การผลิตบีตา-กลูแคนจากยีสต์โดยการเพาะเลี้ยงในถังหมักระบบอากาศลอยตัว

Production of Yeast Beta-glucan by Cultivation in Air-lift Fermenter

คำนำ

ปัจจุบันความรู้ความเข้าใจและปัญหาสุขภาพเป็นสิ่งที่มนุษย์ตระหนักและให้ความสนใจมากขึ้น ดังนั้นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ช่วยเสริมสุขภาพจึงเป็นที่ต้องการของตลาด โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติ เนื่องมาจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายได้ตามกลไกของธรรมชาติ ต่างจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีซึ่งอาจมีปัญหาในเรื่องของการย่อยสลาย ตลอดจนผลข้างเคียงที่ไม่อาจคาดเดาได้

บีตา-กลูแคนเป็นผลิตภัณฑ์ที่พบในธรรมชาติไม่ว่าจะเป็นในพืช เช่น ข้าวบาร์เลย์ หรือในจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ แบคทีเรีย และเห็ด ซึ่งบีตา-กลูแคนเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา 1,3 หรือบีตา 1,6 มีความสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์และสัตว์ในการต่อต้านมะเร็งและช่วยชะลอการเหี่ยวย่นของผิวหนัง (Williams *et al.*, 1996) ดังนั้นบีตา-กลูแคนจึงเป็นที่สนใจในทางการแพทย์ ทางเภสัชกรรม ตลอดจนการเกษตร

จุลินทรีย์ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และสามารถควบคุมให้มีการเจริญได้ดีเมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสม ต่างจากพืชที่ควบคุมสภาวะต่างๆ ได้ยาก ดังนั้นจุลินทรีย์จึงเป็นแหล่งของบีตา-กลูแคนที่มีความน่าสนใจกว่าพืช ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีรายงานจำนวนมากว่ามีการสกัดบีตา-กลูแคนจากผนังเซลล์ออกมาใช้ประโยชน์ (Robertsen *et al.*, 1990; Chorvatovičová *et al.*, 1993; Vereschagin *et al.*, 1994; Babineau *et al.*, 1994) ดังนั้นยีสต์จึงเป็นแหล่งของบีตา-กลูแคนอีกแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจ ด้วยบีตา-กลูแคนเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของยีสต์และปริมาณแตกต่างกันตามสายพันธุ์ ดังนั้นในการพัฒนาการผลิตบีตา-กลูแคนด้วยยีสต์ จึงควรมุ่งประเด็นไปที่การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูง การใช้ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ เป็นวิธีที่สามารถทำให้เซลล์มีการเจริญมากขึ้นหรือน้อยลง เพราะสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญได้ ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเฟด-แบตช์ (fed-batch) เป็นระบบหนึ่งที่สามารถใช้ผลิตเซลล์ได้มาก เนื่องมาจากเป็นวิธีที่สามารถควบคุมปริมาณน้ำตาลที่เติมลงไปให้เพียงพอต่อความต้องการของเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ไม่มี

น้ำตาลเหลือเกินความจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ ซึ่งอาจก่อให้เกิด Reverse Pasteur Effect อันเป็นภาวะที่มีน้ำตาลมากเกินและเกิดการยับยั้งการหายใจ มีผลให้การสร้างมวลเซลล์ลดลง

ถังหมักระบบอากาศลอยตัว (air-lift fermenter) เป็นถังหมักที่ไม่มีแกนสำหรับกวนทำให้มีแรงเฉือนต่ำ ช่วยประหยัดพลังงาน และไม่มีรอยต่อซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่นๆ สามารถใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยลักษณะดังกล่าวถังหมักระบบอากาศลอยตัวจึงมีความเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นสูงเพื่อนำมาสกัดบีตา-กลูแคน

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงทดลองใช้ถังหมักอากาศแบบลอยตัวร่วมกับการหมักแบบแบตช์และเฟด-แบตช์ สำหรับการผลิตเซลล์ยีสต์ที่คัดเลือกได้เพื่อการผลิตบีตา-กลูแคน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือก *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ปริมาณสูงและสามารถสร้างมวลเซลล์ได้เร็ว

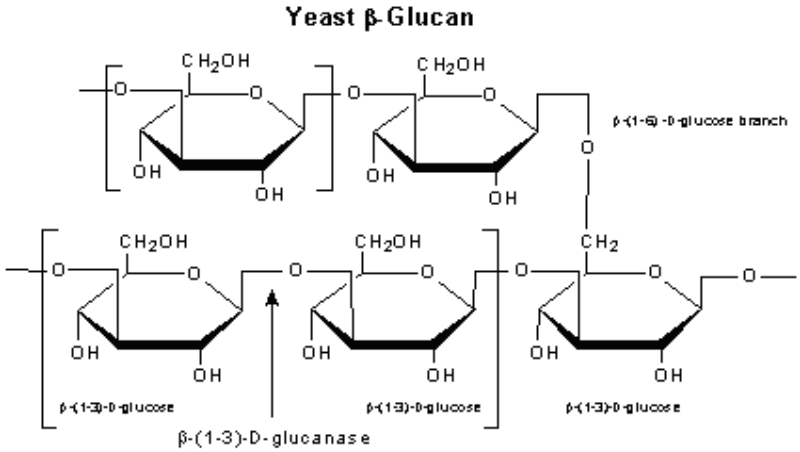
2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์ที่มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ปริมาณสูงในอาหารเหลวกากน้ำตาลของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

3. เพื่อศึกษาการผลิตบีตา-กลูแคนโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแบตช์และเฟด-แบตช์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลโดยใช้ถังหมักระบบอากาศลอยตัว

การตรวจเอกสาร

บีตา-กลูแคน

บีตา-กลูแคนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ พบได้ตามธรรมชาติ เช่น ธัญพืชจำพวก ข้าวบาร์เลย์ ยีสต์ แบคทีเรีย สาหร่าย และเห็ด บีตา-กลูแคนนั้นโดยทั่วไปจะพบที่บริเวณผนังเซลล์ ลักษณะโครงสร้างของบีตา-กลูแคนของยีสต์แสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของบีตา 1,3 กลูแคน และบีตา 1,6 กลูแคนของยีสต์

ที่มา: anonymous (n.d.a)

ยีสต์บีตา-กลูแคนประกอบด้วยสายโครงหลักและสายที่เป็นกิ่งก้าน โดยภายในสายโครงหลักประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา 1,3 (1,3 β linked) สำหรับสายที่เป็นกิ่งก้านประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา 1,6 (1,6 β linked) (Kapteyn *et al.*, 1996) สำหรับบีตา-กลูแคนที่ไม่สามารถละลายได้ในด่าง ซึ่งพบที่ผนังชั้นในของผนังเซลล์ เป็นองค์ประกอบที่พบประมาณ 30-35 เปอร์เซ็นต์ ของผนังเซลล์ โดยมากประกอบด้วยบีตา 1,3 กลูแคนเป็นส่วนใหญ่ และบีตา-กลูแคนที่สามารถละลายได้ในด่างซึ่งพบที่ผนังชั้นกลางของผนังโดยประมาณ 20-22 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์ โดยมากประกอบด้วยบีตา 1,3 กลูแคนที่มีกิ่งก้านของบีตา 1,6 กลูแคน

มาก (Ha *et al.*, 2002)

บีตา 1,3 กลูแคนมีทั้งที่อยู่ในรูปของโครงข่ายเส้นใย (fibrous) และรูปร่างไม่แน่นอน (amorphous) มีค่า degree of polarization (DB) ประมาณ 1,500 มีมวลโมเลกุลประมาณ 240,000 มีความยาวของเส้นใยสูงสุดประมาณ 600 นาโนเมตร บีตา 1,3 กลูแคนโดยทั่วไปมีลักษณะเป็นเกลียว (helical conformation) โดยเกลียวนั้นอาจประกอบด้วยสายเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ หรืออาจประกอบด้วยสายที่มีพันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ ซึ่งทำให้เกลียวเป็นแบบ 3 เกลียว (triple helix) จากการศึกษาพบว่าเส้นใยของบีตา 1,3 กลูแคนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-30 นาโนเมตร (Kopeca and Kerge, 1986) โดยมีแขนงหรือกิ่งก้านที่หมู่ 6-ไฮดรอกซี (6-hydroxy group) ซึ่งการแตกแขนงที่ตำแหน่งนี้ไม่รบกวนต่อการเกิดโครงสร้างที่เป็น 1 เกลียวหรือ 3 เกลียวแต่ความยาวของแขนงหรือกิ่งก้านดังกล่าวมีผลต่อเกลียวโดยหากแขนงนั้นมีความยาวมากจะส่งเสริมให้เกิดโครงข่ายของเส้นใย แต่ถ้าแขนงสั้นจะส่งเสริมให้เกิดเกลียวแบบ 3 เกลียว (Saito,1991)

บีตา 1,6 กลูแคนจัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีการแตกแขนงกิ่งก้านมากทำหน้าที่เชื่อมแต่ละองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ (Kollar *et al.*, 1997) ในเซลล์ที่ขาดความสามารถในการสร้างบีตา 1,6 กลูแคนพบว่าเซลล์ขาดการประกอบกันเป็นผนังเซลล์ขององค์ประกอบต่างๆ ถูกรบกวน และมีผลกระทบรุนแรงต่อการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าบีตา 1,6 กลูแคนเป็นองค์ประกอบที่ยึดจับกับไคตินในบริเวณรอยแผลที่เกิดจากการแตกหน่อ (bud scar) อีกด้วย

จากการศึกษาใน *S. cerevisiae* พบว่ามีบีตา 1,6 กลูแคนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของกลูแคนในผนังเซลล์ โดยเฉลี่ยประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 350 หน่วย ซึ่งหน้าที่ที่สำคัญของบีตา 1,6 กลูแคนคือ เป็นตัวเชื่อมแมนโนโปรตีนกับผนังเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนซ์ (Manner *et al.*, 1973)

การสังเคราะห์บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ของยีสต์

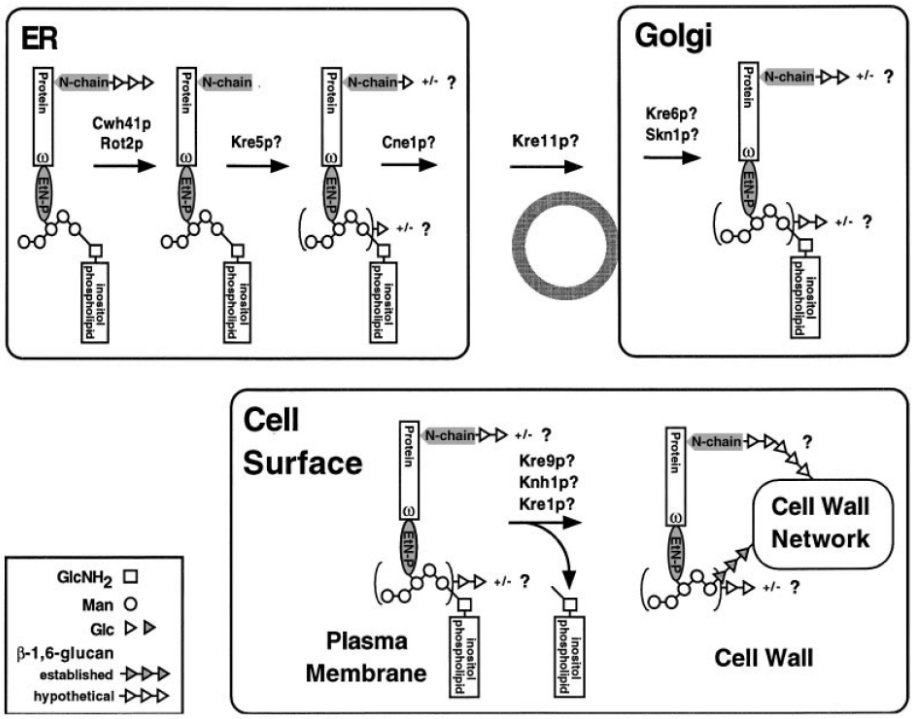
บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ของยีสต์ เริ่มมีการสร้างขึ้นในขณะที่เกิดการแตกหน่อของยีสต์ โดยการทำงานของ เอนไซม์กลูแคนซินเธเทส (glucan synthetase enzyme) ซึ่งพบที่พลาสมาเมมเบรนในขณะที่เกิดการแตกหน่อ (Shematek *et al.*, 1980)

การสร้างผนังเซลล์ของยีสต์เริ่มจากการสร้างบีตา 1,3 กลูแคน เป็นอันดับแรกที่บริเวณพลาสมาเมมเบรนโดยอาศัยการทำงานของโปรตีน Fks1p/Fks2p และ Rho1p ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมการสังเคราะห์บีตา 1,3 กลูแคนสามารถสังเคราะห์ได้โดยไม่จำเป็นต้องมีแมนโนโปรตีนหรือบีตา 1,6 กลูแคน (Kopecka and Kerger, 1986) เมื่อสังเคราะห์บีตา 1,3 กลูแคนแล้ว ต่อมาเกิดการเชื่อมต่อกันของบีตา 1,3 กลูแคนกับบีตา 1,6 กลูแคน โดยบีตา 1,6 กลูแคนนี้อาจสังเคราะห์ขึ้นโดยมีบีตา 1,3 กลูแคนทำหน้าที่เป็นตัวตั้งต้นหรืออาจสร้างจากที่อื่นแล้วจึงมีการขนส่งมาเชื่อมกับบีตา 1,3 กลูแคน และแมนโนโปรตีนจะเข้ามาจับเป็นตัวต่อไป โดยไคตินจะเข้ามาร่วมจับเป็นองค์ประกอบสุดท้าย (Roh *et al.*, 2002)

โปรตีนที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์บีตา 1,3 กลูแคนมีอยู่หลายชนิด เช่น โปรตีน Rho1p หรือ GTP-binding protein ซึ่งสร้างมาจากยีน *RHO1* มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์บีตา 1,3 กลูแคนซินเธเทส (Beta 1,3 glucan synthetase) โดยอยู่ในรูปที่ว่องไวเมื่อจับอยู่กับ GTP และอยู่ในรูปไม่ว่องไวเมื่อจับอยู่กับ GDP จากการศึกษาใน *S. cerevisiae* ที่เกิดการกลายพันธุ์ในยีนสำหรับสร้าง Rho1p พบว่าเซลล์ขาดความสามารถในการสร้างบีตา 1,3 กลูแคน (Roh *et al.*, 2002) ส่วนโปรตีน Kre6p ซึ่งสร้างมาจากยีน *KRE6* เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการสร้างบีตา-กลูแคนทั้ง 2 ชนิด Roemer *et al.* (1994) กล่าวว่า Kre6p อาจเป็นเอนไซม์บีตา-กลูแคนซินเธเทส ซึ่งถ้าเกิดการกลายพันธุ์ที่ยีนสำหรับโปรตีนนี้ส่งผลให้ปริมาณของทั้งบีตา 1,3 กลูแคน และบีตา 1,6 กลูแคนของเซลล์ลดลง แต่จากการศึกษาในเซลล์ที่ยีน *KRE6* ถูกทำลายพบว่าเซลล์ยังสามารถสร้างบีตา-กลูแคนได้ แม้ว่าความสามารถในการเจริญลดลง ซึ่ง Roemer *et al.* (1994) กล่าวว่า เอนไซม์บีตา-กลูแคนซินเธเทสอาจเป็นเอนไซม์ที่มีการทำงานร่วมกันหลายตัว โดย Kre6p อาจเป็นเพียงโปรตีนชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้อง

นอกจากยีนที่สร้างโปรตีนสองชนิดที่กล่าวข้างต้นแล้ว ยังมียีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างบีตา 1,3 กลูแคนที่มีการศึกษา คือ *FKS1*และ *FKS2* (Mazur and Baginsky, 1996) การสูญเสียยีนทั้งสองนี้ส่งผลให้เซลล์ผลิตบีตา 1,3 กลูแคนได้ลดลงตลอดจนเซลล์อาจไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้เมื่อขาดการทำงานของ Fks1p และ Fks2p (ซึ่งเป็นโปรตีนจากยีน *FKS1*และ *FKS2* ตามลำดับ) พบว่าเซลล์สามารถทนต่อเอชิโนคาดิน (echinocadins) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของบีตา-กลูแคนซินเธเทส (Inoue *et al.*, 1995)

สำหรับบีตา 1,6 กลูแคนนั้น Roh *et al.* (2002) กล่าวว่าอาจสร้างขึ้นหลังจากสร้างบีตา 1,3 กลูแคนที่พลาสมาเมมเบรนโดยอาจมีบีตา 1,3 กลูแคนเป็นตัวตั้งต้นหรืออาจสร้างจากส่วนอื่นๆ ของเซลล์ จากการศึกษาของ Shahinian *et al.* (1998) พบว่าการดัดแปลงโครงสร้างของ N-linked chain ส่งผลต่อปริมาณของบีตา 1,6 กลูแคนที่ผนังเซลล์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า N- linked chain กับบีตา 1,6 กลูแคน มีความสัมพันธ์กัน จากการศึกษาโปรตีนที่ช่วยในการจับกันของเซลล์ (α-agglutinin) ทำให้พบว่าแมนโนโปรตีนที่อยู่ส่วนนอกของผนังเซลล์จะผ่านการตัดแต่งโดยการเติมหมู่ไกลโคซิลฟอสฟาทิดิลอินโนซิทอล (glycosylphosphatidylinositol - GPI) (Nobel, 1994) ซึ่งแมนโนโปรตีนที่ได้เมื่อถูกส่งผ่านพลาสมาเมมเบรนแล้วเกิดการแตกของ GPI ที่ปลายคาร์บอน (C-terminal) แล้วจึงเกิดพันธะไกลโคซิดิกกับบีตา 1,6 กลูแคน (Kapteyn *et al.*, 1996) จากนั้นโครงสร้างที่ได้จะเชื่อมกับบีตา 1,3 กลูแคนเพื่อสร้างเป็นโครงข่ายของผนังเซลล์ต่อไป (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 2 แบบจำลองการจับกันระหว่างบีตา 1,6 กลูแคน กับโครงข่ายของผนังเซลล์ โดยอาศัย GPI โปรตีน ($GlcNH_2$ คือ กลูโคซามีน, Man คือ แมนโนส, Glc คือ กลูโคส และ EtN-P คือ ฟอสโฟเอธาโนลามีน)

ที่มา: Shahinian and Bussey (2000)

ในการสร้างผนังเซลล์นั้น การสังเคราะห์บีตา 1,6 กลูแคน แตกต่างจากการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ อื่นๆ เช่น ไคติน บีตา 1,3 กลูแคน ซึ่งมีการสังเคราะห์ขึ้นที่พลาสมาเมมเบรนแต่โปรตีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์บีตา 1,3 กลูแคนจะเกี่ยวข้องกับวิถีการหลั่งสาร(secretory pathway) อันได้แก่ Kre5p และ Cwh41p ซึ่งผลิตที่เอนโดพลาสมิกเรทิคิวลัม Kre6p ซึ่งผลิตที่กอลจิคอมเพล็กซ์ Kre1p ซึ่งผลิตที่พลาสมาเมมเบรน และ Kre9p ซึ่งไม่เป็นที่แน่ชัดว่าผลิตจากที่ใด แต่คาดว่าจะผลิตจากออแกเนลล์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการหลั่งสารเช่นกัน

แหล่งของบีตา-กลูแคน

นอกจากยีสต์แล้ว บีตา-กลูแคนยังสามารถพบได้ในแหล่งอื่นๆ ในธรรมชาติ แต่แหล่งของบีตา-กลูแคนที่เป็นที่สนใจในปัจจุบันคือ

1. บีตา-กลูแคนในธัญพืช (cereal β glucan)

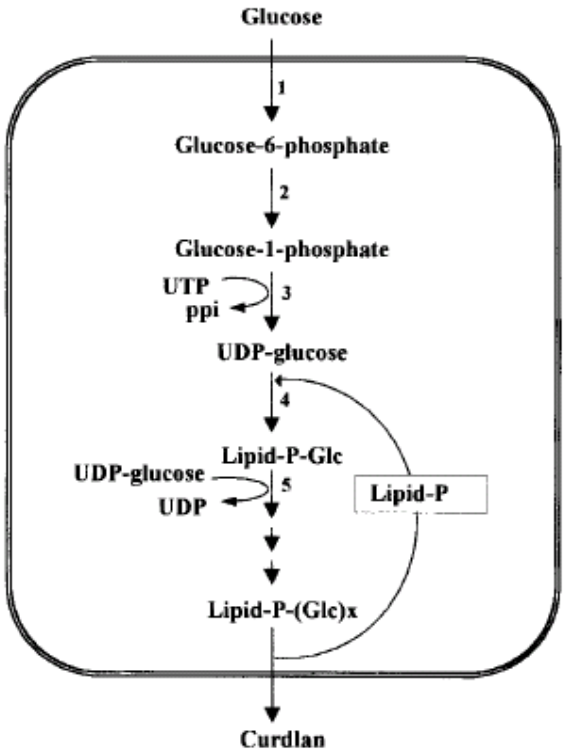
บีตา-กลูแคนที่พบในธัญพืชประกอบด้วยสายตรงของ บีตา 1,3 กลูแคนและบีตา 1,4 กลูแคนปนกันอยู่ในผนังเซลล์ของเอนโดสเปิร์มของข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวไรน์ และข้าวสาลี ซึ่งพบบีตา-กลูแคน 3-11 เปอร์เซ็นต์ 3-7 เปอร์เซ็นต์ 1-2 เปอร์เซ็นต์ และ น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Skendi *et al*., 2003) เมื่อสกัดบีตา-กลูแคนออกมาจากข้าวโอ๊ต พบว่าบีตา-กลูแคนมีลักษณะเป็นสายตรงที่ประกอบด้วย 4-O-linked β-D-glucopyranosyl unit ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 3-O-linked β-D-glucopyranosyl unit ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยบีตา 1,3 กลูแคนพบอยู่เดี่ยวๆ แต่บีตา1,4 กลูแคน มักพบอยู่เป็นกลุ่ม (Ren *et al*., 2003) โดยปกติบีตา-กลูแคนที่พบในธัญพืชมีลักษณะเป็นเกลียวแบบสุ่ม (random coil) แต่สามารถถูกทำให้มีสภาพเป็นเจล (gel) ได้โดยการเตรียมสารละลายบีตา-กลูแคน 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (น้ำหนักโมเลกุล 165000) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งการเกิดสภาพเจลจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของบีตา-กลูแคนลดลงหรือน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น การเกิดสภาพเจลดังกล่าวเกิดจากการรวมกลุ่มกันของบีตา-กลูแคน แต่ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่ามีกลไกการเกิดอย่างไร โดยสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากสายที่ยาวของบีตา 1,4 กลูแคนทำให้เกิดบริเวณที่คล้ายเซลลูโลส (cellulose like region) เมื่อบีตา-กลูแคนมีความเข้มข้นที่เหมาะสมจะเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างบริเวณดังกล่าว บีตา-กลูแคนจึงรวมตัวกันและเกิดสภาพเจล ข้อสันนิษฐานอีกประการคือ เกิดจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง

cellotriosyl unit ที่อยู่ใกล้กันในบีตา 1,3 กลูแคน ซึ่งมี cellotriosyl unit 58-72 เปอร์เซ็นต์ การเกิดพันธะดังกล่าวยังส่งผลให้สายยาวของบีตา 1,3 กลูแคนบิดตัวและเกิดโครงร่างแบบเกลียว (Tosh *et al.*, 2004)

2. <u>บีตา-กลูแคนในแบคทีเรีย</u>

ในแบคทีเรียบีตา-กลูแคนที่ศึกษามากคือ curdlan ซึ่งพบใน *Agrobacterium* sp. ซึ่งเป็นบีตา-กลูแคนในแบคทีเรียที่น่าสนใจเพราะมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของมนุษย์ โดยคำว่า curdlan มาจากลักษณะที่มีสภาพเป็นก้อนแข็ง (curdle) เมื่อได้รับความร้อน curdlan เป็นเอกโซพอลิแซคคาไรด์ ที่มีลักษณะเป็นสายตรงของบีตา 1,3 กลูแคน ไม่มีแขนง มีค่า degree of polymerization (DP) ประมาณ 450 การศึกษาโครงร่างของ curdlan กระทำได้โดยนำมาละลายในสารละลายด่าง (alkaline solution) พบว่าเมื่อสารละลายด่างที่ใช้มีความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่ำ curdlan จะมีรูปร่างเป็นเกลียว (helical) เมื่อสารละลายด่างที่ใช้มีความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์สูงกว่า 0.2 นอร์มอล curdlan จะมีรูปร่างเป็นเกลียวแบบสุ่มและละลายได้หมด (Lee, n.d.b)

การสังเคราะห์ curdlan แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนใหญ่ๆ (Lee, n.d.b) คือ ขั้นตอนแรกเป็นการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ ขั้นตอนต่อมาเป็นการสังเคราะห์พอลิแซคคาไรด์ภายในเซลล์ และขั้นตอนสุดท้ายคือการส่งพอลิแซคคาไรด์ออกสู่ภายนอกเซลล์ โดยขั้นตอนการสังเคราะห์ curdlan แสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การสังเคราะห์ curdlan ในแบคทีเรีย เมื่อ 1 คือ hexokinase, 2 คือ phosphoglucomutase, 3 คือ UDP-glucose pyrophosphorylase, 4 คือ transferase, 5 คือ polymerase, Lipid-P คือ isoprenoid lipid phosphate

ที่มา: Lee (n.d.b)

ประโยชน์ของบีตา-กลูแคน

มีการศึกษาจำนวนมากเกี่ยวกับการใช้บีตา-กลูแคนจากผนังเซลล์ของยีสต์เพื่อช่วยเสริมประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต ทำให้การผลิตบีตา-กลูแคนด้วยเซลล์ของยีสต์เป็นสิ่งที่น่าศึกษา ความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มของบีตา-กลูแคนเพิ่มขึ้นเมื่อโครงสร้างของบีตา-กลูแคนมีแขนงมากโดยพบว่าค่า degree of Branching (DB) ควรอยู่ระหว่าง 0.2 ถึง 0.3 ซึ่งทำให้บีตา-กลูแคนมีโครงสร้างแบบเกลียว 3 เกลียว (triple Helix) และการมีหมู่ไฮโดรฟิลิก

(hydrophilic group) ที่ผิวนอกของเกลียวยังช่วยเพิ่มความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มได้อีกด้วย (Bohn and BeMiller, 1995) และพบว่าบีตา 1,3 กลูแคนจาก *S. cerevisiae* สามารถกระตุ้นโปรโมโนไซต์ชนิด CR3 (CR3 Promonocytic cell) ได้ดีเมื่อบีตา 1,3 กลูแคนมีโครงสร้างแบบเกลียว 3 เกลียวและมีประจุที่ผิวของเกลียวดังกล่าว

ไซโมแซน (zymozan) ซึ่งเป็นสารสกัดจากยีสต์ที่มีการค้นพบมานาน ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน ไขมัน และสารอนินทรีย์ มีความสามารถในการเพิ่มภูมิคุ้มกันในสัตว์ (Khunrae, 2001) เป็นจุดเริ่มต้นของความน่าสนใจเกี่ยวกับการใช้ยีสต์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในมนุษย์และสัตว์ Riggi and Di Luzio (1961) พบว่าสารที่ทำหน้าที่เพิ่มความสามารถของภูมิคุ้มกันในสัตว์ คือ บีตา-กลูแคน ดังนั้นผนังเซลล์ของยีสต์จึงเริ่มเป็นที่สนใจต่อการประยุกต์ใช้ผนังเซลล์ยีสต์เพื่อประโยชน์ทางอิมมูโนวิทยา

ยีสต์บีตา-กลูแคนสามารถส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Bohn and BeMiller , 1995) โดยสามารถจับกับเซลล์ได้หลายชนิดในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Non specific immune system) เช่น มาโครฟาจก์ (macrophage) และนิวโทรฟิล (neutrophil) โดยบีตา-กลูแคนจะจับกับเซลล์เหล่านั้นตรงตำแหน่งรับบีตา-กลูแคน (β glucan receptor) ของเซลล์ ซึ่งพบว่ามาโครฟาจก์เป็นเป้าหมายในการเข้าจับของบีตา-กลูแคนได้ดีกว่าเซลล์ชนิดอื่น (Lee *et al.*, 2001) เมื่อเซลล์จับกับบีตา-กลูแคนแล้ว เซลล์นั้นจะถูกกระตุ้นและเกิดการสร้างสารประกอบต่างๆ เพื่อฆ่าแบคทีเรีย

นอกจากนี้ยังพบว่าบีตา-กลูแคนจากยีสต์สามารถช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล Cholesterol) ทั้งหมดได้ แต่เพิ่มระดับของคอเลสเตอรอลชนิด HDL (high density lipoprotein) ซึ่งบีตา-กลูแคนจากข้าวโอ๊ตก็ก่อให้เกิดลักษณะดังกล่าวได้เช่นกัน โดยกลไกการทำงานดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่คาดว่าอาจเกิดจากการสนับสนุนให้เกิดการหลั่งกรดน้ำดี (Nicolosi *et al.*, 1999) จากการทดสอบในผู้ป่วยที่มีปริมาณคอเลสเตอรอลสูงพบว่าการได้รับเส้นใยบีตา-กลูแคนวันละ 15 กรัม เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถช่วยลดปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมดได้ โดยพบว่าปริมาณคอเลสเตอรอลชนิด LDL (low density lipoprotein) จะลดลงในขณะที่คอเลสเตอรอลชนิด HDL จะสูงขึ้น (Nicolosi *et al.*, 1999)

Kerckhoffs *et al.* (2004) พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่บริโภคคุกกี้และขนมปังที่มีบีตา-กลูแคนเป็นส่วนผสมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยมีปริมาณบีตา-กลูแคนทั้งหมดที่บริโภค 5.9 กรัม พบว่าปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมดในเลือดไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อบริโภคน้ำส้มคั้นที่มีบีตา-กลูแคนเป็นส่วนผสมเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยมีปริมาณบีตา-กลูแคนทั้งหมดที่บริโภคเพียง 0.5 กรัม สามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมดในเลือดได้ถึง 0.22 มิลลิโมลต่อลิตร

Kogan *et al.* (1989) พบว่ากลูแคนจากยีสต์ขนมปังที่ผ่านกระบวนการ carboxymethylation และ sulfoethylation สามารถต่อต้านการติดเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pnuemoniae* ในหนูได้ ซึ่งกลูแคนที่ผ่านกระบวนการ carboxymethylation สามารถป้องกันการเกิดเป็นลิ่มในเลือดหนูอีกด้วย (Vereschagin *et al.*, 1994, 1997) ส่วนกลูแคนที่ผ่านกระบวนการ sulfoethylation จะแสดงความสามารถในการต่อต้านการเกิดมะเร็งในหนูที่ทดสอบด้วยโปแตสเซียมไบโครเมต (potassium bichromate) ซึ่งอาจเกิดจากอิออนของ Cr^{VI} จับกับหมู่ sulfoethyl ในกลูแคน (Chorvatovičová *et al.*, 1993) นอกจากนี้กลูแคนที่จับอยู่กับไคตินยังมีความสามารถในการต่อต้านการเกิดมะเร็งเช่นกัน (Chorvatovičová and Šandola, 1993)

จากการฉีดกลูแคนเข้าไปในปลาแซลมอนพบว่าปลาแซลมอนมีความต้านทานต่อโรค redmouth ซึ่งเกิดจาก *Yersinia rukeri* โรค Vibriosis ซึ่งเกิดจาก *Vibrio anguillaru*m โรค hitra ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Vibrio salmonicida* สูงขึ้น โดยปลามีความต้านทานสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 3 สัปดาห์หลังการฉีด (Robertsen *et al.*, 1990) และจากการฉีดกลูแคนเข้าไปในปลาแซลมอนของ Engstad *et al.* (1992) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 1-3 สัปดาห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme) สูงขึ้น และกิจกรรมของคอมพลีเมนต์ (complement) จะสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 2-4 สัปดาห์

จากการดัดแปลงทางพันธุกรรมของยีสต์เพื่อปรับปรุงบีตา-กลูแคน พบว่าทำให้บีตา-กลูแคนสามารถจับกับโมโนไซต์ (monocyte) และนิวโทรฟิลได้มากขึ้น ซึ่งจากการประยุกต์ใช้บีตา-กลูแคนดังกล่าวในผู้ป่วยที่ต้องการการผ่าตัดพบว่าผู้ป่วยที่ได้รับบีตา-กลูแคนดังกล่าวต้องใช้สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ลดลงหลังการผ่าตัดและระยะเวลาในการรักษาตัวสั้นลง (Babineau *et al.*, 1994)

Pelizon *et al.* (2004) พบว่าหนูที่ได้รับบีตา-กลูแคนจาก *S. cerevisiae* 100 มิลลิกรัม ผลิต IL-12p40 , IL-12p70, TNF-α และเพิ่มกิจกรรมของ NK cell ได้มากกว่าหนูที่ไม่ได้รับบีตา-กลูแคน เมื่อกระตุ้นด้วย *Steptococcus aureus* และเซรั่ม (serum) จากหนูที่ได้รับบีตา-กลูแคนยังมีความสามารถยับยั้งการเจริญของ *Paracoccidioides brasiliensis* ได้มากกว่าหนูที่ไม่ได้รับบีตา-กลูแคนอีกด้วย

บีตา-กลูแคน มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดเนื้องอก การบวม และระงับการทำงานของสารก่อมะเร็ง ยังพบอีกว่าสามารถเพิ่มระยะเวลาการมีชีวิตในสัตว์ ที่ผ่านการปลูกถ่ายเซลล์เมลาโนมา (melanoma) เซลล์อะดีโนคาซิโนมา (adenocarcinoma) เซลล์แมมมารีคาซิโนมา (mammary carcinoma) และเซลล์ลิมโฟไซติกลูคีเมีย (lymphocytic leukemia) (Williams *et al.*, 1996)

บีตา-กลูแคนบางครั้งมีบทบาท/บางครั้งไม่มีบทบาทเป็นสารป้องกันรังสี (radioprotective) ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องผ่านการฉายรังสี (Hofer *et al.*, 1995; Pospíšil *et al.*, 1992)

บีตา-กลูแคนสามารถกระตุ้นการทำงานของมาโครฟาจก์ใน langerhans cells ได้ ซึ่งส่งผลให้ผิวหนังไม่แห้งและเพิ่มความยืดหยุ่นได้ ซึ่งจากการทำงานดังกล่าวบีตา-กลูแคนจึงเป็นที่สนใจในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เสริมความงาม จากการทดลองในอาสาสมัครสตรีที่อายุระหว่าง 35-60 ปี จำนวน 150 คน ซึ่งใช้ผลิตภัณฑ์เสริมความงามที่มีส่วนผสมของบีตา-กลูแคนพบว่าผู้ใช้ส่วนใหญ่มีรอยเหี่ยวย่นลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ไม่ได้ใช้ นอกจากนี้ผิวหนังยังมีความยืดหยุ่นและมีความชื้นสูงขึ้นอีกด้วย (Williams *et al.*, 1996)

การเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตบีตา-กลูแคน

1. วัตถุดิบที่ใช้เพาะในการเพาะเลี้ยงยีสต์

การเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการนิยมใช้อาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยสารอาหารและธาตุต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารที่ต้องการจากยีสต์

แต่อาหารดังกล่าวมีต้นทุนในการเตรียมค่อนข้างสูง จึงไม่สะดวกหากมีการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการประยุกต์ใช้ผลพลอยได้หรือสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมมาเตรียมเป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์จึงเป็นสิ่งที่น่าศึกษา มีผลพลอยได้หรือสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมหลายชนิดที่สามารถประยุกต์เป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ได้ ดังนั้นการใช้อาหารดังกล่าวเพื่อเพาะเลี้ยงยีสต์จึงเป็นสิ่งน่าสนใจ

1.1 เวย์ (whey)

เวย์ เป็นผลพลอยได้จากการผลิตเนย (cheese) โดยเกิดจากขั้นตอนการตกตะกอนนมซึ่งเกิดส่วนที่เป็นของแข็งคือ นมข้น (curd) และส่วนที่เป็นของเหลวคือ เวย์ (whey) โดยเวย์ที่ได้มีน้ำตาลแลกโทสอยู่มาก เวย์แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ sweet whey ซึ่งมี pH สูงกว่า 5.6 และ acid whey ซึ่งมี pH ต่ำกว่า 5.1 (anonymous, n.d.c) นอกจากแลกโทสแล้วเวย์ยังมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ จากองค์ประกอบดังกล่าวเวย์จึงสามารถใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ได้ Revillion *et al.*(2003) เพาะเลี้ยง *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 เพื่อผลิตนิวคลีโอไทด์ปริมาณสูงได้โดยเพาะเลี้ยงในเวย์ที่อุณหภูมิ 35 หรือ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15-30 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดเซลล์มีโปรตีน 20 กรัมต่อลิตร Moeini *et al*. (2004) เพาะเลี้ยง *K. lactis* เพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวซึ่งพบว่ามีค่าผลผลิตโปรตีนต่อสับสเตรต 11.8 กรัมต่อลิตร ผลิตเซลล์ได้สูงสุด 21.4 กรัมต่อลิตร และสามารถลดค่า BOD จาก 30000 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือเพียง 3450 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 ไฮโดรไลเซต (hydrolysate) จากการย่อยวัสดุจากการเกษตร

วัสดุจากการเกษตรถูกใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น การการทำกระดาษ การผลิตน้ำตาล จากกระบวนการดังกล่าวทำให้เหลือส่วนที่ไม่ต้องการทางอุตสาหกรรมแต่ยังมีองค์ประกอบที่น่าสนใจต่อประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ เช่น น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมกระดาษ (spent sulphite liquor) ซึ่งเป็นน้ำที่ได้จากการย่อยไม้ด้วยกรด ดังนั้นจึงมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่มาก หรือชานอ้อยที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำตาลก็สามารถนำมาย่อยด้วยกรดเพื่อให้ได้ไฮโดรไลเซตที่มีน้ำตาลเพื่อประยุกต์ใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ได้

Meyer *et al.* (1992) ศึกษาการใช้ไฮโดรไลเซตจากการย่อยชานอ้อยเพื่อเพาะเลี้ยง *Candida blankii* พบว่าไฮโดรไลเซตจากการย่อยชานอ้อยสามารถใช้เพาะเลี้ยง *C. blankii* ได้ โดยเซลล์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.36 ต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตเซลล์ 0.47 กรัมต่อกรัมคาร์บอน จากนั้น Meyer and Kilian (1992) พบว่าการปรับให้ไฮโดรไลเซตจากการย่อยชานอ้อยมี pH 5.5 และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของ *C. Blankii* เป็น 0.36 ต่อชั่วโมง นอกจากนี้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมกระดาษยังสามารถใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราได้อีกด้วย Taherzadeh *et al*. (2003) ศึกษาการใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมกระดาษในการเพาะเลี้ยง *Rhizopus oryzae* พบว่าสามารถมีค่าผลิตเซลล์และเอทานอลจากน้ำตาลในอาหารเท่ากับ 0.37 และ 0.30 กรัมต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ

1.3 กากน้ำตาล (molasses)

กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลจากอ้อย โดยเริ่มจากนำอ้อยมาตัดให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นจึงผสมน้ำแล้วนำเข้าสู่เครื่องบดเพื่อแยกน้ำอ้อย (มีน้ำตาลซูโครส 10 ถึง 15 เปอร์เซ็นต์) ออกมา กากที่ถูกแยกออกมาคือ ชานอ้อย (bagasse) ซึ่งสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ ส่วนน้ำอ้อยจะผ่านการปรับให้มี pH 7.0 ด้วยปูนขาว (เพื่อป้องกันการสลายซูโครสเป็นกลูโคสและฟรุกโตสในระหว่างขั้นตอนต่อไป) ทิ้งไว้จนเกิดการตกตะกอนของปูนขาวและของแข็งอื่นๆ แยกส่วนใสออกมาแล้วจึงนำไปให้ความร้อนเพื่อระเหยน้ำออกไปจนกระทั่งได้น้ำอ้อยเข้มข้นที่มีซูโครสประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากนั้นจึงนำไปทำให้เดือดภายใต้สภาวะสุญญากาศแล้วทำการตกผลึกจนกระทั่งได้ของผสมของผลึกน้ำตาลและกากน้ำตาล นำมาทำให้เย็นลงเพื่อให้ผลึกมีขนาดใหญ่ขึ้นจากนั้นจึงปั่นเหวี่ยงแยกผลึกน้ำตาลออกจากกากน้ำตาล (anonymous, n.d.d)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของกากน้ำตาลจากอ้อยที่ผลิตในอเมริกา

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น
Brix, spindle	86.0 degrees
Weight/gallon	11.8-12.0 lbs
Nitrogen	1.01%
Crude Protein	6.30%
Total Sugars	48.30%
Density (as fed)	11.8 lbs/gal
Dry Matter	76.50%
Moisture	23.50%
Ash	16.00%
Organic Matter	62.50%
Reducing Substances, as Dextrose	11.50%
Sucrose	35.90%
Fructose	5.60%
Glucose	2.60%
pH	4.9 - 5.4
Calcium	0.80%
Phosphorus	Negligible (not for use)
Potassium	4.20%
Chloride	2.10%
Magnesium	0.27%
Sulfur	0.78%
Sodium	0.09%
Copper	14 ppm
Iron	130 ppm
Manganese	5 ppm
Zinc	8 ppm
Cobalt	negligible

ตารางที่ 1 (ต่อ)

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น
Iodine	negligible
Selenium	negligible
Biotin	3 ppm
Folic Acid	0.04 ppm
Inositol	6000 ppm
Calcium Pantothenate	60 ppm
Pyridoxine	4 ppm
Riboflavin	2.5 ppm
Thiamine	1.8 ppm
Niacin	500 ppm
Choline	700 ppm

ที่มา: anonymous (n.d.e)

กากน้ำตาลมีน้ำตาลอยู่มากประกอบกับมีแร่ธาตุและสารประกอบอื่นๆ ที่ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นกากน้ำตาลจึงน่าสนใจต่อการใช้เป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตผลผลิตต่างๆ ที่ต้องการ จากตารางที่ 1 พบว่าน้ำตาลที่มีมากที่สุดในกากน้ำตาลคือ ซูโครส แต่น้ำตาลที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญได้ดีที่สุดคือ กลูโคส ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์อาจต้องเติมสารประกอบบางอย่างเพื่อส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีซูโครสสูง เช่น การเติมยูเรียเมื่อต้องการเพาะเลี้ยงยีสต์ เพราะจากการทดลองของ Ahsen Baig *et al.* (2003) พบว่ายูเรียสามารถส่งเสริมการสร้างเอนไซม์ฟรุคโตฟูราโนซิเดส (frutofuranosidase) ใน *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนซูโครสเป็นกลูโคสกับฟรุกโทสได้ นอกจากนี้การปรับปัจจัยอื่นๆ ในกากน้ำตาลก็มีความจำเป็นเช่นกัน Vitotlo *et al.* (1995) พบว่าการผลิตเอนไซม์อินเวอเทส (invertase) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ในอาหารเหลวกากน้ำตาล ต้องปรับให้อาหารเหลวกากน้ำตาลมี pH 5.0 ออกซิเจนละลายอยู่ภายในอาหารเหลวกากน้ำตาล 3.3 มิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอินเวอเทส

Goksungur and Zorlu (2001) ผลิตเอทานอลจากอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 10.9 เปอร์เซ็นต์ ด้วย *S. cerevisiae* ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต (Ca-alginate) พบว่าผลิตเอทานอลได้สูงสุด 4.62 เปอร์เซ็นต์ มีค่าผลผลิตทางทฤษฎี 82.9 เปอร์เซ็นต์ Gough *et al*. (1996) ผลิตเอทานอลจากอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 23 เปอร์เซ็นต์ ด้วย *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* โดยหมักที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอทานอล 7.4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

Mostafa (1995) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอล (glycerol) ด้วย *S. cerevisiae* ในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอน 3 ชนิดคือ กากน้ำตาล akalona และกลูโคส พบว่าแหล่งคาร์บอนจากกากน้ำตาลมีความเหมาะสมต่อการผลิตกลีเซอรอลมากที่สุด โดยผลิตได้ 24.35 เปอร์เซ็นต์

Lee and Kim (2001) ศึกษาการผลิตเซลล์ของ *Candida utilis* จากกากน้ำตาล พบว่าเมื่อหมักแบบแบตช์ผลผลิตเซลล์ที่ได้จากสับสเตรตและอัตราการผลิตเซลล์เป็น 0.67 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมสับสเตรต และ 0.24 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อหมักแบบต่อเนื่องผลผลิตเซลล์ที่ได้จากสับสเตรตและอัตราการผลิตเซลล์เป็น 0.36 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมสับสเตรตและ 2.15 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อหมักแบบเฟด-แบตช์ที่เติมน้ำตาลแบบ sigmoidal ผลผลิตเซลล์ที่ได้จากสับสเตรตและอัตราการผลิตเซลล์เป็น 0.51 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมสับสเตรตและ 1.95 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตรต่อชั่วโมง วิศัลย์ (2546) ทำการผลิตเซลล์ *S. cerevisiae* M30 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ด้วยการหมักแบบเฟด-แบตช์ที่เติมน้ำตาลแบบ sigmoidal โดยเติมอาหาร 8 ครั้งทุกๆ 2 ชั่วโมงในถังหมักแบบอากาศลอยตัว พบว่าได้เซลล์ 33.91 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตรที่ 34 ชั่วโมง

2. <u>การเพาะเลี้ยงยีสต์</u>

2.1 การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (batch cultivation)

การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์เป็นการเพาะเลี้ยงแบบปิด เริ่มต้นโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงในอาหาร จากนั้นบ่มภายในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ ตลอดเวลาที่เพาะเลี้ยงไม่มีการเติมสาร

อาหารลงไปแต่อาจเติมสารต่อต้านการเกิดฟอง (antifoam) หรือสารควบคุม pH ด้วยลักษณะการเพาะเลี้ยงดังกล่าวทำให้เซลล์มีระยะต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยง เริ่มจากระยะแล็ก (lag phase) เป็นระยะที่เซลล์ปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่จึงมีการเจริญต่ำมาก เมื่อเซลล์ปรับตัวได้จึงเริ่มแบ่งเซลล์อย่างว่องไวหรือเข้าสู่ระยะที่มีความเร่ง (acceleration phase) จากนั้นการเจริญของเซลล์อยู่ในรูปแบบที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่าต่อหน่วยเวลา ซึ่งเรียกระยะนี้ว่า ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (exponential phase) ต่อมาอาหารเริ่มหมดอัตราการเจริญของเซลล์ลดลงเข้าสู่ระยะลดความเร่ง (deceleration phase) และเข้าสู่ระยะสเตชันนารี (stationary phase) ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีอัตราการเจริญเป็นศูนย์ จากนั้นเซลล์อาจตายและเกิดการย่อยตัวเอง (autolysis) ซึ่งเป็นการเข้าสู่ระยะที่มีการตาย (dead phase) ต่อไป (สาวิตรี, 2549)

Gelinas and Barrette (2007) ผลิตโปรตีนจากยีสต์ *Candida utilis* ATCC 9256 โดยการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในอาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมมันฝรั่งทอด พบว่าสามารถผลิตโปรตีนได้ทั้งหมด 11-12 เปอร์เซ็นต์ โดยเป็นโปรตีนจาก *C. utilis* ATCC 9256 7-8 เปอร์เซ็นต์ Rajoka *et al*. (2006) ผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวด้วย *Candida utilis* โดยการเพาะเลี้ยงในข้าวที่ผ่านการขัดสีแบบแบตช์ พบว่า *C. utilis* มี true protein, crude protein และ crude fiber เท่ากับ 23.6, 32.75 และ 11.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลจากการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ดังกล่าว สามารถพัฒนาโปรตีนเซลล์เดี่ยวจาก *C. utilis* เพื่อใช้เพาะเลี้ยงสัตว์ได้เป็นอย่างดี

Varga *et al*. (2004) ผลิตเอทานอลโดยการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วย Corn stover ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อผลิตเอทานอล โดยการหมักแบบแบตช์ พบว่าผลิตเอทานอลได้ถึง 52 กรัมต่อลิตร โดยการผลิตเอทานอลสูงขึ้นเมื่อปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ย่อย corn stove สูงขึ้น Pramanik (2003) ผลิตเอทานอลด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในอาหารสังเคราะห์ เมื่ออาหารมี pH 4.5 และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอทานอลได้ถึง 90 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าผลผลิตเอทานอลต่อน้ำตาลในอาหารเท่ากับ 0.462

2.2 การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ (fed-batch cultivation)

ใน ค.ศ. 1973 Yoshida *et al.* ได้นำคำว่า fed-batch culture มาใช้อธิบายการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบแบตช์ ซึ่งมีการเติมอาหารเข้าไปอย่างต่อเนื่อง หรือเติมเป็นระยะๆ โดยไม่มีการถ่ายอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อแล้วออก เพราะฉะนั้นปริมาตรของอาหารจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (สมใจ, 2537)

การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ คือการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ซึ่งมีการให้อาหารเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง (fed-continuously) หรือให้อาหารเป็นลำดับ (fed-sequential) โดยไม่มีการเอาอาหารเหลวที่มีจุลินทรีย์เจริญอยู่ออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในการปฏิบัติร่วมด้วยการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์หลังจากนั้นจึงให้อาหารด้วยกลยุทธ์อย่างใดอย่างหนึ่งต่อไปนี้ (สาวิตรี, 2549)

(ก) เติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกับที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในตอนแรกมีผลให้ปริมาตรเพิ่มขึ้น

(ข) เติมสารละลายของสับสเตรตที่จำกัดการเจริญที่ความเข้มข้นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นมีผลให้ปริมาตรเพิ่มขึ้น

(ค) เติมสารละลายสับสเตรตที่จำกัดการเจริญที่มีความเข้มข้นสูงในอัตราการให้อาหารที่ต่ำกว่า (ก) และ (ข) มีผลให้ปริมาตรเพิ่มขึ้น

(ง) เติมสารละลายสับสเตรตที่จำกัดการเจริญที่มีความเข้มข้นสูงมากในอัตราที่ต่ำกว่า (ก) (ข) และ (ค) มีผลให้ปริมาตรเพิ่มไม่มากจนถือว่าไม่มีนัยสำคัญ

ระบบเฟด-แบตช์แบบที่มีการให้อาหารแบบ (ก) และ (ข) เป็นการเพิ่มปริมาตรหรือปริมาตรผันแปร (variable volume) ในขณะที่แบบ (ง) เป็นแบบปริมาตรคงที่ (fix volume) ส่วนแบบ (ค) เป็นแบบที่อยู่ในระหว่างกลาง (สาวิตรี, 2549)

นอกจากนี้การเติมสับสเตรตในการหมักแบบเฟด-แบตช์ สรุปได้ 3 แบบ ตามการทดลอง Lee and Kim (2001) ดังนี้

1. การเติมสับสเตรตแบบ linear increment feeding เป็นการแบ่งเติมสับสเตรตตามระยะเวลาแต่ละช่วงในปริมาณเท่ากัน โดยไม่คำนึงถึงอัตราการเจริญจำเพาะ

2. การเติมสับสเตรตแบบ exponential increment feeding เป็นการแบ่งเติมสับสเตรตตามระยะเวลาแต่ละช่วงในอัตราแบบก้าวหน้า โดยอัตราการเติมคำนวณจากการเจริญจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate)

3. การเติมสับสเตรตแบบ sigmoidal increment feeding เป็นการแบ่งเติมสับสเตรตตามระยะเวลาแต่ละช่วงตามลักษณะการเจริญโดยอัตราการเติมคำนวณจากการเปลี่ยนแปลงค่าอัตราการเจริญจำเพาะในระหว่างการหมัก

การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์สามารถประยุกต์ใช้เพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตผลผลิตที่ต้องการได้ดี วิศัลย์ (2546) ทำการผลิตเซลล์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ M30 เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ด้วยการหมักแบบเฟด-แบตช์ที่เติมน้ำตาลแบบ sigmoidal โดยเติมอาหาร 8 ครั้งทุกๆ 2 ชั่วโมงในถังหมักแบบอากาศลอยตัว พบว่าได้เซลล์ 33.91 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตรที่ 34 ชั่วโมง เมื่อทำการรีพีทเฟด-แบตช์เป็นจำนวน 4 ครั้งใช้รอบการหมัก 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถได้เซลล์ 24.58, 22.21, 22.07 และ 21.35 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร

Lee and Kim (2001) ผลิตเซลล์ของ *Candida utilis* จากกากน้ำตาล พบว่าเมื่อหมักแบบแบตช์ผลผลิตเซลล์ที่ได้จากสับสเตรตและอัตราการผลิตเซลล์เป็น 0.67 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมสับสเตรตและ 0.24 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อหมักแบบต่อเนื่องผลผลิตเซลล์ที่ได้จากสับสเตรตและอัตราการผลิตเซลล์เป็น 0.36 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมสับสเตรตและ 2.15 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อหมักแบบเฟด-แบตช์ที่เติมน้ำตาลแบบ sigmoidal increment feeding ผลผลิตเซลล์ที่ได้จากสับสเตรตและอัตราการผลิตเซลล์เป็น 0.51 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมสับสเตรตและ 1.95 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่จากการคำนวณต้นทุนการผลิตจากปริมาณสับสเตรตที่ใช้พบว่าการหมักแบบเฟด-แบตช์ที่เติมน้ำตาลแบบ sigmoidal increment feeding ให้ต้นทุนการผลิตเซลล์ต่ำที่สุด

Hoek *et al.* (1999) ทำการผลิตยีสต์ขนมปัง *S. cerevisiae* DS28911 ความเข้มข้นสูงโดยการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์จากน้ำตาลแลกโทส พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเป็น 0.18 ต่อชั่วโมง เมื่อเติมน้ำตาลแบบ exponential increment feeding ผลิตเซลล์ได้ 130 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร และผลผลิตจากสับสเตรต 0.5 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมสับสเตรต

Shang *et al*. (2006) ผลิตเซลล์ *S. cerevisiae* ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์เพื่อผลิตเออกอสเตอรอล (ergosterol) พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ที่ควบคุมอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส pH 5.5 และป้องกันไม่ให้ในอาหารมีเอทานอลสูงกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเซลล์ได้ถึง 150 กรัมเซลล์แห้งต่อลิตร และมีค่าการผลิตเออกอสเตอรอลต่อสับสเตรตถึง 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร

Jahic *et al*. (2003) ศึกษารูปแบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์เพื่อลดการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (Protease) เพื่อผลิตโปรตีนด้วย *Pichia pastoris* Mut^+ พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบ methanol limited fed-batch (MLFB) ผลิตโปรตีนได้เพียง 1 กรัมต่อลิตร เพราะโปรตีนถูกเอนไซม์โปรตีเอสย่อยสลาย แต่เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ temperature limited fed-batch (TLFB) สามารถผลิตโปรตีนได้ 2 กรัมต่อลิตร และไม่พบการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส นอกจากนี้จำนวนเซลล์ที่ตายยังลดลงอีกด้วย

Demirci *et al*. (1999) เพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* แบบเฟด-แบตช์เพื่อผลิตยีสต์ที่มีซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบ (organically bound selenium yeast) ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งมะเร็งได้เหมาะแก่การผลิตเป็นอาหารมนุษย์และสัตว์ พบว่าผลิตเซลล์ได้ 45 กรัมเซลล์แห้งต่อลิตร และสามารถผลิตซีลีเนียมที่ล้อมรอบล้อมเซลล์ได้ 2846 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

2.3 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous cultivation)

เซลล์ยีสต์สามารถเพิ่มจำนวนในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นเวลานานด้วยการเจริญแบบเอ็กโพแนนเชียลโดยไม่มีระยะแล็กหรือระยะสเตชันนารี โดยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบนี้จะมีการนำอาหารเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในขณะเดียวกันมีการนำอาหารเหลวที่มีจุลินทรีย์อยู่ (culture broth) ออกจากระบบภายใต้สภาวะคงตัวความเข้มข้นของเซลล์คงที่ โดยเซลล์สูญเสียจากการไหลออกของอาหารเหลวที่มีเซลล์ต้องทำให้สมดุลโดยการเจริญของเซลล์ที่มีอยู่ในถัง ดังนั้นการเจริญของยีสต์ภายใต้สภาวะคงตัวถูกควบคุมโดยอัตราการเจือจางซึ่งในทางปฏิบัติทำโดยการเปลี่ยนอัตราการให้อาหารลงในถังโดยอัตราการเจือจางผันแปรตามการทดลอง ถ้าอัตราการเจือจางเพิ่มเกินอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเซลล์จะถูกนำออกจากถังปฏิกรณ์มากกว่าเซลล์ใหม่ที่ถูกสร้างขึ้นมาจากการเจริญสภาวะคงตัวจะสิ้นสุดและเซลล์ถูกล้างออก (washed out) ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องอาจดำเนินการในอัตราเจือจางที่จำกัดแน่นอนเพื่อควบคุมอัตราการเจริญของเชื้อ (สาวิตรี, 2549)

Kim *et al*. (1998) ผลิตเซลล์ *Kluyveromyces fragilis* เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนด้วยการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่าการใช้อัตราการเจือจางต่ำกว่า 0.17 ต่อชั่วโมง ค่าการผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลฟรุกโทสเท่ากับ 0.42 กรัมต่อกรัมฟรุกโทส ผลิตเซลล์ได้สูงสุด 4.81 กรัมต่อลิตร โดยมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 50-55 เปอร์เซ็นต์ และเกิดเอทานอลน้อยมาก

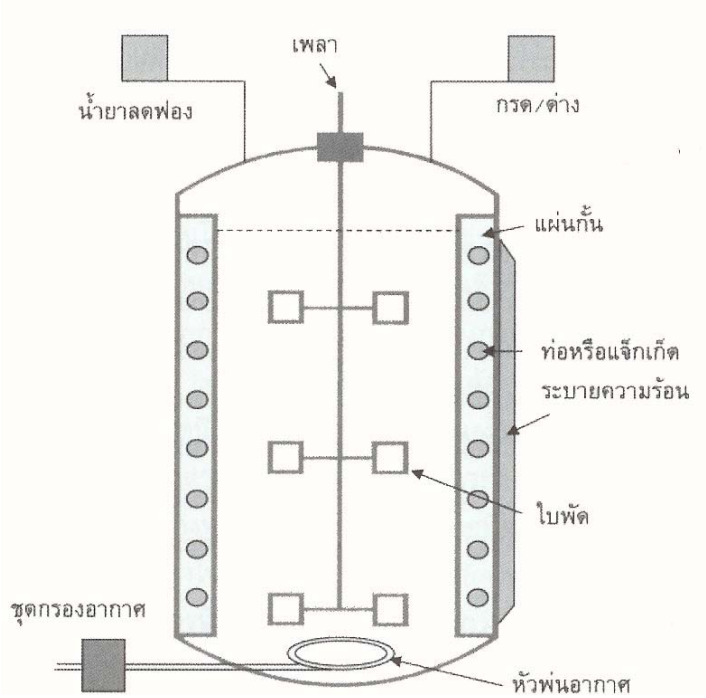
Dunyak and Cook (1985) ผลิตเซลล์ *C. utilis* ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องและแบบแบตช์เพื่อใช้เป็นแหล่งของเมไทโอนีน (methionine) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องผลิตเมไทโอนีนได้สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ 40-80 เปอร์เซ็นต์ และผลิตเมไทโอนีนได้ 3.7-4.5 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

3. <u>ถังหมักที่ใช้เพาะเลี้ยงยีสต์</u>

ถังหมัก (fermenter) เป็นถังที่ถูกออกแบบสำหรับการหมัก หรือเปลี่ยนแปลงโดยจุลินทรีย์ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงที่อาศัยกระบวนการของเอนไซม์ ภายในถังหมักจุลินทรีย์จะแขวนลอยอยู่ในสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการซึ่งละลายอยู่ในของเหลว (สาวิตรี, 2549) ในปัจจุบันถังหมักที่นิยมสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์คือ

3.1 ถังหมักแบบถังกวน (stirred tank fermenter)

เป็นถังที่ของเหลวภายในถังเคลื่อนไหวผสมกันโดยการกวนด้วยใบพัด (impeller) ที่ติดอยู่บนเพลาตรงกลางถัง จำนวนใบพัดขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของถัง ใบพัดอันล่างสุดอยู่เหนือก้นถังขึ้นมาประมาณ 1/3 ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของถัง ใบพัดแต่ละชุดมักห่างกันประมาณ 1/2 ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัดประมาณ 1/3 ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของถัง ใบกวน (stirrer) มีหลายแบบแบ่งได้คร่าวๆ เป็น 2 กลุ่ม คือ turbine impeller และ axial flow impeller ในส่วนของการให้อากาศวิธีที่ใช้มากคือ พ่นแก๊สผ่านตัวพ่น (sparger) เข้าไปที่ก้นถังบริเวณต่ำกว่าใบพัด ตัวพ่นอาจมีลักษณะขดเป็นวงแหวนหรือเป็นแผ่น หรืออาจเป็นท่อเดี่ยวๆ ที่มีรูเปิดเพียงรูเดียว ในส่วนของลักษณะของถัง ถังมีลักษณะเป็นทรงกระบวนโดยมีอัตราส่วนของความสูงต่อเส้นผ่านศูนย์กลางที่นิยมคือ 1:1, 1:2 หรือ 1:3 ภายในถังหมักติดตั้งแผ่นกั้น (baffle) ยื่นจากผนังตัวถังเข้าไปประมาณ 4 อัน แต่ละอันขนาดประมาณ 1/10 หรือ 1/12 ของเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวถังเพื่อป้องการเกิดกระแสของของเหลว (สาวิตรี, 2549)



ภาพที่ 4 ถังหมักแบบถังกวน

ที่มา: สาวิตรี (2549)

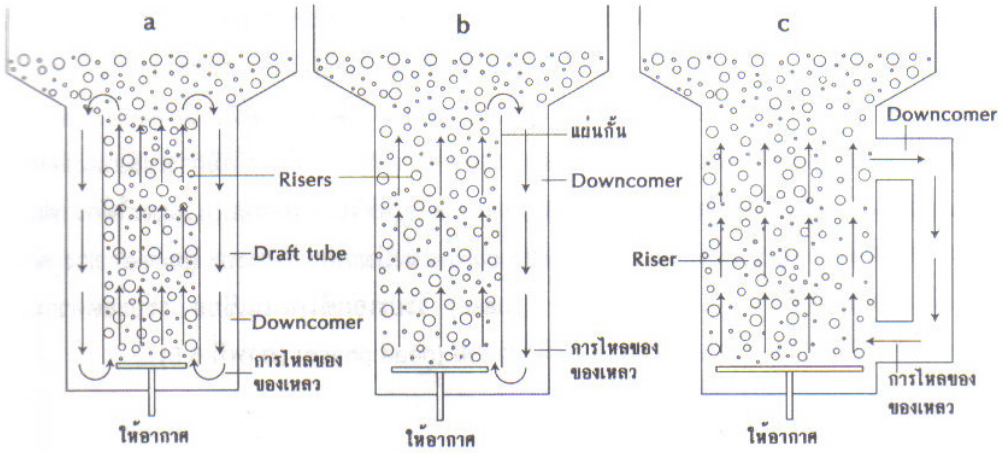
Goksungur *et al*. (2004) ผลิต Pullulan (α-D-glucan) ด้วย *Aureobasidium pullulans* P56 โดยการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ด้วยถังหมักแบบถังกวนด้วยอาหารเหลวกากน้ำตาล สามารถผลิตเซลล์ได้สูงสุด 9.4 กรัมต่อลิตร โดยผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 21.4 กรัมต่อลิตร โดยเป็น pullulan 16.7 กรัมต่อลิตร และพบว่าการมีความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารสูงการผลิต pullulan ลดลง

Bai *et al*. (2004) เพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* แบบต่อเนื่องในถังหมักแบบถังกวน เพื่อศึกษาจำนวนใบพัดต่อการผลิตเซลล์ พบว่าเมื่อมีจำนวนใบพัด 3 ชุด ผลิตเซลล์ได้ 30-40 กรัมเซลล์แห้งต่อลิตร แต่ 2 ชุด ผลิตได้เพียง 15-25 กรัมเซลล์แห้งต่อลิตร

3.2 ถังหมักแบบอากาศลอยตัว (air-lift fermenter)

เนื่องจากถังหมักแบบถังกวนไม่สามารถแยกความร้อนออกจนอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นจึงมีการออกแบบถังถังหมักแบบอากาศลอยตัวซึ่งสามารถถ่ายโอนมวลแก๊สและของเหลวได้ดีและใช้พลังงานน้อยกว่าถังหมักแบบถังกวน การกระจายแก๊สเข้าไปในของเหลวกระทำโดยการฉีดแก๊สเข้าไปจากบริเวณก้นถัง (สาวิตรี, 2549)

ถังหมักแบบอากาศลอยตัวแบ่งเป็น 2 บริเวณที่ติดกันคือ ส่วนที่มีการพ่นอากาศ (riser) และส่วนที่ไม่ได้รับแก๊ส (downcomer) โดยมี draught tube เป็นตัวแบ่งบริเวณทั้งสองออกจากกัน ในส่วน riser ความหนาแน่นทั้งหมดของการกระจายแก๊สและของเหลวมีแนวโน้มต่ำกว่าในส่วน downcomer ทำให้ของเหลวไหลขึ้นด้านบนไปพร้อมกับฟองแก๊สและไหลกลับสู่ด้านล่างผ่านส่วน downcomer สมรรถนะทั้งหมดของถังหมักแบบอากาศลอยตัวนี้ขึ้นอยู่กับอัตราการฉีดแก๊สและอัตราไหลเวียนของเหลวที่เกิดขึ้น โดยปกติอัตราการไหลเวียนของเหลวเพิ่มขึ้นเมื่อความสูงของถังเพิ่มขึ้นนอกจากนั้นถังยังถูกออกแบบให้มีอัตราส่วนของถังที่สูง เพราะการไหลเวียนของเหลวถูกขับเคลื่อนด้วยความแตกต่างของแก๊สที่มีอยู่ไหล riser และ downcomer การไหลเวียนเพิ่มขึ้นถ้าไม่มีแก๊สใน downcomer หรือมีเพียงเล็กน้อย แก๊สทั้งหมดใน downcomer มาจากส่วนที่อยู่ในของเหลวที่เคลื่อนที่เข้ามาใน downcomer จากบริเวณ riser ใกล้ส่วนบนของถังหมักบางครั้งใช้เครื่องแยกแก๊สและของเหลวออกจากกันในบริเวณ head zone เพื่อลดหรือขจัดแก๊สที่เข้ามาใน downcomer (สาวิตรี, 2549)



ภาพที่ 5 ถังหมักแบบอากาศลอยตัว

ที่มา: สาวิตรี (2549)

ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาดของฟองอากาศที่เกิดขึ้น หากมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมาก (มีอากาศเข้าไปอยู่ในฟองมาก) ทำให้ก๊าซเกิดการเคลื่อนที่ขึ้นไปสู่ด้านบนได้เร็ว ดังนั้นอากาศจะละลายอยู่ในของเหลวได้น้อย สำหรับการหมุนเวียนของของเหลวในถังที่ลดลงจะทำให้การส่งผ่านออกซิเจนมากขึ้น เพราะออกซิเจนไม่ถูกแรงส่งให้เคลื่อนที่ไปเฉพาะสู่ด้านบนของถัง แต่มีเวลาที่จะสามารถส่งผ่านไปในทิศทางต่างๆ ได้มากขึ้น นอกจากนี้หากการกระจายตัวของของเหลวมีน้อย จะทำให้ถูกแรงส่งขึ้นไปด้านบนของถังได้มากขึ้น เพราะไม่มีแรงต้านไปในทิศทางอื่นจึงถูกส่งขึ้นไปโดยง่าย (Ratledge and Kristiansen, 2001)

ข้อดีของถังหมักแบบอากาศลอยตัว คือ สามารถผลิตมวลเซลล์ได้ในปริมาณสูง สามารถควบคุมความเข้มข้นและชนิดของสับสเตรตได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถป้องกันการเกิดการกดดันแคแทบอไลต์ (catabolite repression) เพราะสามารถควบคุมความเข้มข้นของสับสเตรตได้ ตัวเครื่องไม่มีการติดตั้งแกนใบพัดจึงลดการมีรอยต่อซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่นและทำให้มีแรงเฉือนในระหว่างการหมักจึงเหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชหรือสัตว์ ในถังที่มีขนาดใหญ่มากจะเกิดความดันบริเวณด้านล่างของถังซึ่งช่วยให้ออกซิเจนละลายได้ดียิ่งขึ้น สำหรับข้อเสียของถังหมักแบบอากาศลอยตัว คือ ค่าใช้จ่ายของหัวพ่นอากาศความดันสูง โดยเฉพาะในถัง

หมักที่มีขนาดใหญ่จะสิ้นเปลืองพลังงานในการพ่นอากาศมากและต้องการผู้มีความชำนาญในการควบคุมการหมัก (สาโรจน์ และคณะ, 2544)

Koutinas *et al*. (2005) ทำการผลิต SCP ด้วย kefir-Yeast ใน air-lift fermenter โดยพัฒนาจากขยายขนาดจาก 3 ลิตร เป็น 100 ลิตร และขยายจนมีปริมาตรบรรจุ 3000 ลิตร พบว่าในถังหมักขนาด 3000 ลิตร การผลิตยังคงใกล้เคียงกับที่ได้จากถังหมักขนาด 100 ลิตร โดยยีสต์ใช้ แลกโทสได้ถึง 97 เปอร์เซ็นต์ และผลิตเซลล์ได้ถึง 34 กรัมต่อลิตร

Klein *et al*. (2002) ศึกษาลักษณะของถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 60 ลิตร ต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าการกระจายของของแข็งในอาหารดีที่สุดเมื่ออัตราส่วนพื้นที่หน้าตัดของ downcomer ต่อ riser (A_D/A_R) มีค่า 1.2 และยังพบว่าหาก draught tube มีความสูงมากขึ้น การกระจายตัวของแก๊สในส่วน downcomer จะมากขึ้นด้วย

ถังหมักแบบอากาศลอยตัวแบบ external loop สามารถใช้ผลิตเซลล์ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* เพื่อสกัดโปรตีนจากเซลล์เชื้อราโดยสามารถผลิตเซลล์ได้ 0.85-0.92 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตรต่อชั่วโมง ซึ่งเซลล์ที่ผลิตได้มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 46–50 เปอร์เซ็นต์ การผลิตมวลเซลล์ให้ได้มากและเร็วนั้นยังขึ้นอยู่กับการละลายของออกซิเจนและค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนอีกด้วย ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวแบบ external loop ที่ติดตั้งระบบให้อากาศ 2 ตัวซึ่งสามารถให้อากาศจนมีค่าละลายของออกซิเจนและค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์สามารถเร่งการผลิตมวลเซลล์ให้ได้มากและเร็วขึ้น (Jin *et al*., 2001)

4. <u>การผลิตบีตา-กลูแคน</u>

บีตา-กลูแคนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในผนังเซลล์ของยีสต์ เกิดการสร้างเมื่อเซลล์มีการแตกหน่อและสร้างผนังเซลล์ของเซลล์ลูก ดังนั้นการผลิตบีตา-กลูแคนจึงสามารถกระทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เซลล์มีมวลเซลล์มากเพราะปริมาณบีตา-กลูแคนแปรผันโดยตรงต่อมวลเซลล์ ปัจจุบันมีเทคนิคต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแบตช์ การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเฟด-แบตช์ หรือการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบต่อเนื่องซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้มวลเซลล์ปริมาณ

สูงเทคนิคเหล่านี้หากประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ย่อมสามารถช่วยเพิ่มมวลเซลล์ของยีสต์และส่งผลให้ได้ปริมาณบีตา-กลูแคนที่สูงขึ้นเป็นผลพลอยได้

Kim *et al*. (2006) ผลิตบีตา-กลูแคนที่ละลายในน้ำด้วยการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* KCTC 7913 แบบต่อเนื่องในอาหารสังเคราะห์ พบว่าปริมาณบีตา-กลูแคนที่ละลายในน้ำที่ผนังเซลล์สูงขึ้นเมื่อใช้อัตราการเจือจางต่ำ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์เซลล์มีปริมาณบีตา-กลูแคนที่ละลายในน้ำที่ผนังเซลล์ 0.13 กรัมบีตา-กลูแคนต่อน้ำหนักแห้ง และมีอัตราการผลิต 0.095 กรัมบีตา-กลูแคนต่อลิตรต่อชั่วโมง

Selbmann (2004) เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Botryosphaeria rhodina* ในถังหมักแบบกวนและแบบแบบอากาศลอยตัวพบว่าถังหมักแบบกวนไม่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนเพราะมีอัตราการผลิตเพียง 0.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ค่าผลผลิตทางทฤษฎีเท่ากับ 0.48 กรัมต่อกรัมของกลูโคส ในขณะที่ในถังหมักแบบแบบอากาศลอยตัวมีอัตราการผลิต 1.17 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ค่าผลผลิตทางทฤษฎีเท่ากับ 0.62 กรัมต่อกรัมของกลูโคส

Wang *et al*. (2003) ศึกษาการผลิตกลูแคนจาก *S. cerevisiae* FL1 โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายตัวเองของเซลล์แล้วจึงสกัดกลูแคนด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเองได้โดยการเติม 1.5 เปอร์เซ็นต์เอธิลแอซีเตตร่วมกับการปรับ pH เป็น 5.5 อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เมื่อผ่านไป 36 ชั่วโมงของเกิดการย่อยสลายตัวเอง สารภายในเซลล์ถูกปลดปล่อยออกมา 42 เปอร์เซ็นต์และสามารถสกัดกลูแคนได้ 22.9 เปอร์เซ็นต์

Flieger *et al*. (2003) ทำการเพาะเลี้ยง *Claviceps viridis* CBS 125.63 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ซึ่งมีกลูแคนเป็นองค์ประกอบประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ในถังหมักแบบกวนปริมาตร 5 ลิตรเป็นเวลา 7 วันโดยไม่มีการควบคุม pH สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ได้ 1.9 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน โดยพบว่าในวันที่ 3 ของการหมักจะมีกิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสสูงและผลิตมวลเซลล์ได้สูงที่สุด (10-14 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร)

Freimund *et al*. (2003) ศึกษาวิธีการใหม่เพื่อผลิตบีตา-กลูแคนจาก *S. cerevisiae* โดยใช้การสกัดบีตา-กลูแคนจากผนังเซลล์ด้วยน้ำร้อน 125 องศาเซลเซียส ตามด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส และแยกบีตา-กลูแคนด้วยอะซีโตน (acetone) นำส่วนที่แยกได้มาทำเป็นผง พบว่าจากการ

ใช้ ผนังเซลล์ยีสต์ 150 กิโลกรัม สามารถผลิตบีตา-กลูแคนได้ถึง 87 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบีตา-กลูแคนที่ได้มีความบริสุทธิ์ถึง 92 เปอร์เซ็นต์

Khunrae (2001) ทำการสกัดกลูแคนจากยีสต์ใช้แล้วในอุตสาหกรรมผลิตเบียร์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล พบว่าสามารถสกัดกลูแคนที่มีความบริสุทธิ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เมื่อคำนวณเป็นค่าการผลิตกลูแคนผงจากยีสต์ใช้แล้วในอุตสาหกรรมผลิตเบียร์พบว่ามีต้นทุนการผลิต 161.3 บาทต่อ 1 กิโลกรัมของกลูแคนผง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 10 สายพันธุ์ ได้แก่ AM12, F65UV89, M30 (สายพันธุ์ที่สามารถหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส), MRF44, MR195, MRF65, RL6, Sc90 (สายพันธุ์ที่ใช้ในโรงงานหมักสุราทั่วไป), TJ1 (สายพันธุ์ที่หมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูง) และ TJ3 ซึ่งเก็บรักษาที่ภาควิชาจุลชีววิทยา โดย รศ.ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง

2. การคัดเลือก *Saccharomyces serevisiae* สายพันธุ์ที่มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูง และชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคน

นำยีสต์ทั้ง 10 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast peptone dextrose (YPD) และอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH อาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น (optical density) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบหมุนความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที (Bio-shaker, BR-300LF, Taitec) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างเซลล์มาสกัดบีตา-กลูแคนตามวิธีของ Dallies *et al.* (1998) วิเคราะห์ปริมาณบีตา-กลูแคนในรูปของกลูโคส เปรียบเทียบปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์จากแต่ละสายพันธุ์ และเปรียบเทียบผลของชนิดอาหารต่อการผลิตบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ปริมาณสูงและชนิดของอาหารที่เหมาะสมเพื่อทำการศึกษาต่อไป

3. การศึกษา pH และองค์ประกอบของอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* TJ3 โดยการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

นำยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2. มาศึกษา pH และองค์ประกอบของอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคน โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่คัดเลือกได้จากข้อ 2. ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของ

เซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที (Bio-shaker, BR-300LF, Taitec) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณบีตา-กลูแคนและน้ำหนักเซลล์แห้งทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.1 pH ของอาหาร

นำ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ปรับ pH เป็น 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 และไม่ปรับ pH (pH 5.3) มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือก pH ของอาหารที่ทำให้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหาร

นำ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ปรับความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเป็น 1, 2, 3 , 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH ตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 คัดเลือกความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารที่ทำให้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.3 ชนิดและความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหาร

นำ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ปรับปริมาณไนโตรเจนในอาหารโดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05, 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ หรือเติมยูเรีย 0.03, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH ตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 คัดเลือกชนิดและปริมาณไนโตรเจนที่ทำให้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.4 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในอาหาร

นำ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 เติมแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 โพแทสเซียมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ปรับ pH ตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 คัดเลือกปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ทำให้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4. <u>การศึกษาความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคน</u>

นำ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 เติมแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 และปรับ pH ตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5, 1, 1.5 และ 2 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณบีตา-กลูแคนและน้ำหนักเซลล์แห้งทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ทำให้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

5. <u>การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคน</u>

นำ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 เติมแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 และปรับ pH ตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 4. บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ปรับอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเป็น 28, 30, 33 และ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณบีตา-กลูแคนและน้ำหนัก

เซลล์แห้งทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ทำให้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

6. <u>การคัดเลือกชนิดของถังหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ โดยการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์</u>

6.1 ถังหมักแบบถังกวน

เพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ แบบแบตช์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตร โดยอาหารเหลวกากน้ำตาลมีองค์ประกอบ และ pH ตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3. ใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่คัดเลือกได้จากข้อ 4. และอุณหภูมิที่คัดเลือกได้จากข้อ 5. โดยใช้ถังหมักแบบถังกวนซึ่งถังมีลักษณะดังนี้ สูง 30 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 14.5 เซนติเมตร หัวจ่ายอากาศสูงจากก้นถัง 3.5 เซนติเมตร ใบพัดชุดที่ 1 สูงจากก้นถัง 6 เซนติเมตร ใบพัดชุดที่ 2 สูงจากก้นถัง 7.5 เซนติเมตร ใบพัดชุดที่ 3 สูงจากก้นถัง 9 เซนติเมตร ในการเพาะเลี้ยงใช้อัตราการให้อากาศ 1vvm อัตราการกวน 100 และ 400 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณบีตา-กลูแคนและน้ำหนักเซลล์แห้ง อาหารเหลวเพื่อวิเคราะห์น้ำตาล pH และเอทานอลทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 8 ชั่วโมงจนถึง 72 ชั่วโมง

6.2 ถังหมักแบบอากาศลอยตัว

เพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ แบบแบตช์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตร โดยอาหารเหลวกากน้ำตาลมีองค์ประกอบ และ pH ตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3. ใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่คัดเลือกได้จากข้อ 4. และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25 ถึง 30 องศาเซลเซียส) โดยใช้ถังหมักแบบอากาศลอยตัวซึ่งถังมีลักษณะดังนี้ สูง 28 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 16.5 เซนติเมตร ติดตั้งหัวจ่ายอากาศสูงจากก้นถัง 2 เซนติเมตร ภายในถังติดตั้ง draught tube สูง 9 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 8.3 เซนติเมตร สูงจากก้นถัง 2 เซนติเมตร ในการเพาะเลี้ยงใช้อัตราการให้อากาศ 1, 2 และ 3 vvm เก็บ ตัวอย่างเซลล์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณบีตา-กลูแคนและน้ำหนักเซลล์แห้ง อาหารเหลวเพื่อวิเคราะห์น้ำตาล pH และเอทานอลทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 8 ชั่วโมงจนถึง 72 ชั่วโมง

เปรียบเทียบการผลิตบีตา-กลูแคนเมื่อใช้ถังหมักแบบถังกวนกับแบบอากาศลอยตัว ดังรายละเอียดข้างต้น เลือกชนิดของถังหมักและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่ทำให้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

7. <u>การศึกษาลักษณะของถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ โดยการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์</u>

สัญลักษณ์ที่ใช้ในการพัฒนาถังหมักมีดังนี้

H_b คือ ระยะระหว่าง draught tube กับพื้นถังหมัก

H_{dt} คือ ความสูงของ draught tube

H_m คือ ความสูงของอาหาร

D_{dt} คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของ draught tube

D_t คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของถังหมัก

7.1 อัตราส่วนระหว่างระยะระหว่าง draught tube กับพื้นถังหมักแบบอากาศลอยตัวกับเส้นผ่านศูนย์กลางของ draught tube (H_b/D_t)

ทำการปรับถังหมักแบบอากาศลอยตัวโดยกำหนดให้เส้นผ่านศูนย์กลางของ draught tube เท่ากับ 8 เซนติเมตร ปรับให้มีค่า H_b/D_t เท่ากับ 8, 4, 2.7 และ 2 แล้วนำมาเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ โดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตร โดยอาหารเหลวกากน้ำตาลมีองค์ประกอบ และ pH ตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3. ใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่คัดเลือกได้จากข้อ 4. และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25 ถึง 30 องศาเซลเซียส) ในการเพาะเลี้ยงใช้อัตราการให้อากาศที่คัดเลือกได้จากข้อ 6.2 เก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณบีตา-กลูแคนและน้ำหนักเซลล์แห้ง อาหารเหลวเพื่อวิเคราะห์น้ำตาล pH และเอทานอลทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 8 ชั่วโมงจนถึง 72 ชั่วโมง คัดเลือกระยะระหว่าง draught tube กับพื้นถังหมักที่ทำให้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

7.2 อัตราส่วนระหว่างความสูงของ draught tube กับ ความสูงของอาหาร (H_{dt}/H_m)

ทำการปรับถังหมักแบบอากาศลอยตัวให้มี H_{dt}/H_m เท่ากับ 2, 1.75, 1.6 และ 1.4 แล้วนำมาเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ โดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตร โดยอาหารเหลวกากน้ำตาลมีองค์ประกอบ และ pH ตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3. ใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่คัดเลือกได้จากข้อ 4. และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25 ถึง 30 องศาเซลเซียส) ในการเพาะเลี้ยงใช้อัตราการให้อากาศที่คัดเลือกได้จากข้อ 6.2 เก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณบีตา-กลูแคนและน้ำหนักเซลล์แห้ง อาหารเหลวเพื่อวิเคราะห์น้ำตาล pH และเอทานอลทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 8 ชั่วโมงจนถึง 72 ชั่วโมง คัดเลือกความสูงของ draught tube ที่ทำให้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

7.3 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ draught tube กับเส้นผ่านศูนย์กลางของถังหมัก (D_{dt}/D_t)

ทำการปรับถังหมักแบบอากาศลอยตัวให้มี D_{dt}/D_t เท่ากับ 2.75, 2.1 และ 1.65 แล้วนำมาเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ โดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตร โดยอาหารเหลวกากน้ำตาลมีองค์ประกอบ และ pH ตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3. ใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่คัดเลือกได้จากข้อ 4. และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25 ถึง 30 องศาเซลเซียส) ในการเพาะเลี้ยงใช้อัตราการให้อากาศที่คัดเลือกได้จากข้อ 6.2 เก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณบีตา-กลูแคนและน้ำหนักเซลล์แห้ง อาหารเหลวเพื่อวิเคราะห์น้ำตาล pH และเอทานอลทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 8 ชั่วโมงจนถึง 72 ชั่วโมง คัดเลือกเส้นผ่านศูนย์กลางของ draught tube ที่ทำให้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

8. <u>การผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้โดยใช้ถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 150 ลิตร และการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ และแบบเฟดแบตช์</u>

ทำการขยายขนาดถังหมักแบบอากาศลอยตัวให้ถังมีสัดส่วนใกล้เคียงกับถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่คัดเลือกได้จากข้อ 7. โดยขยายขนาดของถังให้สามารถบรรจุอาหารเหลวขนาด 150

ลิตร ดังนี้สูง 140 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 40 เซนติเมตร ภายในติดตั้ง draught tube สูง 45 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร สูงจากก้นถัง 12 เซนติเมตร มีบริเวณที่เซลล์ได้รับอากาศ 5660 ลูกบาศก์เซนติเมตร ติดตั้งหัวจ่ายอากาศที่ก้นถัง ในการเพาะเลี้ยงใช้อัตราการให้อากาศ 1 vvm

8.1 การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

เพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้โดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 100 ลิตร โดยอาหารเหลวกากน้ำตาลมีองค์ประกอบ และ pH ตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3. ใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่คัดเลือกได้จากข้อ 4. และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณบีตา-กลูแคนและน้ำหนักเซลล์แห้ง อาหารเหลวเพื่อวิเคราะห์น้ำตาล pH และเอทานอลทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์

8.2 การเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์

เพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้แบบเฟดแบตช์โดยกำหนดให้อาหารมีน้ำตาลที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง 5 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) โดยแบ่งอาหารเป็น 2 ชุด คือ อาหารเหลวเริ่มต้นปริมาตร 80 ลิตร ที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ pH และองค์ประกอบของอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 3. (คำนวณจากปริมาตร 80 ลิตร) และอาหารเหลวที่ใช้เติมปริมาตร 20 ลิตร ซึ่งมีน้ำตาล 17 เปอร์เซ็นต์ หรือมีน้ำตาล 170 กรัมต่อลิตร pH และองค์ประกอบของอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 3. (คำนวณจากปริมาตร 20 ลิตร)

การเติมอาหารเติมครั้งแรกในชั่วโมงที่ 8 และครั้งต่อๆ ไปเติมในชั่วโมงที่ 16, 24 และ 32 ตามลำดับ เก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณบีตา-กลูแคนและน้ำหนักเซลล์แห้ง อาหารเหลวเพื่อวิเคราะห์น้ำตาล pH และเอทานอลทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รูปแบบการเติมอาหารคำนวณตามวิธีของ Lee and Kim (2001) และ Hoek *et al.* (1999) ดังนี้

8.2.1 การเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ linear incremental feeding

แบ่งอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ใช้เติม 20 ลิตร แบ่งเติมครั้งละ 5 ลิตร ครั้งแรกในชั่วโมงที่ 8 และครั้งต่อๆ ไปเติมในชั่วโมงที่ 16, 24 และ 32 ตามลำดับ

8.2.2 การเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ exponential incremental feeding

แบ่งอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ใช้เติม 20 ลิตร เติมครั้งแรกในชั่วโมงที่ 8 และครั้งต่อๆ ไปเติมในชั่วโมงที่ 16, 24 และ 32 ตามลำดับ โดยปริมาตรที่ใช้เติมแต่ละครั้งคำนวณจากสมการ

$$V_F = \frac{e^{\mu_{max} t}}{\sum e^{\mu_{max} t}} \times V_t$$

8.2.3 การเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ sigmoidal incremental feeding

แบ่งอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ใช้เติม 20 ลิตร เติมครั้งแรกในชั่วโมงที่ 8 และครั้งต่อๆ ไปเติมในชั่วโมงที่ 16, 24 และ 32 ตามลำดับ โดยปริมาตรที่ใช้เติมแต่ละครั้งคำนวณจากสมการ

$$V_F = \frac{\mu_{max}}{Y_{x/s} \times S_F} \times (XV_a) e^{\mu t}$$

โดยที่ V_F = ปริมาตรอาหารที่เติม (ลิตร)

μ_{max} = อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (ต่อชั่วโมง)

$Y_{x/s}$ = ผลผลิตเซลล์จากสับสเตรต (กรัมต่อกรัมสับสเตรต)

S_F = ความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารที่เติม (กรัมต่อลิตร)

X	=	น้ำหนักเซลล์แห้ง ณ เวลาที่เติมอาหาร (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร)
V_a	=	ปริมาตรอาหารสะสม ณ เวลาที่เติมอาหาร (ลิตร)
μ	=	อัตราการเจริญจำเพาะ ณ เวลาที่เติมอาหาร (ต่อนาที)
t	=	ระยะเวลาที่เติมอาหาร (ชั่วโมง)
V_t	=	ปริมาตรอาหารทั้งหมดที่ใช้เติม (ลิตร)

ผลและวิจารณ์

1. <u>การคัดเลือก *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูง และชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคน</u>

นำเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ AM12, F65UV89, M30, MRF44, MR195, MRF65, RL6, Sc90, TJ1 และ TJ3 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชนิดคือ อาหารเหลว yeast peptone dextrose (YPD) และอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ในอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

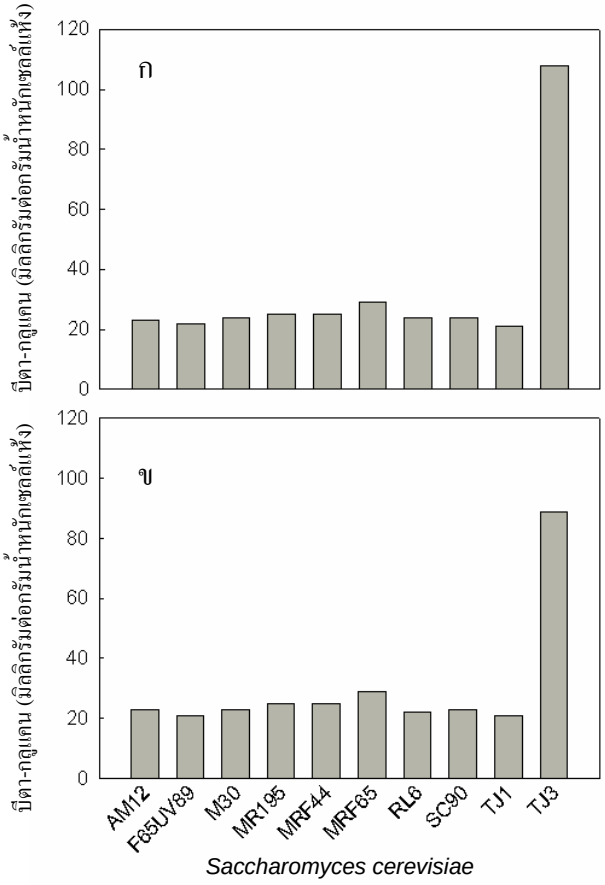
จากการทดลองเพาะเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 10 สายพันธุ์ในอาหาร YPD พบว่ายีสต์ที่มีปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ ซึ่งวัดในรูปของกลูโคสเรียงลำดับจากปริมาณที่มากสุดไปหาน้อยที่ที่สุดเป็นดังนี้ *S. cerevisiae* TJ3 มีบีตา-กลูแคนเท่ากับ 108.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง สายพันธุ์ MRF65 มีบีตา-กลูแคนเท่ากับ 29.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง สายพันธุ์ MR195 กับ สายพันธุ์ MRF44 มีบีตา-กลูแคนเท่ากันคือ 25.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนสายพันธุ์ M30, RL6 และ สายพันธุ์ Sc90 มีบีตา-กลูแคนเท่ากันคือ 24.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง สายพันธุ์ AM12 มีบีตา-กลูแคนเท่ากับ 23.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง สายพันธุ์ F65UV89 มีบีตา-กลูแคนเท่ากับ 22.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และ สายพันธุ์ TJ1 มีบีตา-กลูแคนเท่ากับ 21.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 6 ก)

สำหรับผลการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 10 สายพันธุ์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) พบว่ายีสต์สายพันธุ์ที่มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงที่สุดและสูงกว่าสายพันธ์อื่นมากคือ *S. cerevisiae* TJ3 ซึ่งมีบีตา-กลูแคนเท่ากับ 89.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่สายพันธุ์อื่นมีบีตา-กลูแคนรองลงไป และเรียงลำดับจากมากไปน้อยสุดเป็นดังนี้ สายพันธุ์ MRF65,

MRF44, AM12, M30, Sc90, RL6, F65UV89 และ TJ1 มีบีตา-กลูแคนเท่ากับ 29.2, 25.5, 25.3, 23.2, 23.2, 23.5, 22.6, 21.2 และ 21.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 6 ข)

จากการจากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ทั้ง 10 สายพันธุ์ในอาหาร YPD พบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงที่สุดคือ *S. cerevisiae* TJ3 ที่มีบีตา-กลูแคนซึ่งวัดในรูปของกลูโคสเท่ากับ 108.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* ทั้ง 10 สายพันธุ์ในอาหารเหลวกากน้ำตาล ยังคงพบว่า *S. cerevisiae* TJ3 มีบีตา-กลูแคนสูงกว่าสายพันธุ์อื่นคือ 89.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการใช้อาหารสองชนิดต่อปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* ทั้ง 10 สายพันธุ์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันนัก

แม้ว่าการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลว YPD ให้บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาล แต่อาหารเหลว YPD เป็นอาหารสังเคราะห์ซึ่งมีราคาสูงกว่าอาหารเหลวกากน้ำตาล นอกจากนั้นเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลมีบีตา-กลูแคนเท่ากับ 82 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ซึ่งเป็นค่าที่ต่างกันไม่มากนัก ดังนั้นจึงเลือกอาหารเหลวกากน้ำตาลสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* TJ3 เพื่อการผลิตบีตา-กลูแคนในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 6 ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ในรูปกลูโคสของ *S. cerevisiae* ทั้ง 10 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยง ในอาหารเหลว YPD (ก) และอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ (ข) ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตรเป็น 0.5 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. <u>การศึกษา pH และองค์ประกอบของอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* TJ3 โดยการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์</u>

นำยีสต์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่แล้วคือ *S. cerevisiae* TJ3 มาศึกษา pH และองค์ประกอบของอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคน โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

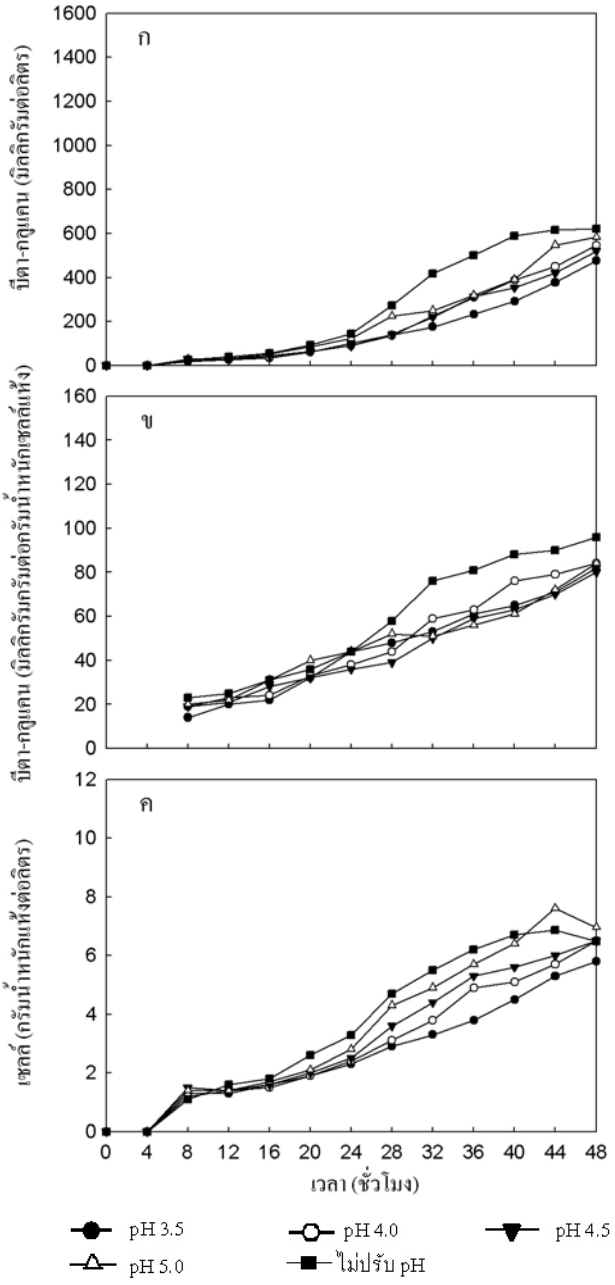
2.1 pH ของอาหาร

ศึกษาผลของ pH ต่อการผลิตบีตา-กลูแคน โดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โดยปรับ pH ของอาหารเป็น 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 และไม่ปรับ pH (pH 5.3) ผลการทดลองแสดงว่าในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งเป็นเวลาที่หยุดการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 สามารถผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงที่สุดในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ส่วน pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีผลให้มีการผลิตบีตา-กลูแคนจากสูงไปหาต่ำคือ pH 5.0, 4.0, 4.5 และ 3.5 ซึ่งให้บีตา-กลูแคนเท่ากับ 622.2, 584.4, 546.3, 520.2 และ 475.7 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยพบว่าช่วง 24 ชั่วโมงแรกปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผลิตได้มีค่าใกล้เคียงกัน แต่หลังจากชั่วโมงที่ 24 อาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ให้บีตา-กลูแคนได้ในปริมาณที่สูงกว่าอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ปรับค่า pH เป็น pH 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 อย่างมาก (ภาพที่ 7 ก)

สำหรับปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* TJ3 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ปรับ pH เป็น pH 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 ใกล้เคียงกันตลอดเวลา 48 ชั่วโมง แต่อาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ใกล้เคียงกับที่ได้จากอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ปรับ pH เป็น pH 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นปริมาณบีตา-กลูแคนที่ได้จาก *S. cerevisiae* TJ3 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่ปรับ pH (pH 5.3) สูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มี pH 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 อย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 48 โดยชั่วโมงที่ 48 อาหารเหลวกากน้ำตาลที่ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) และที่ปรับ pH เป็น pH 4.0, pH 5.0, pH 3.5 และ pH 4.5 ให้บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 96.2, 84.3, 84.6, 82.5 และ 80.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ (ภาพที่ 7 ข)

จากการทดลองเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มี pH ต่างๆ กัน ในช่วง 16 แรก พบว่ามีการเจริญใกล้เคียงกันโดยในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีปรับ pH เป็น pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 และไม่ปรับ pH (pH 5.3) โดยเจริญให้เซลล์เท่ากับ 1.6, 1.5, 1.6, 1.7 และ 1.8 กรัมเซลล์แห้งต่อลิตร ตามลำดับ แต่หลังจากนั้นการเจริญค่อนข้างแตกต่างกัน โดยในชั่วโมงที่ 40 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ปรับ pH เป็น pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 และไม่ปรับ pH (pH 5.3) *S. cerevisiae* TJ3 เจริญให้เซลล์ 4.5, 5.1, 5.6, 6.4 และ 6.7 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนในชั่วโมงที่ 44 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มี pH 4.5 ได้เซลล์ 7.6 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร สูงกว่าอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่ปรับ pH ซึ่งให้เซลล์ 6.86 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร และในชั่วโมงที่ 48 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ปรับ pH เป็น pH 4.5 ให้เซลล์สูงที่สุดคือเท่ากับ 7.0 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 7 ค)

จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่ปรับ pH (pH 5.3) พบว่าสามารถผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงสุดเมื่อเทียบกับ pH 3.5 ถึง 5.0 ในการทดลองนี้ ดังนั้นจึงเลือกอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่ปรับ pH เพื่อการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 7 การผลิตบีตา-กลูแคน (ก) บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (ข) และน้ำหนักเซลล์แห้ง (ค) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลเป็น 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 และไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1.0 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหาร

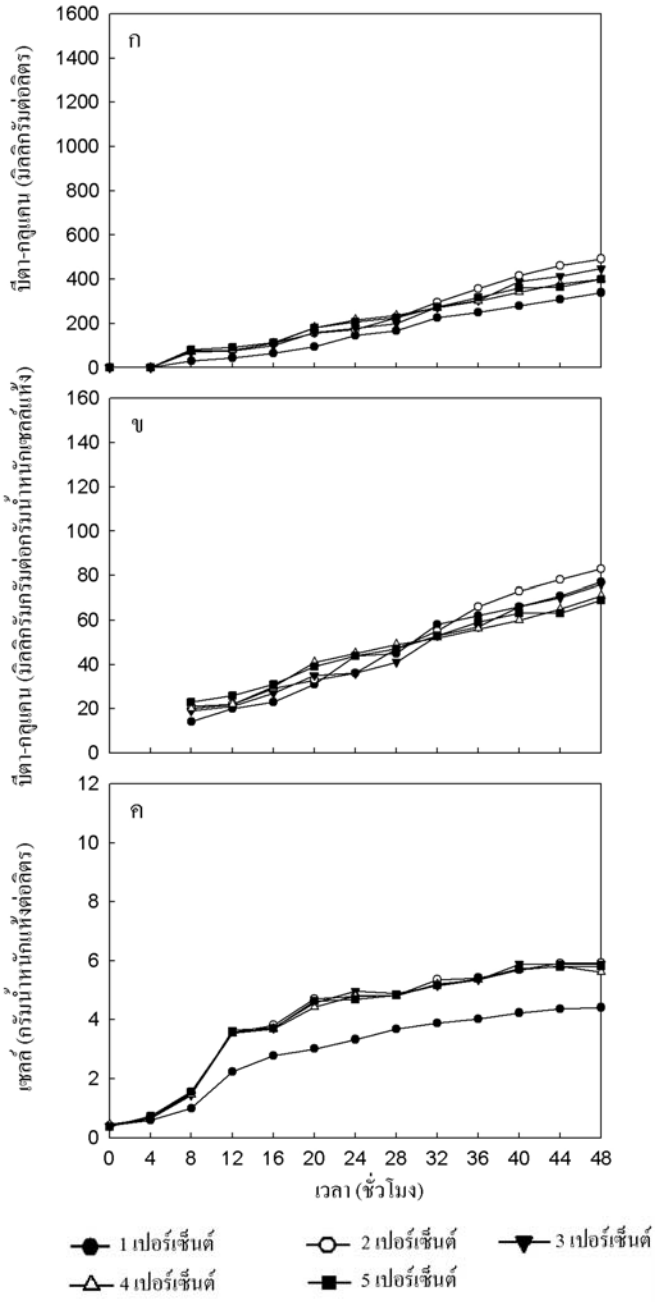
จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และไม่ปรับ pH (pH 5.3) พบว่าอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2, 3, 4 และ 4 เปอร์เซ็นต์นั้น ในช่วง 28 ชั่วโมงแรกให้บีตา-กลูแคนได้ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 32 พบว่าในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ให้บีตา-กลูแคนมากกว่าอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลความเข้มข้นอื่นๆ และในชั่วโมงที่ 48 ให้บีตา-กลูแคน 492.2 มิลลิกรัมต่อลิตรส่วนอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 48 ให้บีตา-กลูแคน 446.9, 399.0 และ 401.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ *S. cerevisiae* TJ3 ผลิตบีตา-กลูแคนทั้งหมดได้น้อยกว่าอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลอื่นๆ มาก โดยในชั่วโมงที่ 48 ให้บีตา-กลูแคนเพียง 339.57 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 8 ก)

เมื่อพิจารณาปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ พบว่าเป็นไปในทำนองเดียวกับปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผลิตได้ คือเมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 28 ชั่วโมงแรกเซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 32 พบว่าในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ เซลล์เริ่มผลิตบีตา-กลูแคนมากกว่าอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลอื่นๆ และในชั่วโมงที่ 48 เซลล์มีบีตา-กลูแคนสูงที่สุด 83.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วน *S. cerevisiae* TJ3 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 1, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 48 ให้บีตา-กลูแคนสูงสุด 77.4, 76.3, 71.1 และ 69.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ (ภาพที่ 8 ข)

สำหรับการเจริญพบว่าในชั่วโมงที่ 48 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ *S. cerevisiae* TJ3 สามารถเจริญให้เซลล์ได้ใกล้เคียงกันคือ 5.9, 5.9, 5.6 และ 5.8 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ *S. cerevisiae* TJ3 ให้เซลล์น้อยกว่ามากคือเพียง 4.4 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร (ภาพที่ 8 ค)

จากผลการทดลองแสดงว่าความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่สูงกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ อาจไม่ส่งผลต่อการเพิ่มการเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 และไม่ส่งเสริมการผลิต

บีตา-กลูแคน นอกจากนี้ Lee and Kim (2001) ทำการเพาะเลี้ยง *C. utilis* ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีกลูโคส 5, 10, 20, 50 และ 100 กรัมต่อลิตร พบว่าผลผลิตเซลล์จากสับสเตรทลดลงเมื่ออาหารเหลวกากน้ำตาลมีกลูโคสสูงขึ้น Thasaprapha (2004) ทำการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 2 ถึง 16 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ โดยมีผลผลิตเซลล์ต่อสับสเตรท 0.053, 0.052 และ 0.051 ตามลำดับ ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลอาจไม่ช่วยให้เซลล์เจริญมากขึ้นและสิ้นเปลืองต้นทุน จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถผลิตบีตา-กลูแคนสูงสุดโดยให้บีตา-กลูแคนต่อปริมาตรอาหารและบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์มากกว่าอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลความเข้มข้นอื่นๆ อยู่เล็กน้อย นอกจากนี้ยังมีการเจริญที่ไม่น้อยกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลความเข้มข้นอื่นๆ ดังนั้นจึงเลือกอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดลองต่อไป



ภาพที่ 8 การผลิตบีตา-กลูแคน (ก) บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (ข) และน้ำหนักเซลล์แห้ง (ค) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1.0 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.3 ชนิดและความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหาร

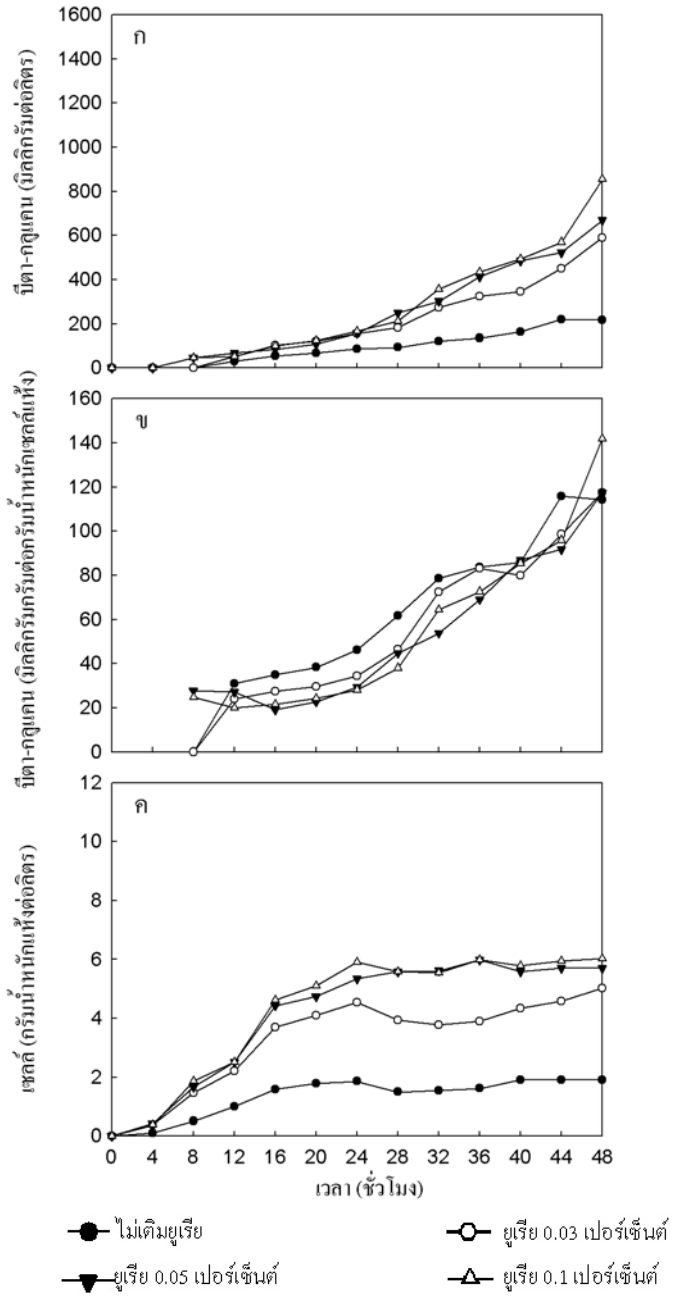
2.3.1 ยูเรีย

ทำการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ และเติมยูเรีย 0, 0.03, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) จากการทดลองพบว่าในช่วง 24 ชั่วโมงแรก การผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* TJ3 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรียความเข้มข้นต่างๆ กันใกล้เคียงกัน ยกเว้นในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่มีการเติมยูเรียซึ่งผลิตบีตา-กลูแคนน้อยกว่ามาก แต่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 28 เป็นต้นไป ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรีย 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ *S. cerevisiae* TJ3 ยังคงผลิตบีตา-กลูแคนใกล้เคียงกัน ในขณะที่ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรีย 0.03 เปอร์เซ็นต์ ให้บีตา-กลูแคนได้น้อยกว่า จนถึงชั่วโมงที่ 48 พบว่าปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผลิตได้เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรียความเข้มข้นต่างๆ แตกต่างกันมาก โดยในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรีย 0, 0.03, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ผลิตบีตา-กลูแคน 217.1, 588. 9, 668.9 และ 853.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งชัดเจนว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่มีการเติมยูเรีย *S. cerevisiae* TJ3 ให้บีตา-กลูแคนน้อยกว่ามาก (ภาพที่ 9 ก)

เมื่อพิจารณาปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ พบว่าในช่วงชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 32 เซลล์ของ *S. cerevisiae* TJ3 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมยูเรียให้บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรีย โดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรีย 0.03 เปอร์เซ็นต์มีบีตา-กลูแคนรองลงมา สำหรับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรีย 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ปริมาณใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรียทุกความเข้มข้น มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ปริมาณใกล้เคียงกัน โดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้บีตา-กลูแคนปริมาณสูงที่สุดคือ 141.8 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง สำหรับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรีย 0, 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีบีตา-กลูแคน 114.3, 117.3 และ 117.4 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (ภาพที่ 9 ข)

การเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรียความเข้มข้นต่างกันแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมยูเรียการเจริญต่ำกว่าอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรียอย่างมาก การเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรีย 0.1, 0.05 และ 0.03 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 48 ให้เซลล์ 6.0, 5.7 และ 5.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ส่วนในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมยูเรียเซลล์มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 40 แต่ให้เซลล์เพียง 1.9 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร (ภาพที่ 9 ค)

การเติมยูเรียลงในอาหารเหลวกากน้ำตาลสามารถเพิ่มการเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 สอดคล้องกับการทดลองผลิตเซลล์ *C. utilis* โดย Lee and Kim (2001) ซึ่งพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *C. utilis* ในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตรที่ไม่เติมยูเรีย สามารถผลิตเซลล์ได้เพียง 1.3 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเติมยูเรีย 0.1 และ 0.37 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเซลล์ได้เพิ่มขึ้นเป็น 2.34 และ 2.65 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 9 การผลิตบีตา-กลูแคน (ก) บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (ข) และน้ำหนักเซลล์แห้ง (ค) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0, 0.03, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1.0 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.3.2 แอมโมเนียมซัลเฟต

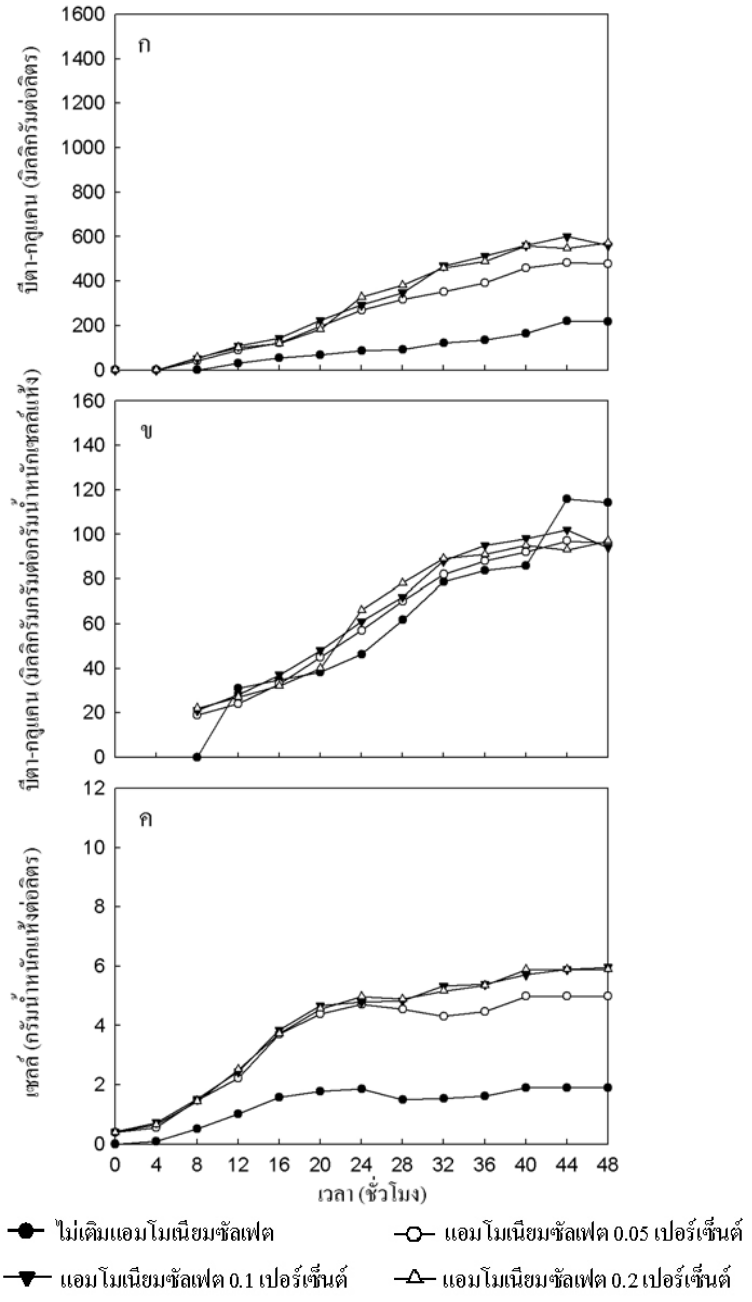
จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0, 0.05, 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) พบว่าในช่วง 24 ชั่วโมงแรกการ บีตา-กลูแคนที่ได้จากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ กันมีค่าใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 28 เป็นต้นไป การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ยังคงให้บีตา-กลูแคนใกล้เคียงกันและสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และในชั่วโมงที่ 48 บีตา-กลูแคนที่ผลิตได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05, 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 478.1, 560.2 และ 570.4 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ แต่ทั้งนี้บีตา-กลูแคนที่ผลิตได้มีค่าสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 44 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 600.8 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 10 ก)

เมื่อพิจารณาปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันตลอดทั้ง 48 ชั่วโมงที่ทำการทดลอง โดยในช่วงชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 40 ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์เรียงลำดับจากมากไปน้อยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1, 0.2 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 เซลล์ให้บีตา-กลูแคนกลับมามีปริมาณใกล้เคียงกัน คือในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05, 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ให้บีตา-กลูแคน 96.1, 94.3 และ 97.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ โดย เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงที่สุด 102.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 44 (ภาพที่ 10 ข)

การเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ กัน ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกเซลล์มีการเจริญใกล้เคียงกัน และต่างกันในช่วงหลังชั่วโมงที่ 24 โดยการเจริญในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ *S. cerevisiae* TJ3 มีการเจริญที่ใกล้เคียงกันมาก เป็นไปได้ว่าอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นความเข้มข้นที่เพียงพอต่อการเจริญสูงสุดของ *S. cerevisiae* TJ3 แล้ว ในชั่วโมงที่ 48 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ *S. cerevisiae* TJ3 มีการเจริญให้เซลล์ 6.0 และ 5.9 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร

ตามลำดับ ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญที่น้อยที่สุดและการเจริญคงที่ในชั่วโมงที่ 40 เป็นต้นไป โดยให้เซลล์ 5.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร สอดคล้องกับการทดลองของ Thasaprapha (2004) ซึ่งเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0 ถึง 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าได้เซลล์สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นสูงกว่านี้ก็ไม่สามารถให้เซลล์ได้สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 10 ค)

จากการทดลองใช้แหล่งไนโตรเจนสองชนิด คือยูเรีย และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน แสดงว่าการเติมยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงสุดเท่ากับ 853.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเจริญให้เซลล์ 6.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงสุด 600.8 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญให้เซลล์สูงที่สุด 6.0 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ในขณะที่เมื่อไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไปในอาหารเหลวกากน้ำตาล *S. cerevisiae* TJ3 ผลิตบีตา-กลูแคนได้เพียง 217.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญให้เซลล์สูงที่สุดเพียง 1.9 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ทั้งนี้น่าจะเกิดจากการที่ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่มีอยู่เดิมในอาหารเหลวกากน้ำตาลไม่เพียงพอต่อการเจริญ จึงส่งผลให้ *S. cerevisiae* TJ3 มีการเจริญน้อยและให้บีตา-กลูแคนน้อยตามไปด้วย จึงไม่เหมาะสมต่อการทดลองขั้นต่อไป เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแหล่งไนโตรเจน คือยูเรียและแอมโนเนียมซัลเฟต พบว่าการเติมยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้บีตา-กลูแคนสูงที่สุด นอกจากนี้ Ahsen Baig *et al*. (2003) พบว่ายูเรียสามารถส่งเสริมการสร้างฟรุคโตฟูราโนซิเดสใน *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลที่พบมากในกากน้ำตาลให้เป็นกลูโคสและฟรุคโทส และจากการทดลองของ Takeshige and Ouchi (1995) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ X2180-1B ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ไม่พบการทำงานของฟรุคโตฟูราโนซิเดส (Fructofuranosidase) และผลการทดลองแสดงว่าเมื่อถึงชั่วโมงที่ 60 น้ำตาลซูโครสในอาหารลดลงไม่มากนัก ในขณะที่กลูโคสและฟรุคโทสลดลงไปมาก ดังนั้นยูเรียอาจมีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลมากกว่าแอมโมเนียมซัลเฟตจึงเลือกยูเรียความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งและความเข้มข้นของไนโตรเจนสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป



ภาพที่ 10 การผลิตบีตา-กลูแคน (ก) บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (ข) และน้ำหนักเซลล์แห้ง (ค) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0, 0.05, 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1.0 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

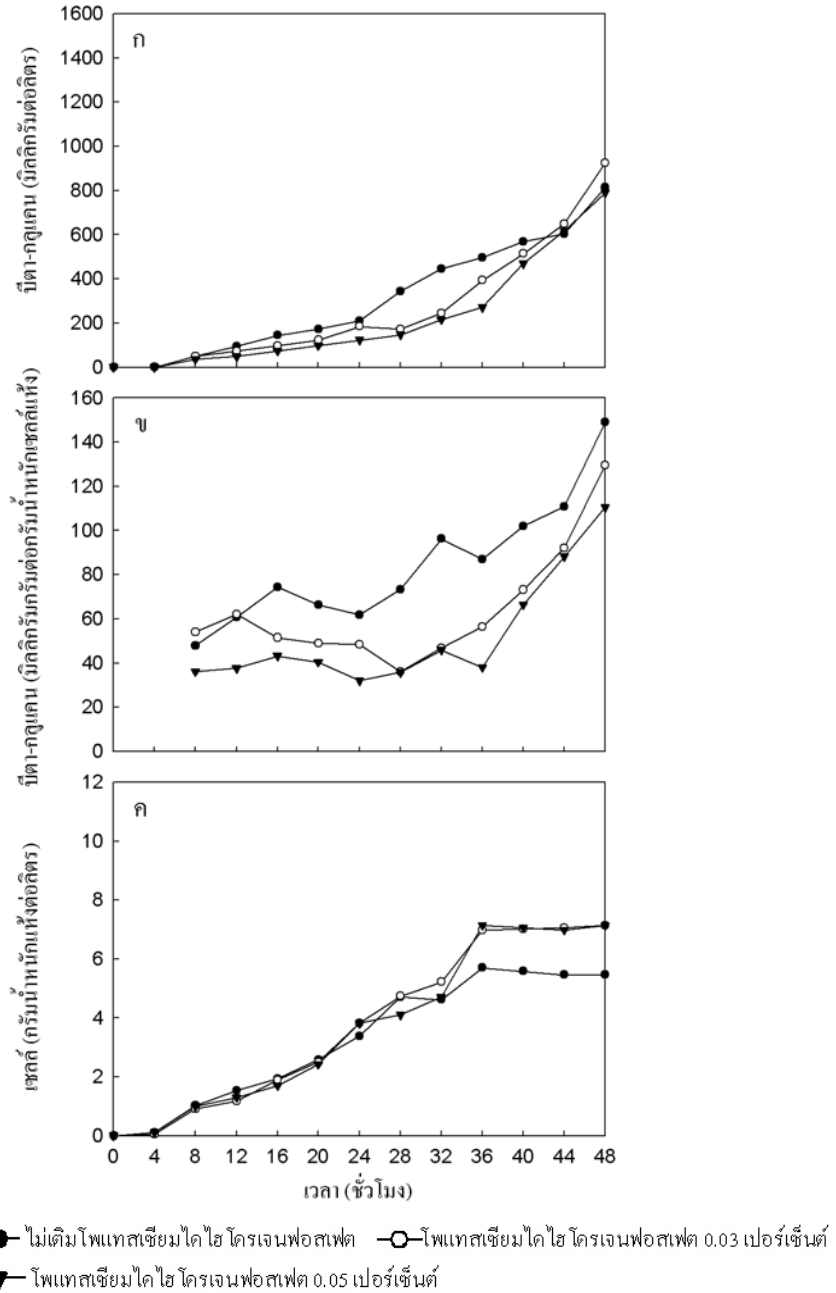
2.4 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในอาหารเหลวกากน้ำตาล

จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) และเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0, 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ พบว่าช่วงชั่วโมงที่ 8 ถึงชั่วโมงที่ 40 *S. cerevisiae* TJ3 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตผลิตบีตา-กลูแคนมากกว่าอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ให้บีตา-กลูแคน 924.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุดในการทดลองนี้ ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ผลิตบีตา-กลูแคนได้ 813.3 และ 788.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 11 ก)

ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* TJ3 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมและเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นต่างกัน พบว่าสูงที่สุดเมื่อไม่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยมีค่าสูงกว่าในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 จนถึงชั่วโมงที่ 48 ในขณะที่อาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 48 มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ 149.0, 129.5 และ 110.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (ภาพที่ 11 ข)

การเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นต่างกันมีการเจริญที่ไม่แตกต่างกันนักในช่วง 32 ชั่วโมงแรกโดยมีการเจริญสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 36 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตการเจริญของเชื้อเริ่มคงที่ และมีค่าสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 36 คือ 5.7 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในขณะที่อาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ *S. cerevisiae* TJ3 มีการเจริญที่ใกล้เคียงกันไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 โดยในชั่วโมงที่ 48 ให้เซลล์สูงที่สุดเท่ากันคือ 7.1 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร (ภาพที่ 11 ค)

แม้ว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ในช่วงชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 36 *S. cerevisiae* TJ3 มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผลิตได้ก็มีปริมาณสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แต่ทั้งนี้เมื่อถึงชั่วโมงที่ 36 เป็นต้นไป *S. cerevisiae* TJ3 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมีการเจริญคงที่ ในขณะที่เมื่อใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตยังมีการเจริญสูงขึ้นไปอย่างต่อเนื่อง และมีปริมาณบีตา-กลูแคนสูงขึ้นตามไปด้วย ทำให้ได้บีตา-กลูแคนสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ 924.44 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป



ภาพที่ 11 การผลิตบีตา-กลูแคน (ก) บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (ข) และน้ำหนักเซลล์แห้ง (ค) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0, 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1.0 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3. <u>การศึกษาความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคน</u>

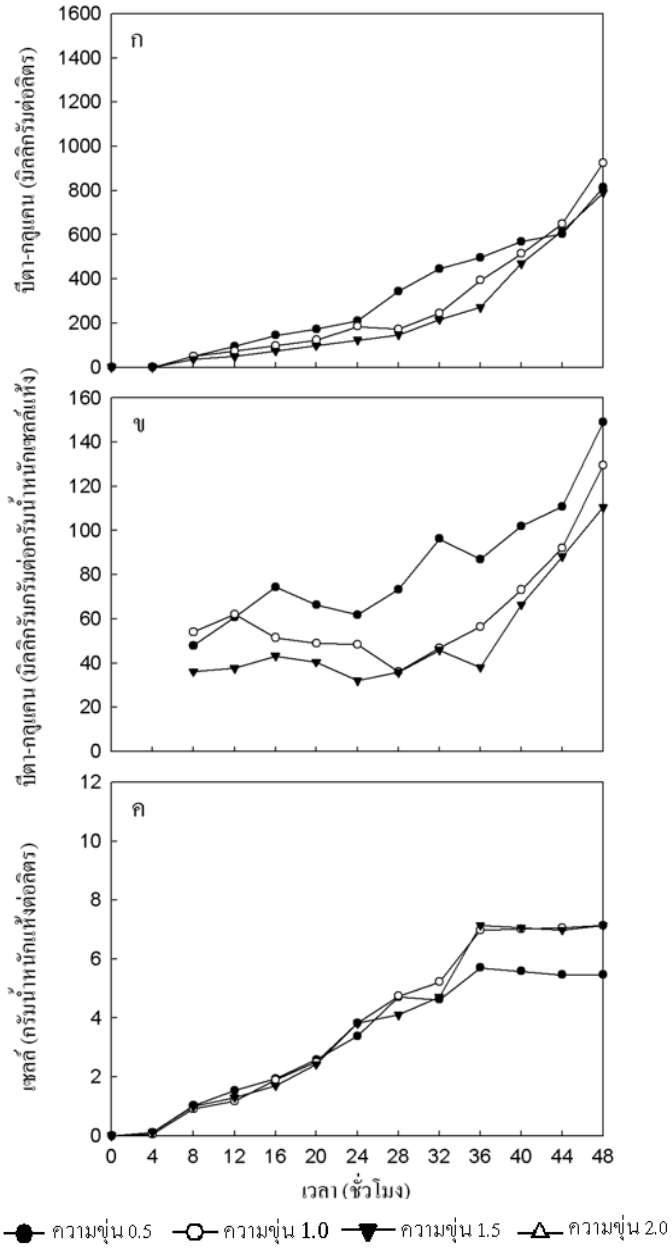
จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าในช่วง 20 ชั่วโมงแรกปริมาณบีตา-กลูแคนมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ช่วงชั่วโมงที่ 20 ถึงชั่วโมงที่ 32 เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1.5 ผลิตบีตา-กลูแคนสูงกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นอื่นๆ และเริ่มคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 32 เป็นต้นไป โดยผลิตบีตา-กลูแคนสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 32 ในขณะที่ในช่วง 32 ชั่วโมงแรกเมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1.0 และ 2.0 ผลิตบีตา-กลูแคนได้ใกล้เคียงกัน และมากกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 เมื่อถึงช่วงชั่วโมงที่ 36 ถึง 48 เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1.0 และ 2.0 ปริมาณกลูแคนที่ผลิตได้มีค่าคงที่ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 ในช่วง 40 ชั่วโมงแรกมีการผลิตบีตา-กลูแคนได้น้อยกว่าเมื่อใช้เซลล์เริ่มต้นความเข้มข้นอื่นๆ แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 สามารถผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงสุดโดยเรียงลำดับปริมาณบีตา-กลูแคนจากมากไปน้อยที่สุด คือเมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5, 1.0, 2.0 และ 1.5 ให้บีตา-กลูแคน 964.1, 957.0, 901.4 และ 860.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 12 ก)

เมื่อพิจารณาปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ในช่วงเวลาต่างๆ พบว่าชั่วโมงที่ 12 ถึง 20 มีค่าที่ใกล้เคียงกันในทุกการทดลอง แต่หลังจากชั่วโมงที่ 20 เป็นต้นไป ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์เริ่มมีค่าที่แตกต่างกันดังนี้ ในช่วงชั่วโมงที่ 24 ถึง 32 เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1.5 มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงกว่าเมื่อใช้เซลล์ความเข้มข้นอื่นๆ โดยหลังจากชั่วโมงที่ 32 ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์เริ่มมีปริมาณคงที่ โดยมีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 32 ส่วนเมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 2.0 ในชั่วโมงที่ 36 มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงสุด และปริมาณจะเริ่มมีค่าลดลงเล็กน้อยในช่วงโมงต่อไป เมื่อถึงชั่วโมงที่ 40 เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1.0 มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงสุด และในชั่วโมงถัดไปจะเริ่มมีค่าที่ลดลงเล็กน้อย ส่วนเมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น

0.5 ในชั่วโมงที่ 44 มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงสุด เมื่อเรียงลำดับบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์จากมากไปน้อย คือเมื่อเมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 2.0, 1.0, 1.5 และ 0.5 ให้บีตา-กลูแคน 124.5, 122.2, 121.1 และ116.0 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ (ภาพที่ 12 ข)

การเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลในช่วง 28 ชั่วโมงแรกเมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1.0, 1.5 และ 2.0 ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 การเจริญน้อยกว่าเมื่อใช้เซลล์เริ่มต้นความเข้มข้นอื่นๆ อย่างชัดเจน ในชั่วโมงที่ 28 การเจริญของเซลล์เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 9.22 กรัมต่อลิตร และลดลงเล็กน้อยในชั่วโมงถัดไป และคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 48 เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1.0 เซลล์มีการเจริญค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และในชั่วโมงที่ 36 ให้เซลล์ 8.34 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1.5 และ 2.0 การเจริญตลอดทั้ง 48 ชั่วโมงมีค่าใกล้เคียงโดยในชั่วโมงที่ 48 ให้เซลล์ 7.5 และ 7.4 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร (ภาพที่ 12 ค)

Abadias *et al*. (2003) ศึกษาผลของความเข้มข้นของกล้าเชื้อต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลง pH, pO_2 ของอาหารเหลวกากน้ำตาลของ *Candida sake* CPA-1 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลเซลล์มีรูปแบบการเจริญและการเปลี่ยนแปลง pH, pO_2 ของอาหารเหลวกากน้ำตาลคล้ายกัน โดยเมื่อใช้ความเข้มข้นของกล้าเชื้อต่ำ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นช้ากว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของกล้าเชื้อสูงในการเพาะเลี้ยง *C. sake* CPA-1 ซึ่งสอดคล้องกับผลการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ซึ่งพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 ซึ่งเป็นความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่น้อยที่สุดในการทดลอง เซลล์มีการเจริญช้ากว่าเมื่อใช้เซลล์เริ่มต้นความเข้มข้นอื่นๆ แต่มีการเจริญสูงกว่า เมื่อพิจารณาที่ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ร่วมกับการผลิตบีตา-กลูแคนที่ได้ พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 และ 1.0 มีค่าไม่แตกต่างกันมากนักและสูงกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1.5 และ 2.0 เนื่องจากในการทดลองขั้นต่อๆ ไปเป็นการขยายขนาดของการหมักให้ใหญ่ขึ้น การใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น



<u>ภาพที่ 12</u> การผลิตบีตา-กลูแคน (ก) บีตา-กลูแคนต่อเซลล์ (ข) และน้ำหนักเซลล์แห้ง (ค) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สูงอาจเป็นอุปสรรคในการเตรียมกล้าเชื้อ เพราะอาจต้องใช้เวลาเตรียมกล้าเชื้อนานขึ้น ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

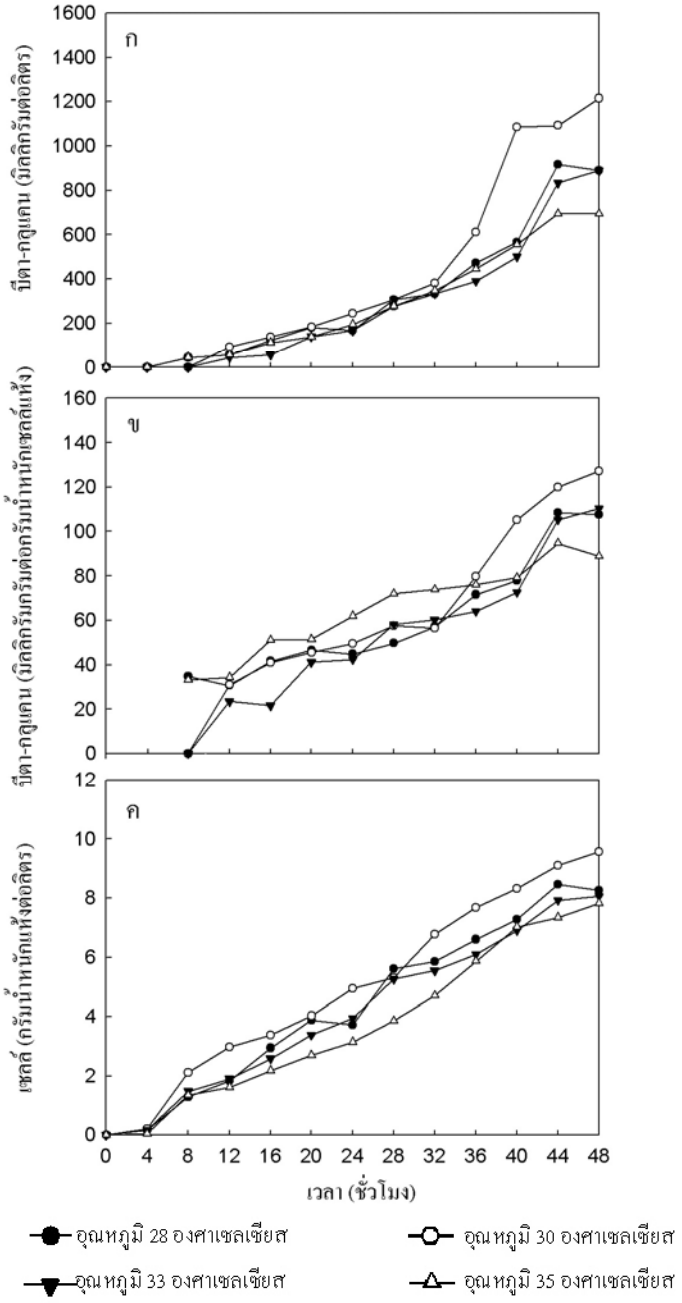
4. <u>การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคน</u>

เพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28, 30, 33 และ 35 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองแสดงว่าในช่วง 32 ชั่วโมงแรก การผลิตบีตา-กลูแคนใกล้เคียงกันในทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลอง แต่ชั่วโมงที่ 32 เป็นต้นไป พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *S. cerevisiae* TJ3 ผลิตบีตา-กลูแคนสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิอื่นๆ โดยสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 48 ผลิตบีตา-กลูแคน 1,215.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนเมื่อเมื่อเพาะที่อุณหภูมิ 28, 33 และ 35 องศาเซลเซียส ผลิตบีตา-กลูแคน 916.7, 888.9 และ 694.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 13 ก)

เมื่อพิจารณาบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ ในช่วง 32 ชั่วโมงแรก *S. cerevisiae* TJ3 ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าที่เลี้ยงในอุณหภูมิอื่นๆ แต่หลังจากชั่วโมงที่ 32 เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กลับมีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงขึ้นมากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอุณหภูมิอื่นๆ และในชั่วโมงที่ 48 เซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ 127.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนในชั่วโมงที่ 44 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 และ 35 องศาเซลเซียส เซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงที่สุดของการทดลอง 108.4 และ 94.6 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เซลล์ผลิตบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงที่สุดของการทดลองในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 110.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 13 ข)

สำหรับการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 48 เซลล์เจริญมากที่สุด 9.6 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร สำหรับอุณหภูมิที่มีการเจริญที่รองลงมา คือ 28, 33 และ 35 องศาเซลเซียส ได้เซลล์ 8.5, 8.1 และ 7.8 กรัมน้ำหนัก



ภาพที่ 13 การผลิตบีตา-กลูแคน (ก) บีตา-กลูแคนต่อเซลล์ (ข) และน้ำหนักเซลล์แห้ง (ค) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 1.0 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28, 30, 33 และ 35 องศาเซลเซียส

เซลล์แห้งต่อลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 13 ค)

จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคน ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

5. <u>การคัดเลือกชนิดของถังหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* TJ3 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์</u>

5.1 ถังหมักแบบถังกวน

เพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 โดยใช้ถังหมักแบบถังกวนขนาด 5 ลิตรซึ่งถังมีลักษณะดังนี้ สูง 30 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 14.5 เซนติเมตร หัวจ่ายอากาศสูงจากก้นถัง 3.5 เซนติเมตร ใบพัดชุดที่ 1 สูงจากก้นถัง 6 เซนติเมตร ใบพัดชุดที่ 2 สูงจากก้นถัง 7.5 เซนติเมตร ใบพัดชุดที่ 3 สูงจากก้นถัง 9 เซนติเมตร ในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตร ที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในการเพาะเลี้ยงใช้อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และอัตราการกวน 100 และ 400 รอบต่อนาที

จากการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบกวนโดยใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที ปริมาณบีตา-กลูแคนเพิ่มสูงขึ้นในช่วงชั่วโมง 0 ถึงชั่วโมงที่ 8 โดยในชั่วโมงที่ 8 ให้บีตา-กลูแคน 175.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่หลังจากชั่วโมงที่ 8 เป็นต้นไปบีตา-กลูแคนที่ผลิตได้ลดลง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ได้ต่ำกว่าค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที โดยผลิตบีตา-กลูแคนซึ่งวัดในรูปของกลูโคสได้สูงที่สุดเพียง 35.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 16 (ภาพที่ 14 ก)

แม้ว่าการผลิตบีตา-กลูแคนที่ได้จากทั้งสองการทดลองมีค่าต่ำ แต่ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* TJ3 เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบถังกวน เมื่อใช้อัตราการกวนทั้งสองอัตรายังคงมีค่าสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้การกวน 400 รอบต่อนาที บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์มีค่าสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 16 เท่ากับ 91.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งและเมื่อใช้

การกวน 100 รอบต่อนาที ให้บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 20 เท่ากับ 88.9 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 14 ข)

การเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 เมื่อ พบว่าเมื่อใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที มีการเจริญให้เซลล์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 8 ให้เซลล์ 2.5 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร หลังจากชั่วโมงที่ 8 การเจริญให้เซลล์ต่ำลงและคงที่ในช่วงชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 24 โดยพบตะกอนหนาแน่นที่ก้นถังตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาทีก็พบลักษณะการตกตะกอนดังกล่าวเช่นกัน โดยพบตะกอนหนาแน่นที่ก้นถังหมักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 ตลอด 24 ชั่วโมง ของการทดลองพบเซลล์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 16 ต่ำเพียง 0.4 กรัม น้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร การตกตะกอนที่พบในการเพาะเลี้ยงโดยใช้อัตราการกวนทั้งสองอัตรา อาจเกิดจาก *S. cerevisiae* TJ3 มีการเจริญสูงในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงเนื่องจากมีอัตราการกวนสูง ทำให้มีการกระจายตัวของเซลล์และสารอาหารที่เหมาะสม จึงมีเซลล์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลมากจนเกิดการตกตะกอน เซลล์ไม่สามารถรับอาหารได้พอเพียง การเจริญจึงหยุดความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้จึงน้อยมาก (ภาพที่ 14 ค)

การเปลี่ยนแปลง pH ในระหว่างการหมักเมื่อใช้อัตราการกวนทั้งสองอัตราแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเมื่อใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที pH ลดลงในช่วง 8 ชั่วโมงแรกโดยมีค่าต่ำสุดในชั่วโมงที่ 8 เท่ากับ 4.9 ซึ่งอาจเกิดจากเซลล์สร้างสารตัวกลางสำหรับการเจริญ ซึ่งเป็นกรดหลายชนิด pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลจึงลดลง จากนั้น pH เพิ่มสูงขึ้นอย่างช้าๆ โดยในชั่วโมงที่ 24 pH เพิ่มขึ้นเป็น pH 5.31 ในขณะที่เมื่อใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที pH ลดลงในช่วง 8 ชั่วโมงแรกและต่ำสุดที่ชั่วโมงที่ 8 เช่นกัน (pH 4.97) และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงต่อไป โดยในชั่วโมงที่ 24 pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลสูงถึง 7.03 (ภาพที่ 14 ง)

ปริมาณเอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลเมื่อใช้อัตราการกวน 100 และ 400 รอบต่อนาทีเป็นไปในลักษณะที่คล้ายกันคือเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยเมื่อใช้การกวน 100 รอบต่อนาที เอทานอลเริ่มต้นในอาหารเหลวกากน้ำตาลเท่ากับ 0.15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 20 เพียง 0.36 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเมื่อใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาทีเอทานอลเริ่มต้นในอาหารเหลวกากน้ำตาลเท่ากับ 0.13 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 24 คือ 0.44 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (ภาพที่ 14 จ)

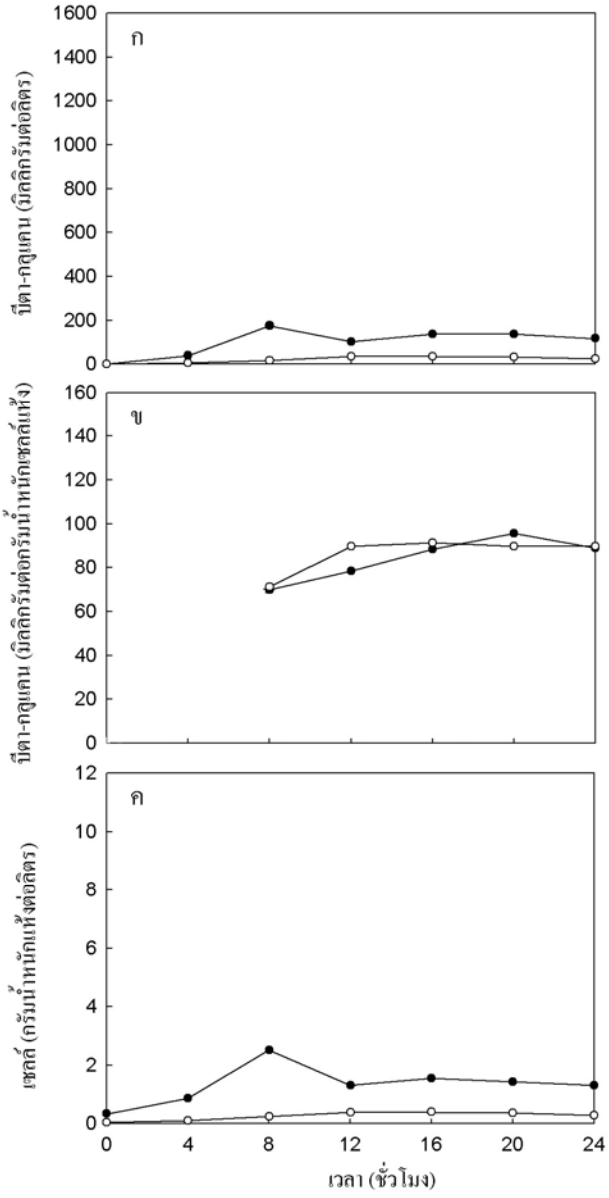
น้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลเมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบถังกวนและใช้อัตราการกวน 100 และ 400 รอบต่อนาที มีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะที่คล้ายกันคือ ลดลงอย่างช้าๆ ตลอดเวลาที่ทำการทดลอง โดยในชั่วโมงที่ 24 มีค่าเท่ากับ 1.25 และ 1.32 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 14 ฉ)

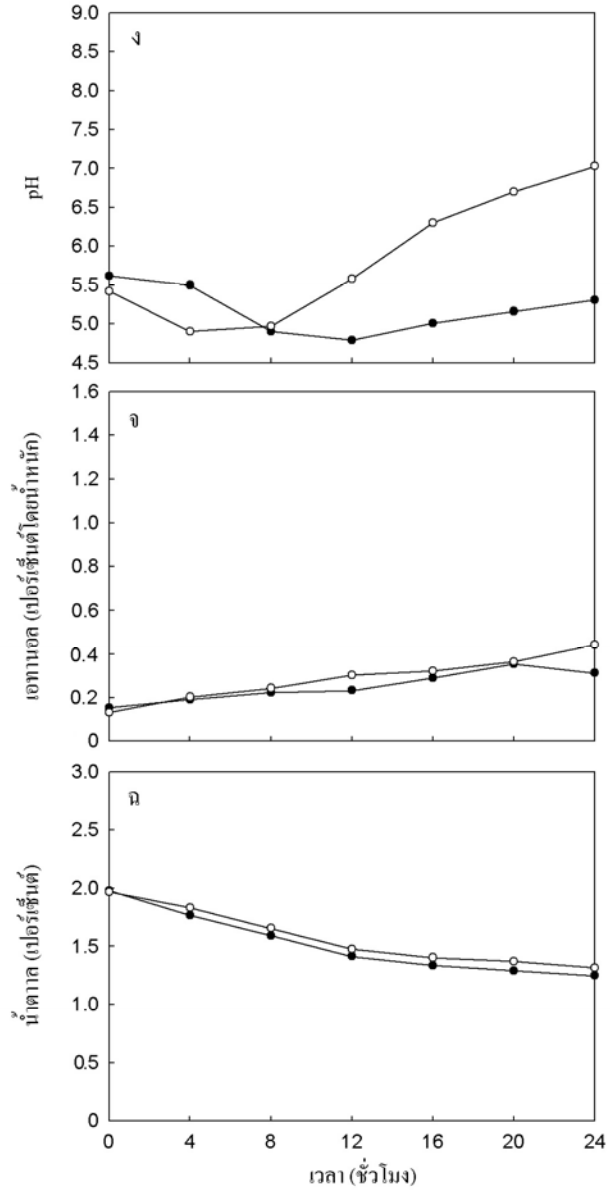
จากการทดลองแสดงว่าการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบถังกวน และใช้อัตราการกวน 100 และ 400 รอบต่อนาที ไม่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคน เพราะผลิตบีตา-กลูแคนได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการที่น้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงไม่มากนัก แสดงให้เห็นว่า *S. cerevisiae* TJ3 มีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเพียงเล็กน้อย จากการการทดลองของ Sampermans *et al.* (2005) พบว่า ความสามารถในการตกตะกอนของ *S. cerevisiae* NCYC 1195 เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเจริญมากขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้การเจริญที่เพิ่มสูงขึ้นถึงแค่ชั่วโมงที่ 8 และลดลงหลังจากนั้น อาจเป็นเพราะเซลล์มีการเจริญมากขึ้นทำให้มีการตกตะกอนเพิ่มขึ้นจึงพบตะกอนเซลล์ที่ก้นถังมากขึ้น นอกจากนี้อัตราการให้อากาศในอัตราเพียง 1 vvm อาจน้อยเกินไป ไม่เพียงพอต่อการเจริญ เช่นเดียวกับที่ Soares *et al.* (1991) พบว่าการให้อากาศ 1 vvm ส่งเสริมการตกตะกอนของ *S. cerevisiae* ได้ แต่การเพิ่มอัตราการให้อากาศสูงถึง 5 vvm จะลดการตกตะกอนของ *S. cerevisiae* และการที่เซลล์ของ *S. cerevisiae* TJ3 ตกตะกอนอยู่ที่ก้นถังทำให้ไม่ใช้อาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงทำให้มีการเจริญน้อย

ภาพที่ 14 การผลิตบีตา-กลูแคน (ก) บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ค) pH (ง) เอทานอล (จ) และน้ำตาล (ฉ) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบถังกวน อัตราการกวน 100 และ 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตร ที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตรเป็น 0.5

คำอธิบายสัญลักษณ์

● 100 rpm ○ 400 rpm


ก
ข
ค
บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
เซลล์ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร)
เวลา (ชั่วโมง)
0
4
8
12
16
20
24


ง
pH
จ
เอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
ฉ
น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)
เวลา (ชั่วโมง)

<u>ภาพที่ 14</u> (ต่อ)

5.2 ถังหมักแบบอากาศลอยตัว

เพาะเลี้ยงสายพันธุ์ *S. cerevisiae* 3 โดยใช้ถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 6 ลิตรซึ่งมีลักษณะดังนี้ สูง 28 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 16.5 เซนติเมตร ติดตั้งหัวจ่ายอากาศสูงจากก้นถัง 2 เซนติเมตร ภายในถังติดตั้ง draught tube สูง 9 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 8.3 เซนติเมตร สูงจากก้นถัง 2 เซนติเมตร มีบริเวณที่เซลล์ได้รับอากาศประมาณ 490 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตร ที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 ในระหว่างการเพาะเลี้ยงใช้อัตราการให้อากาศ 1, 2 และ 3 vvm และที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

จากการทดลองเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่ให้อากาศ 1 vvm บีตา-กลูแคนที่ผลิตได้มีปริมาณสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 32 เท่ากับ 817.8 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณบีตา-กลูแคนลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 72 เหลือบีตา-กลูแคนเพียง 184.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อให้อากาศ 2 vvm การผลิตบีตา-กลูแคนสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 36 ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงที่สุดเท่ากับ 1,420.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งเหลือบีตา-กลูแคน 807.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงโดยให้อากาศ 3 vvm การผลิตบีตา-กลูแคนคล้ายกับเมื่อให้อากาศ 2 vvm แต่ผลิตได้ต่ำกว่าเล็กน้อย คือสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 36 ได้บีตา-กลูแคนสูงที่สุดเท่ากับ 1,291.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นบีตา-กลูแคนที่ผลิตได้ลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งให้บีตา-กลูแคนได้ 622.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแม้ว่าลักษณะการผลิตบีตา-กลูแคนคล้ายกับเมื่อมีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 vvm แต่บีตา-กลูแคนที่ได้มีค่าต่ำกว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 เป็นต้นไปซึ่งเป็นช่วงที่มีการผลิตสูงที่สุด (ภาพที่ 15 ก)

สำหรับปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* TJ3 ได้เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่ให้อากาศ 1, 2 และ 3 vvm ในช่วง 28 ชั่วโมงแรกมีค่าที่ใกล้เคียงกันมาก โดยเมื่อให้อากาศ 2 และ 3 vvm ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ใกล้เคียงกันตลอดทั้ง 72 ชั่วโมงที่ทำการทดลอง โดยมีค่าสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 130.7 และ 128.8 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนเมื่อให้อากาศ 1 vvm มีปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงที่สุด

ในชั่วโมงที่ 32 เท่ากับ 121.9 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง หลังจากชั่วโมงที่ 32 เป็นต้นไป บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่าน้อยกว่าเมื่อให้อากาศ 2 และ 3 vvm (ภาพที่ 15 ข)

S. cerevisiae TJ3 เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่ใช้อัตราการให้อากาศ 2, 3 และ 1 vvm มีการเจริญสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 36 ให้เซลล์เท่ากับ 10.9, 10.0 และ 7.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของการเจริญ พบว่าในช่วง 20 ชั่วโมงแรกการเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 ที่เพาะเลี้ยงโดยให้อากาศ 1 กับ 2 vvm มีค่าความเข้มข้นของเซลล์ใกล้เคียงกันแต่หลังจากชั่วโมงที่ 20 เป็นต้นไปการเจริญแตกต่างกันมากโดยทั้งสองสภาวะมีการเจริญให้เซลล์สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 36 เมื่อใช้อัตราการให้อากาศ 1 vvm มีการเจริญลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 72 ส่วน เมื่อใช้อัตราการให้อากาศ 2 vvm การเจริญลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 52 ให้เซลล์เท่ากับ 8.5 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร และมีความเข้มข้นของเซลล์คงที่จนถึงชั่วโมงที่ 72 ส่วนในสภาวะที่ใช้อัตราการให้อากาศ 3 vvm ในช่วง 16 ชั่วโมงแรกมีการเจริญช้า จากนั้นการเจริญสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 36 ให้เซลล์ 10.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร จากนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 72 (ภาพที่ 15 ค)

การเปลี่ยนแปลงของ pH เมื่อให้อากาศทั้งสามอัตราคล้ายกัน คือลดลงในช่วงแรกๆ จากนั้นเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยพบว่าการให้อากาศในอัตราที่ต่ำทำให้ pH ต่ำที่สุดในช่วงแรกมีค่าน้อยที่สุดด้วย โดยเมื่อให้อากาศ 1 vvm pH มีค่าต่ำลงในช่วง 16 ชั่วโมงแรกโดยมี pH ต่ำที่สุดในชั่วโมงที่ 16 เท่ากับ 4.91 จากนั้น pH สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมี pH สูงที่สุดเท่ากับ 8.02 ส่วน pH เมื่อใช้อัตราการให้อากาศ 2 vvm pH ต่ำลงในช่วง 16 ชั่วโมงแรกเช่นกัน โดยมี pH ต่ำที่สุดในชั่วโมงที่ 16 เท่ากับ 5.01 จากนั้น pH สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมี pH สูงที่สุดเท่ากับ 8.16 และเมื่อใช้อัตราการให้อากาศ 3 vvm pH มีค่าต่ำลงเพียงในช่วง 8 ชั่วโมงแรกโดยมี pH ต่ำที่สุดในชั่วโมงที่ 8 เท่ากับ 5.11 จากนั้น pH สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมี pH สูงที่สุดเท่ากับ 8.33 ซึ่งการที่ pH มีค่าสูงขึ้นมากดังกล่าวอาจเกิดจากการแตกตัวเป็นแอมโมเนียมของยูเรียที่เติมลงไปเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน (ภาพที่ 15 ง)

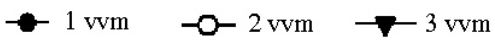
เมื่อให้อากาศทั้งสามอัตราการผลิตเอทานอลมีรูปแบบคล้ายกันคือเพิ่มขึ้นในช่วงแรกและลดลงอย่างต่อเนื่องโดยผลิตได้เพียงเล็กน้อย โดยจากเอทานอล 0.13 ถึง 0.18 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ 0 ชั่วโมง เมื่อให้อากาศ 1 vvm มีการผลิตเอทานอลที่สุดที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 0.82 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในขณะที่เมื่อให้อากาศ 2 vvm มีการผลิตเอทานอลได้ต่ำกว่าเมื่อให้อากาศ 1 vvm คือจากสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 20 ให้เอทานอล 0.54 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเมื่อให้อากาศ 3 vvm ให้เอทานอลสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 20 เท่ากับ 0.53 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (ภาพที่ 15 จ)

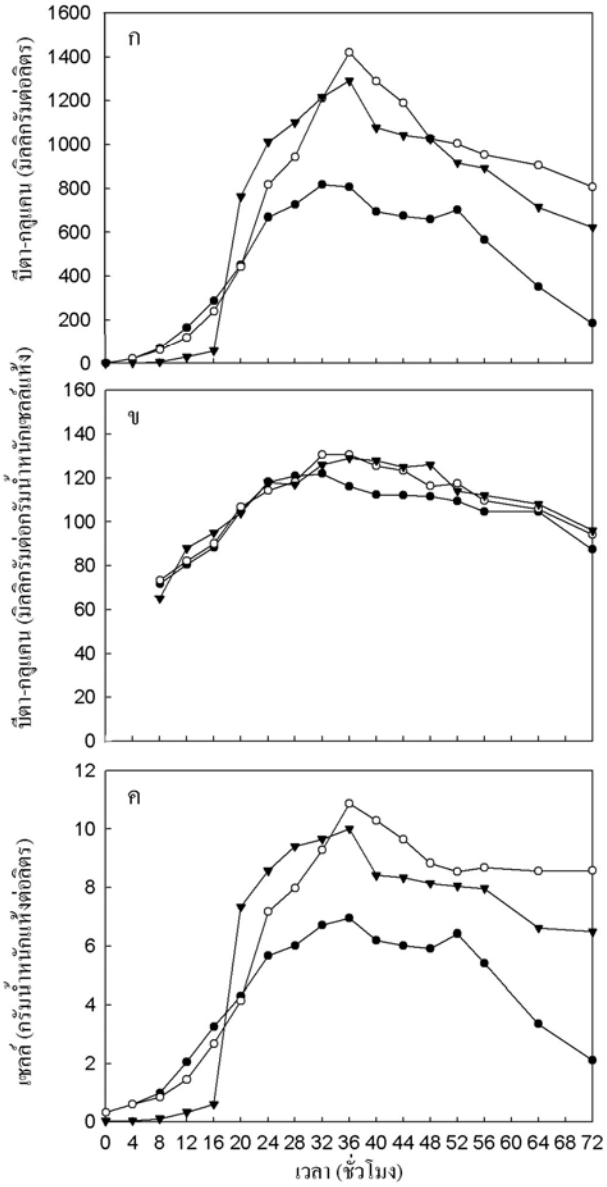
การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลเมื่อให้อากาศทั้งสามอัตรามีรูปแบบคล้ายกันคือลดลงอย่างต่อเนื่องโดยเมื่อใช้อัตราการให้อากาศ 1, 2 และ 3 vvm จากน้ำตาลเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ และลดลงจนมีค่าน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อถึงชั่วโมงที่ 28 คือเท่ากับ 0.7, 0.9 และ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในชั่วโมงที่ 72 มีน้ำตาลเหลืออยู่เพียง 0.07, 0.10 และ 0.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 15 ฉ)

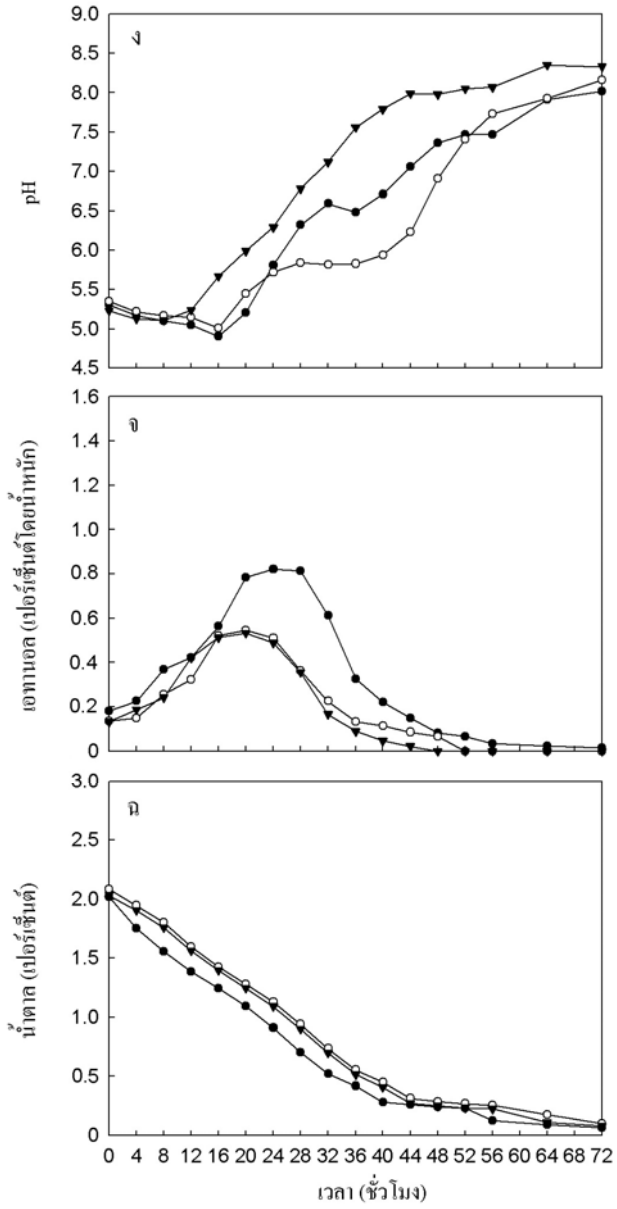
จากการทดลองแสดงว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่ให้อากาศในอัตรา 1 vvm มีการผลิตบีตา-กลูแคนต่ำที่สุด ซึ่งเป็นเพราะมีการเจริญต่ำที่สุดให้ความเข้มข้นของเซลล์น้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเกิดจากอากาศที่ให้ไม่เพียงพอทำให้น้ำตาลส่วนหนึ่งในอาหารอาจถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลมากกว่าเมื่อให้อากาศในอัตราที่สูงกว่า จึงใช้สำหรับผลิตเซลล์ได้น้อยลงเป็นเหตุให้มีการผลิตบีตา-กลูแคนน้อยด้วย ในขณะที่เมื่อให้อากาศ 2 กับ 3 vvm มีรูปแบบการผลิตบีตา-กลูแคน ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ การเจริญ ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบต่างๆในอาหารที่ใกล้เคียงกันมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการให้อากาศตั้งแต่ 2 vvm เพียงพอต่อการเจริญและผลิตบีตา-กลูแคนแล้ว แม้ว่าเพิ่มอัตราการให้อากาศขึ้นไปอีก ก็ไม่สามารถเพิ่มการเจริญ และการผลิตบีตา-กลูแคนขึ้นได้ อีกทั้งการให้อากาศในอัตราต่ำช่วยประหยัดกำลังของเครื่องให้อากาศเมื่อมีการขยายขนาดการหมัก

ภาพที่ 15 การผลิตบีตา-กลูแคน (ก) บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ค) pH (ง) เอทานอล (จ) และน้ำตาล (ฉ) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัว อัตราการให้อากาศ 1, 2 และ 3 vvm ในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตรที่มีน้ำตาลทั้งหมด 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตรเป็น 0.5

คำอธิบายสัญลักษณ์




ก
ข
ค
บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
เซลล์ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร)
เวลา (ชั่วโมง)
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60 64 68 72


ง
pH
จ
เอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
ฉ
น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)
เวลา (ชั่วโมง)

ภาพที่ 15 (ต่อ)

จากการเปรียบเทียบการผลิตบีตา-กลูแคนเมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 โดยใช้ถังหมักแบบถังกวนกับถังหมักอากาศลอยตัวพบว่าการใช้ถังหมักแบบอากาศลอยตัวให้บีตา-กลูแคนในปริมาณที่สูงกว่ามาก ซึ่งอาจเกิดจากการระบบภายในถังหมักอาจมีเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อตกตะกอนสายพันธ์ TJ3 มากกว่าถังหมักแบบถังกวน โดยการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกวน *S. cerevisiae* TJ3 ตกตะกอนอย่างรวดเร็วอันเนื่องมาจากการกวนผสมไม่ดีเพราะใบพัดอยู่สูงจากก้นถังมาก นอกจากนั้นการให้อากาศไม่เพียงพอจึงมีการเจริญต่ำให้เซลล์น้อยและมีการตายของเซลล์เกิดขึ้น เป็นผลให้บีตา-กลูแคนที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยตามไปด้วย ในขณะที่ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวแม้พบการตกตะกอนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 แต่การตกตะกอนมีน้อยกว่ามาก เนื่องจากวิธีการให้อากาศสามารถทำให้เกิดการหมุนเวียนอาหารได้ดี เซลล์จึงไม่ตกตะกอนและสามารถใช้อาหารอย่างมีประสิทธิภาพทำให้เจริญได้ดีกว่า เป็นผลให้มีการผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงกว่า

6. <u>การศึกษาลักษณะของถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนด้วยการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์</u>

เพาะเลี้ยงสายพันธุ์ *S. cerevisiae* 3 โดยใช้ถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 6 ลิตร ซึ่งมีลักษณะดังนี้ สูง 28 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 16.5 เซนติเมตร ติดตั้งหัวจ่ายอากาศสูงจากก้นถัง 2 เซนติเมตร ภายในถังติดตั้ง draught tube สูง 9 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 8.3 เซนติเมตร สูงจากก้นถัง 2 เซนติเมตร

6.1 อัตราส่วนระหว่างระยะระหว่าง draught tube กับพื้นถังหมักแบบอากาศลอยตัวกับเส้นผ่านศูนย์กลางของ draught tube (H_b/D_t)

ปรับถังหมักแบบอากาศลอยตัวให้มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 8, 4 (อัตราส่วนที่ใช้ในการศึกษาที่ผ่านมา ข้อ 5.2), 2.7 และ 2 แล้วนำมาเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 โดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตร ที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 ในระหว่างการเพาะเลี้ยงให้อากาศในอัตรา 2 vvm และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณบีตา-กลูแคนสูงที่ผลิตได้เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 8, 4, 2.7 และ 2 เป็นดังนี้ 1,190.2, 1,193.0, 926.5 และ 797.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 40, 40, 32 และ 32 ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนแปลงของปริมาณบีตา-กลูแคนในระหว่างการหมักเป็นดังนี้ ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ปริมาณบีตา-กลูแคนใกล้เคียงกัน และเริ่มมีความแตกต่างกันชัดเจนหลังชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป โดยการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 8 กับ 4 ให้บีตา-กลูแคนสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีปริมาณสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 40 หลังจากนั้นในช่วงชั่วโมงที่ 40 ถึงชั่วโมงที่ 72 ปริมาณบีตา-กลูแคนลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 4 ในช่วงชั่วโมงที่ 40 ถึงชั่วโมงที่ 72 ดังกล่าวมีค่าสูงกว่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เป็นค่าอื่นๆ ส่วนการเพาะ

เลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 2.7 ปริมาณบีตา-กลูแคนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องถึงชั่วโมงที่ 28 และค่อนข้างคงที่ในช่วงชั่วโมงที่ 28 ถึงชั่วโมงที่ 48 โดยให้บีตา-กลูแคนสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 32 จากนั้นช่วงชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมงที่ 72 ปริมาณบีตา-กลูแคนลดลงอย่างต่อเนื่อง และการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 2 ปริมาณบีตา-กลูแคนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องถึงชั่วโมงที่ 32 และค่อนข้างคงที่ในช่วงชั่วโมงที่ 32 ถึงชั่วโมงที่ 48 โดยให้บีตา-กลูแคนสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 32 จากนั้นช่วงชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมงที่ 72 ปริมาณบีตา-กลูแคนลดลงอย่างต่อเนื่อง และให้บีตา-กลูแคนในช่วงชั่วโมงดังกล่าวน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับบีตา-กลูแคนที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เป็นค่าอื่นๆ ซึ่งชัดเจนว่าอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 2 เป็นระยะที่มากเกินไป (ภาพที่ 16 ก)

ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 8, 4, 2.7 และ 2 สูงที่สุดท่ากับ 126.1, 126.8, 122.3 และ 118.6 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 44, 40, 24 และ 36 ตามลำดับโดยการเปลี่ยนแปลงของปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ในระหว่างการหมักเป็นดังนี้ ในช่วง 16 ชั่วโมงแรก ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและใกล้เคียงกัน ในช่วงชั่วโมงที่ 16 ถึงชั่วโมงที่ 44 เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 8, 4 และ 2 เซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์เพิ่มขึ้นอีกไม่มากนักและสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 44, 40 และ 36 ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 2.7 เซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 24 และลดลงอย่างต่อเนื่อง สำหรับช่วงชั่วโมงที่ 44 ถึงชั่วโมงที่ 72 ในทุกการทดลอง เซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 16 ข)

การเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 8, 4, 2.7 และ 2 ให้เซลล์สูงสุดเท่ากับ 9.5, 9.4, 8.2 และ 6.9 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนแปลงของการเจริญในระหว่างการหมักเป็นดังนี้ ในช่วง 16 ชั่วโมงแรกมีการเจริญให้เซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและใกล้เคียงกันในทุกการทดลอง และเริ่มแตกต่างกันหลังจากชั่วโมงที่ 16 เป็นต้นไป โดย *S. cerevisiae* TJ3 เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 8 กับ 4 มีการเจริญให้เซลล์ใกล้เคียงกันไปจนถึงชั่วโมงที่ 44 โดยมีการเจริญให้เซลล์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 40 และ 44 ตามลำดับ จากนั้นการเจริญลดลงอย่างต่อเนื่องในทั้งสองการทดลอง ส่วนการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 2.7 กับ 2 มีการเจริญต่ำกว่า การเจริญค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ช่วงชั่วโมงที่ 32 ถึง

72 โดยมีการเจริญสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 และ 44 ตามลำดับ และในช่วงเวลาดังกล่าวนี้การเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 2 มีการเจริญต่ำที่สุด ซึ่งส่งผลให้มีการผลิตบีตา-กลูแคนต่ำที่สุดตามไปด้วย (ภาพที่ 16 ค)

การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลทั้ง 72 ชั่วโมงมีรูปแบบคล้ายกัน คือลดลงอย่างต่อเนื่องจนต่ำที่สุดในชั่วโมงที่ 16 เท่ากับ 5.12, 5.04, 5.07 และ 5.05 เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 8, 4, 2.7 และ 2 จากนั้น pH เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและใกล้เคียงกัน หลังจากชั่วโมงที่ 32 pH จึงเริ่มแตกต่างกันเล็กน้อยและยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 72 โดยอาหารเหลวกากน้ำตาลมี pH สูงที่สุด 8.43, 8.39, 8.27 และ 8.49 เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 8, 4, 2.7 และ 2 ส่งผลให้ในช่วงชั่วโมงดังกล่าวการเจริญของเซลล์ลดลงช้าๆ และการผลิตบีตา-กลูแคนลดลงเช่นกัน (ภาพที่ 16 ง)

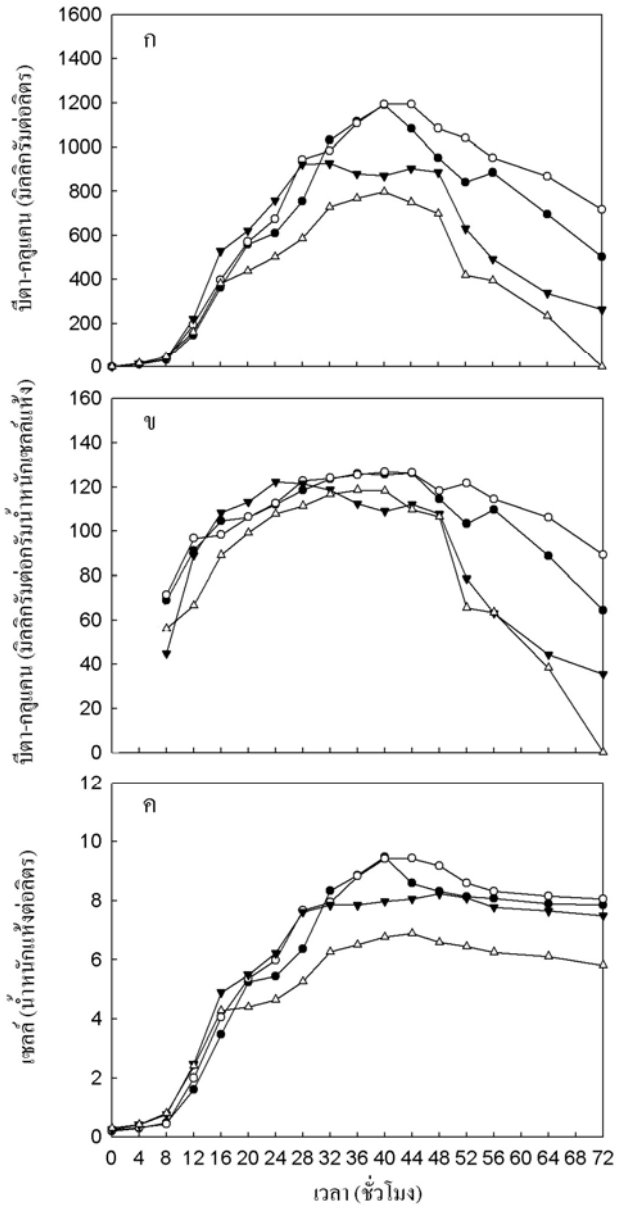
เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 8, 4, 2.7 และ 2 พบว่ามีเอทานอลถูกสร้างขึ้นมาเล็กน้อยคือ จาก 0.14 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักที่ 0 ชั่วโมง เพิ่มเป็น 0.51, 0.52, 0.53 และ 0.59 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 24, 28, 24 และ 32 ตามลำดับ และลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 72 เหลือเอทานอลเพียง 0.14, 0.12, 0.14 และ 0.09 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวแสดงว่าเซลล์เปลี่ยนน้ำตาลบางส่วนเป็นเอทานอล และจึงใช้เอทานอลเพื่อการเจริญต่อไป (ภาพที่ 16 จ)

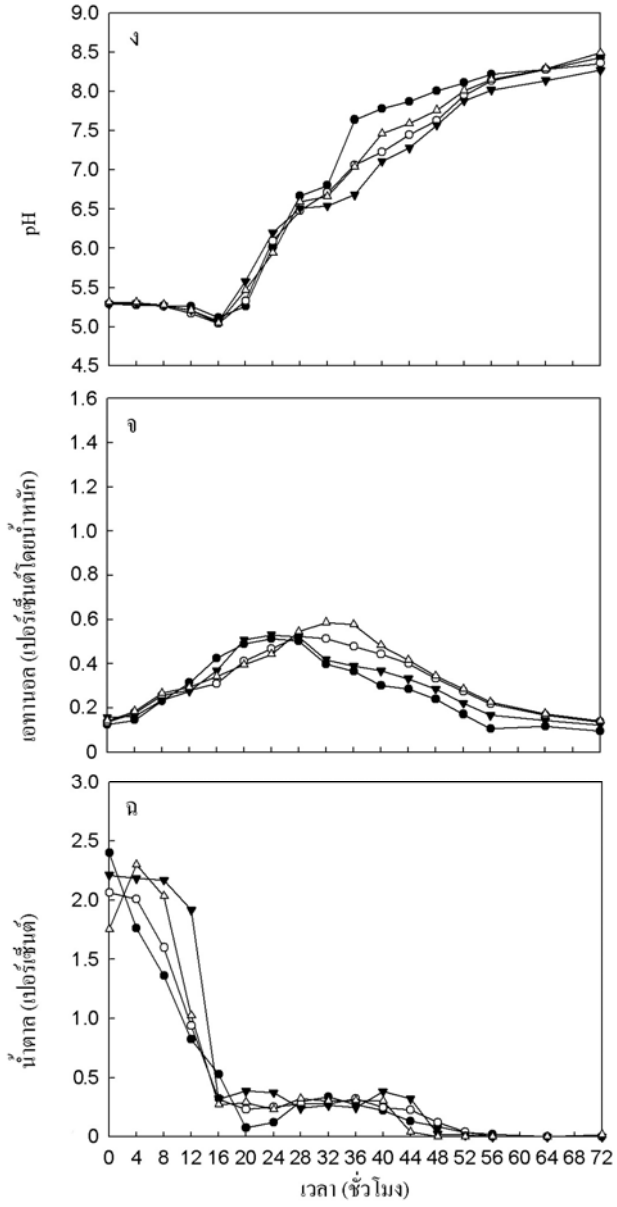
การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลมีรูปแบบที่คล้ายกันในทุกการทดลอง คือลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 16 ชั่วโมงแรกโดยลดลงเหลือเพียง 0.53, 0.32, 0.32 และ 0.27 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักระบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 8, 4, 2.7 และ 2 ตามลำดับ จากนั้นน้ำตาลค่อยๆ ลดลง และหมดไปก่อนถึงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งลักษณะดังกล่าวเกิดจากการใช้น้ำตาลที่รวดเร็ว จึงส่งผลให้เซลล์มีการเจริญสูงในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง pH จึงลดต่ำลงและเอทานอลจึงเพิ่มสูงขึ้นในช่วงเวลาดังกล่าว เมื่อน้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลต่ำลงมาก (ภาพที่ 16 ฉ)

จากผลการทดลองแสดงว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 8, 4, 2.7 และ 2 มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของ pH เอทานอล และน้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลคล้ายกัน คือในช่วง 20 ชั่วโมงแรก เซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็วและใช้น้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลอย่างรวดเร็ว อาจเป็นเพราะอัตราส่วนที่ใช้ในการทดลองมีความแตกต่างกันน้อยเกินไปการเปลี่ยนแปลงต่างๆ จึงไม่ชัดเจนนัก โดยน้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลถูกใช้ในการสร้างสารตัวกลางต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยกรดหลายชนิดเพื่อเจริญและมีบางส่วนถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล ดังนั้นในช่วงชั่วโมงดังกล่าว น้ำตาล และ pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลจึงลดลงในขณะที่มีเซลล์ และเอทานอลเพิ่มขึ้น โดยเอทานอลเพิ่มขึ้นในปริมาณไม่มากนัก แสดงว่าน้ำตาลส่วนใหญ่ถูกใช้ในการเจริญ ซึ่งผลจากการเจริญสูงขึ้น ทำให้ปริมาณบีตา-กลูแคนสูงขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากการผลิตบีตา-กลูแคน และปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงที่สุดเมื่อใช้ถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 4 ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนดังกล่าวสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ภาพที่ 16 การผลิตบีตา-กลูแคน (ก) บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ค) pH (ง) เอทานอล (จ) และน้ำตาล (ฉ) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัว อัตราการให้อากาศ 2 vvm มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 8, 4, 2.7 และ 2 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตรที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตรเป็น 0.5

คำอธิบายสัญลักษณ์


ก
ข
ค
บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
เซลล์ (น้ำหนักแห้งต่อลิตร)
เวลา (ชั่วโมง)


ง
pH
จ
เอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
ฉ
น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)
เวลา (ชั่วโมง)

ภาพที่ 16 (ต่อ)

6.2 อัตราส่วนระหว่างความสูงของ draught tube กับ ความสูงของอาหาร (H_{dt}/H_m)

ทำการปรับถังหมักแบบอากาศลอยตัวให้มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 4 (จากข้อ 6.1) และมีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 2, 1.75, 1.6 และ 1.4 แล้วนำมาเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 โดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตร ที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 ในระหว่างการเพาะเลี้ยงใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 vvm และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

จากผลการทดลองพบว่าการผลิตบีตา-กลูแคนสูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 2, 1.75, 1.6 และ 1.4 เท่ากับ 951.8, 1,059.0, 1,069.9, และ 1,122.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 40, 40, 36 และ 40 ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนแปลงของปริมาณบีตา- กลูแคนในระหว่างการหมักมีรูปแบบที่คล้ายกันเป็นดังนี้ ในช่วง 40 ชั่วโมงแรก ปริมาณบีตา-กลูแคนสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีปริมาณใกล้เคียงกัน จากนั้นเริ่มมีความแตกต่างกันในชั่วโมงที่ 40 เป็นต้นไป โดยการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 1.4 ให้บีตา-กลูแคนสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 40 หลังจากนั้นจนถึงชั่วโมงที่ 72 ปริมาณบีตา-กลูแคนลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 1.4 ในช่วงชั่วโมงดังกล่าวยังคงมีค่าสูงกว่าที่ได้จากถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เป็นค่าอื่นๆ ส่วนการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 2, 1.75, 1.6 และ 1.4 ปริมาณบีตา-กลูแคนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและให้บีตา-กลูแคนสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 40, 40 และ 36 ตามลำดับ หลังจากนั้นจนถึงชั่วโมงที่ 72 ปริมาณบีตา-กลูแคนลดลงอย่างต่อเนื่อง และมีปริมาณใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 17 ก)

เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 2, 1.75, 1.6 และ 1.4 เซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงที่สุดไม่แตกต่างกันนัก คือ 120.1, 126.8, 126.1, 126.7 และ 126.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 32, 40, 44 และ 44 ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงของปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ในระหว่างการหมักเป็นดังนี้ ในช่วง 36 ชั่วโมงแรกปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและใกล้เคียงกัน โดยในช่วงชั่วโมงที่ 8 ถึงชั่วโมงที่ 28 เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีมีอัตราส่วน H_{dt}/H_m

เท่ากับ 2 เซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์มากกว่าการทดลองอื่น และมีค่าสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 32 หลังจากนั้นบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 1.75, 1.6 และ 1.4 เซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 40, 44 และ 44 ซึ่งมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และลดลงอย่างต่อเนื่องหลังจากชั่วโมงที่ 44 เป็นต้นไป (ภาพที่ 17 ข)

การเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 2, 1.75, 1.6 และ 1.4 ให้เซลล์ 7.91, 8.49, 8.85 และ 9.26 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 40, 36, 36 และ 40 ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนแปลงของการเจริญในระหว่างการหมักเป็นดังนี้ ในช่วง 28 ชั่วโมงแรกมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและใกล้เคียงกันในทุกการทดลอง หลังจากนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 1.4 มีการเจริญต่อเนื่องจนมีการเจริญสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 40 หลังจากนั้นการเจริญลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 2.21 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตรในชั่วโมงที่ 72 ส่วน TJ3 เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 1.6 มีการเจริญต่อเนื่องจนมีการเจริญสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 36 หลังจากนั้นการเจริญลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 2.55 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตรในชั่วโมงที่ 72 เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 1.75 มีการเจริญต่อเนื่องจนมีการเจริญสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 36 หลังจากนั้นการเจริญลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 3.25 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตรในชั่วโมงที่ 72 และเมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 2 มีการเจริญต่อเนื่องจนมีการเจริญสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 40 หลังจากนั้นการเจริญลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 2.94 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตรในชั่วโมงที่ 72 (ภาพที่ 17 ค)

การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลทั้ง 72 ชั่วโมงเมื่อเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 2, 1.75, 1.6 และ 1.4 มีรูปแบบคล้ายกัน คือลดลงอย่างต่อเนื่องจนต่ำที่สุดในชั่วโมงที่ 12 มี pH 5.06,5.04, 5.08 และ 5.06 ตามลำดับ จากนั้น pH เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและใกล้เคียงกันจนถึงชั่วโมงที่ 72 โดยอาหารเหลวกากน้ำตาลมี pH สูงที่สุด คือ pH 8.32, 8.24, 8.29 และ 8.43 ตามลำดับ (ภาพที่ 17 ง)

การผลิตเอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 2, 1.75, 1.6 และ 1.4 มีเพียงเล็กน้อยโดยมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 20

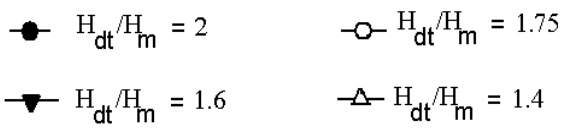
เท่ากับ 0.55, 0.55, 0.54 และ 0.44 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ หลังจากชั่วโมงที่ 20 เอทานอลเริ่มลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 72 (ภาพที่ 17 จ)

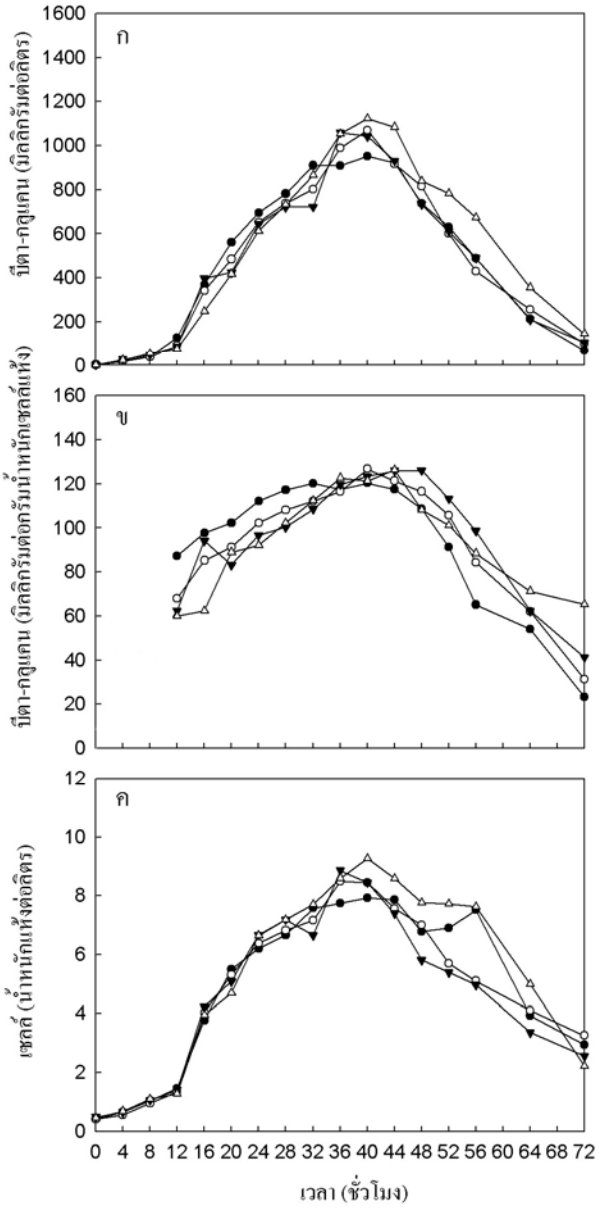
การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลเมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 2, 1.75, 1.6 และ 1.4 มีรูปแบบที่คล้ายกันในทุกการทดลอง คือลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 20 ชั่วโมงแรกโดยลดเหลือเพียง 0.12, 0.10, 0.23 และ 0.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นในช่วงชั่วโมงที่ 20 ถึงชั่วโมงที่ 72 น้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงช้าๆ โดยในชั่วโมงที่ 72 น้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลเหลือน้อยมาก คือ 0.08, 0.01, 0.04 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 17 ฉ)

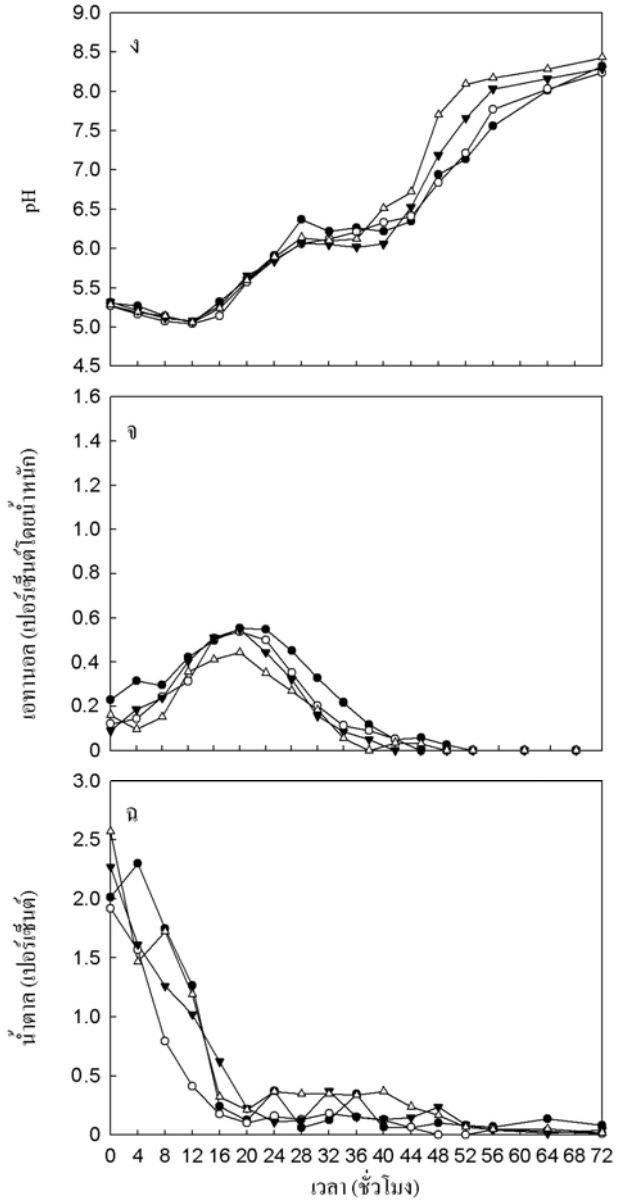
จากผลการทดลองเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 2, 1.75, 1.6 และ 1.4 พบว่าให้การผลิตบีตา-กลูแคน บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ การเจริญ การเปลี่ยนแปลงของ pH เอทานอล และน้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ใกล้เคียงกันตลอดทั้ง 72 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาในช่วงชั่วโมงที่ 40 ถึงชั่วโมงที่ 72 พบว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 1.4 มีการผลิตบีตา-กลูแคน และการเจริญสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีความสูงของ draught tube อื่นๆ ซึ่งอาจเกิดจาก draught tube มีความสูงมาก ระยะระหว่างปลาย draught tube กับผิวอาหารเหลวกากน้ำตาลจึงน้อย ปริมาตรอาหารเหลวกากน้ำตาลที่อยู่เหนือปลาย draught tube จึงน้อยตามไปด้วย น้ำหนักของอาหารเหลวกากน้ำตาลที่อยู่เหนือหัวจ่ายอากาศจึงน้อย หัวจ่ายอากาศจึงสามารถส่งอาหารเหลวกากน้ำตาลภายใน draught tube ออกไปจาก draught tube ได้ง่าย การหมุนเวียนของเซลล์ภายในถังหมักจึงมีความสะดวก เซลล์สามารถสัมผัสอาหารเหลวกากน้ำตาลและอากาศได้อย่างเต็มที่ จึงมีการเจริญ และการผลิตบีตา-กลูแคนสูงขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นจึงเลือกมีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 1.4 สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ภาพที่ 17 การผลิตบีตา-กลูแคน (ก) บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ค) pH (ง) เอทานอล (จ) และน้ำตาล (ฉ) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัว อัตราการให้อากาศ 2 vvm มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 2, 1.75, 1.6 และ 1.4 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตรที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตรเป็น 0.5

คำอธิบายสัญลักษณ์




ก
ข
ค
นีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
นีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
เซลล์ (น้ำหนักแห้งต่อลิตร)
เวลา (ชั่วโมง)


ง
pH
จ
เอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
ฉ
น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)
เวลา (ชั่วโมง)

ภาพที่ 17 (ต่อ)

6.3 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ draught tube กับเส้นผ่านศูนย์กลางของถังหมัก (D_{dt}/D_t)

ทำการปรับถังหมักแบบอากาศลอยตัวให้มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 4 (จากข้อ 6.1) มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 1.4 (จากข้อ 6.2) ปรับให้มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 2.75, 2.1 และ 1.65 แล้วนำมาเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 โดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตร ที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 ในระหว่างการเพาะเลี้ยงใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 vvm และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 2.75, 2.1 และ 1.65 พบว่ามีการผลิตบีตา-กลูแคนสูงที่สุด เท่ากับ 998.8, 966.1 และ 1,004.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48, 52 และ 48 ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนแปลงของปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผลิตในระหว่างการเพาะเลี้ยงมีรูปแบบที่คล้ายกันดังนี้ ปริมาณบีตา-กลูแคนสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 36 และในช่วงชั่วโมงที่ 36 ถึงชั่วโมงที่ 52 ปริมาณบีตา-กลูแคนสูงขึ้นแต่ไม่มากนัก หลังจากชั่วโมงที่ 52 ปริมาณบีตา-กลูแคนลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยในช่วง 16 ชั่วโมงแรก ปริมาณบีตา-กลูแคนใกล้เคียงกันมากจากนั้นเริ่มมีความแตกต่างกันในชั่วโมงที่ 16 ถึงชั่วโมงที่ 48 บีตา-กลูแคนจากมากไปน้อยได้จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 1.65, 2.1 และ 2.75 จากนั้นในช่วงชั่วโมงที่ 52 ถึงชั่วโมงที่ 72 ปริมาณบีตา-กลูแคนลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยปริมาณบีตา-กลูแคนจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 2.75 ให้บีตา-กลูแคนมากที่กว่าอีกสองการทดลองในช่วงเวลาดังกล่าว (ภาพที่ 18 ก)

สำหรับบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 2.75, 2.1 และ 1.65 สูงที่สุดเท่ากับ 134.9, 132.5 และ 127.8 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 52, 52 และ 48 ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงของปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงมีรูปแบบที่คล้ายกัน คือในช่วงชั่วโมงที่ 16 ถึงชั่วโมงที่ 32 ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและใกล้เคียงกัน จากนั้นในช่วงชั่วโมงที่ 32 ถึงชั่วโมงที่ 52 ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องแต่เริ่ม

แตกต่างกันชัดเจน หลังจากนั้นปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 72 จากผลการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t สูงให้บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงสุดมากกว่าจากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t น้อยลง (ภาพที่ 18 ข)

การเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 2.75, 2.1 และ 1.65 มากสูงสุดเท่ากับ 8.85, 8.73 และ 8.50 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 44, 40 และ 40 ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนแปลงการเจริญในระหว่างการเพาะเลี้ยงมีรูปแบบคล้ายกันดังนี้ ในช่วง 44 ชั่วโมงแรกมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 2.1 และ 1.65 มีการเจริญใกล้เคียงกันและมากกว่าการเจริญจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 2.75 หลังจากนั้นในช่วงชั่วโมงที่ 44 ถึงชั่วโมงที่ 72 การเจริญลดลงช้าๆ โดยเมื่อเพาะในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 2.75, 2.1 และ 1.65 ในชั่วโมงที่ 72 *S. cerevisiae* TJ3 มีเซลล์เหลือเพียง 4.88, 3.65 และ 3.36 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 18 ค)

การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลทั้ง 72 ชั่วโมงมีรูปแบบคล้ายกัน คือลดลงอย่างต่อเนื่องจนต่ำที่สุดในชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 5.13, 5.10 และ 5.09 เมื่อเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 2.75, 2.1 และ 1.65 ตามลำดับ จากนั้น pH เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและใกล้เคียงกันจนถึงชั่วโมงที่ 72 โดยอาหารเหลวกากน้ำตาลมี pH สูงที่สุด 8.36, 8.32 และ 8.33 (ภาพที่ 18 ง)

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอทานอลเมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 2.75, 2.1 และ 1.65 พบว่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยอย่างต่อเนื่องในช่วง 24 ชั่วโมงแรก โดยจากเอทานอลเริ่มต้นที่มีในอาหารเหลวกากน้ำตาลเท่ากับ 0.22 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 0.47, 0.46 และ 0.46 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 20, 20 และ 24 ตามลำดับ และหลังจากนั้นเอทานอลลดลงอย่างต่อเนื่องและหมดไปในช่วงโมงที่ 52 (ภาพที่ 18 จ)

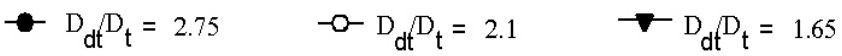
การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลมีรูปแบบที่คล้ายกันในทุกการทดลอง คือเมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 2.75, 2.1 และ 1.65 ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 28 ชั่วโมงแรกโดยลดจาก 2 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 0.10, 0.10 และ 0.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และลดลงอย่างต่อเนื่องจากนั้นน้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลจึงหมดไปในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 18 ฉ)

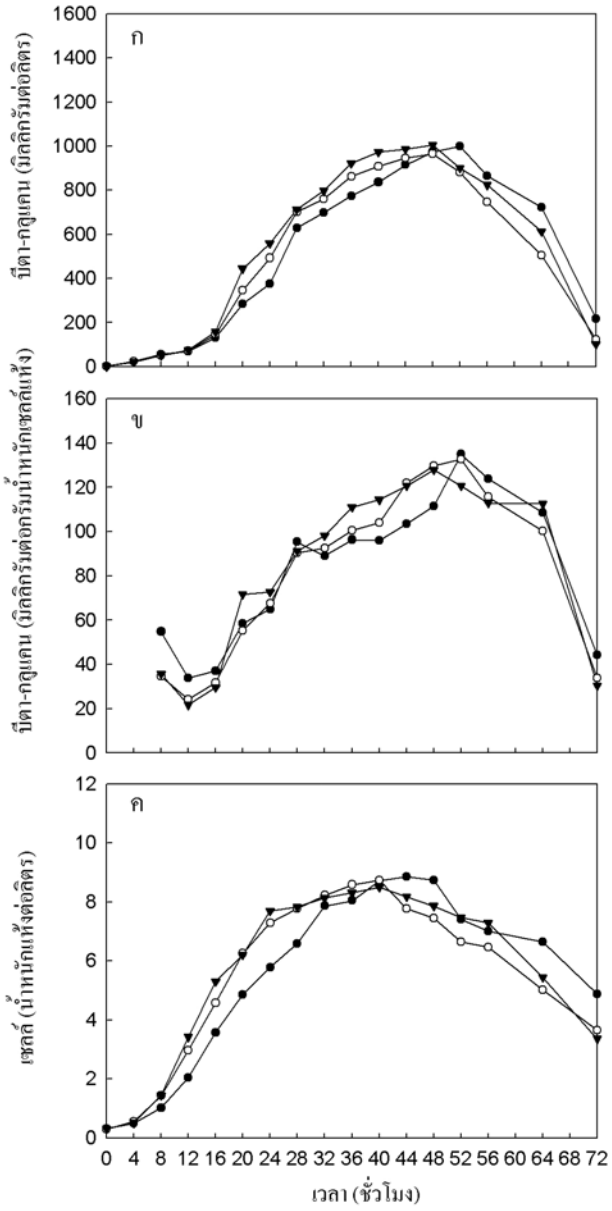
ผลการทดลองแสดงว่าการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 1.65 *S. cerevisiae* TJ3 สามารถผลิตบีตา-กลูแคนและบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงที่สุด และการเจริญก็ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยถังหมักที่มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 1.65 ที่ใช้นี้มีอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลาง draught tube ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของถังหมัก (D_t/D_{dt}) เท่ากับ 0.63 ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับการทดลองของ Koide *et al.* (1983) ที่พบว่าอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลาง draught tube ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของถังหมักที่เหมาะสมของถังหมักแบบอากาศลอยตัวอยู่ในช่วง 0.5 ถึง 0.75 และ Weiland (1984) รายงานว่าเมื่ออัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลาง draught tube ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของถังหมักเท่ากับ 0.6 สัมประสิทธิ์การถ่ายโอนมวลจากแก๊สสู่ของเหลวมีค่าสูงสุด ดังนั้นจึงเลือก draught tube ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 10 เซนติเมตร สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

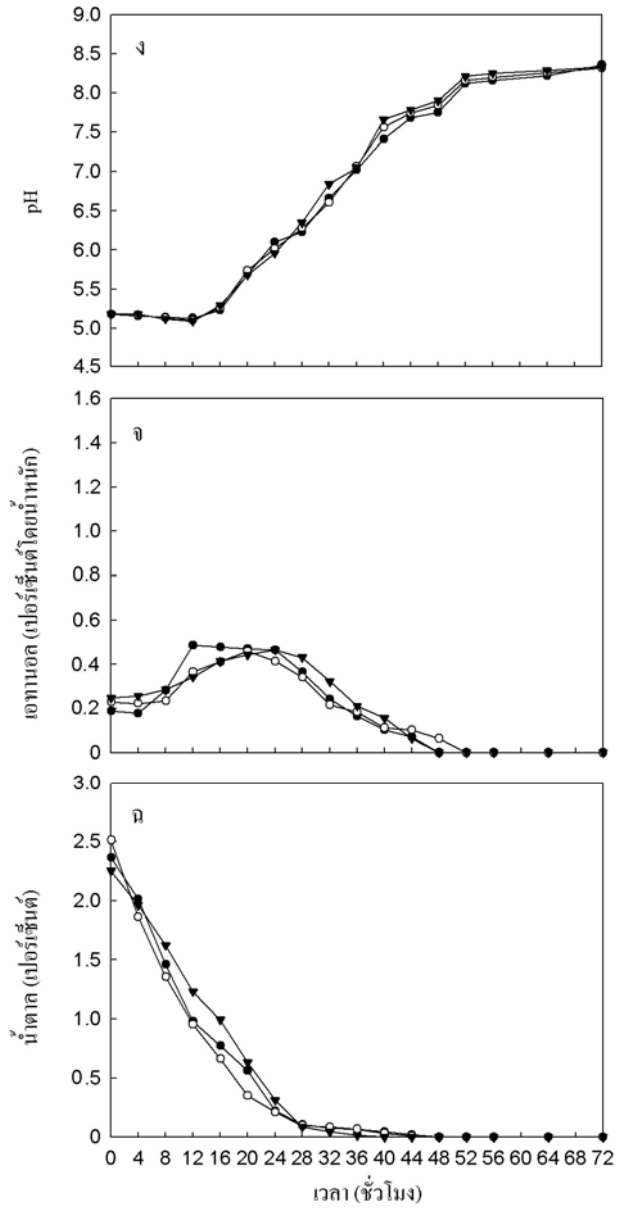
จากผลการทดลองในข้อ 6.1 ถึง 6.3 แสดงว่า เมื่อใช้ถังหมักระบบอากาศลอยตัว ขนาด 6 ลิตร ซึ่งทำการปรับถังหมักแบบอากาศลอยตัวให้มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 4 มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 1.4 และมีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 1.65 *S. cerevisiae* TJ3 สามารถผลิตบีตา-กลูแคนได้เท่ากับ 1,004.6 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพที่ 18 การผลิตบีตา-กลูแคน (ก) บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ค) pH (ง) เอทานอล (จ) และน้ำตาล (ฉ) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัว อัตราการให้อากาศ 2 vvm มีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 2.75, 2.1 และ 1.65 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตรที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตรเป็น 0.5

คำอธิบายสัญลักษณ์




ก
ข
ค
บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
เซลล์ (น้ำหนักแห้งต่อลิตร)
เวลา (ชั่วโมง)


ง
pH
จ
เอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
ฉ
น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)
เวลา (ชั่วโมง)

ภาพที่ 18 (ต่อ)

7. <u>การผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกโดยใช้ถังหมักแบบอากาศลอยตัว ขนาด 150 ลิตร และการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ และแบบเฟด-แบตช์</u>

7.1 การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

ทำการขยายขนาดถังหมักแบบอากาศลอยตัวเป็นขนาด 150 ลิตร โดยให้มีสัดส่วนใกล้เคียงกับถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่ได้จากการศึกษาในข้อ 6 ดังนี้สูง 100 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 40 เซนติเมตร ภายในติดตั้ง Draught tube สูง 35 เซนติเมตร สูงจากก้นถัง 8 เซนติเมตร ติดตั้งหัวจ่ายอากาศที่ก้นถังแล้วนำมาเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 100 ลิตร ที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 และเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ในการเพาะเลี้ยงให้อากาศในอัตรา 1.0 vvm

จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบแบตช์ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 150 ลิตร พบว่ามีการผลิตบีตา-กลูแคนเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 20 ชั่วโมงแรก โดยมีบีตา-กลูแคนสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 20 เท่ากับ 764.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 24 ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผลิตได้กลับลดต่ำลงเหลือเพียง 523.8 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเซลล์จึงมีการผลิตบีตา-กลูแคนเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องอีกครั้งจนถึงชั่วโมงที่ 36 ซึ่งผลิตบีตา-กลูแคน 729.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับชั่วโมงที่ 20 หลังจากนั้นปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผลิตได้จึงต่ำลงเล็กน้อย (ภาพที่ 19 ก)

ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก จากชั่วโมงที่ 0 ซึ่งมีบีตา-กลูแคน 93.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง จนถึงชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 101.8 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง และชั่วโมงที่ 48 โดยมีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ 83.9 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 19 ก)

การเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 สูงที่สุดในช่วง 8 ชั่วโมงแรก โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 0.32 ในช่วงชั่วโมงดังกล่าว จากนั้นเซลล์มีการเจริญต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 20 ซึ่งให้เซลล์สูงที่สุด 8.8 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร จากนั้นการเจริญค่อนข้างคงที่ (ภาพที่ 19 ข)

น้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญรวดเร็วที่สุด โดยลดลงจาก 2.50 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 0 เหลือเพียง 0.23 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 8 จากนั้นในช่วงชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 48 น้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงอย่างช้าๆ (ภาพที่ 19 ข)

เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรก เช่นเดียวกับการเจริญ โดยจากชั่วโมงที่ 0 ซึ่งมี 0.13 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนในชั่วโมงที่ 8 มีปริมาณสูงที่สุด 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากนั้นจึงลดลงอย่างต่อเนื่องและหมดไปในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 19 ค)

pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 8 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญรวดเร็วที่สุด โดย pH ต่ำที่สุด 4.92 ในช่วงดังกล่าว เนื่องจากซลล์สร้างสารตัวกลางที่ใช้ในการเจริญซึ่งประกอบด้วยกรดหลายชนิด ส่งผลให้ pH ลดต่ำลง จากนั้น pH เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 20 ซึ่งมี pH 6.8 หลังจากนั้น pH ค่อนข้างเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ โดยสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 โดยมี pH 7.25 เนื่องจากเซลล์หยุดการเจริญและมีเซลล์บางส่วนแตก (ภาพที่ 19 ค)

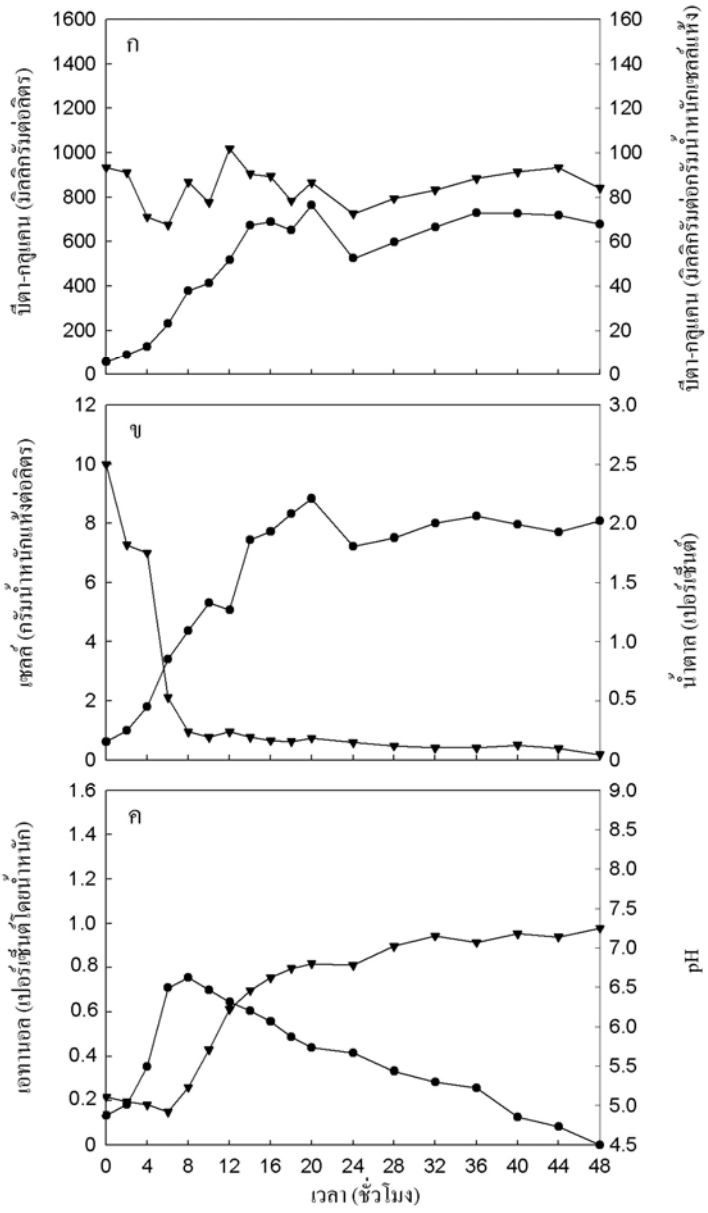
อุณหภูมิภายในถังหมักเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญรวดเร็วที่สุด โดยเพิ่มจาก 29.5 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 0 เป็น 33.6 องศาเซลเซียส เนื่องจากเซลล์มีการคายความร้อนจากกระบวนการหายใจออกมา อุณหภูมิภายในถังหมักจึงเพิ่มสูงขึ้น ในชั่วโมงที่ 12 จากนั้นในช่วงชั่วโมงที่ 16 ถึงชั่วโมงที่ 48 อุณหภูมิภายในถังหมักค่อนข้างคงที่

ภาพที่ 19 การผลิตบีตา-กลูแคนและบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (ก) น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำตาล (ข) และเอทานอลและ pH (ค) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัว ขนาด 150 ลิตร แบบแบตช์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 อัตราการให้อากาศ 1 vvm และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส)

คำอธิบายสัญลักษณ์

—■— บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อลิตร), เซลล์ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร) และเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)

—▼— บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง), น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์) และ pH


ก
ข
ค
น้ำตาล-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
น้ำตาล-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
เซลล์ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร)
น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)
เอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
pH
เวลา (ชั่วโมง)

จากผลการทดลองแสดงว่า เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบแบตช์ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 150 ลิตร สามารถผลิตบีตา-กลูแคนได้สูง 764.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 20 ซึ่งต่ำกว่าที่ผลิตได้เมื่อใช้ถังหมักขนาด 6 ลิตร (ซึ่งผลิตได้ 1004.6 มิลลิกรัมต่อลิตร) เซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงที่สุด 101.8 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง มีการเจริญให้เซลล์สูงที่สุดในชั่วโมง ที่ 8 เท่ากับ 8.8 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร

จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบแบตช์ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 150 ลิตร โดยใช้น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าน้ำตาลถูกใช้หมดไปมากภายในเวลาเพียง 8 ชั่วโมง และมีการผลิตเอทานอลไม่มากนัก แสดงให้เห็นว่าเซลล์สามารถใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญได้อย่างเต็มที่แล้ว และไม่เกิด Reverse Pasteur Effect ดังนั้นการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ด้วยน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ จึงอาจไม่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ เพราะอาจเป็นความเข้มข้นที่ต่ำเกินไป เพราะน้ำตาลถูกใช้เกือบหมดไปภายในเวลาอันรวดเร็ว ดังนั้นเพื่อเพิ่มการผลิตบีตา-กลูแคน จึงทำการทดลองเพราะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบแบตช์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำการทดลองในระดับฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ใช้ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร แล้วพบว่า *S. cerevisiae* TJ3 มีการผลิตบีตา-กลูแคนและการเจริญใกล้เคียงกับเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงกว่าอาจเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์มากกว่า เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารที่มีน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ แบบแบตช์พบว่าการผลิตบีตา-กลูแคนเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 20 ชั่วโมงแรก โดยมีบีตา-กลูแคนสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 20 เท่ากับ 783.3 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 24 ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผลิตได้กลับลดต่ำลงเหลือเพียง 665.6 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเซลล์จึงมีการผลิตบีตา-กลูแคนเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องอีกครั้งแต่ไม่สูงมากนัก (ภาพที่ 20 ก)

ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก จากชั่วโมงที่ 0 ซึ่งมีบีตา-กลูแคน 89.7 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง หลังจากนั้นปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 20 ก)

การเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 สูงที่สุดในช่วง 12 ชั่วโมงแรก โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 0.32 ในช่วงชั่วโมงดังกล่าว จากนั้นเซลล์มีการเจริญต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 20 ซึ่งให้เซลล์สูงที่สุด 8.8 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร และลดลงเหลือ 7.5 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นการเจริญค่อนข้างคงที่ (ภาพที่ 20 ข)

น้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญรวดเร็วที่สุด โดยลดลงจาก 2.50 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 0 เหลือเพียง 2.8 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 8 จากนั้นในช่วงชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 48 น้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 20 ข)

เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 20 ชั่วโมงแรก โดยจากชั่วโมงที่ 0 ซึ่งมี 0.11 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนในชั่วโมงที่ 18 มีปริมาณสูงที่สุด 1.40 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากนั้นจึงลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 0.20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 20 ค)

pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 8 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นโดย pH ต่ำที่สุด 4.97 ในช่วงดังกล่าว จากนั้น pH เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมี pH 7.28 (ภาพที่ 20 ค)

อุณหภูมิภายในถังหมักเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก โดยเพิ่มจาก 28.5 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 0 เป็น 35.5 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นอุณหภูมิภายในถังหมักลดลงเหลือประมาณ 32 องศาเซลเซียส และค่อนข้างคงที่ที่อุณหภูมิดังกล่าวจนถึงชั่วโมงที่ 48

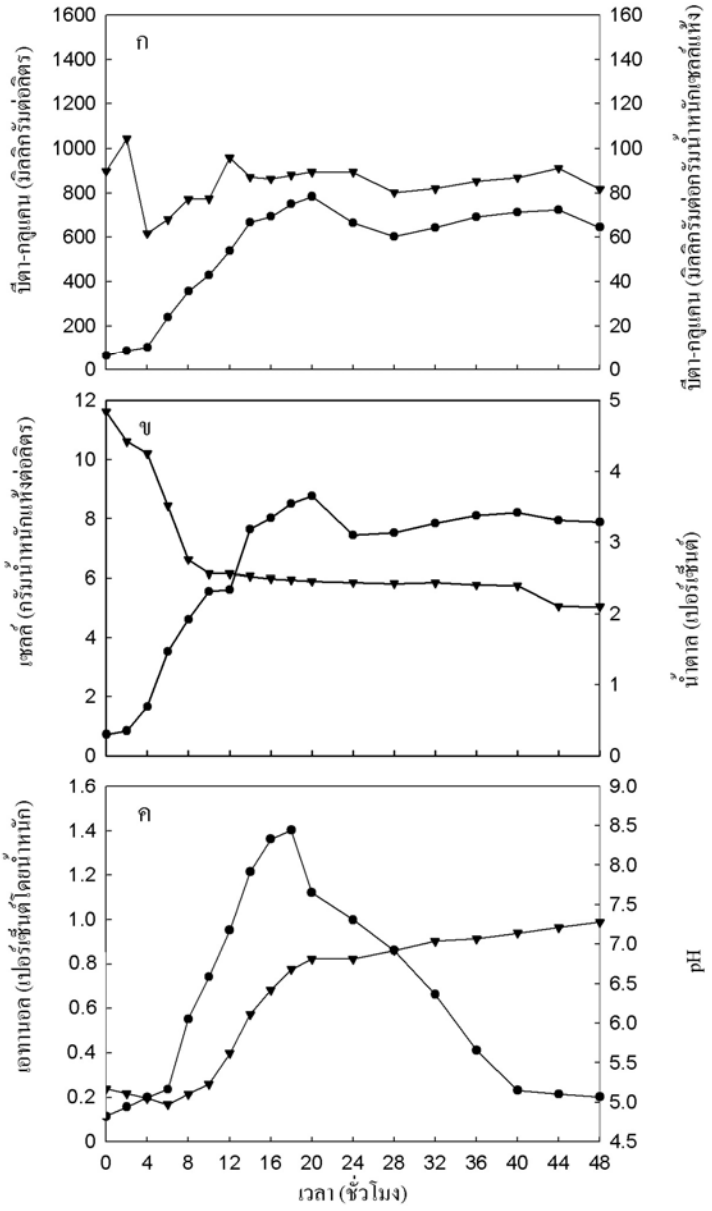
จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ มีการผลิตบีตา-กลูแคนไม่แตกต่างกับเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดการหมักน้ำตาลในอาหารยังไม่หมดไป โดยเหลือถึง 2.8 เปอร์เซ็นต์ และในระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการผลิตเอทานอลออกมาสูงถึง 1.40 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 20 การผลิตบีตา-กลูแคนและบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (ก) น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำตาล (ข) และเอทานอลและ pH (ค) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัว ขนาด 150 ลิตร แบบแบตช์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 อัตราการให้อากาศ 1 vvm และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส)

คำอธิบายสัญลักษณ์

—●— บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อลิตร), เซลล์ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร) และเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)

—▼— บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง), น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์) และ pH


ก
ข
ค
บีดา-คลูแคน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
บีดา-คลูแคน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
เซลล์ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร)
น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)
เอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
pH
เวลา (ชั่วโมง)

อาจทำให้เกิด Reverse Pasteur Effect ทำให้การเจริญของเซลล์ลดลง หากมีการทำเฟด-แบตช์อาจช่วยให้ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงขึ้น ดังนั้นจึงทำการทดลองเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยกำหนดให้น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ในขั้นตอนต่อไป

7.2 การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์

การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์เฟด-แบตช์เป็นการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างลงไปในอาหารที่เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นระยะๆ โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าออก มีข้อดีคือสามารถควบคุมปริมาณสับสเตรตให้เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และช่วยลด Reverse Pasteur Effect ซึ่งเกิดจากปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไปทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญลดลง และยีสต์ *S. cerevisiae* มีความไวต่อกลูโคสมาก ความเข้มข้นของกลูโคสเพียงเล็กน้อยสามารถยับยั้งกระบวนการหายใจของ *S. cerevisiae* ได้ (วิศัลย์, 2546) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ซึ่งเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงด้วยการใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูง อาจส่งผลให้ *S. cerevisiae* ถูกยับยั้งการเจริญผลผลิตที่ต้องการจากเซลล์อาจลดลงด้วย การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจต่อการผลิตผลผลิตจากเซลล์ *S. cerevisiae* เพราะเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีสับสเตรตน้อยแล้วจึงเติมอาหารให้เพียงต่อความต้องการของ *S. cerevisiae* ส่งผลให้ผลิตเซลล์ได้มากและการผลิตเอทานอลลดลงเพราะอาหารถูกเปลี่ยนเป็นเซลล์ได้อย่างเต็มที่ ด้วยเหตุผลดังกล่าวการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์เฟด-แบตช์จึงอาจมีความเหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนด้วย *S. cerevisiae*TJ3 โดยสามารถแบ่งการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์เป็น 3 รูปแบบ ตามรูปแบบการเติมอาหารคือ แบบ linear incremental feeding ซึ่งเป็นการแบ่งอาหารเติมในคาบเวลาที่เท่ากันโดยใช้อาหารที่มีองค์ประกอบโดยเฉพาะความเข้มข้นของน้ำตาลเหมือนกัน แบบ exponential incremental feeding ซึ่งเป็นการเติมอาหารโดยใช้อาหารที่มีองค์ประกอบโดยเฉพาะความเข้มข้นของน้ำตาลพิจารณาจากอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของจุลินทรีย์ และแบบ sigmoidal incremental feeding ซึ่งเป็นการเติมอาหารโดยใช้อาหารที่มีองค์ประกอบโดยเฉพาะความเข้มข้นของน้ำตาลพิจารณาจากอัตราการเจริญจำเพาะ ณ เวลาที่ทำการเติมอาหาร ซึ่งอาหารที่ใช้เติมดังกล่าว สามารถออกแบบให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น ออกแบบให้อาหารรวมหลังการเติมมีความเข้มข้นของน้ำตาลไนโตรเจน หรือฟอสเฟตมีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ณ เวลาที่ทำการเติม เป็นต้น

7.2.1 การเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ linear incremental feeding

ใช้ถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 150 ลิตร จากข้อ 7.1 ทำการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาล 100 ลิตร โดยการเพาะเลี้ยงปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 ใช้อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) และในระหว่างการเพาะเลี้ยงใช้อัตราการให้อากาศ 1 vvm ในการทำเฟด-แบตช์เติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ linear incremental feeding ซึ่งกำหนดให้น้ำตาลที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ โดย อาหารเหลวกากน้ำตาลเริ่มต้นในช่วงการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์มีปริมาตร 80 ลิตร ประกอบด้วย น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ส่วนอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ใช้เติมปริมาตรรวม 20 ลิตร ประกอบด้วย น้ำตาล 17 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) แบ่งเติม 4 ครั้ง ครั้งละ 5 ลิตร เติมทุกๆ 8 ชั่วโมง เติมครั้งแรกในชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง และครั้งต่อๆ ไปเติมในชั่วโมงที่ 16, 24 และ 32 ตามลำดับ

จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ linear incremental feeding ตามวิธีข้างต้นพบว่าเซลล์มีการผลิตบีตา-กลูแคนเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 8 ชั่วโมงแรก โดยในชั่วโมงที่ 8 ผลิตบีตา-กลูแคนได้ 474.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 ในชั่วโมงที่ 8 การผลิตบีตา-กลูแคนยังคงสูงขึ้น ในชั่วโมงที่ 16 ผลิตบีตา-กลูแคนได้ 694.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 ในชั่วโมงที่ 16 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 20 ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงที่สุด 1,165.4 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 ในชั่วโมงที่ 24 พบว่าในชั่วโมงที่ 28 ผลิตบีตา-กลูแคนได้ 1,025.1 แต่หลังจากเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 ในชั่วโมงที่ 32 พบว่าการผลิตบีตา-กลูแคนลดลง โดยในชั่วโมงที่ 48 เหลือบีตา-กลูแคนเพียง 786.7 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 21 ก)

ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ในชั่วโมงที่ 8 เท่ากับ 98.8 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 ซึ่งเท่ากับ 69.8 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง หลังจากนั้นถึงแม้มีการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลอีกถึงสี่ครั้งปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยมีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ 115.7 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ใน

ชั่วโมงที่ 16 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 เซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ 114.6 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 24 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 เซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ 115.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 28 และลดลงเหลือ 109.7 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 32 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 102.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 21 ก)

การเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 สูงที่สุดในช่วง 8 ชั่วโมงแรก โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 0.35 โดยในชั่วโมงที่ 8ให้เซลล์ 4.8 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร จากนั้นเมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 ในชั่วโมงที่ 8 ความเข้มข้นของเซลล์ลดลงเล็กน้อยเนื่องจากปริมาตรอาหารเหลวกากน้ำตาลเพิ่มขึ้น และให้เซลล์ 6.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 16 เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 เซลล์เจริญอย่างรวดเร็วให้เซลล์สูงที่สุด 10.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 20 แต่ลดเหลือ 6.5 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งอาจเกิดจากเซลล์มีความเข้มข้นสูงจึงเกิดการรวมตัวกันและตกตะกอน เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและให้เซลล์ 8.7 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 32 เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 ความเข้มข้นเซลล์ลดลงจาก 9.1 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 32 เหลือเพียง 6.8 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งอาจเกิดจากเซลล์มีความเข้มข้นสูงจึงเกิดการรวมตัวกันและตกตะกอนอีกครั้ง แม้ว่าในชั่วโมงที่ 40 มีการเจริญเพิ่มขึ้นให้เซลล์ 8.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร แต่หลังจากนั้นการเจริญลดลงเล็กน้อย (ภาพที่ 21 ข)

น้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญรวดเร็วที่สุด โดยลดลงเหลือเพียง 0.31 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 8 เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 น้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 1.02 เปอร์เซ็นต์ และลดลงอย่างต่อเนื่องจนเหลือเพียง 0.27 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 16 เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 น้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 0.75 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นลดลงเหลือ 0.23 ในชั่วโมงที่ 24 เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 น้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 0.66 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นลดลงเล็กน้อยเหลือ 1.16 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 24 เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 น้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 0.23 เปอร์เซ็นต์ และลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 0.06 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 40 (ภาพที่ 21 ข)

เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรก เช่นเดียวกับการเจริญ โดยจากชั่วโมงที่ 0 ซึ่งมี 0.19 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนในชั่วโมงที่ 8 ซึ่งมีเอทานอล 0.65 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลยังคงเพิ่มสูงอย่างต่อเนื่องเป็น 0.77 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 16 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลยังคงเพิ่มสูงขึ้นและสูงถึง 1.11 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 20 จากนั้นลดลงเหลือ 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 24 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งและสูงถึง 1.10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 28 จากนั้นลดลงเหลือ 0.98 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 32 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 แม้ว่าในชั่วโมงที่ 32 มีเอทานอลสูงถึง 1.16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แต่ก็ลดลงเหลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 36 จากนั้นเอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 21 ค)

pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 8 ชั่วโมงแรก โดยลดลงจาก pH 5.28 ในชั่วโมงที่ 0 เป็น pH 5.02 ในชั่วโมงที่ 8 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลยังคงลดลงและต่ำที่สุดเป็น pH 4.97 ในชั่วโมงที่ 12 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 16 จึงเพิ่มขึ้นเป็น pH 5.20 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลเป็น 5.08 และ pH 5.26 ในชั่วโมงที่ 24 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 pH ลดลงเล็กน้อยเป็น pH 5.12 ในชั่วโมงที่ 32 และหลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 ในชั่วโมงที่ 48 มี pH คงที่ (ภาพที่ 21 ค)

อุณหภูมิภายในถังหมักเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรก โดยเพิ่มจาก 28.9 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 0 เป็น 32.6 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 8 หลังจากนั้นอุณหภูมิภายในถังหมักค่อนข้างคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 48 โดยอุณหภูมิภายในถังหมักสูงที่สุด 34.9 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 20

จากผลการทดลองแสดงว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ linear incremental feeding ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 150 ลิตร การเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 ไม่เพิ่มการผลิตบีตา-กลูแคนนัก โดยเซลล์ยังคงเจริญ

อย่างต่อเนื่อง แต่เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 เซลล์มีการเจริญสูงขึ้นมาก ส่งผลให้มีการผลิตบีตา-กลูแคนสูงขึ้นตามไปด้วย เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 และ 4 เซลล์และการผลิตบีตา-กลูแคนก็ยังสูงกว่าที่ได้จากการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 ซึ่งอาจเกิดจากในการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 เซลล์ยังใช้น้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลไม่หมดจึงให้เซลล์ได้น้อยกว่าเมื่อมีการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งหลังจากนั้น ซึ่งเซลล์ใช้น้ำตาลเกือบหมดแล้วจึงมีเซลล์มากกว่า และในการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ยังมีค่าค่อนข้างต่ำ ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผลิตได้จึงน้อยกว่าเมื่อมีการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งหลังจากนั้น ซึ่งในการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2, 3 และ 4 เซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ค่อนข้างสูงกว่าช่วงแรกๆ ของการเพาะเลี้ยงจึงผลิตบีตา-กลูแคนได้มากกว่าช่วงแรก โดยผลิตบีตา-กลูแคนสูงที่สุดเมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 ซึ่งเซลล์ใช้น้ำตาลได้เกือบหมดเซลล์มีการเจริญสูงจึงให้เซลล์ได้สูงและส่งผลให้อุณหภูมิสูงที่สุดในช่วงดังกล่าวด้วย

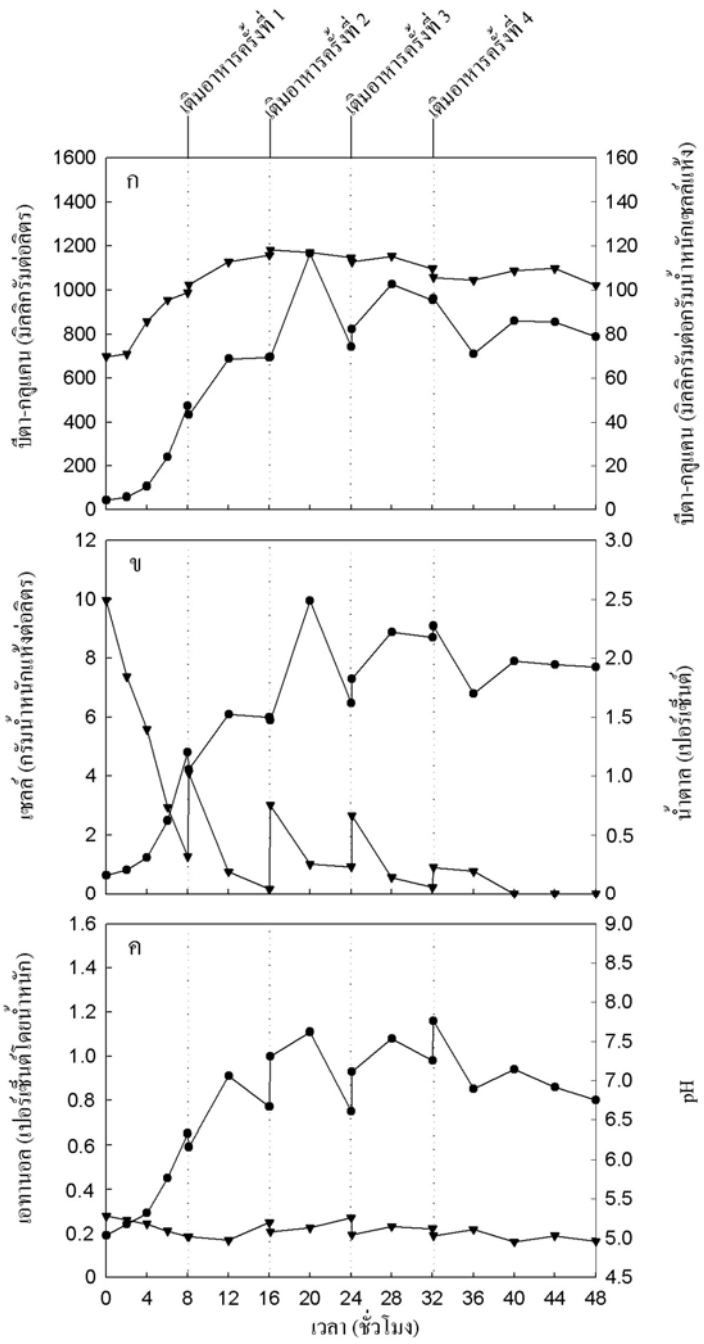
จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ linear incremental feeding ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 150 ลิตร หลังการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงสุด 1,165.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เจริญให้เซลล์สูงสุด 9.95 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 20

ภาพที่ 21 การผลิตบีตา-กลูแคนและบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (ก) น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำตาล (ข) และ เอทานอลและ pH (ค) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัว ขนาด 150 ลิตร แบบเฟดแบตช์โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ linear incremental feedingในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 อัตราการให้อากาศ 1 vvm และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส)

คำอธิบายสัญลักษณ์

—●— บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อลิตร), เซลล์ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร) และเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)

—▼— บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง), น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์) และ pH


เติมอาหารครั้งที่ 1
เติมอาหารครั้งที่ 2
เติมอาหารครั้งที่ 3
เติมอาหารครั้งที่ 4
ก
บีดา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
บีดา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
ข
เซลล์ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร)
น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)
ค
เอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
pH
เวลา (ชั่วโมง)

7.2.2 การเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ exponential incremental feeding

ใช้ถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 150 ลิตร จากข้อ 7.1 ทำการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาล 100 ลิตร โดยการเพาะเลี้ยงปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 ใช้อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) และในระหว่างการเพาะเลี้ยงใช้อัตราการให้อากาศ 1 vvm ในการทำเฟด-แบตช์เติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ exponential incremental feeding ซึ่งกำหนดให้น้ำตาลที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยอาหารเหลวกากน้ำตาลเริ่มต้นในช่วงการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์มีปริมาตร 80 ลิตร ประกอบด้วย น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ส่วนอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ใช้เติมปริมาตรรวม 20 ลิตร ประกอบด้วย น้ำตาล 17 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) แบ่งเติม 4 ครั้ง เติมทุกๆ 8 ชั่วโมง เติมครั้งแรกในชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง และครั้งต่อๆ ไปเติมในชั่วโมงที่ 16, 24 และ 32 ตามลำดับ โดยปริมาตรที่เติมแต่ละครั้งคำนวณจากสมการด้านล่างตามรายละเอียดในอุปกรณ์และวิธีการข้อ 8.2.2

$$V_F = \frac{e^{\mu_{max} t}}{\sum e^{\mu_{max} t}} \times V_t$$

โดย μ_{max} มีค่าเท่ากับ 0.35 ต่อชั่วโมง ปริมาตรอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแต่ละครั้งแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เวลาและปริมาตรอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแบบ exponential incremental feeding

ครั้งที่เติม	เวลา (ชั่วโมง)	$e^{\mu_{max}*t}$	V_F (ลิตรต่อ 8 ชั่วโมง)
1	8	1.00	0.004
2	16	16.44	0.070
3	24	270.42	1.140
4	32	4447.06	18.800

จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ exponential incremental feeding ตามวิธีการข้างต้นพบว่าเซลล์มีการผลิตบีตา-กลูแคนเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 8 ชั่วโมงแรก โดยในชั่วโมงที่ 8 ผลิตบีตา-กลูแคนได้ 360.3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 การผลิตบีตา-กลูแคนยังคงสูงขึ้น ชั่วโมงที่ 16 ผลิตบีตา-กลูแคนได้ 536.3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 การผลิตบีตา-กลูแคนยังเพิ่มขึ้นและผลิตได้ 717.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 การผลิตบีตา-กลูแคนสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและผลิตได้ 844.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 32 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 บีตา-กลูแคนสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งผลิตได้ 991.8 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 22 ก)

ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ในชั่วโมงที่ 8 เท่ากับ 89.9 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 ซึ่งเท่ากับ 72.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยมีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูง 101.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 16 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 ในชั่วโมงที่ 16 เซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ยังคงสูงขึ้นและมีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ 112.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 24 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ค่อนข้างคงที่เท่ากับ 109.9 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 32 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์คงที่ โดยเซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ 114.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 22 ก)

การเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 สูงที่สุดในช่วง 8 ชั่วโมงแรก โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 0.29 โดยในชั่วโมงที่ 8 ให้เซลล์ 4.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 เซลล์ยังคงมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และให้เซลล์ 5.3 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 16 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 เซลล์เจริญให้เซลล์ 6.4 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 ในชั่วโมงที่ 24 เซลล์มีการเจริญให้เซลล์ 7.7 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 32 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 ความเข้มข้นเซลล์ลดลงจาก 7.7 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร เหลือ 6.4 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 32 ซึ่งอาจเกิดจากการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งนี้ใช้ปริมาตรมากกว่า 3 ครั้งแรกมาก จากนั้นเซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องอีกครั้งและให้

เซลล์สูงที่สุด 8.7 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 22 ข)

น้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญรวดเร็วที่สุด โดยลดลง เหลือเพียง 0.42 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 8 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 น้ำตาลลดลงเหลือเพียง 0.10 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 16 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 น้ำตาลไม่เพิ่มขึ้นเพราะเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลน้อยและลดลงเหลือ 0.07 ในชั่วโมงที่ 24 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 น้ำตาลยังลดลงอย่างต่อเนื่องและหมดไปในชั่วโมงที่ 32 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 น้ำตาลเพิ่มสูงขึ้นเป็น 3.21 เปอร์เซ็นต์ และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 48 แต่ในชั่วโมงดังกล่าวก็ยังเหลือน้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลถึง 1.33 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 22 ข)

เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรกเช่นเดียวกับการเจริญ โดยจากชั่วโมงที่ 0 ซึ่งมี 0.16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนในชั่วโมงที่ 8 ซึ่งมีเอทานอล 0.60 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลยังคงเพิ่มสูงเป็น 0.74 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 12 และลดลงเหลือ 0.64 ในชั่วโมงที่ 16 เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลยังคงเพิ่มสูงขึ้นและสูงถึง 0.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 20 จากนั้นลดลงเหลือ 0.52 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 24 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งเป็น 0.61 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 28 จากนั้นลดลงเหลือ 0.57 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 32 เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลเพิ่มสูงถึง 1.43 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 36 จากนั้นเอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 22 ค)

pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 8 ชั่วโมงแรก โดยลดลงจาก pH 5.29 ในชั่วโมงที่ 0 เป็น pH 5.03 ในชั่วโมงที่ 8 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น pH 5.13 ในชั่วโมงที่ 16 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้นเป็น pH 5.35 ในชั่วโมงที่ 24 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 ในชั่วโมงที่ 24 pH เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น pH 5.41 ในชั่วโมงที่ 32 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 pH ลดต่ำลงอย่างช้าๆ โดยในชั่วโมงที่ 48 อาหารเหลว

กากน้ำตาลมี pH 5.05 (ภาพที่ 22 ค)

อุณหภูมิภายในถังหมักเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรก โดยเพิ่มจาก 29.2 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 0 เป็น 31.4 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 8 หลังจากนั้นอุณหภูมิภายในถังหมักค่อนข้างคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 32 เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 ในชั่วโมงที่ 32 อุณหภูมิภายในถังหมักสูงขึ้นอีกครั้งแต่ไม่มากนักโดยมีอุณหภูมิภายในถังหมักสูงที่สุด 33.5 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 40

จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ exponential incremental feeding ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 150 ลิตร การเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลทั้ง 3 ครั้งแรกส่งผลต่อการผลิตบีตา-กลูแคน บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ และการเจริญไม่มากนัก เพราะการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาล 3 ครั้งแรกนี้ใช้ปริมาตรน้อยมากจึงส่งผลให้สภาพภายในถังหมักยังคงดำเนินอย่างต่อเนื่องคล้ายการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ โดยเซลล์ยังคงเจริญอย่างต่อเนื่องโดยการใช้น้ำตาลในอาหารเพื่อการเจริญส่งผลให้น้ำตาลลดลงและหมดไปในที่สุด โดยระหว่างการใช้น้ำตาลเซลล์ผลิตเอทานอลออกมาด้วย เมื่อน้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลหมดไปเซลล์จึงใช้เอทานอลในการเจริญต่อไปอีก ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผลิตได้จึงเพิ่มขึ้นตามการเจริญ เมื่อมีการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 ซึ่งใช้ปริมาตรสูง เซลล์จึงเปลี่ยนจากการใช้เอทานอลซึ่งยังไม่หมดไปมาใช้น้ำตาลจากอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมลงมาใหม่แทน และเนื่องจากอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมมาใหม่มีปริมาตรสูง เซลล์จึงไม่สามารถใช้น้ำตาลให้หมดไปในระยะเวลาอันสั้นได้ ในชั่วโมงที่ 48 น้ำตาลจึงยังเหลืออยู่มากและมีการผลิตเอทานอลออกมาสูง แม้ว่าการผลิตบีตา-กลูแคนจะสูงขึ้นตามไปด้วย แต่ในชั่วโมงที่ 48 น้ำตาลยังเหลืออยู่มาก ดังนั้นจึงผลิตบีตา-กลูแคนได้ 991.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งอาจเพิ่มสูงขึ้นได้อีกหากใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ยาวนานขึ้น

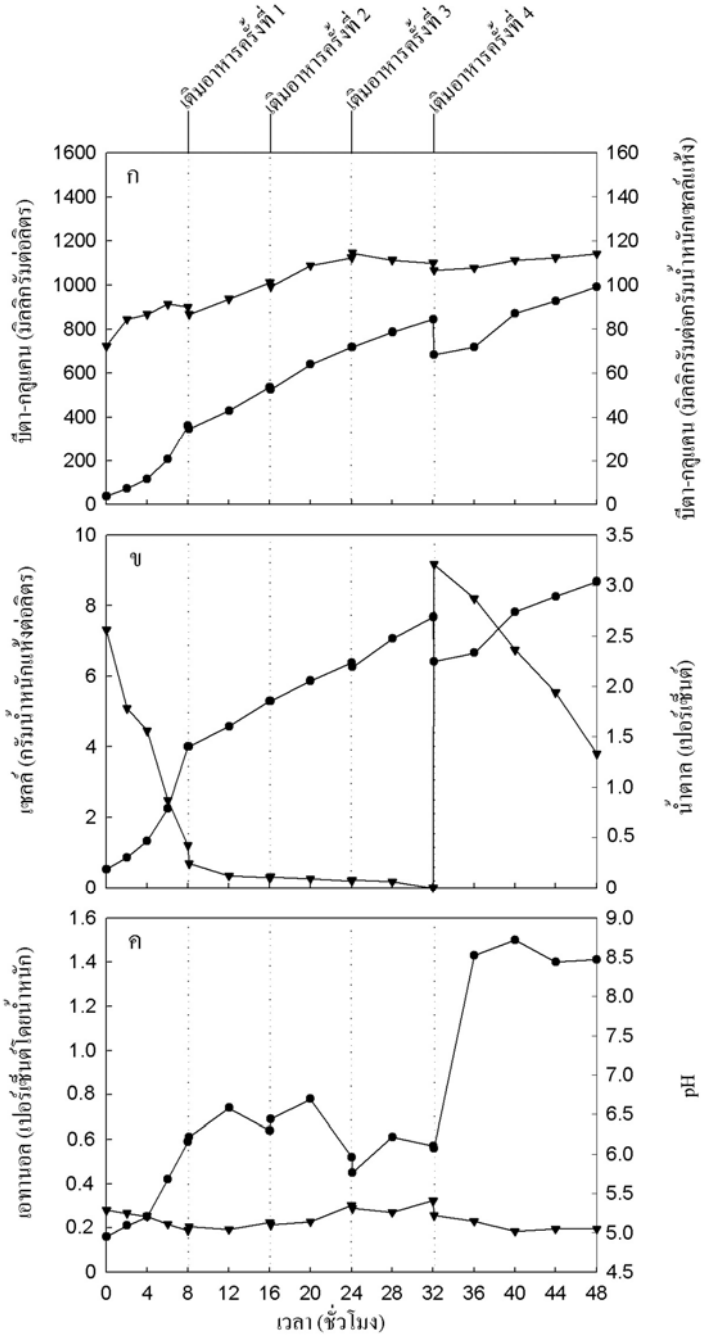
จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ exponential incremental feeding ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 150 ลิตร หลังการเติมอาหารกากน้ำตาลครั้งที่ 4 ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงสุด 991.80 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้เซลล์ได้สูงสุดเท่ากับ 8.68 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48

ภาพที่ 22 การผลิตบีตา-กลูแคนและบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (ก) น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำตาล (ข) และเอทานอลและ pH (ค) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัว ขนาด 150 ลิตร แบบเฟดแบตช์โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ exponential incremental feeding ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 อัตราการให้อากาศ 1 vvm และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส)

คำอธิบายสัญลักษณ์

—●—บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อลิตร), เซลล์ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร) และเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)

—▼—บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง), น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์) และ pH


เติมอาหารครั้งที่ 1
เติมอาหารครั้งที่ 2
เติมอาหารครั้งที่ 3
เติมอาหารครั้งที่ 4
ก
ข
ค
บีดา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
บีดา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
เซลล์ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร)
น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)
เอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
pH
เวลา (ชั่วโมง)

7.2.3 การเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ sigmoidal incremental feeding

ใช้ถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 150 ลิตร จากข้อ 7.1 ทำการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาล 100 ลิตร โดยการเพาะเลี้ยงปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 ใช้อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) และในระหว่างการเพาะเลี้ยงใช้อัตราการให้อากาศ 1 vvm ในการทำเฟด-แบตช์เติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ sigmoidal incremental feeding ซึ่งกำหนดให้น้ำตาลที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยอาหารเหลวกากน้ำตาลเริ่มต้นในช่วงการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์มีปริมาตร 80 ลิตร ประกอบด้วย น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ส่วนอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ใช้เติมปริมาตรรวม 20 ลิตร ประกอบด้วย น้ำตาล 17 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) แบ่งเติม 4 ครั้ง เติมทุกๆ 8 ชั่วโมง เติมครั้งแรกในชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง และครั้งต่อๆ ไปเติมในชั่วโมงที่ 16, 24 และ 32 ตามลำดับ โดยปริมาตรที่เติมแต่ละครั้งคำนวณจากสมการด้านล่างตามรายละเอียดในอุปกรณ์และวิธีการข้อ 8.2.3

$$V_F = \frac{\mu_{max}}{Y_{x/s} \times S_F} \times (XV_a)e^{\mu t}$$

จากการทดลองพบว่าค่าผลผลิตเซลล์จากสับสเตรต ($Y_{x/s}$) มีค่าเท่ากับ 0.43 ดังนั้นจึงใช้ค่านี้เพื่อคำนวณปริมาตรอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแต่ละครั้งซึ่งแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เวลาและปริมาตรอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแบบ sigmoidal incremental feeding

ชั่วโมงที่เติม (ชั่วโมง)	เซลล์ (กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร)	V_a (ลิตร)	μ (ต่อชั่วโมง)	$e^{\mu t}$	V_F (ลิตรต่อ 8 ชั่วโมง)
8	4.00	80.0	0.32	1.00	1.507
16	5.01	81.5	0.09	2.10	4.043
24	6.61	85.5	0.06	2.58	6.868
32	8.01	92.5	0.03	2.00	6.978

จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ sigmoidal incremental feeding พบว่าเซลล์มีการผลิตบีตา-กลูแคนเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 8 ชั่วโมงแรก โดยในชั่วโมงที่ 8 ผลิตบีตา-กลูแคนได้ 389.9 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 ยังคงผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงขึ้นถึงชั่วโมงที่ 16 ซึ่งผลิตบีตา-กลูแคนได้ 528.9 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 การผลิตบีตา-กลูแคนยังคงเพิ่มขึ้นและผลิตได้ 718.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 การผลิตบีตา-กลูแคนยังคงสูงขึ้นและผลิตได้ 918.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 32 เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 บีตา-กลูแคนยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 40 ซึ่งผลิตได้ 1,038.9 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นจึงลดลงเล็กน้อย (ภาพที่ 23 ก)

ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ในชั่วโมงที่ 8 เท่ากับ 97.7 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 ซึ่งเท่ากับ 68.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยมีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ 105.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 16 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 เซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์คงที่โดยมีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ 108.6 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 24 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงที่สุด 114.6 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 32 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก (ภาพที่ 23 ก)

การเจริญของ *S. cerevisiae* TJ3 สูงที่สุดในช่วง 8 ชั่วโมงแรก โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 0.33 โดยให้เซลล์ 4.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 8 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 เซลล์ยังคงมีการเจริญเพิ่มขึ้นให้เซลล์ 5.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 16 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 เซลล์ยังคงเจริญเพิ่มขึ้นให้เซลล์ 6.6 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้นให้เซลล์ 8.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 32 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 เซลล์ยังคงมีการเจริญอย่างต่อเนื่องและให้เซลล์สูงที่สุด 9.1 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 40 หลังจากนั้นการเจริญลดลงเล็กน้อย (ภาพที่ 23 ข)

น้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญรวดเร็วที่สุด โดยลดลงจาก 2.00 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 0 เหลือเพียง 0.04 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 8 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 น้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 0.07 เปอร์เซ็นต์ และลดลงเหลือเพียง 0.10 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 16 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 น้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และลดลงเหลือเพียง 0.08 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 24 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 น้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 0.32 เปอร์เซ็นต์ และลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 0.08 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 32 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 น้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 0.35 เปอร์เซ็นต์ และลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือเพียง 0.032 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 23 ข)

เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรกเช่นเดียวกับการเจริญ โดยจากชั่วโมงที่ 0 ซึ่งมีเอทานอล 0.16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนในชั่วโมงที่ 8 ซึ่งมีเอทานอล 0.49 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลเพิ่มสูงถึง 0.83 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 16 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลยังคงเพิ่มสูงขึ้นและสูงถึง 1.21 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 24 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงจาก 1.21 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เหลือ 0.99 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 24 หลังจากการเติมและจากนั้นลดลงเหลือ 0.86 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 32 เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องและเหลือเพียง 0.59 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 23 ค)

pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 8 ชั่วโมงแรก โดยลดลงจาก pH 5.27 ในชั่วโมงที่ 0 เป็น pH 5.05 ในชั่วโมงที่ 8 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น pH 5.08 ในชั่วโมงที่ 16 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 2 ในชั่วโมงที่ 16 pH ของอาหารเหลวกากน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้นถึง pH 5.21 ในชั่วโมงที่ 24 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 3 ในชั่วโมงที่ 24 pH ลดต่ำลงเล็กน้อยเป็น pH 5.08 ในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น pH 5.18 ในชั่วโมงที่ 32 หลังเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 pH เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ โดยในชั่วโมงที่ 48 อาหารเหลวกากน้ำตาลมี pH 5.28 (ภาพที่ 23 ค)

อุณหภูมิภายในถังหมักเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรก โดยเพิ่มจาก 28.4 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 0 เป็น 31.4 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 8 เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 ในชั่วโมงที่ 8 อุณหภูมิภายในถังหมักเพิ่มสูงขึ้นถึง 33.5 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 16 จากนั้นในช่วงชั่วโมงที่ 16 ถึงชั่วโมงที่ 28 อุณหภูมิภายในถังหมักค่อนข้างคงที่ และลดลงเล็กน้อยในช่วงชั่วโมงที่ 32 ถึงชั่วโมงที่ 48

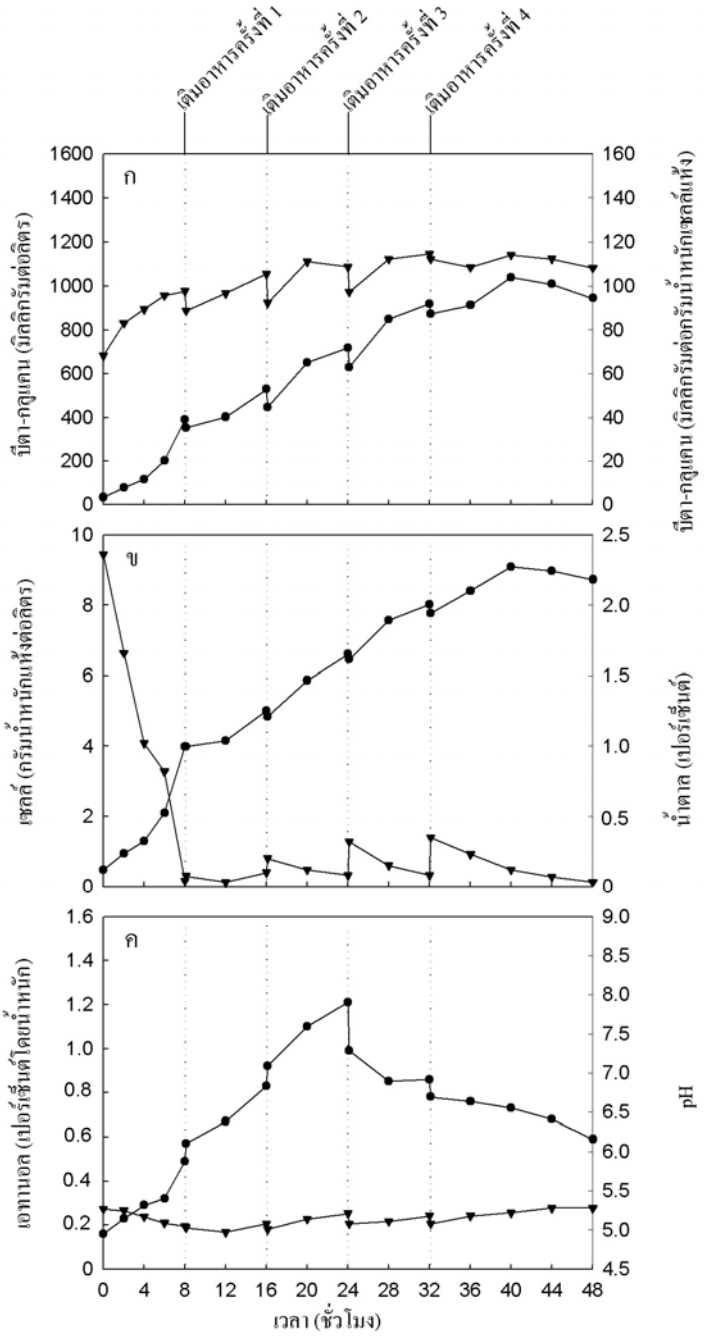
จากผลการทดลองแสดงว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์ โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ sigmoidal incremental feeding ในถังหมักแบบอากาศลอยตัว ขนาด 150 ลิตร สามารถเพิ่มการผลิตบีตา-กลูแคน บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ และการเจริญให้สูงขึ้นได้ในทุกครั้งที่ทำการเติมอาหารกากน้ำตาล เพราะการเติมอาหารกากน้ำตาลแต่ละครั้งมีความต่อเนื่องโดยการเติมแต่ละครั้งเป็นการเติมเมื่อน้ำตาลในอาหารกากน้ำตาลใกล้จะหมด เซลล์จึงได้รับน้ำตาลอย่างสม่ำเสมอ และเซลล์สามารถใช้น้ำตาลที่เติมในแต่ละครั้งได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงใช้เอทานอลไม่มากนัก ซึ่งพบว่าในชั่วโมงที่ 48 ยังคงมีเอทานอลในอาหารกากน้ำตาล 0.59 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

ภาพที่ 23 การผลิตบีตา-กลูแคนและบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (ก) น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำตาล (ข) และเอทานอลและ pH (ค) เมื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัว ขนาด 150 ลิตร แบบเฟดแบตช์โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ sigmoidal incremental feeding ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เป็น 0.5 อัตราการให้อากาศ 1 vvm และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส)

คำอธิบายสัญลักษณ์

—●— บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อลิตร), เซลล์ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร) และเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)

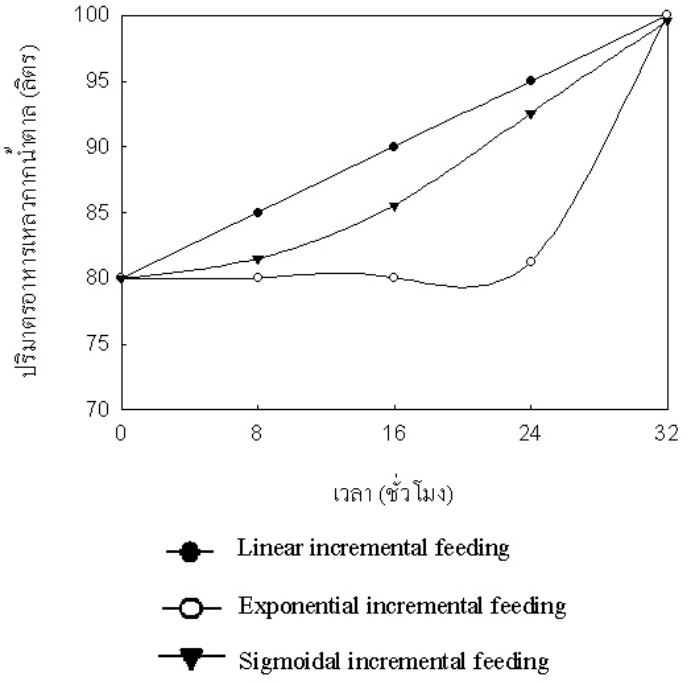
—▼— บีตา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง), น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์) และ pH


เติมอาหารครั้งที่ 1
เติมอาหารครั้งที่ 2
เติมอาหารครั้งที่ 3
เติมอาหารครั้งที่ 4
ก
ข
ค
บีดา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
บีดา-กลูแคน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
เซลล์ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร)
น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)
เอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
pH
เวลา (ชั่วโมง)

จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ sigmoidal incremental feeding ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 150 ลิตร หลังการเติมอาหารกากน้ำตาลครั้งที่ 4 ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงสุด 1,038.9 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้เซลล์ได้สูงสุดเท่ากับ 9.09 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 40

การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์ โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ linear incremental feeding, exponential incremental feeding และ sigmoidal incremental feeding การเปลี่ยนแปลงปริมาตรอาหารเหลวกากน้ำตาลระหว่างการเพาะเลี้ยงแสดงในภาพที่ 23 เมื่อเปรียบเทียบผลของรูปแบบการเติมอาหารในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์ต่อการผลิตบีตา-กลูแคนพบว่ารูปแบบการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนมากที่สุดคือ การเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ linear incremental feeding ซึ่งสามารถผลิตบีตา-กลูแคนสูงที่สุด 1,165.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้เซลล์สูงที่สุด 10.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 20 ซึ่งมีการเติมน้ำตาลไปเพียง 1 ครั้ง เท่ากับใช้น้ำตาลเพียง 2.9 เปอร์เซ็นต์ และอาจเป็นเพราะการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลในแต่ละครั้งเป็นการเติมในช่วงเวลาที่เหมาะสมเพราะเป็นช่วงที่เซลล์ใช้น้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลหมดพอดี เซลล์จึงมีการเจริญอย่างต่อเนื่อง และปริมาตรอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมในแต่ละครั้งอาจมีความเหมาะสมกว่าปริมาตรที่ใช้ในการเติมแบบ exponential incremental feeding และแบบ sigmoidal incremental feeding ส่วนการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ sigmoidal incremental feeding ผลิตบีตา-กลูแคนสูงที่สุด 1,038.9 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้เซลล์สูงที่สุด 9.1 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 40 ซึ่งผลิตได้น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงโดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ linear incremental feeding เล็กน้อย ซึ่งการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ sigmoidal incremental feeding เซลล์สามารถใช้น้ำตาลที่เติมลงไปได้อย่างเต็มที่ น้ำตาลที่เติมลงไปใหม่ลดลงไปมากก่อนเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลในครั้งถัดไป เซลล์จึงมีการเจริญอย่างต่อเนื่อง การผลิตบีตา-กลูแคนจึงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องด้วย แต่ใช้เวลานานในการผลิต ซึ่งอาจเกิดจากการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 1 ปริมาตรอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมน้อยเกินไป เซลล์จึงเจริญช้าในช่วงเวลาดังกล่าว ส่งผลให้เวลาในการผลิตบีตา-กลูแคนจึงช้าออกไป และเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ exponential incremental feeding ผลิตบีตา-กลูแคนสูงที่สุด 991.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้เซลล์สูงที่สุด 8.7 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงโดยเติมอาหารแบบ linear incremental feeding และ sigmoidal incremental feeding พบว่าผลิต

บีตา-กลูแคนได้น้อยกว่าและใช้เวลาในการผลิตนานกว่า ซึ่งอาจเกิดจากการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาล 3 ครั้งแรก ใช้ปริมาตรอาหารเหลวกากน้ำตาลน้อย จึงมีน้ำตาลเพื่อการเจริญน้อย เซลล์อาจต้องใช้เอทานอลเพื่อการเจริญจึงเป็นเหตุให้ในช่วงแรกของการหมัก เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ exponential incremental feeding เอทานอลในอาหารเหลวกากน้ำตาลน้อยกว่าเมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ linear incremental feeding และ sigmoidal incremental feeding เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 ซึ่งใช้ปริมาตรอาหารเหลวกากน้ำตาลมาก เซลล์จึงเริ่มมีการเจริญและผลิตบีตา-กลูแคนสูงขึ้น แต่เมื่อพิจารณาระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต พบว่าการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ exponential incremental feeding ใช้เวลานาน จึงไม่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคน



ภาพที่ 24 ปริมาตรอาหารเหลวกากน้ำตาลในถังหมักแบบอากาศลอยตัว ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์โดยมีการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ linear incremental feeding, exponential incremental feeding และ sigmoidal incremental feeding

ในขณะที่การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบแบตช์ที่ใช้น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ผลิตบีตา-กลูแคนสูงที่สุด 764.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้เซลล์สูงที่สุด 8.8 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 20 ซึ่งใช้เวลาในการผลิตเร็วจึงมีความเหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคน ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ที่เติมอาหาร 1 ครั้ง ถึงแม้จะมีการใช้น้ำตาลมากกว่าแต่อาจเพิ่มการผลิตบีตา-กลูแคนได้

สำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์แบบแบตช์และเฟด-แบตช์เพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้น วิศัลย์ (2546) ทำการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 แบบเฟด-แบตช์ด้วยอาหารเหลวกากน้ำตาลในถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 6 ลิตร เพื่อผลิตยีสต์อาหารสัตว์โดยใช้รูปแบบการเติมอาหารแบบ linear incremental feeding, exponential incremental feeding และ sigmoidal incremental feeding พบว่าการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลทั้ง 3 แบบ มีผลให้ *S. cerevisiae* M30 มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน โดยการเติมอาหารแบบ sigmoidal incremental feeding ได้เซลล์สูงที่สุด รองลงมาคือ แบบ exponential incremental feeding และ linear incremental feeding ซึ่งได้เซลล์ 33.91, 32.66 และ 32.26 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ Lee and Kim (2001) ทำการเพาะเลี้ยง *C.utilis* แบบเฟด-แบตช์ด้วยอาหารเหลวกากน้ำตาลในถังหมักแบบถังกวนขนาด 6 ลิตร โดยใช้รูปแบบการเติมอาหารแบบ linear incremental feeding, exponential incremental feeding และ sigmoidal incremental feeding เช่นกัน พบว่าการเติมอาหารแบบ sigmoidal incremental feeding ผลิตเซลล์ได้มากที่สุด รองลงมาคือแบบ linear incremental feeding และ exponential incremental feeding ซึ่งได้เซลล์ 36.7, 34.5 และ 31.4 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นในยีสต์แต่ละสายพันธุ์อาจต้องการรูปแบบการเติมน้ำตาลที่ต่างกัน ซึ่งในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์ พบว่าการเติมอาหารแบบ linear incremental feeding เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนและเซลล์มากที่สุด

เนื่องจากการผลิตบีตา-กลูแคนด้วยการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบแบตช์และเฟด-แบตช์ อุณหภูมิภายในถังหมักสูงขึ้นมากโดยสามารถสูงถึง 34 องศาเซลเซียส ซึ่งจากผลการทดลองในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวกากน้ำตาล 100 มิลลิลิตร พบว่าอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ไม่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคน ดังนั้นหากสามารถควบคุมอุณหภูมิภายในถังหมักให้อยู่ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคน อาจสามารถผลิตบีตา-กลูแคนให้สูงขึ้นได้