

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สะสมไขมันจากแหล่งธรรมชาติ

การคัดเลือกยีสต์สะสมไขมัน (Oleaginous yeast) ในงานวิจัยนี้คัดเลือกมาจากวัตถุดิบเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมการเกษตร ซึ่งตัวอย่างที่นำมาคัดแยกมี 5 ตัวอย่าง ดังนี้ จากฟางข้าวแห้ง, กากถั่วเหลือง (ของเสียจากกระบวนการทำน้ำเต้าหู้), ก้อนแป้งสาโท, น้ำอ้อยเริ่มเน่าเสีย และจากน้ำเสียโรงงานชำแหละไก่ บริษัท ขอนแก่น โพลทรี จำกัด โดยการนำตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPG medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำมาเกลี่ยบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาคัดแยกยีสต์ที่มีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว ซึ่งสามารถคัดเลือกยีสต์ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ

แหล่งตัวอย่าง	ไอโซเลตยีสต์ที่พบ
ฟางข้าวแห้ง (Rc)	Rc 01, Rc 02, Rc 03, Rc 04, Rc 05
กากถั่วเหลือง (Sbc)	Sbc 01, Sbc 02, Sbc 03, Sbc 04, Sbc 05, Sbc 06, Sbc 07
ลูกแป้งสาโท (Yc)	Yc 01, Yc 01, Satho
น้ำอ้อยเริ่มเน่าเสีย (Scj)	Scj 01, Scj 02, Scj 03, Scj 04, Scj 05, Scj 06, Scj 07, Scj 08, Scj 09, Scj 10, Scj 11, Scj 0A, Scj 0B, Scj 0C, Scj 0D, Scj 0E, Scj 0F, Scj 0G, Scj 0H, Scj 0I, Scj 0J, Scj 0K
น้ำเสียโรงงานชำแหละไก่	ไม่พบเชื้อยีสต์

จากการคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมด 37 ไอโซเลต ซึ่งทั้ง 37 ไอโซเลต สามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าเป็นยีสต์โดยการทดสอบเบื้องต้น ด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะเซลล์ของเชื้อทั้ง 37 ไอโซเลต เมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แล้วมีลักษณะคล้ายกับเซลล์ยีสต์ เช่น มีการแตกหน่อ และมีเซลล์ขนาดใหญ่ การคัดแยกยีสต์สะสมไขมันสามารถคัดแยกได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น รัตนกรณ ลีสิงห์ (2551ก) คัดแยกจากดินในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ ซึ่งสามารถคัดแยกยีสต์ได้ 42 ไอโซเลต รวมไปถึง Mei et al., (2009) คัดแยกยีสต์จากผิวหนังของปลาทะเล ซึ่งสามารถคัดแยกยีสต์ได้มากกว่า 100 ไอโซเลต และยังมีบางรายงานถึงการคัดแยกยีสต์สะสมไขมันจากดิน หรือจากน้ำเสียจากโรงงาน (รัตนกรณ ลีสิงห์, 2551ข) ซึ่งยีสต์สะสมไขมันนี้สามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งธรรมชาติ โดยทั่วไปแล้วการคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันต้องมีการทดสอบยีสต์ว่ายีสต์ที่คัดแยกได้สามารถสะสมไขมันได้มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งจึงถือว่าเป็นยีสต์สะสมไขมันได้

4.2 ผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้

การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์เพื่อหายีสต์สะสมไขมันที่สามารถเจริญและสะสมไขมันได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง โดยการแปรผันอุณหภูมิในการทดสอบการเจริญ คือ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง โดยในการทดสอบนี้ จะคัดเลือกยีสต์ที่สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิสูงที่สุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ ผลการคัดแยกสามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 37 ไอโซเลท และนำมาทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2 และ 4.3

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้จาก จากฟางข้าว (Rc), กากถั่วเหลือง (Sbc), ก้อนแป้งสาโท (Yc, Satho) ที่อุณหภูมิต่างๆ

ไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)			
	30 องศาเซลเซียส	35 องศาเซลเซียส	40 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส
Sbc 01	1.23	1.38	1.08	ไม่มีการเจริญ
Sbc 02	1.35	1.40	1.15	ไม่มีการเจริญ
Sbc 03	1.23	1.28	1.20	ไม่มีการเจริญ
Sbc 04	1.30	1.33	1.10	ไม่มีการเจริญ
Sbc 05	1.33	1.35	1.13	ไม่มีการเจริญ
Sbc 06	1.13	1.30	1.40	ไม่มีการเจริญ
Sbc 07	1.30	1.43	1.15	ไม่มีการเจริญ
Rc 01	1.20	1.45	1.18	ไม่มีการเจริญ
Rc 02	1.48	1.55	1.15	ไม่มีการเจริญ
Rc 03	1.18	1.38	1.43	ไม่มีการเจริญ
Rc 04	1.50	1.40	1.10	ไม่มีการเจริญ
Rc 05	1.30	1.28	1.15	ไม่มีการเจริญ
Yc 01	1.25	1.33	1.13	ไม่มีการเจริญ
Yc 02	1.20	1.38	1.40	ไม่มีการเจริญ
Satho	1.15	1.38	1.15	ไม่มีการเจริญ

ตารางที่ 4.3 ผลทดสอบการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้จากน้ำอ้อยเน่าเสีย (Scj) ที่อุณหภูมิสูงต่างๆ

ไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)			
	30 องศาเซลเซียส	35 องศาเซลเซียส	40 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส
Scj 01	1.45	2.03	2.25	ไม่มีการเจริญ
Scj 02	1.48	1.75	1.25	ไม่มีการเจริญ
Scj 03	1.55	1.40	1.22	ไม่มีการเจริญ
Scj 04	1.53	2.10	1.23	ไม่มีการเจริญ
Scj 05	1.25	2.60	1.03	ไม่มีการเจริญ
Scj 06	1.25	2.40	1.15	ไม่มีการเจริญ
Scj 07	1.20	1.45	1.25	ไม่มีการเจริญ
Scj 08	1.20	1.83	1.30	ไม่มีการเจริญ
Scj 09	1.25	1.55	1.35	ไม่มีการเจริญ
Scj 10	1.20	1.35	1.25	ไม่มีการเจริญ
Scj 11	1.45	1.45	1.50	ไม่มีการเจริญ
Scj 0A	1.20	1.43	1.45	ไม่มีการเจริญ
Scj 0B	1.88	1.50	1.00	ไม่มีการเจริญ
Scj 0C	1.35	1.33	1.20	ไม่มีการเจริญ
Scj 0D	1.50	2.68	1.15	ไม่มีการเจริญ
Scj 0E	2.50	1.90	1.55	1.03
Scj 0F	2.55	1.88	1.07	ไม่มีการเจริญ
Scj 0G	1.73	2.00	1.18	ไม่มีการเจริญ
Scj 0H	1.55	2.75	1.10	ไม่มีการเจริญ
Scj 0I	1.50	1.48	1.13	ไม่มีการเจริญ
Scj 0J	2.20	1.70	1.15	ไม่มีการเจริญ
Scj 0K	1.38	2.75	1.13	ไม่มีการเจริญ

จากการทดลองพบว่ายีสต์ที่คัดแยกได้ทั้ง 37 ไอโซเลทสามารถเจริญได้สูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส แต่มียีสต์เพียง 7 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสยีสต์ที่คัดเลือกได้ไม่สามารถเจริญได้ ยกเว้น ยีสต์ไอโซเลท Scj 0E ที่ยังสามารถเจริญได้เล็กน้อยแต่ไม่มากนัก จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าอุณหภูมิที่สูงที่สุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งมี 7 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ส่วนไอโซเลทอื่นเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

4.2.1 ยีสต์ที่คัดแยกจากกากถั่วเหลือง, ฟางข้าวแห้ง และก้อนแป้งสาโท สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส ตัวอย่างละ 1 ไอโซเลท รวมทั้งหมด 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท Sbc 06, Rc 03 และ Yc 02

4.2.2 ยีสต์ที่คัดแยกจากน้ำอ้อยเน่าเสีย สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส มีอยู่ 4 ไอโซเลท ดังนี้ ไอโซเลท Scj 01, Scj 11, Scj 0A และ Scj 0E

4.2.3 ยีสต์ที่คัดเลือกได้จากน้ำอ้อยเน่าเสีย สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง 45 องศาเซลเซียส มีอยู่ 1 ไอโซเลท ดังนี้ ไอโซเลท Scj 0E

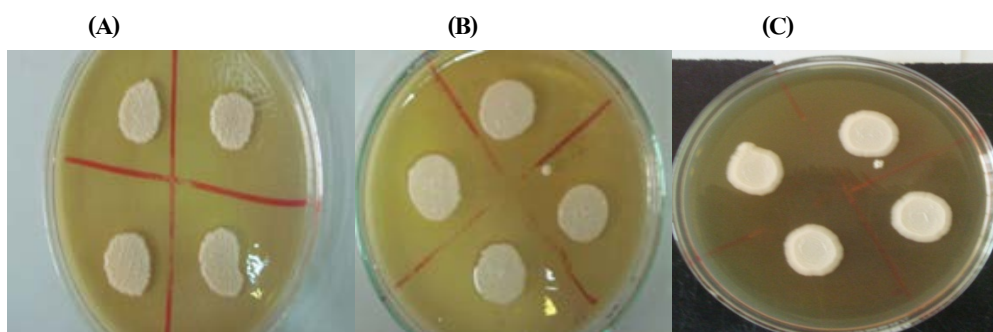
ตารางที่ 4.4 ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร) ของยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงทั้ง 7 ไอโซเลทที่เจริญในอุณหภูมิต่างๆ

ไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)			
	30 องศาเซลเซียส	35 องศาเซลเซียส	40 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส
Scj 01	1.45	2.03	2.25	ไม่มีการเจริญ
Scj 11	1.45	1.45	1.50	ไม่มีการเจริญ
Scj 0A	1.20	1.43	1.45	ไม่มีการเจริญ
Scj 0E	2.50	1.90	1.55	1.03
Sbc 06	1.13	1.30	1.40	ไม่มีการเจริญ
Rc 03	1.18	1.38	1.43	ไม่มีการเจริญ
Yc 02	1.20	1.38	1.40	ไม่มีการเจริญ

จากตารางที่ 4.4 เป็นผลจากการวัดขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร) ของยีสต์ที่คัดแยกได้โดยที่มีการทดสอบการเจริญโดยใช้วิธีการหยดเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง (drop plate) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ต่างๆ แล้วนำมาวัดขนาดของโคโลนีเพื่อเปรียบเทียบในแต่ละอุณหภูมิ โดยจากผลการทดลองพบว่ายีสต์ที่คัดแยกได้เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยเมื่อยีสต์มีขนาดของโคโลนีใหญ่นั้นแสดงให้เห็นว่ายีสต์สามารถเจริญได้ดี เมื่อมีขนาดของโคโลนีใหญ่ขึ้นการเจริญยิ่งดีขึ้นตามไปด้วย จากตารางสรุปได้ว่าเชื้อไอโซเลท Sbc 06, Rc 03, Scj 01, Scj 11, Scj 0A และ Yc 02 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิสูงที่ 40 องศาเซลเซียส โดยเมื่อวัดการเจริญพบว่ายีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลทมีการเจริญที่ดีกว่าอุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ดังนั้นทำให้ทราบว่ายีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลทเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ยกเว้นยีสต์ไอโซเลท Scj 0E ที่มีขนาดของโคโลนีที่ใหญ่ที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิสูงที่ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ยีสต์ Scj 0E ก็ยังสามารถเจริญได้ดีใกล้เคียงกับยีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลทข้างต้น จึงถือว่าเป็นยีสต์ที่สามารถเจริญและสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้เช่นกัน ซึ่งรวมทั้งสิ้นสามารถ

คัดแยกยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงได้ จำนวน 7 ไอโซเลต ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิสูงที่สุดในงานวิจัยนี้

สภาวะที่เหมาะสมทั่วไปของการเจริญของยีสต์ส่วนใหญ่ยีสต์จะสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ซึ่งจะมียีสต์บางสายพันธุ์เท่านั้นที่จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส และการที่ยีสต์สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส ถือว่าเป็นยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน (Thermotolerant) การที่ยีสต์สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงจะสามารถช่วยในการลดการใช้พลังงานในการทำหมักที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ และการที่ยีสต์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องของสภาพอากาศในประเทศไทยซึ่งอาจจะช่วยลดการใช้พลังงานในการควบคุมอุณหภูมิได้อีกทางเลือกหนึ่ง ในรายงานทั่วไปมีน้อยมากที่มีการเพาะเลี้ยงยีสต์ในอุณหภูมิสูงเพื่อการสะสมไขมัน โดยส่วนใหญ่จะมีการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อการสะสมไขมันที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ยีสต์ทั่วไปเจริญได้ดี

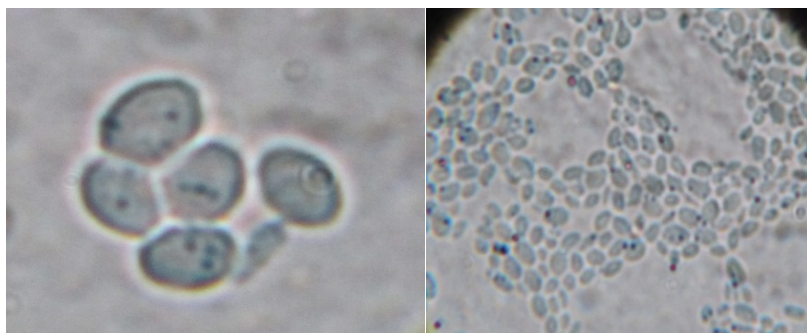


ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่คัดแยกได้ในการทดสอบการเจริญที่มีการแปรผันอุณหภูมิ (A) ไอโซเลต Yc 02 , (B) ไอโซเลต Rc 03 , (C) ไอโซเลต Sbc 06

4.3 การทดสอบการสะสมไขมันของยีสต์ โดยวิธี Sudan Black B และ โดยวิธี Colorimetric method

การทดสอบการสะสมไขมันของยีสต์สะสมไขมันโดยการย้อมด้วยวิธี Sudan Black เป็นการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของยีสต์ว่าสามารถสะสมหรือผลิตไขมันได้ โดยภายในเซลล์ยีสต์สะสมไขมันจะมีไขมันเป็นหยดไขมันเล็กๆ ภายในเซลล์ เมื่อย้อมด้วย Sudan Black หยดไขมันเล็กๆภายในเซลล์จะสามารถติดสีของ Sudan Black ซึ่งจะเห็นเป็นวงกลมเล็กๆภายในเซลล์ติดเป็นสีดำหรือสีม่วงดังแสดงในภาพที่ 4.2 ซึ่งสามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่ายีสต์มีความสามารถในการผลิตหรือสะสมไขมันได้ ซึ่งผลทดสอบของยีสต์ทั้ง 37 ไอโซเลต แสดงไว้ในตารางที่ 4.5-4.6

การติดสี Sudan Blank ของเซลล์ยีสต์จะสามารถติดสีได้ตามปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์ โดยภายในเซลล์ของยีสต์จะมีหยดน้ำมันเล็กๆภายในเซลล์ซึ่งส่วนที่จะติดสีของ Sudan Blank ถ้ามีการติดสีของ Sudan Blank มากและหนาแน่นแสดงว่ายีสต์สามารถมีการสะสมไขมันภายในเซลล์ปริมาณมาก โดยยีสต์แต่ละสายพันธุ์จะมีการติดสีของ Sudan Blank ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณไขมันภายในเซลล์แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังเป็นการทดสอบการสะสมไขมันของยีสต์ในเบื้องต้นเท่านั้น



ภาพที่ 4.2 ลักษณะเซลล์ยีสต์ที่ย้อมสี โดยวิธี Sudan Blank

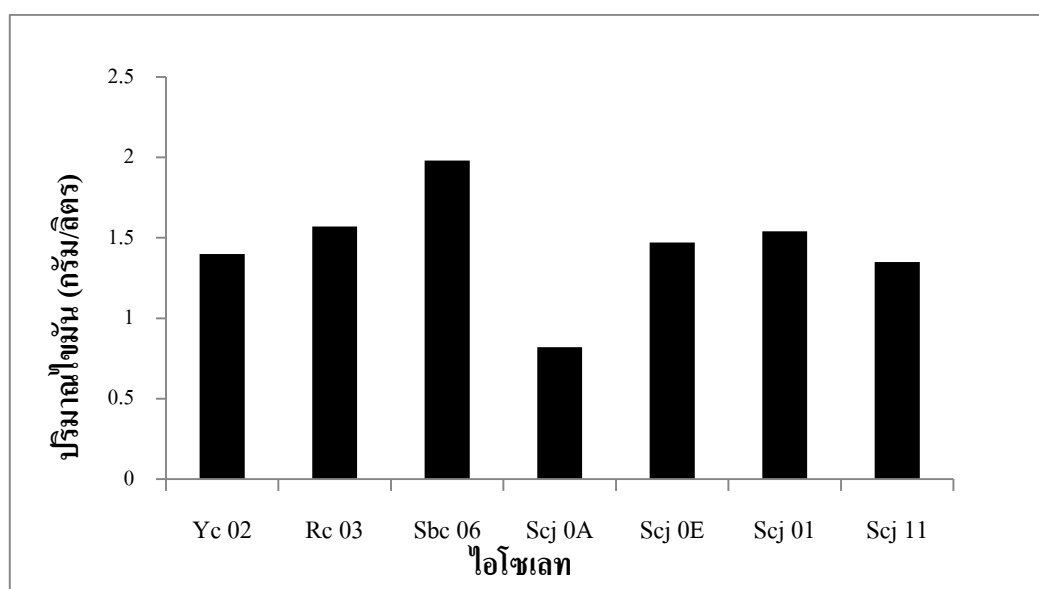
ตารางที่ 4.5 การทดสอบการสะสมไขมันของยีสต์ โดยวิธี Sudan Black ของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกจากจากฟางข้าวแห้ง (Rc), กากถั่วเหลือง (Sbc), ก้อนแป้งสาโท (Yc, Satho)

ไอโซเลต	ระดับการติดสี Sudan Blank
Sbc 01	++
Sbc 02	-
Sbc 03	+
Sbc 04	+
Sbc 05	++
Sbc 06	+++
Sbc 07	++
Rc 01	++
Rc 02	+++
Rc 03	++
Rc 04	+++
Rc 05	+++
Yc 01	++
Yc 02	++
Satho	+++
*หมายเหตุ	
- ไม่ติดสี Sudan Black	++ ติดสี Sudan Black ปานกลาง
+ ติดสี Sudan Black น้อย	+++ ติดสี Sudan Black มาก

ตารางที่ 4.6 การทดสอบการสะสมไขมันของยีสต์ โดยวิธี Sudan Black ของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกจากน้ำอ้อยเน่าเสีย (Scj)

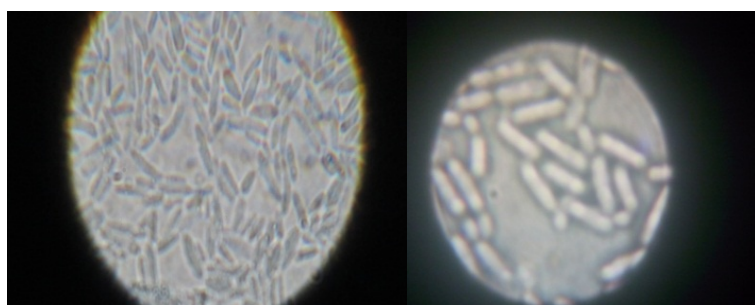
ไอโซเลท	ระดับการติดสี Sudan Black
Scj 01	++
Scj 02	++
Scj 03	+++
Scj 04	++
Scj 05	++
Scj 06	-
Scj 07	+
Scj 08	+
Scj 09	++
Scj 10	++
Scj 11	+
Scj 0A	+
Scj 0B	++
Scj 0C	++
Scj 0D	-
Scj 0E	+
Scj 0F	+
Scj 0G	-
Scj 0H	++
Scj 0I	+
Scj 0J	+
Scj 0K	+++
*หมายเหตุ	
- ไม่ติดสี Sudan Black	++ ติดสี Sudan Black ปานกลาง
+ ติดสี Sudan Black น้อย	+++ ติดสี Sudan Black มาก

การทดสอบการสะสมไขมันของยีสต์โดยวิธี Colorimetric method เป็นวิธีการหาปริมาณไขมันโดยการสกัดไขมันภายในเซลล์ โดยการทดลองเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงเพื่อดูว่ายีสต์สามารถผลิตไขมันได้หรือไม่ตามที่ทดสอบ ด้วย Sudan Blank โดยการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อดูการสะสมไขมันนี้จะทดสอบเฉพาะยีสต์ที่สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส จำนวน 7 ไอโซเลท โดยกำหนดสภาวะในการเพาะเลี้ยงดังนี้ อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ production medium ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 20 กรัม/ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบ/นาที ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 8 วัน ผลการทดสอบการหาปริมาณไขมันของยีสต์สะสมไขมันด้วยวิธี Colorimetric method ได้ผลดังนี้ เชื้อยีสต์ไอโซเลท Yc 02, Rc 03, Sbc 06, Scj 0A, Scj 0E, Scj 01 และ Scj 11 มีปริมาณไขมันที่วิเคราะห์ได้ 1.4, 1.57, 1.98, 0.82, 1.47, 1.54 และ 1.35 กรัม/ลิตร ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 4.3 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าเชื้อยีสต์ทั้ง 7 ไอโซเลท สามารถสะสมไขมันได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงในปริมาณที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงปริมาณไขมันที่สกัดได้จากยีสต์สะสมไขมันด้วยวิธี Colorimetric method โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร Production medium, อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบ/นาที ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 8 วัน

จากผลการทดลองข้างต้นเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเพื่อทดสอบการผลิตและการสะสมไขมันของยีสต์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 7 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมไขมันได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง (40 องศาเซลเซียส) และจากภาพที่ 4.3 จะเห็นได้ว่ายีสต์ไอโซเลท Sbc 06 สามารถผลิตไขมันได้สูงสุด และ รองลงมาเป็นยีสต์ไอโซเลท Scj 01 เมื่อนำยีสต์ทั้งสองชนิดไปจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์พบว่า ไอโซเลท Sbc 06 มีผลการจำแนกเป็นยีสต์สายพันธุ์ *Candida tropicalis* และ ไอโซเลท Scj 01 มีผลการจำแนกเป็นยีสต์สายพันธุ์ *Pichia kudriavzevii* ซึ่งมีงานวิจัยที่มีการศึกษาศักยภาพการผลิตไขมันของยีสต์ *Candida tropicalis* แล้วหลายงานวิจัยและจากการทดลองเบื้องต้นพบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Candida tropicalis* สามารถผลิตไขมันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่ยีสต์ *Pichia kudriavzevii* ยังไม่มีรายงานการนำมาศึกษาศักยภาพในการผลิตไขมัน และจากการทดสอบเบื้องต้นพบว่ายีสต์ *Pichia kudriavzevii* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย เช่น การใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้และมีการผลิตไขมันที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียสที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการนำยีสต์ไอโซเลท Scj 01 มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันที่อุณหภูมิสูงในขั้นตอนการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 4.4 ลักษณะเซลล์ยีสต์ไอโซเลท Scj01 ส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์

ในการสะสมไขมันหรือการผลิตไขมันของจุลินทรีย์จะสามารถสะสมและผลิตไขมันได้ดีก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาวะการเจริญและสภาวะการผลิตไขมันที่เหมาะสมด้วย ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมประกอบด้วยกันหลายปัจจัยทั้งปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมี ซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไป เช่นเดียวกับรัตนภรณ์ ลิสิงห์ (2551ข) ได้ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยวิธี Colorimetric method โดยเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Production medium ที่มีปริมาณกลูโคสสูง 90 กรัม/ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็วรอบ 130 รอบ/นาที ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 8 วัน พบว่ายีสต์ไอโซเลท OYS3 สามารถให้ปริมาณไขมันสูงสุดที่ 4.10 กรัม/ลิตร หรือ 52.7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง

4.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

เอนไซม์ คือ ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ เป็นสารประกอบจำพวกโปรตีนสามารถลดพลังงานก่อกัมมันต์ของปฏิกิริยา เอนไซม์จะเร่งเฉพาะชนิดของปฏิกิริยา และชนิดของสารที่เข้าทำปฏิกิริยา จากการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทำให้ทราบค่าความเข้มข้นของเอนไซม์เริ่มต้น ซึ่งจากการทดลองจะทำให้ทราบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสมีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่าไร ในงานวิจัยนี้ได้นำเอนไซม์ทางการค้ามาใช้ในการย่อยมันเทศ ซึ่งเอนไซม์ที่นำมาใช้ คือ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส (ของ Novozyme) ซึ่งค่าการหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะรายงานในหน่วยของ SDU (Starch Digestion Unit) โดย 1 หน่วยกิจกรรมเอนไซม์ คือปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งมันเทศเป็นมิลลิลิตรแล้วทำให้เกิดกลูโคส 1 ไมโครโมล/นาที่ ในสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์นั้นๆ ผลการวิเคราะห์ค่าการเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการหากิจกรรมของเอนไซม์ ได้ผลดังนี้

4.4.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

การหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยใช้สภาวะการทำงานที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสตามที่บริษัทผู้ผลิตได้กำหนดไว้เพื่อทดสอบในการย่อยแป้งมันเทศที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-hydrochloric buffer ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 เมื่อทำการเจือจางเอนไซม์ตั้งแต่ 10 เท่า ถึง 10⁶ เท่า พบว่าอัตราการเจือจางที่ 10⁵ เท่า เป็นอัตราการเจือจางสูงสุดที่ยังทำให้เห็นความแตกต่างของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตามค่าอัตราการเจือจาง (เช่น เจือจาง 100 เท่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น 100 เท่า) ที่อัตราการเจือจางสูงกว่นี้ จะทำให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่น้อยกว่าค่าอัตราการเจือจาง ดังนั้นจึงเลือกใช้ค่าการเจือจางที่ 10⁵ เท่านี้ในการหากิจกรรมเริ่มต้นของเอนไซม์ จากการวิเคราะห์พบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีกิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 70,000 หน่วย/มล.ของเอนไซม์ ซึ่งบอกได้ว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 1 มิลลิลิตรมีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 70,000 หน่วย ซึ่งมีศักยภาพในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลได้สูง

4.4.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

การหากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสใช้สภาวะการทำงานที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเพื่อทดสอบการย่อยแป้งมันเทศที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ acetate buffer ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.3-4.5 เมื่อทำการวิเคราะห์หาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมเช่นเดียวกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส พบว่าที่อัตราการเจือจาง 10⁴ เท่า เป็นอัตราการเจือจางที่เหมาะสมซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าห้กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะมีค่าประมาณ 7,900 หน่วย/มล.ของเอนไซม์ ซึ่งบอกได้ว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 1 มิลลิลิตรมีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 7,900 หน่วย

การวิเคราะห์หากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จะมีค่ากิจกรรมที่แตกต่างกันเมื่ออยู่ในสภาวะที่แตกต่างกัน ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด การทำงานของเอนไซม์ทุกชนิดต้องอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมของการทำงานเอนไซม์นั้นๆเท่านั้น เอนไซม์นั้นจึงจะสามารถให้กิจกรรมการทำงานที่ดีและสูงที่สุด โดยปัจจัยที่สามารถทำให้เอนไซม์ทำงานได้ด้นั้นประกอบด้วยกันหลายปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย รวมไปถึงชนิดของสารที่เอนไซม์ไปควบคุมปฏิกิริยา

ในการหากิจกรรมของเอนไซม์ควรมีการหากิจกรรมเอนไซม์ทุกครั้งเมื่อนำมาใช้งาน เนื่องจาก เอนไซม์สามารถสูญเสียสภาพได้ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ซึ่งสามารถทำให้กิจกรรมของเอนไซม์นั้นลดลงได้ ดังนั้นควรเก็บเอนไซม์ไว้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำเพื่อลดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ให้ได้มากที่สุด และเพื่อการคงสภาพของเอนไซม์เมื่อนำมาใช้งาน ดังนั้นก่อนการใช้งานทุกครั้งจึงควรนำเอนไซม์มาวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้นก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

4.5 การศึกษาการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์ในห้องปฏิบัติการ

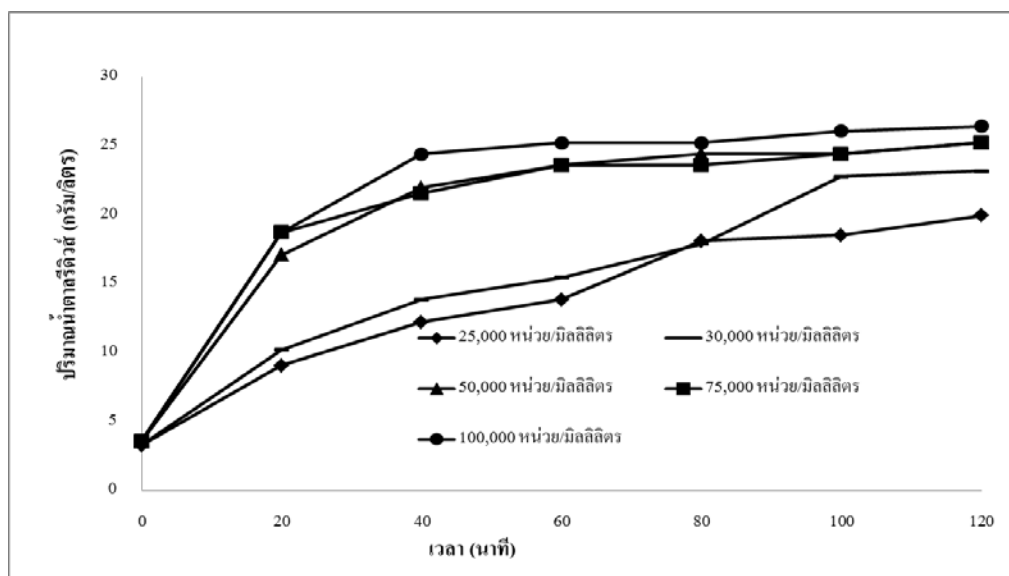
ในการผลิตกลูโคสจากการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์นั้นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และ เอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ทางการค้า (Novozyme) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และปริมาณความเข้มข้นของมันเทศที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการผลิตกลูโคสให้ได้ปริมาณสูงที่สุด โดยการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการมีปริมาตรการทดลอง 100 มิลลิลิตร

ในการผลิตน้ำตาลกลูโคสโดยใช้เอนไซม์ในการย่อยมันเทศนั้นยังไม่มีรายงานการวิจัยมากนัก ส่วนใหญ่เป็นการย่อยมันสำปะหลังที่ โดยในปัจจุบันการผลิตกลูโคสจะผลิตได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ นอกจากนี้สภาวะที่จะนำไปใช้ขึ้นอยู่กับที่มาของเอนไซม์ด้วย ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เอนไซม์ดังกล่าวเพื่อย่อยมันเทศ การผลิตกลูโคสจากมันเทศอาจมีสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยที่แตกต่างกับการย่อยแป้งชนิดอื่นๆที่ไม่ใช่มันเทศ ซึ่งทั้งสองเอนไซม์จะมีสภาวะการทำงานที่ต่างกัน

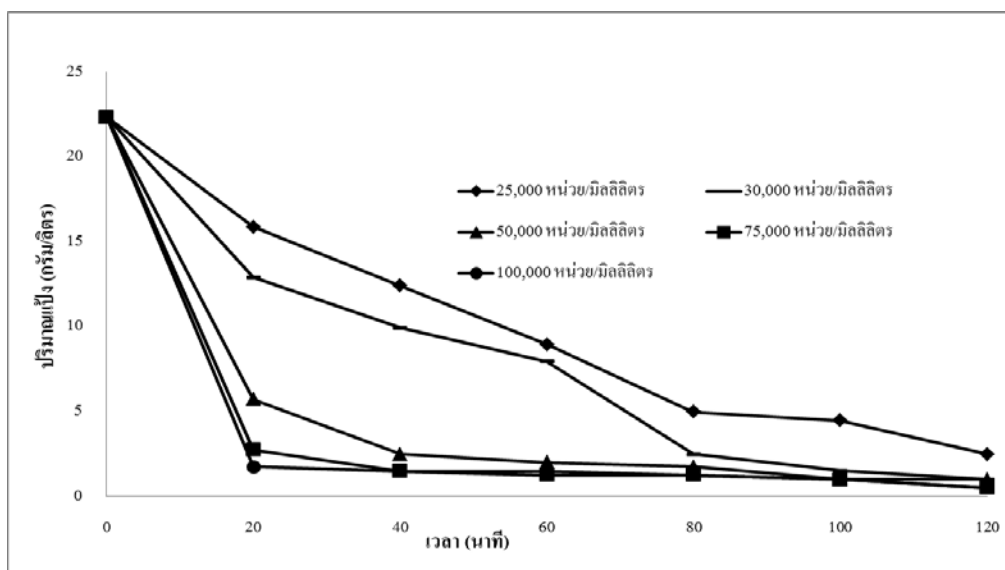
4.5.1 ผลการศึกษาการหาความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมในการย่อยมันเทศ

การศึกษาหาความเข้มข้นของแอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมในการย่อยมันเทศเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด โดยจะใช้ปริมาณมันเทศเริ่มต้นในการย่อย 6 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (6 เปอร์เซ็นต์ หรือ 60 กรัม/ลิตร (ชุดควบคุม)) ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดที่ทำให้สารละลายแป้งมันเทศยังสามารถกวนได้ (หากสูงกว่านี้สารละลายแป้งจะหนืดจนกวนไม่ได้ ทำให้การผสมไม่ทั่วถึง) โดยปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 6.5-7.0 บมที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตั้งแต่ 500 ถึง 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร จากนั้นติดตามการย่อยมันเทศโดยเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นและวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลือทุกๆ 20 นาทีจนครบ 120 นาที พบว่าในเบื้องต้นเมื่อแปรผันความเข้มข้นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่ 500 ถึง 20,000 หน่วย/มิลลิลิตร ยังไม่สามารถย่อยแป้งมันเทศที่มีความเข้มข้น 60 กรัม/ลิตร ได้หมดในเวลา 120 นาที และยังให้ปริมาณของกลูโคสดำ ดังนั้นจึงมีการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสให้มีความเข้มข้นมากขึ้นโดยแปรผันค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ 25,000, 30,000, 50,000, 75,000 และ 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร สามารถย่อยแป้งได้หมดที่นาทีที่ 20 และได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 26.4 กรัม/ลิตร ที่ระยะเวลาในการย่อย 120 นาที และพบว่าปริมาณแป้งจะลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 20 นาทีของการย่อยมันเทศ ดังแสดงในภาพที่ 4.6 ดังนั้นความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่สามารถย่อยมันเทศ 6 เปอร์เซ็นต์ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คือ 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร ซึ่งคาดว่าที่ความเข้มข้นของแอลฟาอะไมเลสที่ 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ ดังนั้นหากมีการเพิ่มปริมาณแป้งมันเทศเข้าสู่กระบวนการย่อยเพิ่มมากขึ้นอาจทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย จึงนำไปสู่การทดลองในขั้นตอนต่อไป จากการทดลองนี้ทำให้ทราบค่า

ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยมันเทศที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 60 กรัม/ลิตร เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดและสามารถย่อยแป้งได้หมดในเวลาอันสั้น อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่มีกิจกรรมการทำงานที่ 50,000, 75,000 และ 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร สามารถให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใกล้เคียงกันที่ 25.2, 25.2 และ 26.4 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 75,000 และ 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร สามารถย่อยแป้งได้หมดเมื่อสิ้นสุดการย่อยที่นาที่ที่ 20 แสดงดังภาพที่ 4.5 และ 4.6



ภาพที่ 4.5 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยมันเทศในระดับห้องปฏิบัติการทำการแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่ความเข้มข้นมันเทศเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ (60 กรัม/ลิตร) ย่อยในสภาวะที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 เป็นเวลา 120 นาที



ภาพที่ 4.6 แสดงปริมาณแป้งที่วัดได้จากการข่อยมันเทศในระดับห้องปฏิบัติการที่ทำการแปรผันความเข้มข้นของ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่ความเข้มข้นมันเทศเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ (60 กรัม/ลิตร) ข่อยในสถานะที่มีอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 เป็นเวลา 120 นาที

4.5.2 ผลการศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของมันเทศในการข่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

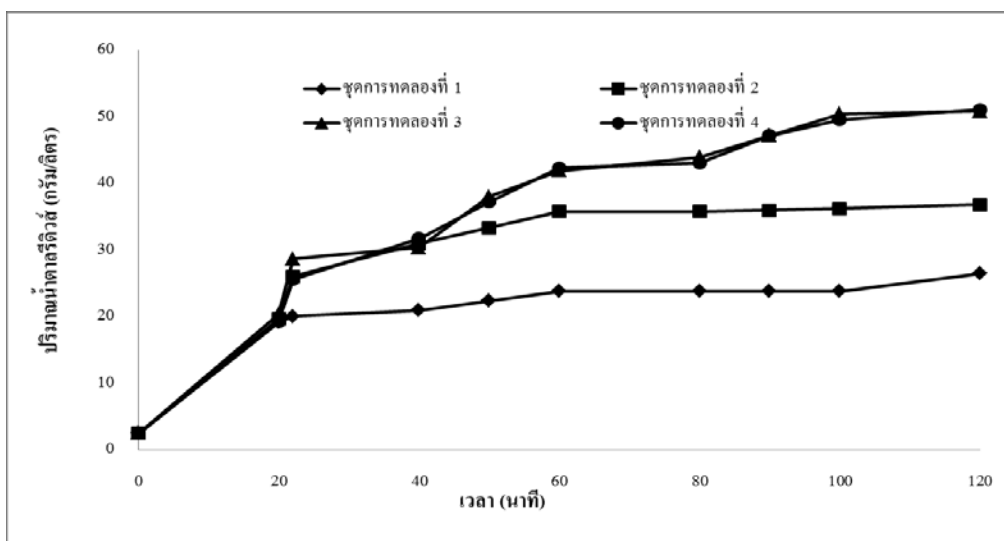
จากผลการทดลองการข่อยมันเทศที่กล่าวมาข้างต้นจากข้อ 4.6.1 พบว่ายังให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่น้อย อยู่และในสารละลายน่าจะยังมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ ดังนั้นจึงทดลองทำการเติมมันเทศในระหว่างการข่อยด้วย เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 100,000 หน่วย/มิลลิตร คล้ายกับการหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch) ที่มีการเติมสารอาหารลงไป เป็นช่วงๆ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ดังนี้

ตารางที่ 4.7 ชุดการทดลองเพื่อศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของมันเทศในการข่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส 100,000 หน่วย/มิลลิตร

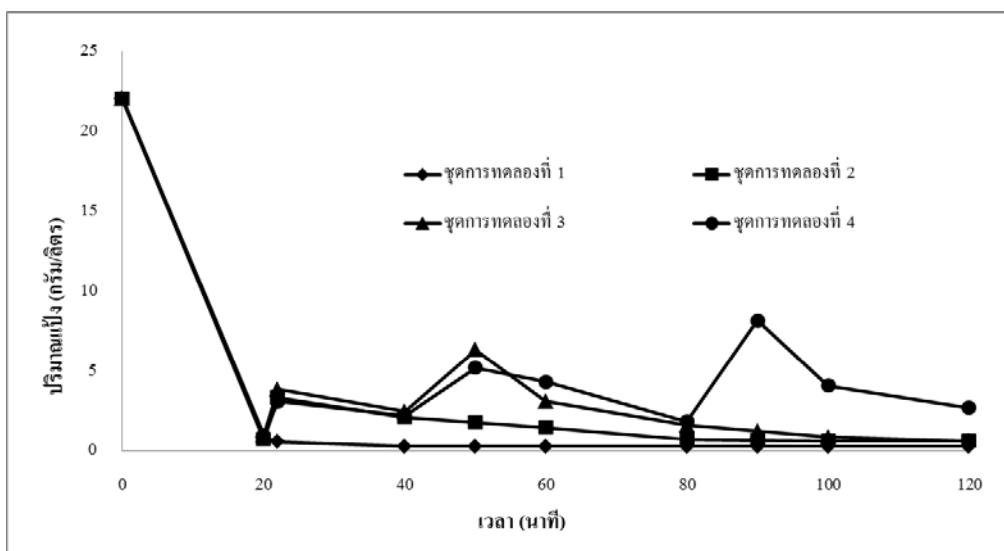
ชุดการทดลอง (ความเข้มข้นมันเทศ ทั้งหมดเป็น กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นมัน เทศเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นมันเทศ ที่เติม (กรัม/ลิตร) ที่ 20 นาที	ความเข้มข้นมันเทศที่ เติม (กรัม/ลิตร) ที่ 50 นาที	ความเข้มข้นมันเทศ ที่เติม (กรัม/ลิตร) ที่ 90 นาที
1 (60 , ควบคุม)	60	-	-	-
2 (90)	60	30	-	-
3 (120)	60	30	30	-
4 (150)	60	30	30	30

โดยปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นให้ได้ 6.5-7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร ติดตามการย่อยมันเทศโดยเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นและวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลือทุกๆ 20 นาทีจนครบ 120 นาที จากการทดลองข้างต้นพบว่า ชุดการทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 สามารถย่อยแป้งได้เพิ่มขึ้น โดยเมื่อมีปริมาณความเข้มข้นมันเทศเพิ่มมากขึ้นก็ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วยซึ่งให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 26.41, 36.78, 50.80 และ 51.02 กรัม/ลิตร ตามลำดับ จากภาพที่ 4.7 และ 4.8 จะเห็นว่าชุดการทดลองที่ 3 และ 4 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกันซึ่งไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ในชุดการทดลองที่ 4 ยังคงมีแป้งมันเทศเหลืออยู่ ดังนั้นจากการทดลองในขั้นตอนนี้จึงเลือกชุดการทดลองที่ 3 เป็นชุดการทดลองที่เหมาะสมในการแปรผันความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยได้ความเข้มข้นของมันเทศที่ 12 เปอร์เซ็นต์ หรือ 120 กรัม/ลิตร ที่ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้น 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร ในปริมาตรการย่อย 100 มิลลิลิตร สามารถย่อยมันเทศได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 50.80 กรัม/ลิตร สาเหตุที่เลือกชุดการทดลองที่ 3 เป็นสภาวะที่เหมาะสมเนื่องจาก แม้ชุดการทดลองที่ 4 จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าชุดการทดลองที่ 3 เล็กน้อย แต่ยังคงเหลือแป้งมันเทศที่ไม่สามารถย่อยหมดอาจเป็นเพราะมีปริมาณความเข้มข้นของแป้งมันเทศที่ใช้ในการย่อยสูงเกินไปจึงทำเอนไซม์ไม่สามารถย่อยแป้งได้หมดหรืออาจเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์มีน้อยลงหรือเอนไซม์มีการเสื่อมสภาพทำให้การเติมมันเทศเพิ่มที่นาที่ที่ 90 มีประสิทธิภาพการย่อยแป้งของเอนไซม์ลดลงได้ เมื่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่แตกต่างกันควรเลือกชุดการทดลองที่มีปริมาณความเข้มข้นของแป้งมันเทศที่น้อยกว่าเพื่อเป็นการลดปริมาณการใช้วัตถุดิบให้น้อยลงแต่ได้ประสิทธิภาพสูงสุด

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส คือ ความเข้มข้นของมันเทศ 12 เปอร์เซ็นต์ หรือ 120 กรัม/ลิตร (6 เปอร์เซ็นต์ + 6 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร เวลาในการย่อย 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ประมาณ 50.80 กรัม/ลิตร และจากการย่อยจะเห็นว่าปริมาณแป้งสามารถถูกย่อยโดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสหมดตั้งแต่นาที่ที่ 20 และเมื่อมีการเติมแป้งเข้าไประหว่างการย่อย เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสก็ยังสามารถย่อยแป้งที่เติมเข้าไปได้อีกจนหมดเมื่อสิ้นสุดกระบวนการย่อยที่นาที่ที่ 120 ดังภาพที่ 4.7



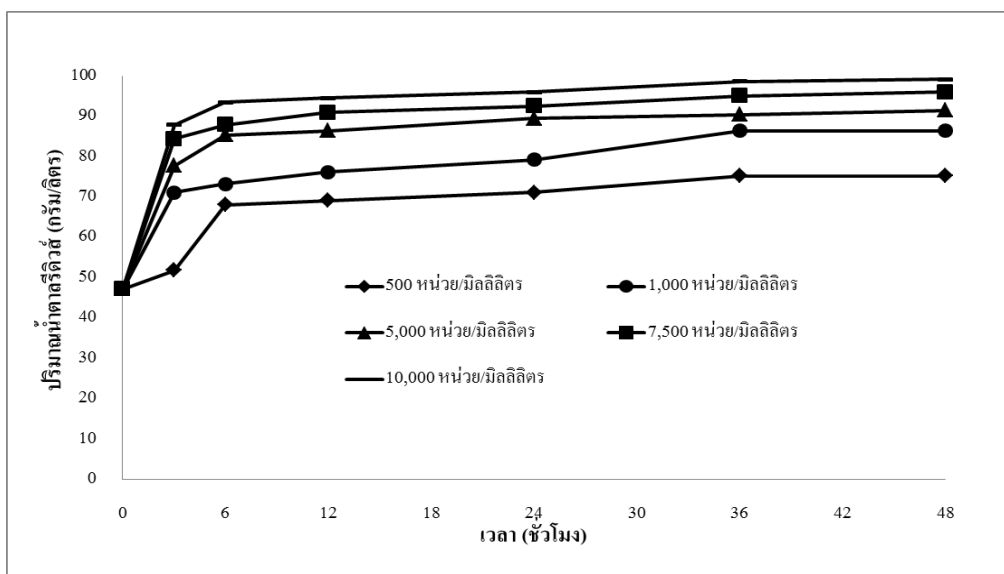
ภาพที่ 4.7 แสดงปริมาณน้ำตาเล็ดที่วัดได้จากการขอยมน้เทศในระดับห้องปฏิบัติการที่แปรผันความเข้มข้น
น้เทศที่ความเข้มข้นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร ข่อยในสภาวะที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 เป็นเวลา 120 นาที



ภาพที่ 4.8 แสดงปริมาณน้ำที่วัดได้จากการขอยมน้เทศในระดับห้องปฏิบัติการที่แปรผันความเข้มข้นน้เทศที่ความ
เข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร ข่อยในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส
ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 เป็นเวลา 120 นาที

4.5.3 ผลการศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการข่อยมันเทศด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจากการข่อยแป้งมันเทศด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากการทดลอง 5.2 คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นมันเทศทั้งหมด 12 เปอร์เซ็นต์ หรือ 120 กรัมต่อลิตร ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 120 นาที ซึ่งจะผ่านเข้าสู่ขั้นตอนการเกิดแซคคาริฟิเคชันด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยในการทดลองนี้ได้ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ทำให้แป้งมันเทศเกิดแซคคาริฟิเคชันได้อย่างสมบูรณ์ โดยแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ 500, 1,000, 5,000, 7,500 และ 10,000 หน่วย/มิลลิลิตร ที่ความเป็นกรด-ด่าง 4.3-4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 160 รอบ/นาที จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สภาวะที่ทดสอบในการข่อยมันเทศโดยการแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเวลาในการข่อย 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่แตกต่างกันปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นก็แตกต่างกันไปด้วย เมื่อมีความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส มากยิ่งขึ้นยิ่งทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มมากขึ้นด้วย โดยสามารถผลิตน้ำตาลได้ 72.18, 86.36, 91.44, 96.01 และ 99.1 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังนั้นความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่สามารถข่อยมันเทศให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คือ ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ 10,000 หน่วย/มิลลิลิตร โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 99.1 กรัม/ลิตร ซึ่งพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 3 และค่อยๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 6 และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก็เริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 จนถึงชั่วโมงที่ 48 จากการทดลองทำให้ทราบว่าในขั้นตอนของกระบวนการข่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสนั้น ไม่จำเป็นที่จะต้องข่อยจนถึงชั่วโมงที่ 48 เพราะชั่วโมงที่ 6 และชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่แตกต่างกันมากนัก เพื่อเป็นการลดการใช้และประหยัดพลังงานในการข่อยมันเทศในขั้นตอนการข่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และนำสภาวะที่ได้ไปศึกษาการข่อยมันเทศในระดับถึงปฏิบัติการชีวภาพ ขนาด 50 ลิตร ต่อไป



ภาพที่ 4.9 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่วัดได้จากการข่อยมันเทศในระดับห้องปฏิบัติการที่มีการแปรผันความเข้มข้น เอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่ความเข้มข้นมันเทศเริ่มต้น 12 เปอร์เซ็นต์ (120 กรัม/ลิตร) ข่อยในสภาวะที่มี อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.3-4.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากการทดลองการข่อยมันเทศจากเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการข่อยกากมันสำปะหลังของพัคตร์ประไพ ประจำเมือง (2546) ที่มีการข่อยที่ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิเดียวกัน พบว่า มีการข่อยกากมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 150 กรัม/ลิตร สามารถให้น้ำตาลรีดิวส์ได้สูงสุด 69.33 กรัม/ลิตร ที่ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 1,000 หน่วย ต่อปริมาณการข่อย 100 มิลลิกรัม ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5-7.0 บม ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสโดยใช้เวลาในการข่อย 120 นาที โดยในระหว่างการข่อยปริมาณแป้งลดลงอย่างรวดเร็ว ภายใน 20 นาทีแรก และเมื่อข่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ความเข้มข้น 6,000 หน่วย ความเป็นกรด-ด่าง 4.3-4.5 บม ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สามารถได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ 104.70 กรัม/ลิตร เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของกากมันสำปะหลังและมันเทศพบว่า กากมันสำปะหลังมีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรต ที่ 77.98 เปอร์เซ็นต์ โดยประมาณ ส่วนมันเทศมีประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่เอนไซม์นำมาใช้ในการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ ซึ่งมันเทศและกากมันสำปะหลังมีปริมาณแป้งที่แตกต่างกันมากอาจทำให้ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่ใช้ในการข่อย และปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากการข่อยมีปริมาณที่แตกต่างกันไปด้วย

จากสภาวะการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cattral et al. (1999) ที่ผลิตแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตกรดฟูมาริกด้วยการข่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์โดยใช้กากมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 150 กรัม/ลิตร ข่อยด้วยเอนไซม์ Thermamyl 1 มิลลิกรัมต่อกากมันสำปะหลัง 100 กรัม ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 และข่อยต่อด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 1 มิลลิกรัมต่อกากมันสำปะหลัง 100 กรัม ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.3 สามารถให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่วัดได้ 62 กรัม/ลิตร นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่มีการข่อยแป้งด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่คล้ายกันของ จิราวรรณ อภิรัชยากร (2540) ซึ่งมีการข่อยกากมันสำปะหลัง 5 กรัมของน้ำหนักรวมในน้ำกลั่น 50 มิลลิกรัมด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (BAN) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5

อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที แล้วย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคสไมเลส (SPEZYME) ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.3 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยจากการย่อยกากมันสำปะหลังพบว่า สามารถผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสได้ 54.45 กรัม/ลิตร

4.6 ผลการศึกษาการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์ในระดับถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ 50 ลิตร

จากการศึกษาการย่อยมันเทศในระดับห้องปฏิบัติการ สามารถทำให้ทราบถึงสภาวะที่ใช้ในการย่อยมันเทศ เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คือ ทราบความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นทั้งหมดที่ใช้ย่อยของมันเทศและความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสไมเลสที่เหมาะสมที่สุด โดยสภาวะที่ได้จากการย่อยมันเทศในระดับห้องปฏิบัติการ คือ ความเข้มข้นมันเทศทั้งหมด 120 กรัม/ลิตรในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร ย่อยที่ 90 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 เป็นเวลา 120 นาที รอบการกวน 160 รอบ/นาทีแล้วย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคสไมเลส 10,000 หน่วย/มิลลิลิตร อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 4.3-4.5 ที่เวลา 6 ชั่วโมงเริ่มกึ่งที่ ซึ่งเมื่อนำมาขยายการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 50 ลิตร ปริมาตรในการย่อย 30 ลิตร และมีอัตราการกวนความเร็วรอบที่ 160 รอบ/นาที จึงนำสภาวะดังกล่าวมาใช้ในการย่อยเพื่อขยายขนาดในการผลิตกลูโคสในระดับถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 50 ลิตร ได้ผลการทดลองดังนี้

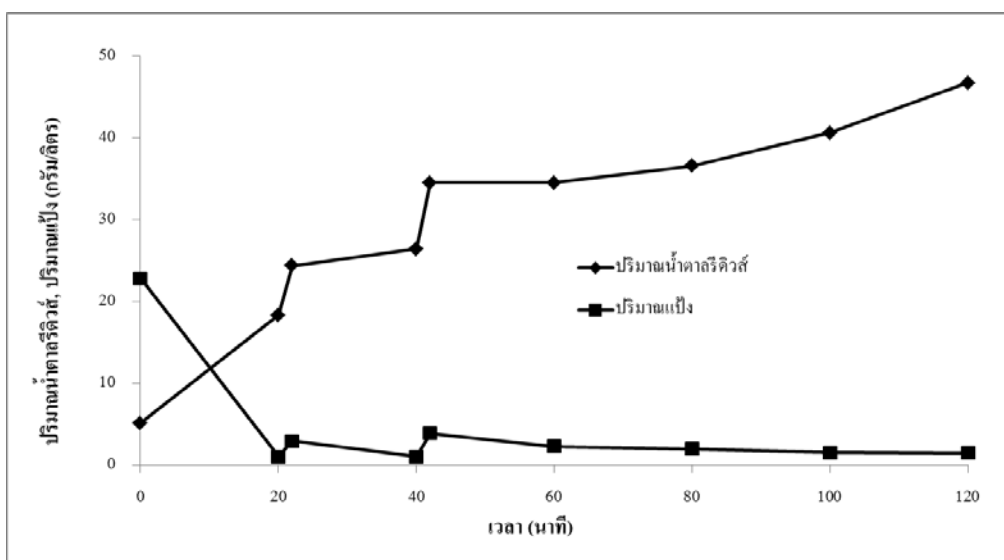
4.6.1 การย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 50 ลิตร

เมื่อย่อยมันเทศความเข้มข้นทั้งหมด 120 กรัม/ลิตร ในน้ำกลั่น 30 ลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มีอัตราการกวนความเร็วรอบที่ 160 รอบ/นาที ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้น 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร เวลาในการย่อย 120 นาที โดยที่ความเข้มข้นของมันเทศเริ่มต้น 60 กรัม/ลิตร และเติมเพิ่มเมื่อนาทีที่ 20 และ 40 ครั้งละ 30 กรัม/ลิตร ความเข้มข้นมันเทศรวมทั้งสิ้น 120 กรัม/ลิตร (12 เปอร์เซ็นต์) สามารถผลิตน้ำตาลได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 46.73 กรัม/ลิตร และสามารถย่อยปริมาณแป้งได้หมดเมื่อครบนาทีที่ 120 โดยปริมาณแป้งเริ่มลดลงและหมดตั้งแต่นาทีที่ 20 โดยเมื่อปริมาณแป้งลดลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก็ค่อยๆเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ดังภาพที่ 4.10

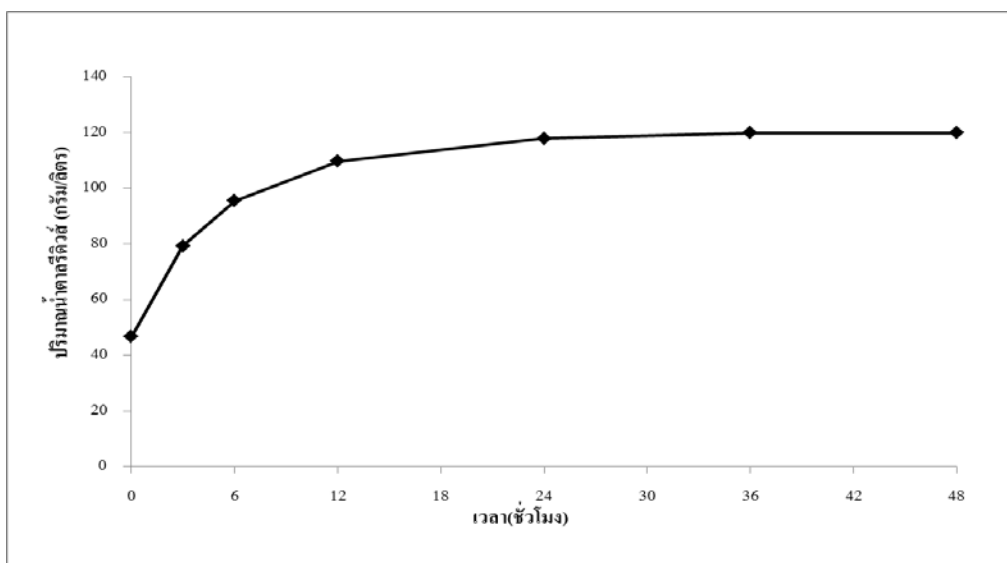
4.6.2 การย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์กลูโคสไมเลสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 50 ลิตร

การย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์กลูโคสไมเลสโดยย่อยต่อจากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้จากข้อ 6.1 ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสไมเลส 10,000 หน่วย/มิลลิลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 4.3-4.5 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีอัตราการกวนความเร็วรอบที่ 160 รอบ/นาที สามารถผลิตน้ำตาลได้ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 119.88 กรัม/ลิตร ที่เวลาในการย่อย 48 ชั่วโมง โดยในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคสไมเลส ในระดับถึงปฏิกรณ์ชีวภาพนี้ สามารถย่อยและให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่เริ่มกระบวนการย่อยจนถึงชั่วโมงที่ 12 และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 24 ซึ่งสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ประมาณ 117.85 กรัม/ลิตร และเริ่มกึ่งที่จนสิ้นสุดกระบวนการที่ชั่วโมงที่ 48 ดังนั้นการย่อยมันเทศเพื่อให้ได้กลูโคสในขั้นตอนนี้ไม่จำเป็นต้องย่อยจนถึง 48 ชั่วโมงก็ได้ เพราะปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มกึ่งที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 48 เพื่อเป็นการประหยัดพลังงานที่ใช้ในการย่อยมันเทศ ดังแสดงในภาพที่ 4.11

จากงานวิจัยของพัศตร์ประไพ ประจำเมือง, (2546) มีการศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 50 ลิตร พบว่าเมื่อมีการย่อยกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100 กรัม/ลิตร ในน้ำกลั่น 35 ลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่มีการแปรผันปริมาณเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มีการกวนด้วยใบกวนแบบ anchor ที่มีความเร็วรอบ 70 รอบ/นาที พบว่าความเข้มข้นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ 200 หน่วยต่อปริมาตรการย่อย 100 มิลลิลิตร ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด ที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัม/ลิตร และยังพบว่าปริมาณแป้งลดลงอย่างรวดเร็วในนาทีที่ 20 หลังจากการเติมเอนไซม์ และย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยมีการแปรผันปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากการทดลองพบว่าที่ เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ 50 หน่วยย่อยนาน 42 ชั่วโมง ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 83.09 กรัม/ลิตร ซึ่งต่ำกว่าเมื่อใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสเข้มข้นที่ 150 300 และ 500 หน่วย โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใกล้เคียงกันโดยวัดได้ 98.81, 97.76 และ 98.95 กรัม/ลิตร ซึ่งโดยปกติแล้วงานวิจัยทั่วไปจะมีสภาวะในการย่อยแป้งแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้สูงสุด เช่น ชนิดของเอนไซม์ สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์นั้น และชนิดของแป้งที่ใช้ในการย่อย โดยแป้งแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน ทำให้สภาวะในการย่อยเพื่อให้ได้กลูโคสใช้รับประทานก็แตกต่างกันไปด้วย



ภาพที่ 4.10 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณแป้งที่วัดได้จากการย่อยมันเทศในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ความเข้มข้นมันเทศเริ่มต้น 60 กรัม/ลิตร และเติมมันเทศนาที่ที่ 20 และ 40 ครั้งละ 30 กรัม/ลิตร ที่ความเข้มข้นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร ย่อยในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 เป็นเวลา 120 นาที ที่รอบการกวน 160 รอบ/นาที



ภาพที่ 4.11 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดส์ที่วัดได้จากการย่อยมันเทศในระดับถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ 50 ลิตร ด้วยเอนไซม์ กลูโคสไมเลส 10,000 หน่วย/มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นมันเทศเริ่มต้น 12 เปอร์เซ็นต์ (120 กรัม/ลิตร) ย่อยในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.3-4.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่รอบการกวน 160 รอบ/นาที

4.7 ปริมาณและชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศ

ในการศึกษาปริมาณและชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งสามารถบอกชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่ต้องการศึกษา โดยชนิดของน้ำตาลที่สนใจในการวิเคราะห์ประกอบด้วยน้ำตาลหลัก 4 ชนิดด้วยกัน คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุคโตส และน้ำตาลมอลโตส

4.7.1 ปริมาณและชนิดของน้ำตาลจากน้ำแช่มันเทศ

การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลในน้ำแช่มันเทศเริ่มต้นก่อนการย่อย (ต้มมันเทศ 6 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรเป็นเวลา 30 นาที) ซึ่งแช่มันเทศในน้ำกลั่นแล้วนำวิเคราะห์ผล ได้ผลวิเคราะห์ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ปริมาณและชนิดของน้ำตาลจากน้ำแช่มันเทศ

ชนิดของน้ำตาล	เปอร์เซ็นต์น้ำตาลทั้งหมด
กลูโคส	4.74
ซูโครส	9.33
ฟรุคโตส	3.26
มอลโตส	11.54

4.7.2 ปริมาณและชนิดของน้ำตาลจากที่ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลในมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร ความเข้มข้นมันเทศ 120 กรัม/ลิตร เมื่อสิ้นสุดกระบวนการย่อยที่นาที่ที่ 120 ได้ผลวิเคราะห์ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ปริมาณและชนิดของน้ำตาลจากที่ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ชนิดของน้ำตาล	เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมด
กลูโคส	6.30
ซูโคส	9.12
ฟรุคโตส	5.20
มอลโตส	13.32

4.7.3 ปริมาณและชนิดของน้ำตาลจากที่ย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลในมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ความเข้มข้น 10,000 หน่วย/มิลลิลิตร ความเข้มข้นมันเทศ 120 กรัม/ลิตร ที่ย่อยต่อจากกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เมื่อสิ้นสุดกระบวนการย่อยที่ 48 ชั่วโมง ได้ผลวิเคราะห์ดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ปริมาณและชนิดของน้ำตาลจากที่ย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ชนิดของน้ำตาล	เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมด
กลูโคส	89.84
ซูโคส	5.48
ฟรุคโตส	4.78
มอลโตส	4.48

4.8 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันที่ทนร้อนโดยใช้น้ำตาลจากการย่อยมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการออกแบบการทดลองทางสถิติ (Statistical method)

การออกแบบการทดลองทางสถิติมีความประสงค์ต้องการศึกษาหาความจริงในการทดลองเพื่อค้นคว้าหรือทดสอบสมมุติฐานบางอย่างที่ต้องการศึกษา การทดลองแต่ละครั้งควรมีการวางแผนล่วงหน้าก่อน เมื่อทดลองแล้ว ผลที่ได้ก็นำมาวิเคราะห์และได้คำตอบตามความมุ่งหมายที่ต้องการศึกษา การออกแบบการทดลองจึงหมายถึง การกำหนดการทดลองเพื่อให้ได้ผลที่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้โดยกระบวนการทางสถิติ ซึ่งสรุปได้ว่าการออกแบบการทดลองมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อดำเนินการทดลองให้ถูกต้องตามหลักวิชาการ เพื่อควบคุมปัจจัยบางอย่างที่ไม่ต้องการ เพื่อให้ได้การทดลองที่น่าเชื่อถือได้ และเพื่อมิให้การทดลองนั้นล้มเหลว เพื่อสามารถสรุปผลการวิจัยได้อย่างถูกต้อง และเพื่อใช้วิธีการทางสถิติวิเคราะห์ได้ถูกต้องตามความต้องการของการวิจัยนั้นๆ

การออกแบบการทดลองในงานวิจัยนี้เพื่อต้องการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ *Scj 01* ที่มีน้ำเชื่อมมันเทศที่ย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ซึ่งมีการออกแบบโดยการหาพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Design) เพื่อประเมินหาความเหมาะสมในสภาวะของการทดลอง โดยการวิเคราะห์ได้ถูกนำมาใช้เพื่อค้นหาคำตอบของการทดลองที่ประกอบด้วยปัจจัยร่วมการทดลองหลายปัจจัย ซึ่งจะสามารถนำไปสู่การค้นพบการตอบสนองที่เหมาะสมในที่สุด โดยการตอบสนองที่เหมาะสมสามารถพิจารณาได้ใน 2 ลักษณะคือการตอบสนองที่มากที่สุด (maximum) และการตอบสนองที่น้อยที่สุด (minimum) ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของการทดลอง ซึ่งมีการออกแบบการทดลองทางสถิติ (Statistical method) ดังนี้

4.8.1 การคัดเลือกปัจจัยสำหรับการผลิตไขมันของเชื้อยีสต์สะสมไขมัน *Scj 01* โดยวิธี

Plackett burman

การออกแบบการทดลองเพื่อกลั่นกรองตัวแปรหรือปัจจัยเพื่อนำมาใช้ได้อย่างเหมาะสมในการทดลอง (Factor Identification and Screening) ซึ่งมีให้เลือกหลายวิธีตามความเหมาะสมของการทดลองนั้นๆ การออกแบบ Plackett burman เป็นการออกแบบเพื่อกลั่นกรองและคัดเลือกเอาปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อระบบก่อน ซึ่งจะถูกนำมาใช้ใน ช่วงต้นๆของการศึกษา ซึ่งในงานวิจัยนี้เป็นการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมไขมันหรือผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมัน ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถกลั่นกรองปัจจัยจำนวนมากๆได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้ทราบปัจจัยที่สำคัญจริงๆ ที่มีผลต่อระบบที่กำลังทดลอง โดยในการทดลองนี้ได้คัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองทั้งหมด 5 ปัจจัยและกำหนดระดับของค่าปัจจัยสำหรับการวัดผลกระทบของแต่ละปัจจัยโดยกำหนดระดับของปัจจัย 2 ค่าด้วยกัน คือ ค่าต่ำ (-1) ค่าสูง (+1) ของแต่ละปัจจัยดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 แสดงระดับและปัจจัยที่ใช้คัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท

Sj01 โดยวิธี Plackett burman

รหัส	ปัจจัย	ค่าต่ำ (-1)	ค่าสูง (+1)
A	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	2.5	10
B	ความเป็นกรด-ด่าง	5	7
C	ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบ/นาที)	100	200
D	ความเข้มข้นน้ำตาล* (กรัม/ลิตร)	60	100
E	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	30	40

*น้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์

การระบุปัจจัยเพื่อคัดกรองปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์ไอโซเลท Scj 01 เพื่อสามารถผลิตไขมันได้สูงสุด โดยทำการระบุปัจจัยด้วยกันทั้งหมด 5 ปัจจัย โดยระดับของแต่ละปัจจัยจะมีการกำหนดโดยการตั้งสมมติฐานของการทดลองโดยรวบรวมข้อมูลจากรายงานวิจัยอื่นๆมาพิจารณาร่วมกัน เพื่อกำหนดค่าของปัจจัยให้ได้ค่าที่ใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสม จากการรวบรวมข้อมูลและพิจารณาปัจจัยทางเคมีและทางกายภาพ พบว่าปัจจัยหลักที่ทำให้ยีสต์เจริญได้ดีและสะสมไขมันได้มากอาจขึ้นอยู่กับปัจจัย ดังนี้ ค่าความเป็นกรด-ด่าง จะมีอิทธิพลต่อทั้งปริมาณและชนิดของกรดไขมัน ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ใช้ในการหมักจะอยู่ในช่วงที่ 5.4-8.5 ที่การศึกษาพบว่าถ้าค่าความเป็นกรด-ด่าง มากกว่า 9.0 จะให้การผลิตไม่ดี โดยค่าความเป็นกรด-ด่าง ช่วงเหมาะสมมักขึ้นกับชนิดของยีสต์ (Moon et al., 1978) อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตไขมันจะมีผลกระทบต่อจำนวนคาร์บอนอะตอมและปริมาณความไม่อิ่มตัวของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งงานวิจัยนี้ต้องการศึกษายีสต์สะสมไขมันที่ทนต่ออุณหภูมิสูงจึงต้องมีการถ่วงน้ำหนักว่ายีสต์ Scj 01 สามารถเจริญและผลิตไขมันได้ดีที่อุณหภูมิต่ำหรือสูง นอกจากนี้ความเร็วรอบในการเขย่า ปริมาณออกซิเจนก็มีผลกระทบต่อการเจริญและการเพิ่มจำนวนเซลล์ เมื่อมีการเพิ่มการให้อากาศพบว่า ยีสต์มีการเจริญและปริมาณไขมันเพิ่มขึ้น โดย Naganuma et al. (1985) รายงานว่า ยีสต์ *Lipomyces starkeyi* เป็นยีสต์ที่ต้องการปริมาณออกซิเจนสูง (High aerobic yeast) เนื่องจากระดับออกซิเจนต่ำจะทำให้ปริมาณเซลล์และปริมาณไขมันลดลง ปริมาณเชื้อเริ่มต้นอาจทำให้เชื้อเจริญได้เร็วและดีตามไปด้วยพร้อมทั้งปริมาณไขมันเพิ่มมากขึ้นในระยะเวลาที่กำหนดไว้ สำหรับปัจจัยด้านปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน จากรายงานรัตนกรณีย์ ลีสิงห์ (2551) พบว่าในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัดและมีแหล่งคาร์บอนสูงๆจะสามารถทำให้ยีสต์สะสมและผลิตไขมันได้มาก เมื่ออัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนสูงและไนโตรเจนต่ำหรืออัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงมักจะเป็นการเพิ่มปริมาณเซลล์ในช่วงแรกของการเจริญแต่ในช่วงหลังเป็นการเปลี่ยนคาร์บอนให้ไปเป็นไขมัน ปริมาณเซลล์และไขมันที่ได้จากยีสต์ไขมันสูงจึงขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (อัจฉราวรรณ ทองมี, 2530) ซึ่งปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้นนี้พร้อมกับการอ้างอิงจากงานวิจัยที่ศึกษาใกล้เคียงกัน จึงพอสรุปได้ว่าปัจจัยที่กล่าวมานี้จะมีความสำคัญและมีผลต่อการเจริญและการสะสมไขมันของยีสต์สะสมไขมันโดยตรง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจนำปัจจัยเหล่านี้มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตและสะสมไขมันของยีสต์ไอโซเลท Scj 01 เพื่อให้ได้ปริมาณไขมันสูงสุด โดยใช้

วิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติโดยปัจจัยทั้ง 5 ที่นำมาออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett burman จะประกอบไปด้วยระดับของแต่ละปัจจัย 2 ระดับ คือ ค่าต่ำ (-1) และค่าสูง (+1) ซึ่งสามารถออกแบบการทดลองได้ดังตารางที่ 4.12 เมื่อออกแบบการทดลองเรียบร้อยแล้วจะสามารถได้การทดลองทั้งหมด 12 การทดลอง (Run) ตามการออกแบบการทดลองของ Expert design version 7 ซึ่งแต่ละการทดลองจะมีระดับของแต่ละปัจจัยที่แตกต่างกัน โดยแต่ละการทดลองจะเลี้ยงในอาหารสูตร Production medium ที่มีการแปรผันปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ระยะเวลาในการบ่ม 6 วัน ซึ่งได้ผลของปริมาณไขมัน (Lipid content) ของแต่ละการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 การออกแบบการทดลองทางสถิติด้วย Expert design โดยวิธี Plackett burman สำหรับการคัดเลือกปัจจัยได้มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Scj01

Run#	Experimental values					Lipid content (g/l)	
	A	B	C	D	E	Observed ^a	Predicted
1	+1	+1	-1	+1	+1	0.69	0.73
2	-1	+1	+1	-1	+1	1.17	1.29
3	+1	-1	+1	+1	-1	1.20	1.38
4	-1	+1	-1	+1	+1	0.82	0.87
5	-1	-1	+1	-1	+1	1.48	1.47
6	-1	-1	-1	+1	-1	0.88	1.02
7	+1	-1	-1	-1	+1	0.80	0.84
8	+1	+1	-1	-1	-1	0.80	0.65
9	+1	+1	+1	-1	-1	1.01	1.14
10	-1	+1	+1	+1	-1	1.51	1.34
11	+1	-1	+1	+1	+1	1.64	1.40
12	-1	-1	-1	-1	-1	1.08	0.96

ตารางที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์ตัวแปรทางสถิติ (ANOVA) เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์
 สะสมไขมันไอโซเลท Scj 01 โดยวิธี Plackett burman

Code	Variable	Low level(-1)	High level(+1)	Coefficient	F-value	p-value Prob>F
A	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	2.5	10	-0.067	1.48	0.2691
B	ความเป็นกรด-ด่าง	5	7	-0.090	2.70	0.1513
C	ความเร็วรอบในการ เขย่า (รอบ/นาที)	100	200	0.24	20.02	0.0042
D	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัม/ลิตร)	60	100	0.033	0.37	0.5650
E	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	30	40	1.000E-002	0.033	0.8611

*น้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์

จากตารางที่ 4.13 แสดงผลการวิเคราะห์ตัวแปรทางสถิติ (ANOVA) เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Scj 01 โดยวิธี Plackett burman เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมและมีผลที่ดีที่สุดในการผลิตและสะสมไขมันของยีสต์สะสมไขมัน ซึ่งผลที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ ปริมาณไขมัน (กรัม/ลิตร) การพิจารณาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตไขมันแล้วให้ปริมาณไขมันนั้น จะพิจารณาจากค่า p -value ซึ่งควรมีค่าน้อยกว่า 0.05 จึงจะถือว่าให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการออกแบบการทดลองต้นแบบ (Model) ให้ค่า p -value เท่ากับ 0.0390 ซึ่งสรุปได้ว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาในการออกแบบการทดลองต้นแบบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสามารถนำไปใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันได้สูงสุดของยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Scj 01 ได้ ในการออกแบบการทดลองขั้นตอนต่อไป โดยสามารถสรุปแนวโน้มของปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองได้จากค่าการออกแบบการทดลองของแต่ละปัจจัยที่เป็น ค่าต่ำ (-1) และ ค่าสูง (+1) สรุปได้ดังนี้ ปัจจัย C ความเร็วรอบในการเขย่า (Agitation) มีค่า p -value ที่ได้จากการออกแบบการทดลองเท่ากับ 0.0042 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 นั้นแสดงว่าปัจจัยความเร็วรอบในการเขย่ามีผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต่อปริมาณไขมัน (Lipid content) ส่วนปัจจัยอื่น ได้แก่ ปัจจัย A ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์), ปัจจัย B ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น, ปัจจัย E อุณหภูมิ และ ปัจจัย D ความเข้มข้นน้ำตาลลิควิดส์ ให้ค่า p -value มากกว่า 0.05 ดังตารางที่ 4.13 แสดงให้เห็นว่าระดับของปัจจัยทั้ง 4 มีผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการทดลองนี้ หมายความว่าระดับปัจจัยที่กำหนดทั้งค่าต่ำ (-1) และค่าสูง (+1) ของแต่ละปัจจัยสามารถให้ผลิตภัณฑ์ (product) หรือปริมาณไขมันที่ได้ไม่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามในขณะที่ปัจจัย A ค่าปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์) และ ปัจจัย B ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ยังให้ค่า p -value ต่ำอยู่ ดังนั้นทั้งสองปัจจัยจึงควรนำไปศึกษาต่อได้ในการออกแบบการทดลองในขั้นตอนต่อไปในการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตไขมันจากยีสต์ไอโซเลท Scj 01 และจากการ

วิเคราะห์ทางสถิติด้วยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett burman ยังสามารถบอกถึงแนวโน้มค่าระดับของแต่ละปัจจัยที่ควรนำไปใช้ในการทดลองต่อไปว่าควรนำค่าต่ำ (-1) หรือค่าสูง (+1) ไปแปรผันในการทดลองขั้นตอนต่อไปเพื่อออกแบบการทดลองให้ได้ผลิตภัณฑ์สูงสุด โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) ที่บ่งบอกว่าควรนำค่าต่ำ (-1) หรือค่าสูง (+1) ไปใช้ในการแปรผันระดับของปัจจัยเพื่อให้ได้ค่าที่ใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสมในการผลิตไขมันจากตารางที่ 4.13 พบว่า

1. ปัจจัย A ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์) มีค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) เท่ากับ -0.0067 นั้นแสดงว่ามีค่าติดลบค่าที่เหมาะสมในการแปรผัน คือ ระดับค่าต่ำ (-1) ที่ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการใช้ปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้นก็ไม่ทำให้การสะสมไขมันเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

2. ปัจจัย B ค่าความเป็นกรด-ด่าง มีค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) เท่ากับ -0.090 ค่าที่เหมาะสม คือระดับค่าต่ำ ที่ค่า pH 5 ซึ่งความเหมาะสมของความเป็นกรด-ด่างจะมีความเหมาะสมขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

3. ปัจจัย C ความเร็วรอบในการเขย่ามีค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) เท่ากับ 0.24 ค่าที่เหมาะสมคือระดับค่าสูง ที่ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบ/นาที ซึ่งปริมาณออกซิเจนควรเพียงพอเพื่อให้เซลล์เจริญได้ และสามารถผลิตไขมัน

4. ปัจจัย D ค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยมันเทศมีค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) เท่ากับ 0.37 ค่าที่เหมาะสม คือ ค่าระดับสูง ที่มีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัม/ลิตร ในอาหารที่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจน จะทำให้ได้ปริมาณไขมันสูงกว่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีค่าต่ำ ตามรายงานวิจัยส่วนใหญ่ การที่ยีสต์จะสามารถสะสมและผลิตไขมันได้สูงก็ต่อเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำโดยไนโตรเจนมักจะจำเป็นเพื่อใช้เพิ่มปริมาณเซลล์ในช่วงแรกของการเจริญ แต่ในช่วงหลังเป็นการเปลี่ยนคาร์บอนเป็นไขมันต้องใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง

5. ปัจจัย E อุณหภูมิมีค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) เท่ากับ 1.000E-002 ค่าที่เหมาะสม คือ ระดับค่าสูง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติทนร้อนตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย แนวโน้มที่ได้จากการทดลองสามารถทราบว่าถ้ายีสต์เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิสูงจะสามารถให้ค่าปริมาณไขมันสูงกว่าเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ จากรายงาน อัจฉรวรรณ ทองมี (2530) พบว่า โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตอาจจะมีผลกระทบต่อจำนวนคาร์บอนและปริมาณความไม่อิ่มตัวของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในไตรกลีเซอไรด์

แต่อย่างไรก็ตามการทดลองในขั้นตอนนี้เป็นเพียงการกลั่นกรองปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองเท่านั้น โดยค่าเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นการพิจารณาเพื่อใช้ในการทดลองหาค่าที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันเพื่อให้ได้ปริมาณไขมันสูงสุดในการทดลองต่อไป

4.8.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ Scj 01 ด้วยการออกแบบทางสถิติด้วยวิธี

Box-Behnken design

การออกแบบ Box-Behnken design เป็นการออกแบบ Incomplete block designs ที่เกิดจากการรวม Factorial designs ที่มีระดับ 2 ระดับ กับ Incomplete block designs ผลลัพธ์ของการออกแบบเป็นลำดับที่ 2 ที่มีการหมุนเพื่อใช้ในการประมาณสัมประสิทธิ์ของพื้นที่การตอบสนองที่เป็นเส้นโค้ง (Response Surface Design) เพื่อประเมินหาความเหมาะสมในสภาวะของการทดลอง ซึ่งการออกแบบ Box-Behnken ต้องการ 3 ระดับของแต่ละปัจจัยที่ต้องการศึกษา โดยระดับเหล่านี้จะถูกใช้สัญลักษณ์เป็นระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (+1) ซึ่งค่าเหล่านี้จะถูกกำหนดและพิจารณาโดยใช้โดยอ้างอิงมาจากการออกแบบการคัดเลือกและกลั่นกรองปัจจัย จากการออกแบบ Plackett burman

การออกแบบและการทดลองด้วย Box-Behnken ในงานวิจัยนี้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ทนร้อน ไอโซเลต Scj 01 ที่คัดแยกได้จากน้ำอ้อยเน่าเสีย ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการออกแบบด้วยวิธีนี้จะมีการกำหนดระดับปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองทั้งหมด 3 ปัจจัย ซึ่งปัจจัยที่คัดเลือกได้จากการทดลองข้างต้นด้วยวิธี Plackett burman ประกอบด้วย ปริมาณเชื้อเริ่มต้น, ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และค่าความเร็วรอบในการเขย่า ปัจจัยที่นำมาใช้โดยพิจารณาจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการออกแบบการทดลองด้วย Plackett burman ที่พิจารณาจากค่า p -value ซึ่งแต่ละปัจจัยแบ่งออกเป็น 3 ระดับดังตารางที่ 4.14 โดยการแปรผันค่าของแต่ละปัจจัยจะมีการพิจารณาจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการออกแบบการทดลองด้วย Plackett burman โดยสามารถพิจารณาค่าแนวโน้มการแปรผันจากค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) ซึ่งค่าที่แปรผันจะครอบคลุมค่าแนวโน้มที่ควรเป็นไปได้จากการพิจารณาข้างต้น

ตารางที่ 4.14 ปัจจัยและระดับปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ไอโซเลต Scj 01

รหัส	ปัจจัย	ค่าต่ำ (-1)	ค่ากลาง (+1)	ค่าสูง (+1)
A	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	3	4	5
B	ความเร็วรอบในการเขย่า (กรัม/ลิตร)	150	200	250
C	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	1.5	3	4.5

หมายเหตุ: เลี้ยงเชื้อในอาหาร Production medium ที่ประกอบด้วยน้ำตาลจากมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์ 100 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 6 วัน

จากตารางที่ 4.14 อธิบายได้ว่า ปัจจัย A ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปัจจัย B ความเร็วรอบในการเขย่าและ ปัจจัย C ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ที่นำมาใช้ในการออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken ได้จากการพิจารณาการออกแบบการทดลองในขั้นตอน Plackett burman ที่พิจารณาจากค่า p -value ที่มีค่าต่ำกว่า 0.05 และค่าที่ใกล้เคียงดังที่ได้กล่าวมาแล้ว โดยทั้งสามปัจจัยมีค่าที่ต่ำและใกล้เคียงกับค่า 0.05 เพื่อความแม่นยำของการค้นหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันจึงควร

นำมาแปรผันค่าเพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ยีสต์สามารถสะสมไขมันได้ปริมาณไขมันสูงสุด การแปรผันปัจจัยทั้งสามสามารถแปรผันค่าได้โดยพิจารณาค่าจากแนวโน้มของค่าที่ได้จากค่า Coefficient ที่ได้จากการออกแบบการทดลอง ในขั้นตอนของการกลั่นกรองปัจจัย ส่วนอีกสองปัจจัยที่ไม่มีผลต่อการทดลองในขั้นตอนดังกล่าว คือ ความเข้มข้นของน้ำเชื่อมมันเทศและอุณหภูมิ ในขั้นตอนนี้ได้กำหนดค่าโดยพิจารณาจากค่า Coefficient ที่ได้จากขั้นตอนที่ผ่านมา โดยค่าที่ได้ที่เหมาะสมที่ทำให้ยีสต์ไอโซเลท Scj 01 สามารถสะสมไขมันสูงสุด คือ ที่ปริมาณความเข้มข้นน้ำเชื่อมมันเทศ 100 กรัม/ลิตร และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken และนำเข้าสู่โปรแกรม Expert design version 7 สามารถออกแบบการทดลองได้โดยมีจำนวนการทดลองทั้งหมด 17 การทดลอง (Run) ดังตารางที่ 4.15 ซึ่งแต่ละการทดลองจะนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาจุดที่เหมาะสม (Optimization) ของการผลิตไขมันจากยีสต์ทนร้อน ไอโซเลท Scj 01 โดยการวิเคราะห์ผลจะวิเคราะห์ผลโดยใช้ปริมาณไขมัน (กรัม/ลิตร) ที่ยีสต์ผลิตได้

ตารางที่ 4.15 การออกแบบการทดลองทางสถิติด้วย Box-Behnken ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ไอโซเลท Scj 01

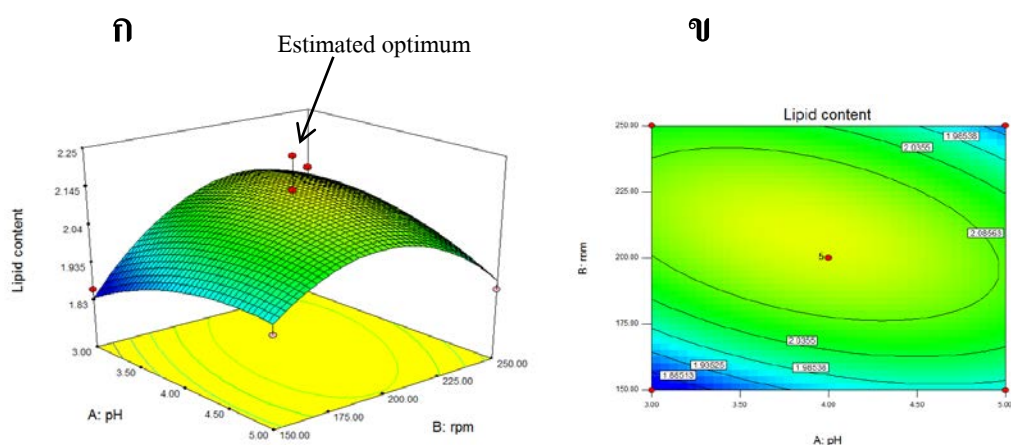
Run#	Variable/levels						Lipid content (g/l)	
	Initial pH		Agitation (rpm)		Inoculum		Observed ^a	Predicted
	Actual	Code	Actual	Code	Actual (%)	Code		
1	3	-1	150	-1	3	0	1.86	1.83
2	5	+1	150	-1	3	0	1.94	1.97
3	3	-1	250	+1	3	0	2.08	2.05
4	5	+1	250	+1	3	0	1.89	1.91
5	3	-1	200	0	1.5	-1	2.05	2.08
6	5	+1	200	0	1.5	-1	2.12	2.10
7	3	-1	200	0	4.5	+1	1.99	2.01
8	5	+1	200	0	4.5	+1	2.02	1.99
9	4	0	150	-1	1.5	-1	1.89	1.89
10	4	0	250	+1	1.5	-1	2.11	2.11
11	4	0	150	-1	4.5	+1	1.94	1.94
12	4	0	250	+1	4.5	+1	1.88	1.88
13	4	0	200	0	3	0	2.24	2.13
14	4	0	200	0	3	0	2.15	2.13
15	4	0	200	0	3	0	2.10	2.13
16	4	0	200	0	3	0	2.05	2.13
17	4	0	200	0	3	0	2.12	2.13

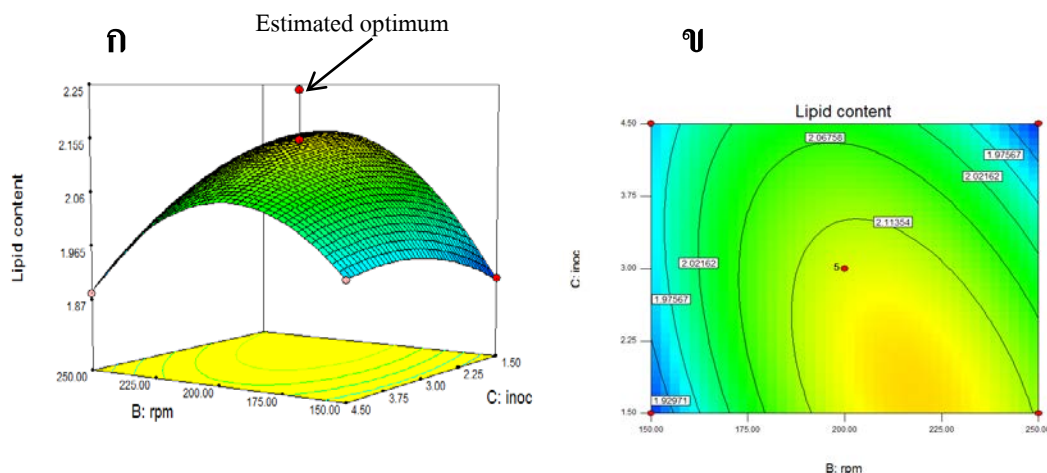
ตารางที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (ANOVA) ของการออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์*ไอโซเลท Scj 01*

Source of variation	Sum of squares	df	Mean Squares	Coefficient	Std error	F-value	p-value Prob>F
Model	0.17	9	0.019	2.13	0.027	5.25	0.0199
A	1.250E-005	1	1.250E-005	-1.250E-003	0.021	3.437E-003	0.9549
B	0.014	1	0.014	0.041	0.021	3.74	0.0943
C	0.014	1	0.014	-0.043	0.021	3.97	0.0865
AB	0.018	1	0.018	-0.068	0.030	5.01	0.0602
AC	4.000E-004	1	4.000E-004	-0.010	0.030	0.11	0.7499
BC	0.020	1	0.020	-0.070	0.030	5.39	0.0533
A2	0.010	1	0.010	-0.050	0.029	2.87	0.1343
B2	0.082	1	0.082	-0.14	0.029	22.61	0.0021
C2	5.842E-003	1	5.842E-003	-0.037	0.029	1.61	0.2455
Residual	0.025	7	3.636E-003				
Lack of Fit	5.575E-003	3	1.858E-003			0.37	0.7774
Pure error	0.020	4	4.970E-003				
total	0.20	16					

จากผลการวิเคราะห์การทดลองทางสถิติด้วย Box-Behnken โดยการทดลองต้นแบบ (Model) การทดลองให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Significant) ที่ค่า p -value เท่ากับ 0.0199 ซึ่งแบบการทดลองจะให้ผลทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญได้ก็ต่อเมื่อมีค่า p -value น้อยกว่า 0.05 เท่านั้น การออกแบบการทดลองนั้นจึงจะสามารถนำมาใช้และสรุปผลการทดลองได้ว่าสามารถนำมาใช้ได้จริง ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าว (จากตารางที่ 4.16) จึงสามารถนำมาใช้และสามารถค้นหาคำตอบของค่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัยในการทดลองนี้ได้ จากตารางที่ 4.15 พบว่าการทดลองที่ 13 สามารถให้ปริมาณไขมันสูงที่สุดที่ 2.24 กรัม/ลิตร หรือ 42.53 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งในการทดลองนี้มีการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบ/นาที ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยมันเทศ 100 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่ม 6 วัน เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ทำได้จริง (Observed^a) กับค่าการทำนาย (Predicted) ของแต่ละการทดลองพบว่ามีความใกล้เคียงกันโดยไม่แตกต่างกันมากนัก

สรุปผลการทดลองจากการออกแบบการทดลองทางสถิติด้วย Box-Behnken เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตหรือสะสมไขมันของยีสต์ไอโซเลท Scj 01 จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (ANOVA) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของทั้ง 5 ปัจจัย ที่สามารถทำให้ยีสต์สะสมไขมันสามารถสะสมไขมันได้สูงที่สุด คือ ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 และความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศที่มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัม/ลิตร โดยสภาวะข้างต้นนี้เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่จะสามารถทำให้ยีสต์ไอโซเลท Scj 01 สามารถผลิตและสะสมไขมันได้สูงสุด ดังที่แสดงในภาพที่ 4.12, 4.13 และ 4.14





ภาพที่ 4.14 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ (ก) และกราฟคอนทัวร์ (ข) แสดงอิทธิพลร่วมระหว่าง ปัจจัย B ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบ/นาที) กับ ปัจจัย C ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์) บนค่าที่เหมาะสมของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 4

จากกราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ และ กราฟคอนทัวร์ที่แสดงในภาพที่ 4.12, 4.13 และ 4.14 สามารถอธิบายได้ดังนี้ จากภาพที่ 4.12 เป็นการแสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย A ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) กับ ปัจจัย B ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm) ที่สามารถบ่งบอกได้ว่าระหว่างค่าของปัจจัย A กับ ปัจจัย B ที่แต่ละระดับสามารถให้ปริมาณไขมัน (Lipid content) ได้เท่าไร ซึ่งทั้งสองปัจจัยมีอิทธิพลร่วมกัน ซึ่งสามารถหาค่าพื้นที่ผิวที่ตอบสนองได้อย่างเหมาะสม เช่นเดียวกันกับภาพที่ 4.13 และ 4.14 ที่แสดงอิทธิพลระหว่างปัจจัย A ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) กับ ปัจจัย C ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์) และปัจจัย B ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm) กับ ปัจจัย C ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ซึ่งจากกราฟจะสามารถบ่งบอกค่าของปริมาณไขมันได้เมื่อมีการกำหนดระดับของปัจจัยที่อยู่ในค่าตามกราฟและสามารถบอกได้ว่าควรใช้ค่าของระดับที่เท่าไรของแต่ละปัจจัยที่สามารถให้ปริมาณไขมันสูงสุดของการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ไอโซเลท Scj 01 ซึ่งค่าระดับแต่ละปัจจัยจะครอบคลุมค่าปัจจัยที่เราแปรผันที่ค่าระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (+1) โดยแสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่ใช้ในการทดลองมีผลต่อการในการผลิตไขมันของยีสต์ Scj 01 โดยจากกราฟจะสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงบนพื้นที่ผิวที่ตอบสนองของกราฟที่มีอิทธิพลต่อการเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงปฏิบัติส่วนใหญ่ ซึ่งจะสามารถหาค่าตอบสนองที่เหมาะสมได้ โดยการที่จะทำให้ยีสต์สามารถผลิตและสะสมไขมันได้มากที่สุดต้องมีการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมทั้งทางด้านปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมี เพื่อให้ยีสต์มีศักยภาพสูงสุดการการผลิตไขมัน ซึ่งปัจจัยที่นำมาใช้ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท Scj 01 เพื่อให้ได้ปริมาณไขมันสูงสุดล้วนเป็นปัจจัยที่สำคัญและมีผลต่อการเจริญและผลิตไขมันทั้งสิ้นตามที่ได้อธิบายมาแล้ว

งานวิจัยส่วนใหญ่จะทำการศึกษาลักษณะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมัน โดยการศึกษาที่ละเอียด แต่ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาโดยการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ปัจจัยร่วมกันทั้งหมดซึ่งยังไม่มีรายงานมากเท่าไร การออกแบบการทดลองทางสถิตินี้เป็นการศึกษาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลร่วมกันที่ส่งผลต่อการผลิตและสะสมไขมันของยีสต์สะสมไขมัน ไอโซเลท Scj 01 เพื่อตอบสนองการหาสภาวะที่ดีที่สุดของแต่ละปัจจัยที่ให้ผลิตภัณฑ์สูงสุด ดังนั้นการออกแบบการทดลองทางสถิติด้วย Box Behnken จึงสามารถบอกค่าที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัยที่สามารถทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สูงสุดได้

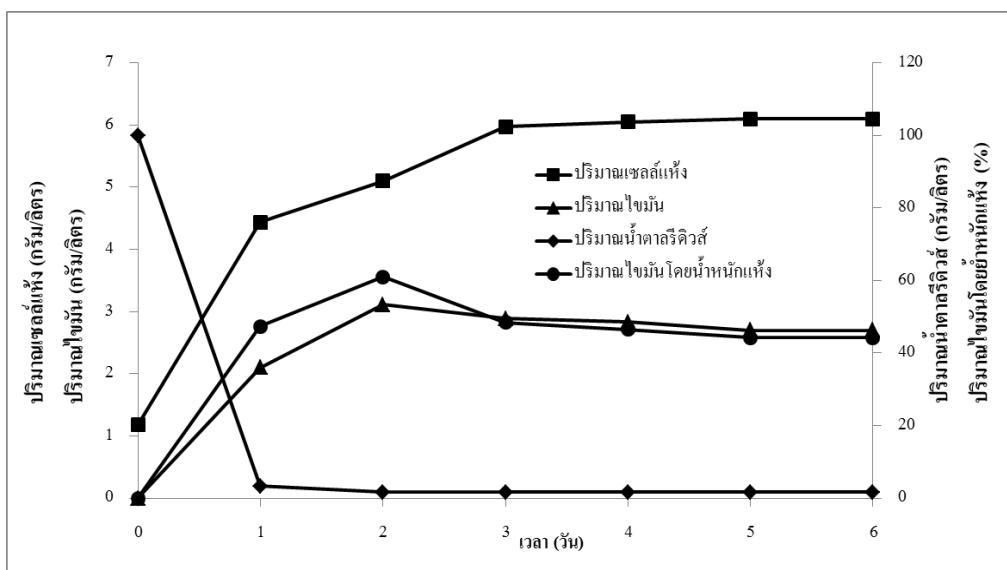
4.9 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท Scj 01 ในสภาวะที่เหมาะสมในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor)

การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมัน Scj 01 โดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการออกแบบการทดลองทางสถิติด้วยวิธี Box Behnken ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง คือ ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 และที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยมันเทศ 100 กรัม/ลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยง Production medium ที่ประกอบด้วย yeast extract 0.5 กรัม/ลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัม/ลิตร, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 กรัม/ลิตร และ KH_2PO_4 1.0 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจน ทำการเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 50 มิลลิลิตร ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 6 วัน เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวแล้ว นำสภาวะดังกล่าวศึกษาการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาการสะสมไขมันของยีสต์ Scj 01 ในระดับที่ใหญ่ขึ้น (large scale) โดยการทดลองนี้เป็นการทดสอบการใช้ประโยชน์จากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์มาเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สูงสุด

4.9.1 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Scj 01 ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมัน ไอโซเลท Scj 01 ในระดับถัง 5 ลิตร ที่มีปริมาตรการเพาะเลี้ยง 3 ลิตร ใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่ได้จากการออกแบบการทดลองทางสถิติ โดยสภาวะที่ใช้มีดังนี้ ความเร็วรอบในการกวน 200 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 และความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยมันเทศ 100 กรัม/ลิตร ระยะเวลาในการบ่ม 6 วัน โดยติดตามผลการทดลองโดยการเก็บตัวอย่างทุกวัน เพื่อวิเคราะห์การเจริญในรูปปริมาณเซลล์แห้ง (Biomass) การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Lipid content) และการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ จากการศึกษพบว่า ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 มีปริมาณของเซลล์ยีสต์น้อยทำให้ตัวอย่างที่เก็บในแต่ละวันไม่เพียงพอต่อการนำมาวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ดังนั้นผลการทดลอง เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมัน ไอโซเลท Scj 01 ครบ 6 วัน พบว่าสามารถได้ปริมาณไขมัน 2.20 กรัม/ลิตร หรือ 45.83 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง และมีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ 4.80 กรัม/ลิตร ซึ่งในหมักที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัม/ลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง และยีสต์สามารถใช้น้ำตาลได้จนหมด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับระดับ ฟลาสก์ 50 มิลลิลิตร พบว่ามีการสะสมไขมันที่ใกล้เคียงกันเมื่ออยู่ในสภาวะการเพาะเลี้ยงเดียวกัน โดยในระดับฟลาสก์สามารถให้ปริมาณไขมันที่ 2.24 กรัม/ลิตร หรือ 42.43 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งซึ่งไม่แตกต่างกันมากนัก

การทดลองข้างต้นเป็นการนำสถานะที่ได้จากห้องปฏิบัติการ (ระดับขวดเชา) มาเพาะเลี้ยงโดยยังไม่มี การให้อากาศ ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญและการผลิตไขมันให้ได้ปริมาณสูงสุด จึงทำการทดลอง โดยการเพิ่มอัตราการให้อากาศเข้าไปในกระบวนการหมักที่ 1 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรอาหาร/นาที่ (vvm) ตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่งคาดว่าจะการเติมอากาศให้กับยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักจะสามารถทำให้ ปริมาณการเจริญของยีสต์ไอโซเลท Scj 01 เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณเซลล์มากขึ้นและสามารถทำให้ได้การ สะสมของไขมันภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย โดยมีการติดตามผลการทดลองทุก 1 วัน จากผลการทดลอง ดังกล่าวพบว่าเมื่อมีการเติมอากาศเข้าไปที่ 1 vvm สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์และเพิ่มปริมาณการสะสมไขมัน ได้สูงขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 4.15 เมื่อเปรียบเทียบกับหมักที่ไม่มีการเติมอากาศกับสถานะที่มีการเติมอากาศ พบว่าการเติมอากาศในระหว่างการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่อุณหภูมิ 30°C ไอโซเลท Scj 01 สามารถทำให้ปริมาณเซลล์เพิ่มสูงขึ้น โดยยีสต์มีการเจริญเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 6 พบว่า ถึงหมักที่ไม่เติมอากาศสามารถให้ปริมาณน้ำหนักร เซลล์แห้งที่ 4.80 กรัม/ลิตร ส่วนถึงหมักที่มีการเติมอากาศสามารถให้ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ 6.10 กรัม/ลิตร และการหมักในระยะเวลาการบ่ม 2 วัน สามารถให้ปริมาณไขมันสูงสุดที่ 3.11 กรัม/ลิตรหรือ 60.98 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง และมีน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ 5.10 กรัม/ลิตร หลังจากวันที่ 2 พบว่า การเจริญของยีสต์มีการเจริญ และเพิ่มปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่มีปริมาณไขมันคงที่ และมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยมันเทศเริ่ม หมดตั้งแต่วันที่ 1 ภายใน 24 ชั่วโมง การที่ปริมาณไขมันคงที่ตั้งแต่วันที่ 2 ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่หมดไป ในวันที่ 1 อาจเป็นเพราะว่ายีสต์อาจมีการดึงไขมันที่อยู่ภายในเซลล์มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาล รีดิวซ์ที่หมดไปเพื่อใช้ในการเจริญเพราะการเจริญของยีสต์ยังสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์มากขึ้นจนถึงวันที่ 3 ซึ่งทำ ให้ทราบว่าเราควรมีระยะเวลาในการบ่มในวิธีการการทดลองนี้ ควรใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 3 วัน เพื่อให้ได้ ปริมาณไขมันสูงสุด จากรายงานของ Davies et al. (1990) ได้กล่าวไว้ว่าในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตไขมันนั้น การที่มีระดับของออกซิเจนต่ำจะมีผลในช่วงเวลาการหมักที่ยาวนานขึ้นและค่าสัมประสิทธิ์ของการผลิตไขมันมี ค่าต่ำไปด้วย Naganuma et al. (1985) พบว่ายีสต์ *Lipomyces starkeyi* เป็นยีสต์ที่ต้องการออกซิเจนสูง (high aerobic yeast) เนื่องจากที่ระดับออกซิเจนต่ำจะทำให้ปริมาณเซลล์และปริมาณไขมันลดลง แต่ยังมีบางรายงานวิจัย ที่กล่าวว่า ออกซิเจนจะมีผลกระทบบ้างเล็กน้อยต่อการเจริญและการเพิ่มปริมาณเซลล์ การผลิตไขมันของยีสต์ จะมีความต้องการปริมาณออกซิเจนต่ำ พบว่าในระบบแอโรบิกจะทำให้ปริมาณไขมันมีค่าเพิ่มมากขึ้น (อรรถวราวรรณ ทองมี, 2530) โดยปริมาณออกซิเจนต้องเพียงพอเพื่อให้เซลล์เจริญโดยช่วงการเปลี่ยนคาร์บอนเป็น ไขมันจะต้องการออกซิเจนประมาณ 13 โมล/ลิตร/ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามสถานะที่เหมาะสมที่จะทำให้ยีสต์ สามารถผลิตไขมันได้สูงสุดนั้นปัจจัยสำคัญขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์ที่นำมาใช้ในการผลิตไขมัน



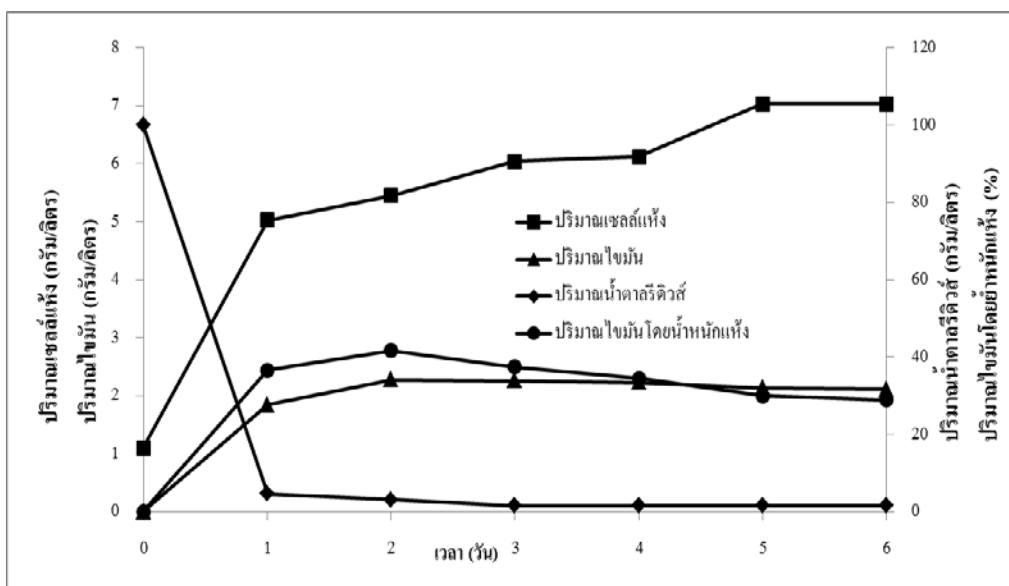
ภาพที่ 4.15 ผลการเพาะเลี้ยงยีสต์ทนร้อนไอโซเลท Scj 01 ในระดับถังปฏิกรณ์ 5 ลิตร ในสภาวะที่เหมาะสมโดยมีการเติมอากาศที่ 1 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรอาหาร/นาที่

4.9.2 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Scj 01 โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch) และแบบกึ่งกะ (Fed-batch)

จากผลการทดลองเมื่อมีการให้อากาศในการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าน้ำตาลถูกใช้หมดภายใน 24 ชั่วโมง ดังนั้นหากทำการเพิ่มน้ำตาลมากขึ้นหลังจากน้ำตาลถูกใช้หมดไป อาจช่วยให้ได้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงทำการทดลองเพิ่มปริมาณน้ำตาลโดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch Cultivation) เพื่อเปรียบเทียบกับแบบกึ่งกะ (Fed-batch Cultivation) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร

4.9.2.1 ศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Scj 01 ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร แบบกะ

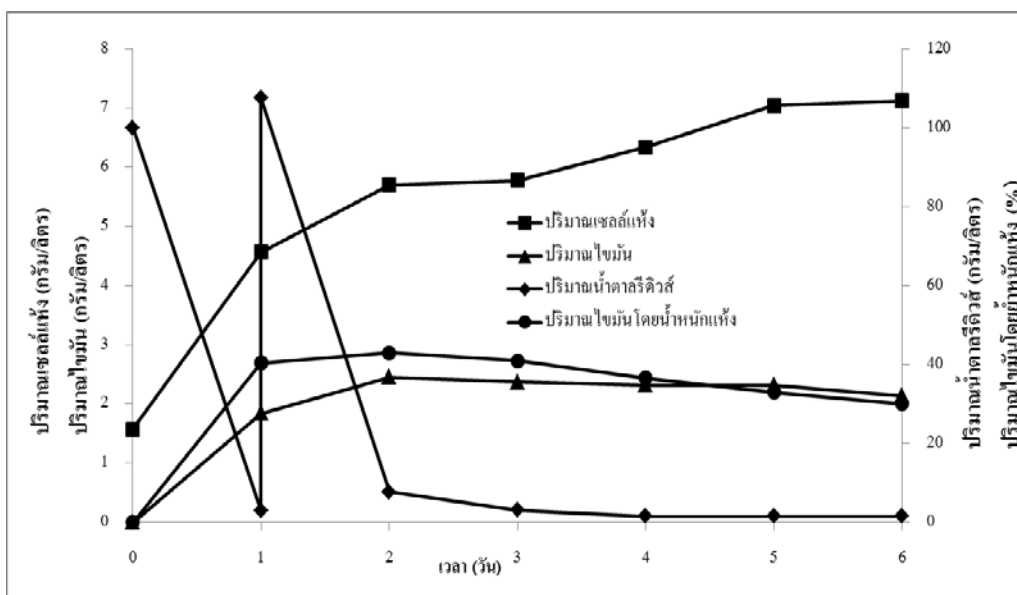
การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Scj 01 ในถังถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ เพื่อศึกษาการเจริญและการสะสมไขมัน โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Production medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยมันเทศที่ 100 กรัม/ลิตร สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 และมีการเติมอากาศ 1 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรอาหาร/นาที่ ระยะเวลาในการบ่ม 6 วันติดตามผลการทดลองทุก 1 วัน ซึ่งผลการทดลองแสดงไว้ในภาพที่ 4.16 พบว่าที่ระยะเวลาในการหมัก 24 ชั่วโมงยีสต์ทนร้อน Scj 01 สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เป็นแหล่งคาร์บอนได้เกือบหมด โดยในวันที่สองของการหมักแบบกะ ยีสต์ทนร้อน Scj 01 สามารถสะสมไขมันได้สูงสุดที่ 2.27 กรัม/ลิตร หรือ 41.65 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง มีปริมาณเซลล์ที่ 5.45 กรัม/ลิตรของน้ำหนักแห้ง และหลังจากวันที่ 2 ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 6 แต่ปริมาณไขมันเริ่มคงที่ไม่มีมีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกันกับการหมักในถังหมัก 5 ลิตร



ภาพที่ 4.16 ผลการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท Scj 01 แบบกะ (Batch Cultivation) ในระดับถึงปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร

4.9.2.2 ศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Scj 01 ในระดับถึงปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร แบบกึ่งกะ

การศึกษการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Scj 01 โดยการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ ในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร เพื่อศึกษการเจริญและการสะสมไขมัน โดยใช้สภาวะเดียวกับการเพาะเลี้ยงแบบกะในข้อ 4.9.2.1 โดยในวันแรกมีปริมาตรการเพาะเลี้ยงที่ 750 มิลลิลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นที่ 100 กรัม/ลิตร เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เติมน้ำตาลที่ปริมาตร 750 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 200 กรัม/ลิตรส่งผลที่มีปริมาตรสุทธิในการเพาะเลี้ยงที่ 1.5 ลิตร ติดตามผลการทดลองทุกวัน ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.17 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัม/ลิตร ยีสต์ทนร้อน Scj 01 สามารถใช้น้ำตาลที่เป็นแหล่งคาร์บอนหมดภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อเติมปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มอีก 200 กรัม/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอยู่ที่ 107.69 กรัม/ลิตร เมื่อผ่านไปอีก 24 ชั่วโมง ยีสต์ทนร้อน Scj 01สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้ทั้งหมดเหลือเพียงเล็กน้อย เมื่อติดตามผลการเจริญและการสะสมไขมันทุกวันจนครบ วันที่ 6 พบว่ายีสต์ทนร้อน Scj 01 สามารถสะสมไขมันได้ 2.14 กรัม/ลิตรหรือ 30.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง และมีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ 7.12 กรัม/ลิตร แต่พบว่าในวันที่สองของการเพาะเลี้ยงสามารถให้ปริมาณไขมันสูงสุดที่ 2.45 กรัม/ลิตรหรือ 42.98 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง และมีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ 5.70 กรัม/ลิตร



ภาพที่ 4.17 ผลการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลต Scj 01 แบบกึ่งกะ (Fed- Batch Cultivation) ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร

จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลต Scj 01 ในสภาวะอุณหภูมิสูง ในการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งกะ พบว่าทั้งสองแบบการทดลองมีการผลิตและสะสมไขมันสูงสุดในวันที่ 2 โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ ในวันที่ 2 สามารถสะสมไขมันได้ 2.27 กรัม/ลิตรหรือ 41.65 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง และมีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ 5.45 กรัม/ลิตร ส่วนแบบกึ่งกะสามารถสะสมไขมันได้ที่ 2.45 กรัม/ลิตรหรือ 42.98 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง และมีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ 5.70 กรัม/ลิตร ซึ่งเปรียบเทียบแล้วแบบกึ่งกะจะสามารถเจริญและสะสมไขมันได้มากกว่าแบบกะเล็กน้อย และแนวโน้มในการเจริญและการผลิตไขมันของทั้ง 2 แบบการทดลองมีแนวโน้มของผลการทดลองที่ใกล้เคียงและคล้ายคลึงกัน ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Mei et al. (2010) ได้ศึกษาการผลิตไขมันเซลล์เดียวจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a โดยในงานวิจัยนี้ได้ใช้เอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งมันสำปะหลังเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a โดยจากการทดลองพบว่ายีสต์ *R. mucilaginosa* TJY15a สามารถสะสมไขมันในเซลล์ได้ 47.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch และ 52.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง ในการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ และ Chun-Hai et al. (2010) ได้ศึกษาการผลิตไขมันเซลล์เดียวจากการย่อยอินนูลินในหัวแค้นตะวันโดยยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a และในงานวิจัยเดียวกันนี้ใช้เอนไซม์อินนูลินเนสในการย่อยหัวแค้นตะวันเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งยีสต์สามารถสะสมไขมันในเซลล์ได้ 48.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch และ 52.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งในการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ

4.10 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์ไอโซเลท Scj 01

การศึกษาคูณสมบัติบางประการของไขมันที่สกัดได้เป็นการศึกษาชนิดและปริมาณของกรดไขมัน จากผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันของยีสต์ที่สกัดได้จากยีสต์ไอโซเลท Scj 01 โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography) พบว่าประกอบด้วยกรดไขมันหลัก 4 ชนิด คือ กรดสเตียริก (stearic acid; C18:0) กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid ; C18:2) กรดปาล์มิติก (palmitic acid ; C 16:0) และกรดโอเลอิก (oleic acid ; C 18:1) ในปริมาณ 5.94 7.33 12.38 66.37 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับและยังสามารถพบกรดไขมันชนิดอื่นทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้งหมด 14 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 4.17 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับองค์ประกอบของน้ำมันที่พบในพืชน้ำมัน ไขมันที่จัดอยู่ในกลุ่ม Oleic-linoleic group ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญส่วนมากได้มาจากพืชน้ำมันทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว คือกรดโอเลอิกและกรดลิโนเลอิก จึงเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้องเหมาะสมที่จะใช้เป็นน้ำมันเพื่อปรุงอาหาร จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ไอโซเลท Scj 01 มีองค์ประกอบของกรดไขมันทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว 21.74 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดและกรดไขมันไม่อิ่มตัว 78.26 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด

ตารางที่ 4.17 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่ได้จากการสกัดไขมันจากยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Scj 01

ชนิดกรดไขมัน	เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด
Lauric acid (C12:0)	0.50
Myristic acid (C14:0)	0.76
Pentadecanoic acid (C15:0)	0.26
Palmitic acid (C16:0)	12.38
Heptadecanoic acid (C17:0)	0.50
Stearic acid (C18:0)	5.94
Arachidic acid (C20:0)	0.50
Behenic acid (C22:0)	0.25
Lignoceric acid (C24:0)	0.63
Plamitoleic acid (C16:1)	3.41
Oleic acid (C18:1)	66.37
Eicosenoic acid (C20:1)	0.38
Linoleic acid (C18:2)	7.33
Linolenic acid (C18:3)	0.76

Mei et al. (2010) และ Chun-Hai et al. (2010) ได้ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันที่สกัดได้จากเชื้อยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a ในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน คือ แป้งมันสำปะหลังและหัวแก๊นตะวัน พบว่า กรดไขมันที่ได้มีกรดโอเลอิก กรดสเตียริก กรดลิโนเลนิกและปาล์มาติก เป็นองค์ประกอบหลัก โดยเป็นกรดไขมันชนิดสายยาวที่มีคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม ที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้ เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ รัตนภรณ์ สีสิ่ง (2551ข) ได้ศึกษาการผลิตไขมันจากจุลินทรีย์โดยยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูง พบว่ายีสต์สะสมไขมันโอโซเลท OYS3 ประกอบด้วยกรดไขมันหลัก คือ กรดปาล์มาติก (palmitic acid ; C16:0) กรดโอเลอิก (oleic acid ; C18:1) กรดสเตียริก (stearic acid ; C18:0) และกรดลิโนเลนิก (linolenic acid ; C18:3) ที่มีศักยภาพในการนำมาผลิตไขมันไตรกลีเซอไรด์เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำมันที่สกัดได้ ประกอบด้วยกรดไขมันหลักที่มีความคล้ายคลึงกับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักที่พบในน้ำมันพืช โดยส่วนใหญ่องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในยีสต์จะมีองค์ประกอบที่เหมือนหรือคล้ายคลึงแต่ปริมาณอาจแตกต่างกันบ้างขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงของยีสต์สายพันธุ์นั้นๆ และ Li et al. (2007) ได้ศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันจากยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* Y4 ที่ประกอบด้วยกรดไขมันหลักคือ กรดโอเลอิก กรดปาล์มาติก กรดสเตียริก และกรดลิโนเลนิก โดยไขมันที่สกัดได้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมกับการผลิตไบโอดีเซล เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นแล้ว (ตารางที่ 4.18) พบว่าองค์ประกอบของกรดไขมันที่สกัดได้จากยีสต์สะสมไขมันโอโซเลท Scj 01 มีความคล้ายคลึงกับงานวิจัยอื่นๆ ทั้งชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่สกัดได้จากยีสต์สะสมไขมันซึ่งปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไปบ้างเล็กน้อย

ตารางที่ 4.18 เปรียบเทียบชนิดของกรดไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูงสายพันธุ์ต่างๆ

Fatty Acid (เปอร์เซ็นต์)	<i>C. lipolytica</i> (1)	<i>C. tropicalis</i> (2)	<i>R. toruloides</i> (3)	<i>R. mucilaginosa</i> TJY15a (4)	This study (5)
Lauric acid	15.1	-	-	-	0.5
Myristic acid	-	5.3	1.8	1.5	0.76
Palmitic acid	21.6	29.7	33.8	22.3	12.38
Palmitoleic acid	5.2	5.0	1.8	4	3.41
Heptadecanoic acid	-	1.5	-	-	0.5
Stearic acid	27.1	56.2	5.2	7	5.54
Oleic acid	19.0	2.3	63.5	48	66.37
Linoleic acid	12.0	-	5.7	3	7.33

ที่มา: (1), (2) Sevgi et al. (2010)

(3) Cuimun et al. (2009)

(4) Mei et al. (2010)

(5) *Pichia kudriavzevii* (Scj 01)

จากตารางที่ 4.18 พบว่าของกรดไขมันที่พบในยีสต์สะสมไขมันมีชนิดที่คล้ายคลึงกัน โดยมีกรดปาล์มาติก (palmitic acid ; C16:0) กรดโอเลอิก (oleic acid ; C18:1) กรดสเตียริก (stearic acid ; C18:0) และกรดลิโนเลนิก (linolenic acid ; C18:3) เป็นกรดไขมันหลักที่พบได้ในยีสต์สะสมไขมันทุกสายพันธุ์และพบในปริมาณมากกว่ากรดไขมันชนิดอื่น ทั้งนี้ทั้งนั้นชนิดและปริมาณของกรดไขมันจะมากขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์สะสมไขมัน รวมไปถึงปัจจัยที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่มีการส่งผลถึงชนิดของกรดไขมันที่แตกต่างกันออกไปและปริมาณของกรดไขมันที่มากน้อยแตกต่างกันไปด้วย ในงานวิจัยนี้พบว่ามีการพบกรดไขมัน กรดโอเลอิกมีปริมาณมากที่สุด ในยีสต์ไอโซเลท Scj 01

4.11 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ที่สกัดแยกได้

การจำแนกหรือบ่งชี้ชนิดของยีสต์ที่สกัดแยกได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลท ซึ่งวิเคราะห์และจำแนกชนิดโดยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) โดยมีการจำแนกชนิดยีสต์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1-D2 บน 26S rDNA (D1-D2 region sequencing)

ตารางที่ 4.19 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ที่สกัดแยกได้ 7 สายพันธุ์

ไอโซเลท	ผลการจำแนกชนิด	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน
Scj 01	<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	100
Scj 11	<i>Candida glabrata</i>	99.83
Scj 0A	<i>Pichia manshurica</i> (<i>Pichia galeiformis</i>)	100
Scj 0E	<i>Candida nivariensis</i>	99.64
Sbc 06	<i>Candida tropicalis</i>	100
Yc 02	<i>Candida</i> sp. (ยีสต์สีชมพูที่ใกล้เคียงที่สุดกับ <i>Candida rugosa</i>)	99.19
Rc 03	<i>Pichia (Issatchenkia) occidentalis</i>	100

4.11.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน 26S rDNA ของยีสต์ที่สกัดแยกได้ 7 ไอโซเลท

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน 26S rDNA ของยีสต์รหัส Scj 01

AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAGTGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGCGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGCTTTCCCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGATGCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCGTCT

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน 26S rDNA ของยีสต์รหัส Sbc 06

AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGC
TCTTTCAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTG
GAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGATCCAGGCCTATGTAAAGTTCC
TTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAAT
ATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAG
AGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGT
TACTTCTTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTATCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAATTGC
GTTGGAATGTGGCACGGCTTCGGTTGTGTGTTATAGCCTTCGTCGATACTGCCAGCCTAGACTGAG
GACTGCGGTTTATACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCCGTCTTG

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน 26S rDNA ของยีสต์รหัส Scj 0A

AAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTGT
TTCGGCACGAGTTGTAGAGTGTAGGCGGGAGTCTCTGTGGAGCGCGGTGTCCAAGTCCCTTGAA
CAGGGTGCCTGAGAGGGTGAGAGCCCCGTAGGGTGCTGCGGAAGCTTTTGAGGCCCTGCTGACG
AGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATATTGGC
GAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAA
ACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGGGCTCGACATGGGGGGTGCGCACCGCTGTC
TCTTGTAGGCGGCGCTCTGGGCGCCCTCTGGGCCAGCATCGGTTCTCTGCTGCGGGAGAAGGGGCT
CCGGAAAGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCGGGGCCAGATGCCGCGTGTGGGGACCGAGGACTG
CGGCTTCTGTCTCGGATGCTGGCATAACGGCGCAATACCGCCCCGTCTTG

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน 26S rDNA ของยีสต์รหัส Scj 11

AAACCAACTGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGT
ACCTTTGGTGCCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGTACCACTTTGGGACTGTACTTTGCCTATGTTCTTG
GAACAGGACGTCATGGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGGTGTCAAGTTCTTTGTAAAGGGTGC
TCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAAT
ACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAG
AGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTTCGCCCC
CTTGCTCTCGTGGGCTTGGGACTCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCGGTTTTGGCGGCCCGGAA
AAACCTAGGGAATGTGGCTCTGCGCCTCGGTGTAGAGTGTTATAGCCCTGGGGAATACGGCCAGC
CGGGACCGAGGACTGCGATACTTGTTATCTAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTG

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน 26S rDNA ของยีสต์รหัส Sej 0E

AAACCAACTGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGT
ACCTTTGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGTACCACTTTGGGACTATACTTTGCCTATGTTTCCTTG
GAACAGGACGTCATGGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGGTGTTAGTTCTTTGTAAAGGGTGCG
TCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAAT
ACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAG
AGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTTCGCGCCC
CTCGCTCCTTGTGGGTGGGGGACTCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTTGCGGCAGGACA
AAACCTTGGGAATGTAGCTGTGCGCCTCGGTGTACAGTGTTATAGCTCTTGGGAATACTGCCAGCG
GGGACTGAGGACTGCGATACTTGTTATCTAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCCGTCTTG

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน 26S rDNA ของยีสต์รหัส Yc 02

AAACCAACCGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAAGCCCCG
GGGCGTTGTAATTTGCAGGCGGATGTTTTGGGGCGGGCGCTGTCTACGTTTCCTTGGAAACAGGACGC
CGCAGAGGGTGAGAGCCCCGTGCGATGGCGCCTTTAACCGCGTAAAACTCCGCCGACGAGTCGAG
TTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATACTGGCGAGAGAC
CGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCAC
GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATGCGATTAGCGGCCAGCAGGAGGTGCGTTCTCGCGAAAA
GGCCGTGCACCGTCTTCGGACACCGTGCGCGGAGATGGCGAGGGGGCGCCTGAGGTCTGCGACTC
GAGGTTGCTGGCGTAATGATTGCATACCACCGTCTTG

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน 26S rDNA ของยีสต์รหัส Rc 03

AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAGATTTGAAATCGTGT
TTCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTTTGTGGAAGCGTGTGTCTAAGTCCCTTGGAAAC
AGGGTGCCATTGAGGGTGAGAGCCCCGTGAGACGCGTGCGGAAGCTGTAAGGCCCTTCTGACGAG
TCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAGGCTAAATATTGGCGAG
AGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACA
GCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGGGCTCGACATGGGATTTGCGCACCGCTGCTCCT
TGTGGGCGGCGCTCTGTGCTTTTCCTGGGCCAGCATCGGTTTTTGCCGCAGGAGAAGGCGTGCTGG
AATGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCAGTGCGAGATGCTGCGTGCGGGGACCGAGGACTGCGAC
ATCTGTCTCGGATGCTGGCACAACGGCGCAATACCGCCCCGTCTT

4.12 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนของยีสต์ทนร้อนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต โดยมีการคัดเลือกยีสต์ทนร้อน 3 สายพันธุ์ มาใช้ในการทดสอบ คือ Scj 01, Sbc 06 และ Rc 03 ทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบ (API Kit, 20 C AUX; SYSMEX bioMérieux Co., Tokyo, Japan) เพื่อแสดงให้เห็นว่ายีสต์มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆได้ โดยยีสต์สามารถเจริญได้ในอาหารชนิดนั้นๆได้ดี

ตารางที่ 4.20 ความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนของยีสต์ทนร้อน

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์ยีสต์		
	Scj 01	Sbc 06	Yc 03
Glucose	++	++	++
Glycerol	++	-	-
2-keto-D-gluc0nate	-	++	-
Arabinose	-	-	-
Xylose	-	++	-
Adonitol	-	++	-
Xylitol	-	-	-
Galactose	-	++	-
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	++	-
Methyl-d-glucoside	-	++	-
N-acetyl-glucosanine	++	++	++
Cellobiose	-	-	-
Lactose	-	-	-
Maltose	+	++	-
Saccharose	+	++	-
Trehalose	++	++	-
Mlelezitose	-	++	-
Rafinose	-	-	-

- ยีสต์ไม่เจริญแสดงว่ายีสต์ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดนั้นได้เพื่อใช้ในการเจริญ
- + ยีสต์เจริญเล็กน้อยแสดงว่ายีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดนั้นได้ไม่มากนัก
- ++ ยีสต์เจริญได้ดีแสดงว่ายีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดนั้นเป็นอาหารได้และใช้ได้ดีทำให้มีการเจริญของยีสต์เจริญเติบโตได้ดี

4.13 ผลการทดสอบการเจริญและการสะสมไขมันในอาหารสูตรต่างๆของยีสต์ไอโซเลท Scj 01

การทดสอบการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ Scj 01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแบ่งสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง ดังนี้

อาหารสูตรที่ 1 อาหารสูตร YPG

อาหารสูตรที่ 2 น้ำไขมันเทศ 100 กรัม/ลิตร และกลูโคส 20 กรัม/ลิตร

(ไขมันเทศ 100 กรัมในน้ำ 1 ลิตร แล้วกรองเอาน้ำ)

อาหารสูตรที่ 3 น้ำไขมันเทศ 200 กรัม/ลิตร และกลูโคส 20 กรัม/ลิตร

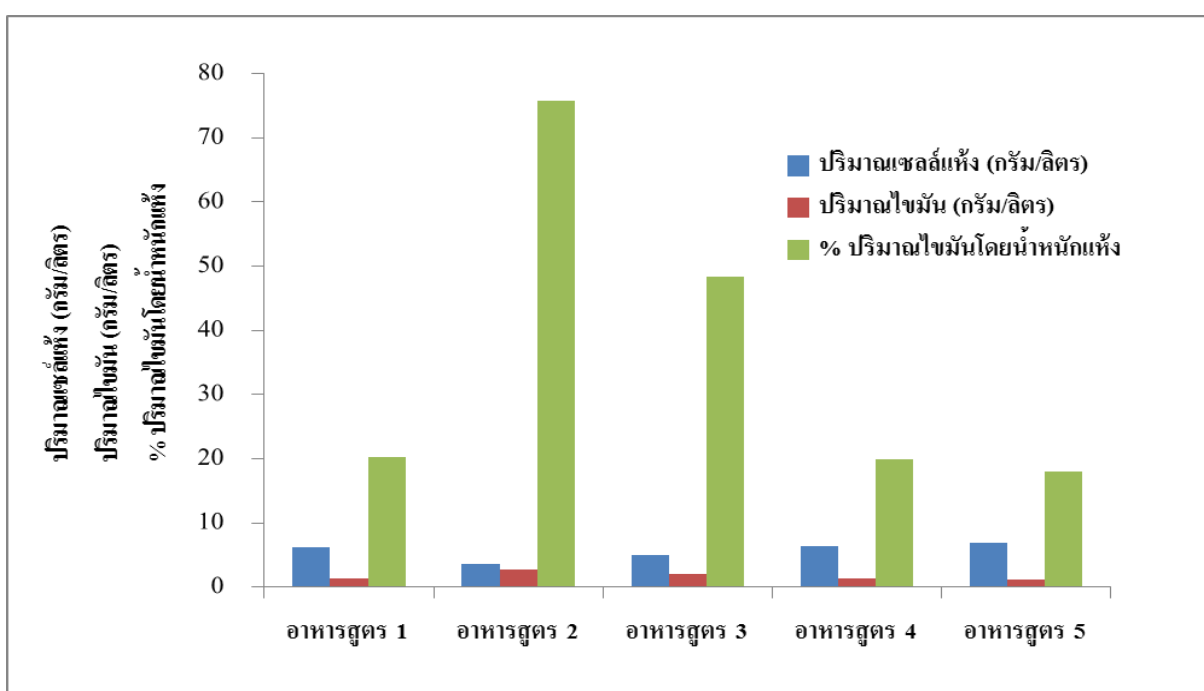
(ไขมันเทศ 200 กรัมในน้ำ 1 ลิตร แล้วกรองเอาน้ำ)

อาหารสูตรที่ 4 น้ำตาลจากการย่อยไขมันเทศ 20 กรัม/ลิตร, peptone 10 กรัม/ลิตร

และ yeast extract 10 กรัม/ลิตร

อาหารสูตรที่ 5 กลีเซอรอล 20 กรัม/ลิตร, peptone 10 กรัม/ลิตร และ yeast extract 10 กรัม/ลิตร

เพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมที่ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบ/นาที ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาเวลาในการบ่ม 6 วัน แล้วนำไปวิเคราะห์ผลการเจริญโดยวิธี Cell dry weight และวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธี Colorimetric method ซึ่งให้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.18



ภาพที่ 4.18 ผลการทดสอบการเจริญและการสะสมไขมันของยีสต์ Scj 01 ในอาหาร 5 สูตร

จากผลการทดลองพบว่าอาหารสูตรที่ 2 น้ำไขมันเทศ 100 กรัม/ลิตร และกลูโคส 20 กรัม/ลิตร (ไขมันเทศ 100 กรัมในน้ำ 1 ลิตร แล้วกรองเอาน้ำ) สามารถให้เปอร์เซ็นต์ปริมาณไขมันโดยน้ำหนักแห้งสูงสุดที่ 75.71 และมีปริมาณไขมัน 2.65 กรัม/ลิตร และปริมาณเซลล์แห้ง 3.5 กรัม/ลิตร รองลงมาคืออาหารสูตรที่ 3 สามารถให้เปอร์เซ็นต์ปริมาณไขมันโดยน้ำหนักแห้งที่ 48.28 ปริมาณไขมัน 1.97 กรัม/ลิตร และปริมาณเซลล์แห้ง 4.98 กรัม/ลิตร แต่อาหารสูตรที่ 4 มีน้ำตาลจากการย่อยมันเทศที่ 20 กรัม/ลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถเจริญเติบโต และได้ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดที่ 6.8 กรัม/ลิตร มากกว่าอาหารสูตรอื่นๆ และทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับปริมาณของแหล่งไนโตรเจนอาจมีผลต่อการเจริญและผลของการสะสมไขมัน โดยในสูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่ำจะทำให้เกิดการเจริญน้อยแต่ทำให้มีการสะสมไขมันมากกว่าสูตรอาหารที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนมาก ซึ่งในอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งไม่มีการเติมสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยอาศัยแหล่งไนโตรเจนที่มีในน้ำไขมันเทศ 10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นซึ่งอาจจะมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนน้อยกว่าสูตรอาหารอื่นๆ รวมทั้งอาหารสูตรที่ 3 อาจจะมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนน้อยเช่นกันแต่อาจจะมีมากกว่าอาหารสูตร 2 จึงทำให้ได้ปริมาณเซลล์แห้งของยีสต์ Scj 01 มากกว่าอาหารสูตรที่ 2 แต่ปริมาณไขมันต่ำกว่า ส่วนอาหารสูตร 1, 4 และ 5 ซึ่งปริมาณแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่เท่ากัน แต่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน คือ อาหารสูตรที่ 1 มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน อาหารสูตรที่ 4 มีน้ำตาลจากการย่อยมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอน และอาหารสูตรที่ 5 มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากัน พบว่าทำให้ปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์แห้งได้ผลไม่แตกต่างกันมากนักแสดงดังภาพที่