สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

วิทยานิพนธ์ งานวิจัย

vtls 122287
M 120754

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การคัดแยกยีสต์จากกากมันสำปะหลังของอุตสาหกรรมผลิตแป้งมัน
The Isolation of Yeast from Cassava Pulp of Modified Starch Production Industry

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ผกามาศ ราชมนตรี

สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
วันรับ
วันลงทะเบียน 11 พ.ค. 2560
เลขทะเบียน ๓๑. 249605
เลขเรียกหนังสือ 579.562 ผ112ก 2557

ฉ.2

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ปีงบประมาณ 2557)

หัวข้อวิจัย การคัดแยกยีสต์จากกากมันสำปะหลังของอุตสาหกรรมผลิตแป้งมัน
ผู้ดำเนินการวิจัย ผกามาศ ราชมนตรี
หน่วยงาน สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
ปี พ.ศ. 2557

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกยีสต์จากกากมันสำปะหลังของอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันที่มีความสามารถในการหมักกากมันสำปะหลังและเพิ่มโภชนะโปรตีนในกากมันหมักยีสต์ได้ พบยีสต์ทั้งหมด 115 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากของเสียจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังเพื่อทดสอบการผลิตโปรตีน โดยไอโซเลท BA2_1 มีการสะสมโปรตีนในเซลล์สูงที่สุดเมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้นในการเพาะเลี้ยง ทำการบ่งชี้ชนิดของยีสต์ในระดับสปีชีส์โดยการศึกษาลำดับเบสบริเวณ 26S rDNA ในส่วนของ D1/D2 domain พบว่ามีความเหมือนกับยีสต์สายพันธุ์ *Pichia kudriavzevii* จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนโดยใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนอง เพื่อศึกษาอิทธิพลของ 3 ปัจจัย ได้แก่ ระยะเวลา ปริมาณคาร์บอน และปริมาณไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจเท่ากับ 0.7194 แสดงว่ารูปแบบการทดลองมีความเหมาะสมต่อความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ และจากสภาวะที่เหมาะสมยีสต์สามารถผลิตโปรตีนได้สูง 3.77 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร และมีโปรตีนสะสมในเซลล์เท่ากับ 66.8 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 100 กรัม แสดงให้เห็นว่า BA2_1 เป็นยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Research Title	The isolation of yeast from cassava pulp of modified starch production industry
Researcher	Phakamas Rachamontree
Organization	Department of Biology, Faculty of Science and Technology Rajabhat Maha Sarakham University
Year	2014

ABSTRACT

The purpose of this study was to isolate and identity yeast from the cassava pulp of modified starch production industry, which is capable of fermenting the cassava pulp with an increase in protein enrichment of yeast-fermented cassava pulp. A total of 115 yeast strains isolated from local cassava processing wastes were measured for crude protein content. Among these strains, the strain BA2_1 possessed the highest protein concentration when used cassava pulp as substrate. By using molecular identification tools, it was identified to be a strain of *Pichia kudriavzevii* based on similarity of D1/D2 domain of 26S rDNA region. In this study, to optimize the protein production by BA2_1 strain, Response Surface Methodology (RSM) was applied. The tested parameters were the incubation time, carbon content and nitrogen content. Here, the value of regression coefficient (R^2) = 0.7194 could be explained by the model which is high to support the significance of the model. Under the optimal condition, the protein content was produced up to 3.77 g per L of the culture and BA2_1 strain contain 66.8 g protein per 100 g of cell dry weight. These results revealed the plausibility of applying the novel strain of yeast in single-cell protein production.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ตลอดจนขอขอบพระคุณอาจารย์ในสาขาชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ ข้อคิดเห็น และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย และสุดท้ายขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในสาขาชีววิทยา และสาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่อำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์เครื่องมือด้านวิทยาศาสตร์ต่างๆ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผกามาศ ราชมนตรี

2558

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย/(นิยามศัพท์เฉพาะ)	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 มันสำปะหลัง	3
2.2 โปรไบโอติก	4
2.3 โปรตีนเซลล์เดียว	6
2.4 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว	8
2.5 ยีสต์ (Yeast)	9
2.6 ปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์	13
2.7 กระบวนการที่ใช้ในการเลี้ยงยีสต์เพื่อเอาเซลล์	14
2.8 คุณค่าทางอาหารของเซลล์ยีสต์	14
2.9 การใช้ยีสต์เสริมในอาหารสัตว์	17
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	20
3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์	20
3.1.1 อุปกรณ์	20
3.1.2 เคมีภัณฑ์	21
3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง	22
3.2.1 การคัดแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างกากมันสำปะหลัง	22
3.2.2 การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีการผลิตโปรตีนสะสมในเซลล์	22
3.2.3 การผลิตโปรตีนด้วยยีสต์จากกากมันสำปะหลังสด	23
3.2.4 การจำแนกสกุลของยีสต์ที่สามารถผลิตโปรตีนได้จากกากมันสำปะหลังสด	23

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.2.5 การหาอิทธิพลของปัจจัยจากแบบจำลองที่เหมาะสมต่อการสะสมโปรตีนในเซลล์ยีสต์........ 24
3.2.6 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ........ 24
บทที่ 4 ผลการวิจัย........ 25
4.1 ผลการคัดแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างกากมันสำปะหลัง........ 25
4.2 ผลการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีการผลิตโปรตีนสะสมในเซลล์........ 25
4.3 ผลการผลิตโปรตีนด้วยยีสต์จากกากมันสำปะหลังสด........ 27
4.4 ผลการจำแนกสกุลของยีสต์ที่สามารถผลิตโปรตีนได้จากกากมันสำปะหลังสด........ 27
4.5 การหาอิทธิพลของปัจจัยจากแบบจำลองที่เหมาะสมต่อการสะสมโปรตีนในเซลล์ยีสต์........ 28
4.6 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ........ 29
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ........ 33
5.1 สรุปผลการวิจัย........ 33
5.2 อภิปรายผล........ 33
5.3 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป........ 34
บรรณานุกรม........ 35
บรรณานุกรมภาษาไทย........ 36
บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ........ 37
ภาคผนวก........ 39
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ........ 40
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจดาล (Kjeldahl method)........ 41
ประวัติผู้วิจัย........ 43

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย	7
2.2 เปรียบเทียบองค์ประกอบทั้งหมดของไวตามิน ของ Torula yeast, นมผง, นมสดและ British petroleum Concentration (B.P)	14
2.3 วิตามินบีรวมของเซลล์ยีสต์ (มิลลิกรัมต่อปอนด์ของน้ำหนักแห้งของเซลล์)	16
2.4 เปรียบเทียบองค์ประกอบทั้งหมดของวิตามิน ของ torula yeast, นมผง และ British Petrolum Concentration (B.P)	16
3.1 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง	24
4.1 แสดงลักษณะโคโลนีและปริมาณโปรตีนสะสมในเซลล์ของยีสที่คัดแยกได้	25
4.2 ปริมาณโปรตีนสะสมในเซลล์ยีสต์ (*Y*) ของแต่ละหน่วยการทดลอง (Run)	28
4.3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลอง (ANOVA analysis)	30

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ยีสต์	10
2.2 การแตกหน่อ (budding) ของเซลล์ยีสต์	11
2.3 วัฏจักรชีวิตของเซลล์ยีสต์	12
4.1 แสดงปริมาณโปรตีนที่สะสมในเซลล์ของแต่ละไอโซเลทเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน	27
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท BA2_1 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MGYP (ข) ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	28
4.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของไอโซเลท BA2_1	28
4.4 ผลตอบสนองพื้นผิวของปริมาณโปรตีนของการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาและปริมาณไนโตรเจน (ก) Contour plot และ (ข) 3D surface plot	32

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา เลย หนองบัวลำพู อุดรธานี หนองคาย สกลนคร อำนาจเจริญ มหาสารคาม เป็นต้น โดยมีผลผลิตรวมทั้งเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 15,387,256 ตัน ในปี พ.ศ.2557 (http://www.thaitapiocastarch.org/crop.asp_online เมษายน, 2558) เนื่องจากมันสำปะหลังเป็นพืชที่ปลูกง่าย สะดวกในการดูแลรักษา เวลาปลูกไม่จำกัด ทนแล้งได้ดี และให้ผลผลิตเป็นที่น่าพอใจในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และเนื่องจากผลผลิตมันสำปะหลังที่มีปริมาณมากนี้ ส่วนหนึ่งจะถูกนำไปใช้ในการผลิตแป้งมันสำปะหลัง หรือโรงงานผลิตฟรุคโตสและสารให้ความหวานเพื่อการบริโภคของมนุษย์ จากกระบวนการผลิตจะทำให้ได้กากมันสำปะหลัง (cassava pulp) เป็นผลผลิตพลอยได้ โดยปกติกากมันสำปะหลังที่ออกจากโรงงานจะมีลักษณะเปียก มีความชื้นประมาณ 80% และยังมีคุณค่าทางอาหารเหลืออยู่ โดยมีแป้งเหลืออยู่ประมาณ 50-60% มีโปรตีน 1.70% ซึ่งโดยทั่วไปแล้วก็จะนำมาเป็นอาหารพลังงานสำหรับสัตว์ (กฤตพล สมมาตย์ และคณิน บรรณกิจ, 2547) แต่ปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ในกากมันสำปะหลังยังอยู่ในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งในสูตรอาหารสัตว์จะใช้วัตถุดิบประเภทโปรตีนประมาณ 20-30% จึงใช้กากถั่วเหลือง และปลาป่นเป็นวัตถุดิบแหล่งโปรตีนหลัก แต่อย่างไรก็ตาม การผลิตกากถั่วเหลืองในประเทศไทยยังมีไม่เพียงพอต่อความต้องการในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ โดยต้องนำเข้าจากต่างประเทศ แต่การใช้กากถั่วเหลืองและปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์เป็นการแก่งแย่งอาหารมนุษย์ เพราะกากถั่วเหลืองและปลาป่นใช้เป็นอาหารได้โดยตรง (ศิริลักษณ์ สร้อยจุฑา, 2554) จึงใช้ยีสต์ (yeast) ที่เป็นโปรไบโอติก (probiotic) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งในกระบวนการหมักกากมันสำปะหลังเป็นกากมันหมักยีสต์ เพื่อช่วยเพิ่มคุณค่าโภชนะโปรตีน พลังงาน และโภชนะอื่นๆ ตามความต้องการของสัตว์แต่ละประเภท ซึ่งเกษตรกรสามารถผลิตได้เองในฟาร์ม แต่ปัญหาที่พบคือยีสต์ที่นำมาทำการหมักกากมันสำปะหลังนั้นเป็นยีสต์ผงที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งทำให้ราคาต้นทุนการผลิตสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการคัดแยกยีสต์จากกากมันสำปะหลังจากกากมันสำปะหลังโรงงานผลิตแป้งสำปะหลัง ใช้เป็นโปรไบโอติกที่มีความสามารถในการหมักกากมันสำปะหลัง เพิ่มปริมาณโปรตีนในอาหารสัตว์ เพื่อนำไปผลิตยีสต์ในระดับขยายส่วน ลดต้นทุนการผลิตอาหารสัตว์มันหมักยีสต์ และลดการนำเข้ายีสต์จากต่างประเทศ ช่วยให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์สามารถผลิตใช้ได้เองในฟาร์มและลดปัญหาวิกฤตอาหารสัตว์ราคาแพงได้ในอนาคต

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างกากมันสำปะหลังโรงงานผลิตแป้งมัน ที่มีความสามารถในการหมักกากมันสำปะหลังและเพิ่มโภชนะโปรตีนในกากมันหมักยีสต์ได้

1.3 ขอบเขตการวิจัย

เก็บตัวอย่างกากมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตแป้งมัน เพื่อคัดแยกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตโปรตีนสะสมในเซลล์ นำยีสต์ที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพการหมักกากมันสำปะหลังสดในระดับห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดมาจำแนกสกุลของยีสต์ทางอนุกรมวิธาน

1.4 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย/(นิยามศัพท์เฉพาะ)

โปรตีนเซลล์เดียว (Single cell protein) หรือ SCP คือ โปรตีนที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ ซึ่งหมายถึงการนำจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มาใช้เป็นแหล่งโปรตีน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

คัดแยกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ในการผลิตกากมันหมักยีสต์ใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยสามารถหมักกากมันสำปะหลังสดและผลิตโปรตีนสะสมในเซลล์สูง เพื่อนำไปพัฒนาใช้ในอุตสาหกรรมมันหมักยีสต์ ลดการนำเข้ายีสต์สายพันธุ์มาตรฐานจากต่างประเทศ และช่วยลดต้นทุนการผลิตอาหารสัตว์ ช่วยให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์สามารถผลิตใช้ได้เองในฟาร์มต่อไปในอนาคต

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา เลย หนองบัวลำพู อุดรธานี หนองคาย สกลนคร อำนาจเจริญ มหาสารคาม เป็นต้น โดยมีผลผลิตรวมทั้งเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 15,387,256 ตัน ในปี พ.ศ.2557 (http://www.thaitapiocastarch.org/crop.asp_online เมษายน, 2558) เนื่องจากมันสำปะหลังเป็นพืชที่ปลูกง่าย สะดวกในการดูแลรักษา เวลาปลูกไม่จำกัด ทนแล้งได้ดี และให้ผลผลิตเป็นที่น่าพอใจในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และเนื่องจากผลผลิตมันสำปะหลังที่มีปริมาณมากนี้ ส่วนหนึ่งจะถูกนำไปใช้ในการผลิตแป้งมันสำปะหลัง หรือโรงงานผลิตฟรุคโตสและสารให้ความหวานเพื่อการบริโภคของมนุษย์ จากกระบวนการผลิตจะทำให้ได้กากมันสำปะหลัง (cassava pulp) เป็นผลผลิตพลอยได้ โดยปกติกากมันสำปะหลังที่ออกจากโรงงานจะมีลักษณะเปียก มีความชื้นประมาณ 80% และยังมีคุณค่าทางอาหารเหลืออยู่ โดยมีแป้งเหลืออยู่ประมาณ 50-60% มีโปรตีน 1.70% ซึ่งโดยทั่วไปแล้วก็จะนำมาเป็นอาหารพลังงานสำหรับสัตว์ (กฤตพล สมมาตย์ และคณิน บรรณกิจ, 2547) แต่ปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ในกากมันสำปะหลังยังอยู่ในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งในสูตรอาหารสัตว์จะใช้วัตถุดิบประเภทโปรตีนประมาณ 20-30% จึงใช้กากถั่วเหลือง และปลาป่นเป็นวัตถุดิบแหล่งโปรตีนหลัก แต่อย่างไรก็ตาม การผลิตกากถั่วเหลืองในประเทศไทยยังมีไม่เพียงพอต่อความต้องการในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ โดยต้องนำเข้าจากต่างประเทศ แต่การใช้กากถั่วเหลืองและปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์เป็นการแก่งแย่งอาหารมนุษย์ เพราะกากถั่วเหลืองและปลาป่นใช้เป็นอาหารได้โดยตรง (ศิริลักษณ์ สร้อยจุฑา, 2554) จึงใช้ยีสต์ (yeast) ที่เป็นโปรไบโอติก (probiotic) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งในกระบวนการหมักกากมันสำปะหลังเป็นกากมันหมักยีสต์ เพื่อช่วยเพิ่มคุณค่าโภชนะโปรตีน พลังงาน และโภชนะอื่นๆ ตามความต้องการของสัตว์แต่ละประเภท ซึ่งเกษตรกรสามารถผลิตได้เองในฟาร์ม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.1 มันสำปะหลัง (ทรงศักดิ์ จำปาวะดี และคณะ, 2550)

มันสำปะหลังมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Manilhol esculenta* Crantz และชื่อสามัญว่า cassava มีถิ่นกำหนดในอเมริกาใต้ แถบประเทศบราซิล ปัจจุบันปลูกกันทั่วไปในประเทศเขตร้อนทั่วโลก (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ และคณะ, 2541) มันสำปะหลังเป็นพืชหัวที่มีการปลูกกันอย่างแพร่หลาย เกือบทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งภาคอีสาน สามารถปลูกได้จนได้รับฉายาว่าพืชเทวดา มันสำปะหลังถือเป็นแหล่งพลังงานและวัตถุดิบอาหารชนิดหนึ่งที่เหมาะสมกับการใช้เลี้ยงสัตว์ชนิดต่างๆ ได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะในประเทศไทยผลิตมันสำปะหลังได้มาก จนบางครั้งมีปัญหาเรื่องราคา มันสำปะหลังในประเทศไทยมีราคาถูกมาก ซึ่งมันสำปะหลังส่วนมากจะถูกนำมาทำแป้งมันสำปะหลัง และทำมันอัดเม็ดส่งขายต่างประเทศ ดังนั้นจึงได้หันมาใช้มันสำปะหลังในการผสมอาหารสัตว์ ถึงแม้มันสำปะหลังจะมีข้อด้อย คือ โปรตีนต่ำ และมีกรดไซยานิค แต่มองถึงเรื่องราคาแล้วราคาของมันสำปะหลังจะถูกมากกว่าวัตถุดิบชนิดอื่นๆ อีกทั้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่ย่อยง่ายโดยเฉพาะในกระเพาะหมักของโค เพราะแป้งมันสำปะหลังเป็นแป้งอ่อน จึงย่อยง่ายสัตว์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ง่าย และมันสำปะหลังมี

ความน่ากินสูง ผนังเซลล์ต่ำ ไม่มีปัญหาเรื่อเยื่อใย ระดับเยื่อใยประมาณ 4-5% ซึ่งถือว่ามีระดับเหมาะสมกับการใช้เป็นอาหารสัตว์ (ทรงศักดิ์ จำปาวะดี, 2545; ทรงศักดิ์ จำปาวะดี และคณะ, 2550) มันสำปะหลังเป็นพืชที่มีการสะสมอาหารที่ราก โดยประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนใหญ่ และมีแป้งมากถึง 64-72% โดยส่วนใหญ่หัวประกอบไปด้วยโปรตีนหยาบประมาณ 1.7-2.2% พบว่ามันสำปะหลังมีโปรตีนประมาณ 3% ไขมัน 1% ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกประมาณ 82% โดยสอดคล้องกับสาโรช ค้าเจริญ (2542) ที่กล่าวว่าโปรตีนในผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังผันแปรอยู่ระหว่าง 1-5%

มันสำปะหลังมีสารพิษที่เรียกว่า กรดไฮโดรไซยานิค เมื่อสัตว์ได้รับกรดไฮโดรไซยานิคมากกว่า 500 มิลลิกรัม สารพิษนี้จะเข้าไปแทนที่ออกซิเจนในฮีโมโกลบิน ซึ่งจะไปขัดขวางการขนส่งออกซิเจน ทำให้ประสาทส่วนกลางถูกทำลาย และเป็นอันตรายต่อสัตว์ถึงสัตว์ หัวมันสำปะหลังสดไม่ควรนำมาเป็นอาหารสัตว์เพราะมีสารไฮโดรไซยานิคสูงมาก และสามารถเป็นอันตรายต่อสัตว์ได้ ดังนั้นก่อนนำมาใช้เลี้ยงสัตว์ควรต้องทำให้สารพิษลดปริมาณน้อยลง (ธีระพล แสนคำราง และคณะ 2545)

2.2 โปรไบโอติก

คำว่า โปรไบโอติก (Probiotic) ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในรายงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของ Lilly และ Stillwell ในปี พ.ศ. 2508 เพื่อกล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมา และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงกันข้ามกับการทำงานของยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) ที่จะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด ในปี พ.ศ. 2517 Parker ได้ให้คำจำกัดความว่า โปรไบโอติก คือสิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในสำไส้ คำจำกัดความล่าสุด ซึ่งเสนอโดย Fuller ในปี พ.ศ. 2532 อธิบายคำว่าโปรไบโอติก คืออาหารเสริมที่มีจุลินทรีย์ที่มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ โดยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่ายกาย โปรไบโอติก (probiotic) คือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่บริโภคเสริมเข้าไปแล้วก่อให้เกิดผลดีต่อผู้บริโภค(host) โดยจะช่วยปรับสมดุลของแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ (Fuller, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกยังสามารถป้องกันโรคท้องร่วง ท้องผูก การอักเสบของลำไส้ ป้องกันการกลับมาเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และลดระดับคลอเลสเตอรอลในเลือด เป็นต้น (Giboson and Roberfroid, 1995a) เชื้อจุลินทรีย์ที่จัดว่าเป็นเชื้อที่มีองค์ประกอบในทางโภชนาการ หรือเป็นเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกควรจะมีคุณสมบัติที่สำคัญ ได้แก่ เชื้อที่อาศัยอยู่ในลำไส้ตามปกติสามารถรอดชีวิตอยู่ได้หลังจากผ่านขบวนการย่อยอาหารขั้นต้นแล้ว ทำให้เกิดประโยชน์เมื่ออยู่ในสำไส้ และยังรักษาความมีชีวิต (viability) และยังคงมีกิจกรรม (activity) อยู่ในอาหารที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ลงไปทั้งในระหว่างการเก็บรักษาจนกระทั่งบริโภค (Lee and Salminen, 1995; Dave and Shah, 1996) สำหรับจุลินทรีย์ที่จัดเป็นโปรไบโอติกนั้น เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Lactobacilli Bifidobacteria Enterococci* และ *Streptococci* เป็นต้น เชื้อยีสต์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida pintolopesii* และเชื้อรา ได้แก่ *Aspergilus niger* และ *A. oryzae* ส่วนพรีไบโอติก (preboitic) หมายถึง ส่วนประกอบของอาหารที่ร่ายกายย่อยไม่หมดที่ลำไส้ หรือไม่สามารถย่อยได้แล้วจึงส่งผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ (Gibson and Roberfoid, 1995a)

โปรไบโอติก เป็นจุลินทรีย์หรือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคและเมื่อเติมเข้าไปในอาหารแล้วเป็นประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ โดยจะปรับปรุงจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารให้สมดุล โดยหลั่งสาร

มาช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ และในขณะเดียวกันก็มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีโทษ ซึ่งผลเหล่านี้ส่งผลต่อสัตว์ คือปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้อาหาร การเจริญเติบโต และทำให้สัตว์มีสุขภาพดีขึ้น (ทรงศักดิ์ จำปาวะดี, 2545) ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) เป็นสารเสริมชีวนะชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ มีอยู่ 2 ชนิด คือ ชนิดแรกเป็นยีสต์ ที่ตายแล้วกับชนิดหลังเป็นยีสต์มีชีวิต (live yeast culture) การใช้ยีสต์ที่ตายแล้วเป็นเพียงการเพิ่มคุณค่าทางอาหารสัตว์ แต่การใช้ยีสต์มีชีวิตในอาหาร ยีสต์จะสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ในกระเพาะและระบบทางเดินอาหารของสัตว์โดยยีสต์ใช้อาหารพวกคาร์โบไฮเดรตและเยื่อใยแล้วขับถ่ายอาหารที่ประกอบด้วยสารพวกโปรตีน ไวตามิน แร่ธาตุออกมา ซึ่งสัตว์สามารถย่อยและใช้ประโยชน์ได้ รวมทั้งตัวยีสต์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อถูกย่อยสลายจะได้สารอาหารโปรตีนเพิ่มขึ้นด้วย (วิศิษฐิพร สุขสมบัติ, 2532)

2.2.1 ลักษณะและหลักการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี (คะนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์, 2540)

- เป็นสายพันธุ์ที่ให้ประโยชน์ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นและมีความต้านทานโรคดีขึ้น
- ไม่ทำให้เป็นโรคและไม่เป็นพิษ
- เป็นเซลล์ที่มีชีวิตและมีจำนวนมากพอควรที่จะเดินทางไปจนถึงทางเดินอาหารส่วนท้าย
- ทนต่อสภาพกรดในกระเพาะและน้ำดีในลำไส้ แต่สามารถย่อยสลายในลำไส้ได้ดี
- มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานในสภาพเก็บรักษาและการใช้จริงในฟาร์ม
- มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานในการผสมอาหารสัตว์ เนื่องจากการผลิตอาหารสัตว์บางชนิด ต้องผ่านกระบวนการความร้อน แรงอัดเพื่อการอัดเม็ด และสภาพเป็นกรด หรือการ Extrusion และ Oxidation เช่น วัตถุที่เติมลงในอาหารสัตว์บางชนิดซึ่งช่วยในการถนอมคุณภาพอาหารสัตว์
- ไม่ตกค้างในซากสัตว์
- ราคาไม่แพง
- ไม่ถูกดูดซึมในทางเดินอาหาร
- ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม

2.2.2 ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์ (คะนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์, 2540)

- ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตแทนยาปฏิชีวนะและเคมีภัณฑ์ซึ้งอาจพบปัญหาการดื้อยา และสารตกค้าง
- ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารดีขึ้น ทำให้การใช้น้ำตาลแลกโตสในน้ำนมดีขึ้น
- ช่วยป้องกันโรคต่างๆ เนื่องจากสารเสริมชีวนะทำให้สัตว์มีภูมิคุ้มกันสูงขึ้นลดการเกิดโรคท้องเสียในสัตว์เกิดความเครียดและมีผลทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้
- ยับยั้งหรือป้องกันการเกิดเนื้องอก โดยสารเสริมชีวนะจะช่วยยับยั้งการสร้างเนื้องอก และลดการสร้างน้ำย่อยที่ใช้ในการสร้างสารไนโตรซามีน
- ยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอล

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

- ใช้ได้กับสัตว์ทุกชนิด ทุกระยะ (ยกเว้นเป็ด เนื่องจากไม่มีข้อแนะนำในการใช้สำหรับเป็ด)

- องค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (The United States Food and Drug Administration; FDA) ยอมรับว่าเป็น GRAS (Generally Recognized as Safe)

2.3 โปรตีนเซลล์เดียว

โปรตีนจากจุลินทรีย์ หรือที่เรียกว่าโปรตีนเซลล์เดียว (Single-Cell Protein) มีชื่อเรียกย่อๆ ว่า SCP ได้บัญญัติขึ้นโดยสถาบัน Massachusetts Institute of Technology โดยให้ความหมายว่าเป็นโปรตีนที่ได้จากจุลินทรีย์ ได้แก่ สาหร่าย เชื้อรา ยีสต์ แบคทีเรีย ซึ่งไม่จำเป็นต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีเซลล์เดียว (unicellular cell) เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ แต่ร่วมถึงจุลลินทรีย์ที่มีหลายเซลล์ (multicellular cell) เช่น สาหร่าย และเชื้อรา แต่อย่างไรก็ดียังคงนิยมเรียกโปรตีนที่ได้ว่าเป็นโปรตีนเซลล์เดียว (พนิดา สมบัติยานุชิต, 2537)

2.3.1 คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งสาหร่าย เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย แต่คุณสมบัติจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวควรมีคุณสมบัติดังนี้ คือ (Bhaltacharjee, 1970)

- สามารถเจริญได้เร็วในอาหารที่มีราคาถูก วัตถุดิบที่หาได้ในท้องถิ่นนั้นๆ
- สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีส่วนประกอบง่ายๆ มีความต้องการวิตามินและสารเร่งการเจริญ (growths factor) ต่างๆ น้อย หรือไม่ต้องการเลย
- คงลักษณะทางพันธุกรรมได้ดี ไม่กลายพันธุ์ (mutant) ง่ายเมื่อเลี้ยงติดต่อกันไปเรื่อยๆ
- การแยกและเก็บเกี่ยวเซลล์ทำได้ง่าย
- มีความต้องการต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ
- ทราบคุณสมบัติทางพันธุกรรม สรีรวิทยา และสามารถปรับปรุงพันธุ์
- ใช้แหล่งพลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- หลังจากผ่านกระบวนการเลี้ยงแล้ว มีวัสดุเหลือทิ้งน้อยหรือไม่มีเลย
- ไม่มีพิษ และทำให้เกิดอาการแพ้
- ให้ปริมาณโปรตีนสูง โดยเฉพาะโปรตีนจะต้องมีกรดอะมิโนที่มีคุณค่า
- เก็บรักษาได้ง่าย เช่น การทำให้แห้งได้

2.3.2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว

ในปัจจุบันมีการผลิต SCP เพื่อเป็นแหล่งโปรตีนกันอย่างแพร่หลายทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นมีข้อดีและข้อเสียในการนำมาผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวแตกต่างกัน ดังนี้

2.3.2.1 สาหร่าย

จัดเป็นพวกที่มีการดำรงชีวิตแบบ phototrophic microorganism คือ สามารถใช้พลังงานแสงอาทิตย์เป็นแหล่งของพลังงานแสงอาทิตย์เป็นแหล่งของพลังงานในการรีดิวซ์ สารอนิน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ทรีย์ (ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์) ให้เป็นสารอินทรีย์ ข้อดีของสาหร่าย คือ มีปริมาณโปรตีนสูงประมาณ 55% ทำให้สามารถผลิตโปรตีนต่อพื้นที่ต่อปีได้สูง นอกจากนี้ยังอุดมด้วยวิตามินซี และวิตามินบีรวมมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและไขมันอยู่ในสัดส่วนที่น่าพอใจดังแสดงในตารางที่ 2.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสามารถทำได้ตลอดทุกฤดูกาล สามารถเพาะเลี้ยงได้ในปริมาณที่ไม่ใช้ในการเพาะปลูก หรือในบริเวณที่แห้งแล้ง สาหร่ายสามารถเก็บผลผลิตได้ง่าย เนื่องจากเซลล์มีขนาดใหญ่และแยกออกจากน้ำที่ใช้เลี้ยงได้ง่าย ส่วนข้อเสียของสาหร่ายก็คือ สาหร่ายมี crude fiber มาก ทำให้มีปัญหาต่อระบบการย่อย บางครั้งทำให้เกิดการรบกวนต่อกระเพาะอาหารและลำไส้ สาหร่ายมีอันตรายการเจริญช้ากว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่นๆ การนำเอาสาหร่ายมาเลี้ยงในระบบปิดหรือในถังหมักจะมักมีปัญหาในการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และแสงแก่สาหร่ายนอกจากนี้ยังพบว่า สาหร่ายมีกลิ่นยังไม่เป็นที่ยอมรับต่อผู้บริโภค ทำให้การผลิตโปรตีนจากสาหร่ายยังไม่แพร่หลายเท่าไรนัก (Bhaltacharjee, 1970)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย

สารประกอบ	น้ำหนักแห้ง (%)
โปรตีน	55-65
ไลปิด	2-6
คาร์โบไฮเดรต	10-15
เยื่อใย (Crude Fiber)	1-4
เถ้า (ASh)	6-15
ความชื้น	5-10

ที่มา: Venkataraman, 1983

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.3.2.2 แบคทีเรีย

การศึกษาเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียเป็นแหล่งโปรตีนนั้นได้รับความสนใจมากขึ้นทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียมี Generation time ต่ำ คือ 20 - 30 นาที ขณะที่ยีสต์และรามี Generation time 2-3 ชั่วโมง และ 4-16 ชั่วโมง ตามลำดับ แบคทีเรียมีโปรตีนสูง ซึ่งในแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีปริมาณแตกต่างกันไปตั้งแต่ 47 -87% ในขณะที่โปรตีนจากสาหร่าย รา และยีสต์นั้นมีปริมาณ 40, 40 และ 50% ตามลำดับ นอกจากนี้แบคทีเรียยังเป็นจุลินทรีย์ที่ง่ายต่อการนำมาปรับปรุงพันธุ์เพื่อใช้ในอุสาหกรรม ส่วนข้อเสียของแบคทีเรียก็คือ เซลล์ของแบคทีเรียนั้นมีขนาดเล็กทำให้เก็บเกี่ยวผลผลิตยาก (Bhaltacharjee, 1970)

2.3.2.3 เชื้อรา

เชื้อราที่ใช้เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์มานานก็คือเห็ด ซึ่งเป็นโปรตีนเซลล์เดียวที่มนุษย์สามารถบริโภคได้โดยตรง เช่น *Agaricus campestris* ก็ถูกใช้เป็นอาหารแถบยุโรป นอกจากนี้ยังมีเห็ด *Cortinellus berkelyanus, Volvaia, Volvacea* ในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ประเทศเยอรมันได้เลี้ยงราพวก *Geotrichum candum* เป็นอาหารเสริมของมนุษย์ เพราะมีการขาดแคลนอาหารโปรตีน และวิตามินส่วนพวกเชื้อรา *Geotrichum lactis* ก็เหมาะที่จะผลิตอาหารเสริมโปรตีน

เพราะว่าสามารถใช้หางนม (Whey) และ sulfite waste liquor เป็นอาหารในการเจริญเติบโตได้ดี ปัจจุบันการใช้เชื้อราจะต้องเสริมด้วย methionine1 กรดกลูตามิค วิตามินบี 2 และวิตามินบี 12 ทั้งนี้เพราะส่วนประกอบของกรดอะมิโนในเชื้อรา มีปริมาณใกล้เคียงกับปริมาณกรดอะมิโนในจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ คือ มี sulfur amino acid ต่ำ และเชื้อราจะมีวิตามินบีทุกชนิดในระดับต่ำ (Bhaltacharjee, 1970)

2.3.2.4 ยีสต์

Bhaltacharjee (1970) รายงานว่ายีสต์นับว่ามีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดในบรรดาจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ใช้เป็นแหล่งใช้กันแพร่หลายมาตั้งแต่สมันสงครามโลกครั้งที่ 2 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการขาดแคลนโปรตีน ยีสต์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ *Candida utilis* นอกจากนี้ก็ยังมี *Rhodotorula gracilis, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces carlsbergensis, Candida tropicalis, Trichosporon pullulans* โดยคุณสมบัติของยีสต์ซึ่งทำให้ยีสต์เป็นที่นิยมในการนำมาใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว คือ

- ยีสต์มีอัตราการเจริญเร็วในอาหารที่มีส่วนประกอบอย่างง่ายๆ
- เซลล์ยีสต์สามารถคลุกเคล้ากับอาหารได้ดี และแยกเซลล์ออกจากอาหารที่เลี้ยงได้ง่าย
- สามารถต้านทานต่อการทำลายของไวรัสและเชื้ออื่นที่ปนเปื้อนและมีความคงตัวต่อสภาวะการหมัก
- สามารถใช้แหล่งพลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อผ่านขบวนการหมักแล้วมีวัสดุเหลือทิ้งน้อยมาก หรือไม่มีเลย
- มีกลิ่นรสที่ดี ไม่มีพิษ และสามารถย่อยได้ง่าย
- มีปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันสูง
- สามารถปรับปรุงพันธุ์ให้มีคุณสมบัติที่ต้องการได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.4 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

สำหรับวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ ไฮโดรคาร์บอนและคาร์โบไฮเดรต (พนิดา สมบัติยานุชิต, 2537)

2.4.1 ไฮโดรคาร์บอน ซึ่งมีทั้งที่อยู่ในสภาพของเหลว เช่น เมทานอล n-paraffin และไฮโดรคาร์บอนในสถานะก๊าซ เช่น methane, n-butane propane ethane เป็นต้น

2.4.2 คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส รวมถึงวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรและอุตสาหกรรมซึ่งได้จากแหล่งต่างๆ เช่น

- กากน้ำตาล ได้จากโรงงานผลิตน้ำตาล ซึ่งเป็นน้ำตาลที่ได้จากอ้อยหรือหัวบีท ขึ้นกับวัตถุดิบที่มีในท้องถิ่น ส่วนประกอบของกากน้ำตาลและหัวบีท ซึ่งส่วนใหญ่จะประกอบด้วย Invert sugar
- น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตกระดาษ (spent sulfite waste liquor)
- น้ำทิ้งจากโรงงานมันฝรั่ง
- น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเนย (whey)

- น้ำตาลโมเลกุลใหญ่ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ แป้งและเซลลูโลส โดยวัตถุดิบพวกนี้ต้องผ่านกระบวนการทางเคมี หรือการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อย่อยให้เป็นน้ำตาลก่อน หลังจากนั้นจึงนำไปเลี้ยงจุลินทรีย์

- เมล็ดธัญพืช โดยทั่วไปจะมีแป้งเป็นส่วนประกอบ โปรตีนมีเพียงเล็กน้อย และมักขาดกรดอะมิโนจำเป็น เช่น ข้าวสาลีขาดไลซีน

- มันสำปะหลัง มีแป้งเป็นส่วนประกอบเป็นส่วนใหญ่ มีโปรตีนเพียง 1 % เป็นที่นิยมนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเนื่องจากราคาถูก หาง่าย มีทุกฤดูกาล

- เซลลูโลส เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบของพืชทุกชนิด ซึ่งเป็นของเหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร

2.5 ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่กระจายอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในสวนผลไม้ ไร่องุ่น ดิน อากาศ ทางเดินอาหารและลำไส้ของสัตว์ ใบไม้ ดอกไม้ และแมลงบางชนิด เป็นต้น ยีสต์ส่วนใหญ่มีบทบาทในอุตสาหกรรมอาหาร เพราะสามารถผลิตเอนไซม์ซึ่งช่วยให้เกิดปฏิกิริยาที่ต้องการได้ เช่น การฟูของขนมปัง การผลิตแอลกอฮอล์ กลีเซอรอล หรือเอนไซม์อินเวอร์เทส และสามารถใช้สังเคราะห์วิตามินบีได้ ส่วนยีสต์ที่ให้โทษก็มีอยู่หลายชนิด ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหาร นอกจากนี้ยีสต์บางชนิดก็ทำให้เกิดโรคกับคน พืช และสัตว์ (บวรศักดิ์ ลีนานนท์, 2536)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับมนุษย์มาเป็นระยะเวลายาวนาน จากคุณสมบัติที่ยีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งยีสต์จะเปลี่ยนของเหลวที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ น้ำผลไม้ต่างๆ ให้เป็นแอลกอฮอล์ มีหลักฐานว่ามีการใช้ยีสต์ในการทำเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ และใช้ยีสต์ในการทำขนมปังตั้งแต่ 3,000 ปี ก่อนคริสตกาล ปัจจุบันยีสต์ได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์มากมาย (ทรงศักดิ์ จำปาวะดี และคณะ, 2550) เช่น

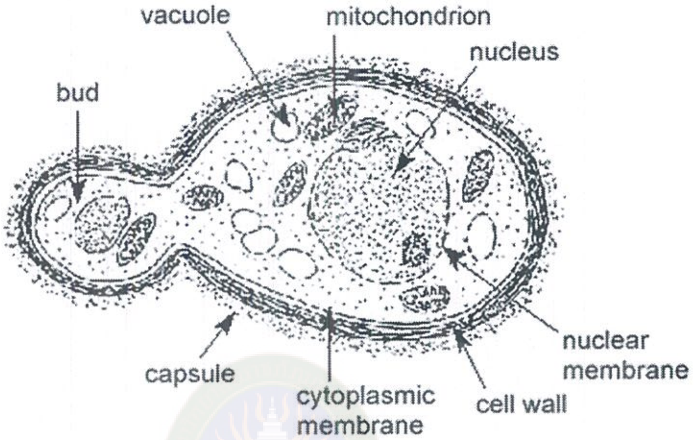
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

- เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (alcoholic beverages) ได้แก่ เบียร์ และเหล้าชนิดต่างๆ
- ยีสต์ใช้ทำขนมปัง (bakers' yeasts)
- ยีสต์อาหารคนและอาหารสัตว์ (food and fodder yeasts)
- แอลกอฮอล์เชื้อเพลิง (fuel alcohol)

ลักษณะทั่วไปและโครงสร้างของยีสต์ ยีสต์เป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต (eukaryote) เซลล์ยีสต์มีขนาดแตกต่างกันออกไป มีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 1 ถึง 5 ไมโครเมตร ยาวตั้งแต่ 5 ถึง 30 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่เซลล์จะรูปไข่ บางชนิดเป็นรูปทรงกลม ขนาดและรูปร่างอาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอายุ และสภาพแวดล้อม ยีสต์ไม่มีโครงสร้างที่ใช้ในการเคลื่อนที่ ดังนั้นจึงเคลื่อนที่ไม่ได้ ลักษณะเด่นของยีสต์ คือ เป็นพวกเซลล์เดียวและมีหน่อ การแตกหน่อบางครั้งเซลล์ไม่หลุดออกจากกัน แต่เกาะกันเป็นกลุ่ม บางครั้งมีการเปลี่ยนแปลงโดยเซลล์ตรงกลางต่อกันเป็นสายยาว เรียกว่าซูโดไมซีเลียม (pseudomycelium) ยีสต์บางชนิดมีการสร้างไมซีเลียมจริง (true mycelium) โดยไมซีเลียมจริงนี้มีผนังกั้นตามขวางแบ่งเป็นเซลล์มีหน่ออยู่รอบกั้นตามขวาง

2.5.1 โครงสร้างต่างๆ ของเซลล์ยีสต์ (ณรงค์ วงษ์พานิช, 2532)

2.5.1.1 แคปซูล (capsule) เป็นโครงสร้างที่ห่อหุ้มเซลล์ (รูปที่ 2.1) โดยยีสต์บางชนิดจะปล่อยสารที่มีลักษณะเป็นเมือกหนืด หรือเหนียวออกมาหุ้มเซลล์ แคปซูลมักเป็นสารพวกโพลีแซคคาไรด์ รวมทั้งเฮกเทอโรโพลีแซคคาไรด์ แมนแนน และสารที่คล้ายแป้ง



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ยีสต์
ที่มา: http://danielseobiodiversity.blogspot.com/2013/04/structure-function_11.html (29 ตุลาคม, 2557)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.5.1.2 ผนังเซลล์ (cell wall จะมีความหนา 1/7 ของเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ ส่วนประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์ ได้แก่

- กลูแคน (glucan) หรือเรียกเซลลูโลสของยีสต์ต่างกับเซลลูโลสที่เป็น β-1,3 linkage หรือ β-1,6 linkage เพราะเป็นเซลลูโลส β-1,4 linkage มีอยู่ 30-35%
- แมนแนน (mannan) เป็นโพลีเมอร์ของแมนโนสมีประมาณ 30%
- ลิปิด 8.5-13.5%
- โปรตีน 6-8%
- ไคติน 1-2%
- ที่เหลือเป็นสารอนินทรีย์ เช่น เกลือฟอสเฟต

2.5.1.3 เยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) จะเป็นพวกไลโปโปรตีน และทำหน้าที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของอาหาร

2.5.1.4 ไซโตพลาส มีลักษณะครึ่งเหลวครึ่งแข็ง ประกอบด้วยสารโพลีแซคคาไรด์ที่สะสมอยู่คือ ไกลโคเจน นอกจากนี้มี RNA และโปรตีนอยู่มากและยังมีไรโบโซม และออการ์แนลอื่นๆ เช่น ไมโตคอนเดรีย

2.5.1.5 นิวเคลียส โครงสร้างทั่วไปเหมือนนิวเคลียสของเซลล์ของพวกยูคาริโอตทั่วๆ ไป

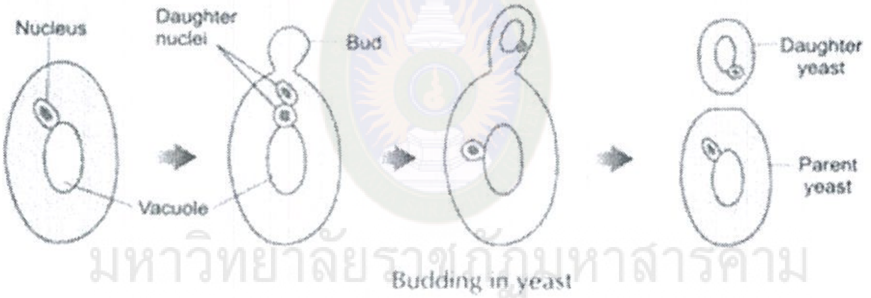
2.5.1.6 แวคคิวโอล (vacuole) หรือช่องว่างในเซลล์อาจจะมี 1 หรือหลายอัน เห็นชัดเจนกว่าโครงสร้างอื่นๆ

2.5.1.7 อินคลูชัน (inclusion) ยีสต์บางสปีชีส์จะมี volutin granule ซึ่งเป็นกรานูลของโพลีฟอสเฟต บางชนิดมีกรานูลไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือโปรตีน บางสปีชีส์สะสมไขมันถึง 50% ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังมีไกลโคเจน เอนไซม์ วิตามิน รงควัตถุ ซึ่งอาจจะเป็นสีเหลือง สีส้ม สีชมพู หรือสีน้ำตาล นอกจากนี้ยังอาจพบไซโตโครม ฮีโมโกลบิน และฟลาวิน

2.5.2 การสืบพันธุ์ (Reproduction)

2.5.2.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แบ่งออกเป็น

- การแตกหน่อ (budding) โดยเกิดปุ่มเล็กๆ ที่ผิวนอกของเซลล์ ต่อมาปุ่มนี้จะขยายใหญ่ขึ้น และมีนิวเคลียส และไซโตพลาสจากเซลล์แม่เข้าไปในปุ่ม ปุ่มนี้จะเปลี่ยนเป็นหน่อที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเกือบเท่าเซลล์แม่ ต่อไปจะแยกออกจากเซลล์ (รูปที่ 2.2) พวกที่สืบพันธุ์โดยการแตกหน่ออย่างแท้จริง เซลล์จะคอดเข้าแล้วหน่อจะหลุดออก ไม่มีการสร้างผนังระหว่างหน่อกับเซลล์แม่ก่อน ถ้าเกิดการแตกหน่อแล้วหน่อไม่หลุดออกจากเซลล์แม่และยังสามารถให้หน่อใหม่ต่อๆ ไปได้อีกจะเกิดเป็นเรียกว่าซูโดไมซีเลียม (pseudomycelium) (ณรงค์ วงษ์พานิช, 2532)



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

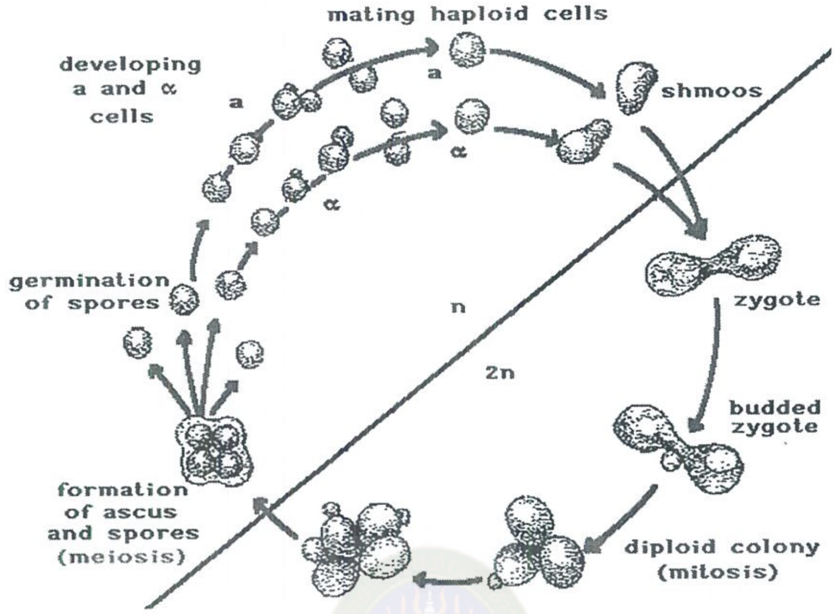
รูปที่ 2.2 การแตกหน่อ (budding) ของเซลล์ยีสต์

ที่มา: http://www.biologydiscussion.com/experiments/experiment-to-observe-binary-fission-in-amoeba-and-budding-in-yeast/1741 (29 ตุลาคม, 2557)

- ฟิชชัน (fission) ยีสต์จะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า binary fission คล้ายกับที่เกิดในแบคทีเรีย โดยที่เซลล์ยีสต์จะพองออกหรือยาวออก นิวเคลียสจะมีการแบ่งทำให้ได้เซลล์ใหม่ขนาดเท่ากัน 2 เซลล์เกิดขึ้น

- การแตกหน่อและฟิชชันเกิดรวมกัน วิธีนี้เรียกว่า bud-fission โดยเซลล์ยีสต์จะสร้างหน่อขึ้นมาและจะมีผนังกั้นระหว่างเซลล์แม่กับหน่อ

2.5.2.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ยีสต์ชนิด *Saccharomyces cerevisiae* มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยมีวัฏจักรชีวิตสลับช่วงชีวิตที่เป็นแฮพพลอยด์และดิบพลอยด์พอๆ กัน ทั้งสองช่วงชีวิตมีการเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อ (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 วัฏจักรชีวิตของเซลล์ยีสต์
ที่มา: http://www.phys.ksu.edu/gene/Mating4.html (29 ตุลาคม, 2557)

2.5.3 กลไกการออกฤทธิ์ของยีสต์ (Mode of action of Yeast culture)

กลไกการออกฤทธิ์ของยีสต์ในการกระตุ้นผลผลิตสัตว์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การออกฤทธิ์อาจเป็นดังนี้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.5.3.1 ยีสต์มีสารปรุงแต่งรสธรรมชาติ (glutamic acid) ซึ่งทำให้อาหารน่ารับประทานยิ่งขึ้น

2.5.3.2 ยีสต์มีวิตามินบีรวม และปัจจัยการเจริญเติบโตที่ไม่ทราบ (unknown growth factors) ซึ่งทั้งสองอย่างนี้เป็นสิ่งที่มีประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารและการเมตาบอลิซึมของสัตว์และยังให้ aminobenzoic acid ซึ่งเป็นปัจจัยการเจริญเติบโต สำหรับแบคทีเรียหลายชนิด เช่น cellulolytic bacteria, hemicellulolytic bacteria เป็นต้น

2.5.3.3 ยีสต์ดูดซึมโปรตีนจำนวนมากและขับกรดอะมิโนที่จำเป็นออกมาเช่นกัน ยีสต์ให้แร่ธาตุซึ่งเป็นประโยชน์ในการ chelation ซึ่งเป็นการทำให้เกิดสารเชิงซ้อนของแร่ธาตุ แบบวงจรที่ความเสถียรหลังยีสต์ย่อยตัวเองและแร่ธาตุเหล่านั้นจะถูกดูดซึมอย่างรวดเร็วในสัตว์ นอกจากนี้ยีสต์ยังสร้าง ergosterol, sterols, lipids, glycolipid และ polypeptides บางตัว

2.5.3.4 ยีสต์เป็นแหล่งที่อุดมมากที่สุดของปัจจัยการเจริญเติบโตที่ไม่ทราบ แต่เป็นที่รู้จักว่าเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต เพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารและอาหารอย่างดีสำหรับสัตว์ มีผลงานวิจัยแสดงว่าองค์ประกอบของ yeast culture สามารถนำมาใช้ทดแทนหางนมผง ปลาป่น หญ้าอัลฟัลฟ่า และผลผลิตที่เหลือจากการหมัก ยังให้องค์ประกอบซึ่งกระตุ้นการใช้เยื่อใยของจุลินทรีย์ในการหมักกระเพาะหมักสัตว์เคี้ยวเอื้อง

2.5.3.5 ยีสต์ขับเอนไซม์ช่วยย่อย เช่น amylase, lipase, protease และเอนไซม์อื่นๆ

2.5.3.6 ยีสต์มีคุณสมบัติดูดซึมอย่างดีที่ผนังเซลล์และเป็นเหมือนแหล่งอาหารและเป็นตัวปรับ pH ในทางเดินอาหาร

2.6 ปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์

2.6.1 แหล่งคาร์บอนและพลังงาน

ยีสต์ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและปราศจากออกซิเจน ยีสต์ส่วนมากจะใช้ fermentable sugar เช่น D-glucose, D-fructose และ D-mannose ได้ดี บางชนิดก็สามารถใช้แป้งได้ เช่น *Endomycopsis fibuligera* บางชนิดก็ใช้ inulin ได้ เช่น *Fabospora fragilis* บางชนิดก็ใช้ pentose ได้ เช่น *Candida utilis* นอกจากนี้บางชนิดยังสามารถใช้สารประกอบไฮโรคาร์บอนได้ด้วย (ณรงค์ วงษ์พานิช, 2532)

2.6.2 แหล่งไนโตรเจน

ยีสต์ต้องการแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการสร้างโปรตีนของตัวเอง แหล่งไนโตรเจนที่ยีสต์นำมาใช้ได้มีหลายอย่าง ยีสต์ทุกชนิดใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ส่วนแอมโมเนียมฟอสเฟต โมโนและไดแอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต แอมโมเนียมคาร์บอเนต แอมโมเนียมทาร์เตรต และยูเรีย ยีสต์หลายชนิดสามารถใช้ได้ดี ในการผลิตยีสต์เพื่อเป็นอาหารเสริมโปรตีน ส่วนมากนิยมใช้สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรีย

2.6.3 แหล่งฟอสฟอรัส

ยีสต์ต้องการแหล่งฟอสฟอรัส เพื่อใช้ในการสร้างพลังงาน เซลล์ยีสต์สามารถดูดซึมสารโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตได้ดีกว่าไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารอาหารอื่นๆ นั้น ยีสต์ต้องการในปริมาณต่ำ ได้แก่ แร่ธาตุต่างๆ เพื่อเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น แมกนีเซียม โคบอลท์ โมลิบดีนัม ทองแดง และสังกะสี เป็นต้น นอกจากนั้นยีสต์ยังต้องการ growth factor บางชนิด เช่น ไบโอติน แพนโททีนิคแอซิด อิโนซิโทล ไทอามีน นิโคลินิคแอซิด ไมริดอกซิน และโฟลิคแอซิด

2.6.4 ความเป็นกรด-ด่าง ของอาหาร

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเป็นกรดมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นปกติความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ทั่วไปอยู่ระหว่าง 4.5-5.5 ความเหมาะสมของความเป็นกรดด่างจะแตกต่างกันไปตามชนิดของยีสต์ เช่น *C.utilis* เจริญได้ดีที่ความเป็นกรดด่าง 4.5-5.5 และ *E. fibuligera* เจริญได้ดีที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 เป็นต้น

2.6.5 อุณหภูมิ

ยีสตีส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส แต่จะแตกต่างกัไปขึ้นกับชนิดของยีสต์ เช่น *E. fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae* เพาะเลี้ยงด้วยการหมักแบบ symba yeast process ในมันเส้น 5% โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม 35 องศาเซลเซียส

2.7 กระบวนการที่ใช้ในการเลี้ยงยีสต์เพื่อเอาเซลล์

2.7.1 Swedish Symba Process ใช้เชื้อ *Endomycopsis fibuligera* ซึ่งมีเอนไซม์ และ amylase เป็นส่วนใหญ่ จะย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ส่วนเชื้อ *Candida utilis* จะใช้น้ำตาลในการเจริญ ได้เชื้อชนิดหลังเป็นแหล่งอาหารโปรตีนซึ่งเป็นการเลี้ยงในลักษณะเชื้อผสม 2 ชนิด

2.7.2 Amylo process ใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ *Rhizopus* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้แป้งเป็นวัตถุดิบ ราจะย่อยแป้งเป็นน้ำตาลซึ่งเป็นโปรตีนเซลล์เดียว

2.7.3 Waldhof proccss ใช้ *C. utilis* ใน sulfite waste liquor ในถังหมักต่อเนื่องของ Waldhof ได้เปอร์เซ็นต์โปรตีน 50-60 %

2.7.4 DSM oxanone-water process ใช้ *Candida lipolytica* และ *Trichosporon cutaneum* ในน้ำทิ้งจากการออกซิไดซ์ cyclohexane ได้โปรตีน 54-67 % (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

2.8 คุณค่าทางอาหารของเซลล์ยีสต์

ภายในเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยสารอาหารหลายชนิด ซึ่งมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับคนและสัตว์ โดยเฉพาะโปรตีน ซึ่งเฉลี่ยแล้วในยีสต์ประกอบด้วยโปรตีนทั้งหมด 45-50 % ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจะเป็นโปรตีนแท้ๆ ประมาณ 40 % ของน้ำหนักแห้งในส่วนของโปรตีนทั้งหมดจะประกอบด้วยกรดอะมิโน ประมาณ 80-85 % และเป็นกรดนิวคลีอิก ประมาณ 2 % และแอมโมเนีย 8 % (Miller, 1964; พนิดา สมบัติยานุชิต, 2537) คุณค่าทางอาหารไม่ได้ขึ้นกับปริมาณสารทั้งหมดที่มีอยู่ในเซลล์เพียงประการเดียว แต่ขึ้นอยู่กับคุณภาพการย่อย (digestibility) ค่า biological value ค่า Net Protein Utilization (NPU) และ Protein efficiency ratio (PER) ด้วย ยิ่งไปกว่านั้นยังขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) (Cooney *et al*., 1975) ซึ่งปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในเซลล์ยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่แตกต่างกันไป ดังแสดงได้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบองค์ประกอบทั้งหมดของไวตามิน ของ torula yeast, นมผง, นมสดและ British petroleum Concentration (B.P)

ชนิดของสสาร องค์ประกอบ	torula yeast %	นมผง %	นมสด %	B.P protein Concentration %
โปรตีน	50.0	26.5	3.5	43.6
คาร์โบไฮเดรท	30	38.0	4.8	21.9
ไขมัน	2.0	28.0	3.8	18.5

ที่มา: เมทนี สุคนธรักษ์, 1970-1971

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบองค์ประกอบทั้งหมดของไวตามิน ของ torula yeast, นมผง, นมสดและ British petroleum Concentration (B.P) (ต่อ)

ชนิดของสสาร องค์ประกอบ	torula yeast %	นมผง %	นมสด %	B.P protein Concentration %
เถ้า	7.0	6.5	0.9	4.4
ความชื้น	4.0	2.0	87.0	7.0
ไวตามิน(ไมโครกรัม/กรัม)				
Thiamine	150.0	3.4	0.44	3-16
Niacine	500.0	7.3	0.94	180-200
Biotin	1.0	0.3	0.031	-
Choline	2500.0	862.0	121.0	-
Cobal amine	0.003	3.9	0.64	0.11
Riboflavin	50.0	15.5	1.75	75.0
Pantothenic acid	100.0	7.9	3.46	150-192
Pyridoxine	35.0	3.9	0.64	23.0
Folic acid	30.0	0.018	0.0028	-

ที่มา: เมทนี สุคนธรักษ์, 1970-1971

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ยีสต์นอกจากจะให้คุณค่า ทางด้านโปรตีนแล้วภายในเซลล์ยังประกอบด้วยแหล่งของวิตามินบีรวม หลายชนิด ที่เหมาะสมสำหรับเป็นอาหารเสริมในอาหารคนและสัตว์ ดังแสดงในตารางที่ 2.3 (Rose and Harrison, 1970) ซึ่งเมื่อเทียบคุณค่าทางอาหารประเภทอื่นๆ ถือว่าอยู่ในระดับน่าพอใจ ดังแสดงในตารางที่ 2.4 พบว่าประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรท 22-33 % ซึ่งเป็น trehalose 33 % , glucan 27 %, manan 21 % และ glucagen 19 % ส่วนไขมันในเซลล์ยีสต์นั้นมีประมาณ 2-3 % ซึ่งประกอบไปด้วย triglyceride lecithin และ ergosterol (Bhaltacharjee, 1970) ส่วนเกลือแร่ที่พบในเซลล์ยีสต์นั้น มีประมาณ 6-8 ซึ่งโปรแตสเซียม และฟอสฟอรัส เป็นส่วนประกอบหลัก และยังคงพบแคลเซียม แมกนีเซียม กำมะถัน ซิลิกอน คลอไรด์ เหล็ก ตะกั่ว บ้างอีกเล็กน้อย (Rose and Harrison, 1970)

จากการศึกษา ถึงแม้ว่า ยีสต์จะมีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดสำหรับผลิตเป็นอาหารมนุษย์แต่ยีสต์ก็ยังคงมีข้อเสียเช่นกัน กล่าวคือ ยีสต์มีปริมาณกรดนิวคลีอิกในเซลล์ในปริมาณค่อนข้างสูง คือ 12 % ซึ่งถ้ารับปริมาณของกรดนิวคลีอิกมากจนเกินไป จะส่งผลทำให้เกิดปัญหาต่อร่างกาย เช่น ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับไต หรือโรคเก๊าท์ได้ มีรายงานว่าหากบริโภค *S. cerevisiae* และ *C. utilis* เป็นอาหารหลักทุกมื้อ จะมีผลทำให้ระบบทางเดินอาหารผิดปกติได้ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า การผลิต *C. utilis* ที่ได้จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษนั้นอาจก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับผิวหนังได้

สำหรับผู้ป่วยที่มีสุขภาพแข็งแรงนั้น สามารถรับปริมาณของกรดนิวคลีอิกจากโปรตีนเซลล์เดียวได้ 2 กรัมต่อวัน จึงจะอยู่ในระดับปลอดภัย จากปัญหาดังกล่าว มีการศึกษาเพื่อค้นหาแนวทาง

ในการลดปริมาณของกรดนิวคลีอิกในเซลล์ยีสต์ ตัวอย่างเช่น มีการใช้ความร้อนในการลดปริมาณกรดนิวคลีอิก โดยการทำ heatshock ที่ 0-100 องศาเซลเซียส แล้วบ่มที่ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หรือใช้สารเคมี เช่น Na_2HPO_4 ที่เจือจางหรือการใช้เอนไซม์ เช่น bivine pancreatic ribonuclease

ตารางที่ 2.3 วิตามินบีรวมของเซลล์ยีสต์ (มิลลิกรัมต่อปอนด์ของน้ำหนักแห้งของเซลล์)

Organism Vitamin	Brewer's yeast	Distiller yeast	*Candida utilis*	Primary grow baker's yeast
Thiamine	41.7	34.8	2.8	72.0
Riboflavin	15.9	12.3	20.2	27.2
Pantothenic acid	49.9	16.4	37.7	59.5
Niacin	303.4	116.0	227.4	215.6
Dyridoxin	19.7		13.4	6.2
Folic acid	4.4	5.0	10.5	-
Biotin	40.0	-	0.5	1.1
p-Amino benzoic acid	-	-	-	5.9

ที่มา: Rose and Harrison, 1970

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบองค์ประกอบทั้งหมดของวิตามิน ของ torula yeast, นมผง และ British Petrolum Concentration (B.P)

ชนิดของสสาร องค์ประกอบ	Torula yeast %	นมผง %	นมสด %	B.P protein concentrate %
โปรตีน	50.0	26.5	3.5	43.6
คาร์โบไฮเดรต	30	38.0	4.8	21.9
ไขมัน	2.0	28.0	3.8	18.5
เถ้า	7.0	6.5	0.9	4.4
ความชื้น	4.0	2.0	87.0	7.0
วิตามิน (ไมโครกรัม/ลิตร)				
Thiamine	150.0	3.4	0.44	3-16
Niacine	500.0	7.3	0.94	180-200
Biotin	1.0	0.3	0.031	-

ที่มา: เมทนี สุคนธรักษ์, 1970-1971

ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบองค์ประกอบทั้งหมดของวิตามิน ของ torula yeast, นมผง และ British Petrolum Concentration (B.P) (ต่อ)

ชนิดของสสาร องค์ประกอบ	Torula yeast %	นมผง %	นมสด %	B.P protein concentrate %
Choline	2500.0	862.0	121.0	-
Cobal amine	0.003	3.9	0.64	0.11
Riboflavin	50.0	15.5	1.75	75.0
Pantothenic acid	100.0	7.9	3.46	150-192
Pyridixine	35.0	3.9	0.64	23.0
Folic acid	30.0	0.018	0.0028	-

ที่มา: เมทนี สุคนธรักษ์, 1970-1971

2.9 การใช้ยีสต์เสริมในอาหารสัตว์

จากการทดลองที่ผ่านมามีหลายงานทดลองที่ใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* หรือสารที่สกัดจากผนังเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรไบโอติก พรีไบโอติกและแหล่งโปรตีนเซลล์เดียว Spring *et al.* (2000) ได้แสดงผลการทดลองการเสริมผลิตภัณฑ์จากผนังเซลล์ยีสต์สกุล *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารที่ความเข้มข้น 4,000 ppm โดยไก่กระทงอายุ 3 วัน จะได้รับเชื้อ *Salmonella typhimurium* 29E ปริมาณ 1×10^{4} cfu/ml พบว่าในวันที่ 3-10 ของการทดลองจำนวนเชื้อ *S. typhimurium* 29E ในไส้ติ่งของกลุ่มที่ได้รับการเสริมยีสต์ในอาหารต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม นอกจากนั้น Eric *et al.* (1997) ได้รายงานข้อมูลการเสริมยีสต์ 10 % ในอาหารไก่กระทงในช่วง 60 ชั่วโมงก่อนอดอาหารและขนส่งไปโรงเชือด โดยไก่กระทงจะได้รับเชื้อ *Salmonella* spp. ตั้งแต่แรกฟักจนถึง 6 สัปดาห์ เมื่อทำการวัดปริมาณ เชื้อ *Salmonella* spp. ภายหลังที่มีการขนส่งก็พบว่ากลุ่มที่ได้รับการเสริมยีสต์มีจำนวนของเชื้อลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับเสริม และการใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ในการป้องกันโรคท้องเสียในสุกรก่อนและหลังหย่านมก็สามารถใช้ได้ผลดี (ธิดาพร จึงสงวนพรสุข, 2541) จากข้อมูลของ Koraoglu and Durdag (2005) ที่ศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของเชื้อยีสต์แห้งสกุล *Saccharomyces cerevisiae* เป็นส่วนประกอบที่ 4×10^{8} cfu เสริมลงในอาหารของไก่กระทงที่ระดับ 1 กรัมต่อกิโลกรัม (0.1 %) และ 2 กรัมต่อกิโลกรัม (0.2 %) ผลการทดลองพบว่าไก่กระทงที่ได้รับการเสริมยีสต์ในอาหารที่มีสมรรถนะการเจริญเติบโตดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมยีสต์ในอาหาร และยังพบว่าที่ระดับ 0.2 % ในอาหารมีระดับการเจริญเติบโตดีกว่ากลุ่มอื่น ในรายงานของ Kemal *et al.* (2001) ก็ทำการศึกษาการเสริมยีสต์แห้งสกุล *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารของไก่กระทงที่ระดับ 0.2 % พบว่าไก่กระทงที่ได้รับการเสริมยีสตร์ในอาหารมีสมรรถนะการเจริญเติบโตดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมยีสต์ในอาหาร

ผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จะมีน้ำตาลแมนแนนโอลิโกแซคคาร์ไรด์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก การเสริมผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารมี

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ความสามารถคล้ายกับยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อการเจริญของจำนวนจุลินทรีย์ภายในลำไส้เล็ก โดยการทำงานของยีสต์จะไปจับตัวกับกลุ่มแมนโนสโปรตีนที่อยู่บริเวณผิวแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทำให้ยับยั้งการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียในลำไส้เล็กลดลงและจะไปรบกวนการจับตัวกับคาร์โบไฮเดรตบริเวณเนื้อเยื่อบุเซลล์บริเวณลำไส้ (Davis *et al.*, 2004a)

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ณรงค์ วงษ์พานิช (2532) ได้ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักสารละลายแป้งมันสำปะหลัง เพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนของ *Schwanniomyces castellii* CBS 2863 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ความเป็นกรดด่าง 4-5 อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 2.6-4.0% ปริมาณโปรตีนของยีสต์แห้งมีถึง 57% ต่อน้ำหนัก และจากการวิเคราะห์กรดอะมิโนแสดงให้เห็นว่า *Schwanniomyces castellii* CBS 2863 สามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับเลี้ยงสัตว์ได้ และเมื่อเพิ่มเวลาการหมักเป็น 96 ชั่วโมง พบปริมาณโปรตีนเพิ่มจาก 0.69% เป็น 1.64% ของน้ำหนักมันสำปะหลังแห้ง

มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี และคณะ (2556) ยังได้ทดลองการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) จากเปลือกสับปะรดด้วยการหมักร่วมกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เพื่อพัฒนาเป็นอาหารสัตว์ โดยใช้แผนการทดลองแบบ 4 x 3 factorial in CRD แบ่งเป็น 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัย A คือ ช่วงเวลาที่ใช้ในการหมัก 0, 15, 30 และ 45 วัน ปัจจัย B คือ ชนิดของเชื้อที่ใช้ในการหมักยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และเชื้อผสมระหว่างยีสต์ร่วมกับแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า มีอิทธิพลร่วมของทั้งสองปัจจัยต่อสภาพการหมักความเป็นกรดด่าง 3.88-4.16 อุณหภูมิ 28.62-29.78 องศาเซลเซียส และมีผลผลิต 11.22-16.94% เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าโภชนะของโปรตีนเซลล์เดียว จากเปลือกสับปะรด พบว่าการใช้เชื้อผสมระหว่างยีสต์ร่วมกับแบคทีเรียจะให้ค่าโปรตีนในผลิตภัณฑ์สูงกว่าเชื้อแบบเดี่ยว และระยะเวลาในการหมักที่ 30 วันจะให้ค่าโปรตีน 10.80 % แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) โดยค่าโปรตีนที่ได้นั้นจะมีความสามารถในการย่อยได้ด้วยเอมไซม์เปปซินเท่ากับ 61.99 % และยังศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเศษเหลือกากกะทิ ผลการทดลองพบว่าอิทธิพลร่วมของทั้ง 2 ปัจจัยมีผลต่อสภาพของการหมักคือ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.00-4.53 และมีผลผลิต 29.21-33.80% แต่อิทธิพลร่วมของทั้ง 2 ปัจจัยไม่มีผลต่ออุณหภูมิของการหมัก เมื่อทาการวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบทางโภชนะของโปรตีนเซลล์เดียวจากกากกะทิ พบว่ากากกะทิที่หมักร่วมกับยีสต์ร่วมกับแบคทีเรียจะมีค่าโปรตีนในผลิตภัณฑ์โปรตีนเซลล์เดียวจากเศษเหลือกากกะทิสูงกว่าการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์เดี่ยวทั้งสองชนิด และระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมที่สุดคือ 45 วัน โดยจะให้ค่าโปรตีนในผลิตภัณฑ์โปรตีนเซลล์เดียวจากเศษเหลือกากกะทิเท่ากับ 14.77% และค่าการย่อยได้ของโปรตีนด้วยเอนไซม์เปปซินเท่ากับ 66.60% (มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี และคณะ, 2556)

นอกจากนี้จรูญ พุทธจรรยา (2544) ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากมันสำปะหลัง เป็นการเพิ่มปริมาณโปรตีนในมันสำปะหลังก่อนที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์เลี้ยง โดยในขั้นตอนแรกจะทำ การหมักมันสำปะหลัง ด้วยเชื้อรา *Aspergillus* sp. เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาล พบว่าสามารถเพิ่มน้ำตาลได้เป็น 10.2 องศาบริกซ์ แล้วนำมาหมักขั้นตอนที่ 2 โดยใช้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomycopsis fibuligera* และ *Candida utilis* เพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีน พบว่าจะได้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 16.61 16.89 และ 18.38% ตามลำดับ หลัง จากนั้นนำมันสำปะหลังที่ได้ไปทำผลิตภัณฑ์อาหารมนุษย์และอัดเม็ดนำไปผสมกับสูตรอาหารเลี้ยงสัตว์ พบว่าสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตแก่เกษตรกร ตลอดจนเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่มันสำปะหลังได้ ซึ่ง เทคโนโลยีการหมักที่ใช้เป็นเทคโนโลยีที่ประยุกต์อย่างง่ายสะดวก ใช้ต้นทุนต่ำ และเป็นที่ยอมรับของเกษตรกรมากกว่า 75%

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

3.1.1 อุปกรณ์

- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) รุ่น WL บริษัท Bosstech ประเทศไทย
- หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy ประเทศญี่ปุ่น
- ตู้อบความร้อน (Hot air oven) รุ่น 600 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น PEP-20 FiveEasy Plus บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- เครื่องชั่งละเอียด (Electric balance) รุ่น AB204-S บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- ไมโครเวฟของบริษัท ชาร์พ แอพพลายแอนซ์ (ประเทศไทย) จำกัด ประเทศไทย
- กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope) รุ่น CH30 บริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
- ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) รุ่น Innova 4340 บริษัท New Brunswick scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge) รุ่น MPW-380R บริษัท MPW Med. Instruments ประเทศโปแลนด์
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BD 115 (Binder) บริษัท เมริทเทค จำกัด
- เครื่องวัดความเข้มข้นของแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 บริษัท Miltion Roy ประเทศสหรัฐอเมริกา
- จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
- บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50 100 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 250 และ 1,000 มิลลิลิตร
- หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 16×150 เซนติเมตร
- ขวดรูปชมพู (Erlenmeyerflask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
- ปิเปต (Pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น A30-0200 pipette BIU ขนาด 20-200 ไมโครลิตร บริษัท เมริทเทค จำกัด ประเทศไทย
- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น A30-1000 pipette BIU ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร บริษัท เมริทเทค จำกัด ประเทศไทย
- เครื่องปั่นผสม (vortex mixture) ยี่ห้อ WiseMix® รุ่น VM-10
- เครื่องเขย่าด้วยความถี่สูง (ultrasonic sonicator) รุ่น power sonic 405 บริษัท Hwashin Technology ประเทศเกาหลี
- หลอดย่อยโปรตีน (Kjeldahl tube) บริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
วิทยานิพนธ์ งานวิจัย

- ชุดกลั่นโปรตีน (semi-micordistillation apparatus) รุ่น B-316 บริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- บิวเร็ต ขนาด 25 มิลลิลิตร บริษัท Witeg ประเทศเยอรมัน
- แผ่นสไลด์ (Slide)
- แผ่นปิดสไลด์ (Cover slip)
- กล้องถ่ายรูปแคนนอน บริษัท แคนนอน อิงค์ ประเทศญี่ปุ่น
- ห่วงเขี่ยเชื้อ (Inoculating Loop)
- ปากคีบ (Forcep) บริษัท MIRA ประเทศเยอรมัน
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- แท่งแก้วคนสาร
- แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader glass)

3.1.2 เคมีภัณฑ์

- กลูโคส (Glucose) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt ประเทศเยอรมัน
- แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) บริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
- สารสกัดจากข้าวมอลต์ (Malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
- แบคโตอะการ์ (Bacto agar) บริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
- โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) E.Merk, Dramstadt ประเทศเยอรมัน
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt ประเทศเยอรมัน
- เอทานอล (ethanol) บริษัท ไทยรุ่งเรืองพลังงานจำกัด ประเทศไทย
- แอมพิซิลลิน (Ampicillin)
- สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)
- Triton X-100 บริษัท Amresco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) บริษัท Amresco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Biorad protein assay kit บริษัท Biorad ประเทศสหรัฐอเมริกา
- กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) บริษัท Quality Reagent Chemical Product ประเทศนิวซีแลนด์
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- กรดบอริก (Boric acid) บริษัท Quality Reagent Chemical Product ประเทศนิวซีแลนด์
- โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) บริษัท Quality Reagent Chemical Product ประเทศนิวซีแลนด์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY
249605

- คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) บริษัท Quality Reagent Chemical Product ประเทศนิวซีแลนด์
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Quality Reagent Chemical Product ประเทศนิวซีแลนด์
- แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) บริษัท Quality Reagent Chemical Product ประเทศนิวซีแลนด์
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Quality Reagent Chemical Product ประเทศนิวซีแลนด์
- เมธิลเรด (Methyl Red) บริษัท Quality Reagent Chemical Product ประเทศนิวซีแลนด์
- เมทธิลีนบลู (Methylene Blue) บริษัท Quality Reagent Chemical Product ประเทศนิวซีแลนด์
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Quality Reagent Chemical Product ประเทศนิวซีแลนด์
- ชุดทดสอบ API 20C AUX ยี่ห้อ bioMerieux ประเทศฝรั่งเศส
- น้ำตาลทรายแดง
- ปุ๋ยยูเรีย
- กากน้ำตาล
- เกลือ
- น้ำกลั่น (Distilled water)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.2.1 การคัดแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างกากมันสำปะหลัง

เก็บตัวอย่างกากมันสำปะหลังจากบริษัทผลิตแป้งมันเพื่อนำมาคัดแยกยีสต์ โดยนำตัวอย่างกากมันสำปะหลังมาชั่งในปริมาตร 10±1 กรัม เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGYP ที่ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) กลูโคส 10 กรัม, แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) 5 กรัม, สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 5 กรัม, สารสกัดจากข้าวมอลต์ (Malt extract) 3 กรัม, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.5 กรัม (Sankh *et al.,* 2013) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและสเตรปโตมัยซินที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่ากัน (Thabet *et al.,* 2012; Kurtzmon *et al.,* 2011) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาเจือจางลำดับส่วนด้วยน้ำกลั่นและ สเปรดเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGYP บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.2.2 การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีการผลิตโปรตีนสะสมในเซลล์

นำเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGYP อายุ 72 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGYP ที่ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) กลูโคส 10 กรัม, แบค

โตเปปโตน (Bactopeptone) 5 กรัม, สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 5 กรัม, สารสกัดจากข้าวมอลต์ (Malt extract) 3 กรัม, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.5 กรัม (Sankh *et al.*, 2013) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที (Gao *et al.*, 2014) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และติดตามประสิทธิภาพการผลิตโปรตีน

1) การวัดการเจริญของเชื้อโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge) ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ จากนั้นนำเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส แล้วนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

2) การวัดปริมาณโปรตีนสะสมในเซลล์ยีสต์

นำน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ออกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ ละลายเซลล์ใน lysis buffer ที่ประกอบด้วย Triton X-100 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อลิตร และ EDTA 0.372 กรัมต่อลิตร ผสมด้วย vortex mixture เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องเขย่าด้วยความถี่สูง (ultrasonic sonicator) ปั่นแยกเซลล์โดยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge) ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และวัดปริมาณโปรตีนด้วย Biorad protein assay kit (Yadav *et al.*, 2014)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.2.3 การผลิตโปรตีนด้วยยีสต์จากกากมันสำปะหลังสด

นำเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGYP อายุ 72 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรโดยปริมาตร) ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) น้ำตาลทรายแดง 1 กรัม, ปุ๋ยยูเรีย 2 กรัม, กากน้ำตาล 80 กรัม และเกลือ 1 กรัม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมกากมันสำปะหลังสด 100 กรัม และหมักต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจดาล (Kjeldahl Method) (ภาคผนวก ข) โดยทำการเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐานที่นำเข้าจากต่างประเทศที่เกษตรกรใช้จริงในการผลิตอาหารสัตว์ โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเดียวกัน

3.2.4 การจำแนกสกุลของยีสต์ที่สามารถผลิตโปรตีนได้จากกากมันสำปะหลังสด

นำเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตโปรตีนจากกากมันสำปะหลังสดได้สูงที่สุดจากข้อ 3.2.3 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทำการบ่งชี้ชนิดของยีสต์ในระดับสปีชีส์โดยการศึกษาลำดับเบสบริเวณ rDNA ในส่วนของ D1/D2 domain ที่อยู่บริเวณปลาย 5´ ของยีน 26S rRNA แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI)

3.2.5 การหาอิทธิพลของปัจจัยจากแบบจำลองที่เหมาะสมต่อการสะสมโปรตีนในเซลล์ยีสต์

ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.H_2O$) 0.5 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.1 กรัม, แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.1 กรัม, สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 0.1 กรัม และทำการแปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน คือ กลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ตามลำดับ ด้วยการออกแบบการทดลองแบบบ๊อกซ์-เบห์นเคน ที่มี 3 ปัจจัย ได้แก่ ระยะเวลา (X_1) ปริมาณคาร์บอน (X_2) และปริมาณไนโตรเจน (X_3) ซึ่งระดับปัจจัยที่ใช้ในการทดลองมี 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (1) ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 5 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม Design Expert เวอร์ชั่น 7.0.0 (Stat-Ease, Inc., MN, USA) ดังนั้นจึงมีหน่วยการทดลองทั้งหมด 17 หน่วย การออกแบบการทดลองใช้ทำนายค่าตอบสนองเป็นสมการพหุนามกำลังสอง (quadratic polynomial) ซึ่งเป็นความสัมพันธ์การถดถอยเชิงเส้น (Quadratic regression relationship) ดังนี้

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} \beta_{ij} X_i X_j$$

โดย *Y* เป็นค่าตอบสนอง, β_0 เป็น ค่าคงที่หรือจุดตัดหรือ Grand mean, β_i, β_j เป็นผลเชิงเส้น (linear effect) ของ X_i และ X_j และ β_{ij} เป็นสัมประสิทธิ์ของตัวแปรอิสระหรือผลเชิงเส้นโค้งของ X_i และ X_j ทั้งนี้ บางเทอมอาจถูกตัดออกไประหว่างการวิเคราะห์เพื่อให้ได้แบบจำลองที่มีนัยสำคัญได้ค่า lack of fit ที่ไม่มีนัยสำคัญ หรือมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ที่มีค่าสูง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 3.1 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

ปัจจัย	ระดับ		
	-1	0	1
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	16	32	48
ปริมาณคาร์บอน (กรัมต่อลิตร)	20	50	80
ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	5	15	25

3.2.6 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม Design Expert เวอร์ชั่น 7.0.0 (Stat-Ease, Inc., MN, USA) เพื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R-Square) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ตลอดจนสร้างสมการทำนายปริมาณโปรตีนสะสมในเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงได้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างกากมันสำปะหลัง

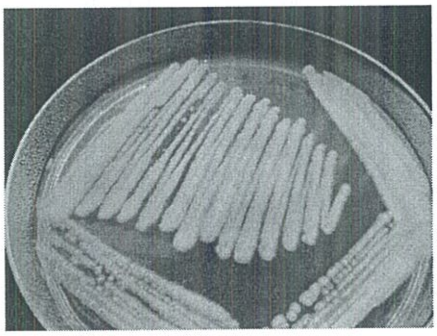
เก็บตัวอย่างกากมันสำปะหลังจากบริษัทผลิตแป้งมันเพื่อนำมาคัดแยกยีสต์ โดยนำตัวอย่างกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบ่มและการเจือจางลำดับส่วนมาสเปรดเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGYP บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 115 ไอโซเลท จากนั้นนำไอโซเลทที่ได้ทั้งไปทดสอบการสะสมโปรตีนในเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน

4.2 ผลการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีการผลิตโปรตีนสะสมในเซลล์

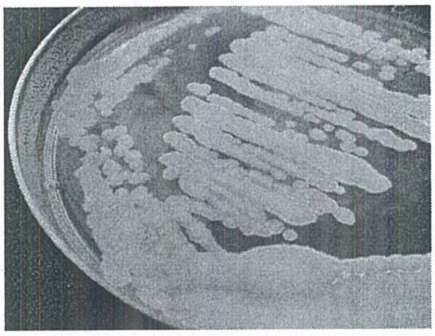
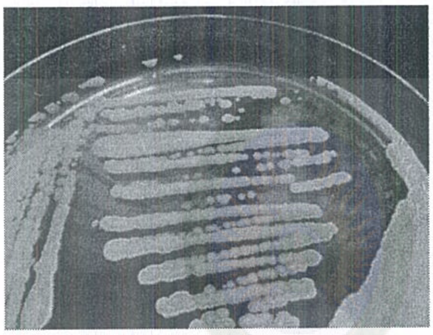
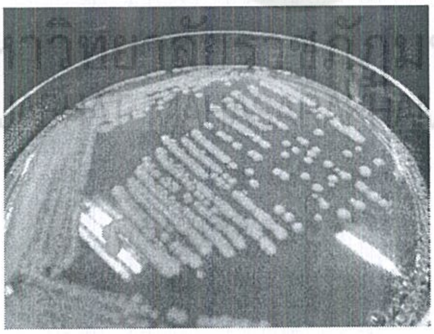
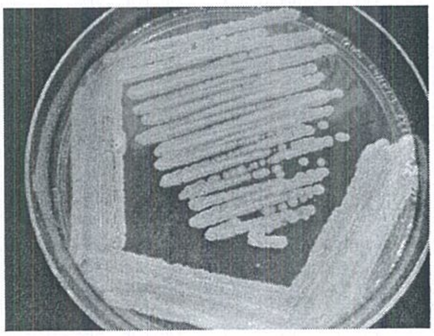
นำเชื้อยีสต์ 115 ไอโซเลท ที่แยกได้เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรมาตรฐาน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อ 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ออกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge) ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ นำเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส แล้วนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และวัดปริมาณโปรตีนสะสมในเซลล์ด้วยชุดทดสอบ Biorad protein assay kit ผลการทดลองพบว่ามี 5 ไอโซเลท ที่พบการสะสมโปรตีนในเซลล์ โดยไอโซเลท BA7_1 มีการสะสมโปรตีนในเซลล์สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรมาตรฐาน คือมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 3.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.1

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะโคโลนีและปริมาณโปรตีนสะสมในเซลล์ของยีสที่คัดแยกได้

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)
BA2_1		3.37±0.50

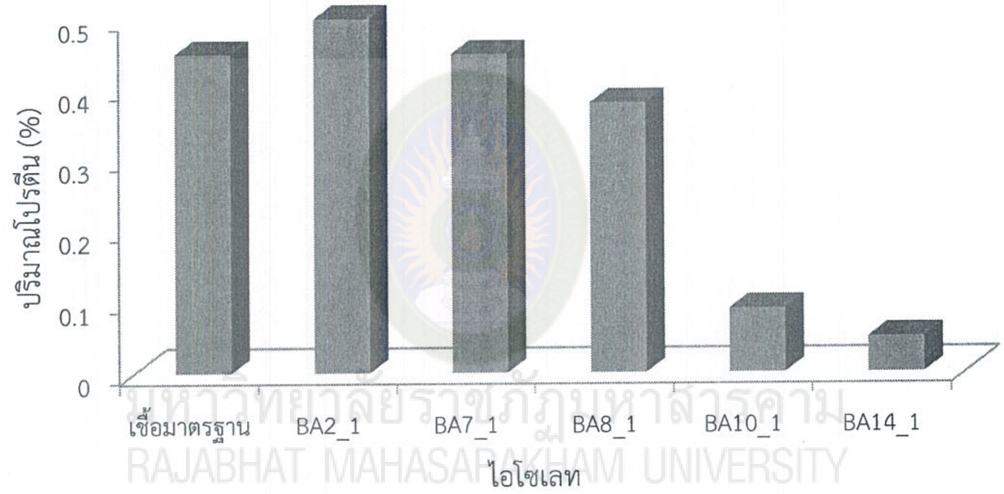
ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะโคโลนีและปริมาณโปรตีนสะสมในเซลล์ของยีสที่คัดแยกได้ (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)
BA7_1		3.78±0.50
BA8_1		2.74±0.30
BA10_1		2.62±0.38
BA14_1		2.98±0.36

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

4.3 ผลการผลิตโปรตีนด้วยยีสต์จากกากมันสำปะหลังสด

นำเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGYP อายุ 72 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรโดยปริมาตร) ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) น้ำตาลทรายแดง 1 กรัม, ปุ๋ยยูเรีย 2 กรัม, กากน้ำตาล 80 กรัม และเกลือ 1 กรัม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมกากมันสำปะหลังสด 100 กรัม และหมักต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน และวัดปริมาณโปรตีน เพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐานผลการทดลองพบว่าไอโซเลท BA2_1 มีการสะสมโปรตีนในเซลล์สูงที่สุดจากทั้งหมด 5 ไอโซเลท เท่ากับ 0.50% และมีปริมาณใกล้เคียงกับโปรตีนที่ผลิตได้จากเชื้อมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 4.1

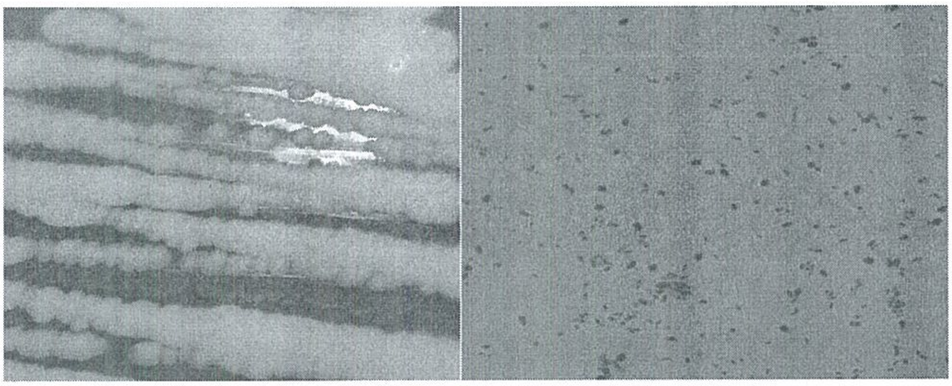


มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณโปรตีนที่สะสมในเซลล์ของแต่ละไอโซเลทเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน

4.4 ผลการจำแนกสกุลของยีสต์ที่สามารถผลิตโปรตีนได้จากกากมันสำปะหลังสด

นำเชื้อยีสต์ไอโซเลท BA2_1 ที่มีความสามารถในการผลิตโปรตีนจากกากมันสำปะหลังสดได้สูงที่สุดมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทำการบ่งชี้ชนิดของยีสต์ในระดับสปีชีส์โดยการศึกษาลำดับเบสบริเวณ rDNA ในส่วนของ D1/D2 domain ที่อยู่บริเวณปลาย 5´ ของยีน 26S rRNA แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ผลการทดลองพบว่าไอโซเลท BA2_1 มีลักษณะโคโลนีสีขาวด้าน กลมนูน (รูปที่ 4.2ก) เซลล์มีลักษณะกลมรี (รูปที่ 4.2ข) เมื่อจำแนกไอโซเลท BA2_1 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 4.3) พบว่ามีความเหมือนกับยีสต์สายพันธุ์ *Pichia kudriavzevii* 100%



(ก) (ข)

รูปที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท BA2_1 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MGYP (ข) ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTG
CTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCAAGTCCCTT
GGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAGTGAGGCCCTTC
TGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAAT
ACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAG
AGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGCGCCCGACATGGGGATTGCGCA
CCGCTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGCTTTCCCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGA
GAAGGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGG
ACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGATGCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCGTCTT

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของไอโซเลท BA2_1

4.5 การหาอิทธิพลของปัจจัยจากแบบจำลองที่เหมาะสมต่อการสะสมโปรตีนในเซลล์ยีสต์

จากทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่คัดแยกได้ด้วยการออกแบบการทดลองแบบบ๊อกซ์-เบห์นเคน ที่มี 3 ปัจจัย ได้แก่ ระยะเวลา (X_1) ปริมาณคาร์บอน (X_2) และปริมาณไนโตรเจน (X_3) ซึ่งระดับปัจจัยที่ใช้ในการทดลองมี 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (1) ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 5 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม Design Expert เวอร์ชั่น 7.0.0 (Stat-Ease, Inc., MN, USA) ดังนั้นจึงมีหน่วยการทดลองทั้งหมด 17 หน่วย ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนสะสมในเซลล์ยีสต์ (Y) ของแต่ละหน่วยการทดลอง (Run)

Run	X_1	X_2	X_3	Y (g)
1	0	-1	1	0.222
2	1	1	0	0.361
3	-1	-1	0	0.185

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนสะสมในเซลล์ยีสต์ (*Y*) ของแต่ละหน่วยการทดลอง (Run) (ต่อ)

Run	X_1	X_2	X_3	Y (g)
4	-1	0	-1	0.319
5	0	-1	-1	0.198
6	0	0	0	0.215
7	-1	1	0	0.197
8	0	0	0	0.248
9	1	0	1	0.311
10	0	1	-1	0.245
11	1	0	-1	0.196
12	0	0	0	0.272
13	-1	0	1	0.218
14	1	-1	0	0.242
15	0	1	1	0.377
16	0	0	0	0.214
17	0	0	0	0.228

4.6 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อสร้างแบบจำลอง โดยการพิจารณาในการเลือกสมการทางคณิตศาสตร์ เพื่อใช้หาจุดเหมาะสมของการผลิตโปรตีนสะสมในเซลล์โดย *Pichia kudriavzevii* BA2_1 ซึ่งในการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อให้ได้ผลการทดลองและข้อสรุปจากการทดลองโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way analysis of variance; ANOVA) ในส่วนการดำเนินการทดลองแบบบ๊อกซ์-เบห์นเคนได้นำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยอาศัยโปรแกรม Design Expert v.7.0.0 (Stat-Ease, Inc., MN, USA) ได้สมการที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนดังสมการที่ 1

$$Y = 0.26264 - (3.55454 \times 10^{-3})X_1 + (1.38692 \times 10^{-3})X_2 - (8.68929 \times 10^{-3})X_3 + (3.37591 \times 10^{-4})X_1X_3 \qquad \text{สมการที่ 2}$$

ซึ่งจากสมการที่ 2 นี้ มี *Y* เป็นปริมาณโปรตีนสะสมในเซลล์ยีสต์ ส่วน X_1 ,X_2 และ X_3 เป็นปัจจัยต่อการทดลอง ได้แก่ ระยะเวลา ปริมาณคาร์บอน และปริมาณไนโตรเจน

ค่าความมีนัยสำคัญของการถดถอยของสมการ (Regression) โดยการทดสอบเพื่อที่จะตรวจสอบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรผลตอบ (ในที่นี้คือปริมาณโปรตีน) กับเซตย่อยของตัวแปรถดถอยระยะเวลา ปริมาณคาร์บอน และปริมาณไนโตรเจน หรือไม่ก็สามารถทำได้โดยกำหนดสมมุติฐาน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

$H_0 : \beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = 0$

$H_1 : \beta$ for at least one i

กำหนดให้ค่า $\alpha = 0.05$

ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนถ้ายอมรับสมมติฐานหลัก (p-value > α) และสรุปว่าฟังก์ชั่นการถดถอยไม่เป็นเชิงเส้นดังนั้นสมการทางคณิตศาสตร์ที่กำลังพิจารณาอยู่ก็ไม่ควรจะถูกนำมาพิจารณาอีกต่อไปและหากมีการปฏิเสธสมมติฐานหลัก (p-value < α) จะบอกให้ทราบว่าอย่างน้อยที่สุดตัวแปรถดถอยระยะเวลา ปริมาณคาร์บอน และปริมาณไนโตรเจน หนึ่งตัวจะมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อแบบจำลองของสมการทางคณิตศาสตร์

ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เป็นตัววัดของจำนวนที่ลดลงในความผันแปรของค่าตอบสนองการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อใช้ตัวถดถอยต่อระยะเวลา ปริมาณคาร์บอน และปริมาณไนโตรเจน อย่างไรก็ตามการที่ค่า R^2 มีค่ามากไม่ได้แปลว่าแบบจำลองการถดถอยที่สร้างขึ้นมานี้ดีเนื่องจากว่าการเติม ตัวแปรเข้าไปในสมการจะทำให้ค่า R^2 เพิ่มขึ้นไม่ว่าตัวแปรนั้นจะมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าสมการที่มีค่า R^2 มากอาจจะเป็นสมการทางคณิตศาสตร์ที่ไม่ดีในการพยากรณ์ค่าตอบสนองก็ได้

ค่า Lack-of-Fit เป็นตัวบอกความเพียงพอของตัวแปรในสมการในการวิเคราะห์ความแปรปรวนจะสรุปว่าฟังก์ชั่นการถดถอยไม่เป็นเชิงเส้นถ้าค่า p-value < α รูปแบบของสมการถดถอยที่จะนำมาพิจารณานี้มีอยู่ด้วยกัน 4 รูปแบบด้วยกัน ได้แก่

1. รูปแบบสมการลีเนีย (Linear)
2. รูปแบบสมการลีเนีย + อินเตอร์แอคชั่น (Linear + Interaction)
3. รูปแบบสมการฟูลควอตดราติก (Full Quadratic)
4. รูปแบบสมการคิวบิก

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

รายละเอียดในการวิเคราะห์ของสมการถดถอยในแต่ละรูปแบบนั้นแสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองที่มีรูปแบบสมการสมการถดถอย โดยจากการทดสอบโดยสรุปว่าสมการลีเนีย + อินเตอร์แอคชั่น เหมาะสมในการวิเคราะห์ค่าของโมเดลการผลิตโปรตีนสะสมในเซลล์ของยีสต์ เพราะมีค่าความแปรปรวน "Prob > *F*" ซึ่ง <0.05 (ตารางที่ 4.3) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.95 % ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.7194 จึงเป็นสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่น่าพอใจ

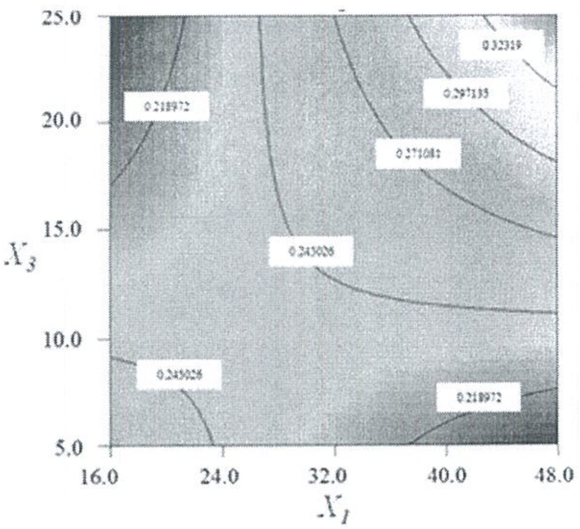
ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลอง (ANOVA analysis)

Source	Mean square	F-value	Prob > F
Model	8.440×10^{-3}	4.78	0.0154
X_1	4.665×10^{-3}	2.64	0.1300
X_2	0.014	7.84	0.0160
X_3	3.574×10^{-3}	2.02	0.1803
X_1X_3	0.012	6.61	0.0245

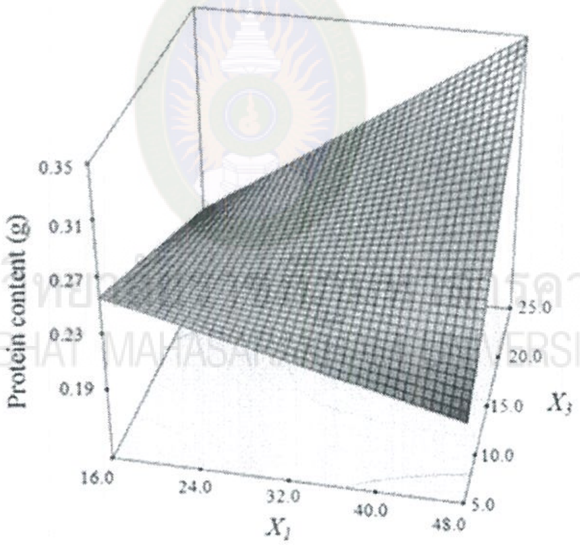
การดำเนินการทดลองโดยใช้เทคนิควิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM) โดยการออกแบบการทดลองแบบบ๊อกซ์-เบห์นเคน ที่มี 3 ปัจจัย ได้แก่ ระยะเวลา (X_1) ปริมาณคาร์บอน (X_2) และปริมาณไนโตรเจน (X_3) ซึ่งระดับปัจจัยที่ใช้ในการทดลองมี 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (1) และมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 5 ครั้ง เพื่อวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองระหว่างตัวแปรกับค่าตอบสนองและหาระดับที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัยซึ่งจะทำให้มีจำนวนครั้งของการทดลอง (Runs) ทั้งหมดเท่ากับ 17 ครั้ง ซึ่งกำหนดให้ค่าความคลาดเคลื่อนในการผลิตต่ำที่สุด โดยมี 2 ปัจจัยคือ ระยะเวลาและปริมาณไนโตรเจนที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนดังแสดงในรูปที่ 4.4

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 สภาวะต่างๆ โดยการออกแบบบ๊อกซ์-เบห์นเคน แล้วทำการทดลองจำนวน 17 การทดลองโดยสมการทางคณิตศาสตร์ในการทำนายปริมาณโปรตีนโดยผ่านการทำประเมินค่า collinearity โดยวิธีการ stepwise เพื่อลดค่าพารามิเตอร์ที่มีผลน้อย พบว่าสมการทางคณิตศาสตร์อธิบายปริมาณโปรตีนดังสมการที่ 1 ปริมาณโปรตีนขึ้นอยู่กับปริมาณคาร์บอน และความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับปริมาณไนโตรเจน คือที่สภาวะปริมาณไนโตรเจนต่ำจะพบปริมาณโปรตีนลดลงเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น และที่สภาวะปริมาณไนโตรเจนสูงกลับพบปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเช่นกัน เมื่อพิจารณาตามสมการของปริมาณโปรตีนแล้วพบว่ามีค่าสูงที่สุดที่ได้ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อ 47.47 ชั่วโมง และอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยปริมาณไนโตรเจน 72.97 กรัมต่อลิตร และปริมาณคาร์บอน 24.47 กรัมต่อลิตร จะสามารถผลิตโปรตีนได้สูงถึง 3.77 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร และมีโปรตีนสะสมในเซลล์ยีสต์เท่ากับ 66.8 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 100 กรัม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.4 ผลตอบสนองพื้นผิวของปริมาณโปรตีนของการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาและปริมาณไนโตรเจน (ก) Contour plot และ (ข) 3D surface plot

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้รายงานผลการศึกษาการคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างกากมันสำปะหลังโรงงานผลิตแป้งมัน ที่มีความสามารถในการหมักกากมันสำปะหลังและเพิ่มโภชนะโปรตีนในกากมันหมักยีสต์ได้

ผลการศึกษาพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อยีสต์ได้ 115 ไอโซเลท และมีเพียง 5 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตโปรตีนสะสมในเซลล์ได้เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน และเมื่อทดสอบการเจริญบนกากมันสำปะหลังสด โดยใช้อาหารปรับปรุงสูตรกากมันหมักยีสต์ พบว่าไอโซเลท BA2_1 สามารถผลิตโปรตีนได้สูงที่สุดและใกล้เคียงกับเชื้อมาตรฐานที่เกษตรกรใช้ในการผลิตกากมันหมักยีสต์ใช้ในปัจจุบัน จากนั้นศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทำการบ่งชี้ชนิดของยีสต์ในระดับสปีชีส์โดยการศึกษาลำดับเบสบริเวณ rDNA ในส่วนของ D1/D2 domain พบว่าไอโซเลท BA2_1 มีลักษณะโคโลนีสีขาวด้าน กลมนูน เซลล์มีลักษณะกลมรี มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับยีสต์สายพันธุ์ *Pichia kudriavzevii* 100% และทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่คัดแยกได้ด้วยการออกแบบการทดลองแบบบ๊อกซ์-เบห์นเคน ที่มี 3 ปัจจัย ได้แก่ ระยะเวลา (X_1) ปริมาณคาร์บอน (X_2) และปริมาณไนโตรเจน (X_3) ครั้ง เพื่อวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองระหว่างตัวแปรกับค่าตอบสนองและหาระดับที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัยซึ่งจะทำให้มีจำนวนครั้งของการทดลอง (Runs) ทั้งหมดเท่ากับ 17 ครั้ง ซึ่งกำหนดให้ค่าความคลาดเคลื่อนในการผลิตต่ำที่สุด พบว่ามี 2 ปัจจัยคือ ระยะเวลาและปริมาณไนโตรเจนที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนสะสมในเซลล์

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 สภาวะต่างๆ โดยการออกแบบบ๊อกซ์-เบห์นเคน พบว่าสมการทางคณิตศาสตร์อธิบายปริมาณโปรตีนได้ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณคาร์บอน และความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับปริมาณไนโตรเจน คือที่สภาวะปริมาณไนโตรเจนต่ำจะพบปริมาณโปรตีนลดลงเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น และที่สภาวะปริมาณไนโตรเจนสูงกลับพบปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเช่นกัน เมื่อพิจารณาตามสมการของปริมาณโปรตีนแล้วพบว่ามีค่าสูงที่สุดที่ได้ 0.3768 กรัม ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อ 47.47 ชั่วโมง และอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยปริมาณไนโตรเจน 72.97 กรัมต่อลิตร และปริมาณคาร์บอน 24.47 กรัมต่อลิตร

5.2 อภิปรายผล

จากผลการทดลองในการศึกษาการคัดแยกยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักกากมันสำปะหลังและเพิ่มโภชนะโปรตีนในกากมันหมักยีสต์ได้ โดยวัดได้จากค่าโปรตีนสะสมในเซลล์ของยีสต์ โดยพบว่ายีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 ที่คัดแยกได้นั้นมีความสามารถในการใช้กากมันสำปะหลังสดเป็นแหล่งอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและสะสมโปรตีนซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของจรูญ พุทธจรรยา (2544) ที่ทำการทดลองเพาะเลี้ยงยีสต์ที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ 3 สายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Candida utilis* โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหาร ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนในกากมันสำปะหลังได้ นอกจากนี้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ณรงค์ วงษ์พานิช (2532) ได้ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักสารละลายแป้งมันสำปะหลัง เพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนของยีสต์ *Schwanniomyces castellii* CBS 2863 พบว่าเมื่อนำไปหมักร่วมกับมันสำปะหลังโดยใช้เวลา 96 ชั่วโมง สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนจาก 0.69% เป็น 1.64% ของน้ำหนักมันสำปะหลังแห้งได้

นอกจากนี้ จากผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่เกี่ยวของกับการเจริญเติบโตของยีสต์ได้แก่ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ที่จะส่งผลให้ยีสต์เจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณเซลล์ได้จำนวนมาก สามารถนำมาผลิตหัวเชื้อสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมการเกษตรได้ และยีสต์หัวเชื้อดังกล่าวยังสามารถเจริญเติบโตได้ดีและสะสมโปรตีนในเซลล์ได้สูงเมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหาร ดังนั้นจึงสามารถใช้ยีสต์ที่คัดแยกได้เป็นโปรไบโอติกในการเพิ่มปริมาณโปรตีนในอาหารสัตว์ โดยเพิ่มปริมาณยีสต์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ ลดการนำเข้ายีสต์จากต่างประเทศ และใช้หมักกากมันสำปะหลังสดใช้เป็นอาหารสัตว์ เพื่อลดต้นทุนการผลิตอาหารสัตว์มันหมักยีสต์ ช่วยให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์สามารถผลิตใช้ได้เองในฟาร์มและลดปัญหาวิกฤตอาหารสัตว์ราคาแพงได้ในอนาคต

5.3 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

5.3.1 ศึกษาในระดับขยายส่วนเพื่อทดลองการเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตอาหารสัตว์เสริมโปรตีน

5.3.2 ศึกษาในระดับขยายส่วนเพื่อผลิตกากมันหมักยีสต์ในอุตสาหกรรมการเกษตร

5.3.3 ศึกษาค่าการย่อยโปรตีนได้ด้วยเอนไซม์เปปซิน

5.3.4 ศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนที่ผลิตได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บรรณานุกรม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บรรณานุกรม

กฤตพล สมมาตย์ และคณิน บรรณกิจ. (2547). **การใช้มันสำปะหลังและผลพลอยได้จากโรงงานแป้งมันสำปะหลังเป็นอาหารโคเนื้อ**. การประชุมวิชาการเกษตรแห่งชาติ ปี 2547 สาขาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

คะนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์. (2540). **การศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพและศักยภาพการผลิตและความต้องการ Probiotic ของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์**. กองควบคุมอาหารสัตว์. กรมปศุสัตว์.

จรูญ พุทธจรรยา. (2544). **แนวทางการพัฒนาการเพิ่มปริมาณโปรตีนเซลล์เดียวจากมันสำ ปะหลังเกษตรกรเพื่อเป็นอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์**. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร, 340-346.

ณรงค์ วงษ์พานิช. (2532). **การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากมันสำปะหลังโดยการหมักด้วยยีสต์**. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ดวงพร คันธโชติ. (2530). **จุลชีวอุตสาหกรรม: ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร.

ทะนงศักดิ์ จำปาวดี, อรวรรณ ชินราศรี, อาณัติ จันทร์ถิระติกุล, สุวรรณี แสนทวีสุข, และทัศน์วรรณ สมจันทร์. (2550). **การผลิตยีสต์จากมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรไบโอติกและโปรตีนเซลล์เดียวในอาหารสัตว์**. หน่วยวิจัยทางทรัพยากรอาหารสัตว์และโภชนศาสตร์สัตว์ โครงการจัดตั้งคณะสัตวแพทย์และสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ทะนงศักดิ์ จำปาวดี. (2545). **โภชนศาสตร์สัตว์ประยุกต์**. ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ธิดาพร จึงสงวนพรสุข. (2541). **การศึกษาเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ในการป้องกันโรคท้องเสียในสุกรก่อนและหลังหย่านม**. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการสอนเคมี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ธีระพล แสนคำราง, สายันต์ ปินะกาพัง, และอรรถชน กองสุข. (2545). **การเสริมวัตถุดิบอาหารสัตว์ในท้องถิ่นต่อสมรรถนะการผลิตและระดับแร่ธาตุในซีรั่มขอโคเนื้อสาวลูกผสมบราห์มันภายใต้สภาวะการเลี้ยงของอำเภอห้วยเม็ก จังหวัดกาฬสินธุ์**. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขวิชาเทคโนโลยีการผลิตวัตว์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

บวรศักดิ์ ลีนานนท์. (2536). **จุลชีววิทยาของอาหาร**. ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

พนิดา สมบัติยานุชิต. (2537). **การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานทำเส้นก๋วยเตี๋ยวโดยเชื้อราและยีสต์**. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาสารคาม.

มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี, พรพรรณ แสนภูมิ, วรางคณา กิจพิพิธ และกฤติยา เลิศชุณหะเกียรติ. (2556). **การศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเปลือกสับปะรดโดยใช้ยีสต์และบาซิลัสซับติลิสเพื่อพัฒนาเป็นอาหารสัตว์**. วารสารแก่นเกษตร ปีที่ 41 ฉบับพิเศษ, 80-86.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี, วรางคณา กิจพิพิธ, อณัญญา ปานทอง และกฤติยา เลิศชุณหะเกียรติ. (2556). **การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเศษเหลือกากกะทิโดยใช้ยีสต์และบาซิลัสซับติลิส เพื่อพัฒนาเป็นอาหารสัตว์**. วารสารวิชาการและวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล พระนคร ฉบับพิเศษ, 72-78.

เมทนี สุคนธรักษ์. (1970-1971). **โปรตีนจากจุลินทรีย์**. วิทยาศาสตร์การอาหาร, 3, 15-24.

รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ, เรวัต เลิศฤทัยโยธิน, ชูศักดิ์ จอมพุก, และจุฑามาศ ร่มแก้ว. (2541). **พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. (2539). **จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร.

วิศิษฐิพร สุขสมบัติ. (2532). **ยีสต์มีชีวิตในอาหารโคนม**. วารสารโคนมปีที่ 9 ฉบับที่ 4 เดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม 2532. หน้า 22-24.

ศิริลักษณ์ สร้อยจุฑา. (2554). **ผลของการเสริมเปลือกมันสำปะหลังที่เพิ่มคุณค่าทางโภชนะโดยใช้จุลินทรีย์จากกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้องต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตและคุณภาพซากของไก่กระทง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

สาโรช ค้าเจริญ. (2542). **อาหารและการให้อาหารสัตว์เลี้ยง**. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Bhaltacharjee, J.K. (1970). **Microorganisms as potential source of food**. *Adv. Appl. Microbiol.*, 13, 134-159.

Cooney, C.L., Levine, D.W. & Snedecor, B. (1975). **Production of single cell protein from methanol**. *Food Technol.*, 29(2), 33-42.

Dave, R.I. & Shah, N.P. (1996). **Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii*ssp. *bulgaricus, Lactobacillus acidophilus* and *bifidobacteria***. *J. Dairy Sci.*, 79, 1529-1536.

Davis, M.E., Maxwell, C.V., Brown, G.F.D.C. & Wistuba, T.J. (2004a). **Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pig**. *J. Anim. Sci.*, 84, 1882-1891.

Eric, L.J., Bailey, S., Cox, N.A. & Stem, N.J. (1997). **Yeast treatment to reduce *Salmonella* and Campylobacter population associated with broiler chickens subjected to transport stress**. *Poult. Sci.*, 76, 1227-1231.

Fuller, R. (1992). **Probiotic: The Scientific Basis**. Chapman & Hall, London. UK.

Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B. (1995a). **Dietary modulation of the human colonic Introducing the concept of prebiotics**. *J. Nutr.*, 125, 1404-1412.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Kemal, C., Muzaffer, D. & Orhan, O. (2001). **The Effects of Saccharomyces cerevisiae and Flavomycin on Broiler Growth Performance**. *Int. J. Poultry Sci.*, 4(11), 1415-1417.

Koraoglu, M. & Durdag, H. (2005). **The influence of dietary probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation and different slaughter age on the performance, slaughter and carcass properties of broiler**. *Int. J. Poultry Sci.*, 4(5), 309-316.

Lee, Y.K. & Salminen, S. (1995). **The coming of age of probiotics**. *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 241-245.

Miller, F.H. (1964). **Conversion of Organic Solid States into Yeast an Economic Evaluation**. *Biotechnol. Bioeng.*, 6, 299-307.

Rose, A.H. & Harrison, J.S. (1970). **The Yeasts**. New York: Academic Press.

Spring, P., Wenk, C., Dawson, A. & Newman, K.E. (2000). **The effect of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the cecum of *Salmonella* challenged broiler chicks**. *Poult. Sci.*, 79, 205-211.

Venkataraman, L.V. (1983). **A monograph on *Spirulina platensis*-biotechnology and application**. The All India Co-ordinated project on Algae Dept. of Science and Technology, India and the Indo-German Algal Project.

http://danielseobiodiversity.blogspot.com/2013/04/structure-function_11.html (29 ตุลาคม, 2557)

http://www.biologydiscussion.com/experiments/experiment-to-observe-binary-fission-in-amoeba-and-budding-in-yeast/1741 (29 ตุลาคม, 2557)

http://www.phys.ksu.edu/gene/Mating4.html (29 ตุลาคม, 2557)

http://www.thaitapiocastarch.org/crop.asp (24 เมษายน, 2558)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGYP (Sankh *et al.*, 2013)

- กลูโคส	10.0	กรัม
- แบคโตเปปโตน (Bactopeptone)	5.00	กรัม
- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.00	กรัม
- สารสกัดจากข้าวมอลต์ (Malt extract)	3.00	กรัม
- โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.00	กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.50	กรัม
- น้ำกลั่น	1.00	ลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM

- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.H_2O$)	0.50	กรัม
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.10	กรัม
- แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	0.10	กรัม
- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.10	กรัม
- น้ำกลั่น	1.00	ลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจดาล (Kjeldahl method)

วิธีการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจดาล (Kjeldahl method) โดยใช้หลักว่าไนโตรเจนที่มีอยู่ในสารอินทรีย์ส่วนมากมาจากโปรตีน ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน ซึ่งเป็นหลักการของวิธีนี้จึงใช้ได้กับอาหารทุกชนิด เมื่อต้องการคำนวณปริมาณโปรตีน ก็เปลี่ยนค่าของไนโตรเจนอีกครั้งด้วยค่าคงที่คือ Conversion factor หลักการของวิธีนี้คือ ย่อยตัวอย่างด้วยกรดกำมะถันอย่างเข้มข้นที่อุณหภูมิสูงๆ เพื่อให้โปรตีนหรือไนโตรเจนในตัวอย่างเปลี่ยนแปลงมาอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วใช้สารละลายด่างเข้มข้น เป็นตัวทำปฏิกิริยากับเกลือดังกล่าวจะเกิดแก๊สแอมโมเนียขึ้น จับแก๊สที่เกิดขึ้นโดยใช้กรดบอริก นำไปไตเตรทกับกรดโดยมีอินดิเคเตอร์เป็นตัวชี้บอก แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีน ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์นี้เป็นค่าประเมินที่เรียกว่า Crude protein ซึ่งมีขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างมาประมาณ 0.5 – 1.0 กรัม อย่างละเอียดใส่ลงในหลอดย่อย
2. ใส่คะตะลิสต์ ประมาณ 10 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ลงไปประมาณ 10 – 15 มิลลิลิตร แล้วเขย่าเบาๆ
4. เปิดเครื่องย่อย แล้วตั้งหลอดย่อยในเครื่อง สวมเครื่องดักจับไอกรดลงบนส่วนบนของหลอดย่อย และเปิด Power ของเครื่องดักจับไอกรด โดยทำการย่อยในตู้ดูดควัน
5. กดปุ่ม Start ที่เครื่องย่อย เมื่ออุณหภูมิได้ 420 องศาเซลเซียสแล้ว เครื่องจะทำการย่อยต่อไปอีก 1 ชั่วโมง จนตัวอย่างเป็นสารละลายสีเขียวใส (หากเมื่อครบ 1 ชั่วโมงแล้วยังไม่เป็นสีเขียวใสให้ทำการย่อยต่อ)
6. ยกหลอดย่อยออกมาตั้งพักไว้ให้เย็น
7. ปิด Power เครื่องย่อย แต่ยังคงเปิดเครื่องดักจับไอกรดไว้เพื่อดักจับไอกรดที่ยังคงเหลืออยู่
8. เปิด Power เครื่องหล่อเย็น แล้วเปิดเครื่องกลั่นทำการล้างระบบด้วยการล้างน้ำกลั่น
9. ตวงกรดบอริค 4% 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร พร้อมหยดอินดิเคเตอร์* ซึ่งจะทำให้กลายเป็นสารละลายสีแดงออกชมพู
10. นำหลอดย่อยประกอบเข้ากับเครื่องกลั่น และวางไว้บริเวณ Plateform ให้แท่งแก้วจุ่มอยู่ใต้กรดบอริก
11. ปิด Safety door ลงเครื่องกลั่นจะทำการกลั่นเป็นเวลาประมาณ 4 นาที
12. เมื่อกลั่นเสร็จแล้ว เอาขวดรูปชมพู่ และหลอดย่อยออกจากเครื่อง
13. นำสารละลายในขวดรูปชมพู่ไปไทเทรตกับสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N จนได้สารละลายเป็นสีชมพู่อ่อน
14. คำนวณผลการวิเคราะห์ดังนี้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{14 \times (v1 - v2) \times \textit{Normality of HCL}\ (mol/L) \times 100}{\textit{Weight of Sample}\ (g) \times 1000}$$

เมื่อ v1 = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไตเตรทตัวอย่าง

v2 = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไตเตรท blank

เปอร์เซ็นต์โปรตีน = เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน × conversion factor

เมื่อ Conversion factor = 6.25

*วิธีการเตรียมอินดิเคเตอร์

ก. ชั่งเมทิลเรด (Methyl red) 0.125 กรัม และเมทิลีนบลู (Methylene blue) 0.2 กรัม ละลายในเอทานอล 100 มิลลิลิตร

ข. ชั่งโบรโมครีซอลกรีน (Bromocresol green) 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

ค. นำสารละลายในข้อ ก และ ข มาผสมกันในอัตราส่วน ก:ข เท่ากับ 5:1

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ประวัติย่อผู้วิจัย

นางสาวผกามาศ ราชมนตรี เกิดเมื่อวันที่ 10 ธันวาคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดขอนแก่น สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2546 และสำเร็จการศึกษาปริญญาโทวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY