การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ในน้ำทิ้งจากขบวนการทำยางแผ่น

Studies on some factors influencing growth of yeasts in rubber sheet processing wastes

โดย

นางเยาวลักษณ์ ดิสระ

นางสาววิลาวัณย์ อัจจิบากุล

วิท
เลขหมู่ 373/892 ว35 ส2529 ฉ.1
01025
เลขทะเบียน
วัน เดือน ปี - 7 ส.ค. 2529

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2529

บทคัดย่อ

จากการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ จำนวน 3 ไอโซเลท คือ Y3, Y15 และ Y16 โดยใช้เครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่ายีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลท เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ในอาหารน้ำซีรัมชีสเติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ และมีระดับ pH 5.5 โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 72 ชั่วโมง ได้น้ำหนักแห้งของยีสต์ 12.50, 12.25 และ 12.50 กรัม ต่อลิตรตามลำดับ

Abstract

The optimization of growth under shake flask conditions of three isolates of yeast, Y3, Y15 and Y16, were studied. Maximal growth was obtained in rubber serum supplemented with 2% glucose, pH 5.5 at 28-30^{o}C using 3% inoculum and an agitation speed of 200 rpm. Upon cultivation for 72 hours, Y3, Y15 and Y16 yield cell dry weights of 12.50, 12.25 and 12.50 g/liter, respectively.

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
สารบาญตาราง	iii
สารบาญภาพ	iv
ความนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลการทดลองและวิจารณ์	18
สรุปผลการทดลอง	27
เอกสารอ้างอิง	28

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตยาง 3 แบบ	4
2	ผลการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุต่างๆ (ppm.) ในน้ำทิ้งจากโรงงานยางข้นและโรงงานยางแผ่นรมควัน	5
3	องค์ประกอบของน้ำทิ้งจากขบวนการผลิตยาง 2 แบบ	6
4	คุณสมบัติของน้ำซีรัมที่ได้จากการแยกยางจากหางน้ำยาง	7
5	ปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นและสำคัญในยีสต์บางชนิด	13
6	วิตามินชนิดต่างๆ ที่พบในเซลล์ยีสต์บางชนิด	14
7	คุณค่าทางอาหารของยีสต์ที่จะใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์	15

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนภาพแสดงการแปรรูปเบื้องต้นของน้ำยาง	3
2	แสดงการเจริญของยีสต์ในน้ำซีรัมที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน	19
3	แสดงการเจริญของยีสต์ในน้ำซีรัมโดยใช้ปริมาณกลูโคสต่างๆ กัน	20
4	แสดงการเจริญของยีสต์ในน้ำซีรัมที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ กัน	22
5	แสดงการเจริญของยีสต์ในน้ำซีรัมที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าต่างๆ กัน	23
6	แสดงการเจริญของยีสต์ในน้ำซีรัมที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเขย่า 200 rpm โดยปรับ pH เริ่มต้นของน้ำซีรัมต่างๆ กัน	24
7	แสดงการเจริญของยีสต์ในน้ำซีรัมที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ pH 5.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 200 rpm โดยควบคุมอุณหภูมิให้แตกต่างกัน	25

ความนำ

ในการพัฒนาประเทศให้เจริญก้าวหน้าจำเป็นต้องใช้ทรัพยากรธรรมชาติจำนวนหนึ่ง ซึ่งทรัพยากรบางอย่างเมื่อผ่านขบวนการผลิตแล้วจะมีกากหรือของเหลือใช้คงอยู่ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาติดตามมาคือ ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม เนื่องจากนับวันของเหลือใช้เหล่านี้ยิ่งจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีวิธีการที่จะจัดการหรือควบคุมได้อย่างเหมาะสม ด้วยเหตุนี้ขบวนการนำของเหลือใช้แล้วกลับมาใช้ให้เป็นประโยชน์อีก จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เพราะเป็นการใช้ทรัพยากรให้คุ้มค่าทั้งช่วยปรับปรุงสภาพแวดล้อมอีกด้วย

ของเหลือใช้ที่มีผู้สนใจนำกลับมาใช้ให้เป็นประโยชน์มักจะเป็นของเหลือใช้ที่เป็นผลิตผลทางการเกษตรหรือของเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งมักจะหาได้ง่ายและมีราคาถูก เช่น ฟางข้าว กากถั่วเหลือง กากน้ำตาล หางน้ำนม หรือแม้แต่น้ำทิ้งจากโรงงานต่างๆ ก็พยายามนำกลับมาใช้ประโยชน์อีก เช่น น้ำทิ้งจากโรงงานสับปะรดกระป๋อง น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง น้ำสำทิ้งจากโรงงานสุรา และน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษ เป็นต้น

ของเหลือใช้ที่กล่าวมาข้างต้นนิยมใช้เป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อนำเซลล์ของจุลินทรีย์มาใช้เป็นอาหารเสริมโปรตีนที่เรียกว่า จุลินทรีย์โปรตีน (single cell protein) ทั้งนี้เนื่องจากใช้เวลาในการผลิตน้อย ต้นทุนต่ำ และพื้นที่ที่ใช้ในการผลิตไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโปรตีนจากพืชหรือสัตว์ จุลินทรีย์โปรตีนที่นิยมใช้กันโดยทั่วๆ ไปมักจะเป็นยีสต์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Candida utilis* เนื่องจากเป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้มากชนิด เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วๆ ไปและให้ปริมาณโปรตีนสูง

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย พื้นที่ปลูกยางของประเทศร้อยละ 91 อยู่ในเขต 14 จังหวัดภาคใต้ ซึ่งสามารถผลิตน้ำยางสดได้ประมาณ 2 ล้านเมตริกตันต่อปี (นัยทัศน์,2529) น้ำยางสดเมื่อผ่านกรรมวิธีแยกเอาส่วนของเนื้อยางออกไปแล้วจะเหลือส่วนของน้ำใสเรียกว่า ซีรัม (serum) ซึ่งมีส่วนประกอบต่างๆ อยู่หลายชนิด ถ้าปล่อยน้ำทิ้งส่วนนี้ลงสู่ดินหรือแหล่งน้ำก็จะเกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อม (John,1972) จึงได้มีการทดลองนำของเหลวส่วนนี้ไปใช้ประโยชน์ เช่น นำไปเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงสาหร่าย (Phang,1977) หรือยีสต์ (John,1976) เป็นต้น

วัตถุประสงค์

การทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองต่อเนื่องจากการทดลองที่สุบาลีและเยาวลักษณ์ (2528) ได้ทำมาแล้ว มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะและธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ที่ให้ปริมาณโปรตีนสูง เพื่อนำมาเลี้ยงในน้ำทิ้งจากขบวนการทำยางแผ่น ทั้งนี้เพื่อให้ยีสต์มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้นทำให้ได้เซลล์ของยีสต์จำนวนมาก อันอาจจะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป เช่น เป็นอาหารเสริมโปรตีนให้กับสัตว์

การตรวจเอกสาร

องค์ประกอบของน้ำซีรัม

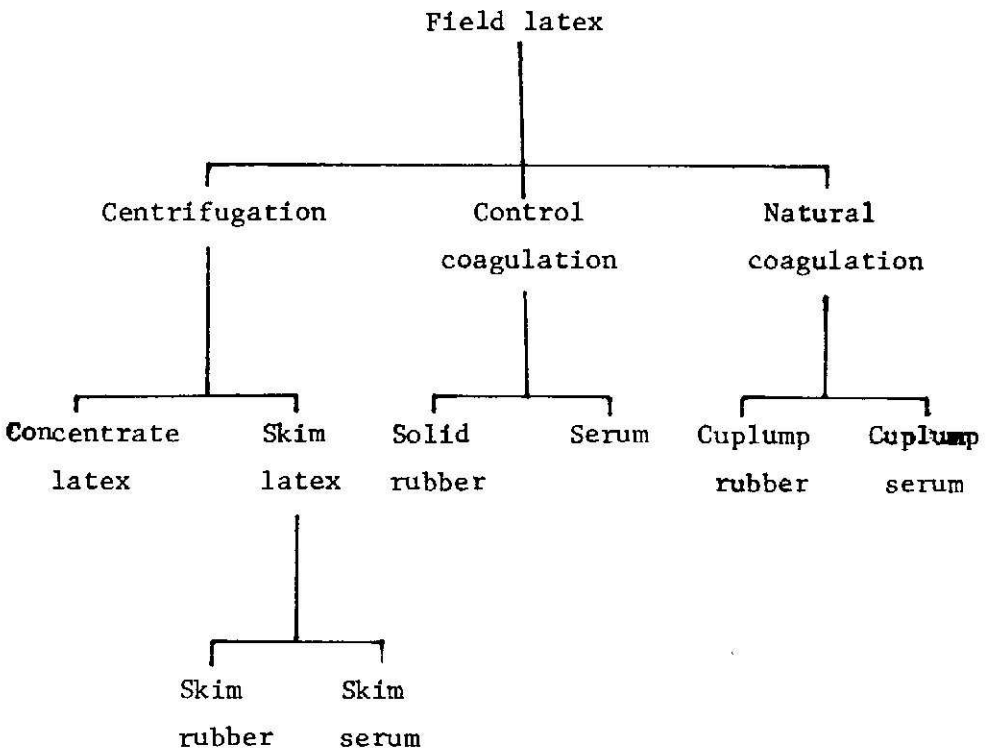
น้ำยางที่กรีดได้จากต้นยางพารา สามารถนำไปแปรรูปเพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นเนื้อยางออกไปได้หลายวิธี ดังแสดงในภาพที่ 1 ส่วนที่เป็นน้ำใสเหลืออยู่เรียกว่า ซีรัม (Ibrahim, 1982)

วราภรณ์ (2524) รายงานว่า ชั้นของซีรัมที่เกิดจากการปั่นแยกน้ำยางสดด้วยเครื่องปั่นอุลตราโซนิคจะมีความหนาแน่นประมาณ 1.02 กรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่างๆ พบว่าประกอบด้วย

1. คาร์โบไฮเดรต ส่วนใหญ่เป็น L-methylinositol หรือที่เรียกว่า quebrachitol ซึ่งมีประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำยาง คาร์โบไฮเดรตอื่นๆ มีบ้างเล็กน้อยได้แก่ กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส และกาแลคโตส เป็นต้น

2. โปรตีนและกรดอะมิโน ในน้ำซีรัมมีโปรตีนหลายชนิดที่สำคัญคือ α-globulin และ hevein สำหรับกรดอะมิโนอิสระมีประมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำยาง กรดอะมิโนที่สำคัญได้แก่ กลูตามิค (glutamic) อะลานีน (alanine) และแอสปาร์ติค (aspartic)

3. สารประกอบอื่นๆ ได้แก่ สารพวกที่มีส่วนประกอบของไนโตรเจนอิสระ เช่น choline และ methylamine กรดอินทรีย์ที่ไม่ใช่กรดอะมิโน อนุมูลของสารอนินทรีย์โดยเฉพาะพวกฟอสเฟตและคาร์บอเนต และอนุมูลโลหะพวกเหล็ก โปแตสเซียม แมกนีเซียม โซเดียมและทองแดง กรดไฮโดร ไซยาไนด์อิสระ และสารประกอบพวก thiol ตลอดจนเอนไซม์หลายชนิด



ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงการแปรรูปเบื้องต้นของน้ำยาง

ที่มา : Ibrahim A. 1982.

นอกจากนี้ Archer et. al. (1969) ยังรายงานว่าน้ำซีรัมประกอบด้วย ascorbic acid ประมาณ 190-270 ไมโครโมลต่อน้ำซีรัม 100 มิลลิลิตร และยังมี nucleotide, nucleotide sugar เป็นต้น

John (1972) กล่าวถึงคุณสมบัติของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตยาง 3 แบบ (ตารางที่ 1) คือ โรงงานผลิตยางข้น โรงงานยางแท่ง และโรงงานยางแผ่นรมควัน

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตยาง 3 แบบ

คุณสมบัติ*	ชนิดของน้ำทิ้งจากโรงงาน		
	ยางข้น	ยางแท่ง	ยางแผ่นรมควัน
pH	6.3	5.6	4.9
Suspended solids	2,030	540	165
Total solids	7,990	1,410	2,650
C.O.D	13,660	2,140	3,280
B.O.D	11,830	1,130	2,615
Ammonical N_2	540	60	10
Albuminoid N_2	110	30	100
Total N_2	750	100	115

ที่มา : John, C.K. 1972.

*ทุกค่ายกเว้น pH มีหน่วยเป็น ppm.

จากตารางจะเห็นได้ว่าน้ำทิ้งจากโรงงานยางข้นจะมีปริมาณสาร ตลอดจนค่า C.O.D และ B.O.D สูงกว่าน้ำทิ้งจากโรงงานยางแผ่นรมควันและโรงงานยางแท่ง

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณธาตุต่างๆ ในน้ำทิ้งจากโรงงานยางข้นและโรงงานยางแผ่นรมควันก็จะได้ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุต่างๆ (ppm.) ในน้ำทิ้งจากโรงงานยางข้นและโรงงานยางแผ่นรมควัน

ธาตุ	ชนิดของน้ำเสีย	
	โรงงานยางข้น	โรงงานยางแผ่นรมควัน
Calcium	0.7	0.1
Copper	0.7	0.1
Iron	26.0	0.4
Potassium	110.0	63.0
Magnesium	268.0	4.5
Sodium	35.0	6.3
Phosphorus	268.0	8.2
Silicon	27.0	0.3

ที่มา : John, C.K. 1972.

Kulkarni (1972) ได้รายงานถึงผลการวิเคราะห์น้ำทิ้งจากขบวนการผลิตยาง 2 แบบคือ น้ำทิ้งที่ได้จากการตกตะกอนยางตามธรรมชาติ (cuplump serum) และน้ำทิ้งที่ได้จากการใช้กรดซัลฟูริคแยกยางจากหางน้ำยาง (skim serum) ดังแสดงในตารางที่ 3

ในปี 1982 Ibrahim,A. ได้รายงานถึงคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำซีรั่มที่ได้จากการแยกยางจากหางน้ำยาง (skim serum) ดังแสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 4

จากตารางที่ 1 และตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าซีรั่มที่ได้จากการตกตะกอนยางด้วยกรดจะมี pH ต่ำกว่า ซีรั่มที่ได้จากการผลิตยางข้น นอกจากนี้ซีรั่มแบบหลังนี้ยังมีสารประกอบต่างๆ อยู่มาก มี B.O.D สูง มีปริมาณไนโตรเจนอยู่ในระดับที่ค่อนข้างสูงเช่นกันและส่วนใหญ่เป็นไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของอนุมูลแอมโมเนีย อย่างไรก็ตามถ้าจะใช้ซีรั่มเป็นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนให้ เนื่องจากมีปริมาณไม่เพียงพอ (Kulkarni,1972)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของน้ำทิ้งจากขบวนการผลิตยาง 2 แบบ (ppm)

	Cuplump serum	Skim serum
Total solid	1,700	13,800
Total N_2	71	2,633
Ammonical N_2	61	1,880
B.O.D	244	14,558
Potassium	28	2,000
Phosphorus	26	155
Sodium	42	43
Calcium	150	45

ที่มา : Kulkarni, P.R. 1972.

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของน้ำซีรัมที่ได้จากการแยกยางจากหางน้ำยาง

คุณสมบัติ*	ผลการวิเคราะห์
pH	4.77
Total solids	42, 550
Volatile solids	36, 410
Suspended solids	2, 850
C.O.D	32, 690
B.O.D	13, 670
Total nitrogen	4, 620
Ammoniacal nitrogen	3, 430
Albuminoid nitrogen	755
Nitrate nitrogen	3
Nitrite nitrogen	1
Total sugars	500
Reducing sugars	409
Calcium	6.0
Cupper	4.0
Iron	2.0
Potassium	.618
Magnesium	61.0
Manganise	0.6
Sodium	11.0
Phosphorus	61.0
Silicon	8.0

*ทุกค่า ยกเว้นค่า pH มีหน่วยเป็น ppm

ที่มา : Ibrahim, A. 1982.

การใช้ประโยชน์จากน้ำชีรัม

น้ำชีรัมที่ได้จากการทำยางยังคงมีสารอินทรีย์อยู่มาก และมีค่า B.O.D สูง จึงได้มีผู้สนใจทำการศึกษาถึงการนำไปใช้ประโยชน์ก่อนที่จะปล่อยทิ้งไป ซึ่งยังเป็นการช่วยลดปัญหามลภาวะอีกด้วย อรัญ (2524) ได้รวบรวมและรายงานการใช้ประโยชน์ของน้ำชีรัมจากการทำยางแผ่นไว้หลายประการ ดังนี้

1. เลี้ยงจุลินทรีย์ น้ำชีรัมจากการทำยางแผ่นสามารถที่จะนำไปเลี้ยงบักเตรี ยีสต์ และสาหร่าย เพื่อผลิตอาหารเสริมโปรตีน หรือผลิตสารประกอบที่ใช้ประโยชน์ได้

1.1 บักเตรี มีผู้ทดลองเลี้ยงบักเตรีในน้ำชีรัมจากการทำยาง โดยปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 7 นำไปต้ม เพื่อแยกยางที่หลงเหลืออยู่ออกและทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ แล้วนำไปเลี้ยงบักเตรี ปรากฏว่ามีบักเตรีหลายชนิดเจริญได้ดี คือ *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Serratia* และ *Corynebacterium*

1.2 ยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์เจริญได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 4.6-6.5 (ปรียา, 2524; Frazier และ Westhoff,1978) ชีรัมที่ได้จากการทำยางแผ่นจึงนับว่าเหมาะต่อการเลี้ยงยีสต์มาก ยีสต์ที่เจริญได้ดีในน้ำชีรัมมี *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula* และ *Rhodotorula* นอกจากนี้ John (1976) ได้ทำการทดลองหาทางใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งของโรงงานทำยาง และพบว่าน้ำชีรัมจากการทำยางแผ่น เป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสำหรับ *Candida* และ *Saccharomyces*

1.3 สาหร่าย การเจริญเติบโตของสาหร่ายต้องการแสงแดด เพื่อช่วยสังเคราะห์แสง หากนำไปเลี้ยงในชีรัมและมีการให้อากาศ สาหร่ายจะเจริญได้ดีและยังสามารถลดค่า B.O.D ลงได้อย่างรวดเร็ว สาหร่ายที่เจริญได้ดีในน้ำชีรัม คือ *Scenedesmus*, *Chlorella* และ *Spirulina* Phang (1977) ทำการทดลองเพาะเลี้ยง *Chlorella* ในบ่อขนาดเล็กที่เก็บน้ำทิ้งจากการทำยาง และมีการให้อากาศไปด้วย พบว่าสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วและยังช่วยลดค่า B.O.D เป็นอย่างดี เนื่องจากสาหร่ายสามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ในน้ำทิ้งหรือน้ำชีรัมจากการทำยางไปได้มาก

2. ทำปุ๋ย ในชีรับมีแร่ธาตุต่างๆ หลายชนิด โดยเฉพาะธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช คือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแตสเซียมนั้นมีอยู่ครบ ดังที่ Ibrahim,A. (1982) แสดงไว้ในองค์ประกอบของน้ำชีรับในตารางที่ 4

3. สกัดสาร ชีรับยังมีสารประกอบต่างๆ อีกหลายชนิดที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น ควีบราซิทอล ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็น dextro-rotatory และในสหรัฐอเมริกามีการสกัดนำไปใช้ประโยชน์แล้ว สำหรับอิโนซิทอล (inositol) เป็นวิตามินชนิดหนึ่งในวิตามินบีรวม และเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในโภชนาการของสัตว์ ส่วนใหญ่ใช้ในทางการแพทย์ และยังพบว่ามีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของหนูมาก นอกจากนี้ในชีรับยังมีโปรตีนอีกหลายชนิด หากสามารถสกัดออกมาแล้วนำไปเพิ่มในอาหารสัตว์ ก็จะใช้ประโยชน์ได้ดี

ปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์

ยีสต์ต้องการอาหารเพื่อช่วยในการเจริญเติบโต อาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงยีสต์ประกอบด้วยสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ และวิตามินต่างๆ (ปรียา,2524)

แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ยีสต์ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและปราศจากออกซิเจนแต่ในสภาพที่มีออกซิเจนยีสต์จะสร้างพลังงานได้มากกว่าเมื่อเซลล์อยู่ในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน ยีสต์ส่วนมากใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และแมนโนสได้ดี และจะใช้ซูโครสได้ดีที่ pH 4-5 (Suomalainen and Oura,1970) สำหรับแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่ใช้ผลิตยีสต์เพื่อเป็นอาหารเสริมโปรตีน มักนิยมใช้วัสดุที่มีราคาถูกหรือของเหลือทิ้งจากขบวนการอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น กากน้ำตาล (molasses)หางน้ำนม (whey) น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษจากไม้ (sulfite liquor) (Peppler,1970) นอกจากนี้อาจมีพวก wood sugar และน้ำผลไม้ (Presscott,1959)

แหล่งไนโตรเจน สำหรับยีสต์อาจใช้ไนโตรเจนทั้งในรูปของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ยีสต์ทุกชนิดใช้ ammonium sulfate ได้ ส่วน ammonium phosphate, mono และ diammonium phosphate, ammonium bicarbonate, ammonium tartate, ammonium carbonate, ammonium acetate และ Urea นั้น ยีสต์หลายชนิดใช้ได้ดี (Suomalainen and Oura,1970) ในการผลิตยีสต์เพื่อเป็นอาหารเสริมโปรตีนส่วนมากนิยมใช้ ammonia solution

หรือ urea (Peppler,1970) เติมลงในอาหารเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน

แหล่งฟอสฟอรัส เซลล์ของยีสต์สามารถใช้สาร orthophosphate และ potassium dihydrogen phosphate ได้ดีกว่า disodium hydrogen phosphate สาร inorganic phosphate นั้นยีสต์สามารถสะสมไว้ในรูป metaphosphate ใน volutin granule และพบว่า metaphosphate สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ดี (Suomalainen and Oura,1970)

แหล่งกำมะถัน (sulfur) ยีสต์ส่วนมากใช้กำมะถันในรูปของสารอนินทรีย์ได้ดี (Suomalainen and Oura,1970) แต่บางพวกสามารถใช้กำมะถันในสารอินทรีย์ได้ เช่น cysteine และ methionine เป็นต้น (ดีพร้อม และวิวัฒน์,2514)

ธาตุอาหารอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์คือ โปแตสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม สำหรับโบรอน ทองแดง สังกะสี แมงกานีส เหล็ก ไอโอดีนและโมลิบดินัมนั้น ยีสต์ต้องการเป็นจำนวนเล็กน้อย ธาตุอาหารที่กล่าวมานี้จะช่วยให้ยีสต์เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว (ดีพร้อม และวิวัฒน์,2514)

นอกจากนั้นยีสต์ยังต้องการวิตามิน และ growth factor ต่างๆ เช่น biotin, thiamine, pyridoxine และ inositol แต่ยีสต์บางชนิดไม่จำเป็นต้องใช้วิตามินในการเจริญเติบโต เพราะสามารถสังเคราะห์ได้เอง เช่น *C. utilis* และ *Hansenula anomala* (Reed and Peppler 1973)

ความเป็นกรด-เบส (pH) ของอาหาร โดยทั่วไประดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์อยู่ระหว่าง 4.5-6.5 (Frazier and Westhoff,1978) แต่อย่างไรก็ตาม pH ที่เหมาะสมที่สุดของยีสต์แต่ละชนิดนั้นแตกต่างกันไปบ้างเล็กน้อย (Suomalainen and Oura,1970)

อุณหภูมิ ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่แท้จริงของยีสต์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป การผลิต *C. utilis* ในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้อุณหภูมิ 25-26 องศาเซลเซียส ในระยะเริ่มต้นของการหมัก ซึ่งต่อมาในระยะการหมักหลังๆ อุณหภูมิจะสูงขึ้นเป็น 30 องศาเซลเซียส (Suomalainen and Oura,1970)

ปริมาณและวิธีให้อากาศ การให้อากาศในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อต้องการให้ได้เซลล์ปริมาณมากกว่าทำได้ 2 วิธีคือ การใช้เครื่องเขย่าสำหรับการทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งวิธีนี้ยีสต์มีโอกาสได้รับอากาศมากน้อยตามปริมาณช่องว่างของอาหารในภาชนะบรรจุ และอัตราความเร็ว

หรือ urea (Peppler,1970) เติมลงในอาหารเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน

แหล่งฟอสฟอรัส เซลล์ของยีสต์สามารถใช้สาร orthophosphate และ potassium dihydrogen phosphate ได้ดีกว่า disodium hydrogen phosphate สาร inorganic phosphate นั้นยีสต์สามารถสะสมไว้ในรูป metaphosphate ใน volutin granule และพบว่า metaphosphate สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ดี (Suomalainen and Oura,1970)

แหล่งกำมะถัน (sulfur) ยีสต์ส่วนมากใช้กำมะถันในรูปของสารอนินทรีย์ได้ดี (Suomalainen and Oura,1970) แต่บางพวกสามารถใช้กำมะถันในสารอินทรีย์ได้ เช่น cysteine และ methionine เป็นต้น (ดีพร้อม และวิวัฒน์,2514)

ธาตุอาหารอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์คือ โปแตสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม สำหรับโบรอน ทองแดง สังกะสี แมงกานีส เหล็ก ไอโอดีนและโมลิบดินัมนั้น ยีสต์ต้องการเป็นจำนวนเล็กน้อย ธาตุอาหารที่กล่าวมานี้จะช่วยให้ยีสต์เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว (ดีพร้อม และวิวัฒน์,2514)

นอกจากนั้นยีสต์ยังต้องการวิตามิน และ growth factor ต่างๆ เช่น biotin, thiamine, pyridoxine และ inositol แต่มียีสต์บางชนิดไม่จำเป็นต้องใช้วิตามินในการเจริญเติบโต เพราะสามารถสังเคราะห์ได้เอง เช่น *C. utilis* และ *Hansenula anomala* (Reed and Peppler 1973)

ความเป็นกรด-เบส (pH) ของอาหาร โดยทั่วไประดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์อยู่ระหว่าง 4.5-6.5 (Frazier and Westhoff,1978) แต่อย่างไรก็ตาม pH ที่เหมาะสมที่สุดของยีสต์แต่ละชนิดนั้นแตกต่างกันไปบ้างเล็กน้อย (Suomalainen and Oura,1970)

อุณหภูมิ ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่แท้จริงของยีสต์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป การผลิต *C. utilis* ในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้อุณหภูมิ 25-26 องศาเซลเซียส ในระยะเริ่มต้นของการหมัก ซึ่งต่อมาในระยะการหมักหลังๆ อุณหภูมิจะสูงขึ้นเป็น 30 องศาเซลเซียส (Suomalainen and Oura,1970)

ปริมาณและวิธีให้อากาศ การให้อากาศในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อต้องการให้ได้เซลล์ปริมาณมากกว่าทำได้ 2 วิธีคือ การใช้เครื่องเขย่าสำหรับการทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งวิธีนี้ยีสต์มีโอกาสได้รับอากาศมากน้อยตามปริมาณช่องว่างของอาหารในภาชนะบรรจุ และอัตราความเร็ว

ของการเขย่าซึ่งจะทำให้เซลล์สัมผัสอากาศได้อย่างทั่วถึง อีกวิธีหนึ่งได้แก่การใช้เครื่องอัดอากาศซึ่งใช้ศึกษาในระดับห้องทดลองและระดับอุตสาหกรรม โดยอัดอากาศที่ปราศจากเชื้อในลักษณะที่เป็นฟองอากาศลงไป (Vananuvat and Kinsella,1975)

การทดลองเลี้ยงยีสต์เป็นอาหารเสริมโปรตีน

ยีสต์สายพันธุ์แรกที่รู้จักกันในฐานะที่เป็นจุลินทรีย์โปรตีนและได้รับความนิยมแพร่หลายทั่วไปได้แก่ *C. utilis* เนื่องจากยีสต์นี้สามารถใช้สารอาหารอย่างง่ายๆ เช่น พวก sulfite waste liquor, wood hydrolysates นอกจากนี้ยังใช้น้ำตาล pentose เป็นอาหารได้ ข้อดีในกรณีอื่นๆ ได้แก่ต้องการสาร growth factor น้อยมาก และสามารถเจริญแข่งขันกับแบคทีเรียได้ ดังนั้นจึงไม่เป็นปัญหาเรื่องการปะปนของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเลี้ยง *C. utilis* (Snyder,1970)

มีการทดลองเลี้ยง *C. utilis* ในวัตถุดิบหลายชนิด เช่น Nolte et. al. (1942) ใช้น้ำทิ้งจากโรงงานทำน้ำส้มกระป๋อง พบว่าได้ยีสต์แห้งหนักประมาณ 46 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำทิ้ง Reiser (1954) ใช้ potato starch waste พบว่ายีสต์นี้สามารถใช้อาหารในน้ำเสียได้ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณโปรตีนสูงถึง 55 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนอโณทัย (2519) ได้ศึกษาการเจริญของ *C. utilis* เปรียบเทียบกับ *Saccharomyces cerevisiae* และ *C. tropicalis* ในน้ำมะพร้าวพบว่า *C. utilis* เจริญได้ดีที่สุดในน้ำมะพร้าวที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ pH 4.5 ในเวลา 72 ชั่วโมงได้น้ำหนักแห้ง 12.05 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ยังมียีสต์อีกหลายชนิดที่มีผู้สนใจศึกษาเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมโปรตีน เช่น *S. cerevisiae* ซึ่งมีผู้ทดลองเลี้ยงในกากน้ำตาล พบว่าให้โปรตีนถึง 42.5-53.1 เปอร์เซ็นต์ และทำการผลิตเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ (Tannenbaum and Nang,1974) Shannon and Stevenson (1975) เลี้ยงยีสต์ตัวเดียวกันนี้ใน brewery waste ได้น้ำหนักแห้ง 5.02-8.74 กรัมต่อลิตร

S. fragilis หรือเรียกทั่วไปว่า whey yeast (Matales and Tannenbaum, 1968) เป็นยีสต์โปรตีนสูงอีกชนิดหนึ่งซึ่งมีผู้ทดลองเลี้ยงใน whey เช่น Wasserman et. al. (1961) พบว่าเมื่อใช้ lactose ใน whey 2.42 ปอนด์ จะได้ยีสต์แห้งหนึ่งปอนด์

C. tropicalis เป็นยีสต์ที่มีผู้ทดลองใช้เลี้ยงในการประกอบพวก hydrocarbon Cunningham, et. al. (1975) รายงานว่าเชื้อยีสต์นี้สามารถเจริญในน้ำมันดิบ (petroleum) ได้และยังเจริญได้ดีใน n-hexadecane ต่างๆ (Blanch and Einsele,1973)

คุณค่าทางอาหารของยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมโปรตีน เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนในเซลล์สูงคือ มีปริมาณ crude protein ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งในจำนวนนี้จะเป็น กรดอะมิโน 80 เปอร์เซ็นต์ กรดนิวคลีอิก 12 เปอร์เซ็นต์และแอมโมเนีย 8 เปอร์-เซ็นต์ สำหรับ true protein ในเซลล์ยีสต์มีประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ (Peppler,1970)ปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นและสำคัญ (essential amino acid) ในเซลล์ยีสต์บางชนิดได้แสดงไว้ในตารางที่ 5

Peppler (1970) รายงานว่า เซลล์ยีสต์ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 22-33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจำแนกได้เป็นทรีฮาโลส, กลูแคน, แมนแนน และไกลโคเจน เท่ากับ 33,27,21 และ 12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับไขมันพบว่ามีประมาณ 2-3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วย triglyceride, lecithin และ ergosterol ส่วนเกลือแร่ที่พบในเซลล์ยีสต์มีประมาณ 5-8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่ โปแตสเซียมและฟอสฟอรัส นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในเซลล์ของยีสต์เป็นแหล่งของวิตามินบีรวม ซึ่งรายละเอียดของวิตามินต่างๆ ที่พบในยีสต์แสดงไว้ในตารางที่ 6

โดยทั่วไปยีสต์จะใช้เป็นอาหารเสริมโปรตีนสำหรับสัตว์จะต้องมีส่วนประกอบต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 7 แต่มีข้อที่ควรระวังคือ ไม่ควรใช้ยีสต์ที่ยังมีชีวิตอยู่เป็นอาหารสำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เพราะยีสต์จะใช้วิตามินบีในลำไส้เล็กได้ (Bhattacharjee,1970)

การใช้ยีสต์เป็นอาหารเสริมนิยมใช้กับสัตว์มากกว่ามนุษย์ ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ยีสต์มีปริมาณกรดนิวคลีอิกค่อนข้างสูงคือประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นกรดยูริค (uric acid) ได้ ในสัตว์จะมีเอนไซม์สำหรับย่อยกรดยูริคแต่เอนไซม์นี้ไม่มีในมนุษย์ ดังนั้นหากบริโภคอาหารที่มีกรดนิวคลีอิกสูงจะทำให้เกิดกรดยูริคสะสมในเลือดมากผิดปกติ เกิดเป็นโรคไขข้ออักเสบแบบเก๊าท์ (gout) (นัยทัศน์,2522; ปรียา,2524) ระดับปลอดภัยของผู้บริโภคคือไม่ควรบริโภคเกิน 30 กรัมของน้ำหนักยีสต์แห้งต่อวัน (Reed and Peppler,1973)

ในปัจจุบันได้มีผู้ศึกษาหาวิธีการลดปริมาณกรดนิวคลีอิกในเซลล์ยีสต์ลง โดยไม่ทำให้เสียคุณค่าทางอาหาร วิธีการต่างๆ ที่ใช้ ได้แก่ การทำ heat shock, heat-shock and enzymatic treatment และ cell disintegration and precipitation of protein เป็นต้น (นิยทัศน์,2522)

ตารางที่ 5 ปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นและสำคัญในยีสต์บางชนิด (กรัมต่อ 16 กรัม N)

amino acid	*S. cerevisiae* จาก molasses	*S. fragilis* จาก whey	*C. utilis* จาก sulfite liquor	*C. utilis* จาก molasses
Lysine	8.2	8.8	6.7	10.7
Valine	5.5	6.6	6.3	5.7
Leucine	7.9	9.9	7.0	8.1
Isoleucine	5.5	5.5	5.3	7.3
Threonine	4.8	5.5	5.5	4.8
Methionine	2.5	1.5	1.2	1.4
Phenylalanine	4.5	3.9	4.3	4.1
Tryptophan	1.2	1.5	1.2	0.5
Cystine	1.6	-	0.7	0.3
Histidine	4.0	2.5	1.9	2.8
Tyrosine	5.0	-	3.3	1.4
Arginine	5.0	4.9	5.4	4.7

ที่มา : Peppler, H.J. 1970.

ตารางที่ 6 วิตามินชนิดต่างๆ ที่พบในเซลล์ยีสต์บางชนิด

Vitamin	Content in dry product (µg/gm)			
	S. cerevisiae in molasses	*S. fragilis* in whey	*C. utilis* in sulfite liquor	*C. utilis* in molasses
Thiamin HCl	165	20	130	25
Riboflavin	100	50	45	50
Niacin	585	330	400	335
Pyridoxine HCl	20	40	30	-
Folacin	13	14	21	20
Calcium -pantothenate	100	115	40	120
Biotin	0.6	2	0.8	2
P-aminobenzoic acid	160	24	11	-
Choline chloride	2,710	4,550	2,860	5,500
Inositol	3,000	3,000	4,500	-

ที่มา : Peppler, H.J. 1970.

ตารางที่ 7 คุณค่าทางอาหารของยีสต์ที่จะใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์

	เปอร์เซ็นต์
โปรตีน	>45
ไขมัน	2
เส้นใย	2
เถ้า	7-8
แคลเซียม	0.1-0.6
ฟอสฟอรัส	1.5
วิตามิน (mg/ปอนด์)	
thiamine	3-50
riboflavin	15-25
pantothenic acid	35-50
niacin	200-350
choline	1,300-1,700

ที่มา : Miller, F.H. 1969.

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมน้ำซีรัม

น้ำซีรัมที่ใช้ในการทดลองได้จากศูนย์วิจัยยางคอหงษ์ นำน้ำซีรัมที่ได้มาต้มประมาณ 20 นาที เพื่อแยกให้เศษยางที่ยังคงหลงเหลืออยู่เล็กน้อยจับตัวกัน จากนั้นจึงกรองแยกเอาส่วนที่เป็นเนื้อยางออกทิ้งไป บรรจุน้ำซีรัมที่ต้มและกรองเรียบร้อยแล้วลงในภาชนะที่สะอาดเก็บไว้ในตู้เย็น

2. ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

ยีสต์ที่ใช้เป็นยีสต์ที่ได้จากการทดลองของสุมาลีและเยาวลักษณ์ (2528) จำนวน 3 ไอโซเลท (isolate) คือ Y3, Y15 และ Y16 ยีสต์ทั้งสามชนิดนี้ได้รับการคัดเลือกว่าสามารถเจริญได้ในน้ำซีรัมและให้ปริมาณโปรตีนสูงคือเท่ากับ 48.07, 46.23 และ 42.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3. การศึกษาสภาวะและธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์

3.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (inoculum)

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยถ่ายเชื้อจาก stock culture ลงในน้ำซีรัมบ่ม (incubate) ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้ออีกครั้งลงในอาหารน้ำซีรัมบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงอีกเช่นกัน วัดความขุ่น (O.D.) ของเชื้อที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ปรับความขุ่นให้ได้ O.D. ประมาณ 0.5 โดยใช้น้ำซีรัมที่ปราศจากเชื้อ

3.2 การวัด O.D. ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน

ดูดเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารที่จะใช้ศึกษาบรรจุอยู่ 40 มิลลิลิตร ทำสามซ้ำทุกการทดลอง (triplicate) นำไปเข้าเครื่องเขย่า (shaker) ด้วยความเร็วประมาณ 100 รอบต่อนาที วัด O.D. ที่ระยะเวลาต่างๆ กันคือ 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง โดยใช้อาหารชนิดเดียวกันกับที่ศึกษาเป็น blank เมื่อค่า O.D. เกิน 1 ต้องทำให้เจือจางลงด้วยน้ำกลั่นและทำให้ blank เจือจางลงในอัตราส่วนเดียวกัน จดค่า O.D. ทั้งสามซ้ำในระยะเวลาที่กำหนด หาค่า O.D. เฉลี่ย นำมาเขียนกราฟของการเจริญ (growth curve) ระหว่าง O.D. กับเวลาโดยใช้

แกนตั้ง เป็นค่า O.D. และแกนนอน เป็นช่วง เวลา

3.3 ศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน

เติมสารที่เป็นแหล่งของคาร์บอนได้แก่ กลูโคส ซูโครส และน้ำตาลทราย ความ เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารน้ำซีรับ โดยทำ เช่น เดียวกับข้อ 3.2 ศึกษาอัตราการ เจริญของยีสต์ เปรียบ เทียบกันระหว่างแหล่งคาร์บอนทั้งสามชนิด

จากนั้นจึงปรับระดับความ เข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ทำให้ยีสต์ เจริญเติบโตได้ดีที่สุดให้ เป็น 1, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เปรียบ เทียบอัตราการ เจริญของแต่ละความ เข้มข้นของแหล่ง คาร์บอน เพื่อหาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่พอ เหมาะ

3.4 ศึกษาปริมาณเชื้อ เริ่มต้น (inoculum size)

เตรียม เชื้อ เริ่มต้น เช่น เดียวกับข้อ 3.1 ใช้ปริมาณเชื้อ เริ่มต้น เป็น 1, 3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในอาหารน้ำซีรับที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ เปรียบ เทียบอัตราการ เจริญเพื่อหา ปริมาณเชื้อ เริ่มต้นที่ เหมาะสม โดยการวัด O.D. แต่ละช่วง เวลา เช่น เดียวกับข้อ 3.2

3.5 ศึกษาความ เร็วรอบของการ เขย่า

ใช้ปริมาณเชื้อ เริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในอาหารน้ำซีรับที่ เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ นำไปวางบน เครื่อง เขย่าที่มีความ เร็วรอบของการ เขย่า เป็น 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อ นาที เปรียบ เทียบอัตราการ เจริญเพื่อหาความ เร็วรอบของการ เขย่าที่ทำให้อัตราการ เจริญดีที่สุด

3.6 ศึกษา pH ที่ เหมาะสมต่อการ เจริญของยีสต์

ใช้ปริมาณเชื้อ เริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในอาหารน้ำซีรับที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เริ่มต้นให้ เป็น 4.5, 5, 5.5 และ 6 นำไปวางบน เครื่อง เขย่าความ เร็ว 200 รอบ ต่อนาที ศึกษาอัตราการ เจริญเพื่อหา pH ที่ เหมาะสม

3.7 ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการ เจริญของยีสต์

ใช้ปริมาณยีสต์ เริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในอาหารน้ำซีรับที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ pH 5.5 นำไปวางบน เครื่อง เขย่าความ เร็ว 200 รอบต่อนาที ซึ่งวางอยู่ภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ปรับอุณหภูมิให้ เป็น 25, 28, 30 และ 35 องศา เซลเซียส เปรียบ เทียบอัตราการ เจริญเพื่อหา อุณหภูมิที่ยีสต์ เจริญได้ดีที่สุด

4. การหาน้ำหนักแห้งของยีสต์

เลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่เหมาะสมทุกอย่างตามที่ได้ศึกษาจากข้อ 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 และ 3.7 เมื่อครบ 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างมา 10 มิลลิลิตร เข้าเครื่องเหวี่ยงความเร็วประมาณ 1,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างเซลล์ออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำไปอบให้แห้งโดยใช้ hot air oven อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง นำมาเก็บไว้ในโถทำแห้ง (desiccator) ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก นำไปอบซ้ำอีกจนได้น้ำหนักคงที่คำนวณหาน้ำหนักแห้งของเซลล์จากตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร

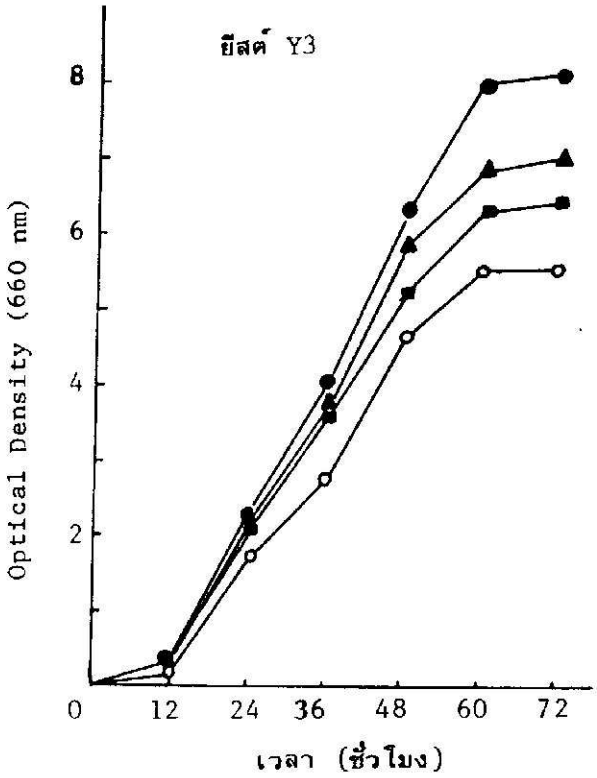
ผลการทดลองและวิจารณ์

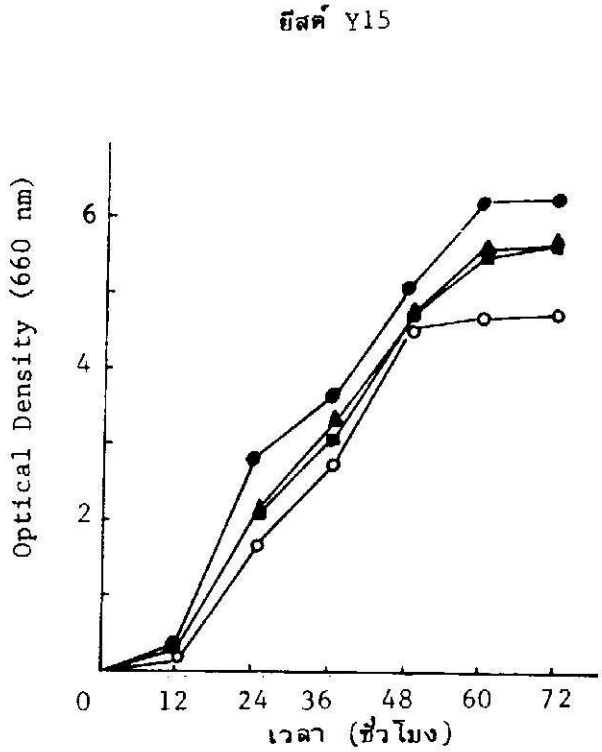
1. ผลการศึกษาสภาวะและธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์

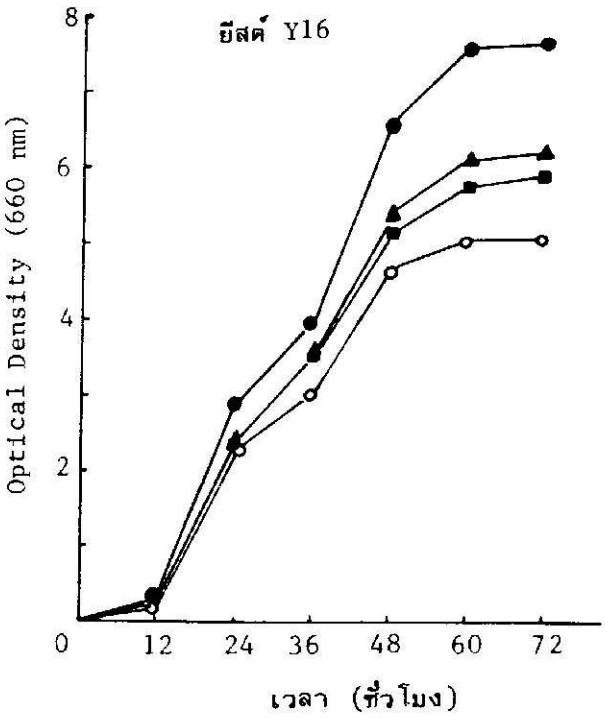
1.1 ผลของชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน

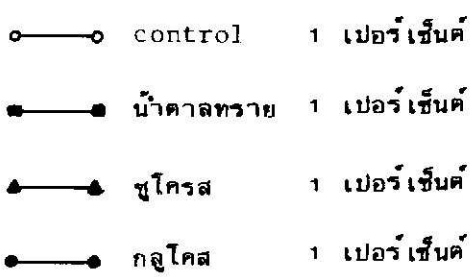
ผลการทดลองเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ Y3, Y15 และ Y16 ในน้ำชีรัมเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ กลูโคส ซูโครส และน้ำตาลทราย ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แสดงในภาพที่ 2 อัตราการเจริญของยีสต์ทั้งสามในน้ำชีรัมที่เติมกลูโคส ซูโครส และน้ำตาลทรายสูงกว่าในน้ำชีรัมที่ไม่ได้เติมสารใดๆ ซึ่งใช้เป็น control แสดงว่าในน้ำชีรัมมีแหล่งธาตุคาร์บอนไม่เพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ และยีสต์ทั้งสามสามารถใช้กลูโคส ซูโครส และน้ำตาลทรายได้ แต่การเจริญของยีสต์ทุกตัวในน้ำชีรัมที่เติมกลูโคสจะสูงกว่าเมื่อเติมซูโครสและน้ำตาลทราย แสดงว่ายีสต์เหล่านี้ใช้กลูโคสได้ดีกว่าซูโครสและน้ำตาลทรายจึงทำให้มีปริมาณเซลล์มากกว่า ทั้งนี้เนื่องจากกลูโคสเป็นโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) ซึ่งยีสต์สามารถนำไปใช้ได้ทันที (Berry, 1982) ในขณะที่ซูโครสและน้ำตาลทรายเป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งมีโมเลกุลใหญ่ผ่านเข้าเซลล์ไม่ได้ ยีสต์ต้องปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อย (breakdown) ให้เป็นโมโนแซคคาไรด์ก่อน (Brock, 1979)

เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอนโดยปรับให้มีความเข้มข้นเป็น 1, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่ายีสต์ทั้งสามสายพันธุ์ เมื่อเจริญในน้ำชีรัมที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์จะมีอัตราการเจริญดีที่สุดได้ค่า O.D. มากที่สุดเมื่อประมาณชั่วโมงที่ 60 (ภาพที่ 3) ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงใช้น้ำชีรัมที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์

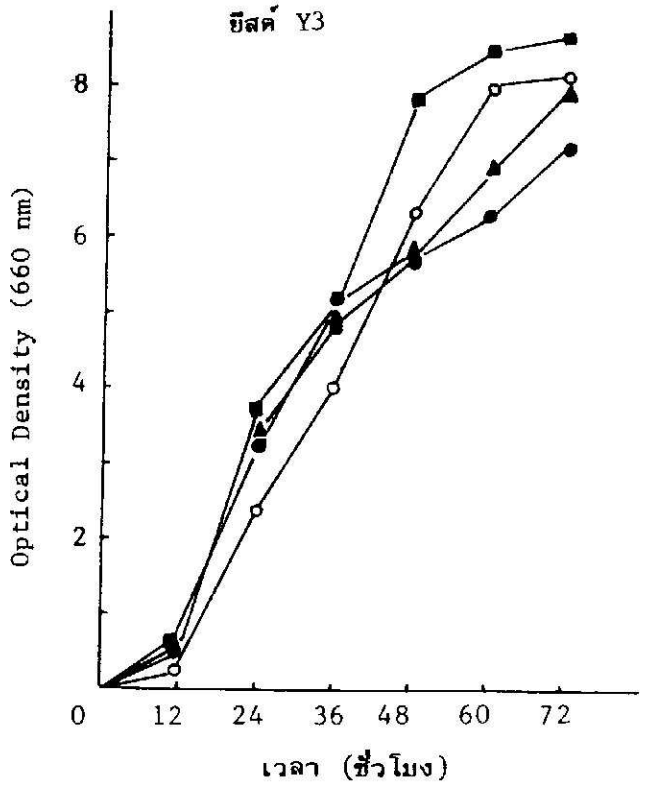


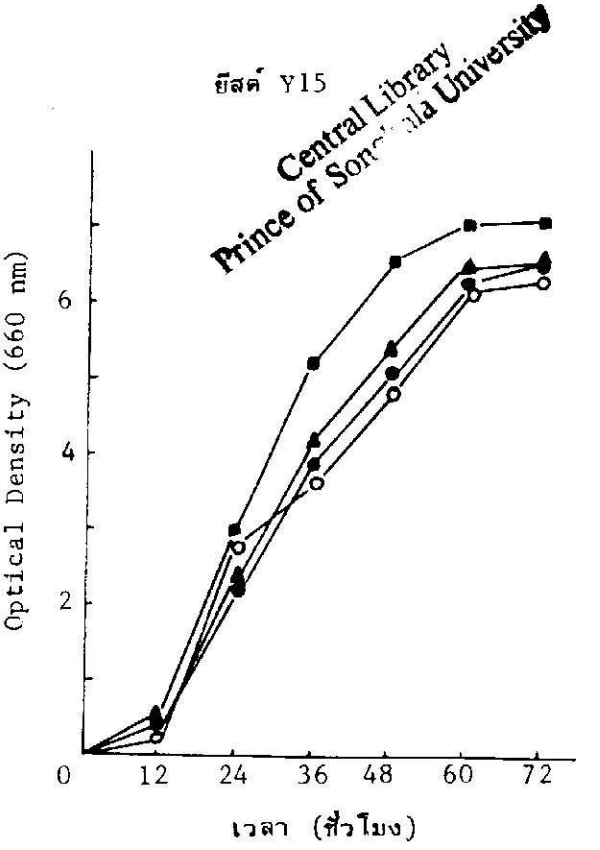




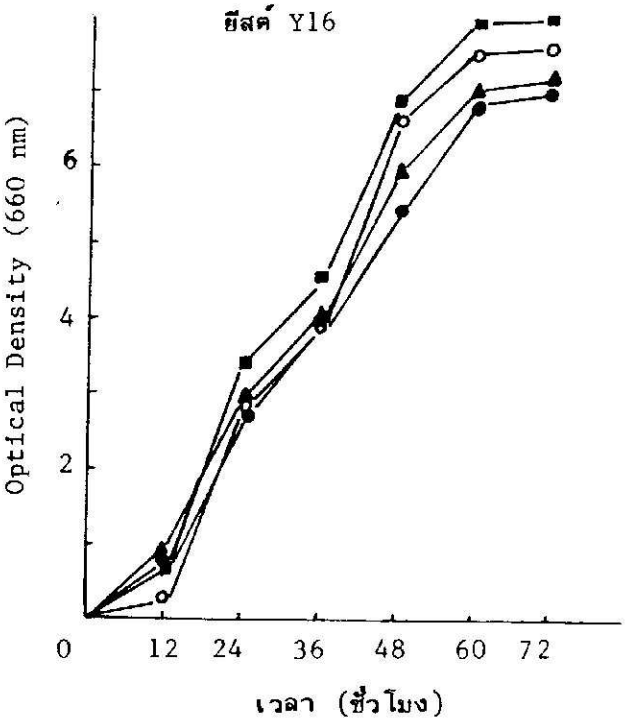


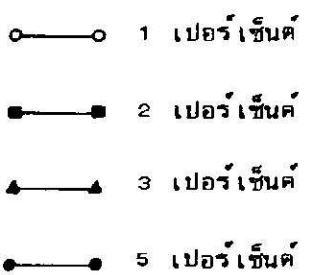
ภาพที่ 2 แสดงการเจริญของยีสต์ในน้ำชีรับที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน





Central Library
Prince of Songkla University





ภาพที่ 3 แสดงการเจริญของยีสต์ในน้ำซีรัมโดยใช้ปริมาณกลูโคสต่างๆ กัน

1.2 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ผลการทดลองเลี้ยงยีสต์ Y3, Y15 และ Y16 ในน้ำชีรัมที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ กันคือ 1, 3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ แสดงในภาพที่ 4 จะเห็นได้ว่ายีสต์ทั้งสามสายพันธุ์มีระยะ lag phase ใกล้เคียงกันอีกทั้งปริมาณเซลล์สูงสุดก็ยังใกล้เคียงกันมาก เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ได้ปริมาณเซลล์น้อยที่สุดในเวลาที่เท่ากัน

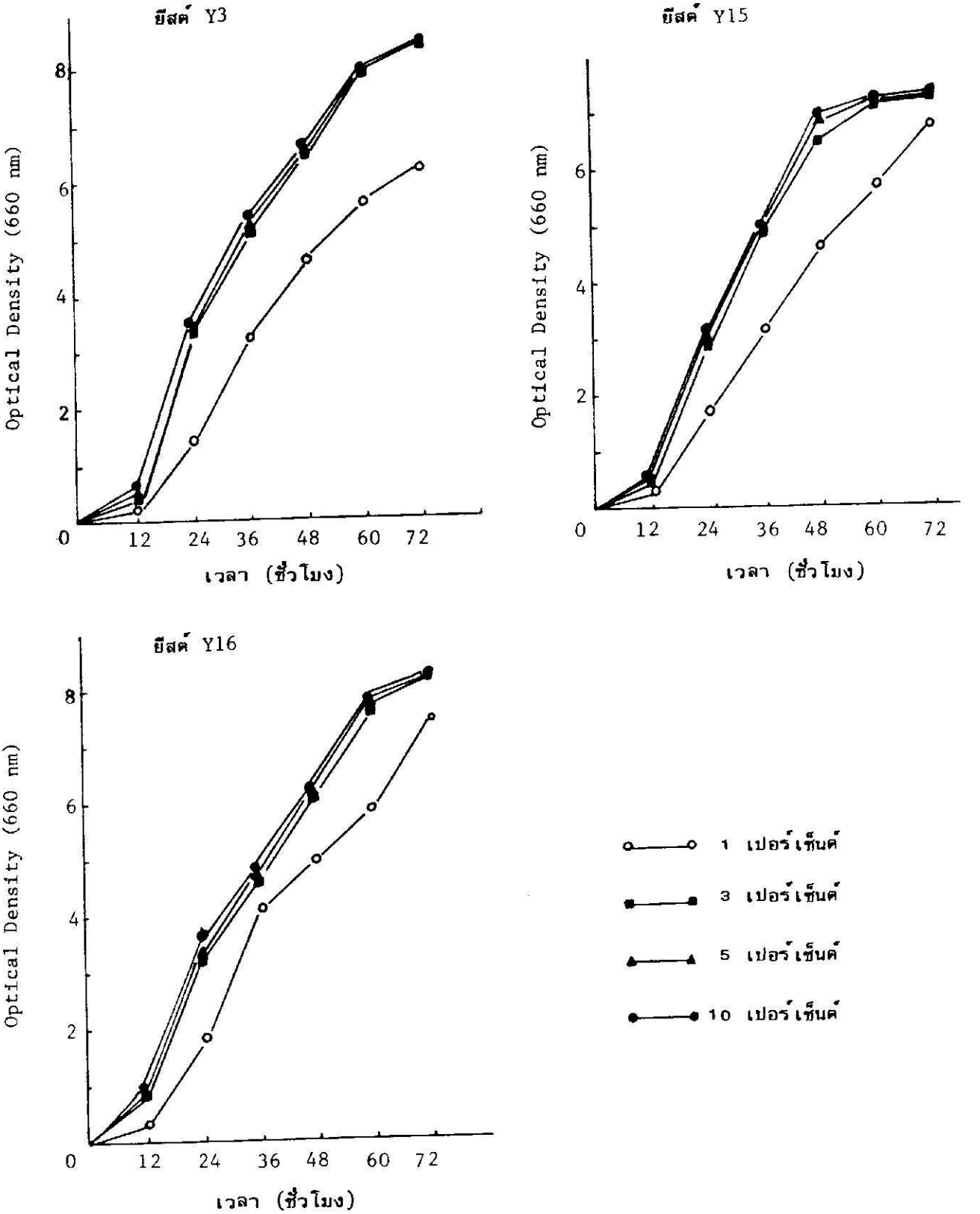
เนื่องจากการใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณมาก เป็นการนำอาหารเก่าบางส่วนไปยังอาหารใหม่ที่จะใช้ทดลองซึ่งอาจทำให้อัตราการเจริญของยีสต์ผิดไป ดังนั้นการทดลองในระยะต่อไปจึงใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 3 เปอร์เซ็นต์

1.3 ผลของความเร็วรอบการเขย่า

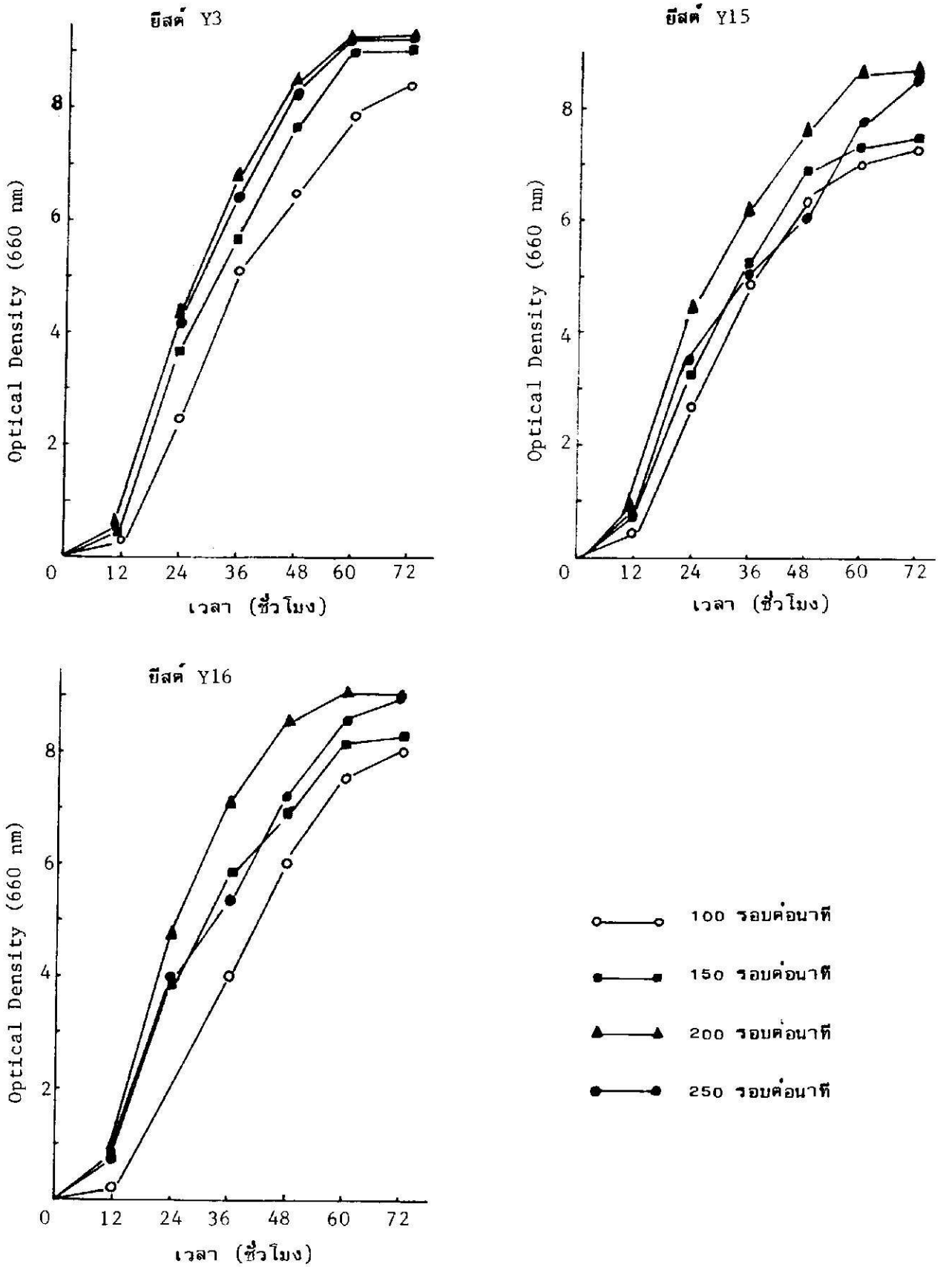
ผลของความเร็วรอบการเขย่าที่มีต่อการเจริญของยีสต์ Y3, Y15 และ Y16 ในอาหารน้ำชีรัมที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาทีแสดงไว้ในตารางที่ 5 ซึ่งจะพบว่าเมื่อใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 และ 250 รอบต่อนาที ยีสต์จะมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกันมาก แต่สามารถรับยีสต์ Y15 และ Y16 เมื่อใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที จะมีอัตราการเจริญที่ดีกว่าเมื่อใช้ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อย่างไรก็ตามยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์จะให้ปริมาณเซลล์สูงสุดในเวลา 60 ชั่วโมง หลังจากนี้อัตราการเจริญเติบโตจะช้ามากและเริ่มเข้าสู่ stationary phase ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที

1.4 ผลของ pH เริ่มต้น

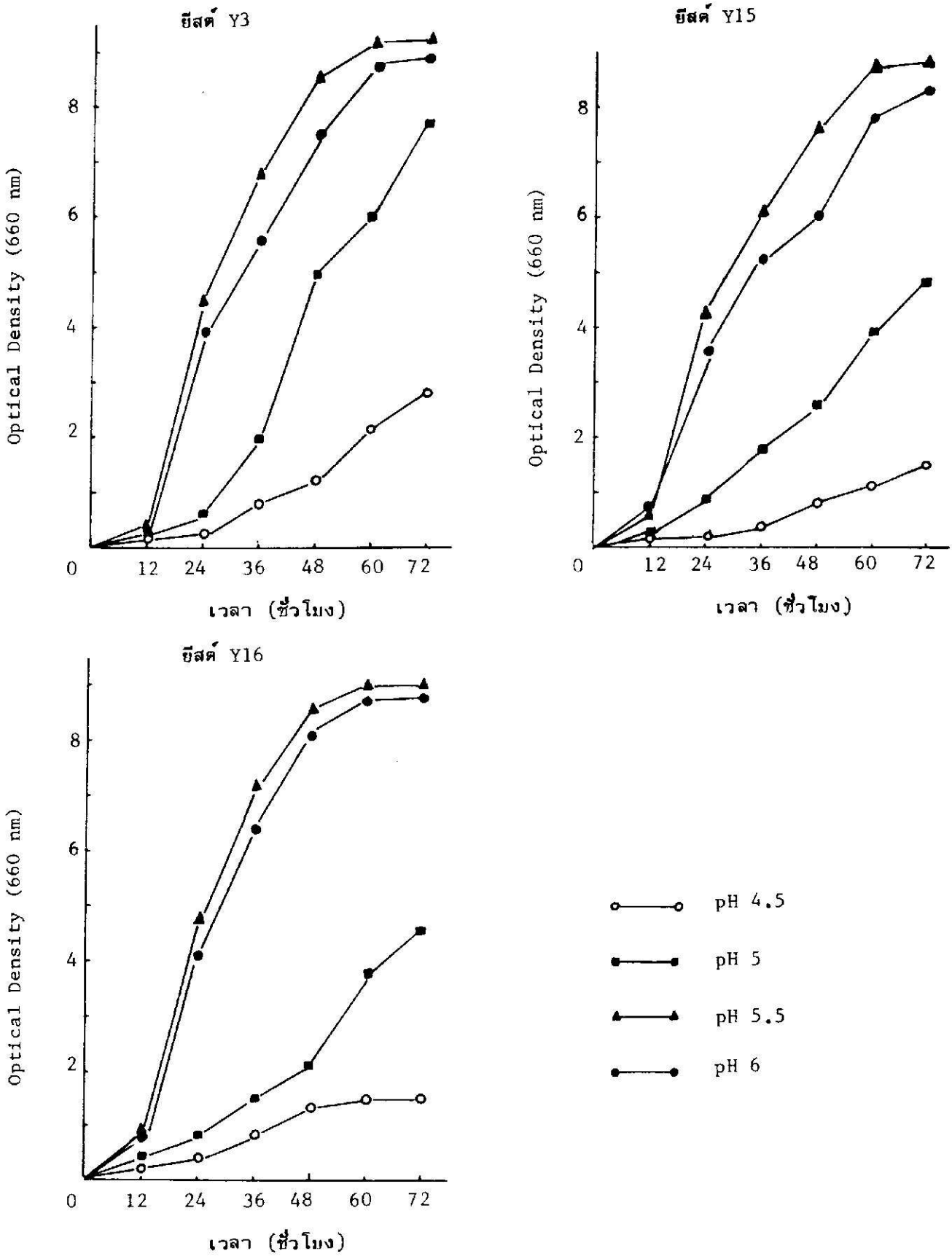
จากการทดลองผลของ pH เริ่มต้นที่มีต่อการเจริญของยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์พบว่า เมื่อน้ำชีรัมมีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 จะทำให้ยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์มีอัตราการเจริญดีที่สุดและใกล้เคียงกับเมื่อน้ำชีรัมมี pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 แต่จะเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจนเมื่อน้ำชีรัมมี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 และ 4.5 ตามลำดับ (ภาพที่ 6)



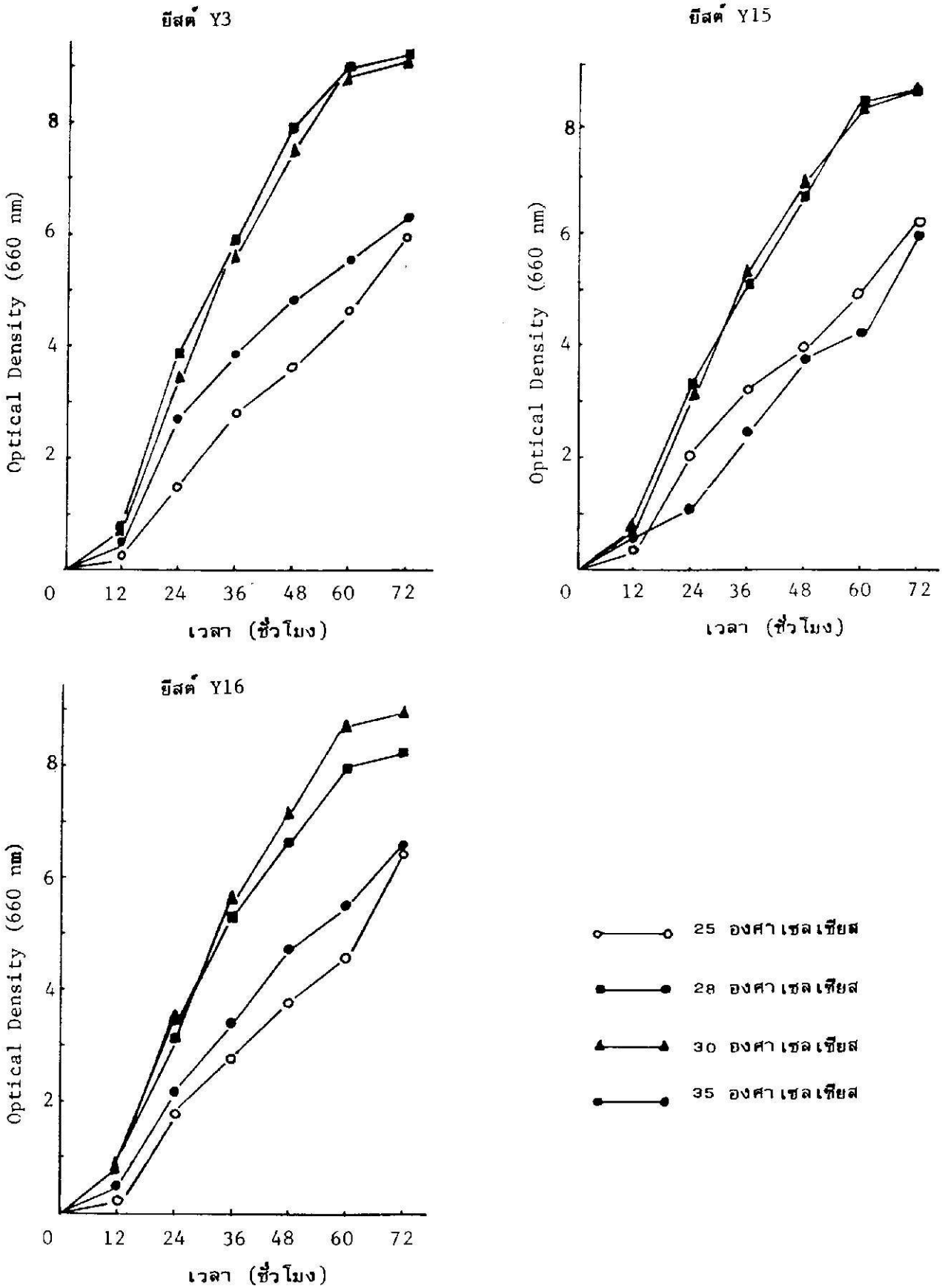
ภาพที่ 4 แสดงการเจริญของยีสต์ในน้ำทิรับที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ กัน



ภาพที่ 5 แสดงการเจริญของยีสต์ในน้ำชีรัมที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าต่างๆ กัน



ภาพที่ 6 แสดงการเจริญของยีสต์ในน้ำชีรับที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบของการเขย่า 200 rpm โดยปรับ pH เริ่มต้นของน้ำชีรับต่างๆ กัน



ภาพที่ 7 แสดงการเจริญของยีสต์ในน้ำชีรับที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ pH 5.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 200 rpm โดยควบคุมอุณหภูมิให้แตกต่างกัน

น้ำชีรับที่ใช้ในการทดลองมีค่า pH เท่ากับ 5.5 ซึ่งต่างจากที่ได้มีผู้รายงานไว้ (John, 1972; Ibrahim,1982) แต่อย่างไรก็ตามค่า pH ของน้ำชีรับนี้ก็ยังอยู่ในช่วงที่ยีสต์โดยทั่วๆ ไปจะเจริญเติบโตได้ดีคือระหว่าง 4.5-6.5 (Frazier and Westhoff,1978)

ดังนั้นในการทดลองเลี้ยงยีสต์ในน้ำชีรับครั้งนี้จึงไม่จำเป็นต้องปรับ pH เพราะ pH ของน้ำชีรับที่ใช้เหมาะสมต่อการเจริญอยู่แล้ว

1.5 ผลของอุณหภูมิ

ภาพที่ 7 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าอัตราการเจริญใกล้เคียงกันมากที่อุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเจริญจะลดลงเมื่อใช้อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมินี้ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีก็อยู่ในช่วงระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส(Suomalainen and Oura,1970)อีกทั้งอุณหภูมิเฉลี่ยของห้องทดลองก็อยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียสเช่นกัน ดังนั้นในการเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวจึงสามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้องปกติไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิหรือถ้าจะนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งในระยะเริ่มต้นการหมัก จะต้องปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 25-26 องศาเซลเซียสก็ตาม แต่ต่อมาในการหมักระยะหลังอุณหภูมิจะสูงขึ้นเป็น 30 องศาเซลเซียส (Suomalainen and Oura,1970) ซึ่งก็จะเป็นอุณหภูมิที่ยีสต์เหล่านี้เจริญได้ดี

2. ผลของการศึกษาน้ำหนักแห้งของยีสต์เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม

เมื่อทดลองเลี้ยงยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์คือ Y3, Y15 และ Y16 ในสภาวะที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษามาแล้วคือ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารน้ำชีรับที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที เมื่อครบ 72 ชั่วโมง นำมาหาน้ำหนักแห้งได้ผลดังนี้คือ pH เท่ากับ 12.50 กรัมต่อลิตร Y15 เท่ากับ 12.25 กรัมต่อลิตร และ Y16 เท่ากับ 12.50 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าที่สุมาลีและเยาวลักษณ์(2528) ได้ทดลองทำไว้ซึ่งได้น้ำหนักแห้งของ Y3, Y15 และ Y16 เพียง 3.27, 1.55 และ 2.59 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

สรุป

ในปีหนึ่งๆ ประเทศไทยสามารถผลิตน้ำยางสดได้ประมาณ 2 ล้านเมตริกตัน (นัยทัศน์, 2529) น้ำยางสดเมื่อผ่านกรรมวิธีแยกเอาส่วนของเนื้อยางออกไปแล้วจะเหลือส่วนของน้ำใส เรียกว่า ซีรัม ซึ่งมีสารประกอบต่างๆ มากมาย ถ้าปล่อยน้ำทิ้งส่วนนี้ลงสู่ดินหรือแหล่งน้ำก็จะเกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อม (John, 1972) การทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะและธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ที่ให้ปริมาณโปรตีนสูง เพื่อนำมาเลี้ยงในน้ำซีรัมดังกล่าว ทั้งนี้เพื่อให้ยีสต์มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น และให้น้ำหนักแห้งสูงขึ้นอันอาจจะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ Y3, Y15 และ Y16 คือ อาหารน้ำซีรัมซึ่งเติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ pH 5.5 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ และใช้เครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ยีสต์ทั้งสามจะให้น้ำหนักแห้ง 12.50, 12.25 และ 12.50 กรัมต่อลิตรตามลำดับซึ่งสูงกว่าที่สุมาลีและเยาวลักษณ์ (2528) ได้ทดลองไว้

เอกสารอ้างอิง

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ และ วิวัฒน์ แดงสุภา. 2514. จุลชีววิทยาทั่วไป. ภาควิชาชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นัยทัศน์ ภู่ศรันย์. 2522. การลดปริมาณสารคลอริกของยีสต์ก่อนใช้เป็นอาหารเสริมโปรตีน. ว.สงขลานครินทร์ 1(4):26-31.

นัยทัศน์ ภู่ศรันย์; ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, เสาวลักษณ์ จิตบรรเจิดกุล และ วรรณา วงศ์กรเชาวลิต. 2529. การศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพปริมาณของเสียจากโรงงานแปรรูปผลิตผลการเกษตรในภาคใต้ เป็นอุตสาหกรรมยางพารา. รายงานการวิจัยภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 8-11.

ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์. 2524. จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์เกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วราภรณ์ ขจรไชยกูล. 2524. คุณสมบัติและส่วนประกอบของน้ำยางธรรมชาติ. ว.ยางพารา 2(1):19-27.

สุมาลี จิรธนกิจ และ เยาวลักษณ์ คิสระ. 2528. การเจริญของยีสต์ในน้ำทิ้งจากการทำยางแผ่น. ว.สงขลานครินทร์ 7(2):155-158.

อรัญ หันพงศ์กิตติกูล. 2524. การใช้ประโยชน์จากน้ำเสียของการทำยาง. ว.ยางพารา 2(3):141-146.

อโณทัย คมเศวต. 2519. การศึกษาการเจริญของยีสต์อาหารสัตว์ โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Archer, B.L.; B.G. Audley; G.P. McSweeney and Tan Chu Hong. 1969. Studies on composition of latex serum and bottom fraction particles. Journal Rubber Research Institute of Malaya. 21(4):560-569.

Berry, R.D. 1982. The Biology of Yeast. Edward Arnold Limited. London. p.10-16.

Bhattacharjee, J.E. 1970. Microorganisms as potential sources of food. Adv. Appl. Microbiol. 13:139-159.

Blanch, H.W. and A. Einsele. 1973. The Kinetics of yeast growth on pure hydrocarbon. Biotechnol. Bioeng. 15(5):861-877.

Brock, D.T. 1979. Biology of Microorganism. 3rd edition. Prentice-Hall, Inc., New Jersey. p.119-131.

Cunningham, S.D., C.M. Cater and K.F. Mattil. 1975. Rupture and protein extraction of petroleum-grown yeast. J. Food Sci. 40:732-735.

Frazier, W.C. and D.C. Westhoff. 1978. Food Microbiology. 3rd edition, New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company.

Ibrahim, A. 1982. Treatment and utilization of rubber factory effluent. RRIM Training Manual on Natural Rubber Processing. p.217-232.

John, C.K. 1972. Non-rubber constituents of hevea latex and their possible utilization. Waste Recovery by Microorganisms. Organized by W.R. Stanton. The Ministry of Education, Kuala Lumpur. p.110-117.

John, C.K. 1976. Utilization of waste from natural rubber processing factories. IFS Work (Fermentation Applied Microbiology 1974-1980). Sweden. p.E17.

Kulkarni, P.R. 1972. Recovery of algae grown on rubber effluents. Waste Recovery by Microorganisms. Organized by W.R. Stanton. The Ministry of Education, Kuala Lumpur. p.118-128.

Matales, R.I. and S.R. Tannenbaum. 1968. Single cell Protein. Cambridge, Mass. M.I.T. Press.

Miller, F.H. 1969. Conversion of organic solid waste into yeast and economic evalution. Ionics, Inc. Watertown, Massachusetts.

Nolte, A.J.; H.W.V. Loesecke and G.N. Pulley. 1942. Feed yeast and industrial alcohol from citrus-waste press juice. Ind. Eng. Chem. 34:670-673.

Peppler, H.J. 1970. Chapter 8 : Food Yeasts. The Yeasts. Vol.3. Rose A.H. and J.S. Harrison. (Editors). Academic Press. London.

Presscott, S.C. and C.G. Dunn. 1959. Industrial Microbiology. McGraw-Hill Book Company. New York.

Phang Siew Moi. 1977. Aspects of the culture of algae in rubber effluent and Utilization of the algae as animal feed. IFS Work (Fermentation Applied Microbiology 1974-1980). Sweden. p.E17.

Reed, G. and H.J. Peppler. 1973. Yeast Technology. The AVI Publishing Company.

Reiser, C.O. 1954. Torula yeast from potato starch waste. Agri. Food Chem. 2:70-74.

Shannon, L.J. and K.E. Stevenson. 1975. Growth of fungi and B.O.D. reduction in selected brewery waste. J. Food Sci. 40:826-829.

Snyder, E.E. 1970. Microbial source of protein. Adv. Food Res. 18:85-140.

Suomalainen, H. and E. Oura. 1970. Chapter 2 : Yeast Nutrition and Solute Uptake. The Yeasts. Vol.2. Rose, A.H. and J.S. Harrison. (Editors). Academic Press. London.

Tannenbaum, S.R. and D.I.C. Wang. 1974. Single cell protein 2. Cambridge, Mass. M.I.T. Press.

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

Wasserman, A.E.; J. Hampson; N.F. Alvare and N.J. Alvare. 1961. Whey utilization V. Growth of *Saccharomyces fragilis* in whey in a pilot plant. J. Dairy Sci. 44:387-392.