บทคัดย่อ

T 142030

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนสำหรับการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากยีสต์ *Schwanniomyces occidentalis* TISTR5555 โดยศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวในระดับขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร การขยายขนาดการผลิตในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร และการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ด้วยวิธีการหลอมรวมโปรโตพลาสต์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น จากการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังทดแทนน้ำตาลกลูโคสในสูตรอาหาร YMPD พบว่าความเข้มข้นของกากมันสำปะหลัง 8% (w/v) ให้ผลผลิตมวลชีวภาพเซลล์ยีสต์และปริมาณโปรตีนสูงสุด แต่ปัญหาของความหนืดของอาหารเพาะเลี้ยงทำให้การผสมของอาหารและการเก็บตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ในระดับขวดเขย่าทำได้ยาก และเมื่อทำการทดลองในถังปฏิกรณ์ที่มีใบพัดช่วยการผสมของอาหาร พบว่าการผสมกันของอาหารเกิดได้ดีขึ้น แต่ยังเกิดปัญหาในส่วนของกระจายตัวของอากาศที่ให้ในถังปฏิกรณ์ นอกจากนี้ปริมาณเซลล์และโปรตีนที่ได้ไม่แตกต่างกับการใช้กากมันสำปะหลัง 6% ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้นของกากมันสำปะหลัง 6% (w/v) จึงเป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาครั้งนี้ เมื่อทำการแปรผันปัจจัยในการผลิต ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) แหล่งไนโตรเจน (Bacto-peptone, $(NH_4)_2SO_3$, NH_4NO_3) อาหารเสริม (Yeast extract และ Malt extract) พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวคือความเข้มข้นของกากมันสำปะหลัง 6% แอมโมเนียมซัลเฟต[$(NH_4)_2SO_3$] 0.5% และ Yeast extract 0.5% ที่ความเป็นกรด-ด่าง 6.5 โดยให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดภายใต้สภาวะการทดลอง (อุณหภูมิ 30°C อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที) เมื่อทำการขยายขนาดการผลิตในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตรภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงเดียวกับระดับขวดเขย่าที่อัตราการให้อากาศ 2 vvm. อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที โปรตีนเซลล์เดียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์เป็นเวลา 60 ชั่วโมง มีค่าโปรตีนโดยรวม ปริมาณไขมัน และปริมาณเส้นใยเท่ากับ 22.03, 0.43 และ 18.46 % น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกากมันสำปะหลังแห้งที่ยังไม่ผ่านกระบวนการผลิต พบว่าผลิตภัณฑ์โปรตีนเซลล์เดียวที่ได้มีค่าปริมาณโปรตีนโดยรวมและปริมาณเส้นใยเพิ่มขึ้น 10 และ 2 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณไขมันต่างกันเพียงเล็กน้อย

เมื่อทำการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ *Schw. occidentalis* TISTR5555 เพื่อให้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงขึ้นด้วยวิธีการหลอมรวมโปรโตพลาสต์กับยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* YS8 ตามสภาวะการหลอมรวมของ Klaus (1995) สามารถคัดเลือกลูกผสมได้ 20 สายพันธุ์ (KKU01-KKU20) ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็งของ Starch-YNB ที่ 42 °C เมื่อย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนจะปรากฏบริเวณส่วนใสรอบโคโลนี แต่ไม่ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ *Schw. occidentalis* ที่เพาะเลี้ยงที่ 30 °C เมื่อศึกษาสัณฐานวิทยา การเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (α-amylase และ glucoamylase) ของเซลล์ลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นในอาหารเพาะเลี้ยงเหลว Starch-YEP พบว่าลูกผสมที่เลือกใช้ในการศึกษา คือ KKU03 และ KKU13 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึง *K. marxianus* และกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ของเซลล์ลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์มีค่าต่ำกว่า *Schw. occidentalis* แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ glucoamylase ใกล้เคียงกับ *Schw. occidentalis* ทั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 42°C แต่ลูกผสมสามารถเจริญเติบโตและการย่อยสลายแป้งได้ต่ำมาก ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเหลว เมื่อทำการศึกษาความคงตัวของลูกผสมด้วยการต่อเชื้อทุก ๆ 3 วันเป็นจำนวน 10 ครั้ง พบว่าลูกผสมสามารถเจริญได้ดีเช่นเดียวกับการต่อเชื้อครั้งแรก ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าลูกผสมที่ได้จากการหลอมรวมโปรโตพลาสต์เป็นลูกผสมที่ได้จากการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *Schw. occidentalis* TISTR5555 และ *K. marxianus* YS8 ที่แสดงคุณสมบัติร่วมบางประการของสายพันธุ์ตั้งต้นทั้งสองสายพันธุ์ แต่การหลอมรวมของโครโมโซมในระหว่างการหลอมรวมโปรโตพลาสต์อาจเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์หรืออาจเกิดการแลกเปลี่ยนข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงบางส่วนเท่านั้น จึงทำให้ลูกผสมไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์อะไมเลสได้เช่นเดียวกับ *Schw. occidentalis* TISTR5555

ABSTRACT

TE142030

Single cell protein (SCP) is used for protein supplementation of staple diet by replacing costly conventional sources to alleviate the problem of protein scarcity. Moreover, bioconversion of agriculture and industrial wastes to protein-rich food and fodder stocks has an additional benefit of making the final product cheaper. Cassava pulp, one of cassava starch industrial wastes, was used as carbon source in SCP production by amylolytic yeast *Schwanniomyces occientalis* TISTR5555. The optimum condition for a high biomass production of *Schw. occidentalis* was studied by varying the concentrations of cassava pulp, nitrogen sources (Bacto-peptone, $(NH_4)_2SO_3$, NH_4NO_3) and the media supplements (yeast extract and malt extract). The optimum pH for *Schw. occidentalis* was also studied. The temperature and agitation speed used were 30°C and 200 rpm respectively. Cassava starch, which contained in cassava pulp, was degraded within 12-18 h of incubation. The higher cassava pulp concentration gave higher biomass concentration. However, at the highest cassava pulp concentration (8%), a high viscosity was formed. High viscosity of the medium caused a difficulty in mixing and sample taking in shaked flask culture. Moreover, cell and protein concentrations obtained from 8% and 6% cassava pulp medium were not different significantly. Thus, 6% cassava pulp was used for the furture experiments. The pH for growth was varied in the rang of 5-7. The result showed that pH 6.5 exhibited the highest cell mass. The type and concentration of nitrogen sources were studied. It was found that 0.5% $(NH_4)_2SO_3$ exhibited the highest cell growth. 05% yeast extract was found to be the best medium supplement for *Schw. occidentalis*. Thus, 6% cassava pulp, 0.5% $(NH_4)_2SO_3$ and 0.5% yeast extract were used as production medium. The SCP production by *Schw. occidentalis* in 5 L reactor was studied. The result showed that the SCP product contained 22.03% dry weight of total protein, 0.43% dry weight of lipid and 18.46% dry weight of fiber which were 10 times of total protein and 2 times of fiber of the original cassava pulp.

The production cost of cooling system of SCP production could be reduced if *Schw. occidentalis* could grow at high temperature (above 37°C). The protoplast fusion technique was used for construction of amylolytic thermotolerant yeasts between *Schw. occidentalis* TISTR5555 (amylolytic enzyme producer) and *Kluyveromyces marxianus* YS8 (able to grow at high temperature; 40-42°C). Twenty fusants (KKU01-KKU20) were obtained on Starch-YNB medium plate which was used as a selective medium (1% Cassava starch, 0.5% Yeast nitrogen base with amino acid, 2% agar, pH 6.5) at 42°C. The picked up fusants could be able to grow on starch-composed medium at 42 °C and created a light clear zone around their colonies, which was not as clear as the halo of *Schw. occidentalis*. The morphology of fusants was the same as *K. marxianus* when they were monitored under microscope. The chromosome pattern of fusants studied by using pulsed field electrophoresis technique was similar to *K. marxianus*. The fusants, however, showed low growth ability in Starch-YEP broth (1% Cassava starch, 0.5% Bacto-peptone, 0.3% Yeast extract, pH 6.5). The amylase activity of the fusants and parental strains was studied. The results showed that the fusants obtained a lower α-amylase activity than *Schw. occidentalis* while their glucoamylase activity was similar to *Schw. occidentalis*. These may cause their low growth ability in the medium broth. These fusants could grow on Starch-YNB medium plate at both 30 °C and 42 °C, while *Schw. occidentalis* could grow only at 30 °C and *K. marxianus* could not grow at all. The stability of the fusants was also studied by subculturing on the Starch-YNB agar plates. The results showed that, after 10 passages, they cloud grow on the Starch-YNB medium as good as the first generation. From these results, it could be concluded that the fusants were the hybrids between *Schw. occidentalis* and *K. marxianus*, which showed some characters of the parental strains hybridization.