การผลิตยีสต์อาหารสัตว์จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Production of Feed Yeast from Palm Oil Mill Effluent

ธีระวุฒิ ทวีทรัพย์

Theerawut Taveesap

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2548

P
TP580 ธ64 ว548 ค. 2
27220

ื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตยีสต์อาหารสัตว์จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
ผู้เขียน นายธีระวุฒิ ทวีทรัพย์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เยาวลักษณ์ ดิสระ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรพล อารีกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตยีสต์อาหารสัตว์จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
ผู้เขียน	นายธีระวุฒิ ทวีทรัพย์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2547

บทคัดย่อ

จากการเลี้ยงยีสต์จำนวน 9 สายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง (30 ±2C) และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5021, *S. cerevisiae* TISTR 5055, *S. cerevisiae* (burgandy), *Candida tropicalis* TISTR 5146, *C. palmioleophila* Y-128 และ *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5116 เจริญได้ทั้ง 2 อุณหภูมิ ในขณะที่ *S. cerevisiae* TISTR 5017, *C. utilis* TISTR 5001 และ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส เมื่อนำยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ มาเลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิห้องและที่ 45 องศาเซลเซียส พบว่า ยีสต์ทุกสายพันธุ์เจริญได้ดีกว่าที่อุณหภูมิห้อง โดย *S. cerevisiae* (burgandy), *K. marxianus* TISTR 5116 และ *S. cerevisiae* TISTR 5021 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.82, 3.17 และ 3.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อนำยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไปศึกษาผลของแหล่งน้ำทิ้ง ได้แก่ น้ำทิ้งรวม น้ำนึ่งปาล์ม และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ พบว่า ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีที่สุดในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ โดยพบว่า *K. marxianus* TISTR 5116 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 7.99 กรัมต่อลิตร และสามารถลดค่าซีโอดีได้ 35.2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมันและกรีส 83.5 เปอร์เซ็นต์ หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *K. marxianus* TISTR 5116 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ พบว่า ยีสต์เจริญได้ดีในน้ำทิ้งที่ไม่มีการเจือจาง ไม่ต้องเติมน้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอน แต่มีการเติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม คือ พีเอชเริ่มต้น 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ *K. marxianus* TISTR 5116 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเป็น 10.95 กรัมต่อลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น (5.89 กรัมต่อลิตร) ผลผลิตของเซลล์ ($Y_{X/S}$) เพิ่มขึ้นจาก 0.30 เป็น 0.45 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตที่ 24 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นจาก 0.19 เป็น 0.40 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่การลดลงของ COD เพิ่มขึ้นจาก 32.9 เปอร์เซ็นต์ เป็น 38.7 เปอร์เซ็นต์ ผลของการขยายขนาดการเลี้ยง *K. marxianus* TISTR 5116 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นขนาด 72 ลิตร ซึ่งบรรจุน้ำทิ้งจากเครื่อง

ดีแคนเตอร์ ปริมาตร 50 ลิตร พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 11.77 กรัมต่อลิตร หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณของแข็งทั้งหมดมีปริมาณกลูแคนร้อยละ 12.51 ของน้ำหนักผนังเซลล์แห้ง มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 34.02 เป็นร้อยละ 45.56 ปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 17.42 เป็นร้อยละ 20.93 ปริมาณเถ้าเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 19.70 เป็น 31.92

Thesis Title	Production of Feed Yeast from Palm Oil Mill Effluent
Author	Mr.Theerawut Taveesap
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2004

Abstract

Nine strains of yeast were grown on PDA at room temperature (30±1°C) and 45°C. It was found that *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5021, *S. cerevisiae* TISTR 5055, *S. cerevisiae* (burgandy), *Candida tropicalis* TISTR 5146, *C. palmioleophila* Y-128 and *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5116 were able to grow at both temperatures while the growth of *S. cerevisiae* TISTR 5017, *C. utilis* TISTR 5001 and *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 were inhibited at 45C. The six selected strains were screened by cultivating in combined palm oil mill effluent (POME) at room temperature and 45C. All strains grew better at room temperature and *S. cerevisiae* (burgandy), *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5116 and *S. cerevisiae* TISTR 5021 gave the highest biomass concentrations of 3.82, 3.17 and 3.05 g/l respestively after 48 h cultivation. The three strains were used to study on the effect of effluent sources; combined POME, sterilizer condensate and decanter effluent. All strains grew best in the decanter effluent and *K. marxianus* TISTR 5116 yielded the highest dry cell weight of 7.99 g/l and gave 35.2 % COD reduction as well as 83.5 % oil & grease reduction after 48 h cultivation. Optimization studies on growth of *K. marxianus* TISTR 5116 in the decanter effluent was investigated. It was found that the strain grew best in raw decanter effluent without addition of crude palm oil as carbon source while diammonium orthophasphate was the selected nitrogen source and phosphorus source at the concentration of 0.6%. Optimal environmental values were the initial pH of 6.5, 37°C, 2.0 vvm aeration rate, 200 rpm agitation speed. Under these optimum conditions, *K. marxianus* TISTR 5116 gave the maximum dry cell mass of 10.95 g/l., about 2.0 folds increase compared to the initial values (5.89 g/l). Cell yield ($Y_{X/S}$) increased from 0.30 to

0.45 g/g and productivity in 24 h from 0.19 to 0.40 g/l/h while COD removal increased from 32.9 % to 38.7 %, Scale-up the production of *K. marxianus* TISTR 5116 from a 5 l fermenter to a 72 l fermenter containing 50 l decanter effluent yielded the dry cell mass of 11.77 g/l after 48 h cultivation. The total solid content was found to contain 12.51 % glucan (base on dry cell wall weight), the protein content increased from 34.02 % to 45.56 %, the fat content increased from 17.42 % to 20.93 % while the ash content increased from 19.70 % to 31.92 %.

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพ	(15)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(17)
บทที่	
1.บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
1.โครงสร้างและลักษณะทั่วไปของยีสต์	2
1.1 รูปร่างลักษณะ	2
1.2 โครงสร้างภายในของเซลล์ยีสต์	2
1.3 องค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์	3
2.คุณสมบัติ และคุณค่าทางอาหารของยีสต์ที่ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว	6
3.ชนิดของยีสต์ที่นิยมใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว	11
4.การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากแหล่งของวัสดุเศษเหลือทางอุตสาหกรรมเกษตร	13
4.1 น้ำทิ้งจากโรงฆ่าสัตว์ โรงงานผลิตกุ้ง โรงงานเนยแข็ง โรงงานปลาทูน่า	13
4.2 น้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง โรงงานแปรรูปมันฝรั่ง	14
4.3 น้ำทิ้งจากโรงงานสับปะรด โรงงานน้ำผักผลไม้	14
4.4 น้ำทิ้งโรงงานผงชูรส	15
4.5 น้ำทิ้งจากโรงงานข้าวโพดหมัก	15
4.6 น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	15
5.การประยุกต์ใช้ยีสต์ในอาหารสัตว์	16

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
6.แหล่งที่มาและคุณลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	18
7.ปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของยีสต์	22
7.1 สารอาหาร	22
7.2 สภาพความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหาร	23
7.3 อุณหภูมิ	24
7.4 ปริมาณและวิธีการให้อากาศ	26
วัตถุประสงค์	28
2.วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	29
วัสดุ	29
อุปกรณ์	30
วิธีการทดลอง	30
1.การคัดเลือกยีสต์ทนร้อนที่เจริญได้ดีในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	34
1.1 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นยีสต์ทนร้อนของยีสต์จำนวน 9 สายพันธุ์	34
1.2 การคัดเลือกยีสต์ทนร้อน	34
2.การคัดเลือกแหล่งน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	34
3.สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ที่คัดเลือกได้	35
3.1 ผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์	35
3.2 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มในน้ำทิ้งต่อการเจริญของยีสต์	35
3.3 ผลของแหล่งไนโตรเจน	35
3.4 ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนที่คัดเลือกได้	35
3.5 ผลของพีเอชเริ่มต้น	35
3.6 ผลของอุณหภูมิ	36
3.7 ผลของปริมาณการให้อากาศ	36
3.8 ผลของการขยายขนาด	36
4.การวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆของเซลล์ยีสต์	36
3.ผลการทดลองและวิจารณ์	37

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
4.สรุปและข้อเสนอแนะ	64
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก ก	72
ภาคผนวก ข	73
ภาคผนวก ค	82
ประวัติผู้เขียน	88

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1. ปริมาณและองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ	5
2. ปริมาณขององค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ	6
3. องค์ประกอบของกรดแอมิโนในเซลล์ของยีสต์จากแหล่งต่างๆ	8
4. องค์ประกอบของวิตามินในเซลล์ยีสต์ต่างๆ	9
5. องค์ประกอบของแร่ธาตุในเซลล์ยีสต์จากแหล่งต่างๆ	10
6. สายพันธุ์ยีสต์ที่นำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดียวทางเทคโนโลยีชีวภาพ	11
7. องค์ประกอบและคุณสมบัติของน้ำทิ้งจากขั้นตอนต่างๆ ในการสกัดน้ำมันปาล์มและน้ำทิ้งรวมของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	20
8. องค์ประกอบโดยประมาณของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	21
9. ปริมาณแร่ธาตุของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	21
10. คุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	22
11. อุณหภูมิในการเจริญของยีสต์ต่างๆ	25
12. การทดสอบคุณสมบัติทนร้อนของยีสต์จากการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	38
13. การเจริญของยีสต์ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิห้อง (30±2°C) และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	39
14. คุณสมบัติของน้ำทิ้งจากขั้นตอนต่างๆของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	40
15. ผลของน้ำทิ้งแหล่งต่างๆของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเจริญของยีสต์ที่คัดเลือกได้ 3 สายพันธุ์จากการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	41
16. ผลของน้ำทิ้งแหล่งต่างๆของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและการเจริญของยีสต์ที่คัดเลือกได้ 3 สายพันธุ์ต่อการลดลงของค่าซีโอดีและน้ำมันและกรีสจากการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	41
17. ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดีของ *K. marxianus* TISTR 5116 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	44

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
18. ผลของการเติมน้ำมันปาล์มดิบที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดีของ *K. marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (มีปริมาณน้ำมันที่เติม เท่ากับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	45
19. ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดีของ *K. marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (มีปริมาณน้ำมันที่เติม เท่ากับ 0, 1, 5 and 10 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	49
20. ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดีของ *K. marxianus* TISTR 5116 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	51
21. ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดีของ *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	54
22. ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยง (อุณหภูมิห้อง, 37 และ 45 องศาเซลเซียส) ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดีของ *K. marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	56
23. ผลของอัตราการให้อากาศ (1.0, 1.5 และ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอากาศต่อนาที) ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดีของ *K. marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในในถังหมัก 5 ลิตร (ปริมาตรบรรจุ 3 ลิตร) ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ที่มีอัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	58
24. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *K. marxianus* TISTR 5116 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	59

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

25. ผลของการขยายขนาดการเลี้ยงต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดี การเจริญของ *K. marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 61
26. องค์ประกอบต่างๆ ของปริมาณของแข็งทั้งหมดจากการเลี้ยง *K. marxianus* TISTR 5116 จากการเลี้ยงในถังหมักขนาด 72 ลิตร (ปริมาตรบรรจุ 50 ลิตร) ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 63
27. การเจริญของยีสต์ 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง) ต่อการลดค่าซีโอดีและน้ำมันและกรีส น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตมวลชีวภาพ 82
28. การเจริญของยีสต์ 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง) ต่อการลดค่าซีโอดี และน้ำมันและกรีส น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตมวลชีวภาพ 82
29. การเจริญของยีสต์ 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในน้ำนึ่งปาล์มของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง) ต่อการลดค่าซีโอดีและน้ำมันและกรีส น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตมวลชีวภาพ 83
30. ผลของระดับการเจือจางของน้ำทิ้งต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K. marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 83
31. ผลของความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มที่เติมต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K. marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 84

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษา แก้ไขข้อบกพร่อง แนะนำให้ความสะดวกในการค้นคว้าวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์ ตลอดจนช่วยตรวจสอบความถูกต้อง จึงทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เยาวลักษณ์ ดิสระ และ รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ ที่เสนอแนะและแก้ไขข้อบกพร่องจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ให้ทุนบัณฑิตศึกษาประเภทผลการเรียนดีเด่น และทุนอุดหนุนในการทำวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณโรงงานน้ำมันปาล์มพืชบริสุทธิ์ จำกัด ที่ได้อนุเคราะห์น้ำทิ้งและขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความสะดวกในการเก็บตัวอย่างดังกล่าวเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรมทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาที่ให้บริการอย่างเต็มที่ เต็มใจ และรวดเร็วเป็นอย่างยิ่ง ตลอดจนพี่ๆเพื่อนๆ และน้องๆของภาควิชาทุกท่านที่ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ คำแนะนำในการใช้เครื่องมือตลอดจนเทคนิคในการทำการวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร ที่ให้ใช้อุปกรณ์ พร้อมทั้งเจ้าหน้าที่ที่ให้ความสะดวก และให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์

ขอขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ที่ให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้านด้วยดีตลอดมาเป็นอย่างยิ่ง

ธีระวุฒิ ทวีทรัพย์

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
32. ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K. marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ไม่เจือจางและไม่เติมน้ำมันปาล์ม บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	84
33. ผลของระดับ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่เติมต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K. marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่เจือจางและไม่เติมน้ำมันปาล์ม บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	85
34. ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K. marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ไม่เจือจางและไม่เติมน้ำมันปาล์ม โดยเติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6% บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	85
35. ผลของอุณหภูมิต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K. marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่เติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6% บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที	86
36. ผลของอัตราการให้อากาศต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K. marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ในถังหมักปริมาตรบรรจุ 3 ลิตร ความเร็วใบพัด 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 ℃	86
37. ผลของเลี้ยงขยายขนาดต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K.marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในถังหมัก ความเร็วใบพัด 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm อุณหภูมิ 37 ℃	87

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1. โครงสร้างโดยทั่วไปเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*	4
2. โครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*	4
3. ผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและการเจริญของยีสต์ *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 จากการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิห้อง	43
4. ผลของความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มที่เติมต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของยีสต์ *Klyveromyces marxianus* TISTR ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิห้อง	46
5. ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยงยีสต์ *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	48
6. ผลของความเข้มข้นของ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่เติมต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยงยีสต์ *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	50
7. ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของยีสต์ *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่เติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6% บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	53
8. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของยีสต์ *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่เติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6% บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที)	55

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
9. ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในถังหมัก 5 ลิตร (ปริมาตรบรรจุ 3 ลิตร) ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่เติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6% ที่มีอัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 ℃	57
10. ผลของการขยายขนาดการเลี้ยงต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 ในถังหมัก 72 ลิตร (ปริมาตรบรรจุ 50 ลิตร) ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่มีอัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 ℃	60

ตัวย่อและสัญลักษณ์

COD	= Chemical oxygen demand
๐C	= degree Celcius
N	= Normality
$Y_{X/S}$	= cellular yield coefficient for the limiting substrate
PDA	= Potato dextose agar
YEPD	= Yeast extract peptone dextrose

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีน้ำมันและสารแขวนลอยปนอยู่ในปริมาณสูง ซึ่งน้ำมันในน้ำทิ้งอยู่ในลักษณะอิมัลชั่น ซึ่งแยกออกได้ยากและมีปริมาณเจือจางที่ทำให้การลงทุนแยกน้ำมันส่วนนี้ไม่มีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ นอกจากนี้ น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีสภาวะเป็นกรด (พีเอชอยู่ในช่วง 3.5-4.5) ซึ่งเหมาะกับการเจริญของยีสต์หรือเชื้อรา แม้ว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ดีในน้ำทิ้ง โดยเฉพาะ *Aspergillus niger* ATCC 6275 (Prasertsan *et al.*, 1997) แต่การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการให้อากาศประสบปัญหากับการที่ไมซีเลียมของเชื้อราเกาะกลุ่มที่แกนของใบพัดหรือเครื่องกระจายอากาศในถังหมัก ทำให้การนำไปประยุกต์ใช้งานในอุตสาหกรรมเป็นไปได้ยาก แนวทางหนึ่งที่เป็นไปได้สูง คือ การใช้ยีสต์ เนื่องจากสามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นกรดเช่นกัน และมีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์มากขึ้นหากนำยีสต์ไปใช้ประโยชน์เป็นอาหารสัตว์ นอกจากนี้ ยังเป็นวิธีการที่เป็นไปได้ในการกำจัดน้ำมันออกจากน้ำทิ้ง ทำให้ปริมาณสารอินทรีย์ลดลง ซึ่งช่วยลดปัญหาด้านการบำบัดน้ำเสีย

ยีสต์เป็นที่ยอมรับและนิยมในการผลิตเป็นแหล่งอาหารเสริมโปรตีนมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น เนื่องจากเจริญเร็ว ตัวเซลล์มีขนาดใหญ่ เก็บเกี่ยวได้ง่ายกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ ภายในเซลล์ยีสต์ยังมีส่วนประกอบของสารและเกลือแร่หลายชนิดปริมาณมาก ซึ่งเหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารเสริมในอาหารสัตว์ โดยเฉพาะโปรตีน มีรายงานการใช้ยีสต์ทั้งในสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โค ม้า แพะ สัตว์กระเพาะเดี่ยว เช่น สุกร สัตว์ปีก เช่น ไก่ เป็ด โดยใช้ทดแทนวัตถุดิบที่มีโปรตีนสูง เช่น ถั่วเหลือง หรือปลาป่นที่นับวันจะมีราคาสูง และหาได้ยาก เมื่อนำยีสต์มาทดแทนแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์สำหรับสัตว์บกและสัตว์น้ำ พบว่า น้ำหนักตัว อัตราการเจริญเติบโต การกินได้ การย่อยได้ รวมทั้งผลผลิตและองค์ประกอบในน้ำนม ดีขึ้น สารที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ กลูแคน ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากผนังเซลล์ของยีสต์ ซึ่งเป็นแอนติเจนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคได้ดี โดยไม่มีผลตกค้างก่อให้เกิดอันตรายเหมือนยาและสารเคมี โดยมีรายงานเกี่ยวกับการใช้สารเบต้ากลูแคนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ เช่น ปลาแซลมอน ปลาเทร้าท์ ปลาคาร์พ

การตรวจเอกสาร

1 โครงสร้างและลักษณะทั่วไปของยีสต์

1.1 รูปร่างลักษณะ

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต เซลล์ยีสต์ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมหรือรี นอกจากนี้อาจมีรูปร่างเป็นรูปถั่ว รูปเลมอน ทรงกระบอก หรือยาวเป็นสาย เซลล์มีความกว้างประมาณ 1-5 ไมครอน และยาวประมาณ 5-30 ไมครอน ขนาดของยีสต์แตกต่างกันในแต่ละชนิด ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ ส่วนมากเกิดโดยการแตกหน่อ (budding) และส่วนน้อยที่เกิดโดยการแบ่งแยกเซลล์ (fission) ยีสต์เป็น heterotroph ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน มีทั้งพวกที่เป็น saprophyte และ parasite พบได้โดยทั่วไปในธรรมชาติ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2535)

1.2 โครงสร้างภายในของเซลล์ยีสต์

ส่วนประกอบของผนังเซลล์ ได้แก่ แมนแนน ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของแมนโนส และกลูแคน (โพลีเมอร์ของกลูโคส) ซึ่งพบในผนังเซลล์ของยีสต์ทุกชนิด โดยกลูแคนเป็นชั้นที่อยู่ด้านใน ส่วนแมนแนนเป็นชั้นที่อยู่ด้านนอกของผนังเซลล์ ส่วนเซลล์เมมเบรนส่วนใหญ่ เป็นพวกลิพิดและโปรตีน ลิปิดมักอยู่ในรูป มอนอไดไตรกลีเซอไรด์ กลีเซอโรฟอสฟาไทด์และสเตอรอล โปรตีนที่อยู่ในเซลล์เมมเบรน ได้แก่ เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการนำกรดแอมิโนและน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ โดยโปรตีนอาจอยู่ที่ผิวของเมมเบรนหรือแทรกอยู่ในส่วนของฟอสฟอลิพิด

ภายในไซโตพลาสซึมจะประกอบด้วยนิวเคลียส ซึ่งนิวเคลียสของยีสต์มักอยู่ระหว่างแวคิวโอลและหน่อ ไมโตคอนเดรียของยีสต์ล้อมรอบด้วยเมมเบรน 2 ชั้น มีรูปร่างหลายแบบ ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามระยะการเจริญของเซลล์ พบว่า ในเซลล์ที่อยู่ในระยะ stationary phase ไมโตคอนเดรียมีรูปร่างกลม เมื่อเซลล์เริ่มแตกหน่อ รูปร่างของไมโตคอนเดรียจะเปลี่ยนเป็นคล้ายเส้นด้าย เคลื่อนที่เข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์แม่และเซลล์ลูก แล้วแบ่งตัวสร้างเป็นไมโตคอนเดรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนในหน่อ เมื่อเซลล์เข้าสู่ stationary phase ไมโตคอนเดรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนจะมีการแตกกิ่งก้าน แล้วแยกออกเป็นไมโตคอนเดรียรูปร่างกลมขนาดเล็กจำนวนมากมาย การกระจายของไมโตคอนเดรียในไซโตพลาสซึมมีความแตกต่างกันตามชนิดของยีสต์ เช่น *Saccharomyces* sp. มีไมโตคอนเดรียมากบริเวณใกล้เยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนเซลล์ของ *Rhodotorula* sp. พบกระจายทั่วไปในไซโตพลาสซึม บริเวณเมมเบรนและไมโตคอนเดรีย มีเอนไซม์มากมาย โดยเฉพาะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการส่งอิเล็กตรอนและการถ่ายทอดอิเล็กตรอน ในยีสต์ที่โตเต็มวัย ภายในเซลล์จะเห็นแวคิวโอลขนาดใหญ่ แต่เมื่อเซลล์เริ่มแตกหน่อ

แวคิวโอลดังกล่าวจะแยกเป็นแวคิวโอลขนาดเล็ก กระจายไปในเซลล์แม่และหน่อ ส่วนโครงสร้างอื่นๆ ภายในเซลล์ยีสต์ ได้แก่ ไรโบโซม ซึ่งเป็นแบบ 80s เอนโดพลาสมิค เรติคิวลัม กอลจิบอดี้ ไกลโคเจน และเม็ดไขมัน (Walker, 1998) (ภาพที่ 1)

1.3 องค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์

ผนังเซลล์ของยีสต์เป็นโครงสร้างที่มีความแข็งแรงเช่นเดียวกับผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอื่น หนาประมาณ 100-200 นาโนเมตร หนักประมาณ 25 % ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ มีโครงสร้างหลักเป็นโพลีแซคคาไรด์ประมาณ 80-90 % ของผนังเซลล์ (Walker, 1998) ซึ่งช่วยทำให้เซลล์คงรูปร่างและความแข็งแรง นอกจากนี้ยังประกอบด้วยโปรตีน 10-15 % โพลีแซคคาไรด์ที่พบในเซลล์ยีสต์ ประกอบด้วย แมนแนน (mannan), กลูแคนที่ละลายได้ในด่าง (alkali-soluble glucan) ซึ่งมีประมาณ 12-15 % (w/w) ของกลูแคนทั้งหมด (Reed and Nagodawitthana, 1991), กลูแคนที่ไม่ละลายได้ในด่าง (alkali-insoluble glucan) และไคติน (chitin) เล็กน้อย (Nguyen *et al.*, 1998)

1.แมนแนน (mannan) อยู่ที่ชั้นนอกของผนังเซลล์ ไม่ได้ช่วยทำให้เซลล์คงรูปร่าง แต่จะทำหน้าที่ในการยึดเกาะองค์ประกอบต่างๆ ของผนังเซลล์ให้คงอยู่ด้วยกัน ปกติจะเกาะกับโปรตีนด้วยพันธะโควาเลนท์ จึงเรียกว่า แมนโนโปรตีน (mannoprotein)

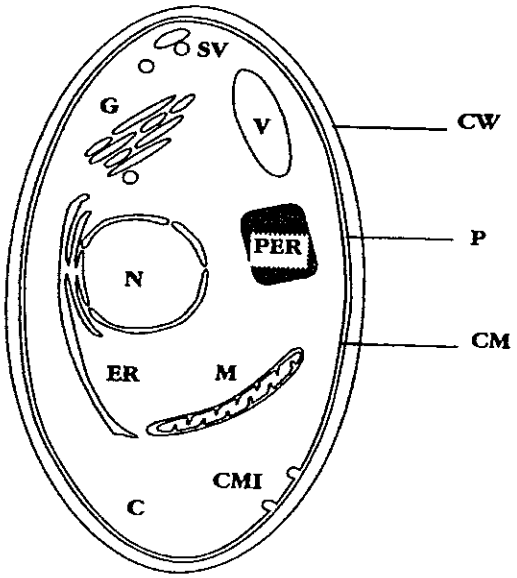
2.กลูแคน (glucan) เป็นส่วนของเซลล์ที่ทำให้สามารถคงรูปร่างอยู่ได้ มีโครงสร้างเชื่อมโยงเป็นโซ่แตกกิ่งก้าน ประกอบด้วย โซ่หลักมีโครงสร้างแบบ เบต้า-(1,3) ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ และมีกิ่งก้านเป็น เบต้า-(1,6) ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 2

3.ไคติน (chitin) เป็นโพลิเมอร์ของ N-acetylglucosamine พบในปริมาณน้อย เช่น *S. cerevisiae* พบเพียงประมาณ 2-4 % ใน bud scar (Walker, 1998)

Shiota และคณะ (1985) พบว่า ผนังเซลล์ของยีสต์ส่วนใหญ่ ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ 2 ชนิด คือ β-glucan และ α-mannan ซึ่งส่วนประกอบที่เป็นโมเลกุลใหญ่อื่นๆ เช่น โปรตีน และไคตินนั้นมีอยู่เพียงเล็กน้อย

Lipke และ Ovalle (1998) รายงานว่า ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* มีโครงสร้างหลักเป็น mannoprotein และ β-(1,3) glucan โดยมี β-(1,6) glucan เป็นโครงสร้างเชื่อมโยงแตกกิ่งก้านในผนังเซลล์ ผนังเซลล์ชั้นในประกอบด้วย β-(1,3) glucan-chitin complex โดยมี β-(1,6) glucan เชื่อมระหว่างผนังชั้นในและผนังชั้นนอกของผนังเซลล์ ส่วนที่ผิวชั้นนอกประกอบด้วย mannoprotein

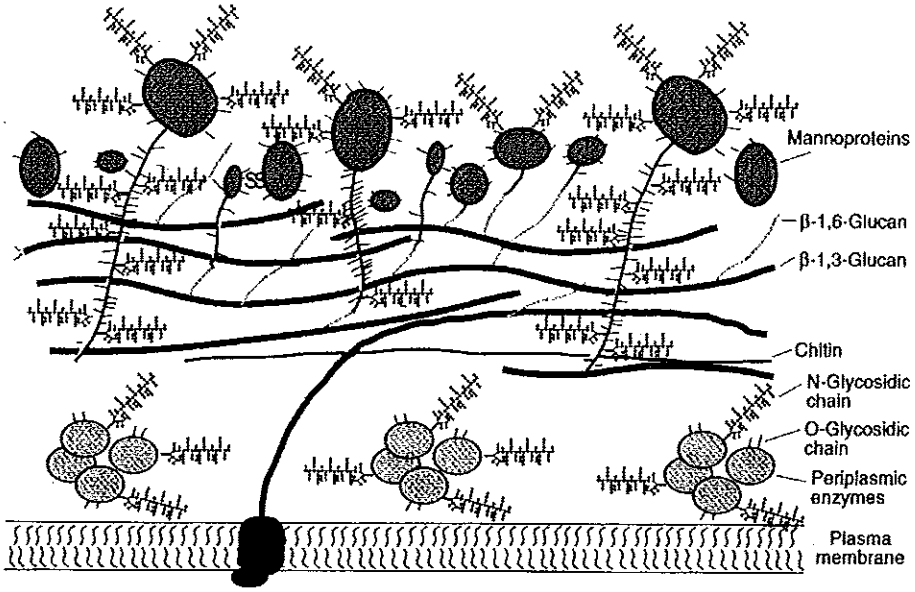
มลฤดี สิทธิพันธุ์ (2541) เลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ผนังเซลล์ยีสต์ที่สกัดได้มีปริมาณร้อยละ 13.65 มีองค์ประกอบทางเคมี



ภาพที่ 1 โครงสร้างโดยทั่วไปของเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

Figure 1 General cell structure of *Saccharomyces cerevisiae* (CW = cell wall, P = periplasm, CM = plasma membrane, CMI = invagination, C = cytoplasm, N = nucleus, M = mitochondrion, ER = endoplasmic reticulum, G = Golgi apparatus. SV = secretory vesicles, V = vacuole, PER = peroxisome)

ที่มา : Walker (1998)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

Figure 2 Cell wall structure of *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา : Walker (1998)

คือ ปริมาณโปรตีนและเถ้าร้อยละ 11.18 และ 0.73 ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 72.40 และ 24.44 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ พบปริมาณกลูแคนร้อยละ 20 ของผนังเซลล์

Nguyen และคณะ (1998) ศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *Kloeckera apiculata, Debaryomyces hansenii, Zygosaccharomyces bailii, Kluyveromyces marxianus* และ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า *Debaryomyces hansenii* 2577 และ *Kluyveromyces marxianus* 5186 เป็นสายพันธุ์ที่มีองค์ประกอบของผนังเซลล์มากที่สุด (32.0 และ 32.5 % ตามลำดับ) (ตารางที่ 1) แต่เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณกลูแคนแล้วพบว่า *Saccharomyces cerevisiae* มีปริมาณกลูแคนมากที่สุด คือ 70.8 % รองลงมาคือ *Kluyveromyces marxianus* 5186 และ *Debaryomyces hansenii* 2577 (66.5 และ 62.9 % ตามลำดับ) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ปริมาณและองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ

Table 1 Cell wall content and wall composition of several yeast species

Yeast species	Wall[a] (%)	Wall composition (%)	
		Polysaccharide	Protein
Kloeckera apiculata 2164	29.8 1.8	86.8 ±1.9	13.2 0.6
Kl. apiculata 2168	28.7 0.9	86.1 ±2.2	13.9 0.6
Debaryomyces hansenii 2577	32.0 2.0	89.1 ±2.4	10.9 0.4
D. hansenii 1570	29.9 1.5	86.1 ±1.9	15.9 0.7
Zygosaccharomyces bailii 1299	25.8 1.6	85.1 ±1.7	14.9 0.6
Z. bailii 3704	27.1 0.7	83.8 ±2.0	16.2 0.6
Kluyveromyces marxianus R157	29.5 1.4	86.8 ±2.1	13.2 0.5
Kluy. marxianus 1586	32.5 1.7	88.6 ±2.7	11.4 0.4
Saccharomyces cerevisiae 1117	29.0 1.6	86.5 ±2.5	13.5 0.5

[a] Based on dry cell weight

ที่มา : Nguyen และคณะ (1998)

ตารางที่ 2 ปริมาณขององค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ

Table 2 Amount of wall components from several yeast species.

Yeast species	Amount (%)			
	Glucan		Chitin	Mannoprotein
	Alkali-soluble	Alkali-insoluble		
Kloeckera apiculata 2164	43.8 0.3	15.5 3.2	0.47 0.05	29.3 4.4
Kl. *apiculata* 2168	38.1 5.5	17.7 2.1	0.18 0.02	30.2 3.7
Debaryomyces hansenii 2577	14.5 3.2	48.4 3.2	7.74 0.55	28.9 2.6
D. hansenii 1570	37.4 1.9	20.9 2.8	2.10 ±19	32.3 1.2
Zygosaccharomyces bailii 1299	37.3 4.1	23.8 0.6	0.71 0.05	29.0 5.7
Z. bailii 3704	33.9 2.0	20.8 3.9	0.64 0.07	34.5 2.6
Kluyveromyces marxianus R157	10.0 4.2	40.6 5.4	4.06 0.35	34.1 4.1
Kluy. marxianus 1586	48.0 3.1	18.5 1.2	1.11 0.10	25.6 3.5
Saccharomyces cerevisiae 1117	33.5 4.1	37.3 3.0	3.36 0.25	24.4 3.5

ที่มา : Nguyen และคณะ (1998)

2 คุณสมบัติ และคุณค่าทางอาหารของยีสต์ที่ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

โปรตีนเซลล์เดียว (Single Cell Protein : SCP) หมายถึง โปรตีนจากจุลินทรีย์ ได้แก่ สาหร่าย รา ยีสต์ และแบคทีเรีย ซึ่งไม่จำเป็นต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีเซลล์เดียว (unicellular cell) แต่รวมถึงจุลินทรีย์ที่มีหลายเซลล์ด้วย (multicellular cell) โปรตีนเซลล์เดียวเริ่มได้รับความสนใจเมื่อองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จัดตั้งหน่วยงานหนึ่งเพื่อหาแหล่งโปรตีนใหม่สำหรับมนุษย์ ซึ่งจะต้องมีความปลอดภัยและเหมาะสมสำหรับเป็นอาหารของมนุษย์ (food) หรือ เป็นอาหารสัตว์ (feed) หน่วยงานนี้คือ Protein Advisory Group โดยจัดตั้งเมื่อปี ค.ศ.1955 โปรตีนเซลล์เดียวหรือโปรตีนจากจุลินทรีย์ จึงได้รับความสนใจ เพราะต้นทุนการผลิตต่ำ และผลิตได้รวดเร็ว นอกจากนี้ ยังสามารถใช้เปลี่ยนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมให้อยู่ในรูปของอาหารโปรตีน เป็นการกำจัดของเสียเพื่อป้องกันปัญหามลภาวะ และได้ผลตอบแทนจากการใช้ประโยชน์ของวัสดุเหล่านี้

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว มีทั้งสาหร่าย เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย Kumnuanta (1976 อ้างโดย ดวงพร คันธโชติ, 2528) ได้รวบรวมคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่เหมาะจะผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว ดังนี้คือ

1.เจริญได้เร็วในอาหารที่มีราคาถูก ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หาได้จากท้องถิ่นนั้นๆ

2.เจริญได้ดีในอาหารที่มีส่วนประกอบแบบง่ายๆ มีความต้องการวิตามิน และสารเร่งการเจริญต่างๆ น้อย หรือไม่ต้องการเลย

3.คงลักษณะทางพันธุกรรมได้ดี ไม่กลายพันธุ์ง่ายเมื่อเลี้ยงติดต่อกันเป็นเวลานาน

4.การแยกและเก็บเกี่ยวเซลล์ทำได้ง่าย

5.มีความต้านทานต่อการปะปนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

6.ทราบคุณสมบัติทางพันธุกรรม สรีรวิทยา และสามารถปรับปรุงทางด้านพันธุกรรมได้

7.ใช้แหล่งพลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

8.หลังจากผ่านกระบวนการเลี้ยงเชื้อแล้ว มีวัสดุเหลือทิ้งน้อย หรือไม่มีเลย

9.ไม่เป็นพิษ และทำให้เกิดอาการภูมิแพ้

10.ให้ปริมาณโปรตีนสูง โดยเฉพาะโปรตีนจะต้องมีกรดอมิโนที่มีคุณค่า

11.เก็บรักษาได้ง่าย เช่น การทำให้แห้ง

ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวต้องการเซลล์ที่ประกอบด้วยโปรตีนสูง ส่วนคาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก ไขมัน ต้องการปริมาณต่ำ และสามารถแข่งขันกับโปรตีนจากพืชหรือปลาป่นได้ มีกลิ่นรสดี และที่สำคัญคือมี lysine methionine และ tryptophan นอกจากชนิดของเชื้อที่ใช้ ยังขึ้นกับชนิดของอาหารและสภาพของการเจริญเติบโต

ภายในเซลล์ยีสต์มีส่วนประกอบของสารและเกลือแร่หลายชนิดเป็นปริมาณมากซึ่งเหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งอาหารของคนและสัตว์ โดยเฉพาะโปรตีน ซึ่งเฉลี่ยแล้วในเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยโปรตีนทั้งหมดประมาณ 45-50 % ของน้ำหนักแห้ง เป็นโปรตีนแท้ๆ ประมาณ 40 %ของน้ำหนักแห้ง ในส่วนของโปรตีนทั้งหมด ประกอบด้วยกรดแอมิโนประมาณ 80% เป็นกรดนิวคลีอิกประมาณ 12 % และแอมโมเนีย 8 % (Peppler, 1970) กรดแอมิโนในยีสต์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปตามชนิดของยีสต์และแหล่งอาหารที่ยีสต์เจริญ ดังแสดงในตารางที่ 3 นอกจากยีสต์จะให้คุณค่าทางด้านโปรตีนแล้ว ยังพบว่ายีสต์เป็นแหล่งของวิตามินและแร่ธาตุต่างๆ อีกด้วย ดังตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของกรดแอมิโนในเซลล์ของยีสต์จากแหล่งต่างๆ

Table 3 Amino acid composition of several yeast from different sources.

Amino acid	Content in yeast (g/16 gN)				
	Candida sp.Y47 (crude palm oil)[a]	*C. tropicalis* TISTR 5146 (Tuna condensate)[b]	*C. utilis* Y900 (pineapple cannery effluent)[c]	*C. tropicalis* F129 (crude palm oil)[d]	*K. marxianus* (whey)[e]
Lysine	4.21	5.26	7.70	8.40	6.90
Valine	4.50	3.60	4.70	5.70	5.40
Leucine	4.14	4.77	6.20	7.20	6.10
Isoleucine	3.60	3.36	4.00	5.10	4.00
Threonine	3.22	3.55	4.60	6.40	5.80
Methionine	-	0.87	1.00	1.30	1.90
Phenylalanine	2.60	2.79	3.40	4.30	2.80
Cystine	1.20	0	-	0.50	-
Tryptophan	-	-	1.30	-	1.40
Histidine	1.70	8.68	1.60	2.20	2.10
Tyrosine	2.40	2.17	-	2.80	2.40
Arginine	3.00	1.55	6.40	5.40	-

หมายเหตุ : - : วิเคราะห์ไม่พบ

a : Natthanonworagan (2000)

b : Sujarit (1997)

c : Nigam และคณะ (1998)

d : Lee และคณะ (1993)

e : Reed และ Nagodawithana (1991)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของวิตามินในเซลล์ยีสต์จากแหล่งต่างๆ

Table 4 Vitamin composition of several yeast from different sources.

Vitamin	Content in dry product (μg/g)			
	S. cerevisiae (molasses)	*C. utilis* (sulphite liquor)	*S. fragilis* (whey)	*C. utilis* (cane-molasses)
Thiamin HCL	165	130	20	25
Riboflavin	100	45	50	50
Niacin	585	400	330	335
Pyridoxine HCL	20	30	40	-
Folacin	13	21	14	20
Calcium d-pantothenate	100	40	115	120
Biotin	0-6	0-8	2	2
p-Aminobenzoic acid	160	11	24	-
Choline chloride	2710	2860	4550	5500
Inositol	3000	4500	3000	-

ที่มา : ดัดแปลงจาก Peppler (1970)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของแร่ธาตุในเซลล์ยีสต์จากแหล่งต่างๆ

Table 5 Mineral composition of several yeast from different sources

Element	Content in yeast dry matter	
	S. cerevisiae (molasses)	*C. utilis* (sulphite liquor)
Potassium (%)	2.0	2.1
Phosphorus (%)	1.1	2.0
Calcium (%)	0.4	0.9
Magnesium (%)	0.2	0.2
Sulphur (%)	0.4	0.4
Sodium (%)	0.2	0.02
Zinc (µg/g)	42	125
Iron (µg/g)	92	175
Copper (µg/g)	21	17
Lead (µg/g)	2.5	2
Manganese (µg/g)	4	35
Iodine (µg/g)	1.6	3.8
Total ash (%)	6.6	7.5

ที่มา : ดัดแปลงจาก Peppler (1970)

ตารางที่ 6 สายพันธุ์ยีสต์ที่นำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดียวทางเทคโนโลยีชีวภาพ

Table 6 Yeast strains for single cell protein with biotechnological uses

Yeast	Uses/potential uses of biomass
Kluyveromyces marxianus *K. lactis*	Animal feed yeast biomass from whey lactose
Candida utilis	Single cell protein (SCP) from sulphite waste liquor and wood sugars
Phaffia rhodozyma	Carotene pigment
Saccharomyces boulardii	Biotherapeutic agent
Pichia pastoris *Hansenula polymorpha*	SCP and recombinant proteins from methanol
Yarrowia lipolytica *Candida paraffinica*	SCP from n-alkanes
Schwanniomyces castellii	SCP from starch
Pichia stipitis *Candida shehatae*	SCP from lignocellulosic biomass
Rhodotorula glutinis *Candida palmioleophila*	Single cell oil (SCO), as substitutes for edible and non-edible oils from cheap carbon sources

ที่มา : ดัดแปลงจาก Walker (1998)

3.ชนิดของยีสต์ที่นิยมใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทมากเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวคือยีสต์ โดยมียีสต์หลายสายพันธุ์ถูกนำมาใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (ตารางที่ 6) สายพันธุ์ยีสต์ที่นิยมใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ได้แก่

1. Genus *Candida* โดยทั่วไปเซลล์มีรูปไข่หรือยาว ไม่สร้างแอสโคสปอร์ เพิ่มจำนวนเซลล์โดยการแตกหน่อรอบเซลล์ ยีสต์ทุกชนิดในสกุลนี้สร้างซูโดไมซีเลียม แต่มีบางชนิดสร้างไมซีเลียมจริง *Candida* ที่นิยมนำมาผลิตคือ *C. utilis, C. tropicalis, C. arborea, C. lipolytica, C. pulcherrima, C. rugosa, C. periphelosum, C. guilliermodii* และ *C. intermedia* (Cooney and Levine, 1972; Snyder, 1970 อ้างโดย ชุตินุช, 2540) ซึ่ง *C. utilis* เป็นยีสต์ที่นิยมนำมาผลิต

โปรตีนเซลล์เดียวมากที่สุด เพราะเจริญได้เร็ว มีปริมาณโปรตีนสูง และสามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529) รวมทั้งน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม ซึ่งเป็นน้ำตาลที่ใช้ยากสำหรับเชื้อชนิดอื่นๆ มีมากในน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ (ดวงพร คันธโชติ, 2528) นอกจากนี้ในรายงานของ Schauer และ Hanschke (1999) ยังพบว่า *Candida* sp. สามารถใช้ไซโลส และเซลโลไบโอสได้ 71 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบ *Candida* sp. 27 สายพันธุ์ สามารถใช้แป้งในรูปที่พืชเก็บสะสมไว้ เช่น starch ได้อีกด้วย

2. Genus *Saccharomyces* โดยปกติทั่วไปเซลล์จะมีรูปร่างกลม รูปรี ทรงกระบอก หรือยาว สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อรอบเซลล์ อาจสร้างซูโดไมซีเลียม แต่ไม่พบไมซีเลียมจริง ยีสต์สกุลนี้แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

-*Saccharomyces sensu stricto* กลุ่มนี้มีมากชนิดที่สุด ที่รู้จักกันดี ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*

-*Zygosaccharomyces* ยีสต์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยพวกที่ชอบน้ำตาลหลายชนิด เช่น *S. rouxii, S. bailii var osmophilis, S. bisporus var millis*

-*Torulaspora* และ *Debaryomyces globosus* ยีสต์กลุ่มนี้มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารมาก และใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด เช่น *S. cerevisiae* ใช้ในการทำขนมปัง เบียร์ ไวน์ รวมถึงโปรตีนเซลล์เดียว

3. Genus *Hansenula* ปกติมีรูปร่างกลมหรือไข่ สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อหลายขั้ว สร้างไมซีเลียมได้ดีเท่ากับซูโดไมซีเลียม สร้างแอสโคสปอร์รูปกลม ครึ่งวงกลม รูปหมวก หรือ รูปดาวเสาร์ มีการศึกษาใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว เช่น *H. polymorpha, H. saturnus, H. anomala* เป็นต้น

4. Genus *Schawanniomyces* รูปร่างกลม รี ไข่ แต่บางครั้งเป็นรูปยาว หรือทรงกระบอก มีการสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อทุกทิศทาง เป็นยีสต์ที่สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยตรง เพราะสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส และกลูโคอะไมเลสย่อยแป้งได้ จึงมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

5. Genus *Schizosaccharomyces* เซลล์รูปกลมถึงรูปทรงกระบอก สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแบ่งตัวแบบทวิภาค (binary fission) ยีสต์พวกนี้ไม่มีการแตกหน่อ ผนังเซลล์ไม่มีไคตินและแมนแนน แต่จะมี เอส-กลูแคน เพิ่มขึ้นจากกลูแคนปกติของยีสต์ทั่วไป เป็นยีสต์อีกสกุลที่สามารถนำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้ ยีสต์สายพันธุ์นี้ได้แก่ *Schizosaccharomyces pombe* ซึ่งถูกแยกได้จากน้ำตาลและกากน้ำตาลที่ทำมาจากอ้อย และจากไวน์ที่ทำมาจากปาล์ม ยีสต์สายพันธุ์ *Schizosaccharomyces*

sp. สามารถหมักน้ำตาลโมเลกุลสั้นๆ แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลโพลีแซคคาไรด์ได้ (Beneke and Stevenson, 1978 อ้างโดย ชนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์, 2543)

6. Genus *Kluyveromyces* มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อรอบเซลล์ อาจสร้างซูโดไมซีเลียม ต้องการวิตามินจากแหล่งภายนอกในการเติบโต สามารถหมักน้ำตาลได้อย่างรวดเร็ว เช่น น้ำตาลแลกโตส ได้แก่ *K. lactis* และ *K. fragilis* ทั้ง 2 ชนิดสามารถใช้ในการผลิตเอนไซม์แลกเตส โดยใช้วัตถุดิบเป็นหางนมจากการทำเนย นอกจากนี้ *K. fragilis* ยังนิยมใช้ผลิตโปรตีนจากหางนม เนื่องจากสามารถใช้น้ำตาลแลกโตสในหางนมได้ดี ทั้งยังมีกรดแอมิโนที่จำเป็น เช่น ไลซีน ในปริมาณสูง ซึ่งในธัญพืชโดยทั่วไปมักขาดกรดแอมิโนชนิดนี้ แต่มีข้อจำกัดคือ ขาดกรดแอมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น ซีสตีน

4.การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากแหล่งของวัสดุเศษเหลือทางอุตสาหกรรมเกษตร

หลักการพิจารณาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากของเสีย (ชุตินุช สุจริต, 2540)

1.ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ จะต้องเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในของเสียนั้นได้ และควรเป็นจุลินทรีย์ที่มีการยอมรับในด้านต่างๆ ด้วย เช่น คุณค่าอาหาร ปริมาณโปรตีน และกรดแอมิโน เป็นต้น

2.ปริมาณของเสียจะต้องมีมากพอที่จะลงทุนผลิต

3.กรรมวิธีการผลิตที่เหมาะสมที่สุดต้องได้รับการคัดเลือกอย่างดี ต้องสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ โดยผลิตภายใต้สภาวะที่ปลอดเชื้อ และสามารถป้องกันการปะปนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้จุลินทรีย์ที่เลี้ยงเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี

4.ต้องคำนึงถึงตลาดและราคาผลผลิตที่ได้ให้เหมาะสม

5.มีการทดสอบด้านความปลอดภัยในการบริโภค เช่น ปริมาณสารพิษ โดยทดลองกับสัตว์ทดลองก่อนที่จะจำหน่าย

การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด รวมถึงวัสดุเศษเหลือทางอุตสาหกรรมเกษตร ซึ่งจะมีส่วนประกอบของสารอินทรีย์สูง ในปัจจุบันประเทศต่างๆ แถบตะวันออกและญี่ปุ่นมีการศึกษาถึงการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากของเสียพวกอินทรีย์สาร ได้แก่

4.1 น้ำทิ้งจากโรงฆ่าสัตว์ โรงงานผลิตกุ้ง โรงงานเนยแข็ง โรงงานปลาทูน่า

Rydin และคณะ (1990) เลี้ยงยีสต์ *C. tropicalis* S001 ในน้ำทิ้งโรงฆ่าสัตว์ที่แยกไขมันออกแล้วเติม triolein เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าได้มวลชีวภาพสูงสุด 0.70 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมไขมัน ส่วน Rhishipal และคณะ (1998) ผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเปลือกกุ้งซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือของโรงงานผลิตกุ้ง โดยใช้ยีสต์ที่แยกได้จากน้ำทะเล ได้แก่ M10 (*Candida*), M15 (*Candida*), M23

(*Rhodotorula*) และ M28 (*Rhodotorula*) พบว่า ยีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ใน protein enrichment media (prawn-shell waste) เมื่อศึกษาถึงเปอร์เซ็นต์โปรตีน ก็พบว่าเพิ่มขึ้นจาก 29-41 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้ง) เป็น 60.6-70.4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้ง) โดย M15 (*Candida*) เป็นสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์โปรตีนมากที่สุด และจากการศึกษาของ Carlotti และคณะ (1991) เลี้ยง *C. kefyr* LY496 ในน้ำทิ้งโรงงานทำเนยแข็งได้มวลชีวภาพ 43 กรัมต่อลิตร และเลี้ยง *C. valida* LY497 ร่วมกับ *C. kefyr* LY496 ภายใต้สภาวะไม่ปลอดเชื้อในน้ำทิ้งโรงงานทำเนยแข็ง ได้มวลชีวภาพเพิ่มขึ้นร้อยละ 20 จากการศึกษาของ สุวิทย์ สุวรรณโณ (2539) ศึกษาการเจริญของ *C. tropicalis* TISTR 5136 ในน้ำนึ่งปลาทูน่า ที่เติมน้ำตาลกลูโครสร้อยละ 2 พบว่าให้ปริมาณมวลชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 15.1 กรัมต่อลิตร สามารถลดค่าซีโอดีได้ประมาณ 84 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 3 วัน และเซลล์ที่ได้ประกอบด้วยโปรตีนและไขมัน 45 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ ชุตินุช สุจริต (2540) เลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ในน้ำทิ้งปลาทูน่าหลังการแยกโปรตีนและไขมัน พบว่า *C. tropicalis* TISTR 5146 เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 3.27 กรัมต่อลิตร หลังเลี้ยงเชื้อสามารถลดค่าซีโอดี น้ำมันและกรีส ได้ 18.23 และ 46.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.2 น้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง โรงงานแปรรูปมันฝรั่ง

Manial และคณะ (1991) เลี้ยง *Endomycopsis fibuligera* ร่วมกับ *C. utilis* ในน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง พบว่า ลดค่าบีโอดี และซีโอดี ได้ร้อยละ 91 และ 94 ตามลำดับ และได้มวลชีวภาพ 20 กรัมต่อลิตร และในการศึกษาของ ดวงใจ โอชัยกุล และ มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ (2541) เลี้ยง *C. tropicalis* TISTR 5136 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปมันฝรั่งภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมทำให้ยีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.47 ต่อชั่วโมง ให้ปริมาณมวลชีวภาพ 1.21 กรัมต่อลิตร และสามารถลดค่าซีโอดี 78.97 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ยีสต์ที่ได้ประกอบด้วยโปรตีนและไขมัน 32.19 และ 0.454 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

4.3 น้ำทิ้งจากโรงงานสับปะรด โรงงานน้ำผักผลไม้

Nigam (1998) ผลิต SCP จากน้ำทิ้งโรงงานสับปะรด พบว่าองค์ประกอบของ SCP ที่ผลิตได้มีโปรตีนรวม 55.3 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนแท้ 51.2 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 27.4 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอมิโนครบทุกตัว แต่พบกรดแอมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในปริมาณน้อย ในขณะที่ Chanda และ Chakrabartic (1996) ผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำผักผลไม้ 4 ชนิด (Deprotienized leaf juice : DLJ) คือ turnip, mustard, radish และ cauliflower โดยใช้ยีสต์ 3 สายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3095, *Torula utilis* NCIM 3055 และ *Candida lipolytica*

NCIM 3229 พบว่ายีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงใน DLJ มีโปรตีนและวิตามินสูง แต่กลับมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตในปริมาณที่ต่ำกว่ายีสต์มาตรฐานที่นำมาผลิตเป็นอาหาร ส่วน Shojaosadati และคณะ (1999) ผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจาก sugar beet stillage ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นพวก acetic acid, lactic acid glycerol และน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ยีสต์ *Hansenula* sp. เป็นการเลี้ยงแบบต่อเนื่องภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าได้มวลชีวภาพ 5.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นโปรตีน 39.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติม $(NH_4)_2SO_4$ และ KH_2PO_4 เป็นแหล่งไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ตามลำดับ พบว่าได้มวลชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็น 8.5 กรัมต่อลิตร คิดเป็นโปรตีนร้อยละ 50.6 นอกจากนี้ยังพบกรดแอมิโนที่จำเป็นเทียบเท่ามาตรฐาน (FAO) และวัตถุดิบอาหารสัตว์อื่นๆ เช่น ปลาป่น กากถั่วเหลือง อย่างไรก็ตาม โปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตได้ยังขาดกรดแอมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ โดยเฉพาะ methionine เช่นเดียวกับยีสต์อื่นๆ

4.4 น้ำทิ้งโรงงานผงชูรส

Yiao (1988) ใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตผงชูรส เลี้ยงยีสต์ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. utilis, C. tropicalis, C. candidum, S. cerevisiae, S. fermentari* เพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส พบว่า *C. tropicalis* เจริญได้ดีที่สุด ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 12.35 กรัมต่อลิตร สามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 68.33 ให้ผลผลิตเซลล์ที่มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 54.4

4.5 น้ำทิ้งจากโรงงานข้าวโพดหมัก

Hang และคณะ (2003) บำบัดและผลิตเซลล์ยีสต์โดยเลี้ยง *K. marxianus* NRRL Y-610 ในน้ำข้าวโพดหมัก (corn silage juice) ที่มีพีเอชต่ำ (3.6) และมีสารประกอบอินทรีย์ต่างๆอยู่สูง (lactic acid, acetic acid, ethanol และน้ำตาล) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 13.3 กรัมต่อลิตร และยังสามารถกำจัด lactic acid, acetic acid และ ethanol ในน้ำทิ้งข้าวโพดหมักได้อีกด้วย

4.6 น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ณัฐวรรธน์ ชูโชติ และ รัชยาภรณ์ ผลมั่ง (2537) เปรียบเทียบการเจริญของ *C. palmioleophila* และ *C. tropicalis* เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยมีการเติมน้ำมันปาล์ม 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 5.1 และ 4.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และยังสามารถลดค่าซีโอดีในน้ำทิ้งได้อีกด้วย นอกจากนี้ ตรีภพ พินันโสตติกุล และ เอกพงษ์ วงศ์สัมพันธ์ (2544) ศึกษาการเจริญของ *C. tropicalis* TISTR 5146 และ *C. utilis* TISTR 5001 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า

C. utilis TISTR 5001 เจริญและลดค่าซีโอดีได้ดีกว่า *C. tropicalis* TISTR 5146 โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 7.27 กรัมต่อลิตรและสามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 41 ในขณะที่ *C. tropicalis* TISTR 5146 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเพียง 6.10 กรัมต่อลิตร และสามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 31

5.การประยุกต์ใช้ยีสต์ในอาหารสัตว์

Association of American Feed Control, Office, Inc. (AAFCO) แบ่งชนิดของยีสต์ที่ใช้ในอาหารสัตว์เป็น 8 ชนิด (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540)

1.Primary Dried Yeast หรือ Dried Yeast เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำยีสต์มาเลี้ยง แยกเซลล์ และทำให้แห้ง เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์โดยเฉพาะ แต่ความนิยมในการใช้ยีสต์ชนิดนี้เป็นอาหารสัตว์ไม่มากนัก เนื่องจากมีราคาแพง ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ประกอบด้วยเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้ว ไม่มีกิจกรรมการหมัก ประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนมากผลิตโดยใช้ยีสต์จีนัส *Saccharomyces*

2.Active Dried Yeast ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ยังคงมีกิจกรรมการหมัก มีเซลล์ที่มีชีวิตประมาณ $15x10^9$ เซลล์ต่อกรัม ผลิตโดยยีสต์หลายจีนัส แต่โดยส่วนใหญ่จะใช้ *Saccharomyces* ปริมาณโปรตีนในมาตรฐานไม่ได้กำหนดแน่นอน มีราคาแพง อาจขายในรูปของยีสต์อาหารสัตว์หรือใช้สำหรับผลิต yeast culture

3.Irradiated Dried Yeast ใช้กันมากในระยะหนึ่งที่ผ่านมาเพื่อเป็นอาหารสัตว์สี่ขา เป็นแหล่งของวิตามินดี 2

4.Brewers' Dried Yeast ได้จากการนำยีสต์ที่ผลิตเบียร์มาทำให้แห้ง ไม่มีกิจกรรมการหมัก เนื่องจากไม่มีเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตเพราะยีสต์ทั้งหมดตายในระหว่างการทำให้แห้ง กำหนดให้มีโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์

5.Grain Distillers' Dried Yeast ยีสต์อาหารสัตว์ชนิดนี้ไม่มีกิจกรรมการหมักเช่นกัน เป็นผลิตภัณฑ์ของยีสต์ในจีนัส *Saccharomyces* ซึ่งใช้ในการผลิตสุรากลั่นชนิดต่างๆ ซึ่งใช้ธัญพืชเป็นวัตถุดิบ มีโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์

6.Molasses Distillers' Dried Yeast ยีสต์อาหารสัตว์ชนิดนี้มีลักษณะเหมือนกับ grain distillers' dried yeast เพียงแต่ *Saccharomyces* ที่ใช้เป็นสายพันธุ์สำหรับผลิตสุรากลั่นจากกากน้ำตาล

7.Torula Dried Yeast ยีสต์แห้งชนิดนี้ไม่มีกิจกรรมการหมักเช่นกัน ยีสต์ที่ใช้คือ จีนัส *Torulopsis* ซึ่งภายหลังจัดจำแนกใหม่เป็นจีนัส *Candida* มีโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ และคุณค่าอาหารเท่าๆ กับ brewers' dried yeast

8.Yeast Culture เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะจำเพาะตามความหมายของ AAFCO นั้น yeast culture หมายถึงผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะแห้ง ประกอบด้วยยีสต์และอาหารที่ใช้เลี้ยง โดยวิธีการทำให้แห้งนั้น ความสามารถในการหมักของยีสต์ยังคงอยู่ การผลิต yeast culture อาจทำโดยการเลี้ยงยีสต์ในสับสเตรท ที่อาจเป็นกากน้ำตาลหรือเมล็ดธัญพืช หรือทั้ง 2 อย่าง ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ จากนั้นทำให้แห้งจนถึงระดับที่ต้องการโดยใช้อุณหภูมิค่อนข้างต่ำ ไม่ทำลายเอนไซม์ และวิตามินบีของยีสต์ ผลิตภัณฑ์มีโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์ที่ใช้ คือยีสต์ในจีนัส *Saccharomyces*

มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการใช้ยีสต์เป็นอาหารสัตว์มากมาย เช่น บุญลือ สมบูรณ์วงศ์ (2532) ศึกษาการใช้มันเทศหมักด้วยยีสต์เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสุกรรุ่น พบว่าการใช้มันเทศหมักด้วยยีสต์สามารถทำให้ปริมาณโปรตีนของมันเทศเพิ่มขึ้นได้ แต่ทั้งนี้ขึ้นกับคุณภาพของมันเทศหมักเป็นสำคัญ นอกจากนี้ยังสามารถใช้มันเทศหมักด้วยยีสต์แห้งบดทดแทนข้าวโพดทั้งหมดในสูตรอาหารเลี้ยงสุกรรุ่นและสุกรขุนได้โดยไม่มีผลต่อสมรรถภาพในการผลิต และคุณภาพซากของสุกรแต่อย่างใด

Onifade และ Babatunde (1996) ศึกษาการใช้ยีสต์ต่อการเจริญเติบโต การกินได้ และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ในไก่กระทงที่ให้อาหารเยื่อใยสูง พบว่าการให้ยีสต์ 3.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ทำให้ไก่มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้ยีสต์ 6.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร กลับพบว่า มีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีกว่า อย่างไรก็ตามไก่ทุกกลุ่มที่ได้รับยีสต์ในอาหาร มีปริมาณการกินได้มากกว่าไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับยีสต์ในอาหาร

อาทิตย์ พลายมาศ และ หทัยรัตน์ พงศ์พิพัฒนาการ (2544) ศึกษาผลของการเสริมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในสูตรอาหารต่อสมรรถภาพการผลิตในไก่กระทง พบว่ามีแนวโน้มทำให้ไก่กระทงมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นตามระดับของการเสริมยีสต์ โดยระดับที่เหมาะสมที่ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของไก่กระทงมีแนวโน้มที่ดีขึ้นและต้นทุนการผลิตต่ำลงคือที่ระดับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหารตลอดการเลี้ยง หรือเสริมยีสต์ที่ระดับ 0.10 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงอายุ 0-3 สัปดาห์ และเสริมที่ระดับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงอายุ 3-6 สัปดาห์

Dann และคณะ (2000) ศึกษาการใช้ยีสต์ในอาหารสัตว์ต่อปริมาณการกินวัตถุแห้ง (dry matter intake) ในโคนม พบว่า โคที่ได้รับยีสต์ในอาหารมีแนวโน้มการกินได้วัตถุแห้งที่ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Erasmus และคณะ (1992) และ Wohlt และคณะ (1998) โดยพบว่า การเสริมยีสต์ลงในอาหารสัตว์ทำให้ค่าการกินได้วัตถุแห้ง (dry matter intake) สูงขึ้น แต่เมื่อมาศึกษาถึงปริมาณผลผลิต และองค์ประกอบในน้ำนม พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันของผลผลิตน้ำนม รวมถึงองค์ประกอบในน้ำนมในโคกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับยีสต์ในอาหาร ในขณะที่เมื่อทำการศึกษาถึงระยะเวลาในการให้ผลผลิตน้ำนมสูงสุดกลับพบว่า โคกลุ่มที่ได้รับยีสต์ในอาหารจะให้ผลผลิตน้ำนมสูงสุด

ก่อนโคกลุ่มที่ไม่ได้รับยีสต์ในอาหาร สอดคล้องกับการศึกษาของ Wohlt และคณะ (1991) ซึ่งพบว่าโคกลุ่มที่ได้รับยีสต์ในอาหารจะให้น้ำนมเร็วกว่าในกลุ่มที่ไม่ได้รับยีสต์ในอาหาร จากรายงานการศึกษาของ Newbold และคณะ (1998) พบว่าการใช้ยีสต์อาหารสัตว์มีผลต่อการเพิ่มของจำนวนแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน รวมถึงเชื้อ *Selenomonas ruminantium* (Tiwari *et al.*,1969 อ้างโดย Newbold *et al.*, 1998) และ cellulolytic bacteria (Harrison *et al.*, 1988) ซึ่งปริมาณของจุลินทรีย์ที่สูงขึ้นทำให้มีการไหลผ่านของไนโตรเจนเข้าสู่ดูโอดินัมในโคที่ได้รับยีสต์ในอาหารซึ่งส่งผลต่อการดูดซึมและใช้ประโยชน์ได้ต่อไปอีกด้วย (Erasmus *et al.*, 1992)

นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาในสัตว์น้ำ โดยชุตินุช สุจริต (2540) นำเซลล์ยีสต์แห้งของ *C. tropicalis* TISTR 5146 เลี้ยงปลากดเหลืองโดยใช้ทดแทนปลาป่นในสูตรอาหาร ร้อยละ 25 และ 50 พบว่า เมื่อทดแทนปลาป่นด้วยยีสต์ร้อยละ 25 พบว่าปลากดเหลืองมีค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและค่าการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิดีกว่าชุดควบคุมและสูตรอาหารที่ทดแทนปลาป่นด้วยยีสต์ร้อยละ 50

ในปัจจุบันมีการศึกษาผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำโดยใช้สารเบต้ากลูแคนสามารถที่จะสกัดได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น รา แบคทีเรีย และยีสต์ โดยได้มีการศึกษา และประยุกต์นำมาใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และเป็นยายับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอก (Reed and Nagodawitthana, 1991) นอกจากนี้ ยังใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และยาบางชนิด สำหรับ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีกลูแคนเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ซึ่งสามารถที่จะสกัดสารเบต้ากลูแคนเพื่อนำไปใช้ในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำได้ มลฤดี สิทธิพันธุ์ (2541) ศึกษาการใช้สารเบต้ากลูแคนในกุ้งกุลาดำ พบว่า กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมเท่ากับ 9.89×10^{7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดเท่ากับ 0.60×10^{4} โคโลนีต่อมิลลิลิตร และความต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยคิดเป็นอัตราการรอดตายเท่ากับ 90.00 เปอร์เซ็นต์

6 แหล่งที่มาและคุณลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบแบบใช้น้ำ หรือแบบมาตรฐาน จะมีน้ำทิ้งมาจาก 2 ขั้นตอน คือ น้ำนึ่งปาล์มหรือน้ำนึ่งจากหม้อฆ่าเชื้อ (sterilizer condensate) ซึ่งเป็นน้ำทิ้งจากการอบทะลายปาล์มด้วยไอน้ำ น้ำส่วนนี้แม้จะมีน้ำมันอยู่แต่มีสารแขวนลอยต่ำและไม่มีสภาพเป็นอิมัลชัน โดยทั่วไปการอบทะลายปาล์ม 25 ตัน จะมีน้ำนึ่งปาล์มเกิดขึ้นประมาณ 2.0-3.0 ลบ.ม. น้ำทิ้งอีกส่วนมาจากการแยกน้ำและกากสลัดจ์ออกจากน้ำมัน น้ำทิ้งส่วนนี้เกิดขึ้นมากที่สุดและเป็นน้ำทิ้งที่มีของแข็งแขวนลอย

มาก กรณีที่ใช้ดีแคนเตอร์ในการแยกน้ำทิ้ง จากการแยกน้ำและกากสลัดจ์ออกจากน้ำมัน จะมีน้ำสลัดจ์ที่ถูกแยกออกมาประมาณ 0.35 ลบ.ม./วัตถุดิบ 1 ตันทะลายปาล์มสด และกรณีที่ใช้ separator จะมีน้ำสลัดจ์ที่ถูกแยกออกมาประมาณ 0.65 ลบ.ม./วัตถุดิบ 1 ตันทะลายปาล์มสด (จินตนา แก้วบริสุทธิ์, 2541) ก่อนจะไหลไปรวมกันเป็นน้ำทิ้งรวมในบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงาน

คุณลักษณะของน้ำทิ้งจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของน้ำทิ้ง ได้แก่ น้ำทิ้งจากบ่อรวบรวมน้ำเสีย น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (ตารางที่ 7) แสดงให้เห็นว่า น้ำทิ้งจากบ่อรวบรวมน้ำเสียของโรงงานมีค่า BOD (biochemical oxygen demand) และ COD (chemical oxygen demand) อยู่ในปริมาณสูง รวมทั้งค่ากรดไขมัน ปริมาณของแข็งทั้งในรูปสารที่ระเหยได้ และสารแขวนลอย (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533) ต่อมา อรัญ หันพงศ์กิตติกูล และคณะ (2537) ศึกษาคุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 4 โรง พบว่าน้ำทิ้งจากหม้อนึ่งมีปริมาณสารแขวนลอยต่ำ (เฉลี่ย 10.30 กรัมต่อลิตร) และมีน้ำมันค่อนข้างสูง (เฉลี่ย 14.57 กรัมต่อลิตร) ส่วนน้ำทิ้งจาก separator ยังคงมีน้ำมันเหลืออยู่ 12.78 กรัมต่อลิตร ในขณะที่น้ำมันจากดีแคนเตอร์มีน้ำมันอยู่ 15.21 กรัมต่อลิตร ส่วนน้ำทิ้งจากบ่อบำบัดน้ำทิ้งรวมมีน้ำมัน 9.45 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้น้ำทิ้งยังประกอบด้วย อินทรีย์สารและแร่ธาตุต่างๆ ที่สำคัญจึงสามารถก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมได้ ดังแสดงในตารางที่ 8 และ 9

นอกจากนี้ Mustar และคณะ (2001) ได้ศึกษาถึงองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อนำมาใช้ในการเลี้ยง *S. cerevisiae* 3010 และ *C. utilis* 1017 พบว่าในน้ำทิ้งมีองค์ประกอบพวกแร่ธาตุต่างๆ เช่น แมกนีเซียม(Mg), แคลเซียม(Ca), โซเดียม(Na) และโพแทสเซียม(K) รวมถึงน้ำตาลที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ ดังแสดงในตารางที่ 10

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

ตารางที่ 7 องค์ประกอบและคุณสมบัติของน้ำทิ้งจากขั้นตอนต่างๆ ในการสกัดน้ำมันปาล์ม และน้ำทิ้งรวมของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Table 7 Composition and characteristic from several process of palm oil mill effluent and combined palm oil mill effluent

ปัจจัยคุณภาพ	น้ำทิ้งจากบ่อรวม	น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ	น้ำทิ้งจากเครื่องแยกน้ำและกากสลัดจ์ออกจากน้ำมัน
สี	น้ำตาลคล้ำ	น้ำตาล	น้ำตาลหรือน้ำตาลปนดำ
พีเอช	4.05-4.62	4.84-5.35	4.61-4.89
บีโอดี	54,750-60,000	22,800-41,985	21,000-45,375
ซีโอดี	80,523-115,934	45,360-80,146	38,246-67,567
กรดระเหย (ในรูปกรดอะซีติก)	3,128-5,870	998-7,125	1,838-2,273
ความเป็นด่าง (ในรูปแคลเซียมคาร์บอเนต)	68-200	37-1,576	86-480
ไขมัน	16-2,449	20-1,165	4
ของแข็งทั้งหมด	49,063-88,508	26,367-76,733	25,634-47,242
ของแข็งระเหยได้	42,063-81,872	24,415-67,635	23,056-39,617
ของแข็งแขวนลอย	18,500-52,000	2,600-6,100	2,900-20,300
ไนโตรเจน			
-แอมโมเนีย	27-61	7-66.3	22-23
-อินทรีย์สาร	551-1,172	22-1,287	518

หมายเหตุ ทุกหน่วยมีค่าเป็น มิลลิกรัม/ลิตร ยกเว้นสี และพีเอช

ที่มา : ดัดแปลงจากพูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ (2533)

ตารางที่ 8 องค์ประกอบโดยประมาณของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Table 8 Proximate composition of palm oil mill effluents.

องค์ประกอบ	Sludge		Condensate	
	Dry wt basis	Wet wt basis	Dry wt basis	Wet wt basis
Total solids	-	4.6	-	6.0
Crude protein (K x 6.25)	10.9	0.5	8.8	0.5
Ether extract	25.6	1.2	34.6	2.1
Ash	11.4	0.5	14.2	0.9
Crude fibre	9.7	0.5	3.3	0.2
Nitrogen-free extract	42.4	1.9	39.1	2.3

ที่มา : Hwang และคณะ (1978)

ตารางที่ 9 ปริมาณแร่ธาตุของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Table 9 Mineral composition of palm oil mill effluents.

แร่ธาตุ	Sludge		Condensate	
	Dry wt basis (ppm)	Wet wt basis (%)	Dry wt basis (ppm)	Wet wt basis (%)
N	689	1.73	944	1.83
P	160	0.31	152	0.36
K	1645	3.19	1300	3.09
Na	31	0.06	22	0.05
Mg	970	1.88	1020	2.42
Ca	110	0.21	140	0.33
Fe	50	0.10	18	0.04
Cu	28	0.05	29	0.07
Zn	13	0.025	15	0.035

ที่มา : Hwang และคณะ (1978)

ตารางที่ 10 คุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Table 10 Characterisation of Palm Oil Mill Effluent

pH	3.9-4.0
Total solids	44.6 g/l
Total suspended solids	14.1 g/l
Total dissolved solids	19.8 g/l
Total carbohydrates	9.0 g/l
Reducing sugars	3.0 g/l
Total phosphate	203 mg/l
Mg	212 mg/l
Ca	185 mg/l
Na	14.5 mg/l
Za	12.0 mg/l
Cu	2.0 mg/l
K	3475 mg/l
Fe	27.4 mg/l

ที่มา : Mustar และคณะ (2001)

7 ปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของยีสต์

7.1 สารอาหาร

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปในการสังเคราะห์เซลล์ยีสต์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในการสังเคราะห์เซลล์ยีสต์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ (สมใจ ศิริโภค, 2540) การมีสารอาหารหรือสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่างกันจะทำให้การเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำทิ้งต่างกัน สำหรับแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่ใช้ผลิตยีสต์เพื่อเป็นอาหารเสริมโปรตีน มักนิยมใช้วัสดุที่มีราคาถูกหรือของเหลือทิ้งจากกระบวนการอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น กากน้ำตาล ซึ่งเป็นส่วนที่เหลือจากการทำน้ำตาลจากอ้อยหรือหัวบีท น้ำเวย์ ซึ่งเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมการทำเนยแข็งและน้ำมัน

งานวิจัยหลายฉบับรายงานว่ายีสต์มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนประเภทน้ำมันเพื่อการเจริญเติบโตได้ ได้แก่ จากการศึกษาของ Koh และคณะ (1983) พบว่า *Torulopsis candida* Y128 สามารถเจริญได้ดีในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ โดยยีสต์สามารถย่อยน้ำมันปาล์มดิบได้เซลล์แห้ง 14.27 กรัมต่อลิตร และให้เซลล์ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และให้กรดแอมิโนใกล้เคียงกับค่ามาตรฐาน ต่อมา Koh และคณะ (1985) เลี้ยง *T. candida* Y128 เพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยใช้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ายีสต์สามารถเจริญได้ดี ให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) 0.43 ต่อชั่วโมง ในขณะที่ Rydin และคณะ (1990) พบว่า *C. tropicalis* S001 เจริญได้ดีในน้ำทิ้งโรงฆ่าสัตว์ที่มีการเติม triolein เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.16 ต่อชั่วโมง และได้มวลชีวภาพเท่ากับ 0.70 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมไขมัน ในการศึกษาของ Zinjarde และ Pant (2002) เก็บตัวอย่างน้ำที่มีการปนเปื้อนน้ำมันแถบ Mumbai คัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้น้ำมัน โดยเลี้ยงใน enrichment medium พบยีสต์ 6 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ดี โดยพบว่า *Y. lipolytica* สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ดีที่สุด (45 เปอร์เซ็นต์) ภายในเวลา 5 วัน ในการศึกษาของ ขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์ (2543) พบว่ายีสต์ในสกุล *Candida* sp. เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่พบมากที่สุดจากการเก็บตัวอย่างดินและพืชบริเวณสวนปาล์มและโรงงานหีบน้ำมันปาล์มและสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มดิบ 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการเติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 6.0 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง 9.50 และ 9.46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ จากการศึกษาของ ณัฐวรรธน์ ชูโชติ และ รัชยาภรณ์ ผลมั่ง (2537) เปรียบเทียบการเจริญของ *C. palmioleophila* และ *C. tropicalis* เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยมีการเติมน้ำมันปาล์ม 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *C. palmioleophila* ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในน้ำทิ้งที่เติมน้ำมันปาล์ม 5 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 5.1 กรัมต่อลิตร สำหรับ *C. tropicalis* ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในน้ำทิ้งที่เติมน้ำมันปาล์ม 5 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกัน โดยได้ 4.9 กรัมต่อลิตร

7.2 สภาพความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหาร

โดยทั่วไปยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ชอบความเป็นกรดและทนกรดได้ดี ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วงพีเอช 4.5-6.5 (Walker, 1998) ซึ่งพีเอชที่เป็นกรดนี้ จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ปะปนมา พีเอชที่เหมาะสมของยีสต์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป

Montet และคณะ (1983 อ้างโดย ปรีชา มุณีศรี, 2538) เลี้ยงเชื้อยีสต์ *Candida curvata, C. rugosa, C. deformen, C. lipolytica, C. porapsilosis, Cryptococcus uniguttilatus, Geotrichum candidum, Trichosporum cutaneum* และ *Rhodotorula pilimanae* ในอาหาร

เหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 0.5 และ 0.2 พีเอช 3.5 และ 6.5 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว พบว่าพีเอช 3.5 เชื้อ *Candida rugosa* สามารถเจริญได้สูงสุด โดยได้เซลล์แห้งและโปรตีน 0.80 และ 0.35 กรัมต่อกรัมของสับสเตรท ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 7 ชั่วโมง

Koh และคณะ (1985) พบว่า *Torulopsis candida* Y128 เจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 แต่ที่ความเข้มข้นของน้ำมันร้อยละ 2 การเจริญของเชื้อกลับลดลง ค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 3.5 จัดว่าเป็นเชื้อที่ทนกรดได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น

นอกจากนี้ยังพบว่า *C. tropicalis* S001 เจริญได้ดีที่พีเอชช่วง 3.2-4.0 (Rydin *et al.*, 1990) *C. tropicalis* F129 เจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มดิบเป็นส่วนประกอบ พีเอชเริ่มต้น 6.0 (Lee *et al.*, 1993) *C. tropicalis* TISTR 5136 เจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำนึ่งปลาทูน่า พีเอช 4.5 (สุวิทย์ สุวรรณโณ, 2539) *C. tropicalis* TISTR 5146 เจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นส่วนประกอบ มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 (ชุตินุช สุจริต, 2540) *Candida* sp. สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่พีเอชเริ่มต้น 4.5-6.5 (ขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์, 2543)

7.3 อุณหภูมิ

ยีสต์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกัน (ตารางที่ 11) โดยส่วนใหญ่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของยีสต์อยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์ยังสามารถเติบโตได้ประมาณ 35-47 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเติบโตได้จะอยู่ระหว่าง 0-5 องศาเซลเซียส ไม่พบยีสต์ที่เป็นเทอร์โมไฟล์หรือยีสต์ที่สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2535) ยีสต์แต่ละชนิดเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เช่น *Leucosporidium frigidum* และ *Leucosporidium nivalis* เจริญได้ในช่วง -2 ถึง 20 องศาเซลเซียส (psychrophilic), *Candida lipolytica* 5-35 องศาเซลเซียส (mesophilic), *Candida parapsilosis* และ *Saccharomyces telluris* 8-42 องศาเซลเซียส (thermotolerant), *Torulopsis bovina* และ *Candida slooffii* 25-45 องศาเซลเซียส (thermophilic) (Helen and Kenneth, 1976)

ในการศึกษาของ Lemmel และคณะ (1979 อ้างโดย ขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์, 2543) ศึกษาการเจริญในสภาวะที่เหมาะสมของ *Saccharomycopsis fibuliger* ในน้ำเสียจากขบวนการผลิตมันฝรั่งโดยเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่า สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ส่วน Koh และคณะ (1983) เลี้ยงยีสต์ *Torulopsis candida* Y128 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ (2 เปอร์เซ็นต์) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ายีสต์สามารถเจริญได้ดีในน้ำมันปาล์มดิบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ต่อมา Koh และคณะ (1985) ใช้น้ำมัน 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อเจริญได้ดีในอาหารที่ใช้

ตารางที่ 11 อุณหภูมิในการเจริญของยีสต์ต่างๆ

Table 11 Growth temperature of several yeast

Species	Temperature		
	Minimum	optimum	maximum
Mesophilic and facultative psychrophilic yeast			
Candida parapsilosis	0	20-25	30
Candida *utilis*	5-10		
Debaryomyces hansenii	0		35
Hansenula valbyensis	5		32-35
Kloeckera apiculata	3	30	35
Nadsonia elongata	0		25
Pichia membranaefaciens	3		30
Rhodotorula glutinis	0	23	<30
Rhodotorula gracilis	5	27	37-42
Saccharomyces carlbergensis	0	25	33.5
Saccharomyces cerevisiae	0-5	28	40-42
Saccharomyces fragilis	5		45
Saccharomyces intermedius	0.5		40
Saccharomyces ludwigii	1-3		37-38
Saccharomyces marxianus	0.5		46-47
Saccharomyces mellis	23		35
Saccharomyces octosporus	17		33
Saccharomyces pastorianus	0.5		24
Saccharomyces turbidans	0.5		40
Saccharomyces validus	0.5		39-40
Saccharomycopsis guttulata	35		40
Torulopsis candida	5	22	32
Torulopsis molischiana	5	22	<42
Obligate phychrophilic yeast			
Candida frigida	(-5)-(-7)	15	20
Candida gelida	(-5)-(-7)	15	20
Candida nivalis	(-5)-(-7)	15	20
Candida scottii	0	4-15	15-20
Rhodotorula infirmo-miniata	-2	14-18	26-28

ที่มา :ดัดแปลงจากวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2535)

น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ที่ 32 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่ Rydin และคณะ (1990) ทดลองเลี้ยงยีสต์ *C. tropicalis* S001 ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าสัตว์ พบว่า เมื่ออุณหภูมิของการเลี้ยงยีสต์เพิ่มขึ้นจาก 30 องศาเซลเซียสเป็น 38 องศาเซลเซียส ยีสต์ยังคงมีการเจริญต่อไป แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจนถึง 40 องศาเซลเซียส ยีสต์จะหยุดการเจริญทันที ต่อมา Lee และคณะ (1993) พบว่า *Candida tropicalis* F-129 จัดเป็น thermotolerant yeast โดยสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่ Nakahara (1982 อ้างโดย Lee, 1993) พบว่า *Candida blankii* สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อใช้สูตรอาหารที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ Cruz-Guerrero และคณะ (1999) เลี้ยง *K. marxianus* CDBB-L-278 ในอาหารสังเคราะห์ พบว่า *K. marxianus* CDBB-L-278 สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส *K. marxianus* CDBB-L-278 เจริญได้สูงสุด โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะ และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 0.56 ต่อชั่วโมง และ 2.16 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาของ ขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์ (2543) พบว่า *Candida* sp. ที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดินและพืชบริเวณสวนปาล์ม และโรงงานหีบน้ำมันปาล์ม สามารถเจริญได้ทั้งที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ยีสต์เจริญได้ดีกว่า ในขณะที่ ตรีภพ พินันโสตติกุล และ เอกพงษ์ วงศ์สัมพันธ์ (2544) ศึกษาการเจริญของ *C. tropicalis* TISTR 5146 และ *C. utilis* TISTR 5001 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า *C. tropicalis* TISTR 5146 เจริญได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 7.27 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ *C. utilis* TISTR 5001 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 6.10 กรัมต่อลิตร

7.4 ปริมาณและวิธีการให้อากาศ

ออกซิเจนเป็นเสมือนอาหารอย่างหนึ่งของจุลินทรีย์ แต่สิ่งที่แตกต่างไปจากสารอาหารอื่นๆ คือ การละลายของออกซิเจนในน้ำมีปริมาณจำกัดมาก ดังนั้นในกระบวนการหมักที่ต้องการอากาศจึงต้องมีการให้อากาศอยู่ตลอดเวลา ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ดังนั้น การผลิตยีสต์ให้ได้ปริมาณมากๆ จำเป็นต้องให้ออกซิเจนในปริมาณที่เหมาะสม การให้อากาศเข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อกระทำได้ 2 วิธี (Stanbury and Whitaker, 1986 อ้างโดย ขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์, 2543) คือการใช้เครื่องเขย่า (shaker) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการ อีกวิธีคือ การใช้เครื่องอัดอากาศเข้าไปในถังหมัก ซึ่งถังหมักบางแบบจะใช้ระบบให้อากาศเพียงอย่างเดียว ในขณะที่บางแบบจะมี

ใบพัดกวนให้อากาศ ทำให้จุลินทรีย์ อากาศ และสารอาหารในน้ำเสียผสมกันอย่างทั่วถึง และช่วยให้ฟองอากาศมีขนาดเล็ก กระจายได้ดี สม่ำเสมอทั่วทั้งถัง

มีการศึกษาเกี่ยวกับอัตราการให้อากาศ เช่น Carlotti และคณะ (1991) พบว่า การให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่มีการให้อากาศอย่างเต็มที่ทำให้มีการเจริญของยีสต์เต็มที่ ได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 17 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ ขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์ (2543) ก็พบว่าเมื่อเลี้ยง *Candida* sp. ในถังหมักที่ให้ความเร็วรอบของการกวนเท่ากับ 400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส การให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เป็นปริมาตรอากาศที่เหมาะสำหรับการผลิตยีสต์เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มากที่สุดเช่นเดียวกัน

Yang และ Tung (1996) เลี้ยง *S. cerevisiae* ในน้ำทิ้งจากโรงงานสุรา ที่มีการกวน 400 รอบต่อนาที ให้อากาศ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่า ได้เซลล์แห้ง 6.8 กรัมต่อลิตร

Shojaosadati และคณะ (1999) ศึกษาการเจริญของ *Hansenula* sp. ใน malasses stilage ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส รอบการกวน 900 รอบต่อนาที พบว่าการให้อากาศที่ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ยีสต์ให้มวลชีวภาพสูงสุด เท่ากับ 5.7 กรัมต่อลิตร

ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี (2534) เลี้ยง *Schwanniomyces castellii* B 5285 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง ยีสต์สกัด $(NH_4)_2HPO_4$ และโซเดียมกลูตาเมต ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อให้อากาศ 1.67 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 3.4 กรัมต่อลิตร ที่ 72 ชั่วโมง

ชุตินุช สุจริต (2540) เลี้ยง *C. tropicalis* TISTR 5146 ในถังหมักบรรจุน้ำนึ่งปลาทูน่า 1.5 ลิตร ที่มีการกวน 400 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ยีสต์เจริญได้ดีที่สุด เมื่อให้อากาศ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.89 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมง

วัตถุประสงค์

1.เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ทนร้อนที่สามารถเจริญในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

2.เพื่อทราบแหล่งน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ยีสต์ทนร้อนเจริญได้ดีที่สุด

3.ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้

4.เพื่อทราบปริมาณกลูแคน รวมถึงองค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้

5.เพื่อศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้ยีสต์ทนร้อนที่มีปริมาณกลูแคนสูง เพื่อใช้เป็นยีสต์อาหารสัตว์

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. จุลินทรีย์

ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. cerevisiae* (Burgandy), *S. cerevisiae* TISTR 5017, *S. cerevisiae* TISTR 5021, *S. cerevisiae* TISTR 5055, ยีสต์ *Candida tropicalis* TISTR 5146, *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida palmioleophila* Y-128 จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ผลิตผลเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร ส่วน *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 และ *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5116 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เก็บยีสต์ในหลอดอาหารวุ้นเอียง (PDA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อใหม่ทุกๆ 1 เดือน

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ (YEPD) ประกอบด้วย ยีสต์สกัด เปปโทน และน้ำตาลเดกซ์โทส (ภาคผนวก ก)

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำหรับเก็บรักษาเชื้อ (ภาคผนวก ก)

3. วัตถุดิบ

น้ำนึ่งปาล์ม น้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ น้ำทิ้งจากบ่อบำบัดรวม และน้ำมันปาล์มดิบ ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จำกัด ตำบลบ้านพรุ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา นำมาบรรจุในแกลลอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

4.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า และกลูแคน

4.2 ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ คลอโรฟอร์ม, เมทานอล และ อีเทอร์

4.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ซีโอดี ของแข็งแขวนลอย น้ำมันและกรีสในน้ำทิ้ง

4.3 สารเคมีอื่นๆ ได้แก่ 1 N NaOH และ 1 N HCl

อุปกรณ์

1.ถังหมักขนาด 5 ลิตร ยี่ห้อ EYELA รุ่น NDL 301

2.ถังหมักขนาด 72 ลิตร ยี่ห้อ Biostat รุ่น DL 50

3.เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Hitachi รุ่น U-2000

4.เครื่องหมุนเหวี่ยง ยี่ห้อ Universal 32R รุ่น Universal 32/32R

5.เครื่องเขย่า (Incubator shaker) ยี่ห้อ Bronswick รุ่น G25-KLC

6.ตู้อบ (hot air oven) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MOV 212

7.เครื่องชั่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP 2100S

8.เครื่อง Laminar air flow ยี่ห้อ Hotpack รุ่น 527044

9.หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ยี่ห้อ TOMY รุ่น SS-325

10.เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ Schott รุ่น CG825

11.เครื่องวิเคราะห์โปรตีน ซึ่งประกอบด้วย เครื่องย่อย (ยี่ห้อ FOSS TECATOR รุ่น 2006)
เครื่องกลั่น (ยี่ห้อ FOSS TECATOR รุ่น 2200)

12.อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhlet apparatus) ยี่ห้อ Electrothermal

วิธีการวิเคราะห์

1.น้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์ (ดัดแปลงจาก A.O.A.C.,1990)

วิธีการ

1.ดวงตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพลาสติกสำหรับหมุนเหวี่ยง

2.นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 15 นาที

3.แยกเอาส่วนใสออก แล้วทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น นำไปหมุนเหวี่ยงที่สภาวะเดียวกับข้อ 2

4.นำตะกอนเซลล์ที่ได้ในหลอด เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส จนแห้งหรือประมาณ 5-6 ชั่วโมง

5.นำออกจากตู้อบ ใส่ในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้จนเย็นเท่าอุณหภูมิห้องแล้วชั่ง

6.บันทึกค่าและคำณวนตามสูตร

7.ค่าที่คำนวณได้นำมาหักลบกับค่าของแข็งที่มีอยู่ในหลอดพลาสติก

การคำนวณ

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(A-B) \times 1000}{5}$$

เมื่อ A = น้ำหนักหลอด + ยีสต์หลังจากอบแห้งแล้ว

B = น้ำหนักหลอดที่อบแห้งแล้ว

2.กลูแคน (ดัดแปลงจาก Catley, 1988 อ้างโดย มลฤดี สิทธิพันธุ์, 2541)

2.1 การทำให้เซลล์แตก โดยใช้ Bead-Beater มีวิธีการดังนี้คือ ผสมเม็ดแก้ว (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร จำนวน 10 กรัม) ต่อ pellet (ตะกอนน้ำทิ้ง+เซลล์ยีสต์สด) จำนวน 1 กรัม ต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ลงในหลอดทดลองขนาดใหญ่ หล่อเย็นด้วยน้ำแข็ง ปั่นโดยวางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 40 นาที โดยหยุดปั่นทุกๆ 10 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายที่อยู่ส่วนบนของหลอดใส่ในบีกเกอร์, และใส่บัฟเฟอร์ที่เย็นในหลอดทดลองที่ยังมีเม็ดแก้วอยู่ ปั่นอีก 10 นาที เทตะกอนทั้งหมดใส่ในบีกเกอร์ รวมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน นำมาเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 9000 จี 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนตะกอนไว้

2.1.1 การล้างและแยกผนังเซลล์

2.1.1.1 ล้างตะกอนในข้อ 2.1.1 ด้วยเอทานอล 2 ครั้งๆ ละ 200 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงแยกเก็บส่วนผนังเซลล์ไว้

2.1.1.2 ล้างผนังเซลล์ด้วยสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม และเมทานอล (1:1) 3 ครั้งๆ ละ 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปล้างด้วยสารผสมระหว่างเอทานอลและอีเทอร์ (1:1) 3 ครั้งๆ ละ 200 มิลลิลิตร แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง

2.1.1.3 นำผนังเซลล์ที่แยกได้ แช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 10 นาที กวนเป็นครั้งคราว แล้วนำไปเหวี่ยงแยกเก็บตะกอน

2.1.1.4 ทำซ้ำข้อ 2.1.1.3 จำนวน 10 ครั้งๆ ละ 100 มิลลิลิตร

2.1.1.5 ล้างผนังเซลล์ด้วยน้ำ 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ในน้ำ 10 มิลลิลิตร ก่อนนำไปแช่แข็งแห้งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.2 การสกัดสารเบต้ากลูแคนจากผนังเซลล์

2.1.2.1 นำผนังเซลล์ที่แช่แข็งแห้ง 10 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 8.0) 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 3000 g 10 นาที

2.1.2.2 แยกส่วนใสเก็บไว้ นำตะกอนมาทำซ้ำในข้อ 2.1.2.1 2 ครั้ง รวมส่วนใสเข้าด้วยกัน

2.1.2.3 เติมโซเดียมอะซิเตท 5.4 กรัม ลงในส่วนใสจากข้อ 2.1.2.2 300 มิลลิลิตรลงไป เติมเอทานอล 900 มิลลิลิตร คนทุกๆ 4-5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปเหวี่ยงแยกเอาตะกอนออก ล้างตะกอนด้วยสารผสมระหว่าง เอทานอลต่อน้ำ ในอัตรา 3:1 (v/v) 100 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 g 10 นาที

2.1.2.4 ละลายตะกอนในน้ำ 50 มิลลิลิตร ทำ dialysis ด้วยน้ำกลั่น 2000 มิลลิลิตร เปลี่ยนน้ำทุก 4 ชั่วโมง แล้วทำ dialysis ต่อไปอีก 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.2.5 ปรับปริมาตรสารละลายในข้อ 5.3.4 ให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย CTAB (เตรียมโดยสารละลาย hexadecyl trimethyl ammonium bromide 4 กรัม ในน้ำ 50 มิลลิลิตร) คน 5 นาที แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 g 10 นาที เก็บส่วนใสไว้

2.1.2.6 เติมกรดบอริกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร ลงในส่วนใสจากข้อ 2.1.2.5 ปรับพีเอชให้ได้ 8.8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

2.1.2.7 เหวี่ยงแยกตะกอนด้วยความเร็ว 3000 g 10 นาที เก็บส่วนใส และนำตะกอนมาล้าง 2 ครั้ง โดยใช้สารละลายโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 8.8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.1.2.8 นำตะกอนมาละลายในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง คน 5 นาที แล้วเติมเอทานอลที่มีโซเดียมอะซิเตท 1 กรัม 150 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ล้างตะกอนด้วยการหมุนเหวี่ยงโดยใช้เอทานอลที่มีกรดอะซิติก 2 เปอร์เซ็นต์ 200 มิลลิลิตร 4 ครั้ง

2.1.2.9 ละลายตะกอนในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ทำ dialysis ด้วยน้ำกลั่น 2000 มิลลิลิตร เปลี่ยนน้ำกลั่นเมื่อครบ 4 ชั่วโมง แล้วทำ dialysis ต่อไปอีก 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนที่อยู่ใน dialysis tube นำมาวัดปริมาตร

2.1.2.10 แล้วเติมเอทานอลที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอะซิเตทลงไป 3 เท่า คน 4-5 นาที ปล่อยให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 3 ครั้งๆ ละ 100 มิลลิลิตร เหวี่ยงแยกและเก็บตะกอน นำไปทำให้แห้งในโถดูดความชื้นที่มี P_2O_6 ที่อุณหภูมิห้อง และชั่งน้ำหนักแห้งของสารที่สกัดได้

3. โปรตีน (โดยวิธี Kjeldahl method) ไขมัน และเถ้า (A.O.A.C.,1990) (ภาคผนวก ข)

4. ซีโอดี (APHA, AWWA, and WPCF, 1985) (ภาคผนวก ข)

5. น้ำมันและกรีสในน้ำทิ้ง (กรรณิการ์ สิริสิงห, 2522) (ภาคผนวก ข)

6.การหาค่าทางไคเนติกส์ (สมใจ ศิริโภค, 2544)

6.1 ผลผลิตมวลชีวภาพของการเจริญของเซลล์ ($Y_{X/S}$)

เนื่องจากในการเจริญของจุลินทรีย์นั้น มีการเปลี่ยนสารอาหารให้เป็นผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์หรือมวลเซลล์ จึงสามารถคำนวณหาผลผลิตมวลชีวภาพได้โดยวัดปริมาณเซลล์ (DCW) (X) ที่เกิดขึ้นและสารอาหาร (COD) (S) ที่ใช้ไปในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ดังนี้

$$Y_{X/S} = \Delta X / \Delta X$$

เมื่อ ΔX = ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในช่วงระยะเวลาหนึ่ง

ΔS = ปริมาณสับสเตรท (COD) ที่ลดลงในช่วงระยะเวลาหนึ่ง

6.2 ผลผลิตต่อหน่วยเวลา (Productivity)

เป็นปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยเวลาของการหมัก จะหาค่า Productivity ของมวลเซลล์ได้จากสูตร

$$\text{Productivity} = \frac{X_{max} - X_0}{t}$$

เมื่อ X_{max} = ปริมาณสูงสุดของมวลเซลล์ที่ stationary phase

X_0 = ปริมาณของมวลเซลล์เริ่มต้น

t = ระยะเวลาทั้งหมดที่ใช้ในกระบวนการเลี้ยงเชื้อ

7.วิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS

วิธีการ

1. การคัดเลือกยีสต์ทนร้อนที่เจริญได้ดีในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

1.1การทดสอบคุณสมบัติการเป็นยีสต์ทนร้อนของยีสต์จำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* 4 สายพันธุ์ (Burgandy, TISTR 5021, TISTR 5055, TISTR 5017), *Candida tropicalis* TISTR 5146, *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida palmioleophila* Y-128 และยีสต์ที่มีปริมาณกลูแคนสูง คือ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 และ *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5116 ซึ่งมีปริมาณกลูแคนเท่ากับ 62.9 และ 66.5 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์ ตามลำดับ (Nguyen และคณะ, 1998) โดยการ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±องศาเซลเซียส) และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ทั้ง 2 อุณหภูมิจัดเป็นยีสต์ทนร้อน

1.2การคัดเลือกยีสต์ทนร้อน

เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้ (ผลจากข้อ1.1) ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยถ่ายเชื้อยีสต์ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ YEPD 50 มล. เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมหัวเชื้อ 5 มล.(10 เปอร์เซ็นต์) ลงในฟลาสก์ ที่มีอาหาร YEPD ปริมาตร 50 มล.เลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำมาทำการเจือจางเพื่อให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากัน เติมหัวเชื้อ 10 มล. (10 เปอร์เซ็นต์) ลงในฟลาสก์ ที่มีน้ำทิ้งที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้นและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 100 มล. เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm. แต่ละตัวอย่างเชื้อทำ 3 ซ้ำ โดยมีน้ำทิ้งที่ไม่เติมเชื้อเป็นชุดควบคุม เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์โดยวัดค่าในรูปน้ำหนักเซลล์แห้ง และคัดเลือกยีสต์ที่เจริญ และให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 3 อันดับแรกเพื่อศึกษาต่อไป

2. การคัดเลือกแหล่งน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ศึกษาการเจริญของยีสต์ 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ (จากข้อ1) โดยถ่ายเชื้อยีสต์ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ YEPD 50 มล. เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมหัวเชื้อ 5 มล.(10 เปอร์เซ็นต์) ลงในฟลาสก์ ที่มีอาหาร YEPD ปริมาตร 50 มล.เลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำมาทำการเจือจางเพื่อให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากัน เติมหัวเชื้อ 10 มล. (10 เปอร์เซ็นต์) ลงในฟลาสก์ที่มีน้ำทิ้งจากขั้นตอนต่างๆ ของกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม ได้แก่ น้ำนึ่งปาล์ม น้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ และน้ำทิ้งรวมของบ่อ

บำบัด (ชุดควบคุม) ที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้นและผ่านการฆ่าเชื้อ ลงในฟลาสก์ บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกแหล่งน้ำทิ้งที่ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์เจริญได้ดีที่สุด โดยวัดการเจริญของยีสต์ที่เวลา 0 6 12 18 24 36 48 60 72 ชม. นำไปวัดค่าพีเอชและหาน้ำหนักเซลล์แห้ง พร้อมนำไปหาค่าซีโอดี น้ำมันและกรีสในช่วงเวลาที่ 0 12 24 48 72 ชม. (แต่ละตัวอย่างเชื้อทำ 3 ซ้ำ โดยมีน้ำทิ้งที่ไม่เติมเชื้อเป็นชุดควบคุม)

3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ที่คัดเลือกได้

เลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกได้ในแหล่งน้ำทิ้งที่ให้การเจริญของยีสต์สูงสุด เลี้ยงเชื้อและเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 6 12 18 24 36 และ 48 ชั่วโมง พร้อมนำไปหาค่าซีโอดีในช่วงเวลาที่ 0 12 24 48 ชม. (แต่ละตัวอย่างเชื้อทำ 3 ซ้ำ โดยมีน้ำทิ้งที่ไม่เติมเชื้อเป็นชุดควบคุม) เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ในน้ำทิ้งจากแหล่งต่างๆ โดยวัดในรูปน้ำหนักเซลล์แห้ง และการลดลงของค่าซีโอดีปัจจัยที่ทำการศึกษา มีดังนี้

3.1 ผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์

วิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์ในรูปซีโอดี (COD) ของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์เลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งโดยปรับระดับความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งโดยการเจือจางในอัตราส่วน 1:0, 1:1, 1:2 และ 1:5 คำนวณค่าซีโอดีของแต่ละความเจือจาง

3.2 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มในน้ำทิ้งต่อการเจริญของยีสต์

เลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนในความเข้มข้นร้อยละ 0, 1, 2 และ 3 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

3.3 ผลของแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่นำมาศึกษาในครั้งนี้คือไนโตรเจนอนินทรีย์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, และ NH_4NO_3 โดยเติมไนโตรเจนแต่ละชนิดลงไปร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.4 ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนที่คัดเลือกได้

เลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งโดยมีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้(จากข้อ 3.3) ในปริมาณร้อยละ 0, 0.2, 0.6 และ 1.0

3.5 ผลของพีเอชเริ่มต้น

เลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งตามปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญ (จากข้อ 3.1-3.4) โดยปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งเท่ากับ 3.5, 4.5, 5.5 และ 6.5

3.6 ผลของอุณหภูมิ

เลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งที่มีน้ำมันปาล์มในความเข้มข้นที่เหมาะสม (ข้อ 3.5) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส

3.7 ผลของปริมาณการให้อากาศ

ศึกษาผลของอัตราการให้อากาศที่ 1.0, 1.5 และ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก (fermenter) ที่ควบคุมสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสม (ผลข้อ 3.6)

3.8 ผลของการขยายขนาด

ศึกษาการเจริญของยีสต์ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรบรรจุในถังหมัก 3 ลิตร (ผลจากข้อ 3.7) เปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ในถังหมักขนาด 72 ลิตร ปริมาตรบรรจุในถังหมัก 50 ลิตร

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆของเซลล์ยีสต์

นำเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเลี้ยงในถังหมักขนาด 72 ลิตร (จากข้อ 3.8) มาสกัดหาปริมาณกลูแคนรวมทั้งปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการในภาคผนวก ข (แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ)

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกยีสต์ทนร้อนที่เจริญได้ดีในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากการศึกษาการเจริญของยีสต์ทั้ง 9 สายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้องและ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนที่ 45 องศาเซลเซียส พบว่า *S. cerevisiae* (burgandy), *S. cerevisiae* TISTR 5021, *S. cerevisiae* TISTR 5055, *Candida tropicalis* TISTR 5146, *Candida palmioleophila* Y-128 และ *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5116 เจริญได้ จากความสามารถในการเจริญของ *Candida tropicalis* TISTR 5146 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จึงจัด *Candida tropicalis* TISTR 5146 เป็นยีสต์ทนร้อน (thermotolerant yeast) สอดคล้องกับรายงานของ Lee และคณะ (1993) โดยเลี้ยง *Candida tropicalis* F-129 ในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถเจริญได้ดีที่ 38 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับในการศึกษาของ ตรีภพ พินันโสตติกุล และ เอกพงษ์ วงศ์สัมพันธ์ (2544) ที่เลี้ยงยีสต์ *Candida tropicalis* TISTR 5146 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส โดยพบว่า ยีสต์สามารถเจริญได้ทั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 17.38 และ 14.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการเจริญของ *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5116 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ก็สอดคล้องกับรายงานของ Cruz-Guerrero และคณะ (1999) ที่พบว่าเมื่อเลี้ยง *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 ในอาหารสังเคราะห์สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 35 ถึง 45 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า *Kluyveromyces marxianus* สามารถเจริญได้ถึงอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส (Banat *et al.*, 1992) ในขณะที่ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5017, *Candida utilis* TISTR 5001 และ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 12) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล (2535) ว่าอุณหภูมิที่ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 เจริญได้สูงสุดคือ 35 องศาเซลเซียส ดังนั้น จึงคัดเลือกเฉพาะยีสต์ที่มีคุณสมบัติทนร้อน 6 สายพันธุ์ในการศึกษาต่อไป

จากการเลี้ยงยีสต์ทนร้อน 6 สายพันธุ์ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* (burgandy), *S. cerevisiae* TISTR 5021, *S. cerevisiae* TISTR 5055, *Candida palmioleophila* Y-128 และ *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5116 เจริญได้ที่อุณหภูมิห้อง และเจริญได้ดีกว่า โดยให้น้ำหนัก

ตารางที่ 12 การทดสอบคุณสมบัติทนร้อนของยีสต์จากการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Table 12 Test of thermotolerant property of yeasts by cultivating on PDA for 48 h at two different temperatures

Strain	Room temperature(302 C)	45C
Saccharomyces cerevisiae (burgandy)	++	+
Saccharomyces cerevisiae TISTR 5021	++	+
Saccharomyces cerevisiae TISTR 5055	++	+
Saccharomyces cerevisiae TISTR 5017	++	-
Candida tropicalis TISTR 5146	++	+
Candida utilis TISTR 5001	++	-
Candida palmioleophila Y-128	++	+
Debaryomyces hansenii TISTR 5155	++	-
Kluyveromyces marxianus TISTR 5116	++	+

++ = excellent growth, + = moderate growth, - = not growth

เซลล์แห้งสูงกว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 13) ยกเว้น *Candida tropicalis* TISTR 5146 โดยไม่เจริญทั้งที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งก็สอดคล้องกับรายงานของ Rydin และคณะ (1990) ที่เลี้ยงยีสต์ *C. tropicalis* S001 ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าสัตว์ พบว่า เมื่ออุณหภูมิของการเลี้ยงยีสต์เพิ่มขึ้นสูงจนถึง 40 องศาเซลเซียส ยีสต์จะหยุดการเจริญทันที จากการที่ยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เจริญได้ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม สอดคล้องกับการศึกษาของ Mustar และคณะ (2001) ซึ่งเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* 3010 ในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยพบว่าในน้ำทิ้งมีองค์ประกอบพวกแร่ธาตุต่างๆ เช่น แมกนีเซียม แคลเซียม โซเดียม และโพแทสเซียม รวมถึงน้ำตาลกลูโคส ฟลุคโตส ซูโครส และมอลโตสที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ จากการศึกษาในครั้งนี้ พบยีสต์ 3 สายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่สุดคือ *S. cerevisiae* (burgandy), *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5116 และ *S. cerevisiae* TISTR 5021 โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 3.82, 3.17 และ 3.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ รองลงไปคือ *Candida palmioleophila* Y-128 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5055 โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง

0.59 และ 0.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้น จึงคัดเลือกยีสต์ 3 สายพันธุ์ดังกล่าวในการศึกษาแหล่งน้ำทิ้งที่เหมาะสมต่อการเจริญต่อไป

ตารางที่ 13 การเจริญของยีสต์ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิห้อง (302C) และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Table 13 Growth of yeasts cultivating in the combined POME at room temperature(302 C) and 45C for 48 h

Strains	Dry cell weight (g/l)	
	Room temperature	45C
Saccharomyces cerevisiae (burgandy)	3.82[a]	0.38
Saccharomyces cerevisiae TISTR 5021	3.05[b]	0
Saccharomyces cerevisiae TISTR 5055	0.54[c]	0.44
Candida tropicalis TISTR 5146	0[c]	0
Candida palmioleophila Y-128	0.59[c]	0
Kluyveromyces marxianus TISTR 5116	3.17[b]	0.51

0 = no growth

[a-c]means different superscripts within a column indicating significant difference ($P<0.05$)

2. การคัดเลือกแหล่งน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทิ้งจากการสกัดน้ำมันปาล์มขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ น้ำนึ่งปาล์ม น้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ และน้ำทิ้งรวมของบ่อบำบัด พบว่า น้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ มีค่าซีโอดีสูงสุด (63,360 มิลลิกรัมต่อลิตร) รองลงมาคือ น้ำนึ่งปาล์ม และน้ำทิ้งรวมของบ่อบำบัด โดยมีค่าซีโอดี เท่ากับ 63,300 และ 38,800 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันและกรีส พบว่า น้ำนึ่งปาล์มมีปริมาณน้ำมันและกรีสสูงสุด (11,720 มิลลิกรัมต่อลิตร) รองลงมาคือ น้ำทิ้งรวมและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (6,930 และ 6,375 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) (ตารางที่ 14) เมื่อนำยีสต์ 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ คือ *S. cerevisiae* (burgandy), *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5116 และ *S. cerevisiae* TISTR 5021 (ผลจากข้อ 1) มาศึกษาการเจริญในน้ำทิ้งจากการสกัดน้ำมันปาล์มขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ น้ำนึ่งปาล์ม น้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์และน้ำทิ้งรวมของบ่อบำบัด

(ชุดควบคุม) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกแหล่งน้ำทิ้งที่เหมาะสม พบว่า น้ำทิ้งทุกแหล่งสามารถใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดีโดย *K. marxianus* TISTR 5116 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่า *S. cerevisiae* (burgandy) และ *S. cerevisiae* TISTR 5021 (7.99, 6.07 และ 4.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 15) และสามารถลดค่าซีโอดีได้ 35.2 เปอร์เซ็นต์ และกำจัดน้ำมันและกรีสได้ 83.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 16) ในขณะที่ *S. cerevisiae* (burgandy) และ *S. cerevisiae* TISTR 5021 สามารถลดค่าซีโอดี และน้ำมันและกรีสได้ร้อยละ 33.16, 50.32 และ 30.72, 56.35 ตามลำดับ ยีสต์ *K. marxianus* TISTR 5116 สามารถใช้สารอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นสูงได้ดีจึงเจริญในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูง (มีค่าซีโอดี เท่ากับ 63,360 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้ดี (ตารางที่ 14) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งรวม (มีค่าซีโอดี เท่ากับ 38,800 มิลลิกรัมต่อลิตร) สอดคล้องกับรายงานของ Hang และคณะ (2003) ซึ่งพบว่า *K. marxianus* NRRL Y-610 เจริญและความสามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ (กรดแลคติค, กรดอะซิติค และ เอทานอล) ในน้ำข้าวโพดหมักที่มีพีเอชต่ำ (pH 3.6) *K. marxianus* TISTR 5116 เจริญในน้ำนึ่งปาล์มได้ต่ำกว่าในน้ำทิ้งรวมและในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ อาจเนื่องจากน้ำนึ่งปาล์มมีปริมาณน้ำมันที่แขวนลอยอยู่มาก (11,717 มิลลิกรัมต่อลิตร) เมื่อเทียบกับในน้ำทิ้งรวม (6,930 มิลลิกรัมต่อลิตร) และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (6,375 มิลลิกรัมต่อลิตร) (ตารางที่ 14) อย่างไรก็ตาม พบว่าเชื้อนี้สามารถเจริญและลดค่าซีโอดีได้สูงสุด (35.2 เปอร์เซ็นต์)ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ดังนั้น จึงเลือก *K. marxianus* TISTR 5116 และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์ต่อไป

ตารางที่ 14 คุณสมบัติของน้ำทิ้งจากขั้นตอนต่างๆของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Table 14 Effluent characteristic from several process of palm oil mill

Effluent source	pH	COD (mg/l)	Oil and grese (mg/l)
Combined effluent	4.55	38800	6930
Decanter effluent	4.48	63360	6375
Sterilizer condensate	4.67	63300	11720

ตารางที่ 15 ผลของน้ำทิ้งแหล่งต่างๆของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเจริญของยีสต์ที่คัดเลือกได้ 3 สายพันธุ์จากการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Table 15 Effect of sources of POME on growth of the three selected yeast strains cultivating at room temperature for 72 h

Strains	Dry cell weight (g/l)		
	Combined Effluent	Decanter Effluent	Sterilizer condensate
Saccharomyces cerevisiae (burgandy)	$4.75^{A,b}$	$6.07^{B,a}$	$4.64^{B,b}$
Saccharomyces cerevisiae TISTR 5021	$3.08^{C,c}$	$4.52^{C,b}$	$4.91^{A,a}$
Kluyveromyces marxianus TISTR 5116	$3.88^{B,c}$	$7.99^{A,a}$	$4.42^{C,b}$

$^{A-C}$ means with different superscripts with a column indicating significant difference ($P<0.05$)

$^{a-c}$ means with different superscripts with a row indicating significant difference ($P<0.05$)

ตารางที่ 16 ผลของน้ำทิ้งแหล่งต่างๆของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและการเจริญของยีสต์ที่คัดเลือกได้ 3 สายพันธุ์ต่อการลดลงของค่าซีโอดีและน้ำมันและกรีส จากการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

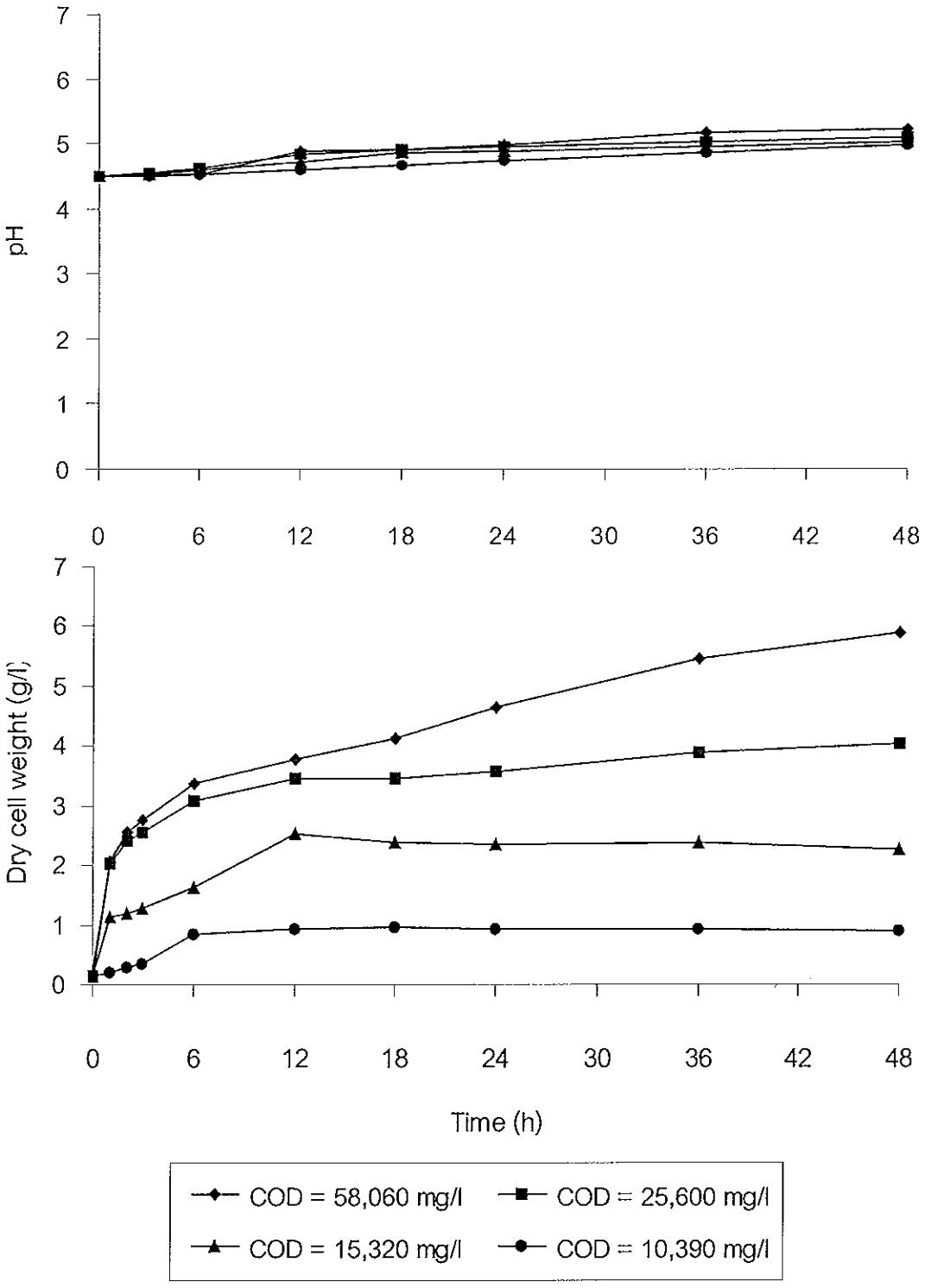
Table 16 Effect of sources of POME and growth of the three selected yeast strains on COD and oil and grese removal cultivating at room temperature for 72 h

Strains	Combined effluent		Decanter effluent		Sterilizer condensate	
	COD removal(%)	oil & grese removal(%)	COD removal(%)	oil & grese remova(%)	COD removal(%)	oil & grese remova(%)
Saccharomyces cerevisiae (burgandy)	40.25	60.75	33.16	50.32	28.95	61.45
Saccharomyces cerevisiae TISTR 5021	28.99	47.04	30.72	56.35	26.07	65.58
Kluyveromyces marxianus TISTR 5116	40.00	50.94	35.20	83.53	33.79	23.62

3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ที่คัดเลือกได้

3.1 ผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์

จากการเลี้ยงยีสต์ *K. marxianus* TISTR 5116 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่มีความเข้มข้นของสารอินทรีย์ระดับต่างๆ โดยมีค่าซีโอดี เท่ากับ 58060, 25600, 15320 และ 10390 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 4.5 จะเห็นว่าเชื้อเจริญในน้ำทิ้งที่มีค่าซีโอดี เท่ากับ 58,060 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ดีที่สุด (ภาพที่ 3) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 5.89 กรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมง การที่เชื้อเจริญและลดค่าซีโอดีได้น้อยกว่าผลในตารางที่ 15 และ 16 เนื่องจากปริมาณสารอินทรีย์ (ซีโอดี) ในน้ำทิ้งชุดนี้มีค่าต่ำกว่า เชื้อจึงนำสารอาหารในน้ำทิ้งมาใช้ในการเจริญได้น้อยกว่า นอกจากนี้จากกราฟการเจริญจะเห็นว่าเชื้อมีการปรับตัวที่เร็วมากหลังการเลี้ยงเชื้อเพียงชั่วโมงแรก เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ มีการเตรียมหัวเชื้อโดยเลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยตรงเลย ทำให้เชื้อมีการปรับตัวได้ตั้งแต่ในช่วงการเตรียมหัวเชื้อก่อนที่จะนำมาเลี้ยงจริง ทำให้ลักษณะการเจริญของเชื้ออยู่ในรูปที่เข้าสู่ระยะ log phase เลย นอกจากนี้ยังมีค่าพารามิเตอร์ต่างๆ จากผลการทดลอง (ตารางที่ 17) ได้แก่ ผลผลิตมวลชีวภาพ ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 0.30 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิต (productivity) ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 0.19 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่เวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งจะเห็นได้ว่ายีสต์มีอัตราการผลิตภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสูงกว่าที่ 48 ชั่วโมง ในขณะที่ค่าซีโอดีลดลง 32.91 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้ คือที่ระดับ 25,600, 15,320 และ 10,390 มิลลิกรัมต่อลิตร เชื้อเจริญได้ต่ำกว่า และลดค่าซีโอดีได้ต่ำกว่าด้วย โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 4.05, 2.52 และ 0.96 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีค่าซีโอดีที่ลดลงเท่ากับ 26.7, 23.2 และ 21.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับในการศึกษาของ Mustar และคณะ (2001) ที่พบว่ายีสต์ *C. utilis* สามารถเจริญในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่ต้องมีการเจือจางได้ ในการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่า *K. marxianus* TISTR 5116 เจริญในน้ำทิ้งที่มีสารอินทรีย์สูง (ซีโอดี เท่ากับ 58,060 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในระดับต่ำกว่า ดังจะเห็นได้จากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นจึงสามารถใช้น้ำทิ้งจากการสกัดน้ำมันปาล์มในการเลี้ยงเชื้อโดยตรง (ไม่ต้องเจือจาง)



ภาพที่ 3 ผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและการเจริญของยีสต์ *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 จากการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิห้อง

Figure 3 Effect of COD concentration of decanter effluent on pH and the growth of *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 cultivating on a shaker (200 rpm) at room temperature

ตารางที่ 17 ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดีของ *K. marxianus* TISTR 5116 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Table 17 Effect of decanter effluent concentrations on dry cell weight and COD removal of *K. marxianus* TISTR 5116 cultivating at room temperature for 48 h

Decanter effluent concentration (COD) (mg/l)	Dry cell weight (g/l)	COD removal (%)	Yield ($Y_{X/S}$) (g/g)	Productivity (g/l/h)	
				24 h	48 h
58060	5.89	32.91	0.30	0.19	0.12
25600	4.05	26.70	0.57	0.15	0.08
15320	2.52	23.16	1.32	0.10	0.05
10390	0.96	21.36	0.42	0.04	0.02

3.2 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มในน้ำทิ้งต่อการเจริญของยีสต์

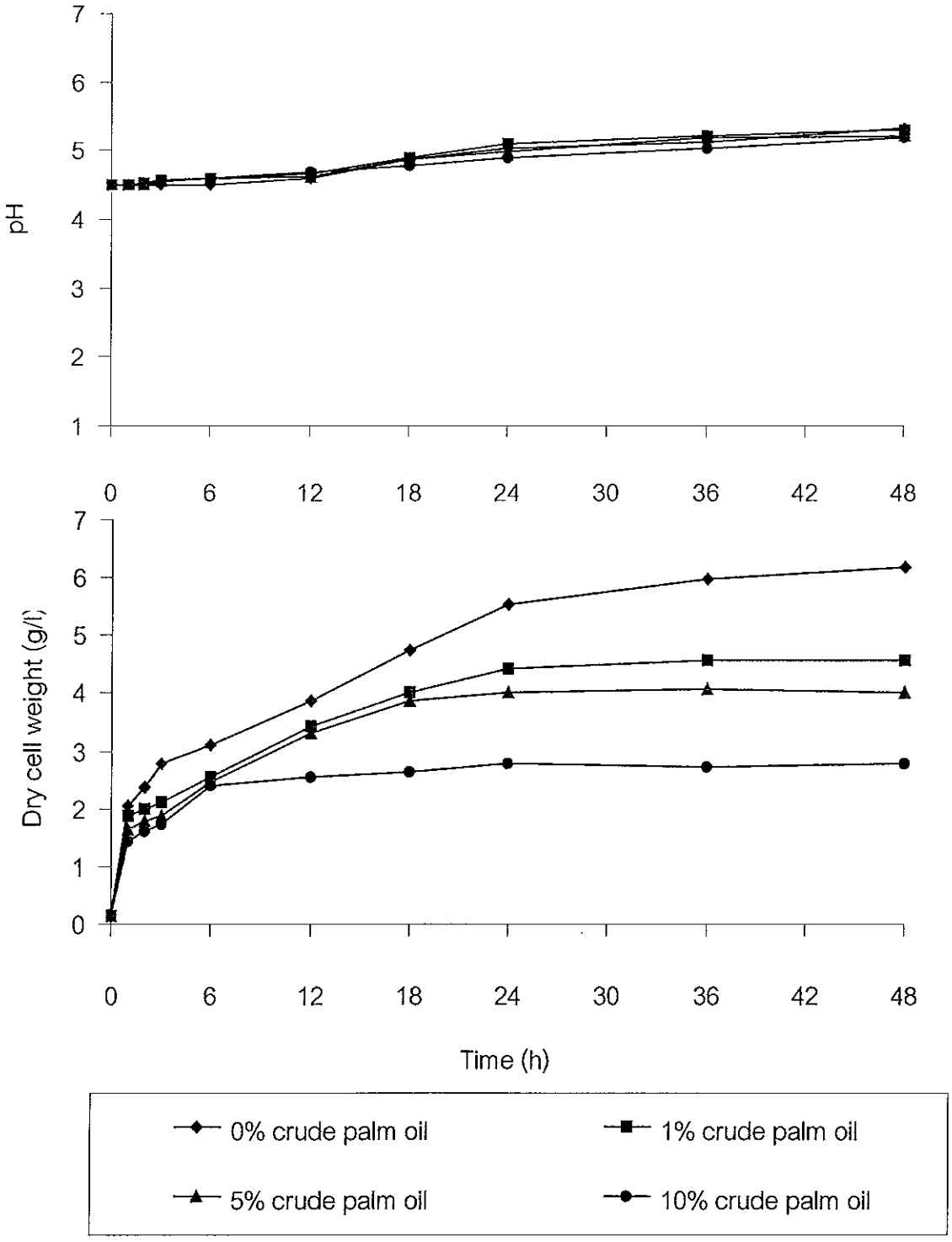
จากงานวิจัยหลายฉบับรายงานว่ายีสต์มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนประเภทน้ำมันในการเจริญได้ เช่น *Candida* sp. สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มดิบ 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (ขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์, 2543) *C. palmioleophila* และ *C. tropicalis* เจริญในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ดี โดยมีการเติมน้ำมันปาล์ม 5 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถลดค่าซีโอดีในน้ำทิ้งได้อีกด้วย (ณัฐวรรธน์ ชูโชติ และ รัชยาภรณ์ ผลมั่ง, 2537) *Y. lipolytica* NCIM 3589 สามารถเจริญในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยสามารถลดค่าซีโอดีได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 2 วัน (Oswal *et al.*, 2002) ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มต่อการเจริญของยีสต์ *K. marxianus* TISTR 5116 ผลจากการเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *K. marxianus* TISTR 5116 ในน้ำทิ้งจากดีแคนเตอร์ (ไม่เจือจาง) ที่มีปริมาณน้ำมันเริ่มต้น เท่ากับ 5,380 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีการเติมน้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนในระดับต่างๆ กัน คือ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 4) พบว่า เชื้อเจริญและใช้น้ำมันปาล์มดิบได้ แต่เจริญได้ดีที่สุดในน้ำทิ้งที่ไม่ต้องเติมน้ำมันปาล์ม (โดยในน้ำทิ้งเดิมมีปริมาณน้ำมันอยู่แล้ว 5,380 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 6.17 กรัมต่อลิตร ผลผลิตมวลชีวภาพ ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 0.33 กรัมต่อกรัม และ อัตราการผลิต (productivity) ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่เมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมง ยีสต์กลับมีอัตราการผลิตที่ต่ำกว่า คือ 0.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 18) จะเห็นได้ว่า

Klyveromyces marxianus TISTR 5116 มีค่าการเจริญแตกต่างจากผลข้อ 3.1 ทั้งนี้เนื่องจากใช้ตัวอย่างน้ำทิ้งคนละชุดกัน ทำให้ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งในการเลี้ยงครั้งนี้มากกว่า (ซีโอดีเท่ากับ 58,540 มิลลิกรัมต่อลิตร) นอกจากนี้ ยีสต์ยังคงมีการเจริญปรับตัวเข้าสู่ระยะ log phase ได้ทันทีเช่นเดียวกับข้อ 3.1 อย่างไรก็ตาม การเติมน้ำมันปาล์มลงไปในน้ำทิ้งไม่มีผลต่อการเจริญ โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.57, 4.02 และ 2.77 กรัมต่อลิตร ในน้ำทิ้งที่มีการเติมน้ำมันปาล์ม 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้น ในการทดลองครั้งต่อไปจึงเลี้ยง *K. marxianus* TISTR 5116 ในน้ำทิ้งที่ไม่เจือจาง (ซีโอดี เท่ากับ 58,060 มิลลิกรัมต่อลิตร) และไม่มีการเติมน้ำมันปาล์มดิบลงไป (มีปริมาณน้ำมันเริ่มต้น เท่ากับ 5,380 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 18 ผลของการเติมน้ำมันปาล์มดิบที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดีของ *K. marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (มีปริมาณน้ำมันที่เติม เท่ากับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Table 18 Effect of various concentration of crude palm oil on dry cell weight and COD removal of *K. marxianus* TISTR 5116 in the decanter effluent (0, 1, 5 and 10% crude palm oil added) at room temperature for 48 h

Crude palm oil concentration added (%)	Dry cell weight (g/l)	COD removal (%)	Yield ($Y_{X/S}$) (g/g)	Productivity (g/l/h)	
				24 h	48 h
0	6.17	30.74	0.33	0.23	0.13
1	4.57	26.01	0.29	0.18	0.09
5	4.06	25.83	0.25	0.17	0.08
10	2.79	21.67	0.20	0.12	0.06

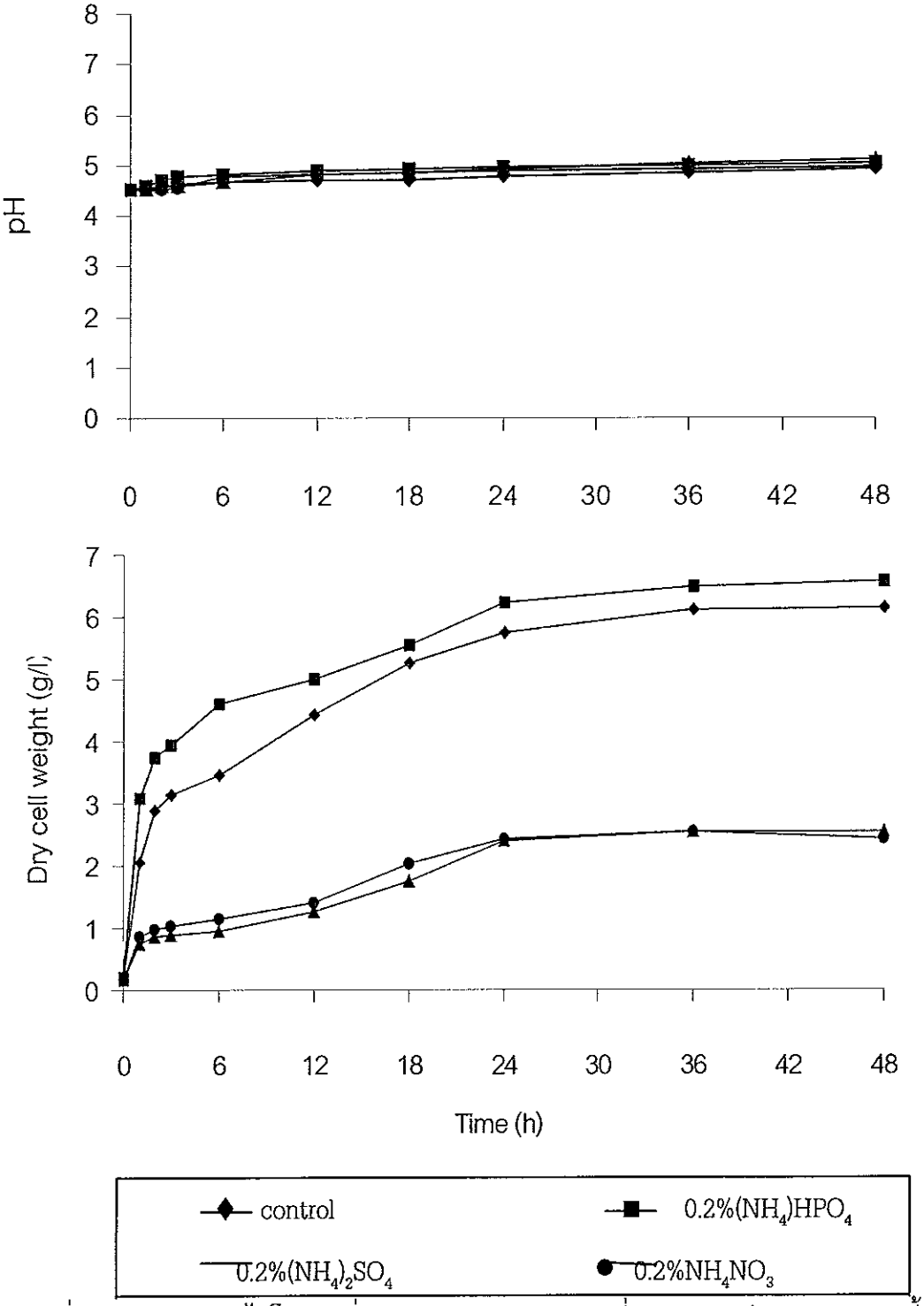


ภาพที่ 4 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มที่เติมต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของยีสต์ *Klyveromyces marxianus* TISTR ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มบนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิห้อง

Figure 4 Effect of crude palm oil concentration added on growth and pH changes of *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 cultivating in the raw decanter effluent on a shaker (200 rpm) at room temperature.

3.3 ผลของแหล่งไนโตรเจน

เมื่อศึกษาการเจริญของยีสต์ *K. marxianus* TISTR 5116 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (ที่ไม่เจือจาง และไม่เติมน้ำมันปาล์ม) ปรับพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 4.5 และเติมแหล่งไนโตรเจนต่างๆ คือ $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, และ NH_4NO_3 แหล่งละ 0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณความเข้มข้นไนโตรเจนเริ่มต้นในน้ำทิ้งเท่ากับ 0.06 เปอร์เซ็นต์ (ใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนใดๆ เป็นชุดควบคุม) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ายีสต์เจริญได้ดีในน้ำทิ้งที่มีการเติม $(NH_4)_2HPO_4$ (ภาพที่ 5) โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 6.56 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 19) และมีผลผลิตมวลชีวภาพ ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 0.15 กรัมต่อกรัม, อัตราการผลิต (productivity) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 0.26 และ 0.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งก็สอดคล้องกับผลข้อ 3.1 และ 3.2 โดยอัตราการผลิตที่ 24 ชั่วโมงยังคงสูงกว่าที่ 48 ชั่วโมง และยีสต์ยังมีการปรับตัวในการเจริญในชั่วโมงแรกได้มากกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (6.14 กรัมต่อลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่สามารถเจริญในน้ำทิ้งที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4NO_3 ได้น้อย โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.55 และ 2.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การที่ยีสต์สามารถใช้ $(NH_4)_2HPO_4$ ได้ดีที่สุด แสดงว่ายีสต์มีการเจริญและใช้แอมโมเนียมไอออน โดยเฉพาะอนุมูลฟอสเฟตที่แตกตัวออกมา ซึ่งในแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ไม่มี ดังนั้นอนุมูลฟอสเฟตที่ได้จาก $(NH_4)_2HPO_4$ ในการทดลองครั้งนี้ ก็น่าจะมีผลต่อการเจริญของยีสต์ อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่าสอดคล้องกับการทดลองของขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์ (2543) ที่เลี้ยง *Candida* sp. Y47 โดยเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า ยีสต์สามารถใช้ $(NH_4)_2HPO_4$ ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับ NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$, $NH_4H_2PO_4$ และ NH_4Cl เช่นเดียวกับ Patel และคณะ (1992) พบว่า *Rhodotorula minuta* ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถใช้ $(NH_4)_2HPO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญมากกว่าแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน เนื่องจากไนโตรเจนมีผลช่วยในการสังเคราะห์โปรตีนและเซลล์ ดังนั้นการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไป จะช่วยให้ยีสต์เจริญได้ดีขึ้น ดังเช่นการศึกษาของ Oswal และคณะ (2002) ที่เลี้ยง *Yarrowia lipolytica* ร่วมกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีสาหร่ายและแบคทีเรีย (algae/bacteria consortium) ในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่า หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สัดส่วนของไนโตรเจนในตะกอนน้ำทิ้งที่ปนอยู่กับกลุ่มของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น โดยสัดส่วน C : N เพิ่มขึ้นจาก 108 : 5 เป็น 108 : 21 เนื่องจากกลุ่มจุลินทรีย์เกิดกระบวนการตรึงไนโตรเจน (nitrogen-fixation) ในระหว่างการเลี้ยง ทำให้ตะกอนของน้ำทิ้งที่มีกลุ่มของจุลินทรีย์ปนอยู่มีปริมาณไนโตรเจนมากขึ้น



ภาพที่ 5 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยงยีสต์ *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

Figure 5 Effect of nitrogen source on growth and pH changes during cultivation of *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 in raw decanter effluent on a shaker (200 rpm) at room temperature

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากการลดลงของค่าซีโอดี พบว่ายีสต์สามารถลดค่าซีโอดีในน้ำทิ้งที่เติม $(NH_4)_2HPO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีที่สุด โดยลดค่าซีโอดีได้ 35.30 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 19) เนื่องจากการเจริญของยีสต์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์นั้นต้องอาศัยไนโตรเจนด้วย จึงต้องมีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไป สอดคล้องกับการทดลองของ Nigam (1998) ที่เลี้ยง *C. utilis* ในน้ำทิ้งจากโรงงานสับปะรด โดยมีการเติม $(NH_4)_2HPO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน 4 กรัมต่อลิตร พร้อมกับ $MgSO_4 7H_2O$ 0.6 กรัมต่อลิตร พบว่ายีสต์เจริญจาก 0.7 กรัมต่อลิตร เป็น 7 กรัมต่อลิตร ในเวลา 10 ชั่วโมง และค่าซีโอดีลดลงจาก 19.1 เป็น 2.3 กรัมต่อลิตร (คิดเป็น 88 เปอร์เซ็นต์) ภายใน 10 ชั่วโมง

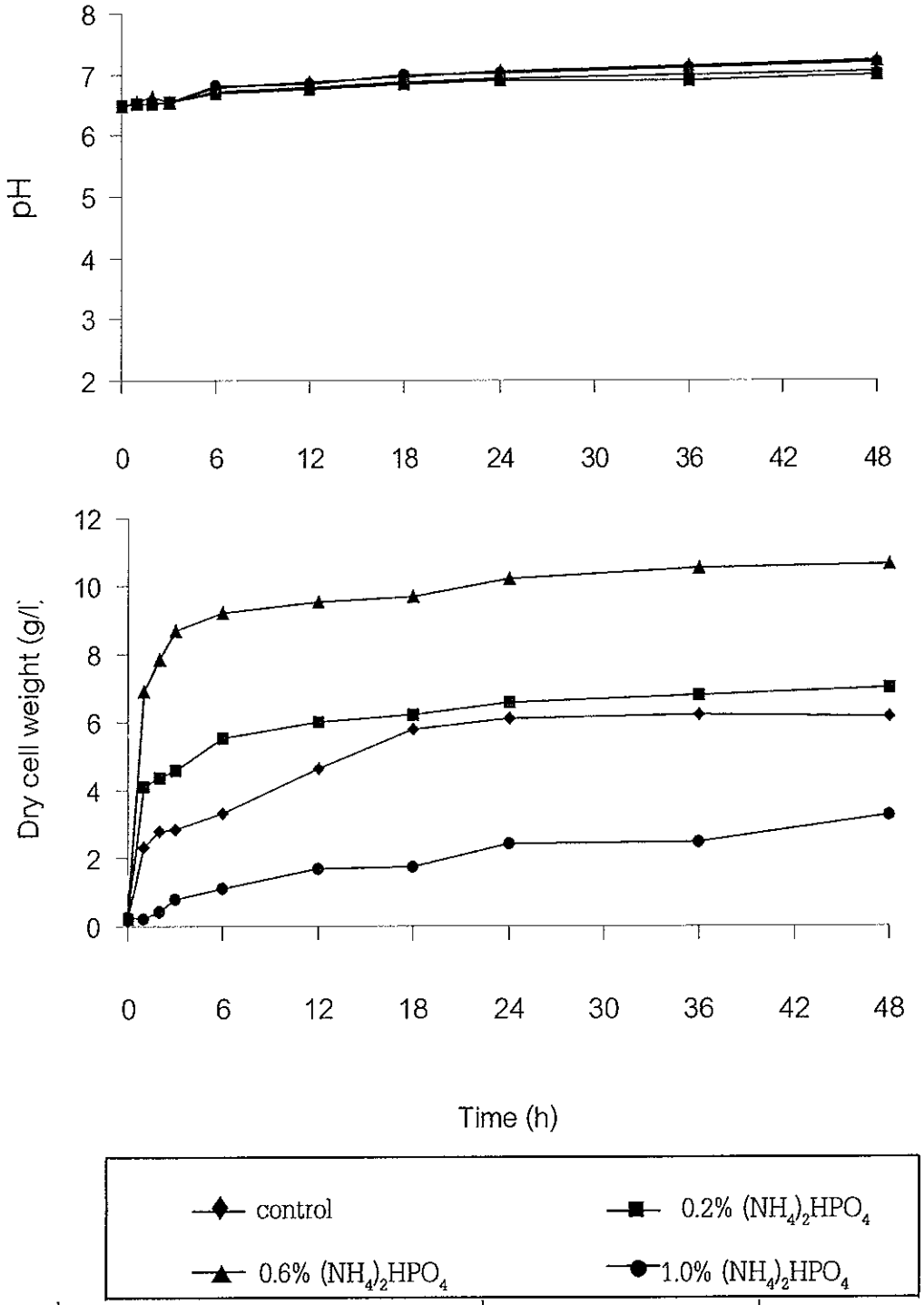
ตารางที่ 19 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดีของ *K. marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (มีปริมาณน้ำมันที่เติม เท่ากับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Table 19 Effect of nitrogen sources on dry cell weight and COD removal of *K. marxianus* TISTR 5116 cultivated in the decanter POME at room temperature for 48 h

Nitrogen sources	Dry cell weight (g/l)	COD removal (%)	Yield ($Y_{X/S}$) (g/g)	Productivity (g/l/h)	
				24 h	48 h
Control	6.14	32.73	0.17	0.24	0.13
0.2%$(NH_4)_2HPO_4$	6.56	35.30	0.15	0.26	0.14
0.2%$(NH_4)_2SO_4$	2.55	31.23	0.07	0.10	0.05
0.2%NH_4NO_3	2.54	31.28	0.06	0.10	0.05

3.4 ผลของความเข้มข้นของ $(NH_4)_2HPO_4$

เนื่องจากปริมาณไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญของ *K. marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จึงทำการศึกษาหาปริมาณ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ โดยเติม $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ระดับ 0, 0.2, 0.6 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชน้ำทิ้งเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์เจริญได้ดีในน้ำทิ้งที่มีการเติม $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ระดับ 0.6 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6) โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 10.64 กรัมต่อลิตร (มีค่า $Y_{X/S}$ เท่ากับ 0.49 กรัมต่อกรัม, productivity ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 0.43 และ 0.22 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) (ตารางที่ 20)



ภาพที่ 6 ผลของความเข้มข้นของ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่เติมต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่าง TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงยีสต์ *Klyveromyces marxianus* เครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

Figure 6 Effect of $(NH_4)_2HPO_4$ concentration added on growth and pH changes during cultivation of *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 in raw decanter effluent on a shaker (200 rpm) at room temperature

ตารางที่ 20 ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดีของ *K. marxianus* TISTR 5116 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Table 20 Effect of $(NH_4)_2HPO_4$ concentration on dry cell weight and COD removal of *K. marxianus* TISTR 5116 in the decanter POME at room temperature for 48 h

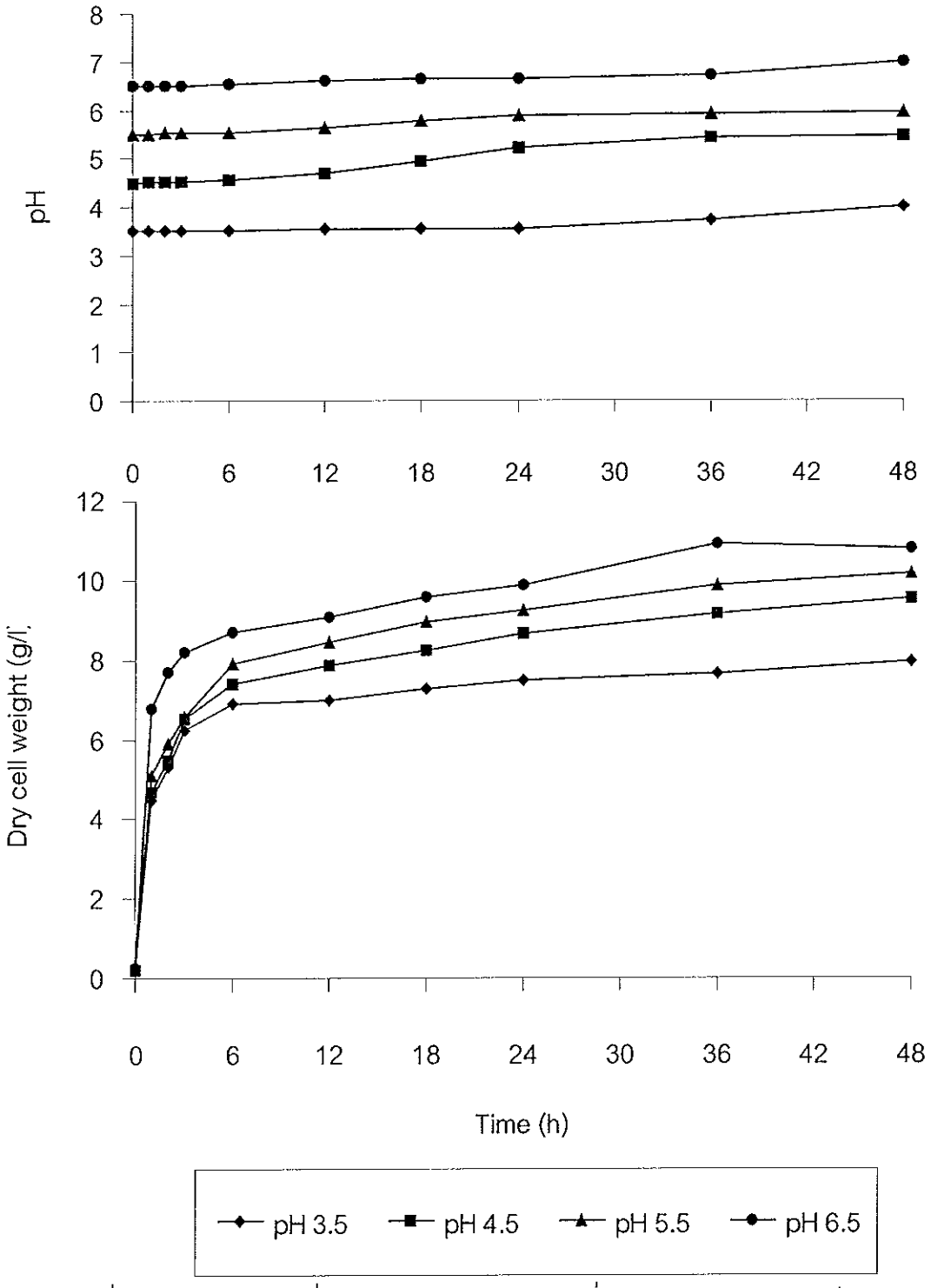
$(NH_4)_2HPO_4$ concentrations (%)	Dry cell weight (g/l)	COD removal (%)	Yield ($Y_{X/S}$) (g/g)	Productivity (g/l/h)	
				24 h	48 h
0	6.17	30.66	0.33	0.26	0.13
0.2 (control)	6.98	36.02	0.32	0.27	0.14
0.6	10.64	34.93	0.49	0.43	0.22
1.0	3.28	26.92	0.18	0.10	0.07

ในขณะที่น้ำทิ้งที่มีการเติม $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ระดับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุม) ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.98 กรัมต่อลิตร ส่วนน้ำทิ้งที่ไม่เติม $(NH_4)_2HPO_4$ พบว่าได้น้ำหนักเซลล์เซลล์แห้งต่ำกว่า (6.17 กรัมต่อลิตร) รวมทั้งน้ำทิ้งที่เติม $(NH_4)_2HPO_4$ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (3.28 กรัมต่อลิตร) ดังนั้นไนโตรเจนที่มากเกินไปก็อาจมีผลยับยั้งการเจริญได้โดย Hill และ Thommel (1982) พบว่า การเติมแอมโมเนียมที่มากเกินพอ ทำให้ปริมาณโปรตีนในเซลล์ยีสต์ลดลง เนื่องจากแอมโมเนียมยับยั้งการใช้กรดแอมิโนของยีสต์ เช่นเดียวกับการศึกษาของชุตินุช สุจริต (2540) ที่พบว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ในปริมาณมาก (ร้อยละ 5) มีผลยับยั้งการเจริญของ *C. tropicalis* TISTR 5146 ที่เลี้ยงในน้ำนึ่งปลาทูน่าที่มีปริมาณไนโตรเจนเพียงพออยู่แล้ว (5.63 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้น การเติม $(NH_4)_2HPO_4$ ถ้าเติมให้พอ เหมาะจะทำให้ยีสต์เจริญได้ดี ซึ่งยังสอดคล้องกับการทดลองของ ขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์ (2543) โดยพบว่าการเติม $(NH_4)_2HPO_4$ ที่มากเกินไป (0.6 เปอร์เซ็นต์) ทำให้ *Candida* sp. Y47 เจริญได้ต่ำกว่าโดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 12.06 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.4 เปอร์เซ็นต์ กลับเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 12.34 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเติม $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ระดับ 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์เจริญได้ต่ำ (11.24 และ 11.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) จากการทดลองเห็นได้ว่า เดิมในน้ำทิ้งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.045 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มระดับไนโตรเจน 0.2 เปอร์เซ็นต์ (มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.245 เปอร์เซ็นต์) ยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.6 เปอร์เซ็นต์ (มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.645 เปอร์เซ็นต์) การเจริญของยีสต์ ยังคงเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มระดับของไนโตรเจน 1.0 เปอร์เซ็นต์ (มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.045

เปอร์เซ็นต์) กลับพบว่ายีสต์มีการเจริญลดลง ดังนั้น แสดงว่าต้องใช้ $(NH_4)_2HPO_4$ ในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญจึงจะทำให้ยีสต์เจริญได้ดีและไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อมีสารในปริมาณมากเกินความต้องการ

3.5 ผลของพีเอชเริ่มต้น

จากการเลี้ยงยีสต์ *K. marxianus* TISTR 5116 ในน้ำทิ้งจากดีแคนเตอร์ที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นที่ระดับต่างๆ ได้แก่ 3.5, 4.5, 5.5 และ 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากผลการทดลอง (ภาพที่ 7) พบว่า *K. marxianus* TISTR 5116 เจริญได้ในพีเอชช่วงกว้างตั้งแต่ 3.5-6.5 ซึ่งสอดคล้องกับ Rose และ Harrison (1971) ที่กล่าวว่ายีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วงพีเอช 3.5-7.0 แต่จากผลการทดลอง *K. marxianus* TISTR 5116 สามารถผลิตเซลล์แห้งได้สูงสุดในน้ำทิ้งจากดีแคนเตอร์ที่มีพีเอชเริ่มต้น 3.5, 4.5, 5.5 และ 6.5 เท่ากับ 7.93, 9.54, 10.14 และ 10.91 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่า $Y_{x/s}$ เท่ากับ 0.53 กรัมต่อกรัม, productivity ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 0.41 และ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ที่พีเอชเริ่มต้น 6.5 (ตารางที่ 21) โดยจะเห็นได้ว่า ที่พีเอช 3.5 และ 4.5 ซึ่งความเป็นกรด มีผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของยีสต์มากกว่าในน้ำทิ้งที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 และ 6.5 เนื่องจากเอนไซม์จะทำงานได้ดีหรือไม่ต้องอาศัยพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน โดยเอนไซม์เป็นตัวควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ของเซลล์ (Walker, 1998) ถ้าต้องการให้เอนไซม์ทำงานได้ดี อาหารที่ใช้เลี้ยงยีสต์ก็ต้องมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ จากการทดลองได้สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งที่พีเอชในระดับต่างๆ โดยพบว่าที่พีเอช 6.5 น้ำทิ้งมีสีเข้มที่สุด ดังนั้นพีเอชน่าจะมีผลต่อการปลดปล่อยสารบางตัวหรือทำให้สับสเตรตอยู่ในรูปที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ด้วย นอกจากนี้ ยีสต์ยังมีการปรับตัวในชั่วโมงแรกได้เร็ว รวมทั้งสามารถเจริญได้มวลเซลล์ที่พีเอชเริ่มต้น 6.5 มากกว่าที่ระดับพีเอชเริ่มต้นอื่นๆ ซึ่งก็สอดคล้องกับการลดลงของค่าซีโอดี โดยที่พีเอชเริ่มต้น 6.5 ยีสต์ *K. marxianus* TISTR 5116 สามารถลดค่าซีโอดีได้มากที่สุด (35.66 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 21) ดังนั้น พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *K. marxianus* TISTR 5116 เท่ากับ 6.5



ภาพที่ 7 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของยีสต์ *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่เติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6% บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Figure 7 Effect of initial pH on growth and pH changes during cultivation of *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 in raw decanter effluent supplemented with 0.6% $(NH_4)_2HPO_4$ on a shaker (200 rpm) at 37 °C

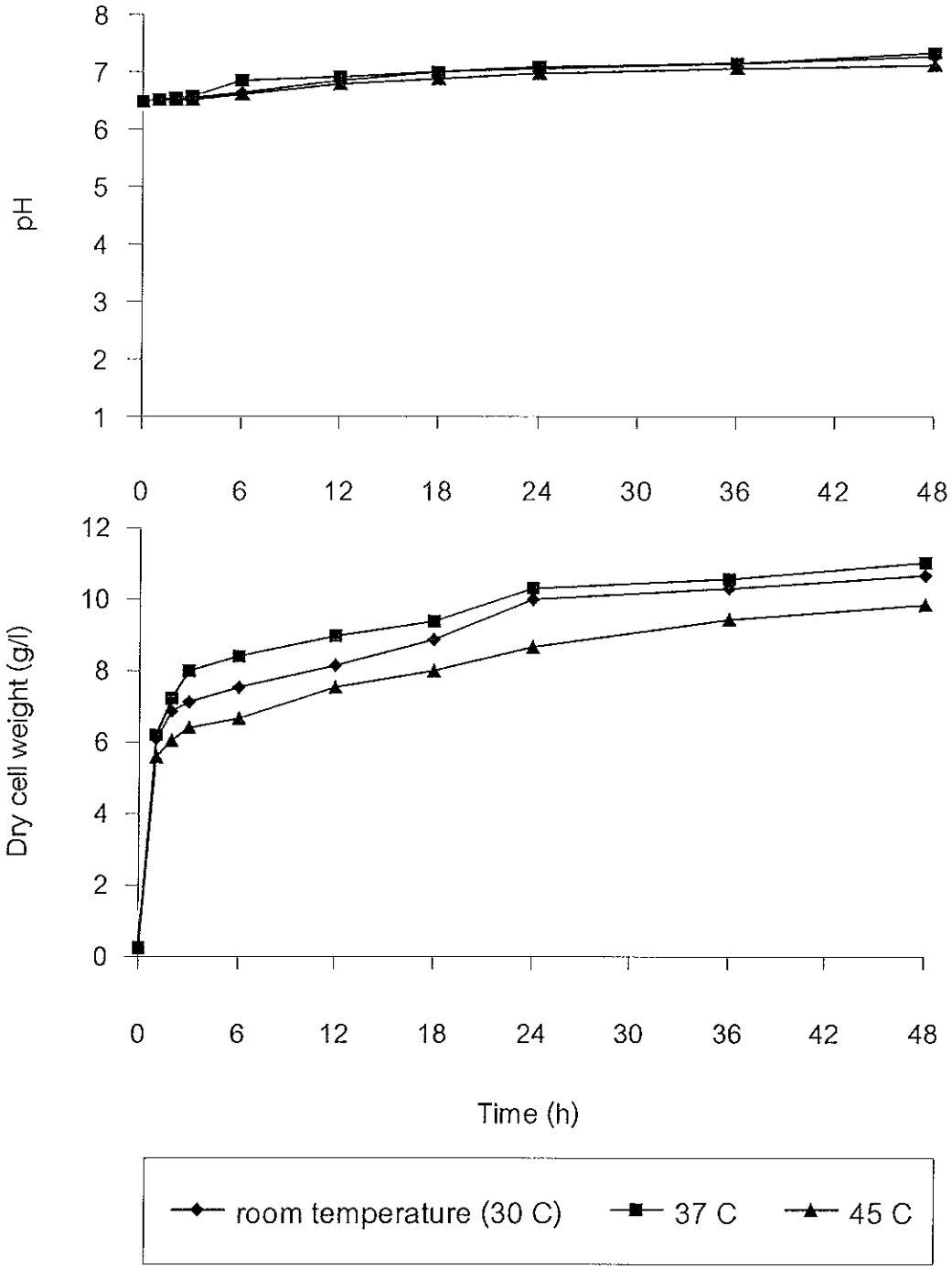
ตารางที่ 21 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดีของ *K. marxianus* TISTR 5116 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Table 21 Effect of initial pH on dry cell weight and COD removal of *K. marxianus* TISTR 5116 in the decanter POME at room temperature for 48 h

Initial pH	Dry cell weight (g/l)	COD removal (%)	Yield ($Y_{X/S}$) (g/g)	Productivity (g/l/h)	
				24 h	48 h
3.5	7.93	20.79	0.63	0.31	0.17
4.5	9.54	31.70	0.48	0.36	0.20
5.5	10.14	31.85	0.50	0.39	0.21
6.5	10.91	35.66	0.53	0.41	0.23

3.6 ผลของอุณหภูมิ

จากการเลี้ยงยีสต์ *K. marxianus* TISTR 5116 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่เติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6 เปอร์เซ็นต์ พร้อมปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบการเจริญที่อุณหภูมิห้อง, 37 และ 45 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 8) พบว่า ยีสต์นี้สามารถเจริญได้ทั้ง 3 อุณหภูมิ โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยีสต์มีการปรับตัวภายหลังการเลี้ยงไปเพียงชั่วโมงแรกได้ดีกว่า และภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก็พบว่ายีสต์เจริญได้ดีที่สุด ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 11.05 กรัมต่อลิตร (มีค่า $Y_{X/S}$ เท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัม, productivity ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 0.41 และ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ) (ตารางที่ 22) เทียบกับการเจริญที่อุณหภูมิห้อง และ 45 องศาเซลเซียส ที่มีการเจริญช้ากว่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยให้ปริมาณเซลล์แห้ง 10.68 และ 9.87 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่า *K. marxianus* TISTR 5116 สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (อุณหภูมิห้องถึง 45 องศาเซลเซียส) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Cosentino และคณะ (2001) ที่พบว่า *K. marxianus* ที่แยกได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็ง เจริญได้ในอุณหภูมิตั้งแต่ 10-45 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ Cruz-Guerrero และคณะ (1999) ที่เลี้ยง *K. marxianus* CDBB-L-278 ในอาหารสังเคราะห์ และเจริญได้ในอุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส *K. marxianus* CDBB-L-278 เจริญได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (2.16 กรัมต่อลิตร) และการที่ *K. marxianus* สามารถเจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียสด้วยนี้ จึงจัดว่า เป็นยีสต์ทนร้อน (thermotolerant



ภาพที่ 8 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของยีสต์ *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่เติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6% บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที)

Figure 8 Effect of temperature on growth and pH changes during cultivation of *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 in raw decanter effluent supplemented with 0.6% $(NH_4)_2HPO_4$ on a shaker (200 rpm)

yeast) (Phaff *et al.*, 1978) ซึ่งก็สอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ด้วย นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Banat และคณะ (1992) ศึกษาการเจริญของ *K. marxianus* หลายสายพันธุ์ในอาหารเหลวเทียบกับ *S. cerevisiae* พบว่า *K. marxianus* สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 25 ถึง 52 องศาเซลเซียส โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่สุด โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.86 ถึง 0.99 ต่อชั่วโมง เมื่อเทียบกับ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิเดียวกัน พบว่ามีอัตราการเจริญจำเพาะเพียง 0.13 ต่อชั่วโมง เมื่อพิจารณาถึงการลดลงของค่าซีโอดีในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า *K. marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส สามารถลดค่าซีโอดีได้ 38.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง และ 45 องศาเซลเซียส (34.7 และ 26.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) (ตารางที่ 22) ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญและน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงในครั้งนี้ ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 37 องศาเซลเซียส

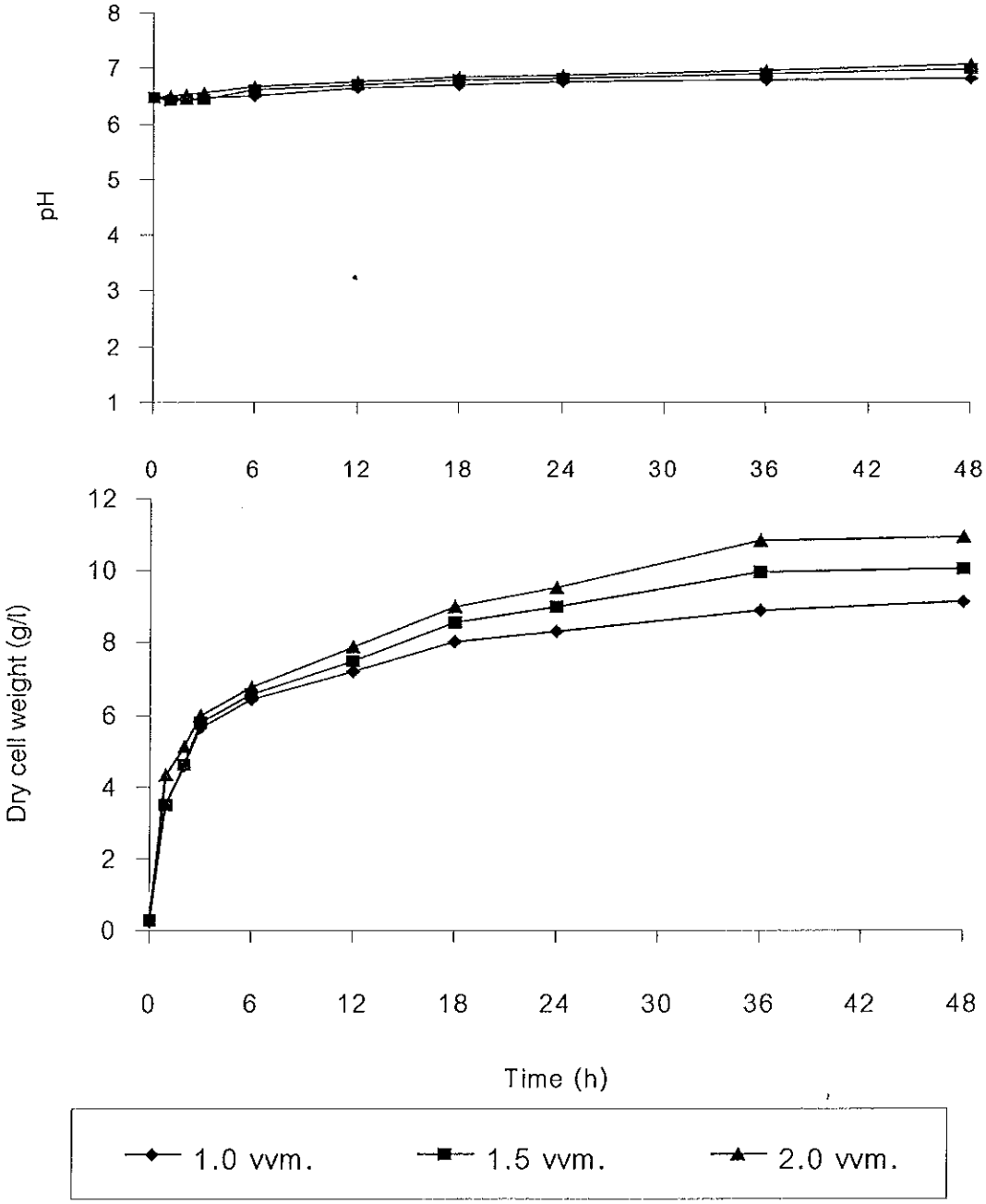
ตารางที่ 22 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยง (อุณหภูมิห้อง, 37 และ 45 องศาเซลเซียส) ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดีของ *K. marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Table 22 Effect of cultivating temperature (room temperature, 37 and 45 ℃) on dry cell weight and COD removal of *K. marxianus* TISTR 5116 in the decanter POME for 48 h

Temperature (℃)	Dry cell weight (g/l)	COD removal (%)	Yield ($Y_{X/S}$) (g/g)	Productivity (g/l/h)	
				24 h	48 h
Room temperature	10.68	34.74	0.48	0.42	0.22
37	11.05	38.20	0.45	0.43	0.23
45	9.87	26.80	0.57	0.36	0.21

3.7 ผลของอัตราการให้อากาศ

ผลของการให้อากาศในการเลี้ยงยีสต์ *K. marxianus* TISTR 5116 ในถังหมักที่มีอัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ที่อัตรา 1.0, 1.5 และ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ภาพที่ 9) พบว่า เมื่อให้อากาศ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ยีสต์มีการเจริญสูงกว่าการให้อากาศ 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยปริมาณเซลล์แห้งที่ได้สูงสุด คือ 10.95 กรัมต่อลิตร 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ได้เซลล์แห้ง 9.14 และ



ภาพที่ 9 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในถังหมัก 5 ลิตร (ปริมาตรบรรจุ 3 ลิตร) ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่เติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6% ที่มีอัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 C

Figure 9 Effect of air flow rate on growth and pH changes during cultivation of *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 in a 5 L fermenter containing 3 L of the decanter POME supplemented with 0.6% $(NH_4)_2HPO_4$ on 200 rpm agitation speed at 37 C

ตารางที่ 23 ผลของอัตราการให้อากาศ (1.0, 1.5 และ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอากาศต่อนาที) ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดีของ *K. marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในในถังหมัก 5 ลิตร (ปริมาตรบรรจุ 3 ลิตร) ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ที่มีอัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Table 23 Effect of air flow rate (1.0, 1.5 and 2.0 vvm) on dry cell weight and COD removal of *K. marxianus* TISTR 5116 in a 5 L fermenter containing 3 L in the decanter POME on 200 rpm agitation speed at 37C for 48 h

Air flow rate (vvm)	Dry cell weight (g/l)	COD removal (%)	Yield ($Y_{x/s}$) (g/g)	Productivity (g/l/h)	
				24 h	48 h
1.0	9.14	31.35	0.46	0.35	0.19
1.5	10.05	35.16	0.54	0.37	0.21
2.0	10.95	38.71	0.45	0.40	0.23

10.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (มีค่า $Y_{x/s}$ เท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัม, productivity ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 0.40 และ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ) (ตารางที่ 23) ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อมีการเลี้ยงในถังหมัก ค่าอัตราการผลิตที่ 48 ชั่วโมง มีค่าสูงกว่าที่ 24 ชั่วโมง ถึง 2 เท่า จึงเป็นที่น่าสังเกตในการเลี้ยงขั้นต่อไป ส่วนการเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการหมักอยู่ในช่วง 6.50-7.06 ซึ่งพีเอชเพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกันทั้งหมด และการให้อากาศ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ยีสต์สามารถใช้ออกซิเจนจากฟองอากาศ โดยที่อัตราการละลายของออกซิเจนจากฟองอากาศเพียงพอต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของยีสต์ในขณะที่มีการเจริญ เนื่องจากการให้อากาศนั้น ต้องมีการผสมเป็นอย่างดีระหว่างเชื้อและสารอาหารรวมทั้งออกซิเจนกระจายได้สม่ำเสมอ และถ้าสามารถให้อากาศได้อย่างเหมาะสมกับความต้องการของยีสต์จะทำให้ยีสต์เจริญได้สูง และผลิตเซลล์ได้มาก ดังเช่นในการศึกษาของชุตินุช สุจริต (2540) ซึ่งเลี้ยง *C. tropicalis* TISTR 5146 ในถังหมักบรรจุน้ำนึ่งปลาทูน่า 1.5 ลิตร พบว่า ยีสต์เจริญได้ดีที่สุด เมื่อให้อากาศ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.89 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมง จากการทดลองนี้ ปริมาตรอากาศที่เหมาะสำหรับการผลิตยีสต์เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มากที่สุดเท่ากับ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และให้ค่าซีโอดีลดลงสูงสุด (38.7 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ ให้อากาศ 1.5 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (35.2 และ 31.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) (ตารางที่ 23) ทั้งนี้เนื่องจากในอาหารที่มีออกซิเจนละลาย

อยู่สูง จุลินทรีย์จะมีอัตราจำเพาะของการดูดซึมออกซิเจนได้สูงสุด และสามารถผลิตเซลล์ได้สูงสุด แต่ถ้าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารต่ำ จะทำให้จุลินทรีย์ผลิตเซลล์ได้น้อยและเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์จะเปลี่ยนแปลงไป (Stanbury and Whitaker, 1986)

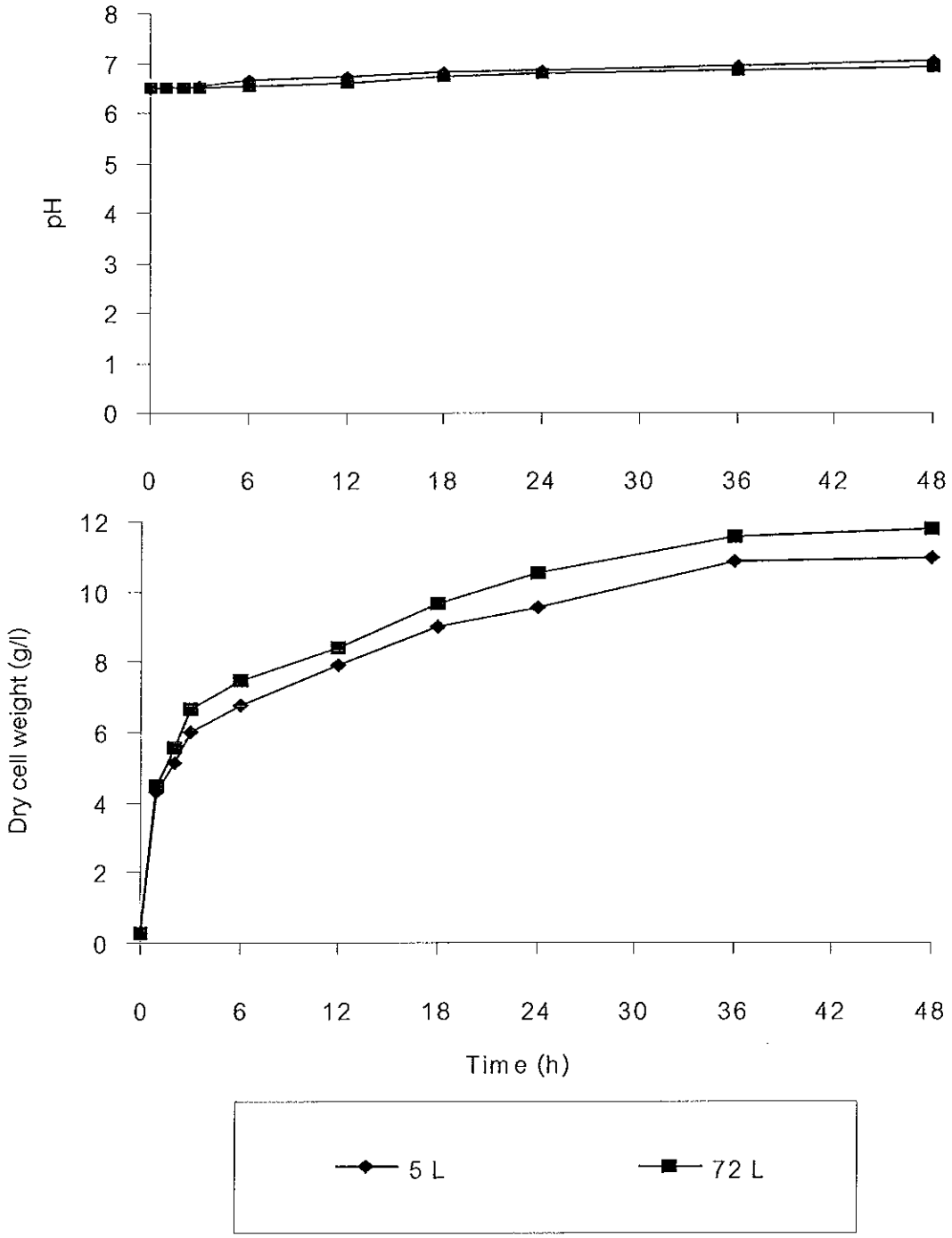
3.8 ผลของการขยายขนาด

จากผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *K. marxianus* TISTR 5116 จึงได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์และลดค่าซีโอดี ดังแสดงในตารางที่ 24 แล้วมาศึกษาผลของการขยายขนาด (ภาพที่ 10) โดยการเลี้ยงยีสต์ *K. marxianus* TISTR 5116 ในถังหมักขนาด 72 ลิตร (ปริมาตรบรรจุ 50 ลิตร) ในถังหมักที่มีการเติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.5 มีให้ความเร็วรอบของการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมพีเอชในระหว่างการหมัก และให้อากาศ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 11.77 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 25) ผลผลิตมวลชีวภาพ ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 0.47 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิต (productivity) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 0.44 และ 0.25 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ค่าอัตราการผลิตของการเลี้ยงยีสต์ในระดับ Up scale สอดคล้องกับการเลี้ยงในระดับ Lab scale และระยะเวลาในการเลี้ยง 24 ชั่วโมง กลับมีค่าอัตราการผลิตที่สูงกว่าการเลี้ยงที่ 48 ชั่วโมง ถึง 2 เท่า ดังนั้น ในการเลี้ยงเพื่อลดต้นทุนในการผลิตเซลล์ จึงควรเลี้ยงในช่วงเวลา

ตารางที่ 24 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *K. marxianus* TISTR 5116 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Table 24 Optimization studies on growth of *K. marxianus* TISTR 5116 in the decanter effluent for 48 h

Optimization	Source/concentration/rate
Decanter effluent concentration	raw decanter effluent (58,060 mg/l COD)
Crude palm oil concentration	0 % (5,380 mg/l)
Nitrogen sources	$(NH_4)_2HPO_4$
$(NH_4)_2HPO_4$ concentration	0.6 %
Initial pH	6.5
Cultivating temperature	37 ๐C
Air flow rate	2.0 vvm



ภาพที่ 10 ผลของการขยายขนาดการเลี้ยงต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 ในถังหมัก 72 ลิตร (ปริมาตรบรรจุ 50 ลิตร) ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่มีอัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 C

Figure 10 Effect of up-scale on growth and pH changes during cultivation of *Klyveromyces marxianus* TISTR 5116 in a 72 L fermenter containing 50 L of raw decanter effluent on 200 rpm agitation speed at 37 C

24 ชั่วโมง นอกจากนี้ ยังพบว่าค่าซีโอดีที่ได้จากการเลี้ยงขยายขนาดลดลงสูงสุด (39.6 เปอร์เซ็นต์) ที่ 48 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในถังหมักดังกล่าว เมื่อเทียบกับการเลี้ยงในระดับ lab scale (10.95 กรัมต่อลิตร) พบว่ามีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากการศึกษาในครั้งนี้จึงสามารถเลี้ยง *K. marxianus* TISTR 5116 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ในการผลิตมวลเซลล์พร้อมๆ กับใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งควบคู่ไปด้วยได้ ซึ่งยังมีรายงานการศึกษาการเจริญของ *K. marxianus* ในแหล่งต่างๆ เพื่อผลิตมวลเซลล์พร้อมไปกับการบำบัดน้ำทิ้ง คือ Hang และคณะ (2003) ซึ่งเลี้ยง *K. marxianus* NRRL Y-610 ในน้ำข้าวโพดหมักซึ่งมีสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ (กรดแลคติค, กรดอะซิติค และ เอทธานอล) และมีพีเอชต่ำ (pH เท่ากับ 3.6) โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 13.3 กรัมต่อลิตร พร้อมกับสามารถลดปริมาณกรดแลคติค, กรดอะซิติค และเอทธานอล (จากปริมาณเริ่มต้น 12.5, 2.02 และ 8.85 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ได้หมด ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะนี้เซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเลี้ยงในครั้งนี้จะนำไปสู่การวิเคราะห์องค์ประกอบและสกัดหาปริมาณกลูแคนต่อไป

ตารางที่ 25 ผลของการขยายขนาดการเลี้ยงต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและการลดค่าซีโอดีการเจริญของ *K. marxianus* TISTR 5116 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Table 25 Effect of up-scale on dry cell weight and COD removal of *K. marxianus* TISTR 5116 in the decanter POME for 48 h

Scale	Dry cell weight (g/l)	COD removal (%)	Yield ($Y_{X/S}$) (g/g)	Productivity (g/l/h)	
				24 h	48 h
Lab scale (3 L)	10.95	38.71	0.45	0.40	0.23
Up scale (50 L)	11.77	39.58	0.47	0.44	0.25

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆของเซลล์ยีสต์

จากการเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในถังหมักขนาด 72 ลิตร ปริมาตรบรรจุ 50 ลิตร ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ในข้อ 3.8) เนื่องจากยีสต์อยู่ในช่วง late exponential phase (Nguyen *et al.*, 1998) มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด และมีปริมาณกลูแคนสูง (Fleet, 1991) พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 11.77 กรัมต่อลิตร ส่วนในขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกจะใช้ตะกอนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงในหลอดทดลองขนาดใหญ่ (ที่มีตะกอนน้ำทิ้งและเซลล์ยีสต์ปนกัน) มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ผสมด้วยเม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์

กลาง 0.5 มิลลิเมตร จำนวน 10 กรัม ปั่นด้วยเครื่องเขย่าหลอด (vortex mixer) เป็นเวลา 40 นาที หลังจากผ่านขั้นตอนการล้างเอาส่วนประกอบอื่นๆ เช่น ไซโตพลาสซึม ออกาแนลต่างๆ พบว่า ผนังเซลล์ที่ได้หลังจากแช่แข็งแห้งมีน้ำหนัก 3.05 กรัม คิดเป็นร้อยละ 12.96 เนื่องจากการล้างด้วย เอทธานอล เมทธานอล อีเธอร์ และคลอโรฟอร์ม เป็นการกำจัดโปรตีน ไขมันและองค์ประกอบอื่นๆ ของเซลล์ยีสต์ออกไป ปริมาณผนังเซลล์ที่ได้ต่ำกว่าผนังเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่เลี้ยงในอาหาร YEPD ซึ่งได้ผนังเซลล์ร้อยละ 13.65 และภายหลังการสกัดหากลูแคนแล้ว พบว่า ได้ปริมาณกลูแคนร้อยละ 20 ของผนังเซลล์ (มลฤดี สิทธิพันธุ์, 2541) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากสายพันธุ์และอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงแตกต่างกัน (Nguyen *et al.*, 1998) เมื่อนำเอาผนังเซลล์แช่แข็งแห้งดังกล่าว 10 กรัม มาสกัดสารเบต้ากลูแคน ซึ่งในการสกัดครั้งนี้เป็นการสกัดโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เป็นด่าง โดยมีพีเอชประมาณ 8 เป็นตัวสกัด โดยมีการเติม CTAB และกรดบอริค เพื่อตกตะกอนแมนโนโปรตีนออกจากกลูแคน โดยสามารถตกตะกอนแมนโนโปรตีนได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Catley, 1988) พบว่าจากวิธีการสกัดทั้งหมด ได้สารสกัดกลูแคนน้ำหนัก 1.25 กรัม คิดเป็นร้อยละ 12.51 ของน้ำหนักผนังเซลล์แห้ง

ในส่วนของการนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆของเซลล์ยีสต์ โดยเปรียบเทียบปริมาณของแข็งที่ได้ก่อนและหลังการเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ พบว่าปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 34.02 เป็นร้อยละ 45.56 ไขมันมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 17.42 เป็นร้อยละ 20.93 เถ้ามีปริมาณเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 19.70 เป็น 31.92 (ตารางที่ 26) ซึ่งเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของชุตินุช สุจริต (2541) ที่เลี้ยง *C. tropicalis* TISTR 5146 ในน้ำนึ่งปลาทูน่า พบว่ามีปริมาณโปรตีนถึงร้อยละ 58.20 แต่ปริมาณไขมันกลับมีเพียงร้อยละ 0.36 และเถ้าร้อยละ 9.59 เมื่อนำไปผสมในสูตรอาหารเลี้ยงปลากดเหลืองโดยทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารในระดับต่างๆ โดยในอาหารทดลองทุกสูตรมีค่าโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ 30.68-30.95 พบว่าให้ผลการเจริญเติบโตดีเทียบเท่ากับสูตรอาหารชุดควบคุม เนื่องจากคุณค่าทางโภชนาการของยีสต์ในอาหารอยู่ในเกณฑ์ดีเมื่อเปรียบเทียบกับปลาป่น ซึ่งพอจะทำให้ทราบว่าเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ มีแนวโน้มที่สามารถนำไปใช้ในอาหารสัตว์ได้ อย่างไรก็ดีควรมีการใช้ยีสต์ที่ได้ดังกล่าวทดแทนในสูตรอาหารในระดับต่างๆ ของการเลี้ยงต่อไป

ตารางที่ 26 องค์ประกอบต่างๆ ของปริมาณของแข็งทั้งหมดจากการเลี้ยง *K. marxianus* TISTR 5116 จากการเลี้ยงในถังหมักขนาด 72 ลิตร (ปริมาตรบรรจุ 50 ลิตร) ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Figure 26 Total solid content composition of *K. marxianus* TISTR 5116 in a 72 L fermenter containing 50 L of raw decanter effluent on a shaker (200 rpm) at 37°C for 48 h

Total solid content composition[a]	Before cultivation (%)	After cultivation (%)
Protein	34.02	45.56
Lipid	17.42	20.93
Ash	19.70	31.92

[a] based on dry cell weight

บทที่ 4

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากการทดสอบยีสต์ 9 สายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง และ 45 องศาเซลเซียส ยีสต์จำนวน 6 สายพันธุ์ เป็นยีสต์ทนร้อน ได้แก่ *S. cerevisiae* (burgandy), *S. cerevisiae* TISTR 5021, *S. cerevisiae* TISTR 5055, *Candida tropicalis* TISTR 5146, *Candida palmioleophila* Y-128, *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5116

2. เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์เจริญที่อุณหภูมิห้องได้ดีกว่าที่ 45 องศาเซลเซียส และ *S. cerevisiae* (burgandy), *K. marxianus* TISTR 5116 และ *S. cerevisiae* TISTR 5021 เจริญได้ดีที่สุด โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 3.82, 3.17 และ 3.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3. เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ 3 สายพันธุ์ในน้ำทิ้งรวมของบ่อบำบัด (ชุดควบคุม) น้ำนึ่งปาล์ม และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า *K. marxianus* TISTR 5116 เจริญได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (burgandy) และ *S. cerevisiae* TISTR 5021 (7.99, 6.07 and 4.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์และสามารถลดค่าซีโอดีได้ 35.2 เปอร์เซ็นต์

4. เมื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์จาก *K. marxianus* TISTR 5116 พบว่ายีสต์เจริญและผลิตเซลล์ได้ดีเมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่ไม่เจือจาง (ซีโอดี เท่ากับ 58,060 มิลลิกรัมต่อลิตร) ไม่ต้องเติมน้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอน เติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.5 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมคือ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่าได้เซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้นจาก 5.89 กรัมต่อลิตร เป็น 10.95 กรัมต่อลิตร มีค่าซีโอดีลดลงเพิ่มขึ้นจาก 32.9 เปอร์เซ็นต์ เป็น 38.7 เปอร์เซ็นต์ (,มีค่าผลผลิตมวลชีวภาพ ($Y_{X/S}$) จาก 0.30 เป็น 0.45 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิต (Productivity) ที่ 24 ชั่วโมง จาก 0.19 เป็น 0.40 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

5. เมื่อเลี้ยงยีสต์ในถังหมักขนาด 72 ลิตร ปริมาตรบรรจุ 50 ลิตร พบว่าได้เซลล์ยีสต์ 11.77 กรัมต่อลิตรที่ 48 ชั่วโมง เมื่อนำของแข็งทั้งหมดมาวิเคราะห์ พบว่าได้ผนังเซลล์ร้อยละ 12.96 ของปริมาณของแข็งทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วยกลูแคนร้อยละ 12.51 ของผนังเซลล์

6. เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของแข็งที่ได้ก่อนและหลังการเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ พบว่าปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 34.02 เป็นร้อยละ 45.56 ไขมันมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 17.42 เป็นร้อยละ 20.93 เถ้ามีปริมาณเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 19.7 เป็น 31.92

ข้อเสนอแนะ

1.ควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ แหล่งคาร์บอนต่างๆ รวมถึงชนิดและปริมาณแร่ธาตุที่มีผลต่อการเจริญที่มีผลทำให้ยีสต์สามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งได้มากขึ้น เพื่อนำยีสต์ดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในด้านการบำบัดน้ำเสียที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูงมากๆได้

2.ศึกษาเพิ่มเติมถึงแนวทางที่ยีสต์จะสามารถนำเอาสารอาหารที่มีอยู่ในน้ำทิ้งเพื่อการผลิตมวลเซลล์และกลูแคนได้มากขึ้น เช่น องค์ประกอบและคุณลักษณะทั้งหมดของน้ำทิ้งที่จะมีผลส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญของเซลล์รวมถึงปริมาณกลูแคนของยีสต์ได้

3.ควรมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกลูแคนของเซลล์ยีสต์ เช่น การสกัดกลูแคนโดยใช้สารเคมี เปรียบเทียบกับการสกัดด้วยเอนไซม์ เพื่อความเป็นไปได้ในการผลิตเป็นอาหารสัตว์

4.ควรมีการศึกษาการประยุกต์ใช้สารเบต้ากลูแคนในสัตว์เพื่อศึกษาผลของการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาการผลิตไปสู่ระดับอุตสาหกรรม

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ สิริสิงห. 2522. เคมีของน้ำโสโครกและวิธีการวิเคราะห์. คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์. 2543. การผลิตเซลล์ยีสต์จากน้ำมันปาล์มดิบ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จินตนา แก้วบริสุทธิ์. 2541. การปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยกระบวนการดูดซับในชั้นตรึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชุตินุช สุจริต. 2540. การเลี้ยงยีสต์ในน้ำนึ่งปลาทูน่าหลังการแยกโปรตีนและไขมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ณัฐวรรธน์ ชูโชติ และ รัชยาภรณ์ ผลมั่ง. 2537. การผลิตสารให้กลิ่นรสจากยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ดวงพร คันธโชติ. 2528. โปรตีนเซลล์เดียว. ว.คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์. 4(1) : 85-93.

ดวงใจ โอชัยกุล และ มาริสา จาตุพรพิพัฒน์. 2541. การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปมันฝรั่งโดย *Candida tropicalis* TISTR 5136. ว.วิทย มข. 26(3) : 181-185.

ตรีภพ พินันโสตติกุล และเอกพงษ์ วงศ์สัมพันธ์. 2544. การใช้ยีสต์และพืชน้ำในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. โครงงานนักศึกษา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี. 2534. การเสริมโปรตีนในมันสำปะหลังโดยใช้ยีสต์ *Schwanniomyces castellii*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

บุญลือ สมบูรณ์วงศ์. 2532. การใช้มันเทศหมักด้วยยีสต์ในอาหารสุกรรุ่น. ว.วิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร. 7(1) : 24-33.

ปรีชา มุณีศรี. 2538. การบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้จุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และอรัญ หันพงศ์กิตติกุล. 2533. กระบวนการใช้ประโยชน์วัสดุเหลือทิ้ง และคุณสมบัติของน้ำเสียของโรงงานน้ำมันปาล์ม. ว.สงขลานครินทร์. 12(2) : 169-176.

มลฤดี สิทธิพันธุ์. 2538. การสกัดสารเบต้ากลูแคนจากยีสต์และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ. สัมมนาสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. จุลินทรีย์โปรตีน ใน เทคโนโลยีชีวภาพ. หน้า 153-160. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2535. ยีสต์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร ใน จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. หน้า 166-188. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ ศิริโภค. 2540. การให้อากาศและการกวน ใน เทคโนโลยีการหมัก. หน้า 179-188. กรุงเทพ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สมใจ ศิริโภค. 2544. ไคเนติกส์ของการหมัก ใน จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. หน้า 159-175. กรุงเทพ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สุวิทย์ สุวรรณโณ. 2539. การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำนึ่งปลาทูน่าโดย *Candida tropicalis* TISTR 5136. ว.สงขลานครินทร์. 18(1) : 43-48.

อรัญ หันพงศ์กิตติกุล, พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, กัลยา ศรีสุวรรณ, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และวีระศักดิ์ ทองลิมป์. 2537. การศึกษาวิธีการแยกน้ำมันในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม : เอกสารประกอบการประชุมสัมมนา การลดการสูญเสียน้ำมันในอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 7 เมษายน 2537 ณ โรงแรมสยามธานี สุราษฎร์ธานี. 96 หน้า.

อาทิตย์ พลายมาศ และหทัยรัตน์ พงศ์พิพัฒนาการ. 2544. ผลของการเสริมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ต่อสมรรถภาพการผลิตในไก่กระทง. ว.พระจอมเกล้าลาดกระบัง. 9(1) : 31-34.

A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc, Arlingtion, VA.

Banat, I. M., Nigam, P. and Marchant, R. 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52C and producing ethanol at 45C and 50C. World J. Microbiol. Biotechnol. 8 : 259-263.

Catley, B. J. 1988. Isolation and analysis of cell wall. In Yeast a Partical Approach (eds.I. Campbell, J. H. Duffus) pp. 163-183. Oxford University Press, Oxford.

Carlotti, A., Jacob, F., Perrier, J. and Poncet, S. 1991. Yeast production from crude sweet whey by a mixed culture of *Candida kefyr* LY 496 and *Candida valida* LY 497. Biotechnol. Lett. 13(6) : 437-440.

Chanda, S. and Chakrabarti, S. 1996. Plant origin liquid waste : a resource for single cell protein production by yeast. Biores. Tech. 57 : 51-54..

Cosentino, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Mulargia, A. F. and Palmas, F. 2001. Yeast associated with Sardinian ewe's dairy products. Int. J. food microbiol. 69 : 53-58.

Cruz-Guerrero, A., Barzana, E., Garcia-Garibay, M. and Gomez-Ruiz, L. 1999. Dissolved oxygen threshold for the repression of endo-polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. Process Biochem. 34 : 621-624.

Dann, H.M., Drackley, J.K., Mc Coy, G.C., Hutjens, M.F. and Garrett, J.E. 2000. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. J. Dairy Sci. 83 : 123-127.

Erasmus, L.J., Botha, P.M. and Kistner, A. 1992. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. J. Dairy Sci. 75 : 3056-3065.

Fleet, G. H. 1991. Cell walls. In The Yeasts, 2nd ed., Vol 4 (Rose, A.H. and Harrison, J.S., eds.). pp. 199-277. Academic Press. New York.

Hang, Y. D., Woodams, E. E. and Hang, L. E. 2003. Utilization of corn silage juice by *Kluyveromyces marxianus*. Biores. Tech. 86 : 305-307.

Harrison, G.A., Hemken, R.W., Dawson, K.A., Harmon, R.J. and Barker, K.B. 1988. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminals fermentation and microbial populations. J. Dairy Sci. 71 : 2967-2975.

Helen Arthur and Kenneth Watson. 1976. Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. J. Bacteriol. 10 : 56-68.

Hill, F. I. and Thommel, J. 1982. Continuous measurement of the ammonium concentration during the propagation of baker's yeast. Process Biochem. 17 : 16-18.

Hwang, T.K., Ong, S.M., Scow, C.C. and Tan, H.K. 1978. Chemical composition of palm oil mill effluents. Planter. 54 : 749-756.

Koh, J.S., Kodama, T. and Minoda, Y. 1983. Screening of yeast and cultural conditions for cell production from palm oil. Agric. Biol. Chem. 47(6) : 1207-1212.

Koh, J.S., Yamakawa, T., Kodama, T. and Minoda, Y. 1985. Cultural conditions for *Torulopsis candida* cell production from palm oil. Agric. Biol. Chem. 49(1) : 215-216.

Lee C., Yamakawa T. and Kodama T. 1993. Rapid growth of a thermotolerant yeast on palm oil. World J. Microbiol Biotechnol. 9 : 187-190.

Lipke, P. N. and Ovalle, R. 1998. Cell wall architecture in yeast : new structure and new challenges. J. Bacteriol. 180 : 3735-3740.

Manial, V.B., Narayanan, C.S. and Balagopalan, C. 1991. Cassava starch effluent treatment with concomitant SCP production. World J. Microbiol. Biotechnol. 7 (2) : 185-190.

Mohd Suria Affandi, Y. 1994. Refining and downstreaming processing of palm and palm kernal oil. In Selected Readings on Palm Oil and Its Uses. Palm Oil research Institute of Malaysia eds. Kuala Lumpur : Harian (Zulfadzli) Sdn. Bhd

Mustar, S., Mohd, M.A., Noor., Ahmad, R. and Amin, A.M. 2001. Single cell protein from palm oil mill effluent. Proc. NSF Workshop, Kuala Lumpur.

Newbold, C.J., Mclintosh, F.M. and Wallace, R.J. 1998. Changes in the microbial population of a rumen simulating fermenter in response to yeast culture. Can. J. Anim. Sci. 78 : 241-244.

Nguyen, T.H., Fleet, G.H. and Rogers, P.L. 1998. Composition of the cell wall of several yeast species. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50 : 206-212.

Nigam, J.N. 1998. Single cell protein from pineapple cannery effluent. World J. Microbiol. Biotech. 14 : 693-696.

Onifade, A.A. and Babatunde, G.M. 1996. Supplemental valve of dried yeast in a high-fibre diet for broiler chicks. Anim. Feed Sci. Tech. 62 : 91-96.

Oswal, N., Sarma, P. M., Zinjarde, S. S. and Pant, A. 2002. Palm oil mill effluent treatment by a tropical marine yeast. Biores. Tech. 85 : 35-37.

Patel, H., Trivedi, U. and Ray, R. 1992. Effect of carbon, nitrogen sources and divalent cations on lipid yield and fatty acid profile of *Rhodotorula minuta*. In Industrial Biotechnology. pp. 533-540. Malik, V.S. and Sridhar, P. eds. New York : Oxford & IBH Publishing Co. PVT. Ltd..

Peppler, H.J. 1970. Food yeasts. In The Yeasts. Vol 3 (Rose, A.H. and Harrison, J.S., eds.). pp. 421-462. Academic Press. New York.

Phaff, H.J., Miller, M.W. and Mrak, E.M. 1978. The life of yeasts. 2nd. Cambridge MA : Harvard University.

Prasertsan, P. 1997. Optimization for xylanase and cellulase production from *Aspergillus niger* ATCC 6275 in palm oil mill wastes and its application. J. Microbiol Biotechnol. 13 : 555-559.

Reed, G. and Nagodawithana, T.W. 1991. Yeast Technology. 2nd ed. Van Nostrand Reinhold. New York.

Rhishipal, R. and Philip, R. 1998. Selection of marine yeast for the generation of single cell protein from prawn-shell waste. Biores. Tech. 65 : 255-256.

Rose, A.H. and Harrison, J.S. 1971. Physiology and biochemistry of yeast. In The Yeast. Vol. 2. London : Academic Press.

Rydin, S., Molin, G. and Nilsson, I. 1990. Conversion of fat into yeast biomass in protein containing waste water. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33 : 473-476.

Schauer, F. and Hanschke, R. 1999. Taxonomy and ecology of the genus *Candida*. Mycoses. 42(1) : 12-21.

Shiota, M., Nakajima, T., Satoh, A., Shida, M. and Matsuda, K. 1985. Comparison of β-glucan structures in a cell wall mutant of *Saccharomyces cerevisiae* and the wide type. J. Biochem. 98 : 1301-1307.

Shojaosadati, S.A., Khalilzadeh, R., Jalilzadeh, A. and Sanaei, H.R. 1999. Bioconversion of molasses stillage to protein as an economic treatment of this effluent. Res. Cons. and Recycling 27 : 125-138.

Stanbury, P.F. and Whitaker, A. 1986. Principles of fermentation technology. New York : Pergamon Press.

Walker, G.M. 1998. Yeast Physiology and biotechnology. New York : John Wiley & Sons Inc.

Wohlt, J.E., Finkelstein, A.D. and Chung, C.H. 1991. Yeast culture to improve intake, nutrient digestibility and performance by dairy cattle during early Lactation. J. Dairy Sci. 74 : 1395-1400.

Wohlt, J.E., Corcione, T.T. and Zajac, P.K. 1998. Effect of yeast on feed intake and performance of cows fed diets based on corn silage during early lactation. J. Dairy Sci. 81 : 1345-1352.

Yang, F. and Tung, H. 1996. Reuse of thin stillage from rice spirit for the culture of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Process Biochem. 31(6) : 617-620.

Yiao, H. 1988. Single cell protein from wastewater of monosodium glutamate manufacture. Process Biochem. 23 : 176-177.

Zinjarde, S.S. and Pant, A.A. 2002. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. Marine Poll. Bull. 44. 118-121.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารที่ใช้สำหรับการเก็บและเลี้ยงยีสต์

อาหารวุ้นเอียง PDA (Potato dextose agar)

สารที่ใช้ มันฝรั่ง 200 กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทส 20 กรัม
ผงวุ้น 15 กรัม

วิธีการ 1.ปอกเปลือกมันฝรั่งหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าเล็กๆ 200 กรัม
2.ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือด กรองด้วยผ้าขาวบาง
3.นำส่วนของเหลวมาใช้โดยเติมน้ำตาลเดกซ์โทส ผงวุ้น ต้มจนวุ้นละลาย
4.ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุในหลอดฝาเกลียว หลอดละ 5 มิลลิลิตร
5.ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที (ขณะที่วุ้นยังไม่แข็งตัวให้นำหลอดมาวางเอียงไว้จนกระทั่งวุ้นแข็งตัวดี)

อาหารเลี้ยงยีสต์ YEPD

สารที่ใช้ ยีสต์สกัด 10 กรัม
เปบโทน 20 กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทส 20 กรัม

วิธีการ ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1.น้ำหนักเซลล์แห้ง (ดัดแปลงจาก A.O.A.C.,1990)

วิธีการ

1.ตวงตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพลาสติกสำหรับหมุนเหวี่ยง

2.นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 15 นาที

3.แยกเอาส่วนใสออก แล้วทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น นำไปหมุนเหวี่ยงที่สภาวะเดียวกับข้อ 2

4.นำตะกอนเซลล์ที่ได้ในหลอด เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส จนแห้งหรือประมาณ 5-6 ชั่วโมง

5.นำออกจากตู้อบ ใส่ในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้จนเย็นเท่าอุณหภูมิห้องแล้วชั่ง

การคำนวณ

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(A-B) \times 1000}{5}$$

เมื่อ A = น้ำหนักหลอด + ยีสต์หลังจากอบแห้งแล้ว

B = น้ำหนักหลอดที่อบแห้งแล้ว

2.โปรตีน (A.O.A.C.,1990)

อุปกรณ์

1.หลอดย่อยตัวอย่าง 2.5x31 ซม.

2.หลอดกลั่นตัวอย่าง 4.0x30 ซม.

3.เครื่อง Kjeltech ซึ่งประกอบด้วยเครื่องย่อย เครื่องกลั่น และเครื่องจับไอกรด

สารเคมี

1.กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)

2.สารช่วยเร่งการย่อย (catalyst) ประกอบด้วย $CuSO_4$ 1 ส่วน และ K_2SO_4 10 ส่วน

3.โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้นร้อยละ 40

4.กรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้นร้อยละ 2

5.mixed indicator

5.1 ชั่ง 0.125 กรัม เมทิลเรดและ 0.082 กรัม เมทิลีนบลูละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5.2 ชั่ง 0.1 กรัม โปรโมครีซอลารีนละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5.3 ผสมสารละลายข้อ1 และข้อ 2 ในอัตราส่วนสารข้อ1 ต่อสารข้อ 2 เท่ากับ 5 ต่อ 1

วิธีการ

<u>การย่อยตัวอย่าง</u>

1.ชั่งตัวอย่าง 0.2-0.5 กรัม หรือ 5-10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดย่อยตามปริมาณไนโตรเจนที่คาดว่าจะมี ถ้ามีมากก็ใช้น้อย ถ้ามีน้อยก็ใช้มาก (ทำ blank ทุกครั้ง)

2.ใส่สารช่วยเร่งการย่อย (catalyst) 1-2 กรัม

3.เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5-10 มิลลิลิตร สวมและเปิดเครื่องจับไอกรด

4.ย่อยที่อุณหภูมิเริ่มต้นประมาณ 200 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นจนถึง 350 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง

5.เมื่อย่อยจนใสหรือได้สารละลายสีฟ้าหรือสีเขียวอมฟ้า ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

6.นำไปกลั่น

<u>การกลั่นตัวอย่าง</u>

1.ใส่ตัวอย่างใส่ในหลอดกลั่น เติมน้ำประมาณ 60-100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อผสมกรด

2.ใส่หลอดเข้ากับเครื่องกลั่นที่พร้อมจะกลั่นเปิดน้ำหล่อเย็น อัตราการไหลประมาณ 3-4 ลิตรต่อนาที

3.เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 % ลงไปช้าๆ จนได้สารละลายสีดำ

4.เริ่มกลั่นโดยใช้กรดบอริก (2%) ที่มีการเติม mixed indicator (2-3 หยด) ประมาณ 10 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร รองรับ condensate โดยให้ปลายท่อจมอยู่ใต้กรด

5.กลั่นให้ได้ condensate ประมาณ 100-150 มิลลิลิตร ก่อนเสร็จการกลั่นในแต่ละครั้ง ให้เลื่อนฟลาสก์เก็บตัวอย่างลงให้พ้นของเหลว กลั่นต่อประมาณ 1 นาที เพื่อล้างเครื่องกลั่น

6.ไตเตรทกับ 0.02-0.1 นอร์มอล HCl หรือ H_2SO_4 หักค่า blank ออกเพื่อนำไปคำนวณ

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{ปริมาณกรด x นอร์มัลลิตี้ x 14}}{\text{ปริมาณตัวอย่าง}}$$

3.ไขมัน (A.O.A.C.,1990)

อุปกรณ์

1.อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhlet appartus) ประกอบด้วย ขวดสกัดสำหรับใส่ตัวทำละลาย ซอคเลต (soxhlet) เครื่องควบแน่น (condenser) และเตาให้ความร้อน (heating mentle)

2.หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)

3.สำลี

4.ตู้อบไฟฟ้า

5.เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 4 ตำแหน่ง

6.โถดูดความชื้น

สารเคมี

1.ปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether)

วิธีการ

1. อบขวดสกัดสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาด 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (2.0 กรัม) ห่อให้มิดชิดโดยคลุมด้วยสำลีเพื่อให้สารละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอในหลอดใส่ตัวอย่าง

3. นำหลอดตัวอย่างใส่ในซอคเลต

4. เติมสารปิโตรเลียม อีเทอร์ ลงในขวดหาไขมัน 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา

5. ประกอบอุปกรณ์ชุดสกัดไขมันพร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิทช์ให้ความร้อน

6. ใช้เวลาในการสกัดไขมัน 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที

7. เมื่อครบ 14 ชั่วโมงแล้ว กลั่นเก็บสารละลายจนเหลือสารละลายในขวดสกัดเพียงเล็กน้อย นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต

8. นำขวดหาไขมันนั้นไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

9. ชั่งน้ำหนัก แล้วอบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

4. **เถ้า (A.O.A.C.,1990)**

วิธีการ

1. เผาเครื่องกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงปิดสวิทส์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิในเตาลดลงก่อน แล้วนำออกจากเตาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก
2. เผาซ้ำอีกครั้งละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1-2 กรัม ใส่ในกระเบื้องเคลือบที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผา ตั้งอุณหภูมิเตาไว้ที่ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
4. คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้าคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{100 \times \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

5.ปริมาณกลูแคนของยีสต์ (ดัดแปลงจาก Catley, 1988 อ้างโดย มลฤดี สิทธิพันธุ์, 2541)

5.1 การทำให้เซลล์แตก โดยใช้ Bead-Beater มีวิธีการดังนี้คือ ผสมเม็ดแก้ว (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร):เซลล์:ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 1:1:2 ลงใน chamber หล่อเย็น chamber ด้วยน้ำแข็ง ปั่น chamber เป็นเวลา 10 นาที โดยหยุดปั่นทุกๆ 1 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายที่อยู่ส่วนบนของ chamber ใส่ในหลอดที่แช่เย็น และใส่บัฟเฟอร์ที่เย็นใน chamber ที่ยังมีเม็ดแก้วอยู่ ปั่นอีก 1 นาที ดูดตะกอนแขวนลอยใส่ในหลอดที่แช่เย็น รวมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน นำมาเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 3000 จี 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนตะกอนไว้

5.2 การล้างและแยกผนังเซลล์

5.2.1 ล้างตะกอนในข้อ 5.1 ด้วยเอทานอล 2 ครั้งๆ ละ 200 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงแยกเก็บส่วนผนังเซลล์ไว้

5.2.2 ล้างผนังเซลล์ด้วยสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม และเมทธานอล (1:1) 3 ครั้งๆ ละ 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปล้างด้วยสารผสมระหว่างเอทานอลและอีเทอร์ (1:1) 3 ครั้งๆ ละ 200 มิลลิลิตร แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง

5.2.3 นำผนังเซลล์ที่แยกได้ แช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 10 นาที กวนเป็นครั้งคราว แล้วนำไปเหวี่ยงแยกเก็บตะกอน

5.2.4 ทำซ้ำข้อ 5.2.3 จำนวน 10 ครั้งๆ ละ 100 มิลลิลิตร

5.2.5 ล้างผนังเซลล์ด้วยน้ำ 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ในน้ำ 10 มิลลิลิตร ก่อนนำไปแช่แข็งแห้งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.3 การสกัดสารเบต้ากลูแคนจากผนังเซลล์

5.3.1 นำผนังเซลล์ที่แช่แข็งแห้ง 10 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 8.0) 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 3000 g 10 นาที

5.3.2 แยกส่วนใสเก็บไว้ นำตะกอนมาทำซ้ำในข้อ 5.3.1 2 ครั้ง รวมส่วนใสเข้าด้วยกัน

5.3.3 เติมโซเดียมอะซิเตท 5.4 กรัม ลงในส่วนใสจากข้อ 5.3.2 300 มิลลิลิตรลงไป เติมเอทานอล 900 มิลลิลิตร คนทุกๆ 4-5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปเหวี่ยงแยกเอาตะกอนออก ล้างตะกอนด้วยสารผสมระหว่าง เอทานอลต่อน้ำ ในอัตรา 3:1 (v/v) 100 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 g 10 นาที

5.3.4 ละลายตะกอนในน้ำ 50 มิลลิลิตร ทำ dialysis ด้วยน้ำกลั่น 2000 มิลลิลิตร เปลี่ยนน้ำทุก 4 ชั่วโมง แล้วทำ dialysis ต่อไปอีก 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.3.5 ปรับปริมาตรสารละลายในข้อ 5.3.4 ให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย CTAB (เตรียมโดยสารละลาย hexadecyl trimethyl ammonium bromide 4 กรัม ในน้ำ 50 มิลลิลิตร) คน 5 นาที แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 g 10 นาที เก็บส่วนใสไว้

5.3.6 เติมกรดบอริกเข้มข้น 1 % 100 มิลลิลิตร ลงในส่วนใสจากข้อ 5.3.5 ปรับพีเอชให้ได้ 8.8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

5.3.7 เหวี่ยงแยกตะกอนด้วยความเร็ว 3000 g 10 นาที เก็บส่วนใส และนำตะกอนมาล้าง 2 ครั้ง โดยใช้สารละลายโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 0.5 % พีเอช 8.8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

5.3.8 นำตะกอนมาละลายในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 2 % 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง คน 5 นาที แล้วเติมเอทานอลที่มีโซเดียมอะซิเตท 1 กรัม 150 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ล้างตะกอนด้วยการหมุนเหวี่ยงโดยใช้เอทานอลที่มีกรดอะซิติก 2 % 200 มิลลิลิตร 4 ครั้ง

5.3.9 ละลายตะกอนในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ทำ dialysis ด้วยน้ำกลั่น 2000 มิลลิลิตร เปลี่ยนน้ำกลั่นเมื่อครบ 4 ชั่วโมง แล้วทำ dialysis ต่อไปอีก 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนที่อยู่ใน dialysis tube นำมาวัดปริมาตร

5.3.10 แล้วเติมเอทานอลที่มี 1 % โซเดียมอะซิเตทลงไป 3 เท่า คน 4-5 นาที ปล่อยให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 3 ครั้งๆ ละ 100 มิลลิลิตร เหวี่ยงแยกและเก็บตะกอน นำไปทำให้แห้งในโถดูดความชื้นที่มี P_2O_5 ที่อุณหภูมิห้อง และชั่งน้ำหนักแห้งของสารที่สกัดได้

6.ซีโอดี (APHA, AWWA, and WPCF, 1985)

อุปกรณ์

1.อุปกรณ์กลั่นไหลกลับ

-ขวดกลมขนาด 250 มิลลิลิตร

-เครื่องควบแน่น

-เตาให้ความร้อน (hot plate)

2.บิวเรต

สารเคมี

1.สารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.025 นอร์มอล

สารละลายโปตัสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ซึ่งอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 12.259 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟามิก (NH_2SO_3H) 0.12 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยการเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

2.Sulfuric acid reagent

ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต 22 กรัมในกรดซัลฟูริกเข้มข้นบรรจุขวดขนาด 1 ปอนด์ (2.65 ลิตร) เนื่องจากซิลเวอร์ซัลเฟตละลายยากมากอาจต้องใช้เวลา 1-2 วัน จึงละลายหมด

3.สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.10 นอร์มอล

3.1การเตรียมสารละลาย

ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต จำนวน 39 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนครบ 1000 มิลลิลิตร

3.2การหาความเข้มข้นของสารละลาย

ปิเปตสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต (0.25 นอร์มอล) จำนวน 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น ไตเตรทด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต เติมเฟอร์โรอิน 2-3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์

การคำนวณ

$$\text{ความเข้มข้น (นอร์มอล)} = \frac{\text{ปริมาณสารละลายโปตัสเซียมไดโครเมต (มล.)} \times 0.25}{\text{ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมทซัลเฟต (มล.)}}$$

4.สารละลายเฟอร์โรอิน

ละลาย 1-10 ฟีแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_6N_2.H_2O$) จำนวน 1.485 กรัม และเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) จำนวน 0.695 กรัม เติมน้ำจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5.ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) ชนิดผง

6.เมอร์คิวรี่ซัลเฟต ($HgSO_4$) ชนิดผลึกบริสุทธิ์หรือเป็นผง ใช้เป็นตัวกำจัดอนุภาคคลอไรด์ (Cl) ในอัตราส่วน $HgSO_4$ ต่อ Cl เท่ากับ 10 ต่อ 1

7.กรดซัลฟามิก (sulfamic acid) ใช้ในกรณีที่กำจัดไนไตรท์เท่านั้น

วิธีการวิเคราะห์

1.เติมเมอคิวรี่ซัลเฟต 0.4 กรัมลงในขวดกลม

2.เติมตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร หรือส่วนของตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มิลลิลิตร

3.เติมสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร และลูกแก้ว (glass bead) 3-5 เม็ด

4.ค่อยๆเติม sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เพื่อละลายเมอคิวรี่ซัลเฟต ควรทำให้เย็นขณะเขย่าเพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียของสารที่เป็นไอในตัวอย่าง (อาจแช่ในอ่างน้ำ)

5.กลั่นด้วยอุปกรณ์กลั่นไหลกลับประมาณ 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น

6.ไตเตรทสารละลายโปแตสเซียมไดโครเมตที่เกินพอด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอร์โรอีนเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากเขียวปนน้ำเงินเป็นสีน้ำตาลปนแดง

7.ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรแทนตัวอย่างน้ำ ทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง (ข้อ 1-6)

การคำนวณ

$$\text{ซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{(A-B) \times N \times 8 \times 1000}{\text{ปริมาณตัวอย่าง (มล.)}}$$

เมื่อ A คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไตเตรท blank

B คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มอล)

7.น้ำมันและกรีสในน้ำทิ้ง (กรรณิการ์ สิริสิงห, 2522)

อุปกรณ์

1.ชุดที่ใช้สำหรับสกัด (Soxhlet)

2.เครื่องดูดสุญญากาศ

3.Buchner funnel

4.ขวดสกัด ขนาด 250 มิลลิลิตร

5.เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 4 ตำแหน่ง

6.โถดูดความชื้น

7.ตู้อบ

สารเคมี

1.ปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether)

2.กระดาษกรอง เบอร์ 40

3.Diatomaceous-silica filter and suspension 10 กรัมต่อลิตรน้ำกลั่น

4.ผ้าขาวบาง

วิธีการ

1.วางกระดาษกรองใน buchner funnel แล้วเทสารละลาย filter aid ที่เตรียมไว้ 100 มิลลิลิตร ใช้เครื่องดูดสูญญากาศดูด ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 10 มิลลิลิตร จนกระทั่งแห้ง

2.กรองตัวอย่างที่เตรียมไว้ แล้วดูดให้แห้ง

3.ใช้ปากคีบกระดาษกรองออกมา ม้วนกระดาษกรองเข้าด้วยกัน แล้วห่อด้วยผ้าขาวบาง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4.ใส่ลงในซอคเลต

5.เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ ลงในขวดสกัดไขมัน 150 มิลลิมิตรแล้ววางบนเตา

6.ประกอบอุปกรณ์ชุดสกัด พร้อมทั้งน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่น แล้วเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน

7.ใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง เมื่อครบแล้ว กลั่นเก็บสารละลายจนเหลือสารละลายในขวดสกัดเพียงเล็กน้อย นำตัวอย่างที่ใส่ในหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต

8.นำขวดสกัดนั้นไปอบในตู้อบทีอุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

9.ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณของกรีสหรือ น้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารที่สกัดได้}}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่าง}} \times 1000$$

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 27 การเจริญของยีสต์ 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง) ต่อการลดค่าซีโอดี และน้ำมันและกรีส น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตมวลชีวภาพ

สายพันธุ์	น้ำทิ้งรวม		ยีสต์	
	ซีโอดีที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)	น้ำมันที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตมวลชีวภาพ ($Y_{x/s}$) (กรัมต่อกรัม)
S.cerevisiae (burgandy)	40.25	60.75	4.75	0.304
S.cerevisiae (5021)	28.99	47.04	3.08	0.274
K.marxianus (5116)	40.00	50.94	3.88	0.314

ตารางที่ 28 การเจริญของยีสต์ 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง) ต่อการลดค่าซีโอดี และน้ำมันและกรีส น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตมวลชีวภาพ

สายพันธุ์	น้ำทิ้งดีแคนเตอร์		ยีสต์	
	ซีโอดีที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)	น้ำมันที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตมวลชีวภาพ ($Y_{x/s}$) (กรัมต่อกรัม)
S.cerevisiae (burgandy)	33.16	50.32	6.07	0.289
S.cerevisiae (5021)	30.72	56.35	4.52	0.232
K.marxianus (5116)	35.20	83.53	7.99	0.358

ตารางที่ 29 การเจริญของยีสต์ 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในน้ำนึ่งปาล์มของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง) ต่อการลดค่าซีโอดีและน้ำมันและกรีส น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตมวลชีวภาพ

สายพันธุ์	น้ำนึ่งปาล์ม		ยีสต์	
	ซีโอดีที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)	น้ำมันที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตมวลชีวภาพ ($Y_{x/s}$) (กรัมต่อกรัม)
S.cerevisiae (burgandy)	28.95	61.45	4.64	0.253
S.cerevisiae (5021)	26.07	65.58	4.91	0.298
K.marxianus (5116)	33.79	23.62	4.42	0.245

ตารางที่ 30 ผลของระดับการเจือจางของน้ำทิ้งต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K. marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

เวลา (ชั่วโมง)	ระดับการเจือจางน้ำทิ้ง							
	1 : 0		1 : 1		1 : 2		1 : 5	
	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)
0	58061	0	25600	0	15319	0	10394	0
12	49493	14.76	22979	10.23	14224	7.15	9398	9.57
24	42458	26.87	20249	20.90	13528	11.69	9110	12.35
48	40210	30.74	20016	21.81	12315	19.61	8445	18.75
72	38952	32.91	18764	26.70	11771	23.16	8174	21.36

ตารางที่ 31 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มที่เติมต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K. marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

เวลา (ชั่วโมง)	ระดับความเข้มข้นน้ำมันปาล์มที่เติม							
	0 %		1 %		5 %		10 %	
	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)
0	58540	0	58710	0	59653	0	59956	0
3	48722	16.77	49580	15.55	51838	13.10	54428	9.22
12	46580	20.43	47484	19.12	49709	16.67	50597	15.61
24	41376	29.32	45887	21.84	48104	19.36	48480	19.14
48	40545	30.74	43439	26.01	44245	25.83	46963	21.67

ตารางที่ 32 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K. marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่เจือจางและไม่เติมน้ำมันปาล์ม บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

เวลา (ชั่วโมง)	แหล่งไนโตรเจนที่เติม							
	Control		$(NH_4)_2HPO_4$		$(NH_4)_2SO_4$		NH_4NO_3	
	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)
0	57989	0	59640	0	59946	0	58496	0
3	53059	8.50	53294	10.64	57920	3.38	52880	9.60
12	46219	12.89	29581	25.73	50663	12.53	44615	15.63
24	32718	29.21	24944	36.98	39162	22.70	33158	25.68
48	22009	32.73	16146	35.27	26931	31.23	22786	31.28

ตารางที่ 33 ผลของระดับ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่เติมต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K. marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ไม่เจือจางและไม่เติมน้ำมันปาล์ม บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

เวลา (ชั่วโมง)	ระดับของ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่เติม							
	Control		0.2 %		0.6 %		1.0 %	
	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)
0	58760	0	59230	0	60577	0	61780	0
3	52208	11.15	48166	18.68	49273	18.66	58024	6.08
12	50528	14.01	43937	25.82	44797	26.05	53909	12.74
24	44939	23.52	42924	27.53	40859	32.55	49529	19.83
48	40744	30.66	37895	36.02	39417	34.93	45149	26.92

ตารางที่ 34 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K. marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ไม่เจือจางและไม่เติมน้ำมันปาล์ม โดยเติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6% บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

เวลา (ชั่วโมง)	ระดับของพีเอชเริ่มต้น							
	3.5		4.5		5.5		6.5	
	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)
0	58632	0	61177	0	61988	0	62012	0
3	53179	9.30	53206	13.03	53954	12.96	50217	19.02
12	49860	14.96	48648	20.48	48338	22.02	45349	26.87
24	47486	19.01	44702	26.93	44718	27.86	41474	33.12
48	46442	20.79	41784	31.70	42245	31.85	39898	35.66

ตารางที่ 35 ผลของอุณหภูมิต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K. marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่เติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6% บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิที่เลี้ยง (C)					
	อุณหภูมิห้อง		37		45	
	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)	COD (mg/l)	COD removal(%)
0	62220	0	62220	0	62220	0
3	54144	12.98	51294	17.56	54144	12.98
12	52246	16.03	50821	18.32	52719	15.27
24	41799	32.82	43237	30.51	50012	19.62
48	40605	34.74	38452	38.20	45557	26.78

ตารางที่ 36 ผลของอัตราการให้อากาศต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K. marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ในถังหมักปริมาตรบรรจุ 3 ลิตร ความเร็วใบพัด 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 C

เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการให้อากาศ (vvm.)					
	1.0		1.5		2.0	
	COD (mg/l)	COD removal (%)	COD (mg/l)	COD removal (%)	COD (mg/l)	COD removal (%)
0	62122	0	62088	0	62010	0
3	56245	9.46	56444	13.55	52572	15.22
12	53052	14.60	51514	17.03	49416	20.31
24	59008	21.11	48863	26.30	43184	30.36
48	42647	31.35	44002	35.16	38006	38.71

ตารางที่ 37 ผลของเลี้ยงขยายขนาดต่อค่าซีโอดีและการลดค่าซีโอดีของยีสต์ *K.marxianus* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในถังหมัก ความเร็วใบพัด 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm ที่อุณหภูมิ 37 ℃

เวลา (ชั่วโมง)	ถังหมัก 5 ลิตร		ถังหมัก 72 ลิตร	
	COD (mg/l)	COD removal (%)	COD (mg/l)	COD removal (%)
0	62010	0	62092	0
3	52572	15.22	51151	17.62
12	49416	20.31	47966	22.75
24	43184	30.36	41744	32.77
48	38006	38.71	37516	39.58

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายธีระวุฒิ ทวีทรัพย์
วัน เดือน ปีเกิด	26 เมษายน 2522

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (สัตวศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับ 1	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่	2544

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างศึกษา)

ทุนบัณฑิตศึกษา ประเภทผลการเรียนดีเด่น