รายงานการวิจัย

เรื่อง

การผลิตเซลล์ชีวมวลของยีสต์โปรตีน *Pichia kudriavzevii* BA2_1 จากกากน้ำตาล

Biomass Production of Single Cell Protein *Pichia kudriavzevii* BA2_1 from Molasses

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ผกามาศ ราชมนตรี

สิทธิศักดิ์ คำผา

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ปีงบประมาณ 2561)

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การผลิตเซลล์ชีวมวลของยีสต์โปรตีน *Pichia kudriavzevii* BA2_1 จากกากน้ำตาล

Biomass Production of Single Cell Protein *Pichia kudriavzevii* BA2_1 from Molasses

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ผกามาศ ราชมนตรี

สิทธิศักดิ์ คำผา

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ปีงบประมาณ 2561)

บรรณานุกรม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บรรณานุกรม

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

ชาตรี พลชัย. (2554). *การวางแผนผังเพื่อจัดเก็บน้ำสุรากรณีศึกษาบริษัทผลิตสุราแห่งหนึ่ง*. วิทยานิพนธ์ วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดงานวิศวกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ชุตินุช สุจริต, อุไรวรรณ วัฒนกุล, วัฒนา วัฒนกุล และสมรักษ์ รอดเจริญ. (2557). *การลดปริมาณสารอินทรีย์โดยใช้ตัวกระทำทางชีวภาพในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว*. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย.

ดวงใจ โอชัยกุล และพรรณวิภา แพงศรี. (2555). *การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแป้งมันสำปะหลังโดยเลี้ยงเชื้อผสม Endomycopsis fibuligera TISTR 5097 และ Candida utilis TISTR 5046*. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 กรุงเทพมหานคร.

นฤมล โตอ่อน. (2549). *ยีสต์สายพันธ์ทนร้อนและการประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี, พรพรรณ แสนภูมิ, วรางคณา กิจพิพัธ และกฤติยา เลิศชุณหะเกียรติ. (2556). การศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเปลือกสับปะรดโดยใช้ยีสต์และบาซิลัสซับติลิสเพื่อพัฒนาเป็นอาหารสัตว์. *วารสารแก่นเกษตร*, *41*(1), 80-86.

เมทินี มาเวียง. (2554). *ชีววิทยาของยีสต์*. [ออนไลน์] http://sites.google.com/site/biotech-rmutisurin/yeast-technology. [2556, มีนาคม 31]

วารุณี ประดิษฐศรีกุล. (2549). ถั่วหมักอร่อย. *วารสารอาหาร, 36*(3), 189-194.

วิเชียร ลีลาวชัรมาศ. (2541). การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกส์. *วารสารจาร์พาร์, 45,* 1-5.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สินีนาฏ พลโยราช และเมธา วรรณพัฒน์. (2558). ศักยภาพในการใช้ยีสต์เป็นแหล่งโปรไบโอติกส์ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง. *วารสารแก่นเกษตร, 43*(1), 191-206.

สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. (2553). *ความรู้เกี่ยวกับกากน้ำตาล.* [ออนไลน์]. http://molasses-review.blogspot.com/2010/08/blog-post.html**.** [2553, สิงหาคม 22]

สุมณฑา วัฒนสินธุ. (2549). *ตำราจุลชีววิทยาทางอาหาร.* พิมพ์ครั้งที่ 2 โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

สุมาลี เหลืองสกุล. (2543). *คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร.* ชัยเจริญการพิมพ์ กรุงเทพมหานคร.

อาทิตย์ วิบูลชัย. (2527). *การศึกษาการใช้ใบกระถิน ใบปอแก้ว หรือใบมันสำปะหลังผสมกับมันสำปะหลังหมักเพื่อเป็นอาหารสุกรเนื้อสำหรับผู้เลี้ยงรายย่อย.* วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศิริลักษณ์ สร้อยจุฑา. (2554). *ผลของการเสริมเปลือกมันสำปะหลังที่เพิ่มคุณค่าทางโภชนะโดยใช้จุลินทรีย์จากกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้องต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตและคุณภาพซากของไก่กระทง.* วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

Carro, M. D., Libzien, P. & Rohr, K. (1992). Influence of yeast culture on the vitro fermentation (Rusitech) of diets containing variable portions of concentrates. *Animal Feed Science and Technology, 37*(3-4), 209-220.

Dobuis, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956). Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry. 28,* 350-356.

Jouany, J.P., Mathieu, F., Senaud, J., Bohatier, J., Bertin, G. & Mercier, M. (1998). The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on the digestion of the cell wall fraction of a mixed diet in defaunated and refaunated sheep rumen. *Reproduction Nutrition Development, 38*(4), 401-416.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Iannotti, E.L., Kafkewitz, D., Wolin, M.J. & Bryant, M.P. (1973). Glucose fermentation products of *Ruminococcus albus* grown in continuous culture with Vibrio succinogenes: changes caused by interspecies transfer of H2. *Journal of Bacteriology, 114*, 1231-1240.

Leng, R.A. & Nolan, J.V. (1984). Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science, 70*, 1027-1034.

Moss, A.R., Jouany, J.P. & Newbold, C.J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie, 49*, 231-253.

Perez-Torrado, R., Gamero, E., Gomez-Pastor, R., Garre, E., Aranda, A. & Matallana, E. (2015). Yeast biomass, an optimised product with myriad application in the food industry. *Trends in Food Science and Tachnology, 46*, 167-175.

Wallace, J., Mckain, N. & Newbold, C.J. (1990). Metabolism of small peptides in rumen fluid. Accumulation of intermediates during hydrolysis of alanine oligomers, and comparison of peptidolytic activities of bacteria and protozoa. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 50*(2), 191-199.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก-1. อาหารสูตร YEPD ซึ่งประกอบด้วย

เปปโตน	10	กรัม
สารสกัดยีสต์	3	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก-2.สารละลายฟีนอล 5% (phenol solution)

ฟีนอล	5	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นคนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ก-3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 นอร์มอล

NaOH	4	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นคนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

ก-4. ไฮโดคลอริก (HCl) 1 นอร์มอล

HCl	8.33	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นคนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

ข-1. การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

1. เตรียม glucose stock solution ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายกลูโคส 500 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 500 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน โดยนำสารละลาย glucose stock solution ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้น ไปวิเคราะห์โดยการปิเปตสารตัวอย่าง 0.5 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลอง

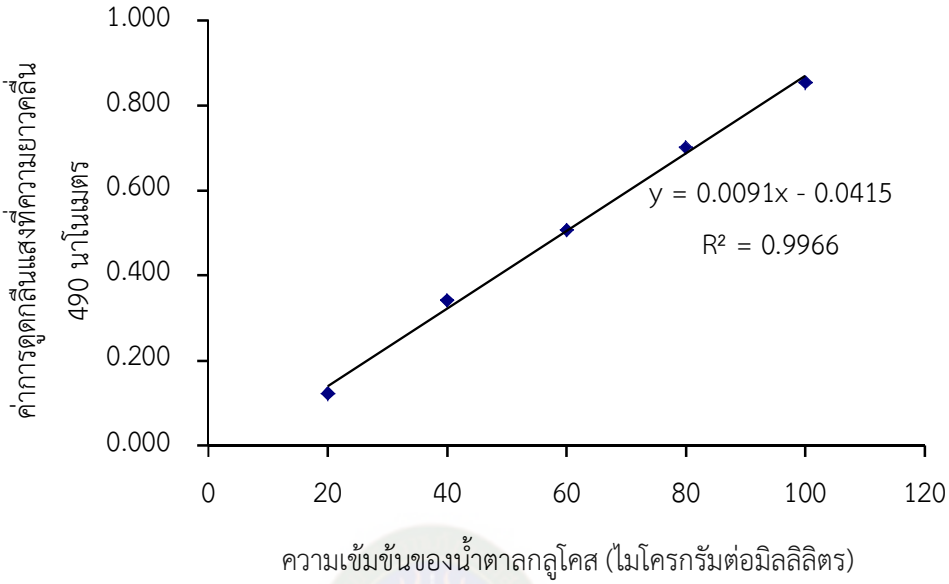
4. เติม 5% (w/v) phenol solution จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน

5. เติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้น จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็วพร้อมเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เขย่าให้เข้ากันด้วย Vortex mixer แล้วแช่ในอ่างน้ำเย็นอุณหภูมิ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา ต่ออีก 20 นาที เทียบกับ Blank ที่ใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตรแทนสารตัวอย่าง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ ข-1 ค่าดูดกลืนแสงของสรละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
20	0.122
40	0.342
60	0.508
80	0.701
100	0.854



ภาพที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกลูโคส

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ค
วิธีการวิเคราะห์

ค-1 การวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total Solids : TS), ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solid : TSS) และปริมาณของแข็งระเหย (Volatile Solid : VS)

วิธีวิเคราะห์

1. อบถ้วย Crucible ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เย็นลงจนเท่าอุณหภูมิห้องใน Desiccator แล้วชั่งหาน้ำหนัก (W1)

2. นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550-600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นลงจนเท่าอุณหภูมิห้องใน Desiccator แล้วชั่งหาน้ำหนัก (W4)

3. ปิเปตน้ำตัวอย่างมาปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในถ้วย Crucible ที่ทราบน้ำหนัก (W1) และ (W4) แล้วนำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นลงจนเท่าอุณหภูมิห้องใน Desiccators แล้วชั่งหาน้ำหนัก (W2)

4. นำตัวอย่างในถ้วยที่ผ่านการหาน้ำหนัก (W2) แล้วไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นลงจนเท่าอุณหภูมิห้องใน Desiccators จากนั้นนำมาชั่งหาน้ำหนัก (W3)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การคำนวณ

ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solids : TS) หน่วย กรัมต่อลิตร $= \frac{(W2-W1)\times 1000\ (g)}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (ml)}}$

ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solid :TSS) หน่วย กรัมต่อลิตร $= \frac{(W3-W4)\times 1000\ (g)}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (ml)}}$

ปริมาณของแข็งระเหย (Volatile Solid; VS) หน่วย กรัมต่อลิตร $= TS-TSS$

ค-2 วิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นน้ำตาลน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar)

ทำการวิเคราะห์หาค่าความเข้าข้นน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ของกากน้ำตาล โดยวิธี Phenol-sulfuric (Dubois *et al.,* 1956) ดังนี้

1. การปิเปตสารตัวอย่าง 0.5 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลอง

2. เติม 5% (w/v) phenol solution จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน

3. เติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้น จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็วพร้อมเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เขย่าให้เข้ากันด้วย Vortex mixer แล้วแช่ในอ่างน้ำเย็นอุณหภูมิ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา ต่ออีก 20 นาที เทียบกับ Blank ที่ใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตรแทนสารตัวอย่าง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

4. วิเคราะห์ค่าน้ำตาลจากสมการกราฟมาตรฐานกลูโคส

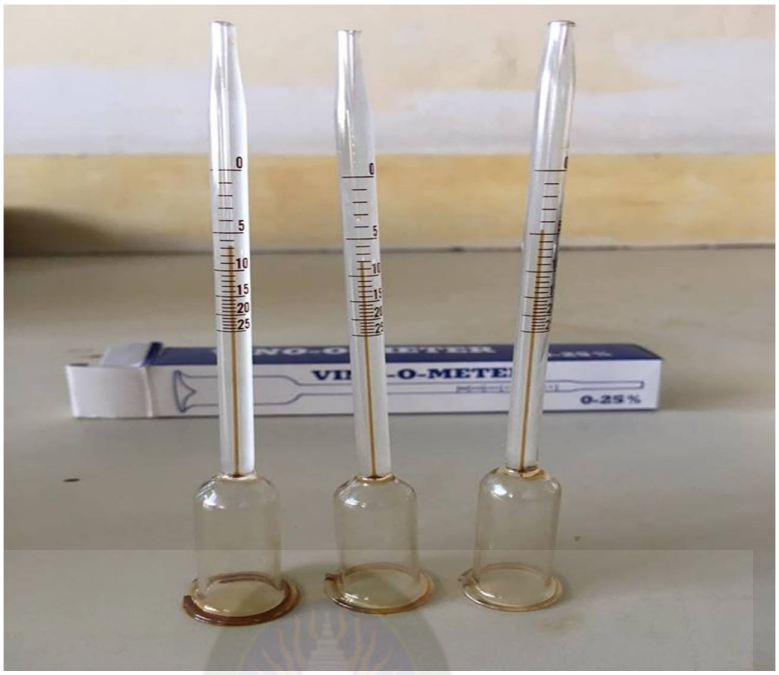
ค-3 วิเคราะห์หาค่าแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้น ด้วยเครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอลล์ (Vino meter)

1. เทตัวอย่างลงในเครื่อง ปล่อยให้ตัวอย่างไหลลง จนหยดลงด้านล่าง ดูให้แน่ใจว่า ไม่มีฟองอากาศอยู่ในท่อ

2. คว่ำไวโนมิเตอร์ลง ตัวอย่างจะไหลย้อนกลับ จนกระทั่งมาหยุดอยู่ที่จุดๆ หนึ่งในท่อ

3. อ่านค่าปริมาณแอลกอฮอล์เป็น % (โดยปริมาตร) ได้จากขีด (scale) ของเครื่อง ณ จุดที่ตัวอย่างในท่อหยุดไหล

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
PIBULSONGKRAM RAJABHAT UNIVERSITY



ภาพที่ ค-1 เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Vino meter)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ง

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

2019 International Forum – Agriculture, Biology, and Life Science – Bangkok (IFABL-Bangkok 2019)
Bangkok, Thailand, March 15-17, 2019

Letter of Acceptance/Invitation

Paper #:2012

Paper Title: Biosynthesis of Single-Cell Biomass from Molasses by Pichia kudriavzevii BA2_1

Author(s): Phakamas Rachamontree, Sittisak Khampa

Presentation: Poster Presentation January 31, 2019

Dear Phakamas Rachamontree, Sittisak Khampa

It is our pleasure to inform you that your submission has passed the review process and been accepted by the IFABL-Bangkok 2019. For your information, all submissions to the conference have been reviewed by at least two independent peers for technical merit and content. The Program Committee would like to invite you to attend the IFABL-Bangkok 2019 in Bangkok, Thailand.

Since the file you upload will be the version we publish in our proceedings, we kindly ask you to prepare and upload your final version of manuscript, in case there should be any changes or update made in your abstract/paper, together with your registration before the deadline. For the deadline for uploading the final version of your manuscript and registration, please refer to the information released on the website.

You can find all detailed information on the conference website at http://iainst.org/ifabl-bangkok/

Should you have any questions, please do not hesitate to contact us at ifabl.bangkok@gmail.com

Once again, thank you very much for your contribution. We do hope to welcome you at the conference.

Yours sincerely,

Piyawadee Saraphirom. Conference Chair, IFABL-Bangkok 2019

IFABL Bangkok 2019
มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ นามสกุล	ผกามาศ ราชมนตรี
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 10 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2524
จังหวัด และประเทศที่เกิด	อำเภอกระนวน จังหวัดขอนแก่น
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2551 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
	วท.ม. (จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
	พ.ศ. 2547 วิทยาศาสตรบัณฑิต
	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล
ตำแหน่ง สถานที่ทำงาน	อาจารย์ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้	20 หมู่ 8 ตำบลน้ำอ้อม อำเภอกระนวน จังหวัดขอนแก่น

ชื่อ นามสกุล	สิทธิศักดิ์ คำผา
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 24 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2521
จังหวัด และประเทศที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดศรีสะเกษ
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2548 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (โทควบเอก)
	ปร.ด. (สัตวศาสตร์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
	พ.ศ. 2543 วิทยาศาสตรบัณฑิต
	วท.บ. (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ตำแหน่ง สถานที่ทำงาน	อาจารย์ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้	227/26 หมู่ 8 ตำบลเกิ้ง อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ตลอดจนขอขอบพระคุณอาจารย์ในสาขาวิชาชีววิทยา และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่กรุณาให้ความรู้ ข้อคิดเห็น และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย และสุดท้ายขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในสาขาชีววิทยา และสาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่อำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์เครื่องมือด้านวิทยาศาสตร์ต่างๆ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผกามาศ ราชมนตรี
สิทธิศักดิ์ คำผา
2562

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

หัวข้อวิจัย การผลิตเซลล์ชีวมวลของยีสต์โปรตีน *Pichia kudriavzevii* BA2_1 จากกากน้ำตาล

ผู้ดำเนินการวิจัย ผกามาศ ราชมนตรี

สิทธิศักดิ์ คำผา

หน่วยงาน สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

ปี พ.ศ. 2562

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ชีวมวลของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 จากกากน้ำตาล โดยเลี้ยงยีสต์โปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 250 กรัมต่อลิตร แปรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น เพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้โซเดียมไนเตรทเข้มข้น 0.1% (น้ำหนักโดยปริมาตร) และปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 8% (ปริมาตรโดยปริมาตร) เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญ โดยพบค่าปริมาณของแข็งระเหยได้เท่ากับ 14.983±0.56 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 153.72 กรัมต่อลิตร และยังพบความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ได้ 1.663% ดังนั้น *Pichia kudriavzevii* BA2_1 สามารถใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและเติมไนโตเจนเป็นสารตั้งต้นในการเจริญเติบโตเพิ่มชีวมวลเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตหัวเชื้อยีสต์ราคาถูกในการผลิตอาหารสัตว์ได้ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : *Pichia kudriavzevii* , เซลล์ชีวมวล, กากน้ำตาล

Research Title Biomass Production of Single Cell Protein *Pichia kudriavzevii* BA2_1 from Molasses

Researcher Phakamas Rachamontree

Sittisak Khampa

Organization Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Maha Sarakham University

Year 2019

ABSTRACT

This study aimed to optimize the single-cell biomass production from molasses by *Pichia kudriavzevii* BA2_1. The investigation conducted by using molasses concentration of 250 g/L as carbon source with varying nitrogen source and nitrogen concentration. The culture was incubated at room temperature using shaken mode, for 72 hours at 150 rpm. Results revealed that the highest total solid, total suspended solids of 14.983±0.56 g/L and fermented sugar of 153.72 g/L, when using initial molasses total sugar of 250 g/L as carbon source, sodium nitrate concentration of 0.1% (w/v) as nitrogen source and initial inoculum of 8% (v/v). In addition, also found the ability of alcohol production was 1.663%. This study showed that *Pichia kudriavzevii* BA2_1 could be used diluted molasses as carbon source with nitrogen source supplementation for biosynthesis of sing-cell biomass. These results served as a basis of low-cost yeast starter production to produce animal feed in the future.

Keywords: *Pichia kudriavzevii*, Single-cell biomass, Molasses

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค

สารบัญ..... ง

สารบัญตาราง..... ฉ

สารบัญภาพ..... ช

บทที่ 1 บทนำ..... **1**

1.1 ที่มาและความสำคัญ..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

1.3 สมมติฐานการวิจัย..... 2

1.4 ขอบเขตการวิจัย..... 2

1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย/(นิยามศัพท์เฉพาะ)..... 3

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... **4**

2.1 โปรตีนเซลล์เดียว หรือ Single cell protein (SCP)..... 4

2.2 ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับยีสต์..... 12

2.3 การเจริญของยีสต์..... 17

2.4 กากน้ำตาล..... 18

2.5 การใช้ยีสต์เสริมในอาหารสัตว์..... 20

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 24

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... **27**

3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์..... 27

3.1.1 อุปกรณ์..... 27

3.1.2 เคมีภัณฑ์..... 28

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย..... 28
3.2.1 การศึกษาการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 ในอาหารสังเคราะห์ YEPD..... 29
3.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 ในอาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล..... 29
3.2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล..... 31
บทที่ 4 ผลการวิจัย..... **32**
4.1 ผลการศึกษาการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 ในอาหารสังเคราะห์ YEPD..... 32
4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 ในอาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล..... 33
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... **41**
5.1 สรุปผลการวิจัย..... 41
5.2 อภิปรายผล..... 41
5.3 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป..... 42
บรรณานุกรม..... **43**
บรรณานุกรมภาษาไทย..... 44
บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ..... 45
ภาคผนวก..... **47**
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 48
ภาคผนวก ข การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส..... 49
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์..... 51
ภาคผนวก ง การเผยแพร่ผลงานวิจัย..... 54
ประวัติผู้วิจัย..... **61**

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ตัวอย่างจุลินทรีย์และสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว..... 6

2.2 แสดงปริมาณโปรตีนก่อนและหลังกระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวในตัวอย่างยีสต์..... 11

2.3 ส่วนประกอบของกากน้ำตาล..... 20

4.1 ผลการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (TSS) ปริมาณของแข็งระเหย (VS) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ค่า pH และปริมาณแอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่างๆ..... 34

4.2 ผลการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (TSS) ปริมาณของแข็งระเหย (VS) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่า pHที่ แหล่งไนโตรเจน 5 ชนิด..... 36

4.3 ผลการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (TSS) ปริมาณของแข็งระเหย (VS) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่า pH ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท..... 38

4.4 ผลการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (TSS) ปริมาณของแข็งระเหย (VS) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่า pH ที่ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้นต่างๆ..... 40

ข-1 ค่าดูดกลืนแสงของสรละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 49

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 รูปร่างยีสต์ และโครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์	13
2.2 การแตกหน่อของยีสต์	16
2.3 กากน้ำตาล (molasses)	18
4.1 กราฟการเจริญของ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 ในอาหารสังเคราะห์ YEPD	32
ข-1 กราฟมาตรฐานกลูโคส	50
ค-1 เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Vino meter)	53

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ กาฬสินธุ์ บุรีรัมย์ ขอนแก่น ร้อยเอ็ด และอุดรธานี เนื่องจากมันสำปะหลังเป็นพืชที่ปลูกง่าย สะดวกในการดูแลรักษา เวลาปลูกไม่จำกัด ทนแล้งได้ดี และให้ผลผลิตเป็นที่น่าพอใจในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ (อาทิตย์ วิบูลชัย, 2527) และเนื่องจากผลผลิตมันสำปะหลังที่มีปริมาณมากนี้ ส่วนหนึ่งจะถูกนำไปใช้ในการผลิตแป้งมันสำปะหลังหรือโรงงานผลิตฟรุคโตสและสารให้ความหวานเพื่อการบริโภคของมนุษย์ 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 พลังงานและโภชนะอื่นๆ ตามความต้องการของสัตว์แต่ละประเภท ซึ่งเกษตรกรสามารถผลิตได้เองในฟาร์ม แต่ปัญหาที่พบคือยีสต์ที่นำมาทำการหมักกากมันสำปะหลังนั้นเป็นยีสต์ผงที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งทำให้ราคาต้นทุนการผลิตสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการผลิตเซลล์ชีวมวลจากกากน้ำตาล (molasses) โดยยีสต์โปรตีน *Pichia kudriavzevii* BA2_1 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักกากมันสำปะหลังในการผลิตกากมันหมักยีสต์ เพิ่มปริมาณโปรตีนในอาหารสัตว์ และนำไปสู่การผลิตยีสต์ในระดับขยายส่วน ลดต้นทุนการผลิตอาหารสัตว์มันหมักยีสต์ และลดการนำเข้ายีสต์จากต่างประเทศ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ช่วยให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์สามารถผลิตใช้ได้เองในฟาร์มและลดปัญหาวิกฤตอาหารสัตว์ราคาแพงได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตหัวเชื้อยีสต์ตั้งต้นจากสารตั้งต้นราคาถูก ได้แก่ กากน้ำตาล เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์กากมันหมักยีสต์ต่อไปในอนาคต ซึ่งประกอบไปด้วยวัตถุประสงค์ย่อยตามยุทธศาสตร์ของโครงการวิจัย ดังนี้

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ชีวมวลของยีสต์โปรตีน *Pichia kudriavzevii* BA2_1 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

1.2.2 เพื่อเขียนบทความทางวิชาการหรือบทความวิจัย เพื่อนำเสนอในที่ประชุมทั้งในระดับชาติหรือนานาชาติ หรือตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการทั้งในระดับชาติหรือนานาชาติ

1.3 สมมติฐานการวิจัย

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ได้แก่ ความเข้มข้นของกากน้ำตาลอันเป็นแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น ส่งผลต่อการผลิตเซลล์ชีวมวลที่แตกต่างกันของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์โปรตีน *Pichia kudriavzevii* BA2_1 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งทำการหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้น ชนิดของแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น ที่เหมาะต่อการเจริญของยีสต์ โดยติดตามเซลล์ชีวมวลด้วยการวัดค่าของแข็งทั้งหมด ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และของแข็งระเหยได้

1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย/(นิยามศัพท์เฉพาะ)

1.5.1 โปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein; SCP) หมายถึง จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารมนุษย์และสัตว์ ซึ่งอาจอยู่ในรูปโปรตีนที่สกัดออกมาจากเซลล์หรืออาจอยู่ในรูปเซลล์จุลินทรีย์ทั้งเซลล์ก็ได้

1.5.2 กากน้ำตาล (molasses) หมายถึง เป็นของเหลวที่มีลักษณะข้นเหนียวสีน้ำตาลดำ ที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย เนื่องจากกรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยนั้น

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ชีวมวลของยีสต์โปรตีนในระดับขวดเขย่า โดยใช้สารตั้งต้นกากน้ำตาลที่มีราคาถูกในการเพาะเลี้ยง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อยีสต์ในระดับขยายส่วนเพื่อการผลิตอาหารสัตว์กากมันหมักยีสต์ต่อไป

1.6.2 ได้บทความทางวิชาการหรือบทความวิจัย เพื่อนำเสนอในที่ประชุมทั้งในระดับชาติหรือนานาชาติ หรือตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการทั้งในระดับชาติ/นานาชาติ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันเกิดปัญหาการขาดแคลนอาหารสัตว์ โดยเฉพาะหญ้าสด เนื่องจากมีพื้นที่ในการปลูกหญ้าลดน้อยลง ทำให้อาหารสัตว์ไม่เพียงพอต่อความต้องการของสัตว์ประกอบกับวัตถุดิบอาหารสัตว์มีราคาแพงขึ้น ทำให้ต้นทุนการเลี้ยงสัตว์สูง จึงมีการนำวัตถุดิบเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมาแปรรูป โดยเฉพาะวัตถุดิบแหล่งพลังงานที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น เปลือกมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลัง เป็นแหล่งอาหารหยาบ ซึ่งแต่ละปีจะมีผลผลิตจากมันสำปะหลังออกมาจำนวนมากและเศษเหลือของกากมันสำปะหลังมากเช่นกัน จึงเป็นผลดีในการนำมาหมักยีสต์เพื่อเพิ่มโปรตีนเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์เพราะเป็นการลดต้นทุนการผลิตอาหารสัตว์ และเพิ่มมูลค่าให้กับเศษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตร

2.1 โปรตีนเซลล์เดียวหรือ Single cell protein (SCP)

ในกระบวนการผลิตอาหารเลี้ยงสัตว์โดยใช้เศษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร จะใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสะสมโปรตีนในเซลล์ได้ เนื่องจากเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรมีโปรตีนปริมาณต่ำไม่เพียงพอต่อความต้องการของสัตว์ และยังมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเพื่อช่วยส่งเสริมโภชนะและสุขภาพของสัตว์เลี้ยง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

โปรตีนเซลล์เดียว เป็นโปรตีนที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะมีลักษณะการเจริญเป็นเซลล์เดียวหรือเส้นใยไม่เกิดเป็นเนื้อเยื่อ จุลินทรีย์ที่นิยมนำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดียวในปัจจุบันคือสไปรูไลนา (*Spirulina* sp.) เพราะมีโภชนาการทางอาหารสูง และมีคุณสมบัติทางการแพทย์ เช่น ลดคลอเรสเตอรอล เพิ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ แก้ไขภาวะขาดแคลนอาหารในเด็ก ยับยั้งไวรัสเอดส์ เป็นต้น ประเทศญี่ปุ่นเป็นประเทศแรกที่มีการผลิตสาหร่ายในระดับทางการค้าเมื่อ พ.ศ. 2503 โดยทำการเลี้ยงสาหร่าย ต่อมาใน พ.ศ. 2513 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูไลนาทางการค้าเริ่มขึ้นที่แถบทะเลสาบเทกโกโก ประเทศเม็กซิโก และแพร่หลายไปทั่วโลก (ชุตินุช สุจริต, 2542)

2.1.1 ความหมาย และประวัติการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (ชุตินุช สุจริต, 2542)

โปรตีนเซลล์เดียว หมายถึง จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารมนุษย์และสัตว์ ซึ่งอาจอยู่ในรูปโปรตีนที่สกัดออกมาจากเซลล์แล้ว อาจอยู่ในรูปเซลล์จุลินทรีย์ทั้งเซลล์ก็ได้ ในปัจจุบันเริ่มมี

การใช้คำว่า Microbial biomass protein (MBP) เข้ามาแทนที่ SCP เพื่อให้ครอบคลุมฟังไจซึ่งเป็นจุลินทรีย์หลายเซลล์ด้วย การผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ครั้งแรกเริ่มขึ้นในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 ที่ประเทศเยอรมนี เนื่องจากภาวะสงครามทำให้เกิดการขาดแคลนอาหาร จึงได้มีการผลิตเซลล์ยีสต์ขนมปัง *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสำหรับมนุษย์ โดยใช้กากน้ำตาลเป็นสับสเตรทหลัก ต่อมาในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ก็ได้มีการพัฒนาการผลิตโดยใช้เชื้อ *Candida utilis* หมักในของเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ (sulfite waste liquor) ที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ และน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายไม้มาใช้เป็นสับสเตรท หลังจากนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิต โปรตีนเซลล์เดียว กันอย่างกว้างขวาง จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1968 ได้มีการก่อตั้งโรงงานผลิตโปรตีนเซลล์เดียวเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากในหลายๆ ประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา สวิสเซอร์แลนด์ ไต้หวัน สหภาพโซเวียต ญี่ปุ่น ฟินแลนด์ ฝรั่งเศส อังกฤษ และไทย เป็นต้น

2.1.2 ประโยชน์ของการใช้จุลินทรีย์สำหลับการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (สุมาลี เหลืองสกุล, 2543)

2.1.2.1 จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ดีและเร็ว จุลินทรีย์โดยทั่วไปสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในอาหารและสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีอัตราการเจริญสูงกว่ายีสต์และรา

2.1.2.2 ปรับปรุงสายพันธุ์ได้ง่าย เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เราใช้ทำโปรตีนเซลล์เดียวเป็นจุลินทรีย์ที่เรารู้จักรูปร่าง องค์ประกอบและปัจจัยในการเจริญเป็นอย่างดีแล้ว ดังนั้นเราจึงสามารถปรับปรุงสายพันธ์ได้โดยง่าย ประกอบกับเทคโนโลยีในการตัดต่อยีน

2.1.2.3 ใช้ทดแทนโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ พบว่าปริมาณสารอาหารในจุลินทรีย์มีปริมาณที่เพียงพอที่จะนำมาเป็นอาหาร เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิค ไขมัน แร่ธาตุ

2.1.2.4 ใช้พื้นที่น้อยและการผลิตไม่ขึ้นกับสภาพอากาศ จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมาก ดังนั้นจึงใช้พื้นที่ในการผลิตน้อย แต่ได้จำนวนมากตามต้องการ

2.1.2.5 ใช้วัสดุได้หลากหลาย ในการผลิตสามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด เช่น การใช้ของเสียให้การผลิตอีกด้วย

2.1.3 สับสเตรทที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (สุมาลี เหลืองสกุล, 2543)

การผลิตโปรตีนเซลล์เดียว สามารถใช้สับสเตรทได้หลายชนิด โดยทั่วไปได้แก่ อัลเคน แอลกอฮอล์ และคาร์โบไฮเดรต หลังจากสงครามโลกครั้งที่ 2 การผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ส่วนใหญ่มี

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

วัตถุประสงค์หลักเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ ดังนั้นกระบวนการผลิตจึงต้องใช้ต้นทุนต่ำพอที่จะแข่งขันกับราคาพืชที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารสัตว์ได้ สับสเตรทที่ใช้ในการผลิตเป็นต้นทุนการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวประมาณ 40-60% ในระยะแรกจึงนิยมใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันปิโตรเลียมเป็นสับสเตรท เนื่องจากสารเหล่านี้มีราคาถูกมากในสมัยนั้น ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1973 เป็นต้นมา ราคาน้ำมันและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันมีราคาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้ต้นทุนการผลิต โปรตีนเซลล์เดียว เพิ่มสูงขึ้นมาก ประกอบกับที่การพัฒนาเทคโนโลยีทางด้านการเกษตร ทำให้สามารถผลิตพืชเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ปริมาณมาก ในราคาถูกและคงที่ จึงเป็นผลให้อุตสาหกรรมการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ต้องปิดไปหลายแห่ง ส่วนที่เหลืออยู่ก็ได้พยายามพัฒนาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ให้มูลค่าสูงขึ้นเพื่อใช้เป็นอาหารมนุษย์

เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการใช้สับสเตรทเพื่อการเจริญที่แตกต่างกัน เช่น *Cellulomonas* spp. และ *Candida utilis* ใช้ชานอ้อยและเอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ (ตารางที่ 2.1) และอาหารหนึ่งชนิดสามารถใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น *Kluyveromyces fragilis* กับ *Penicillium cyclopium* สามารถใช้เนยแข็งเป็นสับเสตรทได้เหมือนกัน และยังพบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้ของเสียและสิ่งที่มีอยู่ตามธรรมชาติได้ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ และแสงแดด

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างจุลินทรีย์และสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน
แบคทีเรีย	
Cellulomonas spp.	ชานอ้อย
Alcaligenes spp.	
Methylophilus methylotrophus	เมทิลแอลกอฮอล์
Methylococcus capsulatus	ก๊าซมีเทน
ยีสต์	
Candida utilis	เอทานอล
Candida lipolytica	แอลเคน

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน
Kluyveromyces fragilis	เนยแข็ง
Saccharomyces cerevisiae	กากน้ำตาล
ราและเห็ด	
Cephalosporium eichorniae	แป้งมันสำปะหลัง
Paecilomyces varioti	ของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตกระดาษ

ที่มา : สุมาลี เหลืองสกุล (2543)

2.1.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (ชุตินุช สุจริต, 2542)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวมีหลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และสาหร่าย การจะเลือกใช้จุลินทรีย์ชนิดใดในกระบวนการผลิตนั้น โดยทั่วไปจะพิจารณาจากปัจจัยต่างๆ หลายประการ คือ

2.1.4.1 สับสเตรท ต้องเลือกใช้จุลินทรีย์ที่สามารถใช้สับสเตรทที่ต้องการใช้ได้

2.1.4.2 อัตราการเจริญและการสร้างผลผลิต โดยทั่วไปแบคทีเรียจะมีอัตราการเจริญสูงกว่ายีสต์และรา และผลิตโปรตีนได้สูงกว่าด้วย และราคาถูก หาง่ายในท้องถิ่น

2.1.4.3 ความทนทานต่ออุณหภูมิสูง และ pH ต่ำ โดยทั่วไปแบคทีเรียจะทนอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าฟังไจ จึงประหยัดค่าใช้จ่ายในการควบคุมอุณหภูมิของถังหมัก ในขณะที่ฟังไจมีความทนทานต่อ pH ต่ำได้ดีกว่าแบคทีเรีย ทำให้ลดโอกาสการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น

2.1.4.4 ความต้องการอากาศและการเกิดฟอง โดยทั่วไปการให้อากาศในกระ บวนการหมักที่ใช้แบคทีเรียและยีสต์จะง่ายกว่า เนื่องจากการเจริญเป็นเส้นใยของเชื้อราทำให้อาหารมีความหนืดสูงและทำให้มีปัญหาในการให้อากาศ

2.1.4.5 ความปลอดภัยและการยอมรับ ต้องเลือกใช้จุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ไม่สร้างสารพิษและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

2.1.4.6 การเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยทั่วไปการเก็บเกี่ยวเส้นใยของเชื้อราจะทำได้ง่ายๆ โดยการกรองในขณะที่การเก็บเกี่ยวเซลล์แบคทีเรียและยีสต์ต้องใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง

2.1.4.7 องค์ประกอบของโปรตีน RNA และสารอาหารอื่นๆ ในผลผลิต โดยทั่ว ไปแบคทีเรียจะมีโปรตีนสูงกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น และมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่มีคุณภาพดีกว่า

ยีสต์และรา แต่เซลล์แบคทีเรียก็มี RNA ปริมาณสูงกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วย จึงอาจก่อให้เกิดปัญหาโรคเกาท์และนิ่วในไตได้ ดังนั้นจึงต้องมีการกำจัด RNA ออกไปให้เหลือประมาณ 1-2% ก่อนที่จะนำไปใช้เป็นอาหารมนุษย์

2.1.4.8 เจริญในอาหารที่มีส่วนประกอบง่ายๆ

2.1.4.9 มีความทนทานต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น

2.1.4.10 ทราบคุณสมบัติทางพันธุกรรมเป็นอย่างดี

2.1.4.11 มีของเหลือทิ้งน้อยที่สุด

2.1.4.12 เก็บรักษาและบรรจุได้ง่าย

2.1.5 ประเภทของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดี่ยว (ชุตินุช สุจริต, 2542)

2.1.5.1 แบคทีเรีย (bacteria) เป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็กมาก ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูงส่องดูจึงมองเห็น ประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียว และเป็นพวกโปรคารีโอต มีผนังเซลล์ที่คงรูปทำให้แบคทีเรียรักษารูปร่างได้ แบคทีเรียมีรูปร่างได้หลายแบบสามารถสืบพันธ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดจากการรวมตัวของเซลล์ 2 เซลล์ ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยทั่วไปเป็นแบบ Binary fission บ้างก็เป็นการแตกหน่อ แบคทีเรียสามารถพบได้ทั่วๆ ไปไม่ว่าจะเป็นดิน น้ำ อากาศ มีทั้งชนิดที่ให้ประโยชน์และบางชนิดก็เป็นโทษ ตัวอย่างของแบคทีเรีย เช่น *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Spirillum* spp. และ *Streptomyces* spp. เป็นต้น

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การศึกษาเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียเป็นแหล่งอาหารโปรตีนเริ่มเป็นที่สนใจกันมากขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียมีอัตราการเจริญสูงกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ และมีปริมาณโปรตีนสูง โปรตีนในแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีปริมาณแตกต่างกันไปทั้งนั้นเนื่องจากอาหารที่ใช้เลี้ยงด้วย แต่มีข้อเสียคือเซลล์มีขนาดเล็กทำให้ยากในการเก็บเกี่ยวผลผลิต ส่วนแบคทีเรียที่เลี้ยงเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวในประเทศไทยมีแนวโน้มสามารถที่จะนำมาใช้ได้คือ *Rhodopseudomonas sphaeroides* P47 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงซึ่งให้ปริมาณโปรตีนสูง และมีองค์ ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตครบถ้วน นอกจากนี้ยังมีปริมาณวิตามินบี 12 ในปริมาณที่สูง คือ 78.9 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีแคโรทีนอยด์ 0.80 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่ช่วยเพิ่มคุณค่าของอาหารสัตว์

2.1.5.2 เชื้อรา (fungi) เป็นจุลินทรีย์ที่มีเซลล์แบบยูคารีโอต มีทั้งชนิดเซลล์เดี่ยวคือยีสต์ (yeast) ซึ่งส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ และหลายเซลล์ซึ่งได้แก่ รา (mold) โดยมีรูปร่างเป็นเส้นใย (filamentous) ส่วนของเส้นใยเรียกว่า ไฮฟี (hyphae) ถ้าไฮฟีมาอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) เส้นใยมีทั้งแบบมีผนังกั้นและไม่มีผนังกั้น ผนังเซลล์ของเชื้อราแตกต่างจากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ขนาดและรูปร่างของเชื้อราแตกต่างกันไป บางชนิดต้องใช้กล้องส่องดู เช่น เซลล์ยีสต์ที่โตขึ้นมา ได้แก่ พวกที่มีลักษณะเป็นเส้นใย และที่สามารถมองเป็นด้วยตาเปล่า ได้แก่ เห็ด (mushroom) ซึ่งเกิดจากเส้นใยของเชื้อรามาอยู่รวมกันและอัดแน่นเป็นดอกเห็นขนาดใหญ่ เชื้อราเจริญได้ดีในที่ที่มีความเป็นกรดสูง อาหารเลี้ยงเชื้อราจึงปรับ pH ประมาณ 4.0 ราทุกชนิดเป็นพวกที่ต้องการอากาศ ส่วนใหญ่ชอบอุณหภูมิปานกลาง การสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ตัวอย่างของเชื้อราพวกที่เป็นเซลล์เดียว เช่น ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ส่วนพวกหลายเซลล์ที่เป็นเส้นใย เช่น *Rhizopus* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. และเห็ด เช่น เห็ดฟาง *Volvariella volvaceae*

เชื้อราได้ถูกใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียวมาตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 คือ ประเทศเยอรมันได้ เพาะเลี้ยงราพวก *Geotrichum candidum* เนื่องจากให้ปริมาณโปรตีนสูง ข้อดีของเชื้อราที่ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียวคือ เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ตลอดจนมีคุณค่าทางอาหารพอๆ กับยีสต์ แต่การเจริญเติบโตจะต่ำกว่ายีสต์และแบคทีเรีย ส่วนปัญหาในการเลี้ยงยีสต์นั้น พบว่าเส้นใยของเชื้อรา เมื่อเลี้ยงในสภาพ Submerged cultivation นานๆ เส้นใยจะพันกันเป็นกลุ่มเป็นก้อน (Pellet) ทำให้เกิดปัญหาในการให้ออกซิเจนแก่เซลล์ เชื้อราหลายชนิดมีแนวโน้มที่สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนสำหรับสัตว์เลี้ยงได้ เช่น *Aspergillus niger*, *Trichoderma virde* และ *Fusarium* sp. ส่วนประกอบของกรดอะมิโนในเชื้อรามีลักษณะใกล้เคียงกับพวกจุลินทรีย์อื่นๆ คือมี Sulfur amino acid ต่ำและเชื้อราจะมีวิตามินบีทุกชนิดในระดับต่ำ การใช้เชื้อราเป็นอาหารสัตว์ยังมีน้อย ส่วนใหญ่มักทดลองในหนูพบว่าทำให้หนูกินอาหารน้อยลง และมีการเจริญเติบโตไม่ดีเท่าที่ควร ส่วนเชื้อราที่ใช้เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์มานานก็คือ เห็ด

2.1.5.3 สาหร่าย (algae) เป็นจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงได้ เพราะมีคลอโรฟีลล์ การสังเคราะห์แสงเหมือนพืชชั้นสูง นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุอื่นๆ อีกทำให้สาหร่ายมีสีต่างๆ กันไป เช่น สีเขียว สีแดง สีน้ำตาล สีน้ำเงิน ซึ่งใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจัดจำแนกหมวดหมู่ของสาหร่าย หรืออาจใช้ประเภทของคลอโรฟิลล์ในการจัดจำแนกก็ได้เช่นกัน ลักษณะของเซลล์เป็นพวกยูคารีโอต มีทั้ง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

พวกที่เป็นเซลล์เดียวมีขนาดเล็กต้องส่องดูด้วยกล้อง บางชนิดมีหลายเซลล์ขนาดใหญ่อาจยาวถึง 100 ฟุต ลักษณะรูปร่างต่างกันไป เช่น รูปกลม รูปท่อน รูปเกลียว รูปแฉก รูปกระสวย บางชนิดเซลล์อาจอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เช่น *Volvox* บ้างต่อกันเป็นสาย เช่น *Anabaena* บ้างเรียงกันเป็นแผ่น เช่น *Ulva* สาหร่ายพวกที่เคลื่อนที่ได้จะอาศัยแฟลกเจลลา หรือเท้าเทียม การสืบพันธุ์มีทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ เนื่องจากสาหร่ายสังเคราะห์แสงได้บริเวณที่แสงส่องถึงจึงสามารถพบสาหร่ายได้ไม่ว่าจะเป็นแหล่งน้ำ พื้นดิน และพื้นผิวที่ชื้นแม้กระทั่งหิน สาหร่ายที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว คือ สาหร่ายเซลล์เดียว *Chlorella, Spirulina Scenedesmus, Coelastrum, Uronema* และ *Dunaliela* โดยเฉพาะ *Spirulina maxima* ชาวพื้นเมืองอัฟริกาและบางส่วนของแม็กซิโกใช้ผสมในอาหาร

คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายเซลล์เดียว สาหร่ายที่ใช้ผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวส่วนใหญ่จะมีคุณค่าทางโภชนาการที่ครบถ้วน คือ ประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 40-65% ไขมัน 2-15% คาร์โบไฮเดรท 10-145% เยื่อใย 1-12% นอกจากนี้ยังประกอบด้วยแคลเซียม 0.75-4.85% ฟอสฟอรัส 1.0-1.9% และประกอบด้วยกรดอะมิโน และวิตามินสำหรับการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงเหมาะที่จะใช้เป็นอาหารโปรตีนได้ทั้งมนุษย์และสัตว์ ในชนบทสามารถใช้เทคโนโลยีง่ายๆ ในการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเอาเซลล์มาใช้ผลิตก๊าซชีวภาพ หรือใช้เป็นอาหารสัตว์ส่วนการเลี้ยงเพื่อเป็นอาหารเสริมสุขภาพของมนุษย์จะได้ราคาดีเช่นกัน ในประเทศแถบตะวันออกไกลสามารถผลิต *Chlorella* sp. เพื่อเป็นสินค้าออก สำหรับประเทศไทยมีบริษัทสยามแอลจีผลิต *Spirulina* sp. ส่งเป็นสินค้าออกให้กับประเทศญี่ปุ่น ซึ่งประเทศญี่ปุ่นใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ ส่วนการเลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งนั้นเป็นการบำบัดน้ำทิ้งโดยใช้เซลล์ของสาหร่าย และ ยังสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนสำหรับสัตว์เลี้ยงปุ๋ยชีวภาพหรือใช้ผลิตก๊าซชีวภาพ

2.1.5.4 ยีสต์ (yeast) โปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตจากยีสต์พบว่าใช้กันมากที่สุด เนื่องจากเป็นแหล่งอาหารโปรตีนและวิตามินที่ดีจึงมีการผลิตเป็นการค้าเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์และบางชนิดก็เป็นที่ยอมรับของมนุษย์ ปริมาณโปรตีนของเซลล์ยีสต์ประมาณ 44-55% ของน้ำหนักแห้ง แต่ข้อเสียของยีสต์ คือ มีปริมาณกรดนิวคลีนิกค่อนข้างสูงประมาณ 12% มีแนวโน้มจะเป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้คือ ทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับไต และโรคเก๊า (gout) และปริมาณโปรตีนไม่สูงเท่าจุลินทรีย์บางชนิด และยังพบว่ากระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากยีสต์สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนสะสมในเซลล์สูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 2.2 จะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนหลังกระบวนการผลิตเมื่อเทียบกับ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ก่อนการผลิตนั้นมีปริมาณที่มากกว่าอย่างเห็นได้ชัด เช่น *C. lipolytica* NRRL-Y-323 ก่อนกระบวนการมี 10.4 มิลลิกรัมต่อเซลล์ หลังกระบวนการมี 75 มิลลิกรัมต่อเซลล์

ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณโปรตีนก่อนและหลังกระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวในตัวอย่างยีสต์

ยีสต์	โปรตีน (มิลลิกรัมต่อเซลล์)	
	ก่อน	หลัง
Candiad lipolytica NRRL-Y-323	10.4	75
C. lipolytica NRRL-Y-1094	13.1	100
C. lipolytica NRRL-Y-37-1	8.3	70
C. lipolytica NRRL-Y- 60-26	9.4	68
C. utilis NRRL-Y-900	6.5	42
C. intermedia NRRL-Y-6328-1	7.7	11
Saccharomyces cerevisiae (baker's yeast)	6.9	8
S. cerevisiae Strain A364A(a) (haploid)	6.9	21

ที่มา : สุมาลี เหลืองสกุล (2543)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
Rajabhat Mahasarakham University

2.1.6 ชนิดของยีสต์ที่ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (ชุตินุช สุจริต , 2542)

2.1.6.1 *Saccharomyces* sp. ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ไวน์ เหล้าต่างๆ เซลล์ที่ผ่านกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์แล้ว สามารถนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ นอกจากนี้ยังใช้ในการทำยีสต์ขนมปังได้ด้วย

2.1.6.2 Torula yeast (fodder yeast) คือ เชื้อ *Candida utills* ใช้ผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวมากที่สุด เพราะเจริญได้เร็วและเลี้ยงง่าย มีปริมาณโปรตีนสูง สามารถให้สารอาหารได้หลายชนิดรวมทั้งน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม ซึ่งเป็นน้ำตาลที่ใช้ได้ยากสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น น้ำทิ้งจากโรงงานเยื่อกระดาษ

2.2 ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับยีสต์ (สุมณฑา วัฒนสินธุ, 2549)

2.2.1 ความหมายของยีสต์

ยีสต์ (yeast) คือ รากลุ่มหนึ่งที่ส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม รี สามเหลี่ยม รูปร่างแบบมะนาว ฝรั่ง เป็นต้น ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการแตกหน่อ พบทั่วไปในธรรมชาติในดิน ในน้ำ ในส่วนต่างๆ ของพืช ยีสต์บางชนิดพบอยู่กับแมลง และในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แต่แหล่งที่พบยีสต์อยู่บ่อยๆ คือแหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวาน ยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติมักจะปนลงไปในอาหารเป็นเหตุให้อาหารเน่าเสียได้ ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กมาก มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส จัดอยู่ในกลุ่มจำพวกเห็ด รา มีทั้งที่เป็นประโยชน์และโทษต่ออาหาร มีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์นานมาแล้ว โดยเฉพาะการผลิตอาหารที่มีแอลกอฮอล์จากคุณสมบัติที่มีขนาดเซลล์เล็กมาก สามารถเพาะเลี้ยงให้เกิดได้ในเวลาอันรวดเร็ว และวิธีการไม่ยุ่งยาก

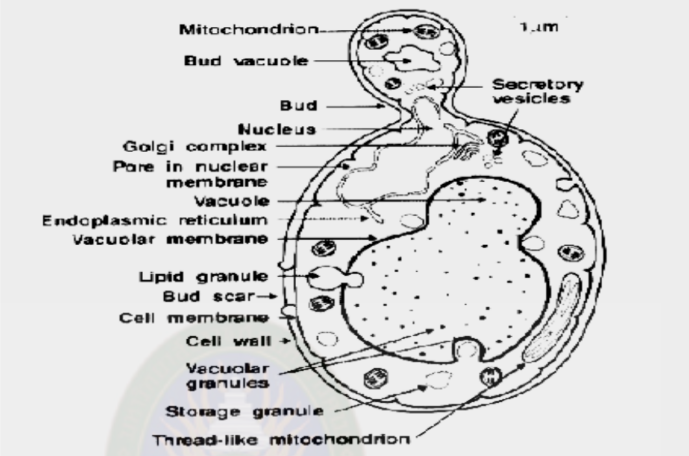
ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่รู้จักกันมาตั้งแต่สมัยโบราณถึงกับมีผู้กล่าวว่า ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์นำมาใช้ รายงานแรกเกี่ยวกับการใช้ยีสต์ คือการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Heineken เมื่อประมาณ 6,000 ปีก่อนคริสต์ศักราช คนไทยรู้จักใช้ประโยชน์จากยีสต์มาเป็นเวลานาน เช่น ในการทำอาหารหมักบางชนิด ได้แก่ ข้าวหมาก ปลาแจ่ว เครื่องดอง ของเมาหลายชนิด เช่น อุ สาโท และกระแช่ เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น การผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เช่น เบียร์ ไวน์ และวิสกี้ การผลิตเอทิลแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นสารเคมี และเชื้อเพลิง การผลิตเซลล์ยีสต์เพื่อใช้เป็นยีสต์ขนมปังและเป็นโปรตีนเซลล์เดียว ราบางประเภทสามารถนำมาใช้ในการผลิตสุราได้แต่ราบางชนิดที่เพาะมาเป็นพิเศษก็เป็นราที่ผลิตมาเพื่อการค้าและมีลิขสิทธิ์เฉพาะ เช่น รา คาลสเบิร์กโนเจนซิส เป็นราลิขสิทธิ์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์คาลสเบิร์ก

ยีสต์ มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ได้ โดยหลักการทำงานของยีสต์ หรือ เบเกอร์ยีสต์ ที่ใส่ให้ขนมปังฟู เนื่องมาจากยีสต์ที่ใส่ลงไปมีการใช้น้ำตาลในแป้งขนมปัง ระหว่างที่ยีสต์กินอาหารจะเกิดการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน สลายกลูโคสได้ Adenosine triphosphate และคายก๊าซคาร์บอนไดออกไซต์ออกมา และเมื่อเราเอาแป้งไปอบ ก๊าซที่มันคายออกมาก็ผุดขึ้นมาระหว่างเนื้อขนมปังทำให้เกิดรูพรุนจนฟูขึ้นมา ส่วนพวกบริวเวอร์ยีสต์ ซึ่งเป็นยีสต์ที่นำมาหมักทำเบียร์และไวน์ มีรสชาติค่อนข้างรุนแรง บริวเวอร์ยีสต์ ประกอบไปด้วยธาตุ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

อาหารมาก มีกรดอะมิโน 16 ชนิด เกลือแร่ 14 ชนิด วิตามิน 17 ชนิด นอกจากนี้ยังมีเกลือแร่สูง คือ โครเมี่ยม สังกะสี เหล็ก ฟอสฟอรัส และเซเลเนียม อีกทั้ง บริวเวอร์ยีสต์ ยังเป็นแหล่งสำคัญของโปรตีนถึง 16 กรัมต่อปริมาตรยีสต์ 30 กรัม มีมากถึง 50-55 %

2.2.2 องค์ประกอบของเซลล์ยีสต์



ภาพที่ 2.1 รูปร่างยีสต์ และโครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์
(เมทินี มาเวียง, 2554)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ยีสต์มีโครงสร้างของเซลล์แบบยูคาริโอต รูปร่างและโครงสร้างของยีสต์จะแตกต่างไปตามสปีชีส์ เนื่องจาก *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีความสำคัญทางเกษตร และอุตสาหกรรมมาก จึงทำให้มีผู้ศึกษารายละเอียดของยีสต์ชนิดนี้มาก แต่ในปัจจุบันได้มีการศึกษายีสต์ชนิดอื่นเพิ่มขึ้น เช่น *Hansenula, Rhodotorula* และอื่นๆ โดยเฉพาะการใช้เทคนิคของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำให้สามารถศึกษาผนังเซลล์และการตัดเฉือนเซลล์เป็นแผ่นบางๆ ได้ จึงสามารถสังเกตโครงสร้างและตำแหน่ง และทำนายการทำงานขององค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ได้ ดังนี้

2.2.2.1 แคปซูล (capsule) ยีสต์บางชนิดมีสารเมือกเหนียวที่ขับออกสู่ภายนอกเซลล์ที่เรียกว่าแคปซูล แคปซูลส่วนใหญ่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีทั้งเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ แมนโนสและสารที่คล้ายแป้ง

2.2.2.2 ผนังเซลล์ (cell wall) ผนังเซลล์ของยีสต์จะบางในเชื้ออายุน้อยและจะหนาขึ้นตามอายุ องค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* มีพอลิแซ็กคาไรด์ 2 ชนิด คือ กลูแคน 30-34% และแมนแนน 30% กลูแคน (ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่

พบในยีสต์ต่างๆ แต่แมนแนน (ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส) จะไม่พบในผนังเซลล์ของ *Schizosaccharomyces, Nadsonia, Rhodotorual* และราที่มีเส้นใยทุกชนิด ผนังเซลล์ของยีสต์มีโปรตีนประกอบอยู่ด้วย โปนตีนบางชิดทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ไขมันมีอยู่ 8.5–13.5% ปริมาณไคติน (chitin) เปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของยีสต์

2.2.2.3 เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เยื่อหุ้มเซลล์มีความหนาประมาณ 8 ไมโครเมตร ประกอบด้วยชั้น 3 ชั้น ที่ทึบต่อแสงอิเล็กตรอน 2 ชั้น คือ ชั้นนอกและชั้นในสุด เยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยไขมัน (รวมทั้งฟอสโฟลิพิด) โปรตีน และ พอลิแซ็กคาไรด์

องค์ประกอบในโพรโทพลาซึม (protoplasm) เซลล์ยีสต์ประกอบด้วยไซโทพลาซึม ซึ่งเป็นสารกึ่งเหลว ภายในมีไรโบโซมที่มี RNA มาก และออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม ได้แก่ เอนโด พลาสมิกเรติคิวลัม ซึ่งเชื่อมติดต่อกับเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นนอก และอาจติดต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย ในไซโทพลาซึมมีเอนไซม์หลายชนิด

2.2.2.4 นิวเคลียส (nucleus) เป็นออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสล้อมรอบ เยื่อหุ้มนิวเคลียสมีสมบัติยอมให้สารบางอย่างผ่านได้เท่านั้น (semipermeable membrane) นิวเคลียสมีหน้าที่เกี่ยวกับเมแทบอลิซึม และการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต

2.2.2.5 ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เป็นออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม มีลักษณะคล้ายเส้นด้ายพับกันอยู่ ไมโทคอนเดรียมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.3-1 ไมโครเมตร และความยาวถึง 3 ไมโครเมตร มีเยื่อหุ้มสองชั้น ชั้นในจะพับเว้าเข้าข้างในเป็นคริสตี (cristae) ไมโทคอนเดรียประกอบด้วยลิโพโปนตีนจำนวนมาก และมี RNA และ DNA เล็กน้อย DNA นี้ต่างจาก DNA ของนิวเคลียส เนื่องจากไมโทคอนเดรียมีเอนไซม์เกี่ยวกับการหายใจ จึงเรียกว่าเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์

2.2.2.6 แวคิวโอล (vacuole) ภายในเซลล์ยีสต์จะมีแวคิวโอลอยู่หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งแวคิวโอล ซึ่งมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเมื่อย้อมสี ในเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตภายในแวคิวโอลจะไม่มีโครงสร้างที่เป็นชิ้นส่วน แต่เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ (stationary phase) แวคิวโอลจะมีสารแกรนูลเพิ่มขึ้น อาจเป็นเมตาฟอสเฟต (metaphosphate) พอลิฟอสเฟต (polyphosphate) หรือลิพิด สารที่อยู่ในแวคิวโอลที่เคยแยกได้ ได้แก่ เอนไซม์ที่เกี่ยว กับการไฮโดรไลซ์ปฏิกิริยาต่างๆ เช่น โปรตีนเอส (Protease) ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease) และเอสเทอเรส (esterase) จากการที่พบเอนไซม์ไฮโดรเลสในแวคิวโอล จึงคิดว่าแวคิโอลเปรียบเหมือนไลโซโซม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.2.2.7 อินคลูชันต่างๆ (inclusion) เซลล์ยีสต์ที่แก่จะมีผนังเซลล์หนาขึ้นและสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น ความร้อน ความแห้งแล้ง และสารเคมี ยีสต์บางชนิดสะสมสารต่างๆ ไว้จำนวนมาก เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือโปรตีน บางชนิดมีรงควัตถุมีเหลือง ส้ม ชมพู น้ำตาลหรือดำ รงควัตถุเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นคาโรทีนอยด์ที่ละลายในไขมัน นอกจากนี้รงควัตถุ เช่น ไซโตโครม เฟลวิน ฮีโมโกลบิน และอื่นๆ ที่พบในเซลล์พืชและสัตว์ชั้นสูง ก็พบในยีสต์ด้วย

2.2.3 การสืบพันธุ์ของยีสต์

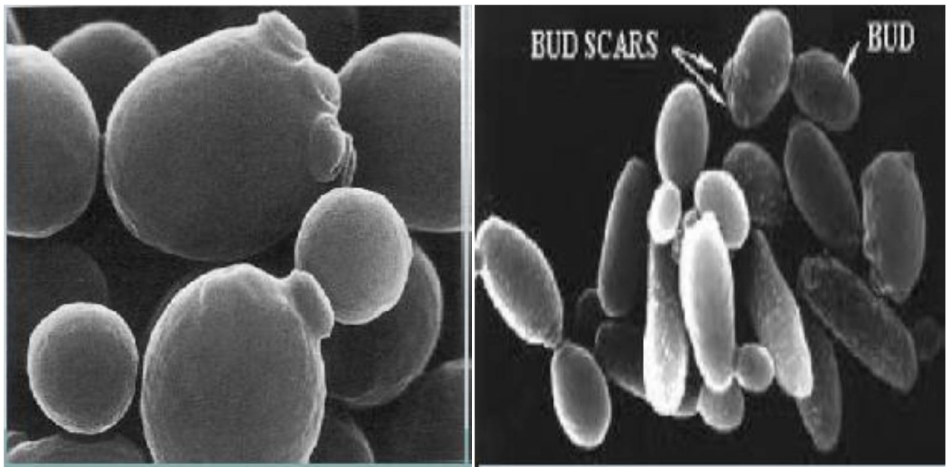
การขยายพันธุ์ของยีสต์ที่สำคัญมี 3 วิธีคือ

2.2.3.1 การแตกหน่อ (budding) ยีสต์ส่วนมากขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ ยีสต์ตามปกติมักจะมีผนังเซลล์หนา เมื่อเวลาขยายพันธุ์ผนังเซลล์ของยีสต์ก็จะอ่อนตัวปล่อยให้นิวเคลียสและโพรโทพลาซึมจากเซลล์แม่ไหลไปยังส่วนที่จะเกิดเป็นหน่อหรือเซลล์ลูกเหมือนหน่อโตเต็มที่ก็จะหลุดจากเซลล์แม่ทันทีหรืออาจแตกหน่อต่อไปได้อีก ยีสต์จะมีการแตกหน่อตรงส่วนไหนของเซลก็ได้ แต่ส่วนมากแล้วหน่อจะเกิดขึ้นที่ปลายของเซลล์

2.2.3.2 การแบ่งตัวของเซลล์จากหนึ่งเป็นสอง (binary fission) การขยายพันธุ์นี้เกิดขึ้นโดยที่เซลล์สร้างผนังกั้นขึ้นภายในเซลล์ นิวเคลียสแบ่งตัวออกเป็นสองส่วนผนังกั้นจะกันแบ่งออกเป็นสองเซลใหม่ที่สร้างขึ้นจะแยกออกจากเซลล์เดิม

2.2.3.3 การสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อและการสร้างผนังกั้นแบ่งเซลล์ร่วมกัน (budfission) เซลล์ที่มีการขยายพันธุ์เริ่มแตกหน่อขึ้นที่ปลายเซลล์และที่ฐานของหน่อมีผนังกั้นระหว่างเซลล์ลูกและเซลล์แม่ ยีสต์ที่ขยายพันธุ์แบบนี้ เช่น *Pityrosporum*

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



ภาพที่ 2.2 การแตกหน่อของยีสต์

(เมทินี มาเวียง, 2554)

สปอร์ของยีสต์ เมื่ออยู่ที่สภาพที่ไม่เหมาะสม ยีสต์ส่วนใหญ่จะสร้างสปอร์ขึ้นการสร้างสปอร์ของยีสต์มีความสำคัญมาก ทั้งนี้เพราะการสร้างสปอร์เป็นขั้นตอนหนึ่งในวัฏจักรชีวิตของยีสต์ สปอร์ที่ยีสต์สร้างขึ้นเรียกว่า แอสโคสปอร์ (ascospore) โดยที่ยีสต์ใช้ตัวเองทำหน้าที่เป็นถุงหุ้มห่อสปอร์ไว้ยีสต์ส่วนมากมี แอสโคสปอร์ 4 สปอร์บางชนิดก็มี 8 สปอร์ หรือมากกว่า ยีสต์แต่ละชนิดมีสปอร์และรูปร่างต่างกัน การจำแนกชนิดของยีสต์จำเป็นต้องใช้จำนวนและรูปร่างของสปอร์ที่แตกต่างกันนี้เป็นหลักเกณฑ์ ด้วยเหตุที่ว่าสปอร์สามารถทนต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี จึงพบว่ายีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติส่วนมากเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์ได้ดีแอสโคสปอร์มีผนังเซลล์หนามากทนต่อสภาพการแช่เยือกแข็ง การทำแห้ง ความร้อน และ สารเคมีได้ดีกว่าเซลล์ธรรมดา แต่แอสโคสปอร์ของยีสต์สามารถทนความร้อนได้มากกว่าเซลล์ยีสต์ธรรมดาเพียง 6-12 องศาเซลเซียสเท่านั้น ซึ่งเป็นสมบัติที่ตรงกันข้ามกับสมบัติของสปอร์ของแบคทีเรียที่สามารถทนความร้อนได้ดีกว่าเซลล์ของแบคทีเรียมากมาย

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.3 การเจริญของยีสต์

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการเจริญของยีสต์ ได้แก่

2.3.1 แหล่งคาร์บอนและพลังงาน

ยีสต์ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและปราศจากออกซิเจน ยีสต์ส่วนมากจะใช้น้ำตาล เช่น น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรักโทส และ น้ำตาลแมนโนส ได้ดี บางชนิดก็สามารถใช้แป้งได้ เช่น *Endomycopsis fibuligera* บางชนิดสามารถใช้คาร์โบไฮเดรต ได้เช่น *Fabospora fragilis* บางชนิดสามารถใช้น้ำตาลเพนโตส ได้เช่น *Candida utilis* นอกจากนี้บางชนิดยังสามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ด้วย

2.3.2 แหล่งไนโตรเจน

ยีสต์ต้องการแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการสร้างโปรตีนของตัวเอง แหล่งไนโตรเจนที่ยีสต์นำมาใช้ได้มีหลายอย่าง ยีสต์ทุกชนิดใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ส่วนแอมโมเนียมฟอสเฟต โมโนและไดแอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต แอมโมเนียมคาร์บอเนต แอมโมเนียมทาร์เตรทและยูเรียนั้น ยีสต์หลายชนิดสามารถใช้ได้ดี ในการผลิตยีสต์เพื่อเป็นอาหารเสริมโปรตีนส่วนมากนิยมใช้สารละลายแอมโมเนียซัลเฟตหรือยูเรีย

2.3.3 แหล่งฟอสฟอรัส

ยีสต์ต้องการแหล่งฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการสร้างพลังงาน เซลล์ยีสต์มีความสามารถดูดซึมสารโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตได้ดีกว่าไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต สารอาหารอื่นๆ นั้น ยีสต์ต้องการในปริมาณต่ำ ได้แก่ แร่ธาตุต่างๆ เพื่อเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ต่างๆ เช่น แมกนีเซียม โคบอลท์ โมลิบดีนัม ทองแดง และสังกะสี เป็นต้น นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการปัจจัยต่อการเจริญเติบโต (growth factor) บางชนิด เช่น ไบโอติน แพนโททีนิคแอซิดอิโนซิโทล ไทอามีน นิโคลินิคแอซิด ไมริดอกซิน และโฟลิคแอซิด เป็นต้น

2.3.4 อุณหภูมิ

ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีระหว่าง 20–30 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมของยีสต์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เช่น *E. fibuligera* กับ *S. cerevisiae* นำมาหมักแบบ Symba yeast กระบวนการหมักในมันเส้น 5% โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม 35 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.3.5 pH ของอาหาร

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเป็นกรดมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ปกติ pH ที่เหมาะสมของยีสต์ทั่วไปอยู่ระหว่าง 4.5-5.5 pH ที่เหมาะสมแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เช่น *C. utilis* pH ที่เหมาะสมคือ 4.5-5.5 และ *E. Fibuligera* pH ที่เหมาะสมคือ 6.0 เป็นต้น

2.4 กากน้ำตาล (สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์, 2553)

กากน้ำตาล (molasses) เป็นของเหลวที่มีลักษณะข้นเหนียวสีน้ำตาลดำ ที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย ผลพลอยได้ที่สำคัญจากการผลิตน้ำตาลทราย ได้แก่ กากน้ำตาล (molasses) ขี้ตะกอน (filter cake) และกากอ้อย (bagasses) กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้ที่มีคุณค่ามากที่สุด เป็นส่วนของของเหลวที่เหลือหลังจากการแยกเอาผลึกของน้ำตาลออกแล้วมีลักษณะเหนียวข้น สีน้ำตาลเข้ม องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครสที่ไม่ตกผลึก ในการผลิตน้ำตาลทรายนั้นจะมีกากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้เกิดขึ้นประมาณ 4-6% ของปริมาณอ้อยที่ใช้ในการผลิต

ภาพที่ 2.3 กากน้ำตาล (molasses)
(นฤมล โตอ่อน, 2549)

2.4.1 ชนิดของกากน้ำตาลมี 3 ชนิด (ชาตรี พลชัย, 2554)

2.4.1.1 Blackstrap molasses เป็นกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว (plantation white sugar) จะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณ 50-60%

2.4.1.2 Refinery molasses เป็นกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (refine sugar) จะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณ 48%

2.4.1.3 Highest molasses กากน้ำตาลที่ได้จากการนำบางส่วนของน้ำอ้อยแปรสภาพให้เข้มข้นโดยการระเหย (inverted cane juice) วิธีนี้เป็นการผลิตน้ำตาลโดยตรง

2.4.2 ประโยชน์และส่วนประกอบของกากน้ำตาล

ประโยชน์ของกากน้ำตาลสามารถใช้ได้ในหลายอุตสาหกรรม เช่น ใช้ทำปุ๋ย ใช้เลี้ยงสัตว์ใช้ผลิตแอลกอฮอล์ ใช้ในอุตสาหกรรมยีสต์ ใช้ทำผงชูรส และใช้ทำกรดน้ำส้ม แต่ส่วนใหญ่จะใช้ผลิตแอลกอฮอล์ และใช้เป็นอาหารสัตว์ สำหรับในประเทศไทยส่วนใหญ่จะใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์สำหรับการผลิตสุรา และการผลิตเอทานอล เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตแก๊สโซฮอล์ นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตผงชูรส อุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมการผลิตยีสต์ ตลอดจนการนำกากน้ำตาลไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมรายย่อยต่าง ๆ เช่น นำกากน้ำตาลไปใช้หมักทำปุ๋ยน้ำ ใช้ทำน้ำสกัดชีวภาพ ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อใช้ในฟาร์มกุ้ง ตลอดจนใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งประโยชน์ของกากน้ำตาลมีดังนี้

2.4.2.1 เหล้ารัม เป็นสุรากลั่นที่ผลิตจากวัตถุดิบจำพวกน้ำอ้อย น้ำเชื่อมของน้ำผลไม้และกากน้ำตาล

2.4.2.2 เหล้ายิน หรือ "ไดร์ยิน" โดยการนำกากน้ำตาลที่ทำให้บริสุทธิ์ไปหมักและกลั่น

2.4.2.3 น้ำส้มสายชู ได้จากการหมักกากน้ำตาล

2.4.2.4 ซีอิ๊วดำ ทำจากซีอิ๊วขาวผสมกับกากน้ำตาล แล้วนำไปต้มจนได้ความเข้มข้นพอเหมาะ สามารถนำไปใช้สำหรับปรุงอาหาร

2.4.2.5 อาหารสัตว์ กากน้ำตาลใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น วัว ควาย แพะ เพราะกากน้ำตาลจะช่วยเพิ่มรสชาติแก่อาหารสัตว์แล้วยังช่วยกระตุ้นการทำงานของแบคทีเรียในกระเพาะซึ่งจะช่วยย่อยอาหารหยาบ เช่น ยอดอ้อย ฟางข้าว การใช้กากน้ำตาลเลี้ยงสัตว์ส่วนใหญ่ใช้เพื่อเพิ่มความน่ากิน ลดฝุ่นและเพื่อยึดเม็ดอาหารให้แน่นขึ้น หรือใช้เป็นพาหะสำหรับยา

2.4.2.6 แอลกอฮอล์ โดยนำเอากากน้ำตาลมาทำให้เจือจางด้วยน้ำแล้วหมักโดยอาศัยเชื้อยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์ จากนั้นก็นำมากลั่นแยกแอลกอฮอล์ออกซึ่งจะได้แอลกอฮอล์ที่มี ความบริสุทธิ์ประมาณ 95% ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้แตกต่างกันไปตามคุณภาพของ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

กากน้ำตาล ตลอดจนกรรมวิธีการผลิตแอลกอฮอล์ของโรงงานนั้น โดยกากน้ำตาลหนัก 1 ตันจะให้แอลกอฮอล์ประมาณ 238-340 ลิตร

2.4.2.7 ผลิตไฟฟ้า โดยการย่อยสลายสารอินทรีย์จากกากน้ำตาลในบ่อหมักจะได้ก๊าซชีวภาพออกมา ซึ่งประกอบด้วยก๊าซหลัก ได้แก่ ก๊าซมีเทน 65% เป็นก๊าซติดไฟ ให้ความร้อน 9,000 กิโลแคลอรีต่อลูกบาศก์เมตร ร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ 35% และก๊าซอื่นๆ เช่น ก๊าซไข่เน่า ก๊าซไนโตรเจน และความชื้น

กากน้ำตาลถูกนำมาใช้ประโยชน์ในแหลงอุตสาหกรรมเนื่องจากกากน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นที่มีองค์ประกอบหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.3 จึงนำมาประยุคใช้ได้หลายด้าน ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบของกากน้ำตาล

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
น้ำ	17-25
ซูโครส	30-40
กลูโคส	4-9
ฟรุกโทส	5-12
น้ำตาลรีดิวส์อื่นๆ	1-5
คาร์โบไฮเดรตอื่นๆ	2-5
เถ้า	7-15
สารประกอบไนโตรเจน	2-6
กรดที่ไม่มีไนโตเจน	2-8

ที่มา : สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์ (2553)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.5 การใช้ยีสต์เสริมในอาหารสัตว์ (Jouany *et al*., 1998)

ศักยภาพในการใช้ประโยชน์ของยีสต์ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง ยีสต์เป็นราที่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดียว ยีสต์นอกจากจะเป็นแหล่งของจุลินทรีย์โปรตีนให้กับสัตว์เคี้ยวเอื้องแล้ว ยีสต์มีชีวิตเมื่อเสริมในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องยังเป็นสารเสริมชีวนะสามารถปรับปรุงกระบวนการหมักในกระเพาะรูเมนของ

สัตว์เคียวเอื้องให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยมีกลไกคือสามารถใช้ออกซิเจนในกระเพาะรูเมนในการเผาผลาญน้ำตาลและ โอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ จากอาหารหรือเป็นผลผลิตที่ได้จากกิจกรรมของ Amylolytic bacteria และยีสต์ยังเป็นแหล่งวิตามิน แร่ธาตุ และกรดอะมิโนสำหรับจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน ส่งผลให้ภายในกระเพาะรูเมนมีสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ รวมถึงจุลินทรีย์ยังได้รับสารอาหารจากยีสต์ ส่งผลต่อการเพิ่มการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการย่อยได้ของโภชนะภายในกระเพาะรูเมนทำให้การกินได้เพิ่มสูงขึ้น สัตว์ได้รับโภชนะเพิ่มสูงขึ้น สนับสนุนให้สัตว์เพิ่มสมรรถภาพการผลิต โดยเฉเพาะอย่างยิ่งเพิ่มผลผลิตน้ำนมและองค์ประกอบของน้ำนม เพิ่มอัตราการเจริญเติบโต จากคุณสมบัติต่างๆ เหล่านี้ยีสต์จึงเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่น่าสนใจที่จะศึกษาเพื่อเป็นแนวทางในการนำมาใช้เป็นแหล่งโปรไบโอติกในสัตว์เคี้ยวเอื้องเพื่อเพิ่มสมรรถภาพการผลิตสัตว์เคี้ยวเอื้อง อย่างไรก็ตามในการใช้ยีสต์ในสัตว์เคี้ยวเอื้องควรคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ที่มาเกี่ยวข้องไม่ว่าจะเป็นสภาวะของสัตว์นั้นๆ วัตถุดิบอาหารที่ใช้ สัดส่วนของอาหารหยาบต่ออาหารข้น ปริมาณยีสต์ที่ใช้เสริมและความคุ้มค่าในการนำไปใช้ ปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์เคี้ยวเอื้องมีการขยายตัวเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งในการเลี้ยงสัตว์นั้นอาหารและการให้อาหารนับว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างมาก เพราะต้นทุนในการเลี้ยงสัตว์ 60-70% เป็นค่าใช้จ่ายทางด้านอาหาร โดยเฉพาะในช่วงฤดูแล้งจะประสบปัญหาการขาดแคลนแหล่งวัตถุดิบอาหารทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพ ทำให้เกษตรกรต้องเสียค่าใช้จ่ายจำนวนมากในการซื้อวัตถุดิบอาหารสัตว์จากต่างถิ่นที่มีราคาแพงมาใช้ในการประกอบสูตรอาหารสัตว์ การใช้วัตถุดิบอาหารที่มีในท้องถิ่น หาซื้อได้ง่ายและราคาถูก มาเป็นแหล่งอาหารสัตว์ เช่น มันสำปะหลังซึ่งเป็นพืชที่ปลูกได้ทั่วไปตามภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วนและยังเป็นแหล่งพลังงานที่ดีและมีราคาถูก นอกจากนี้ปัจจุบันนิยมนำเอาโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein, SCP) คือ เซลล์จุลินทรีย์ ที่ทำแห้งเพื่อนำมาเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ จุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว เช่น สาหร่าย แบคทีเรีย ยีสต์ รา และ เห็ด ลักษณะที่ดีของสิ่งมีชีวิตที่จะใช้เป็นแหล่งโปรตีนเซลล์เดียว คือ เจริญเร็วใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก มีประสิทธิภาพสูงในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถเลี้ยงโดยใช้กระบวนการอย่างง่าย สามารถแยกเซลล์โดยใช้กระบวนการง่ายๆ ไม่เป็นเชื้อโรค ไม่เป็นอันตรายต่อคนและสัตว์ที่ได้รับ รสชาติดี ย่อยง่าย และมีคุณค่าทางอาหารสูง ยีสต์จึงมีความเหมาะสมเนื่องจากสามารถเจริญในวัตถุดิบราคาถูกและใช้อาหารที่มีองค์ประกอบง่ายๆ มีความต้องการ Growth factor ต่างๆ น้อย ใช้แหล่งพลังงานที่ได้อย่างมี

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ประสิทธิภาพ มีความต้านทานต่อการปะปนของจุลินทรีย์อื่น แยกเก็บเซลล์ง่าย มีของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้อย คงลักษณะทางพันธุกรรมดี ไม่กลายพันธุ์ง่ายเมื่อเลี้ยงไปเป็นระยะเวลานานติดต่อกัน มีความเข้าใจลักษณะทางพันธุกรรมและสรีรวิทยาทำให้สามารถปรับปรุงพันธุกรรมได้สะดวก รวมทั้งไม่เป็นพิษ เก็บรักษาง่าย เช่น การทำให้แห้ง ซึ่งยีสต์ที่นิยมนำมาเป็นแหล่งวัตถุดิบอาหารสัตว์ คือ ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* นอกจากยีสต์จะเป็นแหล่งอาหารที่มีโปรตีนคุณภาพสูงโดยเฉพาะเป็นแหล่งของกรดอะมิโนไลซีนในปริมาณที่สูงให้กับสัตว์เคี้ยวเอื้อง นอกจากนั้นยังสามารถใช้เซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตเสริมในอาหารสัตว์ เพื่อเป็นสารเสริมชีวนะ (probiotics) สามารถช่วยปรับปรุงกระบวนการหมักภายในกระเพาะรูเมนได้ดียิ่งขึ้น เพื่อให้ทราบถึงศักยภาพในการใช้ยีสต์เพื่อเป็นแหล่งโปรไบโอติกส์ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง

2.5.1 ศักยภาพในการใช้ยีสต์เพื่อปรับปรุงกระบวนการหมักภายในกระเพาะรูเมน

(สินีนาฎ พลโยราช และเมธา วรรณพัฒน์, 2558)

ยีสต์มีศักยภาพในการเป็นแหล่งโปรไบโอติก ในสัตว์เคี้ยวเอื้องซึ่งสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในกระเพาะรูเมนได้ทั้งนี้เนื่องจากภายในกระเพาะรูเมนซึ่งมีความจุมากที่สุดเมื่อเทียบกับกระเพาะส่วนอื่นๆ ในโค มีความจุประมาณ 100-150 ลิตร ภายในมีสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic) มีอุณหภูมิคงที่ประมาณ 39 องศาเซลเซียส ค่า pH ประมาณ 6-7 ภายในมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา (dynamic) ภายในกระเพาะรูเมนมีประชากรของจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย โปรโตซัว และเชื้อรา) อยู่อย่างหนาแน่นและทำหน้าที่ในการย่อยอาหารได้ถึง 60 -70 % ของการย่อยได้ทั้งหมด (Jouany *et al*., 1998)

2.5.1.1 ยีสต์สามารถเข้าไปแย่งใช้ กลูโคส และ โอลิโกแซ็คคาไรด์ สายเล็กๆ ที่ได้จากการย่อยของ Amylolytic bacteria ที่เกาะติดอยู่กับเม็ดแป้งทำให้มีกลูโคสที่จะใช้ประโยชน์โดยแบคทีเรีย *Streptococcus bovis* น้อยลงซึ่ง *S. cerevisiae* สามารถใช้กลูโคสได้มากถึง 4 กรัม

2.5.1.2 ยีสต์สามารถใช้ออกซิเจน ที่เข้าสู่กระเพาะรูเมนโดยทางอาหารและน้ำที่กินเข้าไปเพื่อใช้ในการผลิตพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตของตัวยีสต์เอง

2.5.1.3 ยีสต์เป็นแหล่งโภชนะสำหรับจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน เนื่องจากยีสต์มีส่วนประกอบของวิตามิน แร่ธาตุ และกรดอะมิโนในปริมาณที่สูง โดยยีสต์สามารถสะสม Malate และปลดปล่อยออกมานอกเซลล์และยีสต์สามารถปลดปล่อยโปรตีนออกมานอกเซลล์ ในรูปของเอนไซม์หรือโปรตีนที่เกาะอยู่กับผนังเซลล์ นอกจากนี้ยีสต์สามารถสังเคราะห์ Mannoproteins จำนวนมาก

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เพื่อใช้เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ระหว่างการเจริญเติบโต โปรตีนหรือ Peptide บางส่วนถูกปลดปล่อยออกมาขณะอยู่ในช่วง Stationary phase หลังจากที่ยีสต์ผ่านกระบวนการสลายตัวเอง (autolysed) โปรตีน แร่ธาตุและ วิตามินจาก Cytosal, เบต้า-กลูแคน และ Mannoproteins จากผนังเซลล์ สามารถใช้ประโยชน์โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในกระเพาะรูเมน จากกลไกลต่างๆ ทำให้การเสริมยีสต์ในสัตว์เคี้ยวเอื้องมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการหมักภายในกระเพาะรูเมน

2.5.2 ผลของยีสต์ต่อการเมตาบอลิซึมของไนโตรเจน และการย่อยได้ของโภชนะ

(สินีนาฎ พลโยราช และเมธา วรรณพัฒน์, 2558)

กระเพาะรูเมนมีการย่อยโปรตีนอย่างรวดเร็วโดยแบคทีเรียและโปรโตซัวภายในกระเพาะรูเมน ผลผลิตที่ได้คือ สายเปปไทด์ กรดอะมิโน และแอมโมเนีย (Wallace *et al.*, 1990) แอมโมเนียบางส่วนถูกนำมาสังเคราะห์เป็นจุลินทรีย์โปรตีน ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญในสัตว์เคี้ยวเอื้องและบางส่วนสัตว์สามารถนำกลับมาใช้ได้อีกในรูปของยูเรีย ซึ่งในระหว่างนี้ปริมาณการผลิตแอมโมเนียในกระเพาะรูเมนมีความสำคัญอย่างยิ่ง มีการสูญเสียไนโตรเจนไปประมาณ 20-25% ของไนโตรเจนที่กินเข้าไป (Leng & Nolan, 1984) และเมื่อขับออกจากร่างกายยังเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม มากไปกว่านั้นอาหารโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนะสูงไม่สามารถดูดซึมในลำไส้เล็ก เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในตัวสัตว์ได้โดยตรง พารามิเตอร์ที่ใช้วัดผลของยีสต์ต่อการปลดปล่อยไนโตรเจนในตัวสัตว์ คือ ค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียต่อไนโตรเจน ซึ่งมีความแปรปรวนตามอาหารที่กินและความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ ผลของการเสริมยีสต์ต่อการย่อยของโภชนะขึ้นอยู่กับสัดส่วนของอาหารเข้มข้นและอาหารหยาบ (Carro *et al*., 1992)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.5.3 ผลของยีสต์ต่อการเมตาบอลิซึมของไฮโดรเจน และการผลิตก๊าซมีเทน

(สินีนาฎ พลโยราช และเมธา วรรณพัฒน์, 2558)

ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง ไฮโดรเจนเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการ Hydrolysis และกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ภายในกระเพาะรูเมน ซึ่งจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซจะนำไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์มาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตก๊าซ ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างไฮโดรเจนที่ผลิตได้และการนำไฮโดรเจนเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์โดยจุลินทรีย์เรียกว่า “Interspecies hydrogen transfer” (Iannotti *et al*., 1973) ผลที่ตามมาคือ มีการขับก๊าซออกจากโคประมาณ 400-500 ลิตรต่อวัน ซึ่งจะทำให้สูญเสียคาร์บอนและพลังงานประมาณ 8-12% ของพลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ในอาหาร ปริมาณการสังเคราะห์ก๊าซมีเทนแปรปรวนตามอาหารที่กิน (สัดส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบ) และ

วิธีการเลี้ยง (intensive/extensive) มากไปกว่านั้นก๊าซมีเทนยังเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจกจึงจำเป็นต้องมีการลดการผลิตเนื่องจากก๊าซมีเทนมีส่วนประกอบประมาณ 18-20% ของก๊าซทั้งหมดที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก (Moss *et al.,* 2000)

คุณลักษณะที่ดีของยีสต์ ทำให้ยีสต์มีศักยภาพสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีคุณภาพสูง โดยเฉพาะกรดอะมิโนไลซีน และนอกจากนี้ยีสต์มีชีวิตยังสามารถนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะช่วยปรับปรุงกระบวนการหมัก ซึ่งระดับที่เหมาะสมในการเสริมยีสต์ในโคนม แกะนม และแพะควรเสริมที่ระดับ 6 กรัมต่อตัวต่อวัน โดยยีสต์มีผลต่อการรักษาค่า pH ภายในกระเพาะ สามารถใช้ประโยชน์จากออกซิเจนภายในกระเพาะรูเมนได้ทำให้ระบบนิเวศวิทยาภายใน กระเพาะรูเมนมีความเหมาะสมต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ที่ย่อยเยื่อใย และนอกจากนี้ยีสต์ยังเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญให้กับจุลินทรีย์ต่างๆ ในกระเพาะรูเมนโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่ใช้ประโยชน์จากกรดแลคติกและ Acetogenic bacteria ทำให้มีการย่อยได้ของอาหารเพิ่มสูงขึ้นเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้ประโยชน์จากอาหารโปรตีนลดการผลิตก๊าซ ส่งผลต่อการเพิ่มศักยภาพในการให้ผลผลิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งเพิ่มผลผลิตน้ำนมและองค์ประกอบของน้ำนมเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตมีผลต่อการลดสัดส่วนของเนื้อต่อกระดูกและลดความสว่างของเนื้อ ในการใช้ยีสต์ในสัตว์เคี้ยวเอื้องมีหลายปัจจัยที่มาเกี่ยวข้องไม่ว่าจะเป็น สภาวะของสัตว์นั้นๆ วัตถุดิบอาหารที่ใช้ สัดส่วนของอาหารหยาบต่ออาหารข้น และปริมาณยีสต์ที่เสริม จากคุณสมบัติต่างๆ ที่ได้กล่าวมาแล้ว ยีสต์จึงเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาใช้เพื่อเพิ่มสมรรถภาพในสัตว์เคี้ยวเอื้องมากไปกว่านั้นในอนาคตควรมีการศึกษาถึงการนำยีสต์มาใช้ร่วมกับผลพลอยได้ทางการเกษตรและแหล่งวัตถุดิบอาหารสัตว์ในท้องถิ่น ที่มีราคาถูก เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนะของวัตถุดิบอาหารเหล่านี้ รวมถึงการเพิ่มศักยภาพของการให้ผลผลิตโดยลดต้นทุนการผลิตสัตว์เคี้ยวเอื้องต่อไป

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี และคณะ (2556) ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว จากเปลือกสับปะรดด้วยการหมักร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* และ *Bacillus subtilis* (บาซิลัสซัสติลิส) เพื่อพัฒนาเป็นอาหารสัตว์ โดยใช้แผนการ ทดลองแบบ 4 x Factorial in CRD แบ่งเป็น 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัย A คือ ช่วงเวลาที่ใช้ในการหมัก 0, 15, 30 และ 45 วัน ปัจจัย B คือ ชนิดของเชื้อที่ใช้ในการหมักยีสต์ บาซิลัสซัสติลิส และเชื้อผสมระหว่างยีสต์ร่วมกับบาซิลัสซัสติลิส ผลการทดลองพบว่ามี

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

อิทธิพลร่วมของทั้งสองปัจจัยต่อสภาพการหมักที่ pH 3.88-4.16 อุณหภูมิ 28.62-29.78 องศาเซลเซียส และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 11.22-16.94% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าโภชนะของโปรตีนเซลล์เดียวจากเปลือกสับปะรด พบว่าการใช้เชื้อผสมระหว่างยีสต์ร่วมกับบาซิลัสซัสติลิสจะให้ค่าโปรตีนในผลิตภัณฑ์สูงกว่าเชื้อแบบเดี่ยว ($p<0.01$) และระยะเวลาในการหมักที่ 30 วันจะให้ค่าโปรตีน 10.80% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) โดยค่าโปรตีนที่ได้นั้นจะมีความสามารถในการย่อยได้ด้วยเอมไซม์เปปซินเท่ากับ 61.99% ($p>0.05$)

ดวงใจ โอชัยกุล และพรรณนิพา แพงศรี (2555) ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสม *Endomycopsis fibuligera* TISTR 5097 กับ *Candida utilis* TISTR 5046 ผลการทดลองพบว่า *E. fibuligera* TISTR 5097 และ *C. utilis* TISTR 5046 เจริญในน้ำทิ้งโดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.10 และ 0.03 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.88 และ 2.96 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เวลาเพาะเลี้ยง 30 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้การใช้ *E. fibuligera* TISTR 5097 ผสมร่วมกับ *C. utilis* TISTR 5046 ในอัตราส่วน 1:4 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเติม *C. utilis* TISTR 5046 ลงไปหลังจากเลี้ยง *E. fibuligera* TISTR 5097 ไปได้ 18 ชั่วโมงจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 1.28 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้ Corn steep liquor ความเข้มข้น 1.3% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนเติมในน้ำทิ้งซึ่งใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 4.88 กรัมต่อลิตร มีปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ 0.63 กรัมโปรตีนต่อน้ำหนักแห้ง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ชุตินุช สุจรติ และคณะ (2557) ศึกษาการลดปริมาณสารอินทรีย์โดยใช้ตัวกระทำทางชีวภาพในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ในบ่อที่ 3 ที่ผ่านการผลิตแก๊สชีวภาพแล้ว ซึ่งมีค่า pH 6.5 ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ (COD) 3,670 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมันและกรีส 133 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งปริมาณของแข็งและแร่ธาตุต่ำกว่าน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter มาก ทำการทดลองเลี้ยงยีสต์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida tropicalis* TISTR 5146, C. *tropicalis* TISTR 5045 และ C. *lipolytica* TISTR 5151 ในน้ำทิ้งดังกล่าวพบว่า C. *tropicalis* TISTR 5146 สามารถลดค่า COD ลง 94.38 % และได้ปริมาณมวลชีวภาพ 2.52 กรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง C.*tropicalis* TISTR 5146 ในน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มที่เจือจางด้วยน้ำที่ระดับ 1:5 โดยมีการเติมยีสต์สกัด 15 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 5.5 บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าได้ปริมาณมวลชีวภาพสูงสุดเท่ากับ

12.53 กรัมต่อลิตร เซลล์ประกอบด้วยโปรตีน 43.12% และไขมัน 0.45% เมื่อนำเซลล์ยีสต์แห้งของ *C. tropicalis* TISTR 5146 นำมาผสมเพื่อเสริมโปรตีนในสูตรอาหารเลี้ยงปลาสวายที่ระดับต่างๆ ได้แก่ 10%, 20%, และ 30% ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่า ปลาสวายมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เสริมโปรตีน 20% และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลอง ($p<0.05$) แต่อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและอัตราการรอดตายไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

3.1.1 อุปกรณ์

- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow cabinet)
- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- ตู้อบความร้อน (hot air oven)
- เครื่องชั่งละเอียด (electric balance)
- ไมโครเวฟ (microwave)
- จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
- บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 250 และ 1,000 มิลลิลิตร
- หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 16x150 เซนติเมตร
- เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- ห่วงเขี่ยเชื้อ (inoculating loop)
- เข็มเขี่ยเชื้อ (inoculating needle)
- เตาเผา (furnance) 550 องศาเซลเซียส
- ถ้วยกระเบื้อง (crucible) ขนาด 25 มิลลิลิตร
- ขวดเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (duran bottle) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 10-100 และ 100-1,000 ไมโครลิตร
- ปิเปตแก้ว (pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- เครื่องวัดความเข้มแสง (spectrophotometer)
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- เครื่องเขย่า (shaker)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)
- หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (eppendorf tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
- หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร

3.1.2 เคมีภัณฑ์

- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)
- เปปโตน (peptone)
- กลูโคส (glucose)
- วุ้น (agar)
- เอทานอล (ethanol)
- น้ำกลั่น (distilled water)
- กากน้ำตาล (molasses)
- ฟีนอล (phenol)
- กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)
- โพรแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)
- แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)
- กรดไฮโดคลอริก (HCl)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

เพาะเชื้อ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YEPD ที่ประกอบด้วย เปปโตน 1% กลูโคส 1% สารสกัดจากยีสต์ 0.3% และปรับค่า pH เริ่มต้นด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล และ กรดไฮโดคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล เท่ากับ 5.5 (ชุตินุช สุจริต และคณะ, 2557) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที (revolution per minute; rpm) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง และวัดค่าดูดกลืนแสง (Optical density;

OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ให้ได้เท่ากับ 0.9-1.0 เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการทดลองต่อไป

3.2.1 การศึกษาการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 ในอาหารสังเคราะห์ YEPD

โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ตั้งต้นในอาหารสังเคราะห์ YEPD ที่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 6-12 ชั่วโมง เพื่อทำการติดตามการเจริญโดยวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.2.1.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ควบคุมอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ จากนั้นนำเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักเซลล์แห้งคงที่ แล้วนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 ในอาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล

เก็บตัวอย่างกากน้ำตาลจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล จากจังหวัดมหาสารคาม จากนั้นทำการทดสอบปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ตามวิธี Phenol-sulfuric (Dubois *et al*., 1956) (ภาคผนวก ค-2)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.2.2.1 การศึกษาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1

เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 50, 100, 150, 200 และ 250 กรัมต่อลิตร และปรับ pH เท่ากับ 5.5 เพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าปริมาตร 50 มิลลิลิตร ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solids; TS) ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (total suspended solids; TSS) และปริมาณของแข็งระเหยได้ (volatile solids; VS) (ภาคผนวก ค-1) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ค-3) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

3.2.2.2 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1

เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 3.2.2.1 ทำการแปรผันแหล่งไนโตรเจน 5 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน โซเดียมไนเตรท โพรแทสเซียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.1% ปรับ pH เท่ากับ 5.5 เพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าปริมาตร 50 มิลลิลิตร ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และปริมาณของแข็งระเหยได้ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอลกอฮอล์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

3.2.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1

เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากหัวข้อ 3.2.2.2 โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, และ 1.0% และปรับ pH เท่ากับ 5.5 เพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าปริมาตร 50 มิลลิลิตร ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และปริมาณของแข็งระเหยได้ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอลกอฮอล์เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.2.2.4 การศึกษาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1

เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน มีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากข้อ 3.2.2.3 ปรับ pH เท่ากับ 5.5 แปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0% เพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าปริมาตร 50 มิลลิลิตร ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมดและปริมาณของแข็งระเหยได้ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอลกอฮอล์เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

3.2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

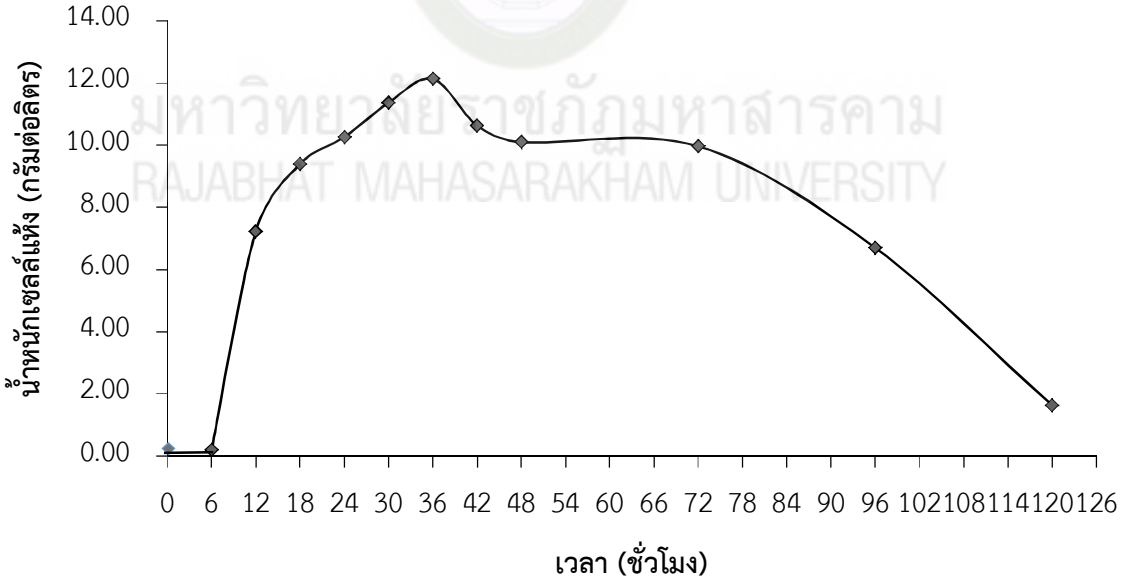
นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way Analysis of Variances) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่โดยใช้ Duncan’s test โดยใช้โปรแกรม SPSS 22.0

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 ในอาหารสังเคราะห์ YEPD

เพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารสังเคราะห์ YEPD ที่ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุก 6-12 ชั่วโมง เพื่อทำการติดตามการเจริญโดยวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลการทดลองพบว่ายีสต์มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังการเพาะเลี้ยงผ่านไป 6 ชั่วโมง และพบการเจริญมากที่สุดในชั่วโมงที่ที่ 36 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดคือ 12.13 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.1) แสดงว่ามีช่วง log phase สั้น (0-6 ชั่วโมง) แล้วพบ late log phase ในช่วง 18-36 ชั่วโมง เป็นช่วงระยะเวลาที่ยีสต์มีความตื่นตัวมากที่สุด จึงใช้เพื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ในการเตรียมเชื้อตั้งต้นในการทดลองต่อไป



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.1 กราฟการเจริญของ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 ในอาหารสังเคราะห์ YEPD

4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 ในอาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล

เก็บตัวอย่างกากน้ำตาลจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล จากจังหวัดมหาสารคาม มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธี Phenol-sulfuric พบว่ากากน้ำตาลมีน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 662.84±0.23 กรัมต่อลิตร

4.2.1 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1

เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 50, 100, 150, 200 และ 250 กรัมต่อลิตร และปรับ pH เท่ากับ 5.5 เพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าปริมาตร 50 มิลลิลิตร ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และปริมาณของแข็งระเหย วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่า pH เมื่อเริ่มต้นการทดลองและสิ้นสุดการทดลอง และปริมาณแอลกอฮอล์ ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 250 กรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์มากที่สุด โดยปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และมีปริมาณของแข็งระเหย เท่ากับ 213.93±7.15, 30.32±7.15 และ 181.65±3.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และยังมีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 2.44% ดังแสดงในตารางที่ 4.1

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (TSS) ปริมาณของแข็งระเหย (VS) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ค่า pH และปริมาณแอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่างๆ

ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	รายการวิเคราะห์							
	ปริมาณของแข็งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณของแข็งระเหยได้ (กรัมต่อลิตร)	pH	ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นน้ำตาลสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้น (%)
50	45.02^{e}±0.61	5.84^{e}±0.601	39.97^{e}±0.21	5.64±0.03	48.82	38.90	9.92	0.50
100	91.30^{d}±2.23	12.29^{d}±2.22	79.01^{d}±1.96	5.40±0.01	95.76	64.63	31.13	0.33
150	130.70^{c}±4.95	17.96^{c}±4.95	112.74^{c}±4.16	4.45±0.04	157.65	92.86	64.79	0.11
200	167.50^{b}±6.67	24.09^{b}±6.67	143.39^{b}±7.02	5.48±0.02	205.88	174.51	31.37	1.55
250	213.93^{a}±7.15	30.32^{a}±7.15	181.65^{a}±3.04	5.37±0.08	247.06	227.06	20.00	2.44

หมายเหตุ: ^{abcde}อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

4.2.2 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 250 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.2.1 ทำการแปรผันแหล่งไนโตรเจน 5 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน โซเดียมไนเตรท โพรแทสเซียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.1% ปรับ pH เท่ากับ 5.5 เพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าปริมาตร 50 มิลลิลิตร ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และปริมาณของแข็งระเหยได้ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่า pH เมื่อเริ่มต้นการทดลองและสิ้นสุดการทดลอง ผลการทดลองพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์มากที่สุด คือโซเดียมไนเตรต โดยปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และมีปริมาณของแข็งระเหย เท่ากับ 10.07±0.69, 1.31±0.08และ 8.45±0.39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และยังมีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 1.55% ดังแสดงในตารางที่ 4.2

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (TSS) ปริมาณของแข็งระเหย (VS) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่า pHที่ แหล่งไนโตรเจน 5 ชนิด

แหล่งไนโตรเจน	รายการวิเคราะห์							
	ปริมาณของแข็งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณของแข็งระเหยได้ (กรัมต่อลิตร)	pH	ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นน้ำตาลสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้น (%)
สารสกัดยีสต์	3.21^{b}±0.47	0.49^{b}±0.54	2.99^{c}±0.49	5.37±0.06	281.17	225.883	55.287	0.57
โพแทสเซียมไนเตรท	8.96^{a}±0.01	1.23^{a}±0.07	7.77^{ab}±0.03	5.28±0.02	257.6	230.587	27.013	1.84
โซเดียมไนเตรท	10.07^{a}±0.69	1.31^{a}±0.08	8.45^{a}±0.39	5.21±0.02	266.5	237.6	28.9	1.55
แอมโมเนียมซัลเฟต	9.20^{a}±0.21	1.20^{a}±0.27	8.11^{a}±0.04	4.71±0.05	273.5	246.67	26.83	1.22
เปบโตน	9.20^{a}±1.06	1.11^{a}±0.27	7.11^{b}±0.13	5.30±0.02	264.12	208.233	55.887	2.44

หมายเหตุ: ^{ab}อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

4.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้กากน้ำตาลเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมีโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากหัวข้อ 4.2.2 โดยแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเท่ากับ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, และ 1.0% และปรับ pH เท่ากับ 5.5 เพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าปริมาตร 50 มิลลิลิตร ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และปริมาณของแข็งระเหยได้ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่า pHเมื่อเริ่มต้นการทดลองและสิ้นสุดการทดลอง ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท ที่ 0.1% เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์มากที่สุด โดยปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และมีปริมาณของแข็งระเหย เท่ากับ 11.65±0.97, 1.35±0.15และ10.30±0.82 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) และยังมีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 1.25% ดังแสดงในตารางที่ 4.3

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (TSS) ปริมาณของแข็งระเหย (VS) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่า pH ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท

ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท (%)	รายการวิเคราะห์							
	ปริมาณของแข็งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณของแข็งระเหยได้ (กรัมต่อลิตร)	pH	ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นน้ำตาลสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้น (%)
0.1	11.65[a]±0.97	1.35[a]±0.15	10.30[a]±0.82	5.33±0.05	272.94	186.45	86.49	1.25
0.2	11.72[a]±0.57	1.32[a]±0.06	10.40[a]±0.53	5.31±0.07	242.35	146.06	96.3	1.17
0.4	11.51[a]±0.45	1.32[a]±0.05	10.19[a]±0.41	5.39±0.08	264.71	183.97	80.74	1.17
0.6	11.52[a]±0.57	1.38[a]±0.06	10.14[a]±0.51	5.38±0.03	264.71	178.83	85.88	1.33
0.8	11.10[a]±0.59	1.32[a]±0.05	9.78[a]±0.54	5.35±0.07	247.06	204.32	42.74	0.83
1.0	11.03[a]±0.75	1.42[a]±0.06	9.61[a]±0.69	4.97±0.04	250.59	205.88	44.71	0.17

หมายเหตุ: [a]อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

4.2.4 การศึกษาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้กากน้ำตาลเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 0.1% เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากข้อ 4.2.3 ปรับ pH เท่ากับ 5.5 แปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0% เพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าปริมาตร 50 มิลลิลิตร ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมดและปริมาณของแข็งระเหยได้ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่า pH เมื่อเริ่มต้นการทดลองและสิ้นสุดการทดลอง ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 8.0% เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์มากที่สุด โดยปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และมีปริมาณของแข็งระเหย เท่ากับ 16.96±0.6, 32.64±0.07 และ 14.32±0.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) และยังมีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 1.663% ดังแสดงในตารางที่ 4.4

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (TSS) ปริมาณของแข็งระเหย (VS) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่า pH ที่ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้นต่างๆ

ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น (%)	รายการวิเคราะห์							
	ปริมาณของแข็งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณของแข็งระเหยได้ (กรัมต่อลิตร)	pH	ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นน้ำตาลสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ เพิ่มขึ้น (%)
1	15.28[a]±0.47	2.37[a]±0.09	12.90[a]±0.37	5.55±0.02	252.94	105.49	147.45	0.663
2	15.36[a]±2.16	2.41[a]±0.28	12.95[a]±1.88	5.52±0.03	252.94	96.86	156.08	1.166
4	15.03[a]±3.92	2.23[a]±0.56	12.66[a]±3.32	5.52±0.06	252.94	110.98	141.96	2.830
6	15.86[a]±0.44	2.47[a]±0.02	13.39[a]±0.42	5.58±0.56	252.94	95.294	147.646	1.273
8	16.96[a]±0.63	2.64[a]±0.07	14.32[a]±0.56	5.58±0.09	252.94	99.22	153.72	1.663
10	16.89[a]±2.03	2.65[a]±0.30	14.24[a]±1.73	5.57±0.08	252.94	104.32	148.62	1.171

หมายเหตุ: [a]อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการเจริญของยีสต์ *Pichia kudriavzevii* BA2_1 ในอาหารสังเคราะห์ YEPD ที่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าที่ชั่วโมงที่ 36 ยีสต์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 12.13 กรัมต่อลิตร จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ชีวมวลโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการแปรผันปริมาณกากน้ำตาลเริ่มต้น ชนิดของแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน และปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น และติดตามการเจริญด้วยค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งแขวนลอย และปริมาณของแข็งระเหยได้ ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 250 กรัมต่อลิตร ใช้โซเดียมไนเตรทเข้มข้น 0.1% เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 8% เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญโดยพบค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งแขวนลอย และปริมาณของแข็งระเหยได้เท่ากับ 16.96±0.6, 32.64±0.07 และ 14.32±0.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 153.72 กรัมต่อลิตร และยังพบความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ได้ 1.663% ดังนั้น *Pichia kudriavzevii* BA2_1 สามารถใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อเป็นสารตั้งต้นในการเจริญเติบโตและเพิ่มชีวมวลได้ในระดับขวดเขย่าที่สภาวะอุณหภูมิห้องได้

5.2 อภิปรายผล

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ชีวมวลของยีสต์โปรตีน *Pichia kudriavzevii* BA2_1 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ายีสต์สามารถเจริญเติบโตและมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ชีวมวลมากขึ้น พิจารณาจากค่าของแข็งระเหยได้ แสดงว่ากากน้ำตาลที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลนั้นสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานของยีสต์ได้เนื่องจากกากน้ำตาลมีองค์ประกอบของน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ ซูโครส กลูโคส ฟรุกโทส และน้ำตาลรีดิวส์อื่นๆ เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Perez-Torrado *et al*. (2015) ที่มีการศึกษาการผลิตเซลล์ชีวมวลยีสต์จากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งพบว่ามีการเลือกใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานในการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เจริญเติบโตของยีสต์สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นหลักในการเจริญเติบโตและผลิตเซลล์ชีวมวลของยีสต์ แต่เนื่องจากกากน้ำตาลอาจจะยังไม่พอจึงมีการเติมแหล่งไนโตรเจนเข้าไปซึ่งผลการทดลองจะเห็นได้ว่ามีการเจริญเติบโตของยีสต์มากขึ้น ยังพบความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ได้

5.3 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

5.3.1 ควรทำการศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาลแต่ละชนิดของเชื้อ เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาหาสารตั้งต้นชนิดอื่นที่มีราคาถูกและเหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ร่วมด้วย

5.3.2 ควรศึกษาการเพิ่มเซลล์ชีวมวลของยีสต์ในระดับขยายส่วนต่อไป

5.3.3 ควรศึกษาการนำหัวเชื้อยีสต์ที่ผลิตได้จากกากน้ำตาลเพื่อการหมักกากมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยวิเคราะห์คุณสมบัติการเพิ่มคุณค่าทางโภชนะ เช่น โปรตีน เยื่อใย และสารอาหารอื่นๆ เพิ่มเติม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY