 และ 550 รอบต่อนาที ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณการสร้างเซลล์ของยีสต์เป็น 76.55, 84.83 และ 83.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ. ดังแสดงในตารางที่ 13 และรูปที่ 6.

ตารางที่ 13. การเจริญของยีสต์เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยแปรผันอัตราเร็วของการกวน

เวลา (ชม.)	ปริมาณเซลล์ยีสต์ (กรัม/ลิตร)		
	อัตราเร็วการกวน (รอบ/นาที)		
	250 รอบ/นาที	**450 รอบ/นาที**	**550 รอบ/นาที**
0	25.2	28.2	28.05
12	54.6	55.95	63.7
24	57.3	63.75	67.4
36	61.95	81.0	82.0
48	76.5	84.83	83.8



รูปที่ 6. ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของยีสต์เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยแปรผันอัตราเร็วของการกวน.

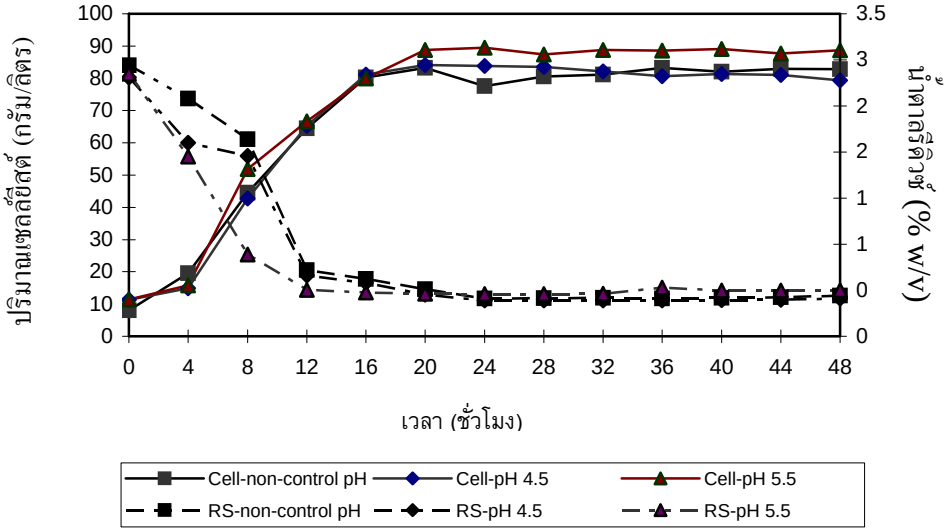
3.11.2 การศึกษาการเจริญเติบของยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยแปรผันการควบคุมค่าพีเอช ในถังหมัก

ผลการศึกษาค่าพีเอชต่อการเจริญของยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (รูปที่ 8) โดยใช้อาหารเลี้ยงปริมาตร 2 ลิตรประกอบของกากน้ำตาล 10%(w/v) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.6% (w/v) และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.01% (w/v). ใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 2% (v/v) สภาวะการเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบ batch culture คือ อัตราการกวน 450 รอบต่อนาที, ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °ซ.), อัตราการให้อากาศ 1 vvm (2 ลิตร/นาที), ซึ่งแปรผันค่าพีเอชต่างๆ กันคือ 4.5, 5.5 และแบบไม่ควบคุมพีเอช (non-control pH). ผลการทดลองพบว่า การเลี้ยงยีสต์ในสภาวะของพีเอชทั้ง 3 สภาวะมีค่าที่ใกล้เคียงกันแตกต่างกันไม่มาก. โดยพบว่า สภาวะการเลี้ยงยีสต์ที่ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ให้การเจริญของยีสต์ที่ดีที่สุด, รองลงมาคือในสภาวะที่ควบคุมพีเอชที่ 4.5 และสภาวะไม่ควบคุมพีเอชมีค่าน้อยที่สุด. โดยค่าปริมาณเซลล์ยีสต์สูงสุดของสภาวะการเลี้ยงที่ควบคุมพีเอช 5.5, 4.5 และแบบไม่ควบคุมพีเอช ที่เวลา 48 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 89.47, 84.04 และ 83.23 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ. ส่วนการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลมีรูปแบบที่คล้ายกันเพียงแต่ชุดการควบคุมพีเอช 5.5 ในช่วงแรกของการเลี้ยงช่วงเวลาชั่วโมงที่ 0-12 จะมีการลดลงของน้ำตาลที่เร็วกว่าชุดควบคุมพีเอช 4.5 และไม่ควบคุมพีเอชเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 14 และ

รูปที่ 7. เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาพบว่า ประสิทธิภาพในการสร้างเซลล์ของยีสต์นั้นสูงดีมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการวิจัยอื่นที่มีรายงาน เช่น ศิริโรจน์ (2521)ได้ผลิตจุลินทรีย์โปรตีนจากยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. YK 43 ในอาหารน้ำต้มถั่ว โดยเลี้ยงในถังหมักขนาด 1 ลิตร ได้ปริมาณเซลล์ยีสต์แห้ง 18.6 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับเซลล์เปียกประมาณ 74.4 กรัมต่อลิตร สมใจและคณะ (2535) ได้ทดลองผลิตยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5276 โดยใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ได้ผลผลิตยีสต์เซลล์เปียกปริมาณ 58.84 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับน้ำหนักยีสต์แห้ง 14.77 กรัมต่อลิตร.

ตารางที่ 14. การเจริญของยีสต์เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยแปรผันการควบคุมค่าพีเอช

เวลา (ชม.)	ปริมาณเซลล์ (กรัม/ลิตร)			ปริมาณน้ำตาล (% w/v)		
	พีเอช 4.5	พีเอช 5.5	ไม่ควบคุมพีเอช	พีเอช 4.5	พีเอช 5.5	ไม่ควบคุมพีเอช
0	11.33	11.42	8	2.81	2.85	2.94
8	42.79	51.87	44.57	1.96	0.89	2.14
16	81.16	79.99	80.29	0.58	0.475	0.62
24	83.83	89.47	77.59	0.390	0.457	0.41
32	82.17	88.82	81.13	0.389	0.462	0.415
40	81.39	89.09	82.03	0.392	0.498	0.418
48	79.37	88.73	82.79	0.409	0.4989	0.446

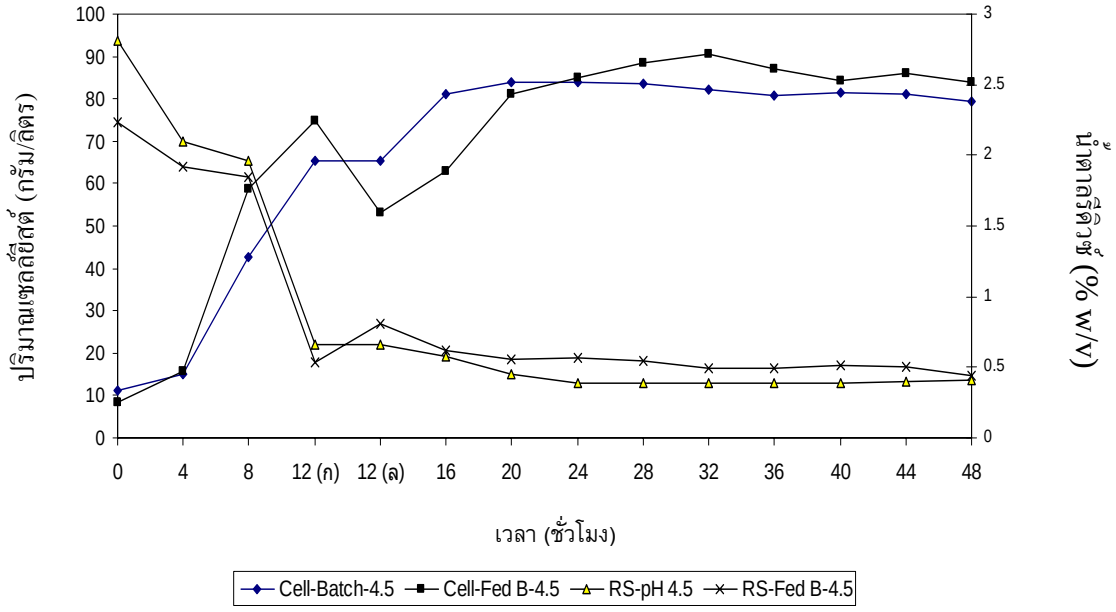


รูปที่ 7. การเจริญและปริมาณการสร้างเซลล์ของยีสต์เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยแปรผันการควบคุมค่าพีเอช.

รูปที่ 8. ถังหมักขนาด 5 ลิตร ในการเลี้ยงยีสต์โดยใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ.

3.11.3 การศึกษาการเจริญเติบของยีสต์ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร ด้วยระบบ Fed-batch fermentation

การศึกษาผลิตเซลล์ยีสต์โดยใช้การเลี้ยงแบบ Fed batch ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยการเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงปริมาตรเริ่มต้น 1 ลิตร ที่มีส่วนประกอบของกากน้ำตาลปริมาณ 10%(w/v) และ 0.6% (w/v) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$] และ 0.01% (w/v) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4), ใส่ปริมาณกล้าเชื้อ 2% (w/v). สภาวะการเลี้ยง อัตราการกวน 450 รอบต่อนาที, ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °ซ.), ควบคุมค่าพีเอชที่ 4.5, อัตราการให้อากาศ 1 vvm (2 ลิตร/นาที) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากเวลา 12 ชั่วโมง. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปเพิ่มอีก 1 ลิตร, แล้วเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 48 ชั่วโมง. ผลการทดลองพบว่าทำการวัดการเจริญเติบของยีสต์ในสภาวะการเลี้ยงแบบ Fed-Batch จะปริมาณการสร้างเซลล์ยีสต์ที่สูงกว่าการเลี้ยงแบบรุ่นผลิต แต่มีค่าที่ใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันมากนัก. อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงแบบ Fed-Batch จะทำให้ค่าของเวลาที่ได้เซลล์ยีสต์สูงสุดล่าช้ากว่าการเลี้ยงแบบสภาวะรุ่นผลิต, โดยค่าปริมาณเซลล์ยีสต์สูงสุดของสภาวะการเลี้ยงแบบ Fed-Batch และรุ่นผลิต มีค่าเท่ากับ 90.54 กรัมต่อลิตรที่เวลา 32 ชั่วโมงลิตร และ 84.08 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 20 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 9.



ก =ก่อนเติมอาหารใหม่ลงไป ล =หลังเติมอาหารใหม่ลงไป

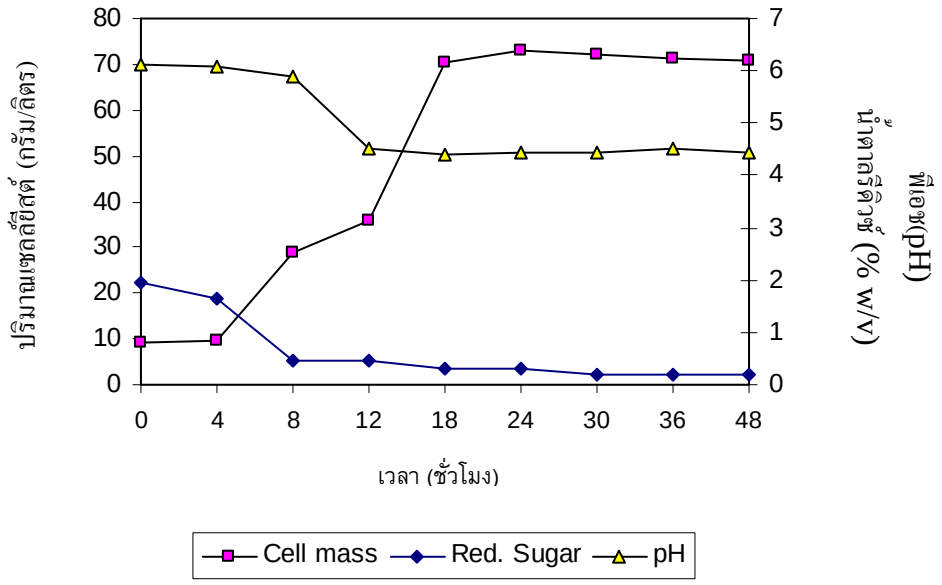
รูปที่ 9. การเจริญและปริมาณการสร้างเซลล์ของยีสต์เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ควบคุมพีเอช 4.5 ในสภาวะการเลี้ยง Fed-batch เปรียบเทียบกับสภาวะการเลี้ยง แบบรุ่นผลิต.

3.11.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์ในถังหมัก (Fermenter) ขนาด 300 ลิตร โดยการเลี้ยงแบบ Batch fermentation

การศึกษาผลิตเซลล์ยีสต์ในถังหมักขนาด 300 ลิตร โดยการเลี้ยงยีสต์แบบรุ่นผลิตในอาหารเลี้ยงปริมาตร 100 ลิตร ที่มีส่วนประกอบของกากน้ำตาลปริมาณ 10%(w/v) และ 0.6% (w/v) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$ และ 0.01% (w/v) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4), ใส่ปริมาณกล้าเชื้อ 2% (w/v). สภาวะการเลี้ยงอัตราการกวน 450 รอบต่อนาที, ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 30 °ซ., ควบคุมค่าพีเอชที่ 4.5, อัตราการให้อากาศ 1 vvm (100 ลิตร/นาที), ทำการเลี้ยงเวลา 48 ชั่วโมง. ทำการวัดการเจริญเติบของเซลล์ยีสต์โดยศึกษาจากน้ำหนักเซลล์เปียก และน้ำตาลในอาหารเลี้ยงยีสต์. ผลการทดลองพบว่า มีลักษณะของการเจริญของเซลล์ยีสต์ที่ดีใกล้เคียงกับการเลี้ยงยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แต่มีปริมาณการผลิตเซลล์ยีสต์ที่น้อยกว่า. กล่าวคือการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตรมีปริมาณการสร้างเซลล์สูงสุด 83.83 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง, ส่วนการเลี้ยงในถังหมักขนาด 300 ลิตร มีปริมาณการสร้างเซลล์สูงสุด 72.83 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง เช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 15 และรูปที่ 10.

ตารางที่ 15. การเจริญของยีสต์เลี้ยงในถังหมักขนาด 300 ลิตร โดยสภาวะการควบคุมพีเอชที่ 4.5

เวลา (ชม.)	ปริมาณเซลล์ (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (% w/v)	พีเอช
0	9.17	1.9327	6.11
4	9.41	1.6403	6.09
8	28.99	0.441	5.9
12	35.99	0.4439	4.5
18	70.49	0.307	4.4
24	72.83	0.2959	4.45
30	72.17	0.2047	4.45
36	71.25	0.2018	4.5
48	70.83	0.2026	4.45



รูปที่ 10. การเจริญและปริมาณการสร้างเซลล์ของยีสต์เลี้ยงในถังหมักขนาด 300 ลิตร ที่ควบคุมพีเอช 4.5 ในสภาวะการเลี้ยง Batch.

3.12 การตรวจหาความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีน

ผลการตรวจหาความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีน โดยการนำเซลล์ยีสต์ที่อบแห้งและบดละเอียด มาทำการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก (Acute Oral Toxicity Test) โดยใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar ทั้งเพศผู้และเพศเมีย, ป้อนตัวอย่างทดสอบทางปาก. ผลการทดลองพบว่า ไม่พบการตายหรืออาการผิดปกติใดๆ ของหนูทดลองหลังป้อนตัวอย่างทดสอบและตลอดระยะเวลาสังเกตผลนาน 14 วัน, ค่าเฉลี่ยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูในกลุ่มทดสอบไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และจากการชันสูตรซาก (gross pathology) เมื่อสิ้นสุดการทดสอบตรวจไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในของหนูทุกตัว. สรุปได้ว่า ตัวอย่างทดสอบ “จุลินทรีย์โปรตีน” มีความปลอดภัย.

3.13 การวิเคราะห์องค์ประกอบของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีน

ผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบด้านโภชนาการและสารที่เป็นพิษในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีนการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน, ไขมันรวม, กรดแอมิโน, วิตามิน, เหล็ก, สังกะสี, ทองแดง. ส่วนสารที่เป็นพิษตามมาตรฐานอาหารสัตว์ได้แก่ ปรอท,

ตะกั่ว, แคดเมียม และสารอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) และส่วนประกอบของกรดแอมิโน ดังแสดงในตารางที่ 16 และผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีนแสดงในรูปที่ 11.

รูปที่ 11. ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีนจากยีสต์.

จากค่าผลการตรวจวิเคราะห์สารประกอบในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีน พบว่า ปริมาณของสารที่เป็นตัวควบคุมไม่ให้มีปริมาณเกินกำหนดตามมาตรฐานอาหารสัตว์ซึ่งกำหนดโดยสหภาพยุโรป ปี พ.ศ. 2542 (Undesirable substances in animal nutrition (EU 1999) มีข้อกำหนดสารที่เป็นสารอันตราย 4 ชนิด ได้แก่ สารหนู, ตะกั่ว, ปรอท, และแคดเมียม ต้องมีปริมาณไม่เกิน 2, 5, 0.1 และ 1 ส่วนในล้านส่วน ตามลำดับ ซึ่งในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีนมีปริมาณสารทั้ง 4 ชนิด ในปริมาณ 0.13, <0.50, <0.1 และ < 0.1 ppm ตามลำดับ. นอกจากนี้ ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีนยังไม่พบ อะฟลาทอกซิน (Afla toxin) อีกด้วย. แสดงให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีนที่ผลิตได้นั้น มีความปลอดภัยสำหรับนำไปใช้สำหรับเป็นแหล่งโปรตีนสำหรับอาหารสัตว์ และนอกจากนี้พบว่า ผลิตภัณฑ์มีส่วนประกอบของกรดแอมิโนที่สูงมาก ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับการเจริญเติบโตของสัตว์.

ตารางที่ 16. การผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีน

รายการ		ปริมาณ
โปรตีนรวม	(กรัม/100 กรัม)	48.0
ไขมันรวม	(กรัม/100 กรัม)	0.64
วิตามินบี 1	(มิลลิกรัม/100 กรัม)	0.180
วิตามินบี 2	(มิลลิกรัม/100 กรัม)	0.233
แคดเมียม	(มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	<0.10
สารหนู	(มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	0.13
ตะกั่ว	(มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	<0.50
ปรอท	(มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	<0.10
อะฟลาทอกซิน	(ไมโครกรัม/กิโลกรัม)	ไม่พบ
ทองแดง	(มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	8.19
เหล็ก	(มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	690.84
สังกะสี	(มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	75.92
เถ้า	(กรัม/100 กรัม)	10.43
กรดแอมิโน (amino acid)		**มิลลิกรัม/100 กรัม**
Aspartic acid		3657.70
Threonine		1860.06
Serine		1891.55
Glutamic acid		4657.18
Proline		1244.96
Glycine		1669.71
Alanine		2068.93
Cystine		354.29
Valine		1588.46
Methionine		326.75
Isoleucine		1351.45
Leucine		2332.79
Tyrosine		3497.00
Phenylalanine		1967.73
Histidine		708.49
Lysine		2483.76
Arginine		1396.50
Tryptophan		308.60

3.14 การทดลองใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีนเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนในการเลี้ยงปลา

ผลการทดลองใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีนมาใช้ในการเลี้ยงปลานิล ซึ่งนำมาใช้ทดแทนแหล่งโปรตีนในอาหารสำหรับเลี้ยงปลาการทดลอง แบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลองในการเลี้ยงปลา คือ :

1) ใช้ถั่วเหลืองเป็นโปรตีนเสริม.
2) ใช้จุลินทรีย์โปรตีนจากยีสต์เป็นแหล่งโปรตีนเสริม.
3) ใช้จุลินทรีย์โปรตีนจากยีสต์ที่ผ่านการทำ pretreatment เป็นแหล่งโปรตีนเสริม.
4) ควบคุมโดยไม่มีแหล่งโปรตีนเสริม มีเฉพาะแหล่งโปรตีนพื้นฐาน (protein basis).

สูตรอาหารเลี้ยงปลาที่มีแหล่งโปรตีนพื้นฐาน (protein basis) 10% (w/w) และมีโปรตีนเสริมจากถั่วเหลือง หรือจากจุลินทรีย์โปรตีนจากยีสต์เพิ่มอีก 10% (w/w) จะมีปริมาณโปรตีนรวมในสูตรอาหารเท่ากันคือ 20% (w/v). ส่วนสูตรอาหารชุดควบคุมจะมีเฉพาะโปรตีนพื้นฐานในปริมาณ 10% (w/v) เท่านั้น, ผลการทดลองพบว่า การเจริญเติบโตของปลาในชุดการทดลองที่ใช้จุลินทรีย์โปรตีนจากเซลล์ยีสต์แห้งเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนให้อัตราการเจริญที่ดีที่สุด, รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ใช้ยีสต์ที่ผ่านการทำ pretreatment ซึ่งมีค่าที่ใกล้เคียงกันมาก, รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ใช้ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนและชุดควบคุม ซึ่งพบว่าน้ำหนักตัวของปลาในสูตรอาหารที่ใช้ยีสต์, ยีสต์ผ่านการทำ pretreatment, ถั่วเหลือง และชุดควบคุมมีน้ำหนักตัวที่สัปดาห์ที่ 7 เป็น 1.958, 2.3328, 2.46 และ 2.426 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 11 และปริมาณการกินอาหารสะสมของปลาเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองดังแสดงในตารางที่ 18.

ตารางที่ 17. การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของปลาในชุดการทดลองต่างๆ

สัปดาห์	น้ำหนักตัวปลาเฉลี่ย (กรัม)			
	อาหารสูตร 1 (ควบคุม)	อาหารสูตร 2 (ถั่ว)	อาหารสูตร 3 (ยีสต์)	อาหารสูตร 4 (ยีสต์-พรีทรีต)
0	1.3784 ± 0.95	1.4790 ± 0.52	1.4285 ± 0.76	1.4883 ± 0.39
1	1.4950 ± 0.95	1.5785 ± 0.52	1.5973 ± 0.76	1.5766 ± 0.39
2	1.5533 ± 1.04	1.7378 ± 0.56	1.7516 ± 0.48	1.6722 ± 0.48
3	1.7135 ± 1.15	1.9817 ± 0.71	2.0200 ± 0.91	1.8923 ± 0.61
4	1.7153 ± 1.20	1.9877 ± 0.67	2.1860 ± 0.79	1.9182 ± 0.64
5	1.8635 ± 0.82	2.0856 ± 0.87	2.2720 ± 1.0	2.0964 ± 0.75
6	1.9330 ± 0.82	2.0187 ± 0.80	2.2953 ± 0.82	2.1313 ± 0.72
7	1.9580 ± 0.83	2.3328 ± 0.95	2.4600 ± 1.1	2.4261 ± 0.92
น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นเฉลี่ย	0.5796	0.8538	1.0311	0.9378

ตารางที่ 18. ปริมาณการกินอาหารสะสมเฉลี่ยของปลาในแต่ละสัปดาห์

สัปดาห์	การกินอาหารเฉลี่ยสะสมต่อตัวต่อสัปดาห์ (กรัม)			
	อาหารสูตร 1 (ควบคุม)	อาหารสูตร 2 (ถั่ว)	อาหารสูตร 3 (ยีสต์)	อาหารสูตร 4 (ยีสต์-พรีทรีต)
0	0.15438	0.20706	0.19999	0.20836
1	0.16744	0.22210	0.22362	0.22072
2	0.17397	0.24329	0.24522	0.23410
3	0.19191	0.27744	0.28280	0.26492
4	0.19211	0.27828	0.30604	0.26854
5	0.20871	0.29198	0.31808	0.29349
6	0.21649	0.28262	0.32142	0.29838
7	0.21929	0.32659	0.34434	0.33965
รวมทั้งสิ้น	1.5243	2.12936	2.24151	2.12816

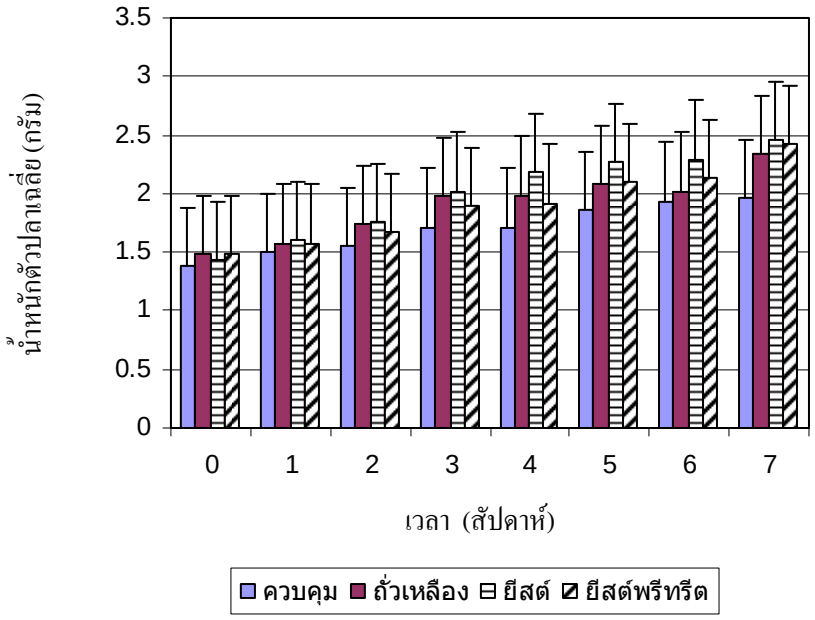
การพิจารณาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตโดยหาประสิทธิภาพในการเปลี่ยนอาหารไปเป็นเนื้อ ซึ่งเรียกว่า อัตราการแลกเนื้อ (Feed conversion rate, FCR) หมายถึง การเปรียบเทียบระหว่างปริมาณการกินอาหารเปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตมีสูตรคำนวณ คือ :

$$\text{อัตราการแลกเนื้อ (Feed conversion rate, FCR)} = \frac{\text{ปริมาณอาหารสะสมทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น}}$$

เมื่อนำมาคำนวณหาค่าอัตราการแลกเนื้อของแต่ละการทดลองพบว่า อัตราการแลกเนื้อของการทดลองที่ใช้ยีสต์ให้ค่าอัตราการแลกเนื้อที่ดีที่สุด คือ มีค่าที่น้อยที่สุด หมายถึงปริมาณอาหารที่น้อยกว่าในการเปลี่ยนไปเป็นเนื้อในปริมาณที่เท่ากัน รองลงมาคือ การทดลองชุดใช้ยีสต์ทำ pretreatment, ชุดการทดลองที่ใช้ถั่วเหลือง และชุดควบคุม, โดยมีค่าอัตราการแลกเนื้อของทั้ง 4 ชุดการทดลองเป็น 2.629, 2.493, 2.173 และ 2.269 ตามลำดับ และปริมาณการสูญเสียของแต่ละการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 20.

ตารางที่ 19. ค่าอัตราการแลกเนื้อ (Feed conversion rate) และการสูญเสียของปลา

การทดสอบ	อาหารสูตร 1 (ควบคุม)	อาหารสูตร 2 (ถั่ว)	อาหารสูตร 3 (ยีสต์)	อาหารสูตร 4 (ยีสต์-พรีทรีต)
อัตราการแลกเนื้อ	2.629	2.493	2.173	2.269
ปริมาณการสูญเสีย (%)	35	30	30	35



รูปที่ 12. การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของปลาในชุดการทดลองต่างๆ.

จากผลการทดลองเลี้ยงปลาด้วยการใช้จุลินทรีย์โปรตีนจากยีสต์เพื่อเป็นแหล่งโปรตีนทดแทน พบว่า ปลานิลมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่ากลุ่มปลาที่ใช้ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีน แม้จะมีค่าความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นที่ 95% ($P>0.05$) ก็ตาม. การใช้ยีสต์ที่ผ่านการทำพรีทรีตของยีสต์บางลงเพื่อช่วยในการย่อย (digestibility) ของปลา พบว่า การเจริญเติบโตของปลาใกล้เคียงกับยีสต์ที่ไม่ได้ผ่านการทำพรีทรีต. แสดงให้เห็นว่า สามารถนำจุลินทรีย์โปรตีนไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนในการเลี้ยงสัตว์ได้ โดยไม่จำเป็นต้องทำการพรีทรีต.

4. สรุปผลการทดลอง

1) การแยกยีสต์จากตัวอย่างธรรมชาติและการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์โปรตีน มีผลการศึกษา ดังนี้ :

1.1 การเก็บตัวอย่างจากธรรมชาติจากผลไม้เน่าเสียและอาหารหมักดองเพื่อสำหรับทำการแยกยีสต์จำนวน 44 ตัวอย่าง สามารถทำการแยกยีสต์ได้ 100 สายพันธุ์.

1.2 การคัดเลือกยีสต์ที่มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์โปรตีนจากตัวอย่างยีสต์ที่แยกจากธรรมชาติ 100 ตัวอย่างและยีสต์จากศูนย์จุลินทรีย์จำนวน 15 สายพันธุ์ รวมเป็น 115 สายพันธ์ พบว่า มียีสต์ทีมีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์โปรตีนจำนวน 5 สายพันธุ์ โดยเป็น *Candida tropicalis* 4 สายพันธุ์ที่แยกจากแหล่งธรรมชาติ คือสายพันธุ์ 15-C-1, 19-H-1, 27-C-1 และ 43-C-1 และเป็นสายพันธุ์ที่มาจากศูนย์เชื้อจุลินทรีย์ วว. 1 สายพันธุ์ คือ *Candida utilis* TISTR 5001. พบว่า ปริมาณการสร้างเซลล์ของยีสต์สายพันธุ์ *Candida tropicalis* มีสูงกว่า *Candida utilis* เล็กน้อย แต่เนื่องจากมีรายงานว่า *Candida tropicalis* มีบางสายพันธุ์ที่อาจก่อให้เกิดโรคในกรณีที่ร่างกายอ่อนแอ (opportunistic disease) จึงเลือกสายพันธุ์ *Candida utilis* TISTR 5001 ใช้ศึกษาเป็นสายพันธุ์จุลินทรีย์โปรตีน.

2) สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเลี้ยงยีสต์ในถังหมัก โดยใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ การศึกษาการผลิตยีสต์ *Candida utilis* TISTR 5001 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร มีผลการศึกษา ดังนี้ :

2.1 ส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมคือ ปริมาณกากน้ำตาลที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 10% (w/v). แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารคือ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH4)_2HPO_4$) คือ 0.6% (w/v). ปริมาณของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ซึ่งเป็นแหล่งฟอสเฟตที่เหมาะสมในอาหารคือ 0.01% (w/v).

2.2 สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงในถังหมักมีดังนี้คือ

2.2.1 การเลี้ยงแบบ Batch fermentation ในถังหมักขนาด 5 ลิตร, ปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสม (seed inoculums) 2.0% (v/v) ของกล้าเชื้อยีสต์ที่มีปริมาณเซลล์ระดับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, อัตราการกวน (agitation speed) ที่ 450 รอบต่อนาที, ที่สภาวะพีเอชที่ 4.5 หรือ 5.5, อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส, อัตราการให้อากาศ (aeration rate) 1 vvm, เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, ซึ่งให้ปริมาณเซลล์ยีสต์น้ำหนักเปียกสูงสุด 89.47 กรัมต่อลิตร.

2.2.2 การเลี้ยงแบบ Fed-batch fermentation ในถังหมักขนาด 5 ลิตร การเลี้ยงในระบบ Fed-batch fermentation ซึ่งสภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับแบบรุ่นผลิต คือ ปริมาณกล้าเชื้อ

ที่เหมาะสม (seed inoculums) 2.0% (v/v) ของกล้าเชื้อยีสต์ที่มีปริมาณเซลล์ระดับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, อัตราการกวน (agitation speed) ที่ 450 รอบต่อนาที, ที่สภาวะพีเอชที่ 5.5, อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส, อัตราการให้อากาศ (aeration rate) 1 vvm, ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อที่ปริมาณอาหาร 1 ลิตรเป็นเวลา 12 ชั่วโมง, แล้วเติมอาหารใหม่ลงไปอีก 1 ลิตร ซึ่งให้ปริมาณเซลล์ยีสต์น้ำหนักเปียกสูงสุด 90.54 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 32 ชั่วโมงลิตร ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงด้วยระบบรุ่นผลิตเล็กน้อย แต่ล่าช้ากว่า, จะให้ปริมาณเซลล์สูงสุดภายในเวลา 24 ชั่วโมง.

2.2.3 การเลี้ยงแบบรุ่นผลิตในถังหมักขนาด 300 ลิตร, โดยใช้ปริมาณอาหาร 100 ลิตร สภาวะเช่นเดียวกับการการเลี้ยงแบบรุ่นผลิต ในถังหมักขนาด 5 ลิตร, โดยได้ปริมาณเซลล์ยีสต์สูงสุดที่ 72.83 กรัมต่อลิตรที่เวลา 24 ชั่วโมง.

3) การทดลองใช้จุลินทรีย์โปรตีนในการเลี้ยงปลา

การทดลองเลี้ยงปลาด้วยการใช้จุลินทรีย์โปรตีนจากยีสต์เพื่อเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนให้ผลที่ดี. การเจริญเติบโตของปลา มีอัตราการเจริญที่ดีกว่ากลุ่มปลาที่ใช้ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนในปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน, แต่ไม่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$). อัตราการแลกเนื้อ (feed conversion rate, FCR) ของการใช้จุลินทรีย์โปรตีนให้ผลที่ดีกว่ากลุ่มที่ใช้ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีน. การใช้ยีสต์ที่ผ่านการทำพรีทรีตของเซลล์ยีสต์บางลงเพื่อช่วยในการย่อยของปลา ผลพบว่า การเจริญเติบโตของปลาใกล้เคียงกับยีสต์ที่ไม่ได้ผ่านการทำพรีทรีต. แสดงให้เห็นว่า สามารถนำจุลินทรีย์โปรตีนไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนในการเลี้ยงสัตว์ได้โดยไม่จำเป็นต้องทำการพรีทรีต.

4) คุณภาพของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรตีน

มีความปลอดภัยตามเกณฑ์มาตรฐานส่วนประกอบของอาหารสัตว์มีโปรตีนแท้ 38-40% และมีโปรตีนหยาบ 48% และมีคุณค่าทาโภชนาการสูง เนื่องจากมีปริมาณส่วนประกอบของกรดแอมิโนสูงและมีปริมาณวิตามินบี 1 บี 2 ที่สูง รวมทั้งมีแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตเช่น เหล็ก สังกะสี และทองแดงที่สูง.

5. เอกสารอ้างอิง

เกณฑ์สาคู, รำไพ. 2535. “การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตยีสต์ขนมปังจากกากน้ำตาล (Study on the optimum conditions for Baker's yeast Production from cane molasses)” กรุงเทพมหานคร : วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

เชี่ยวธีรกุล, เชิดชัย. 2519. “การผลิตโปรตีนจากมันสำปะหลังโดยใช้ยีสต์” รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ 15 สาขาสัตว์ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 3-5 กุมภาพันธ์ 2519, หน้า 303-315.

นัยบุตร, วรรณภา. 2532., “การคัดเลือกยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงเพื่อใช้ผลิตจุลินทรีย์โปรตีน” กรุงเทพมหานคร : วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ว่องสุวรรณเลิศ, วิชชุพร. 2523. “จุลินทรีย์โปรตีนจากมันสำปะหลังโดย Rhizopus และยีสต์” กรุงเทพมหานคร : วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริโรจน์, ปราโมทย์. 2521. “การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีโปรตีนสูงในน้ำทิ้งจากขบวนการแปรรูปอาหารถั่วเหลือง” กรุงเทพมหานคร : วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ, ประไพศรี, ศิริอนันต์ไพบูลย์, สันทัด, ศรีสวัสดิ์, สุวรรณา, ฝั่งสินธุ์, บัณฑิต, และศรีนรคุตร, พรภัทรา. 2532. “การผลิตยีสต์ขนมปังจากน้ำอ้อยในระดับห้องปฏิบัติการ” กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2520.) สถิติการส่งออกผลผลิตและผลิตภัณฑ์จากปศุสัตว์, [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก, (http : // www.oae.go.th/oae_report/export.php, [เข้าถึงเมื่อ 10 มกราคม 2550].

Bhattacharjee, J. E., 1970. Microorganism as potential sources of food, *Adv. In Appl. Microbiol.* ***13***, pp : 139-159.

Davis, P. , 1974 “Single cell protein” Proceedings of the international symposium Rome, Italy, on November 7-9, 1973. London : Academic Press Inc.

Humphrey, T. W., 1968. Single cell protein, pp : 65-78. In R.I. Mateles and S. R. tannenbaum (eds.) Single cell protein. Cambridge : M. I. T. Press.

Konlani, S., Delgenes, J. P., Moletta, R., Traore, A., and Doh, A., 1996. “Optimization of cell yield of *Candida krusei* S01 and *Saccharomyces* sp. LK3G cultured in sorghum hydrolysate.” *Bioresource technology* **57** (3) , pp : 275-281.

Lodder, J. and Kreger-Van Rij, N.J.W., 1952. The Yeast. A Taxonomic study. North-Holland Publishing, Amsterdam, Holland.

Matales, R. I. and S. R. Tannenbaum. 1968. Single cell Protein. Cambridge : M. I. T. press, p. 476.

Olvera-Novoa, M. A. Martinez-Palacios, C. A. and L.,Olivera-Castillo. 2002. "Utilization of torula yeast (*Candida utilis*) as protein source in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) fry, *Aquaculture Nutrition* **8** (4) p.257.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrought, A.L. Farr and R.J. Randall., 1951. *J. Biol. Chem.* **193**, pp. 265-275.

Prescott, S.C. and C. G. Dunn. 1959. Industrial Microbiology. New York : Mc Graw-Hill Book Co.,

Pual, D., Mukhopadhyay, R., Chatterjee B. P., Guha A. K. 2002 "Nutrition profile of food yeast *Kluyveromyces fragilis* biomass grown on whey" *Appl. Biochem. & Biotech*. **97** : (3) pp. 209-218.

Shacklady, C. A. 1974 Response of Livestock and Poultry to SCP, *In* Davis. P. (ed.) Single Cell Protein, London : Academic Press Inc., pp. 115-128.

Sundhagul, M. 1972. Feasibility study on tapioca waste recovery, *In* Waste recovery by microoraganisms. Malaysia : The Ministry of Education, pp. 81-89.

ภาคผนวก

1. การวิเคราะห์โปรตีนหยาบ (Crude protein) โดยวิธี Kjeldahl

การวิเคราะห์โปรตีนหยาบ (Crude protein) โดยวิธี Kjeldahl จะแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ การย่อย (digestion), การกลั่น (distillation) และการไทเทรต (titration)

ขั้นตอนการย่อย ชั่งตัวอย่างเซลล์แห้ง น้ำหนัก 1 กรัม ใส่ลงใน digesting flask, เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 12-15 มิลลิลิตร, เติมโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO4) 7 กรัม, เติมคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 0.3 กรัม, ใส่ลูกแก้วลงไปในฟลาสก์ประมาณ 2-3 ลูก เพื่อป้องกันการเดือดพลุ่งที่รุนแรงแล้วนำสารละลายในฟลาสก์ไปย่อยโดยการนำไปไว้ในเตาให้ความร้อน (heating mantle), โดยความร้อนที่ต่ำก่อน แล้วค่อยเพิ่มความร้อนให้สูงขึ้น. ทำการย่อยจนสังเกตเห็นควันสีขาวเกิดขึ้นในฟลาสก์และทำการย่อยต่อไปประมาณ 1-2 ชั่วโมง จนสารละลายในฟลาสก์ใส ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 250 มิลลิลิตร.

ขั้นตอนการกลั่น นำฟลาสก์ที่ผ่านการย่อยแล้วไปเสียบที่ชุดเครื่องกลั่น เพื่อกลั่นแอมโมเนียจากสารละลายออกมา โดยก่อนทำการกลั่น เติมสารสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 50% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน, แล้วทำการกลั่น โดยให้ปลายของหลอดจากเครื่องควบแน่น (condenser) จุ่มลงในสารละลายกรดบอริก (boric acid) ความเข้มข้น 3% (w/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 250 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการไทเทรต เนื่องจากการกลั่นจะได้แอมโมเนียเข้ามาในสารละลายกรดบอริก จึง nutralize กับกรดบอริกทำให้ปริมาณกรดลดลงไป ดังการหาปริมาณกรดบอริคที่เหลือ ทำได้โดยการไทเทรตย้อนกลับ (back titration) ด้วยสารละลายด่าง คือใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้นที่ทราบแน่นอนโดยใช้ที่ความเข้มข้น 0.1 Normal.

การคำนวณ

จำนวนโมลแอมโมเนีย = จำนวนโมลกรดเริ่มต้น- จำนวนโมลของด่างจากการไทเทรต

เนื่องจาก จำนวนโมลของแอมโมเนีย = จำนวนโมลของไนโตรเจน

ดังนั้น จำนวนกรัมของไนโตรเจน = จำนวนโมลของไนโตรเจน x เลขอะตอมของไนโตเจน (14)

ดังนั้น %ไนโตรเจน = (กรัมไนโตรเจน/ กรัมตัวอย่าง) x 100

โปรตีนหยาบ (crude protein) = %ไนโตรเจน x 6.25

2. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล (Reducing Sugar)

Sample 1 มิลลิลิตร + Alkaline Copper Reagent 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง

vortex

ต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที ปิดปากหลอดด้วยลูกแก้ว

ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว (แช่ในน้ำแข็ง) จากนั้นเติม Nelson Reagent 1 มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 25 นาที

เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ด้วย vortex

นำไปวัดค่า O.D (Optical Density)
ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm.

คำนวณหาปริมาณ Reducing Sugar จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 0- 100 ug/ml.

การเตรียม Alkaline copper reagent (Somogyi' Reagent)

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Potassium Sodium Tartrate 12 กรัม และโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 16 กรัม ละลายผสมกันในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร **(สารละลาย A)**
2. ชั่ง คอปเปอร์ซัลเฟต($CuSO_4.5H_2O$) 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร **(สารละลาย B)**
3. นำสารละลาย **A** และ สารละลาย **B** ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 24 กรัม **(สารละลาย C)**
4. ชั่งโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) 18 กรัม ละลายในน้ำกลั่นต้มพออุ่น 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มเพื่อไล่ก๊าซ ทำให้เย็น **(สารละลาย D)**
4. นำสารละลาย **D** ผสมลงในสารละลาย **C** ใช้แท่งแก้วคนผสมให้เข้ากัน
5. เทใส่ใน Volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร
6. เทใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
7. กรองตะกอนก่อนใช้ (ถ้ามี)

(Michael Somogyi, Biological Chemistry, 195:19,1952)

การเตรียม Nelson reagent

วิธีการเตรียม

1. ชั่งแอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) 21 มิลลิลิตร (สารละลาย A)
3. ชั่งโซเดียมอาซีเนต ($Na_2HasO_4.7H_2O$) 3 กรัมละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร (สารละลาย B)
4. นำสารละลาย A และสารละลาย B ผสมให้เข้ากัน
5. เทใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ.

(Norton Nelson, Biological Chemistry, 153:375, 1944)