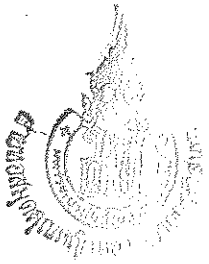
การผลิตเซลล์ยีสต์จากน้ำมันปาล์มดิบ

Production of Yeast Cells from Crude Palm Oil



ขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์

Kanitta Natthanonworagan

ว

เลขหมู่ QR151 .Y36 2543 ฉ.2

Order Key 28852

Bib Key 177679 ✓

1 1 ต.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Microbiology

Prince of Songkla University

2543

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตเซลล์ยีสต์จากน้ำมันปาล์มดิบ

ผู้เขียน นางสาวขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ ดิสระ)

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

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ ดิสระ)

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

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)

..... กรรมการ
(ดร. สุกัญญา จันทะชุม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. นพรัตน์ บำรุงรักษ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตเซลล์ยีสต์จากน้ำมันปาล์มดิบ

ผู้เขียน นางสาวขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2543

หอสมุดกลาง อรรถกระวีสุนทร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยาเขตหาดใหญ่
ได้รับทาน
11 ก.ค. 2543
ลำดับ เล่ม พ.ศ.

บทคัดย่อ

จากการเก็บตัวอย่างดินและพืชบริเวณสวนปาล์มและโรงงานหีบน้ำมันปาล์ม คัดแยกยีสต์ที่สามารถใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ 51 สายพันธุ์ นำยีสต์ 21 สายพันธุ์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวเปรียบเทียบการเจริญและปริมาณโปรตีนในเซลล์กับยีสต์สายพันธุ์มาตรฐาน โดยเลี้ยงในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน คัดเลือกได้ยีสต์สายพันธุ์ Y47 ซึ่งเจริญดีที่สุดและให้โปรตีนมากที่สุด จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบ่งชี้ว่าเป็น *Candida* sp.

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร พบว่ายีสต์เจริญดีที่สุดเมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 6.0 และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท 0.4 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ยีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.072 ต่อชั่วโมง ได้เซลล์แห้ง 12.46 กรัมต่อลิตร มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 43.31 เปอร์เซ็นต์

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญในถังหมักที่มีอาหารบรรจุอยู่ 3.5 ลิตร พบว่า *Candida* sp. Y47 เจริญดีที่สุดเมื่อให้ความเร็วรอบของการกวนเท่ากับ 400 รอบต่อนาที ให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยไม่ควบคุมพีเอช ยีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.25 ต่อชั่วโมง ได้ปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 12.32 กรัมต่อลิตร มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 42 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 15 ชั่วโมง และยีสต์มีกรดอะมิโนจำเป็นทุกชนิดและมีปริมาณใกล้เคียงกับค่าที่ตั้งไว้ของ FAO ยกเว้นเมธไทโอนีนที่พบน้อยมาก

Thesis Title	Production of Yeast Cells from Crude Palm Oil
Author	Miss Kanitta Natthanonworagan
Major Program	Microbiology
Academic Year	2000

Abstract

Fifty-one yeast strains growing on crude palm-oil were isolated from soil and plant debris collected from oil-palm plantations and palm-oil mills. Of these strains 21 having single-cell morphology were grown in a medium containing 2 % crude palm-oil. Their growth and protein content were compared with properties of standard strains. It was found that strain Y47 gave the best results. This strain was identified as *Candida* sp.,based on its morphological and physiological characteristics.

The optimal growth conditions of *Candida* sp. Y47 using shake-flask cultures were investigated. The results showed that 2 % crude palm-oil and 0.4 % di-ammoniumhydrogenphosphate in a medium, initial pH 6.0, with 5 % inoculum and an agitation speed of 250 rpm at 35 $^{\circ}$C provided the maximal specific growth rate of 0.072 h^{-1} and the highest biomass of 12.46 g/l with 43.31 % of protein content after 72 h. of cultivation time.

When *Candida* sp. Y47 was cultivated during 15 h. in a fermentor with a working volume of 3.5 L the maximal specific growth rate of 0.25 h^{-1} and cell dry-weight of 12.32 g/l with a protein content of 42.72 % were obtained under an agitation speed of 400 rpm, an aeration rate of 1.5 vvm at 35 $^{\circ}$C without pH control. The biomass produced contained all essential amino acids although the amount of methionine was rather low.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือจากคณาจารย์หลายท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ ดิสระ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาตลอดในการทำวิจัย การค้นคว้าและเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่าง ๆ และช่วยตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ กรรมการผู้แทนภาควิชาจุลชีววิทยา และ ดร. สุกัญญา จันทะชุม กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ และแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้อง ๆ ที่ให้การอุปการะทุนการศึกษาและคอยเป็นกำลังใจตลอดมา

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ ตลอดจน พี่และน้องนักศึกษาปริญญาโทและปริญญาตรีทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือ คำแนะนำ และเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอมา

นอกจากนี้ใคร่ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มิได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์

ขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบาญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(10)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	29
2 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	30
วัสดุ	30
อุปกรณ์	31
วิธีการวิจัย	32
3 ผลและวิจารณ์	40
4 สรุป	79
บรรณานุกรม	81
ภาคผนวก	89
ประวัติผู้เขียน	124

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1.ปาล์มน้ำมัน : เนื้อที่ ผลผลิต ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ ราคาและมูลค่าของผลผลิตตามราคาที่เกษตรกรขายได้ ปีเพาะปลูก 2531 - 2540	4
2. กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันปาล์มดิบ	9
3. แร่ธาตุและสารเคมีบางชนิดในน้ำมันปาล์มดิบ	10
4. เปรียบเทียบองค์ประกอบของยีสต์เมื่อเจริญบนแหล่งอาหารต่างกัน	15
5. แหล่งอาหารที่ใช้ในการผลิตเซลล์โปรตีนและผลิตภัณฑ์อื่น	16
6. องค์ประกอบของกรดอะมิโนของยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ เปรียบเทียบกับของ FAO (หน่วย : กรัม / 100 กรัมโปรตีน)	27
7. ปริมาณเซลล์แห้งและปริมาณโปรตีนของเซลล์ของยีสต์ 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้	43
8. ชนิดและจำนวนของยีสต์ที่แยกได้จากดินและพืชบริเวณสวนปาล์มและโรงงานหีบน้ำมันปาล์ม	45
9. ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Candida* sp. Y47	47
10. เปรียบเทียบปริมาณเซลล์แห้งและปริมาณโปรตีนของ *Candida* sp. Y47 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน	51
11. เปรียบเทียบปริมาณเซลล์และปริมาณโปรตีนของเซลล์ของ *Candida* sp. Y47 ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม	67
12. องค์ประกอบของกรดอะมิโนของยีสต์ *Candida* sp. Y47 เมื่อเก็บเซลล์ที่เวลา 15 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับของ FAO และ *Candida* sp. สายพันธุ์อื่น ๆ (หน่วย : กรัม / 100 กรัมโปรตีน)	77
13. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่แยกได้ทั้ง 9 ชนิด	95
14. ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Candida* sp.	97
15. ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Rhodotorula* sp.	104

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
16. ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Pichia* sp.	105
17. ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Kloekera* sp.	106
18. ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Kluyveromyces* sp.	107
19. ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Hansenula* sp.	108
20. ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Schizosaccharomyces* sp.	109
21. ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Trichosporon* sp.	110
22. ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ Basidiomycetous yeast	111
23. ไดอะแกรมแสดงการบ่งชี้ชนิดของยีสต์ (Key to the genera) (Kreger-van Rij, 1984)	112

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1. แสดงขบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม	7
2. เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ที่แยกได้กับยีสต์สายพันธุ์มาตรฐานในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	42
3. แสดงลักษณะเซลล์ของ *Candida* sp. Y47 ที่เจริญบนอาหารแข็ง YM ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (กำลังขยาย 40 เท่า)	46
4. เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมแหล่งคาร์บอน คือ น้ำมันปาล์มดิบ น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ และน้ำตาลกลูโคส พีเอชเริ่มต้น 5.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	50
5. เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้น 5.5 เติมเชื้อเริ่มต้นปริมาณต่างกัน เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	54
6. เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้นต่างกัน ใช้เชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	54
7. เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้น 6.0 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 200 และ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	57

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
8. เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้น 6.0 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	57
9. เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบปริมาณต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้น 6.0 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	60
10. เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมแหล่งไนโตรเจน 0.4 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกัน 5 ชนิด พีเอชเริ่มต้น 6.0 มีน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง	60
11. เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทปริมาณต่าง ๆ พีเอชเริ่มต้น 6.0 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	63
12. เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท 0.4 เปอร์เซ็น เติมยีสต์สกัดปริมาณต่างกันในอาหาร พีเอชเริ่มต้น 6.0 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	63

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

13. การเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท 0.4 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 6.0 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง 66

14. เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp.Y47ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 6.0 ในถังหมักที่มีความเร็วรอบของการกวนต่างกัน ให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง 70

15. เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 6.0 ในถังหมักให้ความเร็วรอบของการกวน 400 รอบต่อนาที ให้อากาศปริมาณต่างกัน อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง 70

16. เปรียบเทียบผลของพีเอชต่อการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเหลวพีเอชเริ่มต้น 6.0 ความเร็วรอบของการกวน 400 รอบต่อนาที ให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง 75

17. การเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 6.0 ความเร็วรอบของการกวน 400 รอบต่อนาที ให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง 75

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

18. ปริมาณโปรตีนของยีสต์ *Candida* sp. Y47 เมื่อเจริญในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 6.0 ความเร็วรอบของการกวน 400 รอบต่อนาที ให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง 76
19. กราฟมาตรฐานแสดงปริมาณโปรตีน 94

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมันมีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Elaeis guineensis* มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกา ประเทศไทยเริ่มมีการปลูกปาล์มน้ำมันเพื่อการค้าเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2511 ที่จังหวัดกระบี่และสตูล ต่อมาได้มีการปลูกปาล์มน้ำมันอย่างแพร่หลายในภาคใต้เช่น ตรัง สุราษฎร์ธานี สงขลา ชุมพร เป็นต้น (ธีรพงศ์ ศันสนียวรรธน์, 2532) ปาล์มน้ำมันจึงกลายเป็นพืชยืนต้นที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจทางภาคใต้ของประเทศ ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันที่ให้น้ำมันสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น ๆ เมื่อเทียบต่อหน่วยพื้นที่ (ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และคณะ, 2540) ในช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมามีการขยายพื้นที่เพาะปลูกปาล์มน้ำมันอย่างรวดเร็ว จากรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2540) พบว่าปี 2531 ประเทศไทยมีเนื้อที่เพาะปลูกปาล์มน้ำมันเพียง 682,000 ไร่ เป็นเนื้อที่ให้ผลผลิต 517,000 ไร่ และให้ผลผลิต 885,000 ตัน และในปี 2539 มีเนื้อที่ปลูกปาล์มที่ให้ผลผลิต 1,023,000 ไร่ ให้ผลผลิต 2,688,000 ตัน จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันสูงขึ้นเรื่อย ๆ และมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มขึ้นอีก

น้ำมันปาล์มมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคาร์บอนในปริมาณมากโดยเฉลี่ยพบว่าน้ำมันปาล์มประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และ ไนโตรเจน 76.40, 11.73 และ 0.04 เปอร์เซ็นต์โดยประมาณ (Koh *et al.*, 1983) สามารถจะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยเฉพาะมีงานวิจัยหลายฉบับพบว่ายีสต์มีความสามารถในการใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งให้พลังงานและเจริญเติบโต (Koh *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1993)

ตามปกติภายในเซลล์ยีสต์มีส่วนประกอบของสาร วิตามิน และ เกลือแร่หลายชนิดเป็นปริมาณมากซึ่งเหมาะสมที่จะใช้เป็นอาหารของสัตว์ได้ โดยเฉพาะโปรตีนเฉลี่ยแล้วในเซลล์ประกอบด้วยโปรตีนทั้งหมดประมาณ 45 – 57 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Reed, 1981) คุณค่าทางอาหารยังขึ้นกับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนหลายชนิดโดยเฉพาะกรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ เมธไทโอนีน ไลซีน และ อาร์จินีน กรดอะมิโนเหล่านี้พบในพืชเป็นปริมาณต่ำ โปรตีนเซลล์เดียวจากยีสต์จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญ รวมทั้งการเลี้ยงยีสต์ไม่ยุ่งยาก เก็บเกี่ยวเซลล์ง่าย ยีสต์สามารถเจริญได้ในแหล่งอาหารที่มีพีเอชเป็นกรดและยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบหลายชนิดในการเจริญ เช่น กากน้ำตาล น้ำเวย์ (whey) เมทธานอล และ น้ำมันปาล์ม จึงเห็นได้ว่าการใช้น้ำมันปาล์มเป็นอาหารเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวเป็นสิ่งที่น่าสนใจเพราะน้ำมันปาล์มสามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่นและมีในทุกฤดูกาล

ประเทศเขตร้อนหลายประเทศที่ผลิตปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจทำให้ปริมาณน้ำมันปาล์มเพิ่มสูงขึ้นเป็นเหตุให้ราคาน้ำมันปาล์มค่อยๆลดลง ในหลายประเทศได้หาทางแก้ไขปัญหาอย่างจริงจังเกี่ยวกับผลผลิตน้ำมันปาล์มล้นตลาด เช่น ประเทศมาเลเซียได้ใช้จุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนผลิตเซลล์จุลินทรีย์ (single cell protein) เป็นอาหารเสริมโปรตีนสำหรับสัตว์ (Koh *et al.*,1983) หรือผลิตสารลดแรงตึงผิว (biosurfactant) (Lee *et al.*,1993)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกยีสต์ที่เจริญได้ในน้ำมันปาล์มดิบเพื่อนำมาใช้ผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว โดยใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนและศึกษาถึงสภาพที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว อันจะเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่า (Value added) ของน้ำมันปาล์มดิบจากของที่มีราคาถูกเป็นเซลล์ของยีสต์ที่มีโปรตีนสูง ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นอาหารเสริมโปรตีนให้กับสัตว์

การตรวจเอกสาร

1. ปาล์มน้ำมัน

1.1 พื้นที่ปลูกและปริมาณการผลิต

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่จัดอยู่ในตระกูลปาล์มเช่นเดียวกับ อินทผาลัม จาก มะพร้าว และ ตาลโตนด ซึ่งมีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกา พันธุ์ของปาล์มน้ำมันที่ปลูกในเชิงเศรษฐกิจปัจจุบันมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Elaeis guineensis* มีการนำเข้ามาปลูกในทวีปเอเชียเป็นครั้งแรกที่ประเทศอินโดนีเซียราวปี พ.ศ. 2391 ปรากฏว่าให้ผลผลิตสูง ผลโตเปลือกหนา จึงได้มีการปลูกในเชิงการค้าเมื่อปี พ.ศ. 2454 ต่อมาจึงมีการนำเข้าไปปลูกในประเทศมาเลเซียจนกระทั่งมาเลเซียกลายเป็นผู้ผลิตและส่งออกน้ำมันปาล์มรายใหญ่ที่สุดของโลกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2508 (Jaaffar, 1994)เป็นต้นมา สำหรับในประเทศไทยพบว่าครั้งแรกมีผู้นำปาล์มน้ำมันเข้ามาปลูกที่จังหวัดสงขลาก่อนสงครามโลกครั้งที่ 2 และมีการปลูกปาล์มน้ำมันในเชิงการค้าเป็นครั้งแรกในปี 2511 ที่จังหวัดกระบี่และสตูลโดยนำพันธุ์มาจากประเทศมาเลเซียทั้งหมด ต่อมาได้มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายในอีกหลายจังหวัดได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี ภูเก็ต สงขลา สตูล และชุมพร

จากสถิติที่รวบรวมโดยสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์รายงานว่าการผลิตน้ำมันปาล์มมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ปี 2536 มีจำนวน 1,827,000 ตัน ปี 2537 มีจำนวน 1,923,000 ตัน ปี 2538 มีจำนวน 2,255,000 ตัน ปี 2539 มีจำนวน 2,688,000 ตัน (ตาราง 1) และปี 2540 มีจำนวน 2,777,683 ตัน (ชูชาติ อุรัมภรณ์ และนพดล พีระเสถียร, 2540) ความต้องการใช้น้ำมันปาล์มดิบของโรงกลั่นน้ำมันปาล์มและอุตสาหกรรมอื่นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามการเติบโตของเศรษฐกิจและประชากร อีกทั้งประโยชน์การใช้กว้างขวางจึงเกิดความต้องการสูงขึ้นและมีการใช้ทดแทนน้ำมันพืชชนิดอื่น เป็นเหตุให้มีการเพิ่มพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันมากขึ้นและได้ระบุไว้ในแผนพัฒนา ฯ ฉบับที่ 8 (2540 - 2544) ในการพัฒนาปาล์มน้ำมันให้มีการเพิ่มพื้นที่การผลิต (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2539)

ตาราง 1 ปาล์มน้ำมัน : เนื้อที่ ผลผลิต ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ ราคาและมูลค่าของผลผลิตตามราคาที่เกษตรกรขายได้ ปีเพาะปลูก 2531 - 2541

พ.ศ.	เนื้อที่ปลูก (พันไร่)	เนื้อที่ให้ผลผลิต (พันไร่)	ผลผลิต (พันตัน)	ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ (กก.)	ราคาที่เกษตรกรขายได้ (บาทต่อกก.)	มูลค่าของผลผลิตตามราคาที่เกษตรกรขายได้ (ล้านบาท)
2531	682	517	885	1,711	2.86	2,531.1
2532	804	568	1,098	1,933	1.85	2,031.3
2533	875	600	1,192	1,986	1.89	2,252.9
2534	915	645	1,316	2,040	1.77	2,329.3
2535	958	675	1,352	2,002	1.76	2,379.5
2536	968	833	1,827	2,193	1.70	3,105.9
2537	1,014	870	1,923	2,210	1.82	3,499.9
2538	1,051	919	2,255	2,455	2.05	4,622.8
2539	-	1,023	2,688	2,628	2.02	5,429.8
2540	-	1,097	2,681	2,445	2.17	5,817.8

หมายเหตุ - : ไม่มีข้อมูล

ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2541)

เห็นได้ว่าในช่วงที่ผ่านมามีการเพิ่มพื้นที่ผลิตปาล์มน้ำมันอย่างรวดเร็วผลผลิตน้ำมันปาล์มจึงเพิ่มปริมาณมากขึ้น ทั้งปาล์มน้ำมันเป็นพืชยืนต้นที่ให้น้ำมันสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น ๆ เมื่อเทียบต่อหน่วยพื้นที่ โดย ชัยรัตน์ นิลนนท์ (2538) กล่าวว่าปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีความสามารถสูงในการเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นน้ำมันพืช ในสภาพภูมิอากาศ ดิน และการจัดการที่เหมาะสม ปาล์มน้ำมันสามารถให้ผลผลิตเป็น

น้ำมันได้มากกว่า 1.28 ตันต่อไร่ต่อปี ในขณะที่เมล็ดฝ้าย, ถั่วเหลือง, ถั่วลิสง และมะพร้าว ให้ผลผลิตไม่ถึง 1 ตันต่อไร่ต่อปี ผลผลิตปาล์มน้ำมันจึงมีแนวโน้มมากขึ้นทุก ๆ ปี

1.2 ขบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม (Processing)

ทะลายปาล์มสด (Fresh Fruit Bunch - FFB) เป็นผลผลิตจากต้นปาล์มจะประกอบด้วยทะลาย (bunch) และผลปาล์ม (fruit) ภายในผลจะประกอบด้วยส่วนของชั้นเปลือก (mesocarp) และจากชั้นเปลือกจะมีกะลา (shell) หุ้มเมล็ดในอยู่ (Hartley, 1977) หลังจากผลผลิตทะลายปาล์มสดถูกเก็บเกี่ยวออกจากต้นแล้วจำเป็นที่จะต้องรีบส่งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทันที เพราะคุณภาพของน้ำมันจะลดลงอย่างรวดเร็วภายหลังการเก็บเกี่ยว ทะลายปาล์มสดถูกส่งเข้าสู่โรงงานผ่านขบวนการต่าง ๆ(ภาพประกอบ 1) พอสรุปได้ดังนี้ (ดัดแปลงจาก พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2523 และ Ma, 1994)

1. ทะลายปาล์มสดถูกส่งเข้าไปยังหม้ออบไอน้ำ (sterilizer) ใช้ความดันไอน้ำ 3 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตรและอุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาประมาณ 75 - 90 นาที

2. ทะลายปาล์มที่อบแล้วถูกส่งเข้าเครื่องลอก (stripper) เพื่อแยกผลปาล์มออกจากทะลาย ผลของปาล์มน้ำมันที่ถูกปลิดออกจากทะลายแล้วจะถูกส่งไปยังเครื่องย่อยบด (digester) ส่วนทะลายเปล่าถูกส่งไปยังเตาเผาเพื่อทำปุ๋ยต่อไป ปริมาณทะลายเปล่าของปาล์มน้ำมันโดยทั่วไปมีประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

3. ผลของปาล์มน้ำมันถูกบีบภายใต้สภาพที่เป็นความดันร้อน ซึ่งเครื่องบีบเกลียวอัด (screw press) จะทำหน้าที่บีบน้ำมันออกจากเปลือกออก ในระยะนี้จะมีเมล็ดใน เปลือก และน้ำมันปาล์มดิบ (crude palm oil) เกิดขึ้น ส่วนน้ำมันเมล็ดใน (kernel oil) จะถูกบีบออกจากเมล็ดในโดยผ่านขบวนการต่าง ๆ ดังนี้

(1) เมล็ดในจะถูกส่งเข้าเครื่องกะเทาะเมล็ด(nut cracker)เพื่อแยกชั้นกะลา (shell) ออกจากส่วนของเนื้อใน (kernel)

(2) กะลาเปล่าจะถูกแยกออกจากส่วนของเนื้อในโดยเครื่องแยก ต่อจากนั้นกะลาเปล่าจะถูกส่งไปยังเตาเผาแล้วใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับหม้อต้มน้ำ (boiler)

(3) เนื้อเมล็ดในปาล์ม (kernel) จะถูกส่งไปยังเครื่องทำให้เนื้อแห้ง (kernel dryer) แล้วหลังจากนั้นจะถูกส่งไปเก็บ (storage)

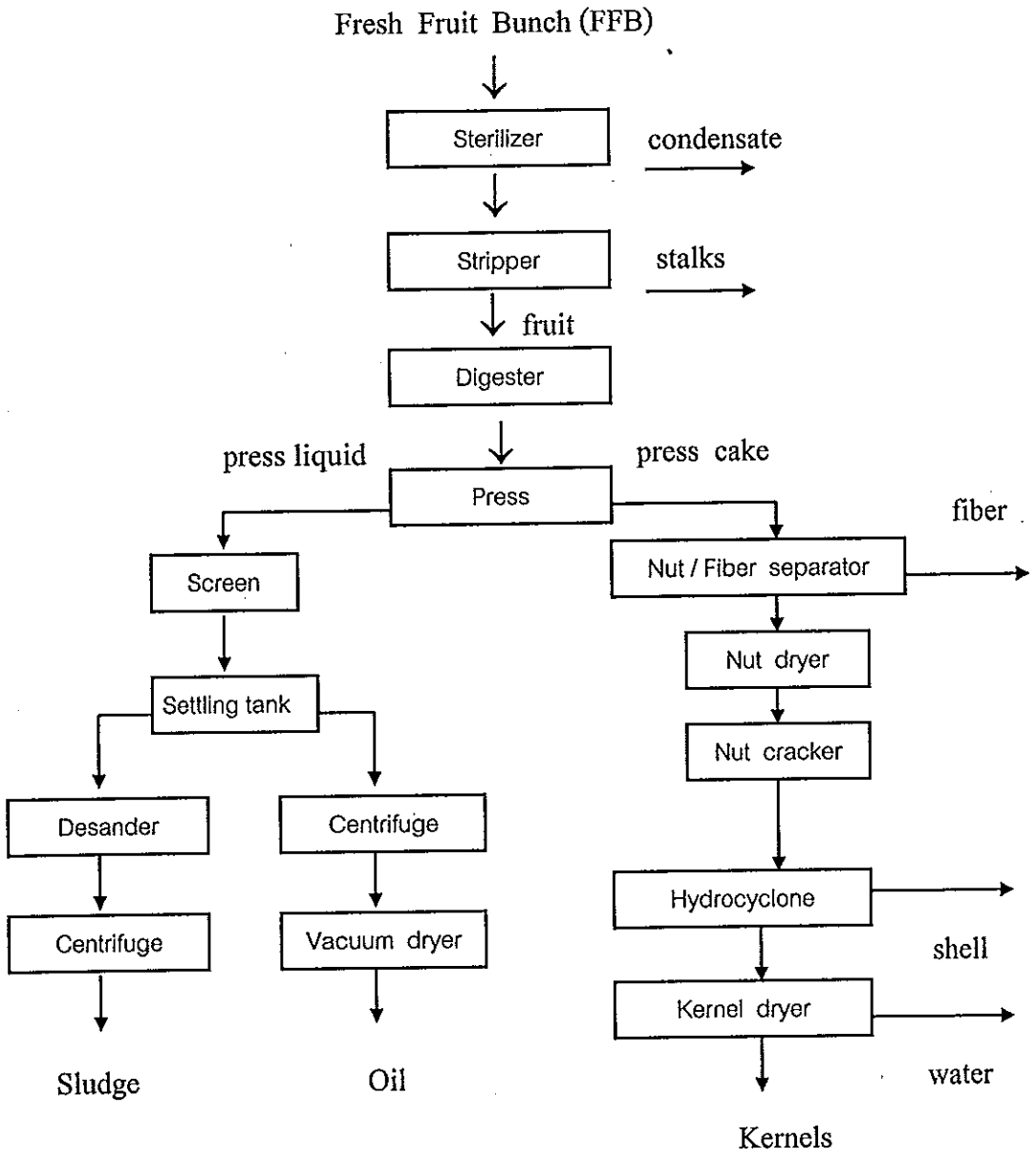
4. น้ำมันดิบถูกส่งเข้าเครื่องกรองที่เรียกว่าตระแกรงกรองน้ำมันและจากนั้นจะถูกส่งต่อไปยังถังพักน้ำมันดิบ

5. น้ำมันดิบถูกส่งไปยังถังแยกชั้นน้ำมัน(carification)ซึ่งในน้ำมันดิบจะมีส่วนผสมของน้ำมันปาล์ม 35 - 45 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ 45 - 55 เปอร์เซ็นต์โดยประมาณ ถังแยกชั้นน้ำมันนี้จะทำหน้าที่แยกน้ำมันออกจากขี้น้ำมันและสิ่งสกปรก

6.น้ำมันดิบที่ถูกแยกออกในถังแยกชั้นน้ำมันจะถูกส่งไปยังเครื่องทำให้บริสุทธิ์ เครื่องทำให้บริสุทธิ์นี้จะทำหน้าที่แยกน้ำมันออกจากสิ่งสกปรกและสิ่งเจือปนต่าง ๆ น้ำมันและความชื้นจะถูกส่งไปยังขบวนการต่อไป ส่วนสิ่งสกปรกและสิ่งเจือปนจะถูกส่งไปยังบ่อน้ำเสียเพื่อระบายทิ้ง

7. น้ำมันบริสุทธิ์และมีความชื้นถูกส่งไปยังเครื่องกำจัดความชื้น จนมีระดับความชื้นต่ำเท่ากับความต้องการ ซึ่งมาตรฐานน้ำมันปาล์มกำหนดให้มีความชื้นและ สิ่งสกปรกได้ไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์

น้ำมันบริสุทธิ์ที่ไม่มีความชื้นจะถูกส่งไปยังถังเก็บและจำหน่ายต่อไป



ภาพประกอบ 1 แสดงขบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม

ที่มา : Ma (1994)

1.3 องค์ประกอบในน้ำมันปาล์ม

น้ำมันที่ได้จากผลปาล์มมี 2 ส่วน น้ำมันส่วนที่ได้จากชั้นเปลือกเรียกว่า น้ำมันปาล์ม (palm oil) มีน้ำมันประมาณ 45 - 55 เปอร์เซ็นต์ ภายในเมล็ดในจะมีน้ำมันอีกชนิดหนึ่งเรียกว่า น้ำมันเนื้อเมล็ดใน (kernel oil) น้ำมันทั้ง 2 ชนิด มีส่วนประกอบทางเคมีแตกต่างกัน (Hartley, 1977) ปริมาณน้ำมันจากเปลือกเป็นส่วนที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงและเป็นส่วนที่ใช้ผลิตน้ำมันปาล์มดิบ (crude palm oil)

ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำมันปาล์มกับน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ที่รับประทานได้ (edible oil) เป็นสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเป็นสารเอสเตอร์ มีโมเลกุลประกอบด้วย กลีเซอรอล และกรดไขมัน เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเคมีที่แข็งแรง (Maclellan, 1983) เมื่อผลปาล์มสุกจะมีเอนไซม์ไลเปสจะเปลี่ยนสารกลีเซอไรด์เป็นกรดไขมันอิสระ (นพรัตน์ บำรุงรักษ์, 2534) ผลปาล์มที่มีกรดไขมันอิสระสูงจะทำให้คุณภาพน้ำมันปาล์มตกต่ำ น้ำมันปาล์มดิบแยกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนใสและส่วนที่เป็นไข โดยทั่วไปมีจุดหลอมเหลวประมาณ 40 องศาเซลเซียส และจุดแข็งตัวระหว่าง 25 – 50 องศาเซลเซียสขึ้นกับชนิดและปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมัน (Pike, 1980) น้ำมันปาล์มดิบที่มีลักษณะสีแดงส้มเป็นส่วนของคาโรทีนอยด์ (carotenoid) ประกอบด้วยเม็ดสีที่เรียกว่า คาโรทีน (carotene) ไลโคปีน (lycopine) และซินโตฟิล (xinthophyll) (Hui, 1996) น้ำมันปาล์มดิบมีส่วนประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในปริมาณที่ใกล้เคียงกันโดยตาราง 2 แสดงชนิดและปริมาณของกรดไขมันในน้ำมันปาล์มดิบ เห็นได้ว่ากรดไขมันอิ่มตัวที่มีปริมาณมากที่สุดในน้ำมันปาล์มคือ กรดปาล์มเมติกมีอยู่ 44.02 เปอร์เซ็นต์ และกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบมากได้แก่กรดโอเลอิกมีอยู่ 39.15 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบกรดลิโนลีอิกมีอยู่ 10.12 เปอร์เซ็นต์และกรดลิโนลีนิกมีเล็กน้อยประมาณ 0.37 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งองค์ประกอบของกรดไขมันอาจผันแปรบ้างขึ้นกับพันธุ์ปาล์ม ดินฟ้าอากาศ และสถานที่เพาะปลูก (ศักดิ์ศิลป์ โชติสกุล, 2541) ทั้งนี้น้ำมันปาล์มดิบยังมีคุณค่าเป็นทั้งแหล่งแร่ธาตุและวิตามินโดยประกอบด้วย คาโรทีนอยด์ โทโกเฟอรอล(tocopherol) เหล็ก ฟอสฟอรัส และ ทองแดง (ตาราง 3) รวมทั้งน้ำมันปาล์มยังมีวิตามินเอและอีสูงกว่าน้ำมันชนิดอื่น ๆ

ตาราง 2 กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันปาล์มดิบ

	ช่วง	ค่าเฉลี่ย
กรดไขมันอิ่มตัว (%)		
Lauric acid (C 12 : 0)	0.1 - 1.0	0.23
Myristic acid (C 14 : 0)	0.9 - 1.5	1.09
Palmitic acid (C 16 : 0)	41.8 - 46.8	44.02
Stearic acid (C 18 : 0)	4.2 - 5.1	4.54
Arachinidic acid (C 20 : 0)	0.2 - 0.7	0.38
Total Saturated fatty acid		50.26
กรดไขมันไม่อิ่มตัว (%)		
Oleic acid (C 18 : 1)	37.30 - 40.80	39.15
Linoleic acid (C 18 : 2)	9.10 - 11.00	10.12
Linolenic acid (C 18 : 3)	0 - 0.6	00.37
Total Unsaturated fatty acid		49.64

ที่มา : ดัดแปลงจาก Maclellan (1983)

ตาราง 3 แร่ธาตุและสารเคมีบางชนิดในน้ำมันปาล์มดิบ

ส่วนประกอบ	ผลปาล์มสดที่โตเต็มที่	มาตรฐานของน้ำมันปาล์ม
ฟอสฟอรัส (ppm)	2 – 3	20 - 30
เหล็ก (mg/kg)	0.1 - 0.3	5 – 10
ทองแดง (mg/kg)	0.01	0.05
โทโกเฟอรอล (ppm)	800	600 - 800
คาโรทีน (ppm)	550	550

ที่มา : ดัดแปลงจาก Hui (1996)

เนื่องจากน้ำมันปาล์มประกอบด้วยกรดไขมันซึ่งเป็นสารพวกคาร์บอนเป็นองค์ประกอบจำนวนมากสามารถใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ (Koh *et al.*, 1983 ; Lee *et al.*, 1993) แต่การจะใช้น้ำมันโมเลกุลของน้ำมันต้องถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทำให้ได้กรดไขมัน ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำมันปาล์มได้ต้องมีเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากยีสต์บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยน้ำมันแล้วได้กรดไขมันอิสระมาใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ (Papaparaskevas *et al.*, 1992) จึงเป็นส่วนดีที่จะนำน้ำมันปาล์มมาเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว

ปัจจุบันน้ำมันปาล์มได้รับความนิยมนำมาใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ ทั้งการอุปโภคและบริโภคทำให้มีความต้องการน้ำมันปาล์มสูงขึ้น จึงมีการขยายพื้นที่ปลูกมากขึ้นทำให้ผลผลิตน้ำมันปาล์มผลิตเข้าสู่ตลาดมาก ปัญหาของราคาน้ำมันปาล์มมีความผันแปรสูงจึงตามมา เนื่องจากราคาของน้ำมันปาล์มไม่ได้ขึ้นกับผลผลิตภายในประเทศเพียงอย่างเดียวแต่ได้รับผลกระทบมาจากปริมาณการผลิตและความต้องการใช้ในตลาดโลกส่งผลให้ราคาน้ำมันปาล์มไม่แน่นอน (มนัส ชัยสวัสดิ์ และคณะ, 2531)

จากรายงานสรุปข่าวธุรกิจปี 2541 ปาล์มน้ำมันของไทยจะได้รับผลกระทบอย่างรุนแรงจากการจัดตั้งเขตการค้าเสรีอาเซียน (AFTA) โดยมาเลเซียได้เสนอให้พืชน้ำมันอยู่ในรายการที่ต้องลดภาษีเป็นการเร่งด่วน แต่รัฐบาลไทยได้ขอให้น้ำมันปาล์มเป็นสินค้าในกลุ่มขอสงวนสิทธิ์ชั่วคราว (temporary exclusion list) (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2539) คือไม่เร่งลดภาษีภายในระยะเวลา 8 ปี (2536 - 2543) เนื่องจากไทยยังไม่สามารถแข่งขันทางด้านต้นทุนการผลิตกับประเทศในกลุ่มอาเซียนได้ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2541) จากการที่รัฐบาลได้ให้ปาล์มน้ำมันเป็นสินค้าในกลุ่มขอสงวนสิทธิ์ชั่วคราวซึ่งเวลานี้ครบกำหนดที่ไทยจะต้องเปิดเขตการค้าเสรีอาเซียนแล้ว ปัญหาของราคาน้ำมันปาล์มจะตามมาเพราะไทยไม่สามารถแข่งขันทางด้านต้นทุนการผลิตกับประเทศในกลุ่มอาเซียนโดยเฉพาะประเทศมาเลเซีย

การค้นคว้าวิจัยเพื่อทำให้น้ำมันปาล์มพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์ใหม่ โดยนำน้ำมันปาล์มดิบมาเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อจะได้เป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณค่าและเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่ปาล์มน้ำมันในอนาคต

2. โปรตีนเซลล์เดียว (Single Cell Protein)

2.1 ความสำคัญ

โปรตีนเซลล์เดียวเริ่มได้รับความสนใจเมื่อองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จัดตั้งหน่วยงานหนึ่งเพื่อหาแหล่งโปรตีนแหล่งใหม่สำหรับมนุษย์ ซึ่งจะต้องมีความปลอดภัยและเหมาะสมสำหรับเป็นอาหารของมนุษย์ หรือเป็นอาหารสัตว์ หน่วยงานนี้คือ Protein Advisory Group โดยจัดตั้งเมื่อ ค.ศ. 1955 (ดวงพร คันธโชติ, 2530) สาเหตุที่โปรตีนเซลล์เดียวเป็นที่สนใจเพราะมีการขาดแคลนอาหารโปรตีน ขาดแคลนวัตถุดิบที่จะใช้ผลิตโปรตีนจากเนื้อสัตว์ ปัญหาการกำจัดของเหลือใช้ การใช้โปรตีนเซลล์เดียวจึงเป็นหนทางหนึ่งที่จะใช้แก้ปัญหาดังกล่าวได้ โดยเฉพาะปัจจุบันอาหารประเภทโปรตีนเช่น เนื้อสัตว์ และพวกปลาต่างๆ มีราคาสูงขึ้น เนื่องจากสัตว์ที่ให้โปรตีนเหล่านี้ล้วนต้องใช้ระยะเวลานานในการเลี้ยง และใช้ค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงสูง ตลอดจนปริมาณการจับสัตว์น้ำมีปริมาณลดลง สัตว์ที่ให้โปรตีนเหล่านี้มีปริมาณเท่าเดิมและมีแนวโน้มจะลดลงเมื่อเทียบกับประชากรมนุษย์ที่มีเพิ่มมากขึ้นทุกปีดังนั้นความ

ต้องการโปรตีนจึงมีสูงขึ้นจึงต้องพยายามหาแหล่งโปรตีนแหล่งใหม่ที่ใช้ระยะเวลาในการผลิตไม่นาน ใช้พื้นที่ในการผลิตน้อย ต้นทุนการผลิตต่ำ แหล่งโปรตีนเหล่านี้ได้แก่สิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว เช่น สาหร่ายเซลล์เดียว ยีสต์ รา และแบคทีเรีย เป็นต้น

ทั้งนี้ Gray (1962) ได้สรุปว่าจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบเหนือกว่าพืชและสัตว์ซึ่งเป็นแหล่งอาหารของมนุษย์และสัตว์ที่มีศักยภาพ คือ

1. ทั้งจุลินทรีย์และพืชสามารถผลิตโปรตีนได้จากสารอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่พืชต้องการฤดูกาลเพื่อการเจริญ

2. จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว (submerged culture) ซึ่งประหยัดเนื้อที่มากกว่าการเลี้ยงสัตว์ หรือปลูกพืช

3. จุลินทรีย์สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วและใช้ระยะเวลาในการเจริญสั้น

4. จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบที่เป็นสารประกอบคาร์บอนให้เป็นเนื้อเยื่อภายในเซลล์ และเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบที่เป็นสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนให้เป็นโปรตีนได้

ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวต้องการเซลล์ที่ประกอบด้วยโปรตีนสูง ส่วนคาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก และไขมันในปริมาณต่ำ และสามารถแข่งขันกับโปรตีนจากพืชหรือปลาป่นได้ มีกลิ่นรสดีและที่สำคัญคือมีไลซีน เมธไทโอนีน ทริปโตเฟนสูง ซึ่งโปรตีนจากพืชมักขาดกรดอะมิโนเหล่านี้

2.2 สมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมโปรตีน

วราวุฒิ ครูส่ง (2529) กล่าวถึงสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมโปรตีนดังนี้

1. เจริญได้เร็วในอาหารที่มีราคาถูก ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หาได้ในแหล่งนั้น ๆ

2. เจริญได้ในอาหารที่มีส่วนประกอบแบบง่าย ๆ มีความต้องการวิตามินหรือสารที่ช่วยในการเจริญต่าง ๆ น้อยหรือไม่ต้องการเลย

3. คงลักษณะทางพันธุกรรมได้ดีไม่กลายพันธุ์ง่าย เมื่อเลี้ยงติดต่อกันเป็นเวลานาน

4. แยกและเก็บเกี่ยวเซลล์ง่าย

5. มีความต้านทานต่อการปะปนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ

6. ทราบคุณสมบัติทางพันธุกรรม และทางสรีรวิทยา และสามารถปรับปรุงทางด้านพันธุกรรมได้

7. สามารถใช้แหล่งพลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

8. หลังจากผ่านกระบวนการผลิตแล้วมีวัสดุเหลือทิ้งน้อยหรือไม่มีเลย

9. ไม่เป็นพิษและทำให้เกิดอาการภูมิแพ้

10. ให้ปริมาณโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตสูง

11. เก็บรักษาง่าย เช่น โดยการทำให้แห้ง

ตามลักษณะที่บรรยายมายีสต์สามารถใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียวได้อย่างดี คุณสมบัติของยีสต์ที่เหมาะสมในการนำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดียว มีดังนี้ (Kuhad *et al.*, 1997)

1. ยีสต์มีกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในปริมาณต่ำ

2. ยีสต์เป็นแหล่งของ วิตามินบี วิตามินอี และโปรวิตามินดี ได้อย่างดี

3. ยีสต์มีกรดนิวคลีอิกเป็นองค์ประกอบในปริมาณต่ำกว่าแบคทีเรีย

4. ยีสต์มีเซลล์ขนาดใหญ่ทำให้เก็บเกี่ยวเซลล์ง่าย

5. ยีสต์มีความเป็นพิษ (toxic) ต่ำกว่าแบคทีเรีย

6. ยีสต์ได้รับการยอมรับให้เป็นแหล่งโปรตีนโดยผู้บริโภคได้มากกว่าจุลินทรีย์อื่น ๆ

ส่วนสำคัญของการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวในระดับอุตสาหกรรมคือ ต้นทุนการผลิต พบว่าประมาณ 30 - 50 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนทั้งหมดเป็นเงินที่ใช้ลงทุนซื้อวัตถุดิบ ดังนั้นวัตถุดิบที่ใช้ต้องมีราคาถูก แต่เดิมแหล่งคาร์บอนที่ใช้สำหรับผลิตโปรตีนเซลล์เดียวมีส่วนประกอบของ คาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการเกษตรกรรมหรืออุตสาหกรรม ต่อมามีการค้นพบว่าสามารถใช้สารพวกปิโตรเลียมเป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้ เช่น gas/oil, n-paraffins, synthetic methanol และ ethanol จนกระทั่งปี 1970 ต้องหาแหล่งอาหารแหล่งใหม่เนื่องจากเกิดวิกฤตการณ์น้ำมันมีผลให้วัตถุดิบที่เป็นปิโตรเคมีมีราคาแพงขึ้น แหล่งอาหารแหล่งใหม่ที่พบได้แก่ น้ำตาล แป้ง เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส น้ำมันจากเมล็ดพืช หรือของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม

ต่าง ๆ ซึ่งหาได้ง่าย มีปริมาณมากและราคาต่ำ จากที่มีการกล่าวถึงน้ำมันปาล์มพบว่าน้ำมันปาล์มเริ่มมีการผลิตมากขึ้นซึ่งในอนาคตคาดว่าจะเพิ่มมากขึ้นอีกทั้งน้ำมันปาล์มยังเหมาะที่จะนำมาเป็นแหล่งอาหารของยีสต์เพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวดังนี้ (Koh *et al.*, 1983)

1. เป็นแหล่งอาหารแหล่งใหม่สำหรับจุลินทรีย์เพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว
2. หาได้ง่ายในประเทศเขตร้อน โดยเฉพาะทางภาคใต้ของประเทศไทยถือได้ว่าเป็นพืชที่เริ่มมีการปลูกกันมากขึ้น
3. มีส่วนประกอบทางเคมีเป็นพวกคาร์บอนสูงทำให้เป็นแหล่งคาร์บอนได้อย่างดี
4. น้ำมันปาล์มไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์
5. สามารถทำหน้าที่เป็นสารกำจัดฟอง
6. จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้ได้

เนื่องจากน้ำมันปาล์มมีประโยชน์โดยเฉพาะเมื่อนำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดียว พบว่าสามารถผลิตโปรตีนเซลล์เดียวที่มีคุณค่าทางอาหารใกล้เคียงกับโปรตีนเซลล์เดียวที่เจริญโดยใช้วัตถุดิบอื่น ๆ เช่น กากน้ำตาล และ sulphite liquor ดังตาราง 4 การใช้น้ำมันปาล์มดิบมาเป็นแหล่งอาหารเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ

ตาราง 4 เปรียบเทียบองค์ประกอบของยีสต์เมื่อเจริญบนแหล่งอาหารต่างกัน

องค์ประกอบ	*S. cerevisiae* ในกากน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	*Candida utilis* ใน sulphite liquor (เปอร์เซ็นต์)	*Torulopsis candida* ในน้ำมันปาล์มดิบ (เปอร์เซ็นต์)
โปรตีน	50	55	45.4
ไขมัน	6	5	3.4
เถ้า	7	8	6.8
ความชื้น	5	6	-

ที่มา : ดัดแปลงจาก ดวงพร คันธโชติ (2530) และ Koh และคณะ (1983)

2.3 ปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของยีสต์

2.3.1 แหล่งคาร์บอน แหล่งคาร์บอนที่เป็นสารอินทรีย์ได้รับความนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตร เช่น แป้งจากข้าวชนิดต่าง ๆ ข้าวโพด มันสำปะหลัง มันฝรั่ง และของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร เช่น กากน้ำตาลเป็นส่วนที่เหลือจากการทำน้ำตาลจากอ้อยหรือหัวบีท ส่วนน้ำเวย์ (whey) ซึ่งมีแลคโตสจากน้ำนม เป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมการทำเนยแข็ง ส่วนวัสดุชนิดต่าง ๆ จากพืช เช่น กากถั่วเหลือง กากเมล็ดฝ้าย กากข้าวโพด น้ำมันมะกอก และของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมีราคาถูกทั้งสิ้น นอกจากนี้น้ำมันน้ำมันปาล์มสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังแสดงในตาราง 5 ซึ่งมีการใช้น้ำมันพืชเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวน้ำมันพืชที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงยีสต์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนโดยเฉพาะเป็นแหล่งของกรดโอลีอิก กรดลิโนลีอิก และกรดลิโนลีนิก และสามารถทำหน้าที่เป็นสารกำจัดฟองได้ (สมใจ ศิริโภค, 2540)

ตาราง 5 แหล่งอาหารที่ใช้ในการผลิตเซลล์โปรตีนและผลิตภัณฑ์อื่น

Material	Availability	Pretreatment	Yield (g/g substrate)	Use
Saccharides				
Molasses	Seasonal	Simple	0.25 - 0.33	Animal feed
Sulfite waste	Year - round	Simple	0.008	Animal feed
Potato waste	Seasonal	None	0.5	Animal feed
Polysaccharides				
Starch	Seasonal	Hydrolysis	0.5 - 0.6	Food
Cellulose	Year - round	Hydrolysis	0.03	Fuel/Animal feed
Alcohols				
Methanol	Year - round	None	0.25 - 0.5	Fuel/Animal feed
Ethanol	Year - round	None	0.6 - 0.7	Fuel/Animal feed
Oils				
Palm oil	Year - round	None	1.01	Animal feed
Sunflower oil	Seasonal	None	0.14 - 0.35	Animal feed

ที่มา : ดัดแปลงจาก Deshpande และ Daniels (1995), Lee และคณะ (1993) และ Lee (1996)

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปในการสังเคราะห์เซลล์ยีสต์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในการสังเคราะห์เซลล์ยีสต์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50 - 55 เปอร์เซ็นต์ (สมใจ ศิริโภค, 2540) ได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของยีสต์ ได้แก่

Levine และ Cooney (1973) ศึกษาการเจริญของ *Hansenula polymorpha* ในอาหารเหลวที่มีเมทธานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ

0.20 ต่อชั่วโมงและเซลล์มีโปรตีน 46 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สามารถนำไปเป็นอาหารเลี้ยงหนูได้โดยไม่เป็นพิษ

Yeeh (1996) ศึกษาการเจริญของ *Rhodotorula* sp. Y38 ในอาหารที่เติมเอทธานอล กรดอะซิติก หรือ อะเซทตอลดีไฮด์ โดยเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture) พบว่า *Rhodotorula* sp. Y38 สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่เติมเอทธานอล 1.0 เปอร์เซ็นต์ ได้มวลชีวภาพ 64 กรัมต่อ 100 กรัมเอทธานอลและให้โปรตีน 52 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

อนุเทพ ภาสุระ และปราโมทย์ ศิริโรจน์ (2534) ศึกษาการเจริญของ *C. tropicalis* สายพันธุ์ DMKU9, DMKU10, DMKU17, DMKU19 และ *C. utilis* NRRL Y900 ในอาหาร YM ที่ไม่เติมมอลท์สกัด น้ำตาลกลูโคส และเติมแป้งมันสำปะหลัง 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ DMKU10 เจริญได้ดีให้น้ำหนักแห้ง 5.1 กรัมต่อลิตรและมีโปรตีนในเซลล์สูง 38.57 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Hottinger และคณะ (1974) เลี้ยง *C. lipolytica* ในอาหารที่มีน้ำมันจากปลา 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สามารถเจริญและมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.239 ต่อชั่วโมง โดยเซลล์ยีสต์ที่ได้มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 42.7 เปอร์เซ็นต์

Koh และคณะ (1983) พบว่า *Torulopsis candida* Y128 สามารถเจริญ ได้ดีในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ โดยยีสต์สามารถย่อยน้ำมันปาล์มดิบได้และเมื่อใช้ nonionic surfactant เป็นตัวช่วยในการผสมน้ำมันให้เข้ากับน้ำทำให้ยีสต์เจริญได้ดีได้เซลล์แห้ง 14.27 กรัมต่อลิตร และให้เซลล์ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และให้กรดอะมิโนใกล้เคียงกับค่ามาตรฐาน

Koh และคณะ (1985) เลี้ยง *T. candida* Y128 ในถังหมัก เพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยใช้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ายีสต์สามารถเจริญได้ดีให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.43 ต่อชั่วโมง และผลิตเซลล์ได้สูงสุดเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Welsh และ Zall (1984) พบว่า *C. utilis* สามารถเจริญได้ในน้ำทิ้งจากการดองน้ำแข็งปลาทะเล (fishery refrigeration brines) ทำให้ค่าซีโอดีลดลง 84

เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ผลิตมวลชีวภาพได้สูงถึง 159.5 กรัมต่อกิโลกรัม และมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ 128 กรัมต่อกิโลกรัมของเซลล์

Yiao (1988) ศึกษาการเจริญของยีสต์ 5 ชนิด คือ *C. tropicalis, C. utilis, Geotrichum candidum, S. cerevisiae* และ *S. fermentati* ในน้ำเสียจากโรงงานผลิตผงชูรส พบว่า *C. tropicalis* สามารถลดค่าซีโอดีของน้ำเสียได้มากที่สุด คือ ลดลง 68.33 เปอร์เซ็นต์ และผลิตเซลล์ได้ 12.35 กรัมต่อลิตร มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ 54.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

ดุษณี ธนะบริพัฒน์ และคณะ (2534) ผลิตยีสต์ขนมปัง (Baker ' s yeast) หรือ *S. cerevisiae* จากน้ำกากส่าซึ่งมีค่าบีโอดีสูงมาก การเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีน้ำกากส่า 500 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งต้องเติมน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์และไม่ต้องปรับพีเอชของอาหาร โดยอาหารสูตรนี้ทำให้ผลิตยีสต์ได้น้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งสูงสุด 7.20 กรัมต่อลิตร

สุวิทย์ สุวรรณโณ (2539) ศึกษาการเจริญของ *C. tropicalis* TISTR 5136 ในน้ำนึ่งปลาทูน่าที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ยีสต์สามารถเจริญได้ดีให้มวลชีวภาพสูงสุด 15.1 กรัมต่อลิตร สามารถลดค่าซีโอดีได้ 84 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 3 วัน และเซลล์ที่ได้ประกอบด้วยโปรตีนและไขมัน 45 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ชุตินุช สุจริต (2540) เลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ ในน้ำนึ่งปลาทูน่าหลังการแยกโปรตีนและไขมัน พบว่า *C. tropicalis* TISTR 5146 เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 3.27 กรัมต่อลิตร หลังการเลี้ยงเชื้อสามารถลดค่าซีโอดี น้ำมันและกรีส ได้ 18.23 และ 46.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ดวงใจ โอชัยกุล และมาริสา จาตุพรพิพัฒน์ (2541) เลี้ยง *C. tropicalis* ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปมันฝรั่งที่ไม่เจือจาง พีเอชเริ่มต้น 4.5 เลี้ยงภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมทำให้ยีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.47 ต่อชั่วโมง ให้ปริมาณมวลชีวภาพ 1.21 กรัมต่อลิตร และสามารถลดค่าซีโอดี 78.97 เปอร์เซ็นต์

เซลล์ยีสต์ที่ได้ประกอบด้วยโปรตีนและไขมัน 32.19 และ 0.454 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ

2.3.2 แหล่งไนโตรเจน ยีสต์ต้องการไนโตรเจน เนื่องจากไนโตรเจนเป็นแร่ธาตุที่สำคัญในการสร้างโปรตีนของเซลล์ และเซลล์ของจุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8 - 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของยีสต์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์บางชนิดเจริญได้ดีในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนแต่บางชนิดก็ต้องการอินทรีย์ไนโตรเจน โดยทั่วไปยีสต์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน (สมใจ ศิริโภค, 2540) แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนจะได้รับความนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ ก๊าซแอมโมเนีย เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท เป็นต้น ส่วนแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนอาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย แต่ในระดับอุตสาหกรรมแหล่งไนโตรเจนที่ใช้มักจะให้ในรูปของอนินทรีย์ไนโตรเจน (Stanbury and Whitaker, 1986) และ ชุตินุช สุจริต (2540) พบว่าการเติมแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนในปริมาณมากจะมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ในกรณีที่วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเหมาะสมแล้วดังนั้นการเติมสารไนโตรเจนในการเลี้ยงยีสต์ต้องมีปริมาณที่เหมาะสม โดย Rose และ Harrison (1971) กล่าวว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนเมื่อเติมในปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้ยีสต์เจริญได้ดี

Koh และคณะ(1983) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนของ *T. candida* Y128 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ คือ NH_4NO_3, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_2)_2CO$, $NaNO_3$ และ $NaNO_2$ ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ยีสต์เจริญได้ดีที่สุดคือ $(NH_4)_2SO_4$ ทำให้ผลิตเซลล์ได้สูงที่สุด

ดุษณี ธนะบริพัฒน์ และคณะ (2534) ศึกษาการเจริญของ *S. cerevisiae* ในอาหารที่เติมน้ำกากส่าเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.01 - 0.30 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นเหมาะสมที่ทำให้ผลิตเซลล์มากที่สุดคือ $(NH_4)_2SO_4$ เข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ให้เซลล์ 5.70 กรัมต่อลิตรและพบ

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

ว่า $(NH_4)_2SO_4$ เป็นสารเคมีที่ให้ผลดีที่สุดในการกำจัดสีน้ำตาลเข้มของน้ำกากส่า ยีสต์ที่ผลิตได้เมื่อนำมาทำขนมปังจะมีสีเหลืองอ่อนทำให้ดูน่ารับประทานมากกว่าสีน้ำตาลเข้ม

Enwefa (1991) ทดสอบการเจริญของ *S. uvarum* ในอาหารที่ใช้เปลือกกล้วยผงเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ดังนี้ NH_4NO_3, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4OH พบว่า $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของยีสต์ ซึ่ง $(NH_4)_2SO_4$ เป็นทั้งแหล่งของไนโตรเจนและซัลเฟอร์ $(NH_4)_2SO_4$ เมื่อเติมลงในอาหารจะทำให้เกิดสภาพเป็นกรดทำให้ยืดเวลาในการเจริญของยีสต์และยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่เข้ามาปนเปื้อน

อนุเทพ ภาสุระ และ ปราโมทย์ ศิริโรจน์ (2534) ทำการศึกษา *C. tropicalis* DMKU10 ที่เจริญในอาหารเหลวเติมแป้งมันสำปะหลัง 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ คือ KNO_3, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์พบว่ายีสต์เจริญดีที่สุดในอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ พบว่าปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$ 1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ยีสต์สามารถผลิตเซลล์ได้สูงสุดและมีปริมาณโปรตีนในเซลล์สูง 43.63 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

2.3.3 แหล่งของแร่ธาตุ อาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่จะมีธาตุต่าง ๆ เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วยคือ แมกนีเซียม(Mg) ฟอสฟอรัส(P) โปตัสเซียม(K) ซัลเฟอร์(S) แคลเซียม(Ca) และ คลอรีน (Cl) ถ้าอาหารที่นำมาใช้มีสารเหล่านี้ไม่เพียงพอจำเป็นต้องเติมธาตุเหล่านี้ลงไปในรูปสารประกอบที่เหมาะสม ส่วนใหญ่มักใช้ในรูปของเกลือ มีบางธาตุที่เป็นส่วนประกอบอยู่ในอาหารมีเพียงพอไม่ต้องเติมได้แก่ โคบอลท์(Co) คอปเปอร์(Cu) เหล็ก(Fe) แมงกานีส(Mn) โมลิบดินัม(Mo) และสังกะสี(Zn) ธาตุต่าง ๆ เหล่านี้ยีสต์ต้องการในปริมาณน้อย แต่มีผลช่วยให้ยีสต์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยแร่ธาตุที่นิยมเติมในขบวนการผลิตเซลล์จุลินทรีย์ได้แก่ แมงกานีสซัลเฟทมีความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.02 - 0.2 เปอร์เซ็นต์ (Hottinger *et al.*, 1974)

Berry (1989) กล่าวว่า ฟอสเฟทอาจจะได้มาจากการย่อยไดไฮโดรเจนฟอสเฟท และฟอสเฟทเอสเตอร์อื่นๆ ที่มีอยู่ในอาหารเพียงเล็กน้อยโดยเอนไซม์ฟอสฟาเตสที่อยู่ในผนังเซลล์ของยีสต์ ส่วนซัลเฟอร์จะได้จากการย่อยซัลเฟท ซัลไฟท์ หรือ

ไธโอซัลเฟทอิออน และเมธไทโอนีน แต่กรดอะมิโนอื่นที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบได้แก่ ซีสตีน ซิสเตอีน เป็นต้น ไม่สามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์นี้

ดุษณี ธนะบริพัฒน์ และคณะ (2534) ศึกษาการเจริญของ *S. cerevisiae* ในน้ำกากส่า พบว่าในการเจริญของยีสต์แหล่งอาหารจำเป็นต้องมีการเติมแหล่งของฟอสฟอรัส โปตัสเซียม และแมกนีเซียม ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* และแหล่งแร่ธาตุเหล่านี้ต้องการในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น

2.3.4 แหล่งของวิตามิน วิตามินเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิต จุลินทรีย์ก็เช่นเดียวกันบางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินที่มันต้องการได้เอง แต่จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์ได้ ซึ่งยีสต์สามารถสังเคราะห์วิตามินได้เองเช่น ไบโอติน แพนโททีเนท ไทอามีน เป็นต้น (สมใจ ศิริโภค, 2540) เนื่องจากวิตามินมีส่วนช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น ดังนั้นจึงต้องมีการเติมวิตามินลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ในกรณีที่ต้องการผลิตเซลล์ไม่จำเป็นต้องเติมวิตามินในปริมาณมากเพราะยีสต์ต้องการวิตามินเพียงเล็กน้อยอีกทั้งยีสต์สามารถผลิตได้เอง (Reed andNagodawithana, 1991)

วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจากผลผลิตทางการเกษตรหรือของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมและการเกษตร ปกติจะมีวิตามินเป็นส่วนประกอบอยู่บ้างซึ่งชนิดและปริมาณของวิตามินอาจเพียงพอสำหรับขบวนการผลิตเซลล์ แต่ถ้าไม่เพียงพอก็จะแก้ไขโดยการใช้วัตถุดิบที่มีวิตามินเป็นส่วนประกอบหลายชนิดผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม (กำเนิด สุภัณวงษ์, 2534)

2.3.5 อุณหภูมิ ยีสต์แต่ละชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกัน โดยยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิเดียวกันกับรา คือ 25 - 30 องศาเซลเซียส ในอุตสาหกรรมการหมักนิยมใช้อุณหภูมิช่วง 25 - 35 องศาเซลเซียส (Stanbury and Whitaker, 1986) ในระหว่างการเลี้ยงยีสต์อุณหภูมิจะเปลี่ยนแปลงได้เสมอถ้าไม่มีการควบคุมเนื่องจากเกิดความร้อนขึ้นขณะที่ยีสต์เจริญเติบโต ยีสต์ที่เจริญในอาหารที่เหมาะสมอัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่ออุณหภูมิอยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่สุด (optimum temperature) อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดของยีสต์แต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน เช่น *C. tropicalis* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Rose and Harrison, 1971)

R. glutinis เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มเจริญได้ดีที่ 35 องศาเซลเซียส (Papaparaskevas *et al.*,1992) เช่นเดียวกับ *C. tropicalis* F129 เจริญได้ดีที่ 38 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันปาล์ม (Lee *et al.*, 1993) *Saccharomycopsis lipolytica* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำมันมะกอก และไขมันสัตว์สามารถเจริญได้ที่ 30 องศาเซลเซียส (Tan and Gill, 1984 and 1985)

Koh และคณะ (1985) เลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมมีผลต่อการกระจายตัวของน้ำมันในอาหาร ทั้งน้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการกระจายตัวในอาหารแตกต่างกันขึ้นกับจุดหลอมเหลวของน้ำมัน

Lemmel และคณะ (1979) ศึกษาการเจริญในสภาวะที่เหมาะสมของ *Saccharomycopsis fibuliger* ในน้ำเสียจากขบวนการผลิตมันฝรั่ง โดยเลี้ยงแบบต่อเนื่องพบว่าสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

Rossi และ Clementi (1985) เลี้ยง *Schwanniomyces castellii* ในอาหารเหลวที่มีแป้งมันฝรั่งเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ยีสต์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิช่วงกว้างตั้งแต่ 23 - 37.5 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ คือ 22.5 และ 37.5 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของ *Schw. castellii* เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ได้เซลล์แห้ง 8 กรัมต่อลิตร

Rydin และคณะ (1990) ทดลองเลี้ยงยีสต์ *C. tropicalis* S001 ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าสัตว์ซึ่งมีทั้งไขมันและโปรตีนเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก และการทดลองไม่มีการควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเลี้ยงยีสต์พบว่า เมื่ออุณหภูมิของการเลี้ยงยีสต์เพิ่มขึ้นจาก 30 องศาเซลเซียสเป็น 38 องศาเซลเซียส ยีสต์ยังคงมีการเจริญต่อไป แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจนถึง 40 องศาเซลเซียส ยีสต์จะหยุดการเจริญทันที

2.3.6 สภาพความเป็นกรดด่างของอาหาร โดยทั่วไปยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ชอบความเป็นกรดและทนกรดได้ดีกว่าจุลินทรีย์พวกอื่นๆ ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วงพีเอช 3.5 - 7.0 (Rose and Harrison, 1971) ในอุตสาหกรรมมักปรับให้อยู่ในช่วงพีเอช 3.5 - 4.5 โดยที่ยีสต์สามารถเจริญได้ดีและสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนด้วย ตามปกติการเจริญของจุลินทรีย์จะถูกควบคุมโดยเอนไซม์ในขบวนการ

เมตาบอลิซึมต่างๆ ซึ่งการทำงานของเอนไซม์จะทำงานได้ดีหรือไม่ต้องอาศัยพีเอชที่เหมาะสมต่อเอนไซม์ของเชื้อนั้น ๆ (Walker, 1998) พีเอชที่เหมาะสมของยีสต์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป เช่น *C. tropicalis* F129 เจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มดิบเป็นส่วนประกอบพีเอชเริ่มต้น 6.0 (Lee *et al.*, 1993) *C. tropicalis* TISTR 5136 เจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำนึ่งปลาทูน่าพีเอช 4.5 (สุวิทย์ สุวรรณโณ, 2539) *C. tropicalis* TISTR 5146 เจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นส่วนประกอบมีพีเอชเริ่มต้น 5.5 (ชุตินุช สุจริต, 2540)

Koh และคณะ (1985) เลี้ยง *Torulopsis candida* Y128 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มพบว่า เมื่อยีสต์มีการเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่ควบคุมพีเอชระหว่างการเลี้ยงพีเอชของอาหารลดลงอย่างรวดเร็วและมีพีเอชต่ำกว่า 3.0 ภายในเวลา 8 ชั่วโมง

Tan และ Gill (1984) พบว่าการเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีน้ำมันมะกอก หรือกรดโอลีอิกเป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชของอาหารจะต่ำกว่าการเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ

2.3.7 ปริมาณและวิธีการให้อากาศ การให้อากาศเป็นการให้ออกซิเจนแก่จุลินทรีย์ ออกซิเจนเป็นธาตุที่มีความสำคัญสำหรับการเจริญ โดยเฉพาะเมื่อต้องการเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตมวลเซลล์จำเป็นต้องให้ยีสต์เจริญในที่ ๆ มีอากาศอย่างเต็มที่ การให้อากาศเข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อกระทำได้ 2 วิธี (Stanbury and Whitaker, 1986) คือ การใช้เครื่องเขย่า (shaker) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการ วิธีนี้ยีสต์ได้รับอากาศมากน้อยขึ้นกับปริมาณช่องว่างของอาหารในภาชนะบรรจุและอัตราความเร็วรอบของการเขย่า เครื่องเขย่าที่ใช้มี 2 แบบ คือ เครื่องเขย่าแบบ reciprocal shaker เป็นเครื่องเขย่าที่มีลักษณะการเคลื่อนที่แบบกลับไปกลับมาตามแนวราบ และเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker เป็นเครื่องเขย่าที่ให้อากาศโดยการหมุนเป็นวง อีกวิธีคือ การใช้เครื่องอัดอากาศเข้าไปในถังหมัก ซึ่งถังหมักบางแบบจะใช้ระบบให้อากาศเพียงอย่างเดียว ในขณะที่บางแบบต้องใช้วิธีการกวนร่วมด้วย

เนื่องจากกระบวนการผลิตเซลล์ต้องการอากาศทำให้ต้องศึกษาปริมาณการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิต

Vananuvat และ Kinsella (1975) เลี้ยง *S. fragilis* ในอาหารที่ใช้แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเซลล์ โดยเลี้ยงยีสต์ในถังหมักขนาด 14 ลิตร มีปริมาตรการหมักเท่ากับ 6 ลิตร เลี้ยงในอาหารพีเอช 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่าความเร็วรอบของการกวนมีผลต่อส่วนประกอบภายในเซลล์ของยีสต์ โดยที่การเพิ่มความเร็วรอบของการกวนทำให้ยีสต์ผลิตกรดนิวคลีอิกเพื่อมาใช้ในการแบ่งเซลล์มากขึ้นทำให้มีการเจริญเพิ่มปริมาณขึ้น ขณะที่ปริมาณโปรตีนในเซลล์ลดลงเมื่อความเร็วรอบของการกวนเพิ่มขึ้น

Tanและ Gill (1985)ศึกษาการเจริญของ *Saccharomycopsis lipolytica* ในอาหารเหลวที่มีไขมันสัตว์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 1.5 ลิตร และให้อากาศโดยการกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก พบว่าเมื่ออัตราการกวนเพิ่มขึ้นจะทำให้น้ำมันกระจายในอาหารได้ดีและเร็วขึ้น เป็นเหตุให้อัตราการเจริญเพิ่มขึ้นด้วย

ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี (2534) ศึกษาการเจริญของ *Schwanniomyces castellii* B5282 ในอาหารเหลวแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเลี้ยงยีสต์ในฟลาสก์ที่เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำให้ยีสต์สามารถผลิตเซลล์และโปรตีนได้ใกล้เคียงกับการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เมื่อนำยีสต์มาเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีปริมาตรการหมัก 1.2 ลิตร ในอาหารชนิดเดิม พบว่ายีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.113 ต่อชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.5 กรัมต่อลิตรเมื่อให้อากาศ 1.67 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ความเร็วรอบของการกวนเท่ากับ 400 รอบต่อนาที

2.4 ชนิดของยีสต์ที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทมากเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวคือยีสต์ ในสมัยปี 1914 - 1918 มีการผลิตโปรตีนจากยีสต์เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์จนกระทั่งสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ยีสต์ถูกนำมาใช้ในการผลิตเป็นอาหารสำหรับมนุษย์ (Barnell, 1974) มียีสต์หลายชนิดที่นิยมใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ได้แก่

2.4.1 สกุล *Saccharomyces* เซลล์รูปร่างกลม รูปไข่ หรือค่อนข้างยาวรี สามารถสร้างเส้นใยเทียม มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ และ

แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ซึ่งมีรูปร่างกลมบรรจุอยู่ในแอสคัสจำนวน 1-4 สปอร์ (Reed and Nagodawithana, 1991) ยีสต์ชนิดนี้มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารเช่น ขนมอบ และเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ *Saccharomyces* ที่เลี้ยงเพื่อเป็นแหล่งโปรตีนมีหลายสายพันธุ์ เช่น *S. cerevisiae, S. carlbergensis, S. fragilis* เป็นต้น (สุมาลี เหลืองสกุล, 2532; Vananuvat and Kinsella, 1975)

2.4.2 สกุล *Candida* เซลล์มีรูปร่างยาวรีหรือรูปไข่ สามารถสร้างเส้นใยเทียมและคลามัยโดสปอร์ มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ *Candida* สายพันธุ์ที่รู้จักกันดีและนิยมใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวมากที่สุดคือ *C. utilis* เพราะเจริญเร็ว เลี้ยงง่าย และให้โปรตีนสูง *C. utilis* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีน้ำตาลเพนโตสและเฮกโซสเป็นองค์ประกอบ (Reed and Nagodawithana, 1991) นอกจากนี้ *Candida* สายพันธุ์อื่นที่นำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้แก่ *C. tropicalis, C. lipolytica, C. rugosa, C. krusei* และ *C. valida*

Montet และคณะ (1983) พบว่ายีสต์ซึ่งมีความสามารถเจริญและใช้น้ำมันจากเมล็ดพืช (rape-seed oil) ได้แก่ *C. rugosa, C. deoformans, C. lipolytica* และ *Geotrichum candidum* และยีสต์ที่สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนคือ *C. rugosa*

2.4.3 สกุล *Schwanniomyces* เซลล์รูปร่างกลม, รี หรือ รูปไข่ บางครั้งพบเป็นแท่งยาวหรือทรงกระบอก สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ และอาจพบที่มีการสร้างสปอร์ซึ่งมักจะมีเพียงสปอร์เดียวหรือ 2 สปอร์ สปอร์มีรูปร่างคล้ายผลวอลนัทและผิวขรุขระซึ่ง *Schwanniomyces* sp. สามารถหมักและนำสารประกอบคาร์บอนไปใช้ในการเจริญเติบโตได้หลายชนิดคล้ายกับ *Saccharomyces* sp. (Beneke and Stevenson, 1978) *Schwanniomyces* sp. ที่นำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้แก่ *Schw. castellii, Schw. alluvius, Schw. uvarum* เป็นต้น

2.4.4 ยีสต์สกุลอื่น ๆ นอกเหนือจากยีสต์ที่กล่าวมาข้างต้นมียีสต์อีกหลายสกุลที่ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้แก่

Hansenula polymorpha เจริญในอาหารที่มีเมทธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน และสามารถผลิตเซลล์ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 45 เปอร์เซ็นต์ของ

น้ำหนักแห้งและผลิตเซลล์ได้ 0.37 กรัมเซลล์ต่อกรัมของเมทธานอล (Cooney *et al.*, 1975)

Schizosaccharomyces เป็นยีสต์อีกสกุลที่สามารถนำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้ ยีสต์สายพันธุ์นี้ได้แก่ *Schiz. pombe* ถูกแยกได้จากน้ำตาลและกากน้ำตาลที่ทำมาจากอ้อย และจากไวน์ที่ทำมาจากปาล์ม (palm wine) ซึ่งบางครั้งถูกนำมาใช้ในการผลิต African beer อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์เช่นกัน ยีสต์สายพันธุ์ *Schizosaccharomyces* sp. สามารถหมักน้ำตาลโมเลกุลสั้น ๆ แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลโพลีแซคคาไรด์ (Beneke and Stevenson, 1978)

Kluyveromyces เป็นยีสต์อีกสกุลที่ได้รับความนิยมนำมาผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวซึ่ง *Kluyveromyces* เป็นยีสต์รูปร่างกลม รี สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อและอาจพบการสร้างสปอร์รูปร่างกลมหรือ reniform พบสปอร์ประมาณ1-100 สปอร์ต่อแอสคัส มีการสร้างเส้นใยเทียม (Kurtzman, 1990)

การคัดเลือกชนิดยีสต์ที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียวต้องคำนึงถึงความสามารถในการใช้วัตถุดิบนั้นเช่นกันและยีสต์แต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบซึ่งมีคุณค่าทางอาหารแตกต่างกัน ในกรณีที่ต้องการผลิตเซลล์ต้องคำนึงถึงคุณค่าทางอาหารของยีสต์เป็นหลัก

2.5 คุณค่าทางอาหารของยีสต์

ภายในเซลล์ยีสต์มีส่วนประกอบของสารและเกลือแร่หลายชนิดเป็นปริมาณมากซึ่งเหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งอาหารของคนและสัตว์ โดยเฉพาะในเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยโปรตีนทั้งหมดประมาณ 45 - 57 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Reed, 1981) คุณค่าทางอาหารยังขึ้นกับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนหลายชนิดซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับร่างกาย กรดอะมิโนในยีสต์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปตามชนิดของยีสต์และแหล่งอาหารที่ยีสต์เจริญ ดังแสดงในตาราง 6 นอกจากยีสต์จะให้คุณค่าทางด้านโปรตีนแล้วยังพบว่ายีสต์เป็นแหล่งของวิตามินได้แก่ วิตามินบีรวมหลายชนิด

ตาราง 6 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ เปรียบเทียบกับของ FAO (หน่วย : กรัม / 100 กรัมโปรตีน)

Amino Acid	FAO profile[a]	*Candida tropicalis* F 129 on crude palm oil[b]	*Candida boidinii* on methanol[c]	Brewers yeast[a]
Essential				
Threonine	2.8	6.4	4.42	5.8
Valine	4.2	5.7	4.59	4.7
Methionine	2.2	1.3	0.86	1.5
Isoleucine	4.2	5.1	3.98	3.6
Leucine	4.8	7.2	5.29	5.8
Phenylalanine	2.8	4.3	3.39	3.4
Lysine	4.2	8.4	6.01	6.8
Non-essential				
Aspartic	ND	8.9	ND	ND
Glutamic	ND	15.6	ND	ND
Serine	ND	5.8	ND	ND
Glycine	ND	4.5	ND	ND
Histidine	ND	2.2	ND	2.1
Arginine	ND	5.4	ND	ND
Alanine	ND	6.2	ND	ND
Proline	ND	3.5	ND	ND
Tyrosine	2.8	2.8	-	2.7
Cystine	2.0	0.5	-	ND

หมายเหตุ

ND : ไม่ได้วิเคราะห์

- : วิเคราะห์ไม่พบ

a : Bernstein และคณะ (1977)

b : Lee และคณะ (1993)

c : Cooney และคณะ (1975)

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกยีสต์ที่เจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอน
2. ทำการบ่งชี้ชนิดของยีสต์ที่แยกได้
3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของยีสต์ที่คัดเลือกได้เพื่อการผลิตชีวมวล (biomass)
4. ทำการผลิตชีวมวลของยีสต์โดยใช้ถังหมัก (fermenter)
5. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ที่คัดเลือกได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัตถุดิบ น้ำมันปาล์มดิบได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บริษัท ไทยพัฒนาจำกัด อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล นำมาแบ่งใส่ภาชนะขนาดเล็กเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. ยีสต์สายพันธุ์มาตราฐานจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*, *Kluyveromyces* marxianus, *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159, *Yarrowia lipolytica* TISTR 5621 เก็บยีสต์ในหลอดอาหารวุ้นเอียง YM เก็บรักษาในตู้เย็น ถ่ายเชื้อเดือนละครั้ง
3. ตัวอย่างดินและพืชบริเวณสวนปาล์มและโรงงานหีบปาล์มน้ำมัน
4. อาหารเลี้ยงยีสต์ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก)

   Yeast Malt extract broth (YM broth) บริษัท Difco

   Yeast Malt extract agar (YM agar) บริษัท Difco

   อาหารสำหรับแยกและคัดเลือกยีสต์ (Isolation medium for yeast) (Koh *et al.*, 1983)

   อาหารสำหรับเก็บเชื้อ (Stock medium)

   Acetate agar บริษัท Difco

   Gorodkowa's agar บริษัท Difco

   Bacto Yeast Nitrogen Base บริษัท Difco

   Bacto Yeast Carbon Base บริษัท Difco

5.สารเคมี

5.1 น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ glucose, galactose, sucrose, maltose, lactose, raffinose, mannitol, inositol, cellobiose และ erythritol บริษัท Difco

5.2 ตัวทำละลายอินทรีย์ (solvent) ได้แก่ acetone และ ethanol บริษัท Merck

6. สารที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (ภาคผนวก ข)

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ยี่ห้อ Olympus, Japan
2. เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
3. เครื่องเขย่า (vortex mixer), Scientific Industries, Inc. Bohemia, N.Y.,11716, U.S.A.
4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (electronic balance), Sartorius, Germany.
5. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilizer) U.S.A.
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubators) ของ Heraeus GmbH, Germany.
7. ตู้เย็นยี่ห้อ Sanyo, Thailand.
8. ตู้อบ (hot air oven) รุ่น T 5042 ของ Heraeus GmbH, Germany.
9. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (shaker incubator) ของ New Brunswick Scientific, U.S.A.
10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV - 1601 ของ Shimadzu Corporation, Japan.
11. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น H - 11NA ของ Kokusan Enshinki Co., Ltd., Japan.
12. เตาแม่เหล็ก (hot plate) ของ Thermolyne Barnstead Thermolyn Cooperation, U.S.A.
13. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ของ Tomy Seiko Co. Ltd., Japan.
14. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W760 ของ Memmert, Germany
15. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของ Beckman Instruments, Germany
16. ถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตร รุ่น Bioflo 3000 ของบริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A.

วิธีการ

1. การแยกยีสต์ซึ่งสามารถเจริญได้ในน้ำมันปาล์มดิบ

1.1 การเก็บตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติ

เก็บตัวอย่างดินและพืชบริเวณโรงงานหีบน้ำมันปาล์ม และบริเวณสวนปาล์ม ตัวอย่างละ 20 กรัม จำนวน 67 ตัวอย่าง โดยใช้ช้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตักดินหรือพืชตัวอย่างที่ต้องการ สำหรับดินควรเก็บดินลึกลงไปจากผิวหน้าดินประมาณ 1 นิ้ว บรรจุตัวอย่างลงในภาชนะที่ปลอดเชื้อ พร้อมทั้งบันทึก สถานที่และวัน เดือน ปีที่เก็บ

1.2 วิธีการแยกเชื้อ

1.2.1 ชั่งตัวอย่างดินหรือพืช ตัวอย่างละ 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารสำหรับแยกและคัดเลือกยีสต์ (ภาคผนวก ก) บรรจุอยู่ 100 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.2.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 1.2.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารชนิดเดิมปริมาตร 20 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2.3 นำยีสต์ที่ได้จากการเลี้ยงในข้อ 1.2.2 มาทำการเจือจางในระดับ 10^{-1}- 10^{-5} โดยใช้เปปโทน 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวเจือจาง (diluent) ใช้ปิเปตดูดเชื้อที่เจือจางแล้วที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ระดับความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (ภาคผนวก ก) บรรจุในจานเพาะเชื้อ ใช้แท่งแก้ว (spreader) เกลี่ยเชื้อให้ทั่วอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้ายยีสต์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งโดยวิธีการ streak plate เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำไปเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.2.4 นำยีสต์ที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี ได้แก่ ขนาด สี ขอบ ผิว และศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อใช้ในการแยกยีสต์ที่มีลักษณะแตกต่างกัน เก็บตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ในอาหารวุ้นเอียง

(stock medium) ตามภาคผนวก โดยเลี้ยงยีสต์ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญเต็มที่และเก็บหลอดเชื้อที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อเดือนละครั้ง

2. เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ที่แยกได้

เลี้ยงยีสต์ที่ต้องการเปรียบเทียบการเจริญ (เฉพาะยีสต์ที่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ) บนอาหารวุ้นเอียง (ภาคผนวก ก) บรรจุในหลอดขนาด 16 X 150 มิลลิเมตร ซึ่งมีความลาดเอียงของผิวหน้าอาหารเท่ากันทุกหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อจำนวน 3 มิลลิลิตร เขย่าหลอดให้เชื้อผสมกัน ใช้ลูปเขี่ยเชื้อใส่ในหลอดแก้วขนาด 24 X 200 มิลลิเมตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวที่เติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยใส่ยีสต์หลอดละ 2 ลูป ยีสต์แต่ละสายพันธุ์ทำสองซ้ำ นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาหาน้ำหนักแห้งของเซลล์โดยปิเปตตัวอย่าง ๆ ละ 5 มิลลิลิตร เติมสารผสมของ acetone และ ethanol (อัตราส่วน 1 : 1) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน แยกเซลล์ยีสต์โดยการเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักที่คงที่โดยใช้เวลา 16 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ คัดเลือกยีสต์ที่มีการเจริญสูงที่สุดและรองลงมารวมทั้งหมด 5 สายพันธุ์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Herbert *et al.*, 1971) คัดเลือกยีสต์ที่ให้โปรตีนสูงเพียง 1 สายพันธุ์ไว้ศึกษาต่อไป

3. การจำแนกชนิดของยีสต์

นำยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 มาจำแนกชนิดของยีสต์ตามวิธีของ Kreger van Rij (1984) โดยพิจารณาจากลักษณะดังต่อไปนี้

3.1 ศึกษาลักษณะการเจริญ (Cultural characteristics)

3.1.1 ศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารแข็ง (YM agar) โดย streak เชื้อลงบนอาหารแข็ง YM บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สังเกตลักษณะโคโลนี ได้แก่ สี ขอบ รูปร่าง ความมัน ความด้าน ผิว และลักษณะเป็นเมือก

3.1.2 ศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารเหลว (YM broth) โดยเขี่ยเชื้อลงในอาหารเหลว YM บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 3 วัน 7 วัน และ 2 อาทิตย์ สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อในอาหารว่าลอยเป็นฝ้า (pellicle) อยู่ที่ผิวหรือตกตะกอน (flocculation) อยู่ที่ก้นหลอด

3.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

ศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดของเซลล์ โดยนำเชื้ออายุ 2 วันจากอาหาร YM broth มาทำ wet mount ด้วย methylene blue ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ การวัดขนาดความกว้างยาว ทำได้โดยใช้ micrometer วัดเซลล์ไม่น้อยกว่า 20 เซลล์เพื่อหาค่าเฉลี่ย

3.3 ศึกษาลักษณะการสืบพันธุ์ (Characteristic of reproduction)

3.3.1 ศึกษาการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จากเชื้ออายุ 3-5 วัน ในอาหารแข็ง YM สังเกตการสืบพันธุ์แบบต่าง ๆ เช่น การแบ่งตัวแบบ fission, การแตกหน่อแบบ unipolar, bipolar หรือ multipolar โดยทำการ wet mount ด้วย methylene blue ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.2 ศึกษาการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ คือการสร้าง ascospore โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร acetate agar และ Gorodkowa's agar โดยการ streak เชื้อลงบนอาหารและใช้ sterile cover glass ปิดทับรอย streak บางส่วน นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ศึกษาดู ascospore ทั้งภายนอกและใต้ cover glass ดูรูปร่างของ ascospore และจำนวน ascospore ต่อเซลล์ ใช้เวลา 4 อาทิตย์

3.4 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiological characteristics)

3.4.1 ศึกษาความสามารถในการเฟอร์เมนต์น้ำตาล (Fermentation of carbon compound) โดยเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลว yeast nitrogen base ซึ่งมีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ อยู่ 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็น

เวลา 24-48 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ (Durham' s tube) ถ้ามีก๊าซเต็มหลอดภายใน 3 วันถือว่ามีความสามารถในการเฟอร์เมนต์เร็ว (vigorous) ถ้าก๊าซเต็มหลอดภายหลัง 7 วัน ถือว่ามีความสามารถในการเฟอร์เมนต์ช้า (slow) ถ้ายังไม่เต็มหลอดภายใน 2 สัปดาห์ ถือว่ามีความสามารถในการเฟอร์เมนต์น้อย (weak) บันทึกความสามารถในการเฟอร์เมนต์จนครบ 21 วัน น้ำตาลที่ใช้ในการทดสอบคือ glucose, galactose, sucrose, maltose, lactose และ raffinose

3.4.2 ศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาล (Assimilation of carbon compound) โดยเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลว yeast nitrogen base ซึ่งมีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ อยู่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงอ่านผลโดยดูความขุ่นของอาหาร (โดยการนำกระดาษที่ขีดเป็นเส้นหนาประมาณ 2 - 3 มิลลิเมตร มาทาบด้านหลังของหลอดทดลองและสังเกตการมองเห็นเส้นด้านหลังในกรณีที่สังเกตแล้วเห็นขอบของเส้นแสดงว่าเชื้อไม่เจริญหรือเจริญน้อยมากให้เป็น + ถ้าสังเกตเห็นขอบของเส้นราง ๆ แสดงว่าเชื้อมีการเจริญปานกลางให้เป็น ++ และถ้ามองไม่เห็นเส้นปรากฏอยู่แสดงว่าเชื้อเจริญได้ดีมากให้เป็น +++ เปรียบเทียบความขุ่นของเชื้อบันทึกความสามารถในการใช้น้ำตาลจนครบ 21 วัน) เทียบกับหลอดควบคุมน้ำตาลที่ใช้ในการทดสอบคือ glucose, galactose, sucrose, maltose, lactose, raffinose, mannitol , inositol, cellobiose และ erythritol

3.4.3 ศึกษาความสามารถในการใช้เกลือไนเตรท (Nitrate assimilation) นำเชื้อไปเลี้ยงในอาหาร yeast carbon base ที่มี potassium nitrate เป็นเวลา 3 วัน อ่านผลโดยตรวจดูความขุ่นของอาหารเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 ปริมาณการเจริญระดับ +++ จึงจะถือว่ามีความสามารถในการใช้เกลือไนเตรทได้

3.4.4 ศึกษาความสามารถในการใช้ยูเรีย (Urease test) เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารวุ้นเอียงที่เติมยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง อ่านผลบันทึกความสามารถในการใช้ยูเรียจนครบ 7 วัน โดยตรวจดูการเปลี่ยนสีของอาหาร ถ้าเชื้อมีการใช้ยูเรียเชื้อจะผลิตแอมโมเนียมออกมาทำให้สีของอาหารเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพูบานเย็น

4. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของยีสต์ที่แยกได้ในอาหารที่มีส่วนประกอบของน้ำมันปาล์มดิบ น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ และ น้ำตาลกลูโคส

จาก stock culture ถ่ายเชื้อลงบนอาหารวุ้นเอียง บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจาก slant ลงในอาหารเหลว YM เขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อยีสต์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรให้ได้ OD.ไม่เกิน 0.5 ย้ายเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอาหารเหลว (ภาคผนวก ก) ที่มีส่วนผสมของน้ำมันปาล์มดิบ น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ และน้ำตาลกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง โดยแต่ละครั้งเก็บตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโต โดยวัดปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ และวัดปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ตามวิธีของ Lowry (Herbert *et al.*,1971)

5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4

ทำการศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอาหารเหลว (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 4 ทำการทดลองสองซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง นำเชื้อแต่ละฟลาสก์มาหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ตามวิธีในข้อ 2 สภาวะเกี่ยวกับองค์ประกอบของอาหารและสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญที่ศึกษามีดังนี้

5.1 ศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้น (inoculum size)

ศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม โดยเตรียมเชื้อเริ่มต้นเช่นเดียวกับข้อ 4 และเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์

5.2 ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญของยีสต์

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอชเริ่มต้น

ของอาหารเท่ากับ 4.5 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ ศึกษาการเจริญของยีสต์ที่พีเอชต่าง ๆ

5.3 ศึกษาผลของความเร็วรอบของการเขย่า

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 ปรับพีเอชให้เหมาะสมตามข้อ 5.2 โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ปรับให้มีความเร็วรอบเท่ากับ 150 200 และ 250 รอบต่อนาที

5.4. ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอาหารเหลวปรับพีเอชตามข้อ 5.2 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นตามข้อ 5.1 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมจากข้อ 5.3

5.5 ศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอาหารเหลวซึ่งมีพีเอชเริ่มต้นของอาหาร และปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมตามผลที่ได้จากการทดลองตามข้อ 5.1 และ 5.2 นำไปเขย่าตามสภาวะที่เหมาะสมตามที่ทดลองในข้อ 5.3 - 5.4 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มปริมาณ 1.0 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์

5.6 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนและปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์

ศึกษาชนิดของไนโตรเจนโดยใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟท แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท และแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟท ปริมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอาหารเหลวที่เหมาะสมซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำมันปาล์ม พีเอชเริ่มต้นของอาหาร และปริมาณเชื้อเริ่มต้นตามที่ทดลองมาข้างต้น นำไปเขย่าที่อุณหภูมิและความเร็วรอบของที่เหมาะสม

จากผลการทดลองได้ชนิดของอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมจึงนำมาศึกษาปริมาณไนโตรเจนดังกล่าวโดยใช้ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 0.2 0.4 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอาหารเหลวที่เหมาะสมตามที่ทดลองมาที่มีความเข้มข้นของน้ำมันปาล์ม พีเอชเริ่มต้นของอาหาร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม นำไปเขย่าตามสภาวะที่เหมาะสมตามที่ได้ทดลองมาข้างต้น

5.7 ศึกษาผลของยีสต์สกัดที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอาหารเหลวที่เหมาะสมตามที่ทดลองมา มีความเข้มข้นของน้ำมันปาล์ม พีเอชเริ่มต้นของอาหาร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมและนำไปเขย่าตามสภาวะที่เหมาะสมตามที่ทดลองมาข้างต้น โดยเติมยีสต์สกัดเป็น growth factor ปริมาณ 0.01 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ และไม่เติมยีสต์สกัด

5.8 ศึกษาอัตราการเจริญและปริมาณโปรตีนจากการเลี้ยงในฟลาสก์

เลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอาหารเหลวโดยเลี้ยงในฟลาสก์ในสภาวะต่าง ๆ ตามข้อ 5.1 - 5.7 เก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ และนำตัวอย่างเซลล์ที่ได้มาวัดปริมาณโปรตีนตามวิธี Lowry (Herbert *et al.*, 1971)

6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ โดยเลี้ยงในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการเตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอาหารเหลว (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มไว้บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมเชื้อเริ่มต้น ลงในถังหมักที่มีอาหารเหลวซึ่งคัดเลือกได้จากการศึกษาในข้อ 5 จำนวน 3.5 ลิตร เก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเจริญของยีสต์ โดยหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ตามข้อ 2 ปัจจัยที่ทำการศึกษามีดังนี้

6.1 ศึกษาอัตราการกวน

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนที่ 300 400 และ 500 รอบต่อนาที โดยให้ปริมาณอากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

6.2 ศึกษาปริมาณการให้อากาศ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงอัตราการให้อากาศที่ 0.5 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที รอบของการกวนได้จากข้อ 6.1

6.3 ศึกษาผลของการควบคุมพีเอชเริ่มต้น

ทำการศึกษาการเติบโตของเซลล์ยีสต์เมื่อมีการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 6.2 และมีการควบคุมพีเอชด้วย 1 N NaOH และ 1 N HCl

6.4 ศึกษาอัตราการเจริญและปริมาณโปรตีนของยีสต์จากการเลี้ยงในถังหมัก

เลี้ยงยีสต์ในอาหารที่เหมาะสมโดยมีการเลี้ยงในถังหมักตามสภาวะต่าง ๆ ที่ได้ศึกษามาจากข้อ 6.1 - 6.3 หลังครบกำหนดแต่ละช่วงเวลาเก็บตัวอย่างเซลล์ที่ได้นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้งและนำตัวอย่างเซลล์ที่ได้มาวัดปริมาณโปรตีนตามวิธี Lowry (Herbert *et al.*, 1971) และศึกษาคุณค่าทางอาหารของยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. Y47 ที่ได้ โดยหาชนิดของกรดอะมิโนจากตัวอย่างเซลล์ที่เวลาซึ่งยีสต์มีการเจริญของเซลล์สูงสุด เก็บตัวอย่างเซลล์โดยวิธี liophilize และส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง บางเขน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิเคราะห์โดยใช้ HPLC (Waters Acc. QTAT amino analysis method)

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. การแยกยีสต์ซึ่งสามารถเจริญได้ในน้ำมันปาล์มดิบ

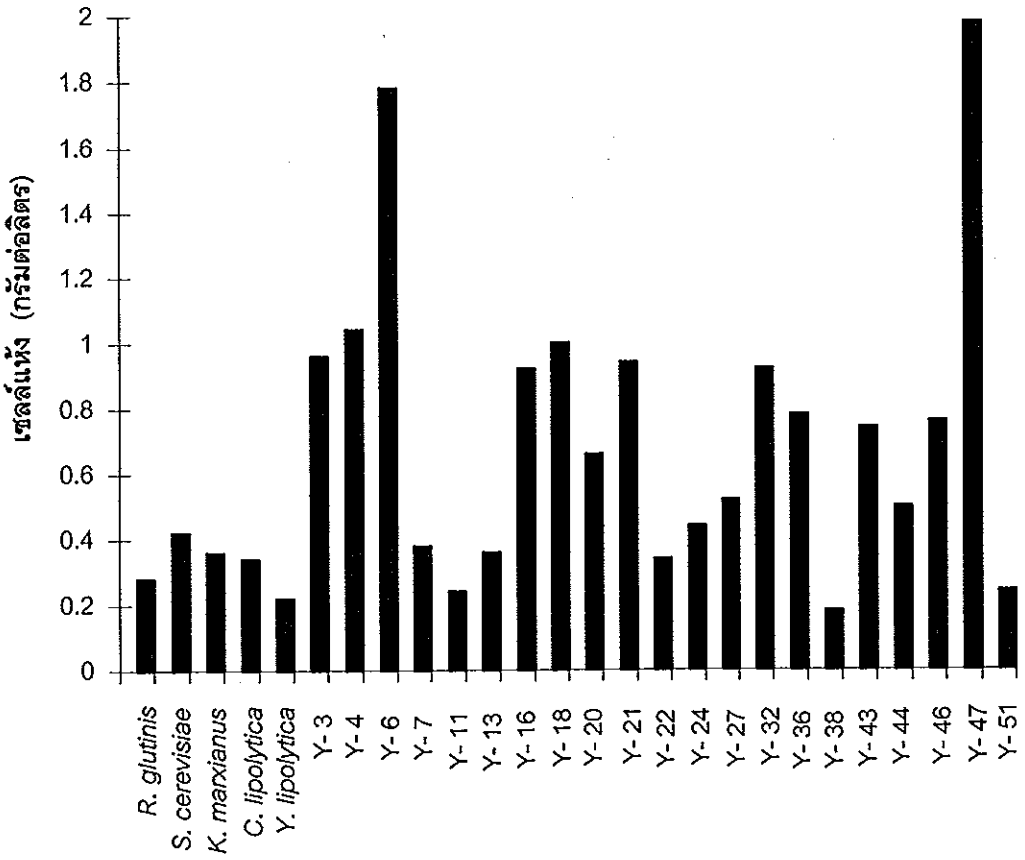
จากการแยกยีสต์จากดินและพืชบริเวณสวนปาล์มและโรงงานหีบปาล์มน้ำมันจำนวน 67 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกยีสต์ที่เจริญในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มดิบเป็นส่วนประกอบจำนวน 51 สายพันธุ์โดยแยกจากลักษณะโคโลนีและลักษณะเซลล์ที่สังเกตได้และแตกต่างกัน ยีสต์ทั้ง 51 สายพันธุ์ที่แยกได้มีลักษณะเป็นยีสต์ซึ่งสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) จำนวน 13 สายพันธุ์เป็นยีสต์ซึ่งสร้างเส้นใยแท้ (true mycelium) จำนวน 17 สายพันธุ์ ที่เหลือเป็นยีสต์เซลล์เดียว (single cell) จำนวน 21 สายพันธุ์ซึ่งนำมาทำการทดลอง เนื่องจากยีสต์ที่มีการสร้างเส้นใยเมื่อนำมาเลี้ยงในสภาพที่เป็น submerged cultivation เส้นใยจะอยู่ในสภาพเป็นกลุ่มก้อน (pellet) ทำให้เกิดปัญหาในการให้ออกซิเจนแก่เซลล์ (ดวงพร คันธโชติ, 2528) จึงเลือกยีสต์ที่ไม่สร้างเส้นใยมาศึกษา

2. เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณโปรตีนของยีสต์ที่แยกได้

ผลการเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ทั้ง 21 สายพันธุ์ กับยีสต์สายพันธุ์มาตรฐาน 5 สายพันธุ์ คือ *Candida lipolytica, Yarowia lipolytica* TISTR 5621, *Saccharomyces cerevisiae* , *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 และ *Kluyveromyces marxianus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอาหารเหลวที่เติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดลองขนาด 24 x 200 มิลลิเมตร เขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกยีสต์ที่เจริญดีและให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 5 อันดับตามลำดับ คือ Y47, Y6, Y4, Y18 และ Y3 ส่วนยีสต์สายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 5 ชนิดเจริญในอาหารเหลวซึ่งเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ได้ไม่ดีเท่ากับยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์นี้ภายในระยะเวลาเท่ากัน (ภาพประกอบ 3) ยีสต์ Y47 ที่เจริญได้ดีในน้ำมันปาล์มดิบเพราะสามารถผลิตเอนไซม์

ไลเปสได้ โดยวัดความสามารถในการผลิตกรดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวเติมน้ำมันปาล์มดิบที่มี bromothymol blue เป็นอินดิเคเตอร์

เมื่อพิจารณายีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนและปริมาณเซลล์ของยีสต์ พบว่ายีสต์รหัส Y47 มีปริมาณโปรตีนของเซลล์อยู่ในระดับกลางคือมีอยู่ 37.86 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง แต่ให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.98 กรัมต่อลิตร เทียบกับ Y18 ซึ่งมีปริมาณโปรตีนของเซลล์เท่ากับ 47.78 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง แต่ให้ปริมาณเซลล์เพียง 1.00 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ Y4 มีโปรตีนรองจาก Y8 เท่ากับ 40.91 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง มีปริมาณเซลล์ 1.04 กรัมต่อลิตร ส่วน Y3 และ Y6 มีทั้งปริมาณโปรตีนของเซลล์และปริมาณเซลล์ต่ำกว่า Y47 (ตาราง 7) ตามปกติแล้วยีสต์ที่จะนำมาใช้เป็นอาหารจะประกอบด้วยโปรตีนแท้ (true protein) อย่างน้อย 40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ไขมันอย่างน้อย 0.5 เปอร์เซ็นต์ และเถ้าไม่เกิน 9 เปอร์เซ็นต์ (Rose and Harrison, 1971) จากการทดลอง Y47 มีปริมาณโปรตีนของเซลล์ต่ำกว่ามาตรฐาน แต่ให้ปริมาณเซลล์สูงกว่า Y4 และ Y18 เกือบเท่าตัว ดังนั้นเมื่อคิดเป็นปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมดจากอาหารปริมาตรเท่ากัน Y47 จะให้ปริมาณโปรตีนรวมมากกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่น จึงเลือกยีสต์รหัส Y47 มาทำการศึกษาต่อไป



ภาพประกอบ 2 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ที่แยกได้กับยีสต์สายพันธุ์มาตรฐาน ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตาราง 7 ปริมาณเซลล์แห้งและปริมาณโปรตีนของเซลล์ของยีสต์ 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้

ชนิดของยีสต์	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณโปรตีนรวม (กรัมต่อลิตร)
Y3	0.96	36.11	0.35
Y4	1.04	40.91	0.43
Y6	1.78	31.73	0.57
Y18	1.00	47.48	0.48
Y47	1.98	37.86	0.75

3. การจำแนกชนิดของยีสต์ที่แยกได้

จากผลการแยกยีสต์ซึ่งมีความสามารถใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอน จำนวน 51 สายพันธุ์ (จากข้อ 1) แยกยีสต์ได้เป็น 3 พวกใหญ่ ๆ คือ ยีสต์ซึ่งสร้างเส้นใยแท้ ยีสต์ซึ่งสร้างเส้นใยเทียม และยีสต์ซึ่งไม่สร้างเส้นใย นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบางประการ ข้อมูลที่ได้นำมาใช้จำแนกชนิดของยีสต์ตาม Kreger van Rij (1984) ได้ยีสต์ทั้งหมด 9 ชนิด ดังตาราง 8 ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันดังภาคผนวก ค จากผลของการศึกษายีสต์ที่ไม่สร้างเส้นใยจำนวน 21 สายพันธุ์ เป็นยีสต์ในสกุล *Candida* sp. จำนวน 19 สายพันธุ์ สกุล *Kluyvermyces* sp. จำนวน 1 สายพันธุ์ และสกุล *Rhodotorula* sp. จำนวน 1 สายพันธุ์ และยีสต์ซึ่งมีจำนวนมากที่สุดได้แก่ยีสต์ในสกุล *Candida* sp. จากงานวิจัยหลายฉบับพบว่ายีสต์ซึ่งมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนประเภทน้ำมันเพื่อการเจริญเติบโตได้แก่ ยีสต์ในสกุล *Rhodotorula* (Johnson *et al.*, 1992; Papaparaskevas *et al.*, 1992 andPatel *et al.*, 1992) ยีสต์ในสกุล *Candida* โดยเฉพาะ *C. tropicalis* (Lee *et al.*,1993 and Rydin *et al.*,1990) *C. curvata, C. deformans* (Bui and Galzy, 1990)*C. rugosa* และ *C. lipolytica* (Montet *et al.*,1983) ที่มีความสามารถเจริญ และผลิตเซลล์ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันพืชโดยเฉพาะน้ำมันปาล์ม

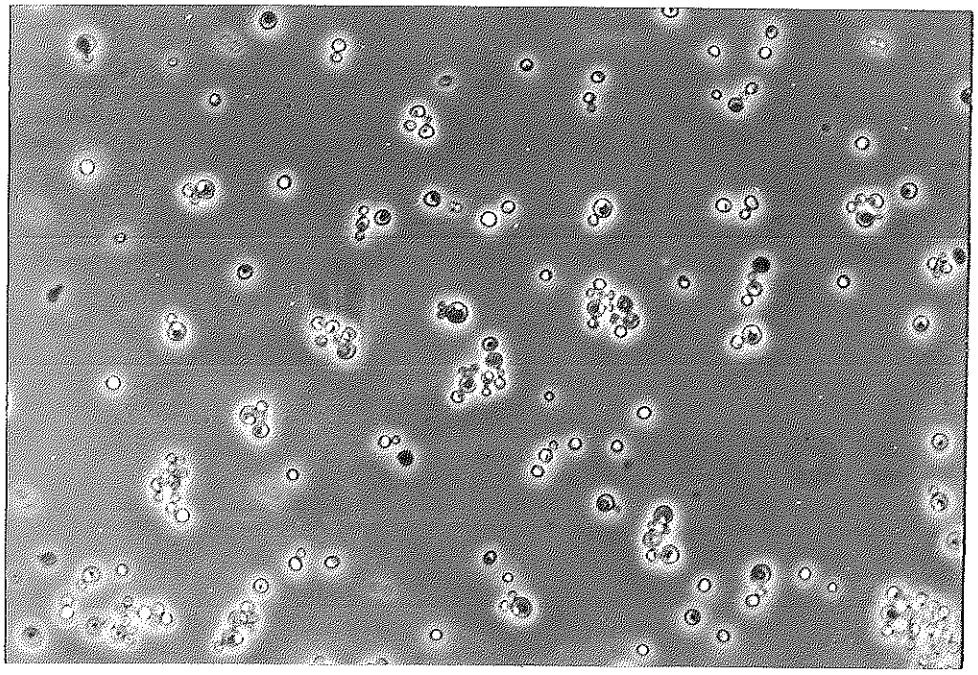
Koh และคณะ (1983) ได้แยกยีสต์จากตัวอย่างดินและพืชจำนวน 240 ตัวอย่างได้ยีสต์มากกว่า 200 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถใช้น้ำมันปาล์มและยีสต์ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ดีในอาหารน้ำมันปาล์มดิบมากกว่าน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้คือ *Torulopsis candida* (Saito) สามารถเจริญได้ดีในอาหารเติมน้ำมัน ปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมงให้ปริมาณโปรตีน 3.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยีสต์สายพันธุ์นี้แยกมาจากดิน

Lee และคณะ (1993) แยกยีสต์จากตัวอย่างดินและพืชจำนวน 236 ตัวอย่าง ได้ยีสต์ที่มีความสามารถเจริญได้ในอาหารเติมน้ำมันปาล์ม 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิมากกว่า 43 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นยีสต์พวก thermotolerant yeast คือ *C. tropicalis* และจากผลการศึกษาในข้อ 2 พบว่ายีสต์ที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษา

ต่อไปคือ ยีสต์รหัส Y47 และเมื่อเทียบเคียงตาม Kreger van Rij (1984) ระบุว่ายีสต์รหัส Y47 เป็นยีสต์ในสกุล *Candida* sp. โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาดังนี้ ลักษณะโคโลนีเมื่อเจริญบนอาหารแข็ง YM 48 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียส มีลักษณะสีขาวครีม กลม นูน ขอบเรียบ และเป็นมัน เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดของเซลล์โดยเฉลี่ยมีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 2.5 x 7.5 ไมครอน เซลล์อาจจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรืออาจเป็นสายสั้น ๆ (ภาพประกอบ 4) มีการสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อแบบ multilateral budding เมื่อเจริญในอาหารเหลว YM มีการตกตะกอนและสร้างฝ้าบริเวณผิวหน้าของอาหาร บนอาหารแข็ง PDA ยีสต์ไม่มีการสร้างเส้นใย หลังจากการเลี้ยงบนอาหารทดสอบการสร้างสปอร์ (acetate agar และ Gorodkowa's agar) ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 อาทิตย์ ตรวจดูการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) เป็นระยะ ไม่พบการสร้างแอสโค สปอร์ ผลการทดสอบการใช้ยูเรีย (urease test) ให้ผลลบ และผลการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการแสดงผลดังตาราง 9

ตาราง 8 ชนิดและจำนวนของยีสต์ที่แยกได้จากดินและพืชบริเวณสวนปาล์มและโรงงานหีบน้ำมันปาล์ม

ชนิดของยีสต์ (Genus)	จำนวนของยีสต์ (Isolates)
Candida	39
Trichosporon	1
Rhodotorula	1
Pichia	1
Kloekera	1
Kluyveromyces	1
Hansenula	2
Schizosaccharomyces	1
Basidiomycetous yeast	4
รวม	51



ภาพประกอบ 3 แสดงลักษณะเซลล์ของ *Candida* sp. Y47 ที่เจริญบนอาหารแข็ง YM ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (กำลังขยาย 40 เท่า)

ตาราง 9 ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Candida* sp. Y47

ลักษณะทางสรีรวิทยา	ผลการทดสอบ
1.ความสามารถในการหมักน้ำตาล	
Glucose	v
Galactose	+
Sucrose	+
Maltose	+
Lactose	-
Raffinose	+
2. ความสามารถในการใช้น้ำตาลและไนเตรท	
Glucose	+
Galactose	+
Sucrose	+
Maltose	+
Lactose	+
Cellobiose	-
Raffinose	+
Erythritol	-
Mannitol	+
Inositol	-
KNO_3	-

หมายเหตุ

v ยีสต์มีการเจริญและใช้น้ำตาลได้ภายในเวลา 1-3 วัน

\+ ยีสต์มีการเจริญและใช้น้ำตาลได้หลังจาก 3 วัน

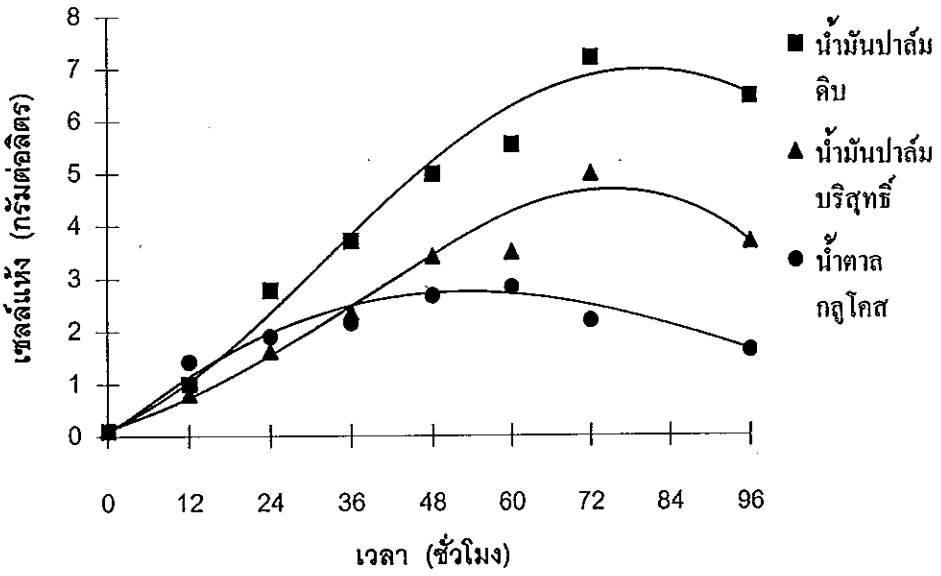
\- ยีสต์เจริญและใช้น้ำตาลไม่ได้เลย

4. เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *Candida* sp. Y47 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของน้ำมันปาล์มดิบ น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ และ น้ำตาลกลูโคส

ผลจากการเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมแหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ น้ำมันปาล์มดิบ, น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ และน้ำตาลกลูโคส ชนิดละ 2 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 4) พบว่ายีสต์ *Candida* sp. Y47 สามารถเจริญและใช้อาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดได้ เมื่อเปรียบเทียบเจริญในอาหารที่เติมน้ำมันปาล์มทั้ง 2 ชนิด และน้ำตาลกลูโคส พบว่ายีสต์สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อการเจริญได้เร็วกว่าใช้น้ำมันปาล์ม ทั้งนี้เนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นสารอาหารพื้นฐานที่สามารถขนส่งเข้าไปใช้ในเซลล์ได้ง่าย จากการทดลองยีสต์สามารถใช้กลูโคสได้อย่างรวดเร็วทำให้เข้าสู่ระยะ log phase ได้เร็ว ขณะที่อาหารที่เป็นน้ำมันปาล์มถูกย่อยอย่างช้า ๆ และใช้ไปในรูปของกรดไขมัน ทำให้ยีสต์เข้าสู่ระยะ log phase ได้ช้า เห็นได้จากระยะเวลาของการเจริญที่ยีสต์เจริญในอาหารเติมน้ำตาลกลูโคสใช้เวลาเจริญสูงสุด 60 ชั่วโมง ขณะที่เจริญในน้ำมันปาล์มใช้เวลาถึง 72 ชั่วโมง และจากการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดที่ยีสต์ผลิตได้ พบว่ายีสต์ซึ่งเจริญในน้ำมันปาล์มให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าที่เจริญในน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากในการสลายไขมันจะได้พลังงานสูงทำให้ยีสต์นำไปใช้เพื่อการสร้างมวลได้มาก

จากการเปรียบเทียบการเจริญในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ ยีสต์ *Candida* sp. Y47 สามารถเจริญและใช้น้ำมันปาล์มดิบได้ดีกว่าน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ โดย Hui (1996) กล่าวว่า น้ำมันปาล์มดิบนอกจากจะเป็นแหล่งคาร์บอนยังมีสารอาหารและแร่ธาตุอื่นๆ เช่น คาโรทีนอยด์ สเตียรอล โทโคฟีรอล เหล็ก ทองแดง ฟอสฟอรัส เป็นต้น ขณะที่น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์จะมีสารเหล่านี้ในปริมาณน้อยหรืออาจจะไม่มีเลยเมื่อผ่านขบวนการสกัดมาแล้ว ยีสต์ *Candida* sp. Y47 สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 7.22 กรัมต่อลิตร และในน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ได้เซลล์แห้ง 5.0 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ขณะที่เมื่อเจริญในอาหารเติมน้ำตาลกลูโคสได้เซลล์แห้งเท่ากับ 2.84 กรัมต่อลิตร ที่

เวลา 60 ชั่วโมง ส่วนปริมาณโปรตีนเมื่อเทียบที่เวลาของการเจริญสูงสุดให้ปริมาณโปรตีนของเซลล์ดังนี้ (ตาราง 10) ที่เวลา 72 ชั่วโมง ยีสต์เจริญในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดมีปริมาณโปรตีนของเซลล์ 35.09 และ 34.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่เจริญในน้ำตาลกลูโคสให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ 60 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนในเซลล์ 44.16 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *Candida* sp. Y47 เจริญในอาหารที่เติมน้ำมันปาล์มทั้ง 2 ชนิด จะมีปริมาณโปรตีนของเซลล์ต่ำกว่าเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคส โดยเฉพาะที่เลี้ยงในอาหารเติมน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ แต่เมื่อคิดเป็นปริมาณโปรตีนรวมพบว่ายีสต์ซึ่งเลี้ยงในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบจะได้ปริมาณโปรตีนรวมมากกว่า ถึงแม้ว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณโปรตีนจะลดลงในขณะที่เซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้น จากงานของ Deshpande และ Daniel (1995) เลี้ยง *C. bombicola* ในอาหารที่ใช้ไขมันสัตว์เป็นแหล่งคาร์บอน นำเซลล์ที่เลี้ยงในถังหมักที่เวลา 24 ชั่วโมง มาวิเคราะห์พบว่ามีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่ 59 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนลดลงเหลือ 37 เปอร์เซ็นต์และมีไขมันของเซลล์ 14 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 32 เปอร์เซ็นต์ Deshpande และ Daniel กล่าวว่าโดยปกติยีสต์จะมีไขมันเป็นองค์ประกอบในเซลล์ประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ที่ 72 ชั่วโมง มีไขมันในเซลล์มากกว่ามาตรฐาน แสดงว่าภายในเซลล์มีการสะสมไขมันมากทำให้ปริมาณโปรตีนลดลงได้ นอกจากนี้ Vananuvat และ Kinsella (1975) พบว่า ยีสต์ที่มีอัตราการเจริญค่อนข้างช้า การแบ่งเซลล์จะช้าไปด้วย ทำให้ปริมาณกรดนิวคลีอิกน้อย โปรตีนจึงสะสมอยู่ในเซลล์มาก แต่ในขณะที่อัตราการเจริญสูง การแบ่งเซลล์รวดเร็ว มีปริมาณกรดนิวคลีอิกถูกผลิตมากเพื่อนำไปใช้ในการแบ่งเซลล์ทำให้ปริมาณโปรตีนของเซลล์น้อยลง ดังนั้นช่วงที่มีการแบ่งเซลล์มากจะได้ปริมาณเซลล์มากแต่มีโปรตีนของเซลล์น้อย เป็นไปได้ว่ายีสต์ *Candida* sp. Y47 ช่วงแรกมีการเจริญแบ่งเซลล์ช้าจึงมีปริมาณโปรตีนของเซลล์มาก แต่เมื่อเซลล์มีการแบ่งตัวเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง log phase ประมาณชั่วโมงที่ 48 ของการทดลองทำให้ปริมาณโปรตีนของเซลล์ลดลง



ภาพประกอบ 4 เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมแหล่งคาร์บอนคือ น้ำมันปาล์มดิบ น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ และน้ำตาลกลูโคส พีเอชเริ่มต้น 5.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ตาราง 10 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์แห้งและปริมาณโปรตีนของ *Candida* sp. Y47 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

แหล่งคาร์บอนที่ใช้	เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณโปรตีนรวม (กรัมต่อลิตร)
น้ำมันปาล์มดิบ	24	2.78	49.97	1.39
	48	5.00	37.41	1.87
	60	5.56	35.78	2.00
	72	7.22	35.09	2.53
น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์	24	1.63	51.83	0.84
	48	3.42	41.13	1.41
	60	3.50	25.32	0.89
	72	5.00	34.85	1.74
น้ำตาลกลูโคส	24	1.90	52.29	1.00
	48	2.68	37.18	1.00
	60	2.84	44.16	1.25
	72	2.20	45.32	1.00

5. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ในฟลาสก์บนเครื่องเขย่า

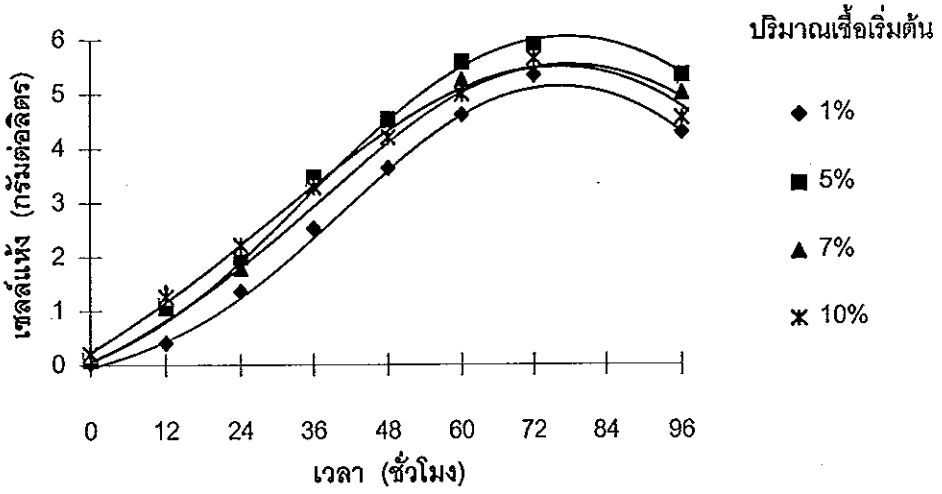
5.1 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

จากการทดลองหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหาร เติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในภาพประกอบ 5 จากผลการทดลองพบว่ายีสต์ *Candida* sp. Y47 เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ระยะ lag phase จะสั้นกว่าการใช้เชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องมาจากเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์ต้องมีการเพิ่มปริมาณเซลล์ในระยะ lag phase อยู่นานเพราะมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นน้อยทำให้ยีสต์เจริญเติบโตได้ไม่ทันกับการใช้เชื้อเริ่มต้น 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ผลการเจริญเมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์จึงมีปริมาณของเซลล์น้อยที่สุด แต่ผลจากการใช้เชื้อเริ่มต้น 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์มีระยะ lag phase สั้นและให้ปริมาณเซลล์ตลอดระยะการเลี้ยงโดยเฉพาะที่เวลา 72 ชั่วโมงให้ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดไม่แตกต่างกัน แต่เชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ให้เซลล์แห้งเท่ากับ 5.90 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เชื้อเริ่มต้น 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ให้ปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 5.66 กรัมต่อลิตรเท่ากันและจากการทดลองของ ปราโมทย์ ศิริโรจน์ (2521) กล่าวว่า การใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณมากเป็นการนำอาหารเก่าไปยังอาหารที่จะใช้ทดลองจึงอาจเกิดสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ได้ ซึ่งในงานวิจัยของ Hongpattarakere และ H-Kittikun (1995) ใช้เชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากอาหารเติมแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ โดย *Schwanniomyces castellii* B 5285 พบว่าได้เซลล์แห้ง 5.27 กรัมต่อลิตร และได้โปรตีน 6.8 กรัมต่อ 100 กรัมของแป้งที่ใช้ไป และ Meyrath และ Suchanek (1972) กล่าวว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในระดับอุตสาหกรรมที่นิยมใช้คือ 3 - 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารที่ใช้ในการผลิต ดังนั้นปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ควรเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด ทั้งในแง่ของปริมาณอาหารเดิมและปริมาณเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์

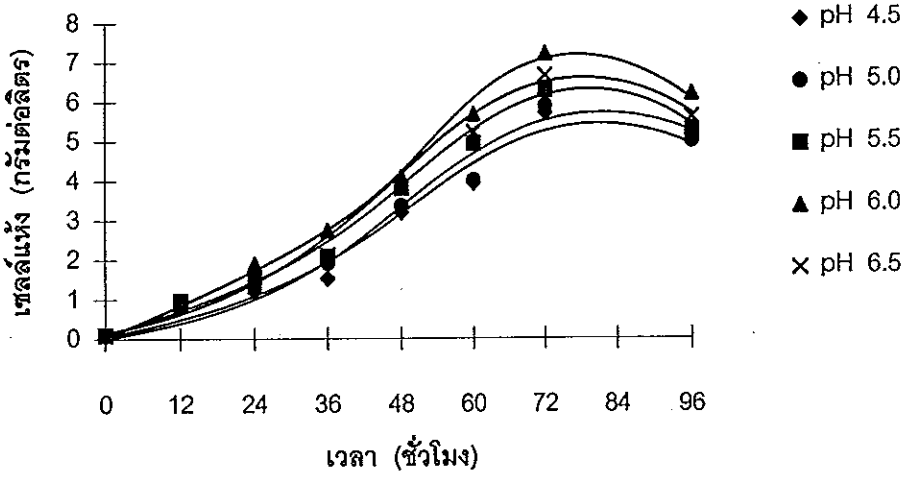
5.2 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญของยีสต์

การทดลองหาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงยีสต์ *Candida* sp. Y47 โดยปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากผลการทดลอง (ภาพประกอบ 6) พบว่ายีสต์ *Candida* sp. Y47 สามารถเจริญได้ดีที่พีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ 4.5 - 6.5 ยีสต์สามารถผลิตเซลล์แห้งได้สูงสุดเมื่อเจริญในอาหารพีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ได้เซลล์ดังนี้ พีเอช 4.5 ได้เซลล์ 5.7 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.0 ได้เซลล์ 5.89 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.5 ได้เซลล์ 6.28 กรัมต่อลิตร พีเอช 6.0 ได้เซลล์ 7.22 กรัมต่อลิตร และ พีเอช 6.5 ได้เซลล์ 6.66 กรัมต่อลิตร สำหรับในอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 5.0 และ 5.5 ซึ่งมีสภาพเป็นกรดมากกว่ายีสต์มีการเจริญที่ไม่แตกต่างกันและเมื่อเทียบกับที่ พีเอชเริ่มต้น 6.5 ซึ่งมีสภาพเกือบเป็นกลาง อาจเนื่องมาจากการเลี้ยงยีสต์ในฟลาสก์ไม่มีการควบคุมพีเอช ทำให้ตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงยีสต์พีเอชของอาหารมีการเปลี่ยนแปลง ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นค่อนข้างเป็นกรดจึงถูกเปลี่ยนแปลงให้เข้าสู่สภาวะเป็นกรดมากขึ้นทำให้ยีสต์เจริญได้น้อย ขณะที่อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นไม่ได้มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์

จากงานวิจัยของ Koh และคณะ (1985) เลี้ยง *Torulopsis candida* Y128 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 3 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงในถังหมัก พบว่าการเลี้ยงยีสต์ที่ไม่ได้ควบคุมพีเอชในระหว่างการเลี้ยง ภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง พีเอชจะลดลงต่ำกว่า 3.0 ซึ่งจากผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมของยีสต์สายพันธุ์นี้คือ พีเอช 3.5 ซึ่งมีสภาพเป็นกรดมาก Walker (1998) กล่าวว่ายีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่พีเอช ประมาณ 4.5 - 6.5 และตามปกติเอนไซม์จะทำงานได้ดีหรือไม่ต้องอาศัยพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน ซึ่งเอนไซม์จะเป็นตัวควบคุมขบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ของเซลล์ เพราะฉะนั้นถ้าต้องการให้เอนไซม์ทำงานได้ดีอาหารที่ใช้เลี้ยงยีสต์ต้องมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์



ภาพประกอบ 5 เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้น 5.5 เติมปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างกัน เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 6 เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้นต่างกัน เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

จากการทดลอง *Candida* sp. Y47 เจริญได้ดีในอาหารที่พีเอชเริ่มต้น 6.0 ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 7.22 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับ Lee และคณะ (1993) เลี้ยง *C. tropicalis* F129 ในอาหารเหลวที่เติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายีสต์เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 6.0 ได้ผลผลิตเซลล์ 101 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 12 ชั่วโมง โดยให้โปรตีน 35 เปอร์เซ็นต์ และมีกรดนิวคลีอิก 3.1 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Rossi และ Clementi (1985) พบว่า *Schwanniomyces castellii* เจริญได้ดีบนอาหารเหลวเติมมันฝรั่งหรือเปลือกมันฝรั่ง เมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0

5.3 ผลของความเร็วรอบการเขย่า

ผลการทดลองเลี้ยงยีสต์บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วของการเขย่า 3 ระดับ คือ 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารพีเอชเริ่มต้น 6.0 ที่มีน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 7) พบว่ายีสต์ *Candida* sp. Y47 เจริญได้เมื่อเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็วรอบของการเขย่าทั้ง 3 ระดับ แต่ให้การเจริญและปริมาณเซลล์แห้งแตกต่างกัน (ที่เวลา 72 ชั่วโมง) คือ ที่ 150 รอบต่อนาทีให้เซลล์แห้ง 6.76 กรัมต่อลิตร ที่ 200 รอบต่อนาทีให้เซลล์แห้ง 8.02 กรัมต่อลิตร และที่ 250 รอบต่อนาทีให้เซลล์แห้ง 9.48 กรัมต่อลิตร เห็นได้ชัดเจนว่า *Candida* sp. Y47 ต้องการอากาศในการเจริญมากทำให้มีการเจริญได้ดีที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที และทำให้เข้าสู่ระยะ log phase ได้เร็วรวมทั้งให้ปริมาณเซลล์สูง

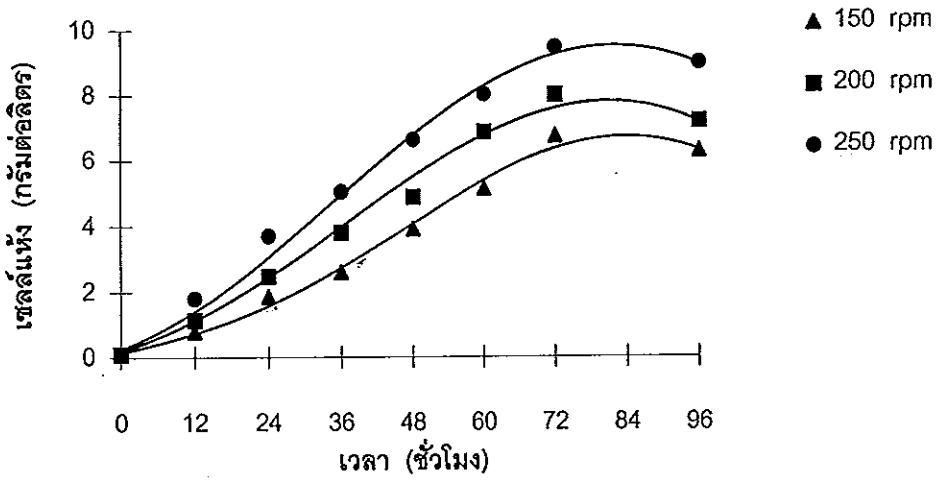
ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถเจริญได้ทั้งในที่ที่มีอากาศและมีอากาศน้อยมาก การผลิตเซลล์ยีสต์ให้มีปริมาณมากจำเป็นต้องให้อากาศอย่างเพียงพอ เนื่องจากการเพิ่มปริมาณอากาศให้กับยีสต์ที่เลี้ยงในฟลาสก์ทำได้โดยการเขย่าดังนั้นการเพิ่มความเร็วรอบของการเขย่าจึงเพิ่มปริมาณอากาศ แสดงว่าความเร็วของการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ทำให้ *Candida* sp. Y47 ได้รับอากาศเพียงพอและเหมาะสมต่อการเจริญ เมื่ออากาศมีการกระจายตัวอยู่ในอาหารอย่างเพียงพอและทั่วถึงทำให้ยีสต์ผลิตเซลล์ได้สูง

อนุเทพ ภาสุระ และปราโมทย์ ศิริโรจน์ (2534) เลี้ยง *C. tropicalis* 4 สายพันธุ์ และ *C. utilis* ในอาหารเติมแป้งมันสำปะหลังเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

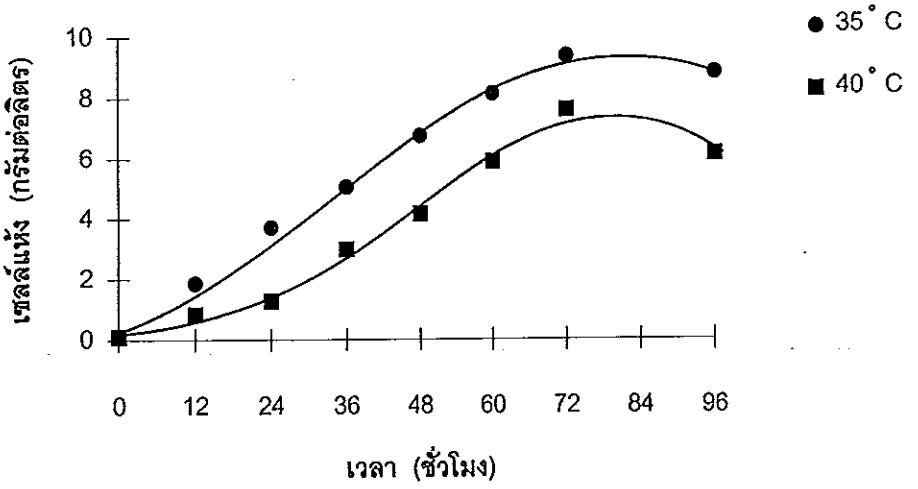
พบว่า การเขย่าฟลาสก์ที่ 250 รอบต่อนาที เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์มากที่สุด โดยเฉพาะสายพันธุ์ DMKU-10 เจริญได้ดีที่สุดเพราะยีสต์จะได้รับอากาศอย่างเพียงพอต่อการผลิตเซลล์ Hongpattarakere และ H-Kittikun (1995) เลี้ยง *Schwanniomyces castellii* B 2585 ให้การเจริญดีที่สุดเมื่อเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 5.24 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ได้โปรตีนเท่ากับ 7.2 กรัมต่อ 100 กรัมของแป้งมันสำปะหลังที่ใช้ และ Enwefa (1991) พบว่า *S. uvarum* เจริญได้ดีในอาหารที่ใช้เปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้น้ำหนักแห้งเท่ากับ 4.98 กรัม ต่อลิตร ดังนั้นความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมซึ่งจะใช้ต่อไปเท่ากับ 250 รอบต่อนาที

5.4 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงยีสต์ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยง 96 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบการเจริญที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงในภาพประกอบ 8 พบว่า *Candida* sp. Y47 สามารถเจริญได้ทั้งที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ยีสต์เจริญได้ดีกว่าให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 9.36 กรัมต่อลิตร ที่ 72 ชั่วโมง เทียบกับการเจริญที่ 40 องศาเซลเซียสมีการเจริญที่ช้ากว่าและให้ปริมาณเซลล์แห้งเพียง 7.58 กรัมต่อลิตร ที่เวลาเดียวกัน เนื่องจากน้ำมันปาล์มดิบมีจุดหลอมเหลวระหว่าง 33 - 39 องศาเซลเซียส (Mohd Suria Affandi, 1994) ทำให้มีผลต่อการกระจายตัวในอาหารเมื่อควบคุมอุณหภูมิในกระบวนการเลี้ยงยีสต์เป็น 35 องศาเซลเซียส เมื่อเกิดการเขย่าน้ำมันซึ่งมีสภาพเป็นของเหลวไม่จับตัวเป็นก้อนทำให้ยีสต์สามารถใช้น้ำมันปาล์มได้ดี เช่นเดียวกับ Lee และคณะ (1993) ที่เลี้ยง *C. tropicalis* F129 ในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายีสต์เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส



ภาพประกอบ 7 เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้น 6.0 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 200 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 8 เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้น 6.0 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

แต่จากการทดลองของ Koh และคณะ (1984) เลี้ยง *Torulopsis candida* Y128 ในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอัตราการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิของการเลี้ยงเท่ากับ 32 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 32 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของยีสต์จะลดลง นอกจากนี้พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส น้ำมันปาล์มดิบมีการจับตัวกันเป็นก้อนเพราะน้ำมันปาล์มดิบจะมีทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบและยีสต์จะใช้กรดไขมันไม่อิ่มตัวก่อน กรณีที่ในน้ำมันปาล์มดิบมีกรดไขมันอิ่มตัวมากจะทำให้จุดหลอมเหลวสูงกว่าปกติ ดังนั้นไขของน้ำมันปาล์มดิบจึงจับตัวเป็นก้อนเมื่อเลี้ยงยีสต์ที่ 40 องศาเซลเซียส ทำให้ยีสต์ไม่สามารถใช้น้ำมันปาล์มดิบได้การเจริญจึงไม่ดีเท่าที่เจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

5.5 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มดิบต่อการเจริญ

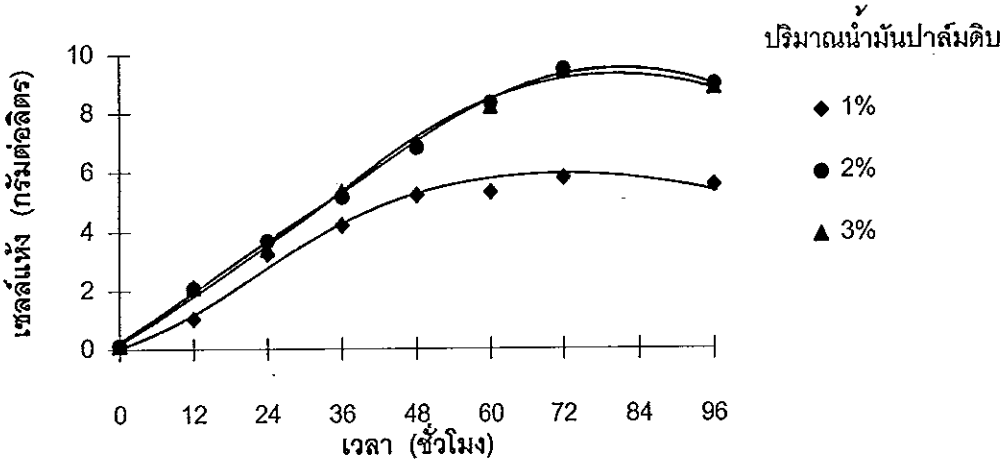
ผลการศึกษาปริมาณของน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *Candida* sp. Y47 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารพีเอชเริ่มต้น 6.0 โดยเติมน้ำมันปาล์มดิบ 1 2 และ 3 กรัมในอาหาร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 9) พบว่า *Candida* sp. Y47 เจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มดิบ 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่น้ำมันปาล์มดิบเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อยีสต์มีการเจริญและใช้อาหารหมดจะเข้าสู่ระยะ stationary phase เร็ว ส่วนการใช้น้ำมันปาล์มดิบ 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์มีการเจริญใกล้เคียงกันและได้เซลล์แห้งเท่ากับ 9.5 กรัมต่อลิตร และ 9.46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับแต่เนื่องจากน้ำมันปาล์มดิบ 3 เปอร์เซ็นต์ จะมีไข (solid fat) เกิดขึ้นมากกว่าทำให้การใช้น้ำมัน 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นการให้ที่สูญเปล่าเนื่องจากยีสต์ไม่สามารถใช้น้ำมันได้มากกว่า 2 เปอร์เซ็นต์เพราะน้ำมันเกิดการจับตัว โดยในรายงานของ Koh และคณะ (1985) สรุปว่า *Torulopsis candida* Y128 ที่เลี้ยงในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนมีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มถูกใช้ไปหมด แต่ถ้าน้ำมันมีความเข้มข้นมากกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ปริมาณเซลล์ลดลงและมีไขหลงเหลืออยู่ในอาหารเป็นปริมาณมากรวมทั้งการให้น้ำมันปาล์มดิบเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สามารถใช้น้ำมันไปได้มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้ผลผลิตของเซลล์ต่อน้ำมันปาล์มสูงสุดเท่ากับ 0.92 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำมันปาล์ม

5.6 ผลการศึกษาชนิดและปริมาณไนโตรเจนต่อการเจริญ

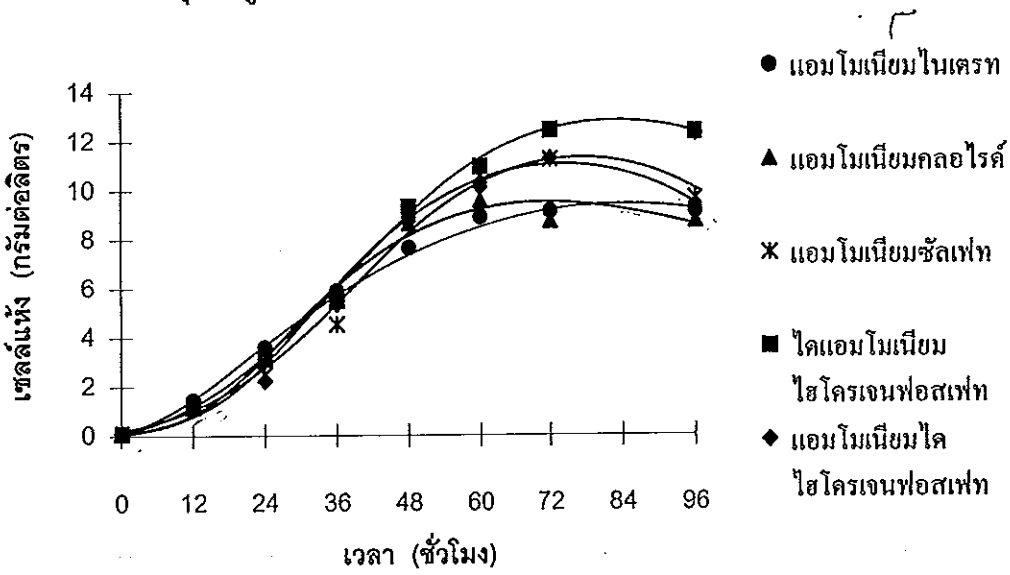
เมื่อศึกษาการเจริญของยีสต์ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเหลวซึ่งมีน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนประกอบ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 โดยมีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ คือ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟท ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท และแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟท ชนิดละ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ยีสต์มีอัตราการเจริญในอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนทั้ง 5 ชนิดในระยะแรกไม่แตกต่างกัน (ภาพประกอบ 11) หลังจาก 48 ชั่วโมง การเจริญของยีสต์ในอาหารที่เติมแอมโมเนียมไนเตรทและแอมโมเนียมคลอไรด์ค่อนข้างคงที่ แต่การเจริญของยีสต์ในอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนอีก 3 ชนิดยังคงมีการเจริญต่อไปอีก และพบว่า *Candida* sp. Y47 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทได้เซลล์แห้งเท่ากับ 12.44 กรัมต่อลิตรที่เวลา 72 ชั่วโมง ขณะที่เจริญในอาหารเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ได้น้อยที่สุดได้เซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.72 กรัมต่อลิตร ที่เวลาเดียวกัน

ปกติจุลินทรีย์มีความสามารถเจริญและใช้สารประกอบไนโตรเจนแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน (Stanbury and Whitaker, 1986) จากการทดลอง *Candida* sp. Y47 สามารถใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทได้ดี แสดงว่าเมื่อยีสต์มีการเจริญและใช้แอมโมเนียมไอออน ส่วนของอนุมูลฟอสเฟทที่แตกตัวออกมาก็มีการนำไปใช้ต่อในขบวนการอื่น ๆ โดยในรายงานของ Rodney และ Paul (1984) กล่าวถึงความเป็นพิษของอนุมูลต่าง ๆ ที่มีผลต่อเซลล์เรียงลำดับจากมากไปหาน้อยคือ $I^- > NO_3^- > Cl^- > H_2PO_4^- > SO_4^{2-}$ และอนุมูลฟอสเฟทจะมีส่วนเกี่ยวข้องและนำไปใช้ในขบวนการไกลโคไลซิส

ในงานของ Papaparaskevas และคณะ (1992) เลี้ยง *Rhodotorula glutinis* ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์เจริญได้ดีและเอนไซม์ไลเปสมีกิจกรรมดีที่สุดเมื่อใช้แอมโมเนียมฟอสเฟทเป็นแหล่งไนโตรเจน Patelและคณะ (1992) พบว่า *R. minuta* ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อ



ภาพประกอบ 9 เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบปริมาณต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้น 6.0เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 11 เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมแหล่งไนโตรเจน 0.4 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกัน 5 ชนิด พีเอชเริ่มต้น 6.0 มีน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

การเจริญมากกว่าแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนอื่น ๆ คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซิเตรท แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟท โพแทสเซียมไนเตรท โซเดียมไนเตรท และ ยูเรีย ทำให้ได้เซลล์แห้ง 10.2 กรัมต่อลิตร

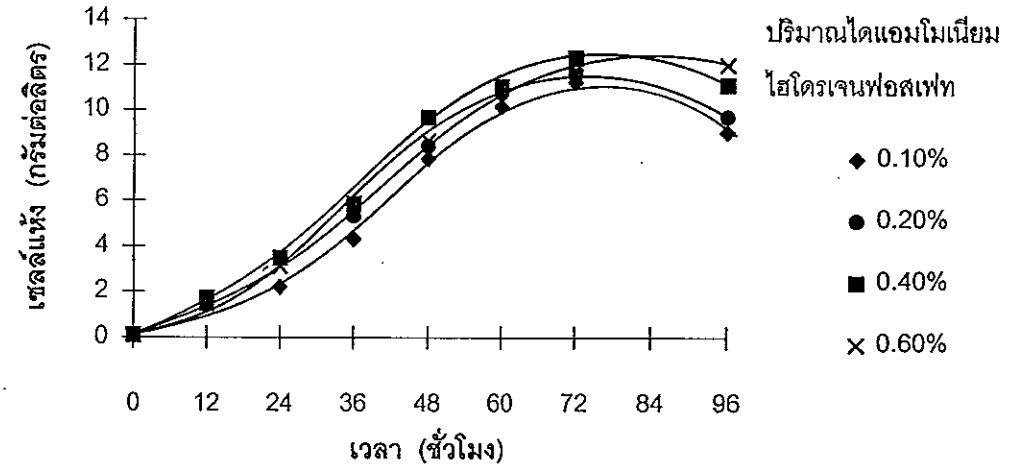
ผลของปริมาณไนโตรเจน เนื่องจากปริมาณไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญของยีสต์จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทมีปริมาณต่าง ๆ คือ 0.1 0.2 0.4 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบการเจริญ พบว่า ยีสต์เจริญดีที่สุดเมื่อเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท 0.4 เปอร์เซ็นต์ (ภาพประกอบ 11) ขณะที่ใช้ปริมาณ 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ อาจจะมีปริมาณของแหล่งไนโตรเจนไม่เพียงพอทำให้ปริมาณเซลล์ที่ได้น้อยและมีแนวโน้มของการเจริญต่ำกว่าและเมื่อใช้สาร 0.6 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์มีปริมาณเซลล์และการเจริญต่ำกว่าการเติมสาร 0.4 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ปริมาณเซลล์แห้งที่เวลา 72 ชั่วโมง ดังนี้สาร 0.1 เปอร์เซ็นต์ได้เซลล์แห้ง 11.24 กรัมต่อลิตร 0.2 เปอร์เซ็นต์ได้เซลล์แห้ง 11.56 กรัมต่อลิตร 0.4 เปอร์เซ็นต์ได้เซลล์แห้ง 12.34 กรัมต่อลิตร และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ได้เซลล์แห้ง 12.06 กรัมต่อลิตร แสดงว่าต้องใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญจึงจะทำให้ยีสต์เจริญได้ดีและไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อมีสารในปริมาณมากเกินความต้องการ โดย Reed และ Nagodawithana (1991) กล่าวว่ายีสต์ต้องการไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสังเคราะห์โปรตีน การเติมแหล่งไนโตรเจนในปริมาณมากอาจมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ เช่นเดียวกับการทดลองของ ชุตินุช สุจริต (2540) ซึ่งเลี้ยง *C. tropicalis* TISTR 5146 ในอาหารน้ำนึ่งปลาทูน่าที่แยกโปรตีนและไขมันออก พบว่าเมื่อเติมแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนอัน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟท และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท ยีสต์เจริญได้น้อยกว่าการไม่เติมสารเหล่านี้ และการเติมที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์จะมีการเจริญต่ำที่สุดทั้งนี้เนื่องจากการเติมแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนปริมาณมากมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้

จากการทดลองการเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท 0.6 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์มีการเจริญต่ำกว่าการใช้สาร 0.4 เปอร์เซ็นต์อาจเกิดจากในอาหารที่ใช้เลี้ยง

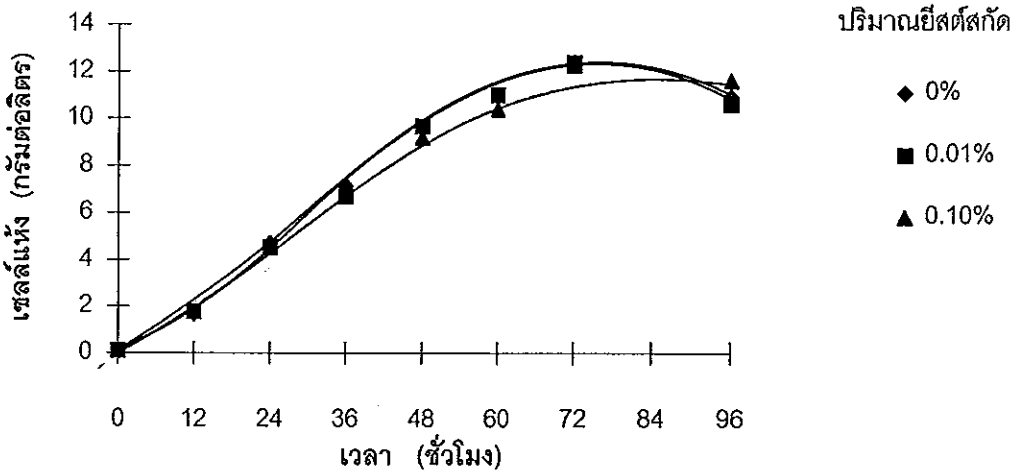
Candida sp. Y47 มีแหล่งไนโตรเจนบ้างแล้วและถ้าใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท 0.4 เปอร์เซ็นต์ ก็เพียงพอต่อความต้องการ กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย (2532) ศึกษาปริมาณของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปสพบว่า ที่ความเข้มข้นของสารเกินกว่า 0.8 เปอร์เซ็นต์ สารจะละลายได้ยากโดยเฉพาะเมื่อผ่านความร้อนถ้ามีไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทมากเกินไปทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการตกตะกอน จะทำให้เชื้อนำสารไปใช้ประโยชน์ได้ยาก ดังนั้นการเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทถ้าเติมให้พอเหมาะจะทำให้ยีสต์เจริญได้ดี จากการทดลองเห็นได้ว่าเมื่อมีแหล่งไนโตรเจนเพิ่มการเจริญเติบโตของยีสต์จะเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่งหลังจากนั้นแม้จะเพิ่มปริมาณของสารอีกยีสต์ก็ไม่สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทในการทดลองนี้เท่ากับ 0.4 เปอร์เซ็นต์

5.7 ผลของยีสต์สกัดต่อการเจริญ

ผลการศึกษาการเลี้ยงยีสต์ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท 0.4 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเติมยีสต์สกัดเพื่อเป็น growth factor ปริมาณต่างกันคือ 0.01 0.1 เปอร์เซ็นต์ และไม่เติมยีสต์สกัดในอาหาร พีเอชเริ่มต้น 6.0 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนทั้งที่มีการเติมและไม่เติมยีสต์สกัดให้ผลการเจริญไม่แตกต่างกัน (ภาพประกอบ 12) โดยยีสต์ *Candida* sp. Y47 ที่เลี้ยงให้ปริมาณเซลล์แห้งดังนี้ ในอาหารที่ไม่เติมยีสต์สกัดได้เซลล์แห้ง 12.40 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่เติมยีสต์สกัด 0.01 เปอร์เซ็นต์ได้เซลล์แห้ง 12.38 กรัมต่อลิตร และในอาหารเติมยีสต์สกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์ ได้เซลล์แห้ง 12.26 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง แสดงว่าการเติมยีสต์สกัดเพื่อเป็น growth factor ไม่จำเป็นสำหรับยีสต์ *Candida* sp. Y47 Reed (1981) กล่าวว่า ตามปกติยีสต์สกัดจัดเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ที่มีทั้งวิตามิน และแร่ธาตุซึ่งจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์นอกเหนือจากแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ แต่ในการทดลองนี้มีไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทเป็น



ภาพประกอบ 11 เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทปริมาณต่างๆ พีเอชเริ่มต้น 6.0 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 12 เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท 0.4 เปอร์เซ็นต์ เติมยีสต์สกัดปริมาณต่างกัน พีเอชเริ่มต้น 6.0 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

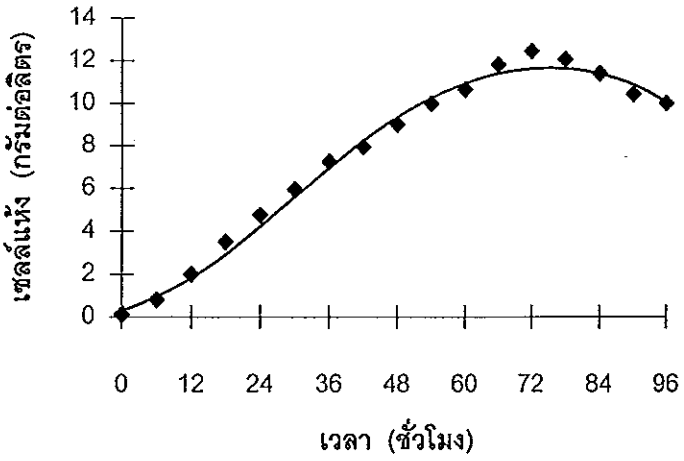
แหล่งไนโตรเจนและยีสต์สกัดที่ใช้มีปริมาณน้อยมากคือ 0.01 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ จึงไม่มีผลต่อการเจริญทำให้การเจริญของยีสต์ไม่แตกต่างกัน แต่ถ้าต้องการให้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณของยีสต์สกัดที่ใช้ต้องพอเหมาะ โดยผลการศึกษาของ อนุเทพ ภาสุระ และ ปราโมทย์ ศิริโรจน์ (2534) พบว่าปริมาณของยีสต์สกัดที่เติมลงไปจะแปรผันโดยตรงกับการเจริญของยีสต์ *C. tropicalis* สายพันธุ์ DMKU-10 ขณะเดียวกับที่ปริมาณโปรตีนในเซลล์จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อปริมาณยีสต์สกัดเพิ่มขึ้นจนถึงระดับความเข้มข้นหนึ่ง หลังจากนั้นปริมาณโปรตีนในเซลล์จะไม่เพิ่มขึ้นอีก เมื่อคำนึงถึงต้นทุนการผลิตจะทำให้ต้นทุนของการผลิตเพิ่มขึ้นถ้าเติมยีสต์สกัดลงในอาหาร ดังนั้นจากการทดลองนี้แสดงว่าอาหารที่ใช้เลี้ยง *Candida* sp. Y47 ซึ่งเติมน้ำมันปาล์มดิบ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท และแร่ธาตุต่าง ๆ มีสารอาหารทั้งคาร์บอน ไนโตรเจน วิตามิน และแร่ธาตุ เพียงพอต่อความต้องการของ *Candida* sp. Y47 จึงไม่จำเป็นต้องเติมยีสต์สกัดลงในอาหารอีก

5.8 ผลของการเจริญและปริมาณโปรตีนจากการเลี้ยงยีสต์ในฟลาสก์

ผลการเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ที่ทำการศึกษาในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในอาหารประกอบด้วยน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท 0.4 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า *Candida* sp. Y47 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.072 ต่อชั่วโมง ปริมาณเซลล์ที่ได้เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเลี้ยงยีสต์ที่เพิ่มขึ้นได้เซลล์แห้ง 12.46 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 13) เมื่อนำตัวอย่างเซลล์ที่เวลา 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ซึ่งเป็นตัวแทนของการเจริญในช่วง mid log phase, late log phase, stationary phase และ late stationary phase ตามลำดับ มาหาปริมาณโปรตีน (ตาราง 11) พบว่าปริมาณโปรตีนในเซลล์ช่วง mid log phase มีปริมาณสูงที่สุด เมื่อยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้นในระยะ late log phase ปริมาณโปรตีนจะลดลง และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในระยะ early stationary phase จากการทดลองปริมาณโปรตีนลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase อาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่าง โดย Vananuvat และ Kinsella (1975) กล่าวว่า ยีสต์ที่มีการเจริญเติบ

โตช้าจะมีการแบ่งเซลล์ช้า ทำให้ผลิตกรดนิวคลีอิกได้น้อยจึงมีโปรตีนสะสมอยู่ในเซลล์มากเมื่อเซลล์มีอัตราการเจริญสูงมีการแบ่งเซลล์สูงขึ้นปริมาณโปรตีนของเซลล์จะสะสมได้น้อยลง อย่างไรก็ตาม *Candida* sp. Y47 เป็นยีสต์ที่มีการเจริญเติบโตและมีปริมาณโปรตีนของเซลล์ไม่ต่ำกว่ามาตรฐานคืออยู่ในช่วง 40 - 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ควรจะมีในยีสต์ซึ่งในการศึกษาของ Koh และคณะ(1983) ทดลองเลี้ยง *Torulopsis candida* Y128 ในฟลาสก์โดยมีน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟท 0.47 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ พบว่ายีสต์เจริญที่ 24 ชั่วโมงให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร เท่ากับ 10.98 และให้โปรตีน 42.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณโปรตีนของเซลล์ที่ได้ไม่แตกต่างกันมาก

จากการทดลองเมื่อมีการปรับสภาวะสำหรับการเลี้ยงยีสต์ในฟลาสก์ให้เหมาะสมต่อการเจริญทำให้ยีสต์มีปริมาณโปรตีนของเซลล์เมื่อเจริญสูงสุดได้เท่ากับ 43.31 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เปรียบเทียบกับที่เจริญโดยไม่ได้ปรับสภาวะซึ่งมีปริมาณโปรตีนของเซลล์เมื่อเจริญสูงสุดได้เท่ากับ 35.09 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Candida* sp. Y47 เป็นผลให้ยีสต์มีการเจริญดีขึ้นและผลิตโปรตีนได้มากขึ้น



ภาพประกอบ 13 การเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท 0.4 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 6.0 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ตาราง 11 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์และปริมาณโปรตีนของเซลล์ของ *Candida* sp. Y47 ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณโปรตีนรวม (กรัมต่อลิตร)
24	4.74	45.26	2.14
48	9.00	36.09	3.24
72	12.46	43.31	5.39
96	10.00	37.20	3.72

6. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ในถังหมัก

หลังจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าแล้ว จึงทำการทดลองเลี้ยงยีสต์ให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในถังหมัก โดยใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตร มีปริมาตรในการหมัก 3.5 ลิตร โดยอาหารเลี้ยงยีสต์ประกอบด้วยน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท 0.4 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ในถังหมักดังนี้

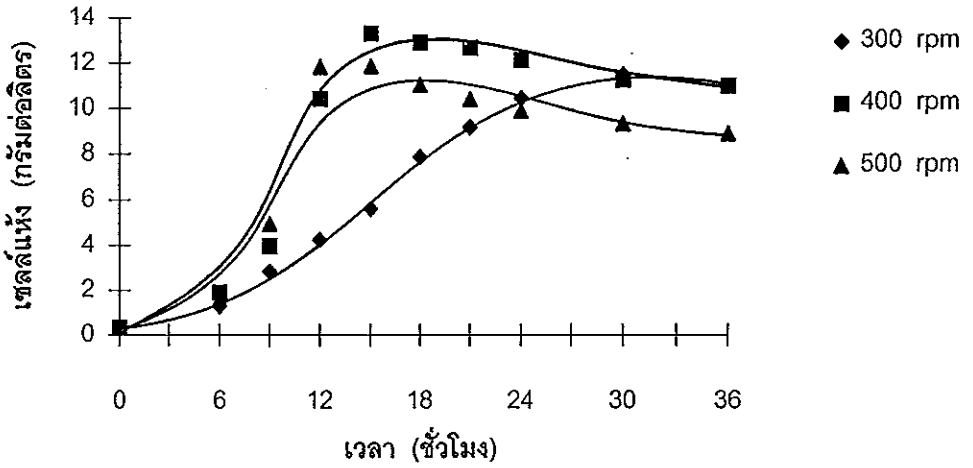
6.1 ผลของความเร็วรอบของการกวน

จากการเลี้ยงยีสต์ในถังหมักโดยให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ปรับระดับความเร็วรอบของการกวนเป็น 300 400 และ 500 รอบต่อนาที โดยไม่มีการควบคุมพีเอชในระหว่างการหมัก เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่า การใช้ความเร็วรอบของการกวน 400 รอบต่อนาที มีผลทำให้ *Candida* sp. Y47 เจริญดีที่สุด ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 13.32 กรัมต่อลิตรภายในระยะเวลา 15 ชั่วโมง ดังภาพประกอบ 14 การเจริญของยีสต์ที่มีความเร็วรอบของการกวน 300 และ 500 รอบต่อนาที ยีสต์มีการเจริญให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 11.50 กรัมต่อลิตรภายในระยะเวลา 30 ชั่วโมง และ 11.86 กรัมต่อลิตรภายในระยะเวลา 15 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าความเร็วรอบของการกวนที่ต่างกันทำให้การเจริญและระยะเวลาของการเจริญไม่เท่ากัน การทดลองที่ความเร็วรอบของการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาที น้ำมันปาล์มกระจายตัวไม่ดีและปริมาณอากาศเข้าไปในอาหารได้น้อย อีกทั้งเมื่อเซลล์มีการแบ่งตัวเกิดการเกาะกลุ่มขึ้นจะทำให้เซลล์ได้รับอากาศและอาหารไม่ทั่วถึงจึงมีการเจริญอย่างช้า ๆ และยังพบว่ายีสต์ใช้เวลาในการปรับตัวนานเพื่อเข้าสู่ระยะ log phase ทำให้ปริมาณเซลล์ที่ผลิตได้ต่ำ Tan และ Gill (1984) ทำการทดลองเลี้ยงยีสต์ในอาหารเติมน้ำมันมะกอกพบว่าอัตราการเจริญจะลดลงถ้าความเร็วรอบของการกวนต่ำเพราะการกระจายตัวของน้ำมันไม่ทั่วถึง เมื่อความเร็วรอบของการกวนเพิ่มขึ้นเป็น 400 และ 500 รอบต่อนาที ออกซิเจนละลายในอาหารได้ดีและยีสต์คลุกเคล้ากับอาหารได้ทั่วถังหมักเป็นผลให้ยีสต์ใช้เวลาในการเจริญสั้นลงแต่การกวนด้วยความเร็วรอบของใบพัดในระดับสูงส่งผลให้เซลล์ของยีสต์ที่กำลังมีการแตกหน่อถูกดึงให้แยกออกจากเซลล์แม่ในเวลาที่ไม่เหมาะสม

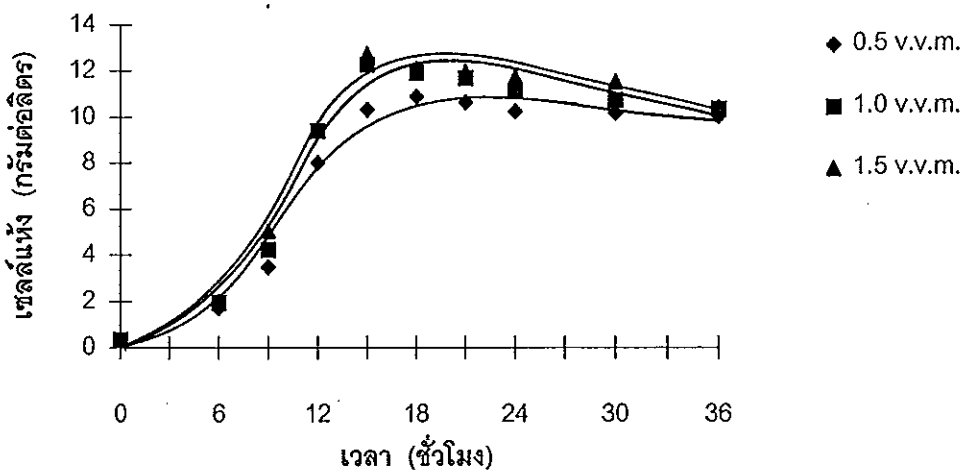
ทำให้เซลล์ได้รับบาดเจ็บและเกิดการตายขึ้น (Stanbury and Whitaker, 1986) จากการทดลองเมื่อให้ความเร็วรอบของการกวน 400 และ 500 รอบต่อนาทียีสต์เจริญได้ใกล้เคียงกัน แสดงว่าที่ 400 รอบต่อนาทียีสต์จะได้รับอากาศเพียงพอแล้ว และที่ 500 รอบต่อนาที ยีสต์อาจจะได้รับอันตรายจากการหมุนของใบพัดทำให้ยีสต์มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกับที่ 400 รอบต่อนาที สอดคล้องกับการทดลองของ ชุตินุช สุจริต (2540) ทดลองเลี้ยง *C. tropicalis* TISTR 5146 ในอาหารน้ำนึ่งปลาทูน่าในถังหมัก มีความเร็วรอบของการกวนเป็น 300 400 และ 500 รอบต่อนาที พบว่าความเร็วรอบของการกวน 400 รอบต่อนาทีเป็นความเร็วของใบพัดที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญของยีสต์ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.89 กรัมต่อลิตร ในการทดลองต่อไปจึงใช้ความเร็วรอบของการกวนเท่ากับ 400 รอบต่อนาที

6.2 ผลของการให้อากาศ

จากการศึกษาผลของการให้อากาศเมื่อเลี้ยงยีสต์ *Candida* sp. Y47 ในถังหมักที่ให้ความเร็วรอบของการกวนเท่ากับ 400 รอบต่อนาที และให้อากาศ 0.5 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อาหารพีเอชเริ่มต้น 6.0 ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยง 36 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในภาพประกอบ 15 เมื่อให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ยีสต์มีการเจริญต่ำกว่าการอากาศ 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยที่ให้ปริมาณเซลล์แห้งที่ได้ คือ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ได้เซลล์แห้ง 10.88 กรัมต่อลิตรที่เวลา 18 ชั่วโมง 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ได้เซลล์แห้ง 12.30 และ 12.74 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 15 ชั่วโมง ซึ่งการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาทียีสต์มีการเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ช้า ทำให้ยีสต์มีการเจริญต่ำและใช้ระยะเวลาในการเจริญได้เซลล์แห้งนานกว่า แสดงว่าการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาทียีสต์ได้รับอากาศไม่เพียงพอทำให้ยีสต์ผลิตเซลล์ได้น้อยกว่าการให้อากาศ 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในขณะที่ทำการหมักจะเกิดกลิ่นของแอลกอฮอล์ขึ้น ส่วนที่ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาทีปริมาณของออกซิเจนในอาหารจะถูกส่ง



ภาพประกอบ 14 เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 6.0 ในถังหมักที่มีความเร็วรอบของการกวนต่างกัน ให้อากาศ1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 15 เปรียบเทียบการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 6.0 ในถังหมักให้ความเร็วรอบของการกวน 400 รอบต่อนาที ให้อากาศปริมาณต่างกัน อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เข้าสู่ถังหมักได้มากกว่าและเพียงพอต่อการผลิตมวลเซลล์รวมทั้งแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำมันจะมีความหนืดมากกว่าน้ำตาลทำให้ต้องมีการให้อากาศมากอาหารจึงจะคลุกเคล้าได้ดีทั่วทั้งถังหมัก (Tan and Gill, 1985)

เนื่องจากการให้อากาศเข้าสู่ระบบการหมักในถังหมักเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนในถังหมักนอกเหนือจากการใช้ใบพัด และถ้าสามารถให้อากาศได้อย่างเหมาะสมกับความต้องการของยีสต์จะทำให้ยีสต์เจริญเติบโตได้สูงและผลิตเซลล์ได้มาก เพราะ Stanbury และ Whitaker (1986) กล่าวว่า ในอาหารที่มีออกซิเจนละลายอยู่ในอาหารสูงจุลินทรีย์จะมีอัตราจำเพาะของการดูดซึมออกซิเจนได้สูงสุดและสามารถผลิตเซลล์ได้สูงสุดแต่ถ้าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารต่ำจะทำให้จุลินทรีย์ผลิตเซลล์ได้น้อย และเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์จะเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากยีสต์ต้องการออกซิเจนเพื่อเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในขบวนการหายใจ และเป็นปัจจัยที่สำคัญในขบวนการสังเคราะห์กรดไขมันและสเตียรอล (sterol) ที่ผนังของเมมเบรน (Rose and Harrison, 1971) รวมทั้ง Postma และคณะ (1989) กล่าวว่ายีสต์พวก *S. cerevisiae* และ *C. utilis* เป็นยีสต์พวก facultative fermentation เมื่อเจริญในที่มีอากาศไม่เพียงพอต่อความต้องการจะทำให้ยีสต์เปลี่ยนแปลงสภาพจากการผลิตเซลล์เป็นผลิตแอลกอฮอล์ทำให้ปริมาณเซลล์ที่ผลิตต่ำลง และกรณีที่มีการให้อากาศที่มากเกินพอจะทำให้ยีสต์สามารถผลิตเซลล์ได้มากเช่นเดียวกับ Carlotti และคณะ (1991) ซึ่งผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยใช้เชื้อร่วมกันระหว่าง *C. kefyr* LY496 และ *C. valida* LY497 ในอาหารที่เติมน้ำเวย์ (whey) มีปริมาตรของการหมักเท่ากับ 3 ลิตร พีเอชของอาหารเท่ากับ 4.5 ความเร็วรอบของการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาที การให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่มีการให้อากาศอย่างเต็มที่เพื่อไม่ให้เกิดการผลิตเอธานอลขึ้น ทำให้มีการเจริญของยีสต์เต็มที่ให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 17 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจากการทดลองนี้ปริมาณอากาศที่เหมาะสำหรับการผลิตยีสต์เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มากที่สุดเท่ากับ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

6.3 ผลของพีเอชต่อการหมัก

ผลจากการเลี้ยง *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่มีความเร็วรอบของการกวน 400 รอบต่อนาที ให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในสภาวะที่มีการควบคุมพีเอชที่ 6.0 และไม่มีการควบคุมพีเอช พบว่าการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชระหว่างการหมัก การเจริญของยีสต์ให้ผลใกล้เคียงกัน (ภาพประกอบ 16) จากการติดตามระดับของพีเอชตลอดการทดลองในสภาวะที่ไม่มีการควบคุมพีเอช พีเอชของอาหารจะลดลงเรื่อย ๆ เมื่อยีสต์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นในระยะ late log phase พีเอชของอาหารลดลงอย่างรวดเร็วจาก 6.0 จนต่ำกว่า 3.0 ภายในระยะเวลา 9 ชั่วโมง จากนั้นยีสต์ยังคงมีการเจริญต่อไปอีกระยะหนึ่งก่อนเข้าสู่ stationary phase แสดงให้เห็นว่า *Candida* sp. Y47 สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชกว้างตั้งแต่ 3.0 - 6.0 ซึ่งการควบคุมพีเอชระหว่างการหมักได้เซลล์แห้งเท่ากับ 10.54 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 15 ชั่วโมง ในขณะที่ไม่ควบคุมพีเอชจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 11.54 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 15 ชั่วโมง กรณีที่ยีสต์สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีสภาพเป็นกรดมีผลดี คือ ป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียในระหว่างเลี้ยงได้ (Rydin *et al.*, 1990)

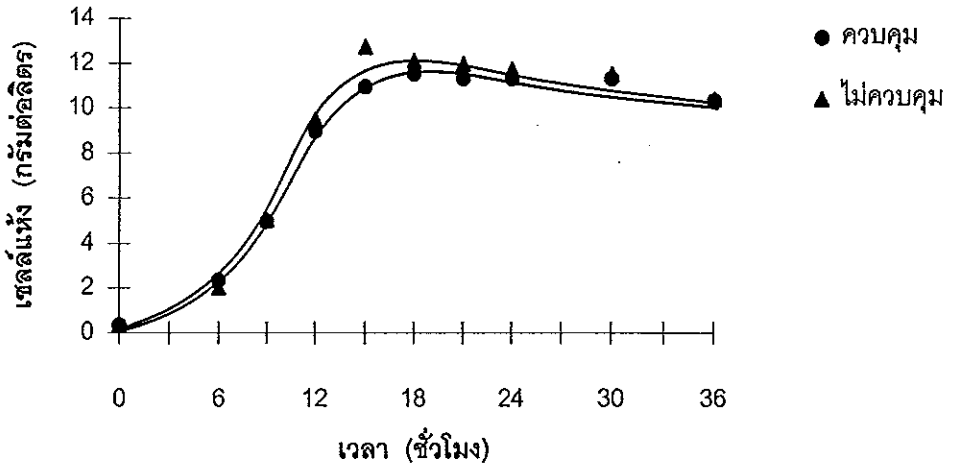
Koh และคณะ (1985) เลี้ยง *Torulopsis candida* Y128 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้น้ำมันปาล์ม 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การหมักที่ไม่ควบคุมพีเอชจะทำให้ พีเอชของอาหารลดลงเป็น 3.0 ภายในเวลา 8 ชั่วโมงของการเจริญ พีเอชที่เหมาะสมของยีสต์สายพันธุ์นี้เท่ากับ 3.5 และสามารถเจริญได้ดีที่พีเอชในช่วง 3.0 - 6.0 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 3.0 การเจริญของยีสต์จะลดลง ในงานวิจัยหลายงานไม่จำเป็นต้องมีการควบคุมพีเอชในระหว่างการเลี้ยงยีสต์ในถังหมัก ชุตินุช สุจริต (2540) เลี้ยง*C. tropicalis* TISTR 5146 ในถังหมักมีอาหารน้ำนึ่งปลาทูน่าบรรจุ 1.5 ลิตร พบว่า ยีสต์เจริญได้ดีที่สุดเมื่อให้อากาศ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ความเร็วรอบของการกวนเท่ากับ 400 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 5.5 โดยไม่ควบคุมพีเอชระหว่างการหมัก มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.37 ต่อชั่วโมง ได้เซลล์แห้งเท่ากับ 8.86 กรัมต่อลิตร และปราโมทย์ ศิริโรจน์ (2521) เลี้ยงยีสต์ YK32 ในน้ำต้มถั่วเติมกากน้ำตาล 12 เปอร์เซ็นต์ พีเอชของอาหารเท่ากับ 6.5 ไม่มีการ

ควบคุมพีเอชระหว่างการหมัก วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 15.20 จากการทดลองการเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่ไม่ควบคุมพีเอชระหว่างการหมักยีสต์สามารถเจริญได้ใกล้เคียงกับสภาวะที่ควบคุมพีเอชดังนั้นการทดลองต่อไปไม่จำเป็นต้องควบคุมพีเอชและสามารถตัดปัญหาการใช้สารเคมีในการควบคุมพีเอช

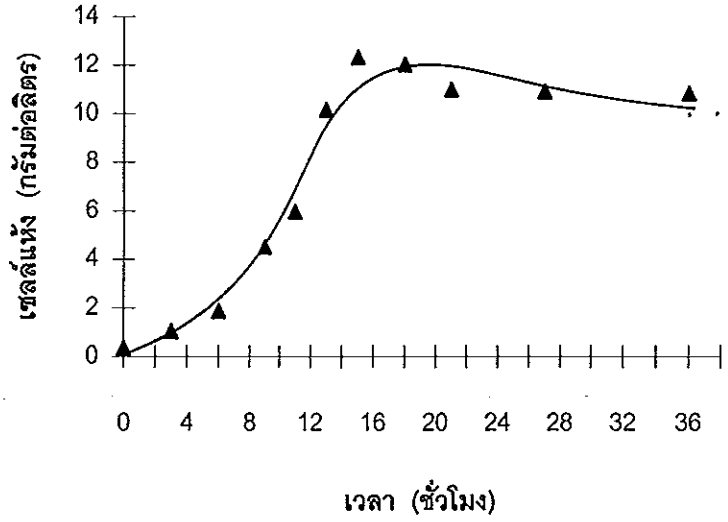
6.4 ผลการศึกษาการเจริญ ปริมาณโปรตีนและปริมาณกรดอะมิโนในเซลล์จากยีสต์ที่เลี้ยงในถังหมักในสภาวะที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *Candida* sp. Y47 ในอาหารที่เหมาะสม พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เลี้ยงในถังหมักปริมาตรการหมักเท่ากับ 3.5 ลิตร มีความเร็วรอบของการกวน 400 รอบต่อนาที ให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการควบคุมพีเอช ระยะเวลาการเลี้ยง 36 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 17) พบว่ายีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.231 ต่อชั่วโมง ได้ปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 12.32 กรัมต่อลิตรที่เวลา 15 ชั่วโมง สำหรับปริมาณเซลล์ที่ได้เมื่อเทียบกับการเลี้ยงในฟลาสก์ให้ปริมาณเซลล์ไม่แตกต่างกันแต่ระยะเวลาในการเจริญได้เซลล์สูงสุดสั้นลง ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนพบว่าเมื่อยีสต์มีการเจริญในอาหารและสภาวะที่เหมาะสม ยีสต์จะผลิตโปรตีนได้สูงในระยะเวลาแรกของการเจริญคือ ภายในเวลา 9 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 18) เมื่อยีสต์มีการเจริญสูงขึ้นปริมาณโปรตีนจะลดลงจนกระทั่งปริมาณโปรตีนลดลงมากเมื่อผลิตเซลล์สูงสุดที่เวลา 15 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะ late log phase ได้โปรตีนเท่ากับ 42.72 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง จากนั้นปริมาณเซลล์เริ่มลดลงขณะที่ปริมาณโปรตีนจะสูงขึ้นอีกเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้สอดคล้องกับ Vananuvat และ Kinsella (1975) พบว่า *S. fragilis* เลี้ยงในถังหมักแบบกะมีการผลิตโปรตีนของเซลล์เพิ่มขึ้นจนถึงระยะเวลาหนึ่งจากนั้นปริมาณโปรตีนจะลดลงเมื่อยีสต์มีการเจริญสูงเนื่องจากมีการผลิตกรดนิวคลีอิกเพิ่มขึ้นเพื่อนำไปใช้ในการแบ่งตัวของเซลล์ทำให้มีโปรตีนของเซลล์ลดลง เมื่อยีสต์เจริญเข้าสู่ระยะ late log phase ปริมาณโปรตีนจะเริ่มคงที่จนกระทั่งการเจริญสิ้นสุดลง เช่นเดียวกับข้อมูลที่ได้จาก *Trichoderma harzianum* ซึ่งเจริญในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่ามีปริมาณโปรตีนของเซลล์สูงที่ระยะแรกของการเจริญ และเมื่อเซลล์มีการเจริญสูงสุดปริมาณโปรตีนของเซลล์จะลดลง หลังจากนั้นโปรตีนของเซลล์จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

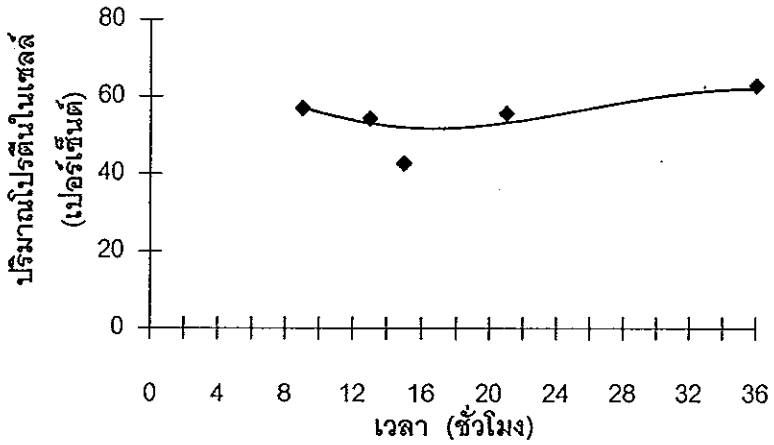
จนกระทั่งสิ้นสุดการเจริญ (Vikineswary *et al.*,1997) และผลจากการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในเซลล์ที่เวลา 15 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นและกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นรวมทั้งหมด 18 ชนิด (ยกเว้นทริปโตเฟนที่ไม่ได้วิเคราะห์) ได้ปริมาณของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ดังแสดงในตาราง 12 จากตารางจะเห็นได้ว่า กรดอะมิโนที่ *Candida* sp. Y47 ผลิตได้มีปริมาณน้อยกว่ากรดอะมิโนของ *C. tropicalis* F129 และ *C. boidinii* ซึ่งเจริญในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มดิบและเมทธานอล ตามลำดับ และเมื่อเทียบระหว่างกรดอะมิโนจำเป็นกับค่าที่เสนอโดย FAO พบว่ากรดอะมิโนจำเป็นที่มีปริมาณมากกว่าชัดเจนคือ กรดอะมิโนธรีโอนีน และกรดอะมิโนวาลีนที่มีมากกว่าเล็กน้อย กรดอะมิโนไลซีนมีปริมาณเท่ากัน ส่วนไอโซลูซีน ลูซีน และ ฟีนิลอะลานีนมีปริมาณต่ำกว่า สำหรับกรดอะมิโนเมธไทโอนีนไม่พบแต่เมื่อได้ทดลองเอาเซลล์ที่อยู่ในระยะ stationary phase (36 ชั่วโมง) มาวิเคราะห์พบว่าในเซลล์มีเมธไทโอนีนแต่เกิดขึ้นในปริมาณน้อยมาก (0.139 กรัมต่อ 100 กรัมเซลล์) ซึ่ง ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี (2534) รายงานว่าโปรตีนที่ผลิตจากจุลินทรีย์มักจะมีกรดอะมิโนที่มีกำมะถัน เช่น เมไธโอนีนอยู่ในปริมาณต่ำ รวมทั้งในงานวิจัยอื่น ๆ ที่ใช้ ยีสต์พวก *Candida* พบว่า *Candida* sp. จะผลิตเมธไทโอนีนได้ต่ำเช่นกัน จึงเห็นได้ว่ายีสต์พวก *Candida* ซึ่งเลี้ยงในอาหารเติมน้ำมันปาล์มพบว่าจะมีกรดอะมิโนที่เป็นเมทไธโอนีน และ ซีสตีน ในปริมาณต่ำและกรดอะมิโนที่พบในปริมาณสูง คือ แอสปาติก และ กลูตามิก



ภาพประกอบ 17 เปรียบเทียบผลของพีเอชต่อการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ใน อาหารเหลวพีเอชเริ่มต้น 6.0 ให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อ ปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราของการกวน 400 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 18 การเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 6.0 ให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อ ปริมาตรอาหารต่อนาที ความเร็วรอบของการกวน 400 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 18 ปริมาณโปรตีนของยีสต์ *Candida* sp. Y47 เมื่อเจริญในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 6.0 ความเร็วรอบของการกวน 400 รอบต่อนาที ให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ตาราง 12 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของยีสต์ *Candida* sp. Y47 เมื่อเก็บเซลล์ที่เวลา 15 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับของ FAO และยีสต์ *Candida* sp. สายพันธุ์อื่น ๆ (หน่วย : กรัม / 100 กรัมโปรตีน)

Amino Acid	FAO profile[a]	*Candida tropicalis* F129 on crude palm oil[b]	*Candida boidinii* on methanol[c]	*Candida* sp. Y47 on crude palm oil
Essential				
Threonine	2.8	6.4	4.42	3.22
Valine	4.2	5.7	4.59	4.5
Methionine	2.2	1.3	0.86	-
Isoleucine	4.2	5.1	3.98	3.6
Leucine	4.8	7.2	5.29	4.14
Phenylalanine	2.8	4.3	3.39	2.6
Lysine	4.2	8.4	6.01	4.21
Non-Essential				
Aspartic	ND	8.9	ND	5.4
Glutamic	ND	15.6	ND	6.0
Serine	ND	5.8	ND	3.13
Glycine	ND	4.5	ND	2.6
Histidine	ND	2.2	ND	1.7
Arginine	ND	5.4	ND	3.0
Alanine	ND	6.2	ND	4.4
Proline	ND	3.5	ND	3.13
Tyrosine	2.8	2.8	-	2.4
Cystine	2.0	0.5	-	1.2

หมายเหตุ

ND : ไม่ได้วิเคราะห์

- : วิเคราะห์ไม่พบ

a : Bernstein และคณะ (1977)

b : Lee และคณะ (1993)

c : Cooney และคณะ (1975)

บทที่ 4

สรุป

1.ผลจากการแยกยีสต์ซึ่งมีความสามารถใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถแยกยีสต์ได้ดังนี้ คือ *Candida* sp. 33 สายพันธุ์ Basidiomycetous yeast 7 สายพันธุ์ *Schizosaccharomyces* sp. 4 สายพันธุ์ *Hansenula* sp. 2 สายพันธุ์ และ *Trichosporon* sp. *Rhodotorula* sp. *Pichia* sp. *Kloekera* sp. *Kluyveromyces* sp. ชนิดละ 1 สายพันธุ์ แสดงว่ายีสต์ที่สามารถใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนส่วนใหญ่ คือ *Candida* sp. และยีสต์ที่ศึกษาต่อไปเป็น *Candida* sp.

2. การคัดเลือกยีสต์ที่เจริญได้ดีในอาหารเติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ จากยีสต์ที่เป็น single cell ได้ยีสต์เจริญดีที่สุดและรองลงมา 5 สายพันธุ์ คือ Y3, Y4, Y6, Y18 และ Y47 เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักแห้งและปริมาณโปรตีนที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *Candida* sp. Y47 มีการเจริญสูงที่สุดให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.98 กรัมต่อลิตร มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 37.86 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

3. แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยง *Candida* sp. Y47 คือ น้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 7.22 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณโปรตีนของเซลล์เท่ากับ 35.09 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

4. อาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Candida* sp. Y47 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร 100 มิลลิลิตร พบว่ายีสต์เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่เติมน้ำมันปาล์มดิบ 2 เปอร์เซ็นต์ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท 0.4 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยเติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.072 ต่อชั่วโมง และให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 12.46 กรัมต่อลิตร และมีโปรตีนของเซลล์เท่ากับ 43.31 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 72 ชั่วโมง

5. เมื่อเลี้ยง *Candida* sp. Y47 ในอาหารที่เหมาะสมปริมาตร 3.5 ลิตร บรรจุในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร พบว่า *Candida* sp. Y47 เจริญได้ดีที่สุดเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 และเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ควบคุมพีเอชในระหว่างการหมัก ให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราของการกวน 400 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง พบว่ายีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.25 ต่อชั่วโมง ได้เซลล์แห้งเท่ากับ 12.32 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 15 ชั่วโมง เซลล์ยีสต์ที่ได้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 42.72 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และเซลล์แห้งมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตทุกชนิดใกล้เคียงกับค่าที่ FAO ตั้งไว้ยกเว้นกรดอะมิโนเมธไทโอนีนที่พบน้อยมาก

ข้อเสนอแนะ

1. ยีสต์ที่ได้จากการคัดแยกมีความสามารถเจริญและใช้น้ำมันได้ ดังนั้นสามารถนำยีสต์ที่แยกได้ไปใช้ประโยชน์ ในด้านการบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของไขมันได้

2. ควรมีการศึกษาถึงยีสต์ที่ทำการทดลองว่าเป็นยีสต์ที่ก่อโรคหรือไม่ รวมถึงความเป็นพิษอื่น ๆ เช่น ปริมาณกรดนิวคลีอิกของเซลล์ที่ผลิตได้

3. ควรมีการศึกษานำยีสต์ที่ผลิตได้มาใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงสัตว์เศรษฐกิจ เช่น ไก่ไข่ ไก่เนื้อ นกกระทา หรือสัตว์น้ำ เป็นต้น ซึ่งเป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตไปสู่ระดับอุตสาหกรรม

บรรณานุกรม

กำเนิด สุภัณวงษ์. 2534. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักในอุตสาหกรรม. ใน จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. หน้า 86 - 110. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย. 2532. การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสและศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชัยรัตน์ นิลนนท์. 2538. การใช้ปุ๋ยเพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพปาล์มน้ำมัน. ใน ปาล์มน้ำมัน. สงขลา : ภาควิชาธรณีศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชุตินุช สุจริต. 2540. การเลี้ยงยีสต์ในน้ำนึ่งปลาทูน่าหลังการแยกโปรตีนและไขมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชูชาติ อุรัมภรณ์ และ นพดล พีระเสถียร. 2540. สถานการณ์เกษตรปี 2540. ว. เศรษฐกิจธนาคารกรุงเทพ จำกัด (มหาชน). 29(7) : 10 - 11.

ดวงพร คันธโชติ. 2528. โปรตีนเซลล์เดียว. ว. คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์. 4(1) : 826 - 829.

ดวงพร คันธโชติ. 2530. ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในรูปของเซลล์ ใน จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. หน้า 1 - 28. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

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

ดุษณี ธนะบริพัฒน์, นวลพรรณ ณ ระนอง, สมหวัง วีระวุฒิวงศ์, ทิพย์พงา บุญเหมือน และ ขนิษฐา ยอดธรรมา. 2534. การผลิตยีสต์ขนมปังจากน้ำกากส่า. ว. วิทย มศว. 7(2) : 43 - 51.

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

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ธีระพงศ์ จันทรนิยม, ประกิจ ทองคำและ ชัยรัตน์ นิลนนท์. 2540. การสำรวจพื้นที่ปลูกและปัญหาพื้นฐานการผลิตของปาล์มน้ำมันในภาคใต้ของประเทศไทย. ว. สงขลานครินทร์. 19(3) : 381 - 385.

ธีรพงศ์ ศันสนียวรรธน์. 2532. การศึกษาเชื้อราและยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากวัสดุเศษเหลือของกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มดิบ. คณะอุตสาหกรรมการเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นพรัตน์ บำรุงรักษ์. 2534. เอกสารคำสอนวิชาหลักพืชศาสตร์ (Plant science). คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปราโมทย์ ศิริโรจน์. 2521. การคัดเลือกสายพันธุ์และการเลี้ยงยีสต์ที่มีโปรตีนสูงในน้ำทิ้งจากขบวนการแปรรูปอาหารถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2523. ปาล์มน้ำมัน. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มนัส ชัยสวัสดิ์, สมมาตร จุลิกพงศ์, ยุพาวดี โพชนุกูล, เสาวณี แย้มแสง, วิวัฒน์ แซ่หลี, ศาสตรา ขาวหนู และปริญญา เชาวนาศัย. 2531. รายงานการวิจัยเรื่อง ตลาดน้ำมันปาล์ม : ศึกษาความต้องการใช้ภายในประเทศ. สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. จุลินทรีย์โปรตีน <u>ใน</u> เทคโนโลยีชีวภาพ. หน้า 254 - 263. กรุงเทพฯ : คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศักดิ์ศิลป์ โชติสกุล. 2541. การแปรรูปปาล์มน้ำมัน <u>ใน</u> เอกสารวิชาเรื่องปาล์มน้ำมัน. หน้า 124 - 129. กรุงเทพฯ : กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร.

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

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2539. แนวทางการพัฒนาปาล์มน้ำมันในแผนพัฒนาฯ ฉบับที่ 8 (2540 - 2544). สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรกฎาคม 2539. หน้า 1 - 28 .

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2541 . สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2539/41. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 78.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2541. ปาล์มไทย : พัฒนาศักยภาพรับมือ "AFTA". ว.สรุปข่าวธุรกิจ ธ. กสิกรไทย. 24(12) : 3 - 8.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2532. อาหารและเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ใน จุลชีววิทยาทางอาหาร. หน้า 368 - 376. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

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

อนุเทพ ภาสุระ และ ปราโมทย์ ศิริโรจน์. 2534. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ *Candida tropicalis* เพื่อการผลิตเป็นอาหารโปรตีนเซลล์เดียวจากแป้งมันสำปะหลัง. ว. วิทยาศาสตร์ ม.ก. 9(1-3) : 48 - 53.

Barnell, H.R. 1974. New foods. In Biology and The Food Industry. pp. 44 - 51. Southampton : The Camelot Press Ltd.

Beneke, E.S. and Stevenson, K.S. 1978. Classification of food and beverage fungi. In Food and Beverage Mycology. pp.1 - 15. Benchal, L.R. ed. Westport : Avi publishing company, Inc.

Bernstein, S., Tzeng, C.H. and Sisson, D. 1977. The commercial fermentation of cheese whey for the production of protein and/or alcohol. In Single Cell Protein from Renewable and Nonrenewable Resources. pp. 1-9.

Gaden, E.L. and Humphery, J.A.E. eds. New York : An Interscience Publication.

Berry, D.R. 1989. Growth of yeast In Process Development of Industrial Organisms. pp. 277 - 302. Neway, J.O. ed. California.

Bui, K. and Galzy, P. 1990. Food yeast. In Yeast Technology. pp. 241 - 249. Spancer, J.F.T. and Spancer, D.M. eds. New York : Springer - Verlag.

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.

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

Deshpande, M. and Daniels, L. 1995. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. Bioresource Technol. 36 : 143 - 150.

Enwefa, C. 1991. Biomass production from banana skins. Microbiol. Biotechnol. 36 : 283 - 284.

Gray, W.D. 1962. Microbial protein for the space age. In Development in Industrial Microbiology. Vol. 3. pp. 63 - 71. Koda, C.F. ed. New York : Plenum Press.

Hartley, C.W.S. 1977. The products of the oil palm and their extraction In The Oil Palm. pp. 1 - 10. New York : Longman Inc.

Herbert, D., Philips, P.J. and Strange. 1971. Chemical analysis of microbial cells In Method in Microbiology. Vol. 58. pp. 245 - 252. Noris, J.R. and Ribbon, D.W. eds. New York : Academic Press.

Hongpattarakere, T. and H - Kittikun, A. 1995. Optimization of single cell protein production from cassava starch using *Schwanniomyces castellii.* World J. Microbiol. Biotechnol. 11 : 607 - 609.

Hottinger, H.H., Richardson, T., Amundson, C.H. and Stuiber, D.A. 1974. Utilization of fish oil by *Candida lipolytica* and *Geotrichum candida* . J. Milk Food Technol. 37 : 522 - 528.

Hui, Y. H. 1996. Palm oil. In Bailey's Industrial Oil and Fat Products. : Edible Oil and Fat : Oil and Oilseed. Vol. 2 pp. 271 - 376. New York : John Wiley & Sons, Inc.

Jaaffar, A. 1994.The Malaysian palm oil - A Dynamic industry. In Selected Readings on Palm Oil and Its Uses. pp.1 - 10. Palm Oil Research Institute of Malaysia eds. Kuala Lumpur : Harian (Zulfadzli) Sdn. Bhd.

Johnson, V., Singh, M., Saini, V.S., Sista, V.R. and Yadav, N.K. 1992. Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast : *Rhodotorula glutinis.* World J. Microbiol. Biotechnol. 8 : 382 - 384.

Koh, J. S., Kodama, T. and Minoda, Y. 1983. Screening of yeasts 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.

Kreger-van Rij, N.J.W. 1984. The Yeasts : A Taxonomic study. Amsterdum : Elsevier Science Publishing Company, Inc.

Kuhad, R.C., Singh, A., Tripathi, K.K., Sexena, R.K. and Eriksson, K.L. 1997. Microorganisms as an alternative source of protein. Nutrition Rev. 55(3) : 65 - 75.

Kurtzman, C.P. 1990. Classification and general properties of yeast In Yeast Biotechnology and Biocatalysis. Herbert, V. ed. pp. 1 - 3. New York : Marcel Dekker, Inc.

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

Lee, B.H. 1996. Fundamentals of food biotechnology. pp. 265 - 275. New York : VCH Publishers, Inc.

Lemmel, S.A., Heimsch, R.C. and Edwards, L.L. 1979. Optimizing the continuous production of *Candida utilis* and *Saccharomycopsis fibuliger* on potato processing wastewater. Appl. and Environ. Microbiol. 37(2) : 227 - 232.

Levine, D.W. and Cooney, C.L. 1973. Isolation and characterization of a thermotolerant methanol - utilizing yeast. Appl. Microbiol. 26(6) : 982 - 990.

Ma, A.N. 1994. Extraction of crude palm oil and palm kernel oil. In Selected Readings on Palm Oil and Its Uses. pp. 24 - 34. Palm Oil Research Institute of Malaysia eds. Kuala Lumpur : Harian (Zulfadzli) Sdn. Bhd

Maclellan, M. 1983. Palm oil. JAOCS. 60(2) : 320 - 325.

Meyrath, J. and Suchanek, G. 1972. Inoculation techniques effects due to quality and quantity of inoculum. In Methods in Microbiology, Vol. 7B. pp. 159 - 209. Norris, J.R. and Ribbons, D.W. eds. London : Academic Press.

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

Montet, D., Ratomahenina, A., Ba, A., Pina, M., Graille, J. and Galzy, P. 1983. Production of single cell protein from vegetable oils. J. Ferment. Technol. 61(4) : 417 - 420.

Papaparaskevas, D., Christakopoulos, P., Kekos, D. and Macris, B. 1992. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. Biotechnol. Lett. 14(5) : 397 - 402.

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.

Pike, M. 1980. Growth in importance of palm oil in the 1970s. In Fat and Oils : Chemistry and Technology. pp. 215 - 247. Hamilton, R.J. and Bhati, A. eds. London : Applied Science Publishers Ltd.

Postma, E., Kuiper, A., Tomasouw, W.F., Scheffers, W.A. and Dijken, J.P. 1989. Compettition for glucose between the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. Appl. Env. Microbiol. 55(12) : 3214 - 3220.

Reed, G. 1981. Use of microbial culture : yeast products. Food Technol. 35(1) : 89 - 94.

Reed, G. and Nagodawithana, T.W. 1991. Yeast technology. 2nd ed. U.S.A. : An AVI Book.

Rodney, P.J. and Paul, F.G. 1984. A review of yeast ionic nutrition. Process Biochem. 16 : 48 - 59.

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

Rossi, J. and Clementi, F. 1985. Protein production by *Schwanniomyces castellii* on starchy substrates, in liquid and solid cultivation. J. of Food Technol. 20 : 319 - 330.

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.

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

Tan, K.H. and Gill, C.O. 1984. Effect of culture conditions of batch growth of *Saccharomycopsis lipolytica* on olive oil. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 20 : 201 - 206.

Tan, K.H. and Gill, C.O. 1985. Batch growth of *Saccharomycopsis lipolytica* on animal fat. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 21 : 292 - 298.

Vananuvat, P. and Kinsella, J.E. 1975. Production of yeast protein from crude lactose by *Saccharomyces fragilis*. Batch culture studies. J. of Food Sci. 40 : 336 - 341.

Vikineswary, S., Kuthubutheen, A.J. and Ravoof, A.A. 1997. Growth of *Trichoderma harzianum* and *Myceliophthora thermophila* in palm oil sludge. World J. Microbiol. Biotechnol. 13 : 189 - 194.

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

Welsh, F.W. and Zall, R.R. 1984. Single cell protein from waste fishery refrigeration brines. Process Biochem. 19 : 122 - 123.

Yeeh, Y. 1996. Single cell protein of *Rhodotorula* sp. Y38 from ethanol, acetic acid and acetaldehyde. Biotechnol. Lett. 18(4) : 411 - 416.

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

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสำหรับแยกและคัดเลือกยีสต์ (Isolation medium for yeast) (Koh *et al.*,1983)

น้ำมันปาล์มดิบ	20.00	กรัม
NH_4NO_3	4.00	กรัม
KH_2PO_4	4.70	กรัม
Na_2HPO_4 12 H_2O	0.30	กรัม
$MgSO_4$ 7 H_2O	1.00	กรัม
$FeSO_4$ 7 H_2O	0.01	กรัม
$CaCl_2$ 2 H_2O	0.01	กรัม
$MnSO_4$ 4 H_2O	0.01	กรัม
Yeast extract	0.10	กรัม
Chloramphenicol	0.02	กรัม
Tween 20	1.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 5.5 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ (อาหารชนิดเหลวและชนิดแข็ง) (Koh *et al.*, 1983)

ส่วนผสมต่าง ๆ เหมือนกับอาหารสำหรับคัดเลือกยีสต์ ยกเว้นไม่ต้องเติม chloramphenicol ละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากัน ปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 5.5 นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ในกรณีที่เตรียมเป็นอาหารแข็งให้ใส่ผงวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

อาหารสำหรับเก็บเชื้อ (Stock medium) (Koh *et al.*, 1983)

น้ำมันปาล์มดิบ	10.00	กรัม
Yeast extract	10.00	กรัม
Malt extract	10.00	กรัม
Peptone	5.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากัน บรรจุลงในหลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที นำมาวางไว้ให้เอียงเพื่อทำเป็น slant

Carbon assimilation medium

Bacto yeast nitrogen base	6.7	กรัม
แหล่งคาร์บอนที่ใช้	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ยกเว้นน้ำตาลที่ใช้จะทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Nitrate assimilation medium

Bacto yeast carbon base	11.7	กรัม
KNO_3	0.78	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Carbon fermentation medium

เตรียมเช่นเดียวกับอาหารสำหรับทดสอบ carbon assimilation แต่ให้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ เป็นปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร เติม bromocresol purple เป็นตัวบ่งชี้ บรรจุหลอดดักก๊าซอยู่ภายใน

Acetate agar

Glucose	1.00	กรัม
KCl	2.50	กรัม
Sodium acetate trihydrate	2.50	กรัม
Yeast extract	2.50	กรัม
Agar	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากัน และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Gorodkowa's agar

Glucose	1.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากัน และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Yeast Malt extract broth (YM broth)

Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากัน ปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 4.5 บรรจุลงหลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ในกรณีที่เตรียมเป็นอาหารแข็ง (YM agar) ให้ใส่ผงวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

Urease test medium

Glucose	1.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
KH_2PO_4	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เติม phenol red 0.012 กรัม เป็นตัวบ่งชี้ ละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากัน ปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 6.8 บรรจุลงหลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมยูเรียที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนแท้โดยวิธีของ Lowry (Herbert *et al.*,1971)

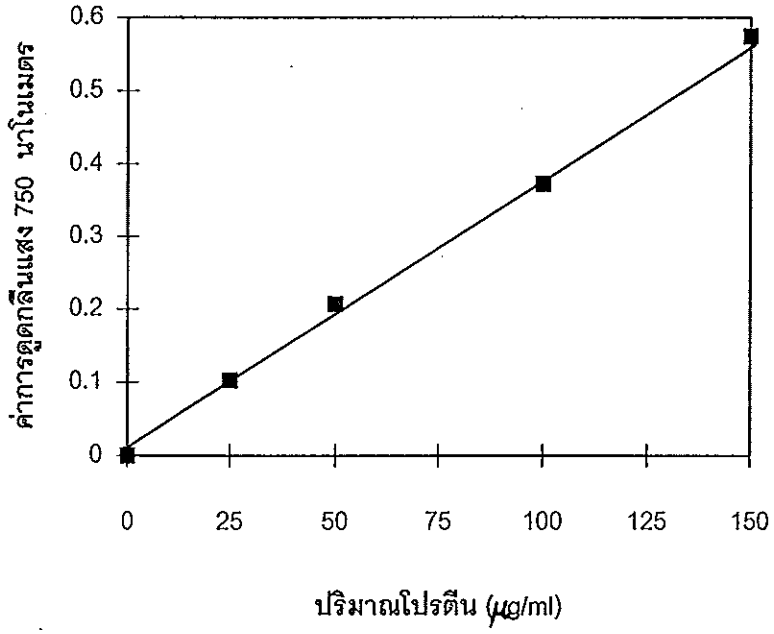
สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลาย 1 N NaOH
2. สารละลาย 0.5 เปอร์เซ็นต์ของ $CuSO_4 5H_2O$ ในสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ของ potassium sodium tartrate (สารละลาย A)
3. สารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ของ Na_2CO_3 (สารละลาย B)
4. Alkaline copper solution : ผสมสารละลาย A 2 มิลลิลิตร กับสารละลาย B 50 มิลลิลิตร (เตรียมให้เสร็จใช้ทันทีเพราะสารผสมนี้สลายตัวได้ง่าย)
5. Folin reagent 1 N : โดยการเติมน้ำกลั่นต่อ Folin reagent ในอัตราส่วน 1 : 1
6. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน : Bovine Serum Albumin (BSA) เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
7. เซลล์แห้งประมาณ 100 ไมโครกรัม

วิธีการ

1. ชั่งเซลล์ที่อบแห้งประมาณ 100 ไมโครกรัม ใส่ในหลอดทดสอบเติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร และ 1.0 N NaOH 0.5 มิลลิลิตร นำไปใส่ใน water bath ที่น้ำกำลังเดือดนาน 5 นาที และปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น
2. เติมน้ำยา alkaline copper solution ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที รีบเติม diluted folin reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วปล่อยทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้เกิดสีอย่างชัดเจน
3. ใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เป็น reagent blank
4. เตรียมสารละลายโปรตีนมาตราฐาน (โดยใช้ BSA 25 - 200 ไมโครกรัม) นำไปวิเคราะห์โดยวิธีการเดียวกันกับตัวอย่างที่ต้องการหาโปรตีนข้างต้น

5. หลังจากปล่อยทิ้งไว้ 30 นาที วัดสีโดยเทียบกับ blank ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร
6. ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีน อ่านค่าโปรตีนของตัวอย่างที่ต้องการจากกราฟมาตรฐานในส่วนที่เป็นเส้นตรง



ภาพประกอบ 19 กราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีน

การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ (วัดการเจริญของยีสต์)

ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเลี้ยงที่เวลาต่าง ๆ ครั้งละ 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน เติมสารผสมของ acetone และ ethanol (อัตราส่วน 1 : 1) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งล้างเซลล์ต่ออีก 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้จากการปั่นล้างเข้าอบที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้น้ำหนักเซลล์แห้งที่แน่นอนประมาณ 16 ชั่วโมง

ภาคผนวก ค

ตาราง 13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่แยกได้ทั้ง 9 ชนิด

ชนิดของยีสต์	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์	สปอร์	การสืบพันธุ์	ลักษณะเส้นใย	การเจริญในอาหารเหลว
Candida sp.	สีขาว/สีครีม กลม ขอบเรียบ ด้าน/เป็นมัน	รูปร่างกลม/รูปไข่	ไม่พบ	แตกหน่อแบบ multi	มีการสร้างเส้นใยเทียม/แท้	ตกตะกอน/เป็นฝ้า
Rhodotorula sp.	สีแดง กลม ขอบเรียบ เป็นมันวาว	รูปร่างกลม เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ	ไม่พบ	แตกหน่อแบบ multi	ไม่พบ	ตกตะกอน
Pichia sp.	สีขาว กลม ขอบหยัก ด้าน	รูปร่างกลม	1-4 สปอร์ รูปร่างกลม	แตกหน่อแบบ multi	สร้างเส้นใยเทียม	เป็นฝ้า
Kloekera sp.	สีครีม กลม ขอบเรียบ เป็นมันเยิ้ม	รูปร่างเป็น apiculate	ไม่พบ	แตกหน่อแบบ bipolar	สร้างเส้นใยเทียม	เป็นฝ้า
Kluyveromyces sp.	สีครีม กลม ขอบเรียบ ด้าน	รูปร่างกลม	1-4 สปอร์ รูปร่าง reniform	แตกหน่อแบบ multi	ไม่พบ	เป็นฝ้า

ตาราง 13 (ต่อ)

ชนิดของยีสต์	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์	สปอร์	การสืบพันธุ์	ลักษณะเส้นใย	การเจริญในอาหารเหลว
Hansenula sp.	สีครีม กลม ขอบหยัก ด้าน	เซลล์รูปไข่ เป็นเซลล์เดี่ยว	1-4 สปอร์ รูปร่าง saturn	แตกหน่อแบบ multi	ไม่พบ	เป็นฝ้า
Schizosaccharomyces sp.	สีขาวครีม กลม ขอบหยัก ด้าน มีเส้นใย	รูปไข่ / รูปทรงกระบอก	ไม่พบ	binary fission	สร้างเส้นใยแท้	เป็นฝ้า
Trichosporon sp.	สีครีม กลม ขอบหยัก ด้าน มีเส้นใย	รูปไข่ / รูปทรงกระบอก	พบการสร้าง arthro - spore	แตกหน่อแบบ multi	สร้างเส้นใยแท้	เป็นฝ้า
Basidiomycetous yeast	สีขาว / ครีม กลม ขอบหยัก ด้าน มีเส้นใย	รูปร่างกลม/ รูปไข่ พบ clamp connection	ไม่พบ	แตกหน่อแบบ multi	สร้างเส้นใยแท้	เป็นฝ้า

ตาราง 14 ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Candida*

ลักษณะทางสรีระวิทยา	Y2	Y3	Y4	Y7	Y9	Y10
การหมักน้ำตาล						
Glucose	+	+	v	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	-	+	+
Erythritol	-	-	-	+	+	+
การใช้น้ำตาลและไนเตรท						
Glucose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	-	+	+
Maltose	+	+	+	-	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	+
Cellobiose	+	-	+	+	-	+
Raffinose	-	+	+	-	-	+
Erythritol	-	-	-	+	+	+
Mannitol	+	+	+	-	-	+
Inositol	-	-	-	-	-	-
KNO_3	-	-	-	-	-	-
ทดสอบการใช้ยูเรีย	-	-	-	-	-	v

หมายเหตุ

v ยีสต์มีการเจริญและใช้น้ำตาลได้ภายในเวลา 1-3 วัน

\+ ยีสต์มีการเจริญและใช้น้ำตาลได้หลังจาก 3 วัน

\- ยีสต์ไม่สามารถเจริญและใช้น้ำตาลได้เลย

ตาราง 14 (ต่อ)

ลักษณะทางสรีรวิทยา	Y11	Y13	Y14	Y15	Y16	Y17
การหมักน้ำตาล						
Glucose	+	+	+	+	+	v
Galactose	-	-	+	+	+	+
Sucrose	-	-	+	v	+	+
Erythritol	-	-	-	-	+	+
การใช้น้ำตาลและไนเตรท						
Glucose	v	+	+	v	+	+
Galactose	-	+	+	+	+	+
Sucrose	-	+	+	v	+	+
Maltose	-	-	+	v	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	+
Cellobiose	-	-	-	+	+	v
Raffinose	-	-	-	-	-	+
Erythritol	-	-	-	-	+	+
Mannitol	-	+	-	-	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-
KNO_3	-	-	-	-	-	-
ทดสอบการใช้ยูเรีย	-	-	-	v	-	+

ตาราง 14 (ต่อ)

ลักษณะทางสรีรวิทยา	Y18	Y20	Y21	Y23	Y24	Y25
การหมักน้ำตาล						
Glucose	v	v	+	v	+	v
Galactose	+	+	+	+	-	+
Sucrose	+	+	+	+	-	+
Erythritol	+	-	+	+	-	+
การใช้น้ำตาลและไนเตรท						
Glucose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	-	+
Sucrose	+	+	+	+	-	+
Maltose	+	+	+	+	-	+
Lactose	+	-	+	+	-	+
Cellobiose	+	+	+	-	-	+
Raffinose	-	+	-	+	-	+
Erythritol	+	-	+	+	-	+
Mannitol	+	+	+	+	-	+
Inositol	-	-	-	-	-	-
KNO_3	-	-	-	-	-	-
ทดสอบการใช้ยูเรีย	-	-	-	-	-	-

ตาราง 14 (ต่อ)

ลักษณะทางสรีรวิทยา	Y26	Y27	Y28	Y29	Y31	Y32
การหมักน้ำตาล						
Glucose	v	+	+	+	v	v
Galactose	+	+	+	+	v	+
Sucrose	+	+	+	+	v	+
Erythritol	+	-	+	+	+	+
การใช้น้ำตาลและไนเตรท						
Glucose	v	v	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	v	v	v	v	+	v
Maltose	+	+	+	+	+	+
Lactose	v	v	+	+	+	+
Cellobiose	v	v	-	-	-	-
Raffinose	v	v	+	v	+	v
Erythritol	+	+	+	+	+	+
Mannitol	v	v	v	v	+	v
Inositol	+	+	-	-	+	-
KNO_3	-	-	-	-	-	-
ทดสอบการใช้ยูเรีย	v	-	-	-	v	-

ตาราง 14 (ต่อ)

ลักษณะทางสรีรวิทยา	Y34	Y35	Y36	Y37	Y38	Y39
การหมักน้ำตาล						
Glucose	v	v	+	+	v	+
Galactose	+	+	+	+	+	v
Sucrose	+	+	+	+	+	v
Erythritol	+	+	-	-	-	v
การใช้น้ำตาลและไนเตรท						
Glucose	+	+	+	+	v	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	+
Cellobiose	v	v	-	-	-	v
Raffinose	v	v	+	+	+	v
Erythritol	+	+	-	-	-	+
Mannitol	v	v	v	+	-	v
Inositol	+	+	-	+	-	+
KNO_3	-	v	-	-	-	-
ทดสอบการใช้ยูเรีย	-	-	-	-	-	v

ตาราง 14 (ต่อ)

ลักษณะทางสรีรวิทยา	Y40	Y41	Y43	Y44	Y46	Y47
การหมักน้ำตาล						
Glucose	+	v	+	v	+	v
Galactose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Erythritol	+	+	+	-	-	-
การใช้น้ำตาลและไนเตรท						
Glucose	+	v	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	-	-	+
Cellobiose	v	-	-	-	-	-
Raffinose	v	v	-	-	+	+
Erythritol	+	+	+	-	+	-
Mannitol	v	v	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	-	-	-
KNO_3	-	-	-	-	-	-
ทดสอบการใช้ยูเรีย	-	v	-	-	-	-

ตาราง 15 ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Rhodotorula*

ลักษณะทางสรีรวิทยา	Y22
การหมักน้ำตาล	
Glucose	+
Galactose	-
Sucrose	-
Erythritol	-
การใช้น้ำตาลและไนเตรท	
Glucose	+
Galactose	-
Sucrose	+
Maltose	+
Lactose	-
Cellobiose	-
Raffinose	-
Erythritol	-
Mannitol	+
Inositol	-
KNO_3	-
ทดสอบการใช้ยูเรีย	v

ตาราง 14 (ต่อ)

ลักษณะทางสรีรวิทยา	Y48	Y49	Y50	Y51
การหมักน้ำตาล				
Glucose	+	+	v	+
Galactose	+	+	+	+
Sucrose	-	+	+	-
Erythritol	-	-	-	-
การใช้น้ำตาลและไนเตรท				
Glucose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	-
Sucrose	-	+	+	-
Maltose	+	+	+	-
Lactose	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-
Mannitol	+	-	-	+
Inositol	-	-	-	-
KNO_3	-	-	-	-
ทดสอบการใช้ยูเรีย	-	-	-	-

ตาราง 16 ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Pichia*

ลักษณะทางสรีรวิทยา	Y33
การหมักน้ำตาล	
Glucose	v
Galactose	+
Sucrose	+
Erythritol	+
การใช้น้ำตาลและไนเตรท	
Glucose	+
Galactose	+
Sucrose	+
Maltose	+
Lactose	-
Cellobiose	v
Raffinose	v
Erythritol	+
Mannitol	v
Inositol	-
KNO_3	-
ทดสอบการใช้ยูเรีย	-

ตาราง 17 ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Kloekera*

ลักษณะทางสรีรวิทยา	Y8
การหมักน้ำตาล	
Glucose	+
Galactose	+
Sucrose	+
Erythritol	+
การใช้น้ำตาลและไนเตรท	
Glucose	+
Galactose	+
Sucrose	+
Maltose	+
Lactose	+
Cellobiose	+
Raffinose	+
Erythritol	+
Mannitol	-
Inositol	-
KNO_3	-
ทดสอบการใช้ยูเรีย	-

ตาราง 18 ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Kluyveromyces*

ลักษณะทางสรีระวิทยา	Y6
การหมักน้ำตาล	
Glucose	v
Galactose	+
Sucrose	+
Erythritol	+
การใช้น้ำตาลและไนเตรท	
Glucose	v
Galactose	+
Sucrose	+
Maltose	+
Lactose	-
Cellobiose	v
Raffinose	+
Erythritol	+
Mannitol	+
Inositol	-
KNO_3	-
ทดสอบการใช้ยูเรีย	-

ตาราง 19 ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Hansenula*

ลักษณะทางสรีรวิทยา	Y1	Y12
การหมักน้ำตาล		
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Sucrose	+	+
Erythritol	-	-
การใช้น้ำตาลและไนเตรท		
Glucose	+	+
Galactose	+	-
Sucrose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	-	-
Cellobiose	v	v
Raffinose	-	-
Erythritol	-	-
Mannitol	+	-
Inositol	-	-
KNO_3	+	+
ทดสอบการใช้ยูเรีย	-	-

ตาราง 20 ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Schizosaccharomyces*

ลักษณะทางสรีรวิทยา	Y19
การหมักน้ำตาล	
Glucose	v
Galactose	+
Sucrose	-
Erythritol	+
การใช้น้ำตาลและไนเตรท	
Glucose	+
Galactose	+
Sucrose	+
Maltose	+
Lactose	+
Cellobiose	-
Raffinose	-
Erythritol	-
Mannitol	+
Inositol	-
KNO_3	-
ทดสอบการใช้ยูเรีย	-

ตาราง 21 ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ *Trichosporon*

ลักษณะทางสรีรวิทยา	Y5
การหมักน้ำตาล	
Glucose	v
Galactose	+
Sucrose	+
Erythritol	+
การใช้น้ำตาลและไนเตรท	
Glucose	+
Galactose	+
Sucrose	+
Maltose	+
Lactose	+
Cellobiose	+
Raffinose	+
Erythritol	+
Mannitol	+
Inositol	v
KNO_3	-
ทดสอบการใช้ยูเรีย	-

ตาราง 22 ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของ Basidiomycetous yeast

ลักษณะทางสรีรวิทยา	Y30	Y42	Y45
การหมักน้ำตาล			
Glucose	v	v	v
Galactose	v	v	+
Sucrose	+	v	+
Erythritol	+	+	+
การใช้น้ำตาลและไนเตรท			
Glucose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Cellobiose	+	-	-
Raffinose	+	+	+
Erythritol	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Inositol	+	-	-
KNO_3	v	v	v
ทดสอบการใช้ยูเรีย	v	v	v

ไดอะแกรมแสดงการบ่งชี้ชนิดของยีสต์ (Key to the genera)

(Kreger–van Rij, 1984)

1 a Vegetative reproduction exclusively by cross wall formation without constriction

Schizosaccharomyces.....p. 414

b Vegetative reproduction exclusively by cells formed on stalks

Sterigmatomyces..... p. 921

c Vegetative reproduction by the formation of terminal buds on a conidiophore; the conidiophore elongates to develop a succession of conidia

Sympodiomyces.....p. 930

d Other forms of vegetative reproduction 2

2 a Vegetative reproduction by unipolar budding on a broad base; true mycelium may occur

Malassezia.....p. 882

b Vegetative reproduction by bipolar budding on a broad base 3

c Vegetative reproduction by multipolar budding ; true mycelium, arthrospores and ballistospores may also occur 8

3 a Ascospores formed 4

b Ascospores not formed 6

4 a Ascospores cap-shaped

Wickerhamia.....p. 440

b Ascospores hat- or helmet-shaped

Hanseniaspora..... p. 154

c Ascospores spherical 5

5 a Ascospores smooth, hyaline, conjugating in pairs in the ascus; a narrow ledge is not visible under the light microscope

Saccharomycodes.....p. 396

b Ascospores warty and brown

Nadsonia.....p. 279

c Ascospores smooth or warty, with or without an indistinctly visible ledge, not brown, not conjugating in pairs in the ascus

Hanseniaspora..... p. 154

6 a Glucose fermented 7

b Glucose not fermented

Schizoblastosporion.....p. 909

7 a Strong acetic acid formation from glucose; on malt agar growth is slow and cells are short-lived

Eeniella *

b No strong acetic acid formation from glucose; growth not slow

Kloekera.....p. 873

8 a Ballistospores formed 9

b Ballistospores not formed 11

9 a Teliospores formed

Sporidiobolus..... p. 532

b Teliospores not formed 10

10a Cultures pink, red or orange

Sporobolomyces..... p. 911

b Cultures ream colored to slightly yellow

Bullera
Fibulobasidium } see *Bullera* key...p. 577
Sirobasidium

11a Some vegetative cells triangular

Trigonopsis..... p. 963

b Vegetative cells not triangular 12

12a Strong acetic acid formation from glucose; on malt agar growth is slow and cells are short-lived 13

b Not this combination of characters 14

13a Ascospores formed

Dekkera..... p. 146

b Ascospores not formed

Brettanomyces..... p. 562

14a Ascospores formed 15

b Ascospores not formed 41

15a Nitrate assimilated 16

b Nitrate not assimilated 19

16a Abundant true mycelium and budding cells; the hyphal septa have a dolipore visible under the light microscope as a small dark dot in the middle of the septum

Ambrosiozyma..... p. 106

b True mycelium present, scarce or absent; without Septal dolipores 17

17a Hat-shaped ascospores formed in globose compartment at distal end of tube-shaped ascus

Pachysolen.....p. 289

b Ascus not tube-shaped 18

18a Ascospores spherical with a warty wall

Citeromyces..... p. 117

b Ascospores hat-shaped, helmispherical or Saturn-shaped

Hansenula..... p. 165

c Ascospores oblong with obtuse ends

Wickerhamiella..... p. 443

19a Ascus is sac-like protrusion on a vegetative cell; spores light amber or brown

Lipomyces..... p. 252

b Not this combination of characters 20

20a Abundant true mycelium in addition to budding yeast cells 21

b True mycelium scarce or absent 27

21a The hyphal septa have a dolipore visible under the light microscope as a small dark dot in the middle of the septum

Ambrosiozyma..... p. 106

b Hyphal septa without dolipores 22

22a Asci spindle-shaped, vegetative cells lemon-shaped or elongate, ascospore with a ledge

Arthroascus..... p. 114

b Not this combination of characters 23

23a Asci fromed exclusively on the true hyphae 24

b Asci not fromed exclusively on the true hyphae 26

24a Asci spherical with a small vegetative apical cell attached to it

Stephanoascus..... p. 431

b Asci without apical cell 25

25a Ascospores lunate; the wall at the two poles is thickened and gives the appearance of appendages

Guilliermondella ..... p. 151

b Ascospores not lunate

Saccharomycopsis..... p. 399

26a Nitrate assimilated

Hansenula.....p. 165

b Nitrate not assimilated

Pichia .....p. 295

27a Ascospores needle-shaped, one or two per ascus

Metschnikowia.....p. 266

b Ascospores spindle-shaped 28

c Ascospores of a different shape 29

28a Ascospores with a whip-like appendage

Nematospora.....p. 285

b Ascospores without a whip-like appendage; parasitic in intestine of *Drosophila*; not yet in culture

Coccidiascus.....p. 123

29a Ascospores oval to cylindrical; growth only on media with gaseous CO_2 present; occurrence confined to digestive tract of rabbits and certain other rodents

Cyniclomyces.....p. 125

b Not this combination of characters 30

30a Asci dehiscent 31

b Asci persistent 33

31a Ascospores clavate, and warty ahich may not be visible under the light microscope

Clavispora.....p. 120

b Ascospores spherical or ellipsoidal, thick-walled

Sporopachydermia ..... p. 427

c Ascospores hat- or Saturn-shaped

Pichia..... p. 295

d Ascospores reni- or crescentiform

Kluyveromyces..... ...p. 224

e Ascospores spherical or ellipsoidal 32

32a Fermentation of glucose vigorous

Kluyveromyces..... ...p. 224

b Fermentation of glucose weak, slow or absent

Pichia..... p. 295

33a Ascospores spherical, warty with an equatorial ledge

Schwanniomyces .....p. 423

b Ascospores lentiform, light brown

Wingea ..... p. 446

c Ascospores hat- or Saturn-shaped

Pichia..... p. 295

d Ascospore oblong with obtuse ends; not thick-Walled; one, seldom two per ascus

Lodderomyces ..... p. 263

e Ascospores spherical or ellipsoidal 34

34a Conjugation immediately preceding ascus formation 35

b No conjugation immediately preceding ascus formation 39

35a Ascospores spherical or ellipsoidal, warty or with ridges 36

b Ascospores spherical and smooth 37

36a Fermentation of glucose vigorous

Torulaspora .....p. 434

b Fermentation of glucose not vigorous; usually slow, weak or absent

Dekeryomyces .....p. 130

37a Early formation of a pellical on liquid media

Pichia..... p. 295

b No early formation of a pellical on liquid media 38

38a Conjugation usually between individual cells

Zygosaccharomyces.....p. 449

b Conjugation usually between a cells and its bud

Torulaspora .....p. 434

39a Early formation of a pellical on liquid media

Issatchenki..... p. 214

b No early formation of a pellical on liquid media 40

40a Ascospores ellipsoidal, thick-walled

Pachytichospora.....p. 292

b Ascospores spherical or ellipsoidal, not thick-walled

Saccharomyces .....p. 379

41a Teliospores formed 42

b Teliospores not formed 43

42a Cultures yellow, orange or due to the presence of carotenoid pigments

Rhodosporidium..... p. 509

b Cultures not yellow, orange or due to the presence of carotenoid pigments

Leucosporidium .....p. 496

43a Basidiospores formed 44

b Basidiospores not formed 46

44a Basidia arranged in synnemata

Chionosphaera.....p. 470

b Basidia not arranged in synnemata 45

45a Basidiospores produced in chain on the apex of the basidium

Filobasidiella .....p. 472

b Basidiospores produced in a whorl on the apex of the basidium

Filobasidium.....p. 483

46a Cultures pink or red due to the presence of carotenoid pigments 47

b Cultures not pink or red due to the presence of carotenoid pigments 50

47a Glucose fermented

Phaffia .....p. 890

b Glucose not fermented 48

48a Inositol assimilated

Cryptococcus.....p. 845

b Inositol not assimilated 49

49a Starch-like compounds formed

Yeast-like forms of *Taphrina* *

b Starch-like compounds not formed

Rhodotorula.....p. 893

50a Multilateral budding on a broad base combined with the formation of septa; no arthrospores

Oosporidium ..... p. 886

b Multilateral budding, true mycelium and arthrospore 51

c Multilateral budding, true mycelium may be formed, no arthrospore 52

51a Sarcina-like agglomerates of cells formed by septation in different planes

Sarcinosporon .....p. 906

b No formation of sarcina-like agglomerates of cells

Trichosporon.....p. 933

52a Formation of terminal needle-shaped blastospores

Aciculoconidium .....p. 558

b No formation of needle-shaped blastospores 53

53a No formation of pseudomycelium, inositol assimilated

Cryptococcus
Holtermannia } see *Cryptococcus* key...p. 846
Tremella

b Not this combination of characters

Candida
Tremella } see *Candida* key .....p. 591

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวขนิษฐา ณัฐนนท์วรกานต์

วัน เดือน ปีเกิด 16 ธันวาคม 2516

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ศึกษาศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี	2539

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

ทุนผู้ช่วยสอน