วท
TP
ส๙๘.๖๕
.ร๕๖
๙๑๒๙

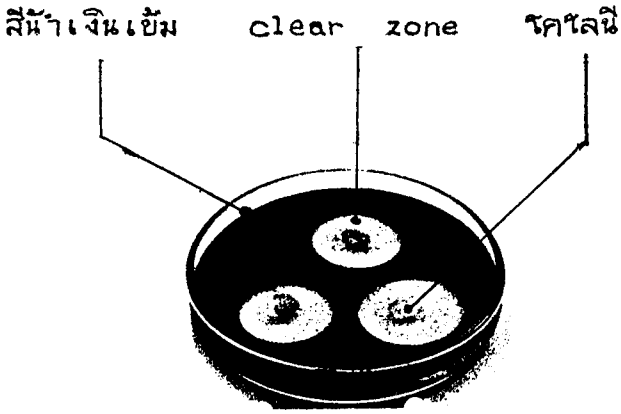


ห ๖๕๒๗
หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 3
# ผลการทดลอง

## 3.1 ผลการเปรียบเทียบหาสายพันธุ์ยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้ง

ใช้เชื้อยีสต์ 2 สายพันธุ์ในการทดสอบการใช้อาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน (starch agar) คือ *Schwanniomyces occidentalis* TISTR 5346 และ *Schwanniomyces occidentalis* TISTR 5555 ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 8 พบว่า เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ ในการทดลองได้เลี้ยงเชื้อทั้ง 2สายพันธุ์ในอาหาร starch agar บ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเก็บตัวอย่างมาวัดระยะเส้นผ่าศูนย์กลาง clear zone ต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีพบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Schwanniomyces occidentalis* TISTR 5555 ให้ระยะเส้นผ่าศูนย์กลาง clear zone ต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีสสูงกว่า เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Schwanniomyces occidentalis* TISTR 5346 ดังนั้นจึงเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Schwanniomyces occidentalis* TISTR 5555 ในการทดลองผลิตโปรตีนเซลล์เดียว เพราะยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถย่อยแป้งได้ดีกว่าอีกสายพันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบกันซึ่งรูปที่ 2 เป็นรูปแสดง clear zone ที่เกิดขึ้นและเห็นชัดเจนเมื่อหยดสารละลายไอโอดีนลงไปในจานเลี้ยงเชื้อ ส่วนที่อยู่รอบโคโลนีจะเห็นเป็น clear zone ชัดเจน เพราะแป้งในส่วนนี้ถูกย่อยสลายไปแล้ว ส่วนของแป้งที่ยังไม่ถูกย่อย จะเกิดปฏิกิริยากับไอโอดีนได้เป็นสีน้ำเงินเข้ม




รูปที่ 2 แสดง clear zone ที่เกิดจากการย่อยแป้งของเชื้อ *S.occidentalis* บนอาหาร starch agar

ตารางที่ 8 แสดงระยะเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี และระยะเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone และอัตราส่วนระหว่างระยะเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone : ระยะเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี

| เวลา | เชื้อสายพันธุ์ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Schwanniomyces occidentalis* TISTR 5346 | | | *Schwanniomyces occidentailis* TISTR 5555 | | |
| ชั่วโมงที่ | ø clear zone | ø colony | ø clear zone / ø colony | ø clear zone | ø colony | ø clear zone / ø colony |
| 6 | 0.10 | 0.10 | 1.00 | 0.15 | 0.10 | 1.50 |
| 12 | 0.16 | 0.15 | 1.00 | 0.27 | 0.17 | 1.58 |
| 21 | 0.43 | 0.30 | 1.50 | 0.50 | 0.30 | 1.60 |
| 30 | 0.73 | 0.30 | 2.43 | 0.90 | 0.33 | 2.72 |
| 48 | 1.30 | 0.53 | 2.45 | 1.41 | 0.50 | 2.82 |
| 72 | 1.70 | 0.60 | 2.83 | 1.93 | 0.63 | 3.06 |
| 96 | 2.43 | 0.83 | 2.92 | 2.66 | 0.83 | 3.20 |
| 120 | 2.56 | 0.86 | 2.97 | 2.93 | 0.90 | 3.25 |
| 144 | 3.10 | 1.03 | 3.00 | 3.56 | 1.03 | 3.46 |

ø = ระยะเส้นผ่าศูนย์กลาง (เซนติเมตร)

**3.2. ผลการหาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและเวลาที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว**

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ *Schwanniomyces occidentalis* TISTR 5555 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 1%, 2%, 3% และ 4% w/v แทนกลูโคส โดยบ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแป้ง ปริมาณน้ำตาล และปริมาณโปรตีนได้ผลตามตารางที่ 9 ตามลำดับจากการหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เวลาต่างๆ (รูปที่ 3) พบว่าเซลล์เจริญอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรก และการเจริญจะเริ่มคงที่หลังเวลา 24 ชั่วโมง อาหารที่มีความเข้มข้นแป้ง 4% จะให้น้ำหนักเซลล์สูงสุดคือ 6.36 กรัมต่อลิตรและอาหารความเข้มข้นแป้ง 1%, 2% และ 3% จะให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งดังนี้คือ 4.40 กรัมต่อลิตร, 4.96 กรัมต่อลิตร และ 6.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการทดลองหาปริมาณแป้ง (รูปที่ 4) พบว่าเชื้อยีสต์สามารถย่อยแป้งได้รวดเร็วมาก คือใช้หมดภายในเวลา 6-9 ชั่วโมงแรก ซึ่งในอาหารความเข้มข้นแป้ง 1%, 2%, 3% และ 4% นั้นเชื้อยีสต์จะใช้แป้งได้หมดในเวลาใกล้เคียงกัน

จากการทดลองหาปริมาณน้ำตาล (ในรูปที่ 5) พบว่าจุลินทรีย์สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้อย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก ทำให้ปริมาณน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น จนถึงจุดสูงสุด ซึ่งแป้งเปลี่ยนเป็นน้ำตาลหมด ในการเจริญและเพิ่มจำนวนของเซลล์มีการใช้น้ำตาลทำให้ปริมาณน้ำตาลค่อยๆลดลง จนถึงชั่วโมงที่ 36 น้ำตาลเหลือน้อยมาก และอาหารความเข้มข้นแป้ง 4% จะได้ปริมาณน้ำตาลในอาหารที่เวลา 12 ชั่วโมงสูงที่สุดคือ 21.02 กรัมต่อลิตร ส่วนอาหารความเข้มข้นแป้ง 3%, 2% และ 1% จะให้ปริมาณน้ำตาลในอาหารต่ำลงตามลำดับคือ 14.57 กรัมต่อลิตร, 12.42 กรัมต่อลิตร 7.42 กรัมต่อลิตร

จากการหาปริมาณโปรตีน (วิธี Lowry) ที่เวลาต่างๆ (รูปที่ 6) พบว่าปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 36 และชั่วโมงที่ 36 นี้จะให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด จึงเลือกเก็บเกี่ยวเซลล์ที่เวลา 36 ชั่วโมง อาหารที่มีความเข้มข้นแป้ง 4% จะให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุดคือ 2.5 กรัมต่อลิตร และอาหารความเข้มข้นแป้ง 3%, 2% และ 1% จะให้ปริมาณโปรตีนลดลง ตามลำดับคือ 2.3,1.98 และ 1.71 กรัมต่อลิตร

จากตารางที่ 10 เมื่อนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแป้ง ปริมาณน้ำตาล น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโปรตีนในอาหาร YM ที่ใช้แป้งเข้มข้น 1%, 2%, 3% และ 4% w/v ได้ผลออกมาดังรูปที่ 7,8,9 และ 10 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปริมาณการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ทั้ง 4 ตัวสอดคล้องกันในทุกความเข้มข้น โดยปริมาณแป้งจะลดลงเพราะถูกเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาล ทำให้ปริมาณน้ำตาลสูงขึ้นระยะหนึ่งจึงลดลง เนื่องจากเซลล์นำไปใช้ในการเจริญเติบโต

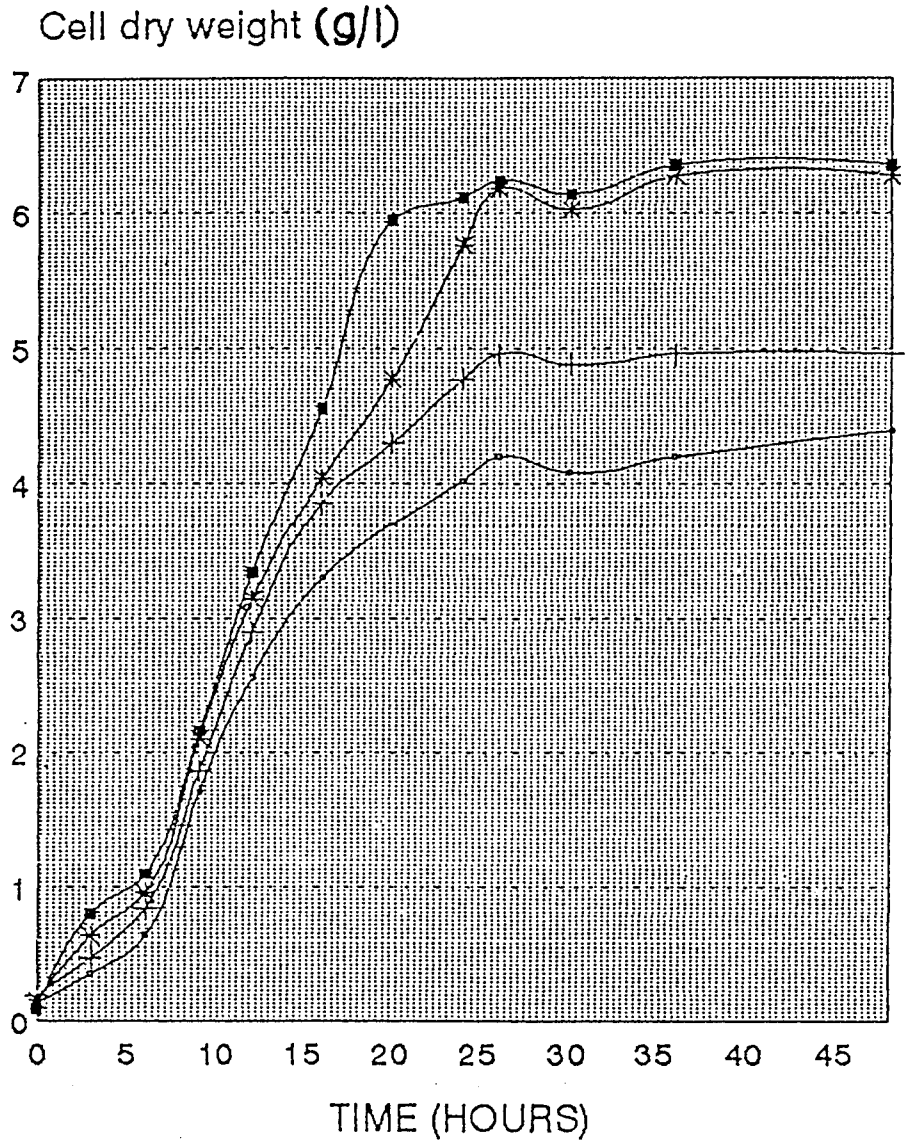
และเพิ่มจำนวน ส่วนปริมาณโปรตีนและน้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงระยะหนึ่งน้ำหนักเซลล์แห้งจะมีค่าคงที่ และโปรตีนยังเพิ่มเนื่องจากอาจจะมีการสะสมโปรตีนของเซลล์จนถึงระยะหนึ่งก็จะมีค่าคงที่

ตารางที่ 9 แสดงผลน้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณแป้ง, ปริมาณน้ำตาล, ปริมาณโปรตีนที่เวลาต่างๆ ในอาหารที่มีแป้งเข้มข้น 1%, 2%, 3% และ 4% w/v

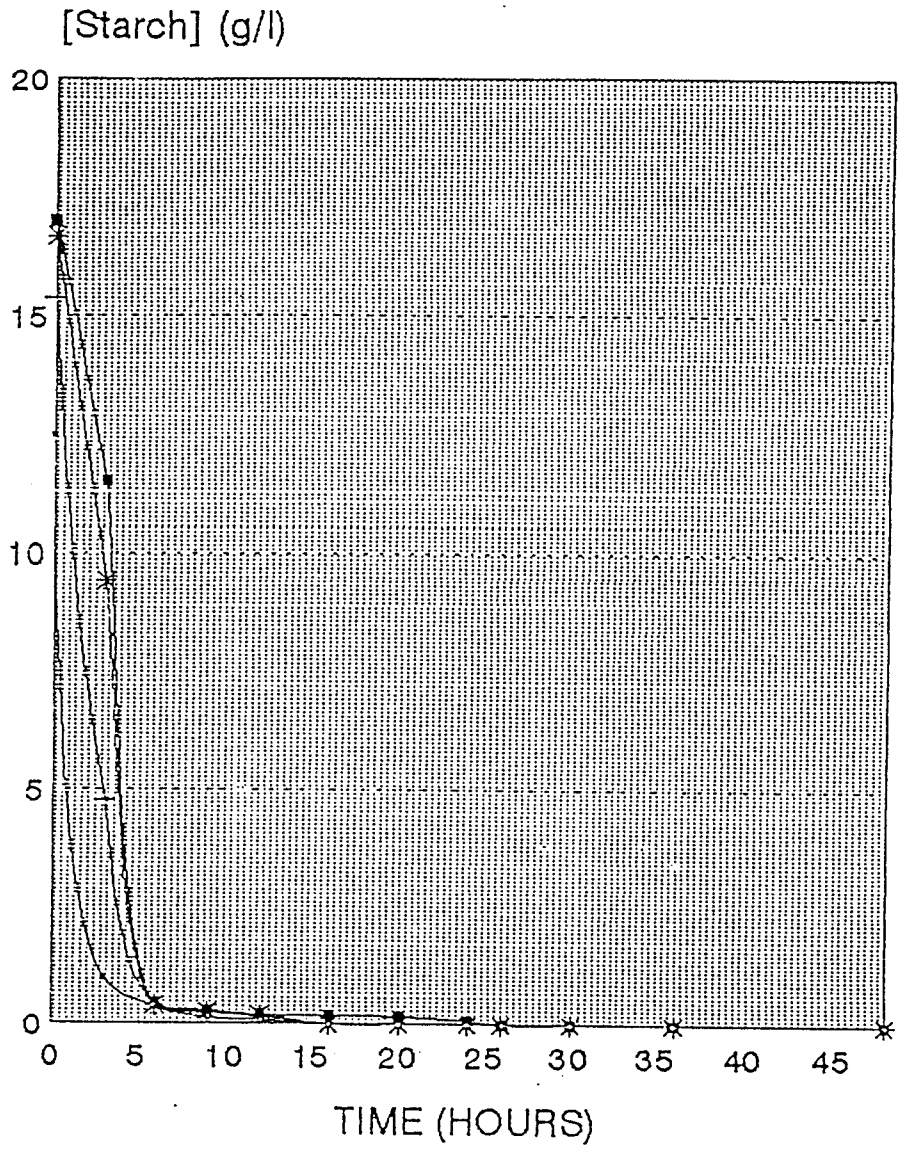
| เวลา ชั่วโมง | อาหารที่มีแป้งเข้มข้น 1% | อาหารที่มีแป้งเข้มข้น 2% | อาหารที่มีแป้งเข้มข้น 3% | อาหารที่มีแป้งเข้มข้น 4% |
|---|---|---|---|---|
| **น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)** | | | | |
| 0 | 0.14 | 0.20 | 0.16 | 0.10 |
| 3 | 0.36 | 0.48 | 0.64 | 0.80 |
| 6 | 0.64 | 0.84 | 0.96 | 1.10 |
| 9 | 1.70 | 1.86 | 2.10 | 2.16 |
| 12 | 2.56 | 2.90 | 3.14 | 3.34 |
| 16 | 3.30 | 3.86 | 4.04 | 4.56 |
| 20 | 3.70 | 4.30 | 4.78 | 5.94 |
| 24 | 4.02 | 4.78 | 5.76 | 6.12 |
| 30 | 4.08 | 4.88 | 6.02 | 6.14 |
| 36 | 4.20 | 4.96 | 6.18 | 6.24 |
| 48 | 4.40 | 4.96 | 6.28 | 6.36 |
| **ปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร)** | | | | |
| 0 | 12.50 | 15.38 | 16.68 | 17.00 |
| 3 | 0.98 | 4.75 | 9.39 | 11.50 |
| 6 | 0.38 | 0.40 | 0.42 | 0.45 |
| 9 | 0.15 | 0.25 | 0.27 | 0.30 |
| 12 | 0.09 | 0.18 | 0.20 | 0.22 |
| 16 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.20 |
| 20 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.17 |
| 24 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.08 |
| 30 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 36 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 48 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

ตารางที่ 9 (ต่อ)

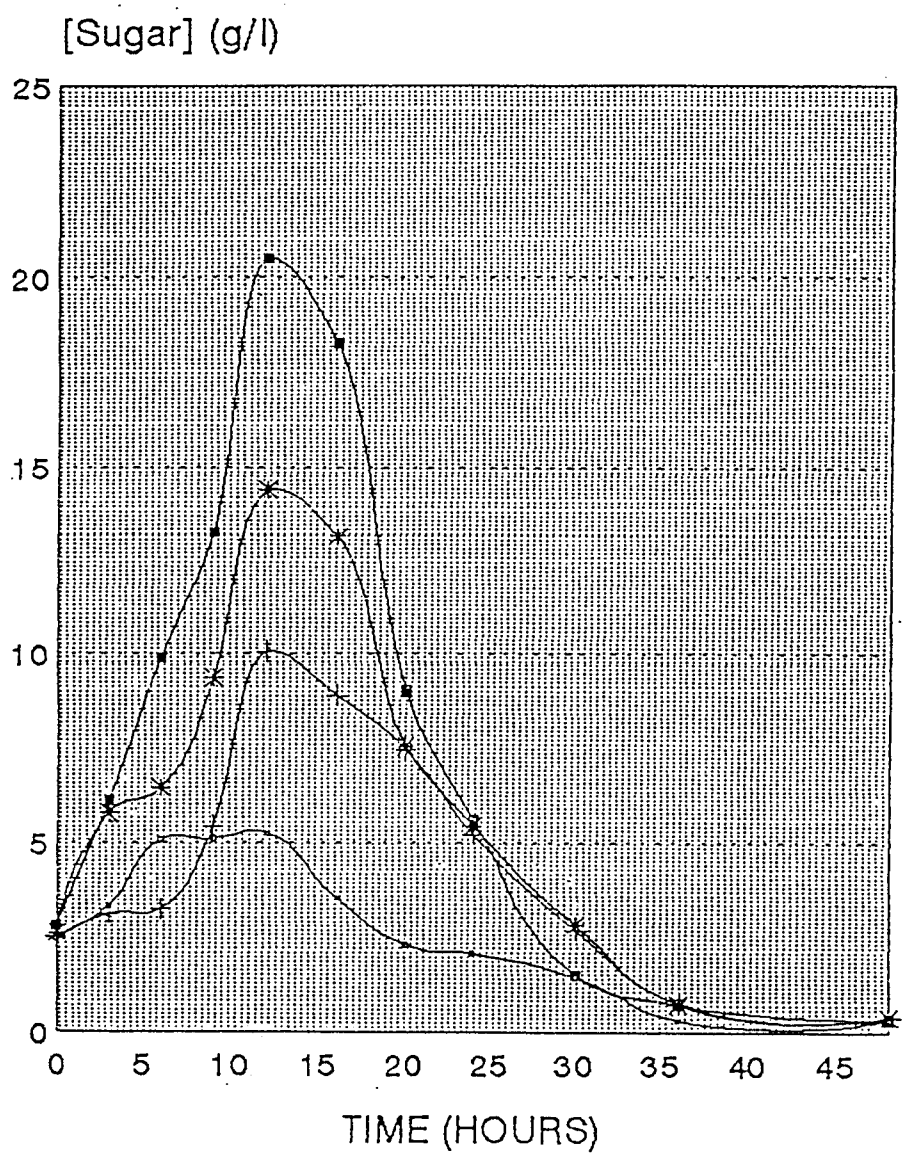
| เวลา (ชั่วโมง) | อาหารที่มีแป้งเข้มข้น 1% | อาหารที่มีแป้งเข้มข้น 2% | อาหารที่มีแป้งเข้มข้น 3% | อาหารที่มีแป้งเข้มข้น 4% |
|---|---|---|---|---|
| **ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)** | | | | |
| 0 | 2.45 | 2.50 | 2.60 | 2.81 |
| 3 | 3.34 | 3.12 | 5.77 | 6.11 |
| 6 | 5.08 | 3.25 | 6.45 | 9.89 |
| 9 | 5.11 | 5.44 | 9.34 | 13.25 |
| 12 | 5.26 | 10.06 | 14.76 | 20.49 |
| 16 | 3.54 | 8.89 | 13.13 | 18.26 |
| 20 | 2.30 | 7.48 | 7.56 | 9.00 |
| 24 | 2.09 | 5.22 | 5.44 | 5.59 |
| 30 | 1.67 | 2.69 | 2.83 | 1.52 |
| 36 | 1.46 | 0.77 | 0.75 | 0.75 |
| 48 | 0.33 | 0.40 | 0.42 | 0.35 |
| **ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)** | | | | |
| 0 | 0.01 | 0.04 | 0.03 | 0.03 |
| 3 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.08 |
| 6 | 0.23 | 0.25 | 0.25 | 0.27 |
| 9 | 0.80 | 0.80 | 0.80 | 0.70 |
| 12 | 0.85 | 1.09 | 1.27 | 1.07 |
| 16 | 1.04 | 1.40 | 1.40 | 1.56 |
| 20 | 1.04 | 1.25 | 1.62 | 1.71 |
| 24 | 1.02 | 1.25 | 1.65 | 1.65 |
| 30 | 1.05 | 1.30 | 1.75 | 1.65 |
| 36 | 1.65 | 1.93 | 2.30 | 2.50 |
| 48 | 1.71 | 1.98 | 2.30 | 2.50 |



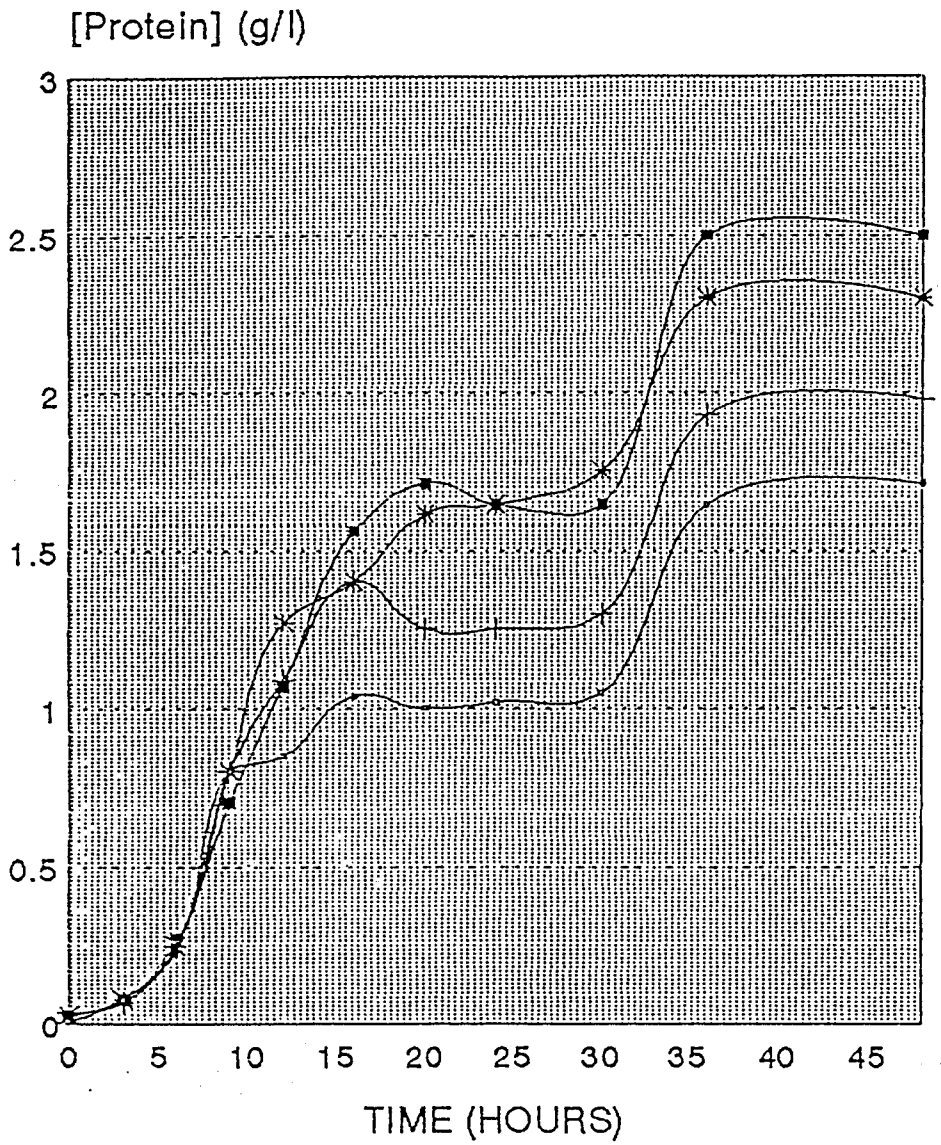

รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง)




รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง)




<u>รูปที่ 5</u> แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง)



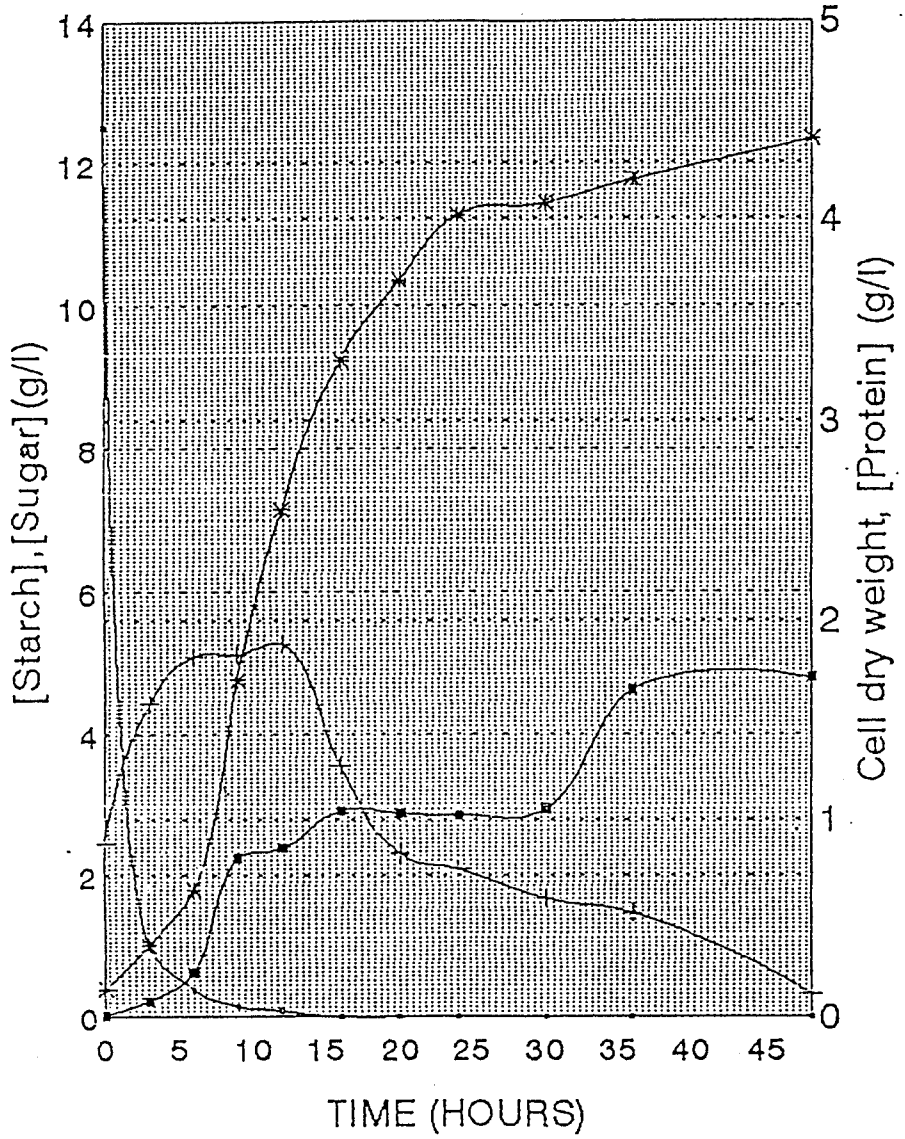

<u>รูปที่ 6</u> แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง)

ตารางที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแป้ง, ปริมาณน้ำตาล, น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโปรตีน ที่เวลาต่างๆ ในอาหารความเข้มข้นแป้ง 1%, 2%, 3% และ 4%

| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| **แป้ง 1%** | | | | |
| 0 | 12.50 | 2.45 | 0.14 | 0.01 |
| 3 | 0.98 | 4.43 | 0.36 | 0.08 |
| 6 | 0.38 | 5.08 | 0.64 | 0.22 |
| 9 | 0.15 | 5.11 | 1.70 | 0.80 |
| 12 | 0.09 | 5.26 | 2.56 | 0.85 |
| 16 | 0.00 | 3.54 | 3.30 | 1.04 |
| 20 | 0.00 | 2.30 | 3.70 | 1.03 |
| 24 | 0.00 | 2.09 | 4.02 | 1.02 |
| 30 | 0.00 | 1.67 | 4.08 | 1.05 |
| 36 | 0.00 | 1.46 | 4.20 | 1.65 |
| 48 | 0.00 | 0.33 | 4.40 | 1.71 |
| **แป้ง 2%** | | | | |
| 0 | 15.38 | 2.50 | 0.20 | 0.40 |
| 3 | 4.75 | 3.12 | 0.48 | 0.07 |
| 6 | 0.40 | 3.24 | 0.84 | 0.25 |
| 9 | 0.25 | 5.44 | 1.86 | 0.8 |
| 12 | 0.18 | 10.06 | 2.90 | 1.09 |
| 16 | 0.00 | 8.89 | 3.86 | 1.15 |
| 20 | 0.00 | 7.48 | 3.94 | 1.25 |
| 24 | 0.00 | 5.22 | 4.78 | 1.25 |
| 30 | 0.00 | 2.69 | 4.88 | 1.30 |
| 36 | 0.00 | 0.77 | 4.96 | 1.93 |
| 48 | 0.00 | 0.40 | 4.96 | 1.98 |

ตารางที่ 10 (ต่อ)

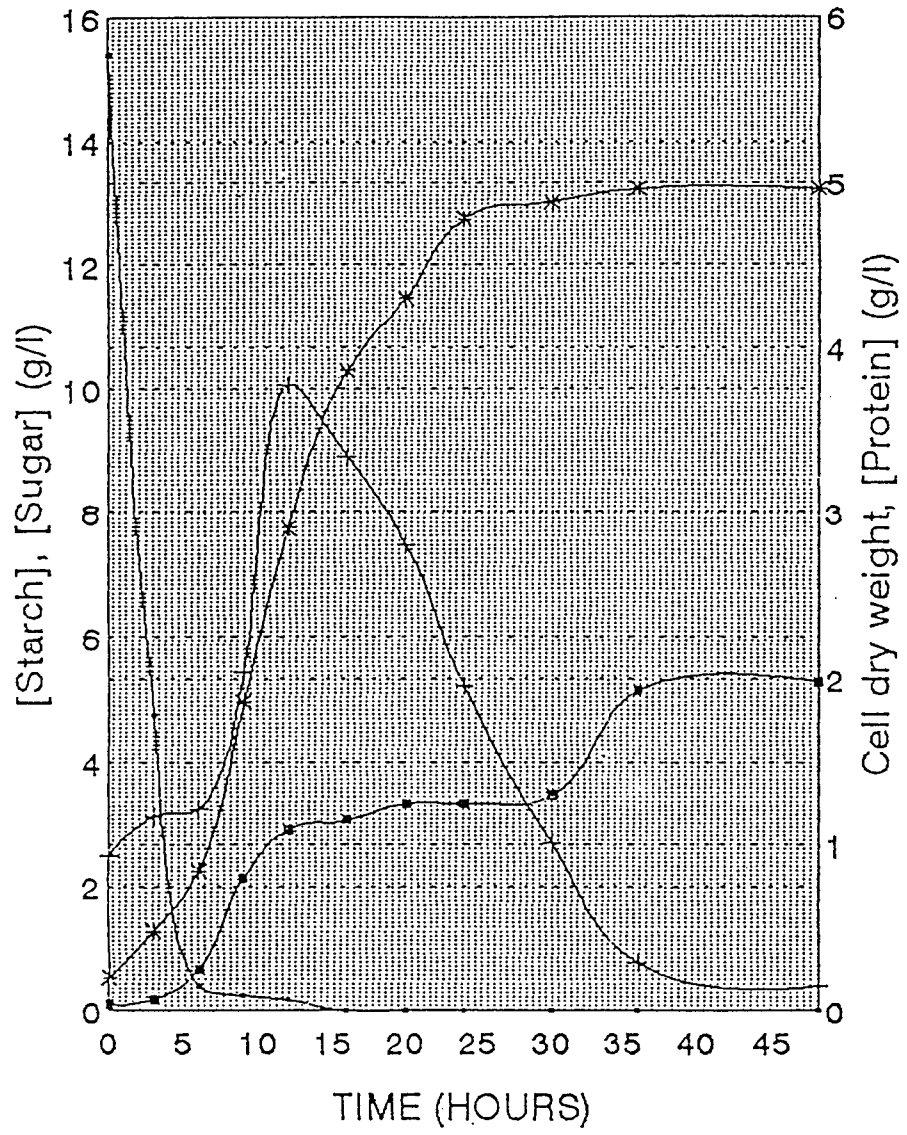
| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| **แป้ง 3%** | | | | |
| 0 | 16.68 | 2.60 | 0.16 | 0.03 |
| 3 | 9.39 | 5.77 | 0.64 | 0.08 |
| 6 | 0.42 | 6.45 | 0.96 | 0.25 |
| 9 | 0.27 | 9.34 | 2.10 | 0.80 |
| 12 | 0.20 | 14.77 | 3.14 | 1.27 |
| 16 | 0.00 | 13.13 | 5.24 | 1.40 |
| 20 | 0.00 | 7.56 | 5.55 | 1.62 |
| 24 | 0.00 | 5.44 | 5.76 | 1.65 |
| 30 | 0.00 | 2.82 | 6.02 | 1.75 |
| 36 | 0.00 | 0.75 | 6.18 | 2.3 |
| 48 | 0.00 | 0.42 | 6.24 | 2.3 |
| **แป้ง 4%** | | | | |
| 0 | 17.00 | 2.81 | 0.10 | 0.03 |
| 3 | 11.50 | 6.11 | 0.80 | 0.08 |
| 6 | 0.45 | 9.87 | 1.10 | 0.27 |
| 9 | 0.30 | 13.25 | 2.16 | 0.70 |
| 12 | 0.22 | 20.49 | 3.34 | 1.07 |
| 16 | 0.20 | 18.26 | 4.56 | 1.56 |
| 20 | 0.17 | 9.00 | 5.94 | 1.71 |
| 24 | 0.08 | 5.59 | 6.12 | 1.65 |
| 30 | 0.00 | 2.84 | 6.14 | 1.65 |
| 36 | 0.00 | 0.75 | 6.24 | 2.50 |
| 48 | 0.00 | 0.35 | 6.36 | 2.50 |




— = ปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร)  + = ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)

-*- = น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)  -■- = ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)

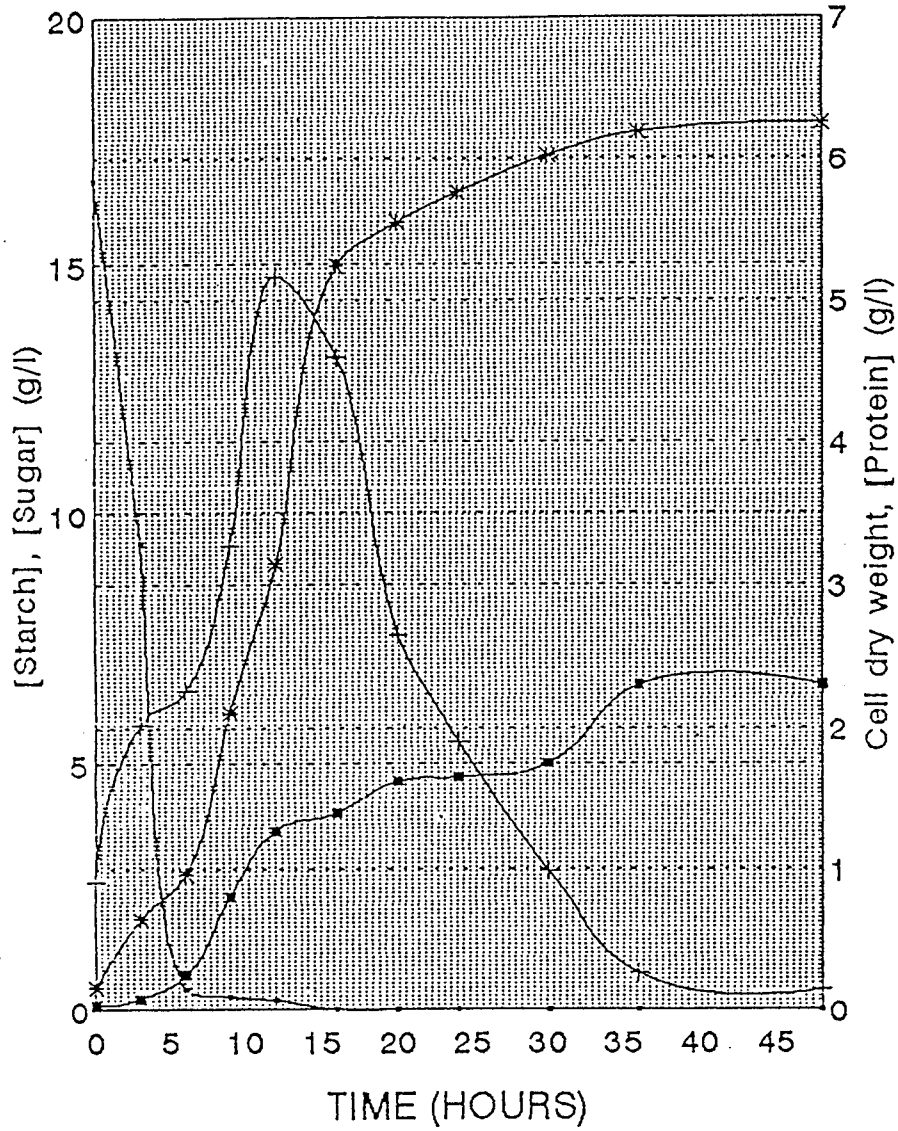
รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร), ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร), น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร) ที่เวลาต่างๆ ในอาหารความเข้มข้นแป้ง 1%




= ปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร)  = ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)

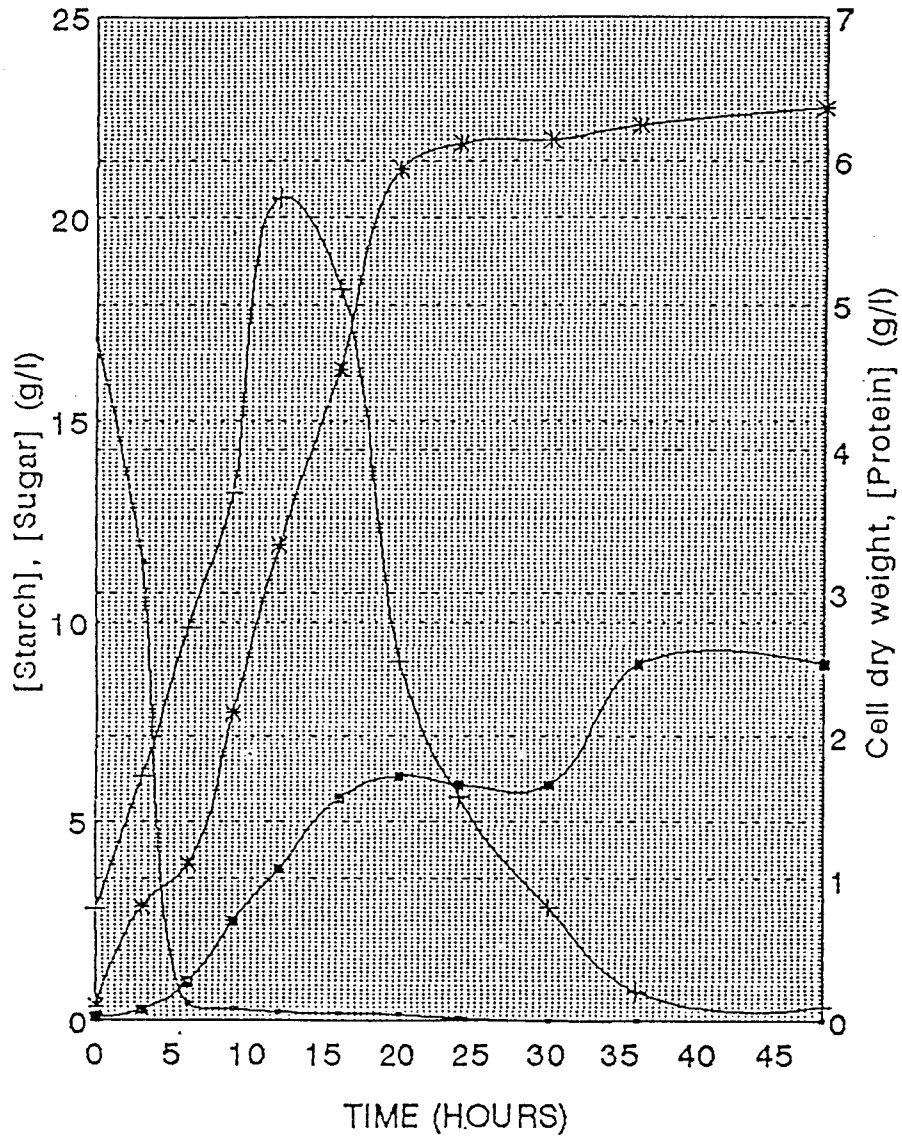
= น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)  = ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)

รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร), ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร), น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร) ที่เวลาต่างๆ ในอาหารความเข้มข้นแป้ง 2%




—•— = ปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร)
—+— = ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
—*— = น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
—■— = ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)

รูปที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร), ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร), น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร) ที่เวลาต่างๆ ในอาหารความเข้มข้นแป้ง 3%




— = ปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร)  + = ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)

-*- = น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)  -■- = ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)

รูปที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร), ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร), น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร) ที่เวลาต่างๆ ในอาหารความเข้มข้นแป้ง 4%

## 3.3 วิเคราะห์หาโปรตีนและไขมันที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตได้

จากการทดลองที่ 2 ได้อาหารความเข้มข้นแป้ง 4% เป็นอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ดังนั้นจึงทำการขยายขนาดการทดลองโดยเลือกอาหารความเข้มข้นแป้ง 4% ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อรวม 2,400 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อโดยบ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เพื่อที่จะเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยเลือกเก็บเกี่ยวเซลล์ที่เวลา 36 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 5.95 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์หาโปรตีนและไขมัน ซึ่งเป็นส่วนประกอบได้ผลการทดลองตามตารางที่ 11 ดังนี้

ตารางที่ 11 แสดงถึงโปรตีนและไขมันที่มีอยู่ในเซลล์ *Schwanniomyces occidentalis* TISTR 5555

| องค์ประกอบในเซลล์ | เปอร์เซนต์ (ของน้ำหนักแห้งเป็นกรัม) |
|---|---|
| โปรตีน | 33.84 |
| ไขมัน | 0.55 |

หมายเหตุ วัดปริมาณโปรตีนโดย Kjeldahl Method
วัดปริมาณไขมันโดย Soxhlet extraction