การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเมทานอล

SINGLE CELL PROTEIN PRODUCTION FROM METHANOL

นางสาวมยุรา ศรีกัลยานุกูล

MISS MAYURA SRIKANLAYANUKUL

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2540

ISBN 974-621-816-6

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....28855
วัน, เดือน, ปี.....7 พ.ย. 2540

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SINGLE CELL PROTEIN PRODUCTION FROM METHANOL

MAYURA SRIKANLAYANUKUL

THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE

MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

1997

ISBN 974-621-816-6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเมทานอล
นักศึกษา	นางสาวมยุรา ศรีกัลยานุกูล
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร.ปราโมทย์ ศิริโรจน์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.ดุษฎี ธนะบริพัฒน์
ระดับการศึกษา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
พ.ศ.	2540

บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่ใช้เมทานอลเป็นวัตถุดิบ โดยคัดเลือกเชื้อที่มีโปรตีนสูงสุดมาทำการศึกษาซึ่งพบว่าคือ เชื้อ *Pseudomonas* sp. และเมื่อศึกษาหาปัจจัยต่างที่เหมาะสมต่อการผลิตได้ผลดังนี้คือ ใช้เมทานอล 0.5 % แหล่งไนโตรเจนใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 % ที่ พีเอช 7 ได้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) 0.14 ชม.$^{-1}$ ผลผลิต 0.611 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล โปรตีน 72.2 % และเซลล์ 2.18 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการศึกษาในถังหมักได้ค่าความเร็วในการกวนที่เหมาะสมคือ 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 1 vvm. ให้ค่า μ 0.25 ชม.$^{-1}$ ผลผลิต 0.72 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล โปรตีน 73.07 % และเซลล์ 2.44 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาในการผลิต 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Single Cell Protein Production from Methanol
Student	Miss Mayura Srikanlayanukul
Thesis Advisor	Dr.Pramote Sirirote
Thesis Co-advisor	Assoc.Prof.Dr.Dusanee Thanaboripat
Level of Study	Master of Science Program in Biotechnology
Department	Applied Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Year	1997

Abstract

Single cell protein production from methanol-utilizing bacteria isolated from soil was studied. One isolate which gave the maximum production of protein was selected and identified as *Pseudomonas* sp. The optimal medium was 0.5 % methanol , 0.1 % ammonium sulfate at pH 7. This strain gave the specific growth rate (μ) of 0.14 $hr.^{-1}$, conversion (Y) of 0.611 g cellls/g methanol , 72.2 % protein and 2.18 g cells/l of cell mass. In batch culture (containig 1 litre of medium), the optimal conditions at 500 rpm. aeration and 1.5 vvm. increased the results of μ ,Y, protein content and cell mass to 0.25 $hr.^{-1}$, 0.72 g cellls/g methanol , 73.07 % protein and 2.44 g cells/l , respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาจากคุณพ่อคุณแม่ที่ช่วยให้การอบรมสั่งสอนให้กำลังใจ และให้การอุดหนุนในด้านทุนทรัพย์ในการทำวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ขอกราบขอบพระคุณดร.ปราโมทย์ ศิริโรจน์ และ รศ.ดร.ดุษฎี ธนะบริพัฒน์ ที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำผู้วิจัยตลอดมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่าน และกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ. นวลพรรณ ณ ระนอง ที่กรุณาให้คำแนะนำและชี้แนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านต่างๆ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

ขอขอบพระคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือและให้กำลังใจต่อผู้วิจัยอย่างใกล้ชิดตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

มยุรา ศรีกัลยานุกูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VI

สารบัญภาพ VIII

บทที่

1. บทนำ 1

ความเป็นมาของงานวิจัย 1

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

ขอบเขตของงานวิจัย 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

2. ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง 3

1. โปรตีนเซลล์เดียว 3

2. คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว 7

3. วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว 8

4. ประเภทของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว 18

5. กระบวนการหมักโปรตีนเซลล์เดียว 20

6. คุณภาพและความปลอดภัยของโปรตีนเซลล์เดียว 24

3. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย 25

1. อุปกรณ์และสารเคมี 25

2. วิธีการดำเนินการวิจัย 26

2.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ในดินที่สามารถย่อยสลายเมทานอลได้ 26

2.2 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์ 27

2.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการติดสีแกรม 27

2.4 การศึกษาหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่แยกได้ 27

2.5 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อที่แยกได้ 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

2.6 การศึกษาการเจริญของเชื้อในถังหมัก....29

4. ผลการทดลองและวิจารณ์.... 30

1. ผลการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ในดินที่สามารถย่อยสลายเมทานอลได้.... 30

2. การศึกษาหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่แยกได้.... 32

3. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อที่แยกได้.... 43

4. การเจริญของเชื้อในถังหมัก.... 46

5. สรุปผลการทดลอง.... 51

บรรณานุกรม....52

ภาคผนวก ก. อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ....57

ภาคผนวก ข. การเตรียมสารเคมี.... 61

ภาคผนวก ค. วิธีการวิเคราะห์.... 64

ภาคผนวก ง. กราฟมาตราฐาน.... 68

ประวัติผู้เขียน.... 71

30 - 46 = 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนเซลล์เดียวจากสาหร่ายที่ใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นวัตถุดิบ....4
2. แสดงปริมาณกรดอะมิโนของยีสต์ที่ใช้เมทานอลเป็นวัตถุดิบ....5
3. แสดงปริมาณกรดอะมิโนของแบคทีเรียที่ใช้เมทานอลเป็นวัตถุดิบ....6
4. แสดงสับสเตรทชนิดต่าง ๆ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้สับสเตรทนั้น ๆ ได้....8
5. แสดงชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญบนเมทานอลได้ดี....13
6. แสดงอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่สามารถย่อยสลายเมทานอลได้....14
7. แสดงราคาของเมทานอลเปรียบเทียบกับสับสเตรทอื่น ๆ ที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญได้....15
8. แสดงผลผลิตของโปรตีนเซลล์เดียวต่อน้ำหนักของ C_1 compound สับสเตรท....17
9. แสดงผลผลิตของโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อ *Pseudomonas methylotrophus* ของ ICI....22
10. แสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ของโปรตีนเซลล์เดียวเปรียบเทียบกับถั่วและนมผง....24
11. แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปร่างและการติดสีแกรมและปริมาณโปรตีนของเชื้อที่แยกได้จากดิน....31
12. แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิต ปริมาณโปรตีนและปริมาณเซลล์ของเชื้อที่แยกได้ในอาหารที่มีเมทานอลต่าง ๆ กัน....33
13. แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิต ปริมาณโปรตีนและปริมาณเซลล์ของเชื้อที่แยกได้ในอาหารที่แหล่งไนโตรเจน ๆ กัน....35
14. แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิต ปริมาณโปรตีนและปริมาณเซลล์ของเชื้อที่แยกได้ในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ กัน....37
15. แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิต ปริมาณโปรตีนและปริมาณเซลล์ของเชื้อที่แยกได้ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่าง ๆ กัน....39
16. แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิต ปริมาณโปรตีนและปริมาณเซลล์ของเชื้อที่แยกได้ในอาหารที่เหมาะสม....41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

17. แสดงผลการจัดจำแนกชนิดของเชื้อตาม Bergey's Manual..... 44
18. แสดงผลการย่อยสลายน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของเชื้อที่แยกได้จากดิน.....45
19. แสดงผลการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1 vvm. และความเร็วในการกวนต่าง ๆ กัน..... 46
20. แสดงผลการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในถังหมักที่มีความเร็วในการกวน 500 rpm. และมีอัตราการให้อากาศต่าง ๆ กัน..... 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

1. แสดง ถังหมักของ ICI แบบ "ICI pressure cycle fermenter" 21
2. แสดงกระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเมทานอล 23
3. การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีปริมาณเมทานอลต่าง ๆ กัน 34
4. การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน 36
5. การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตต่าง ๆ กัน 38
6. การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่าง ๆ กัน 40
7. การเจริญของเชื้อในอาหารที่เหมาะสม 42
8. การเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1 vvm. และความเร็วในการกวน 250 และ 500 รอบต่อนาที 47
9. การเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในถังหมักที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศต่าง ๆ กัน 49
10. แสดงความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. กับการใช้อาหารและปริมาณเซลล์ในถังหมักที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศ 1.5 vvm. 50
11. กราฟมาตราฐานของโปรตีน Bovine Serum Albumin 68
12. กราฟมาตราฐานของเมทานอล 69
13. กราฟมาตราฐานระหว่าง Absorbance กับน้ำหนักเซลล์ของเชื้อ *Pseudomonas* sp. 70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

<u>ความเป็นมาของงานวิจัย</u>

ปัจจุบันประชากรโลกมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้ความต้องการทางด้านอาหารมีเพิ่มมากขึ้น แต่เนื่องจากแหล่งอาหารของมนุษย์ เช่น แหล่งโปรตีนมีไม่เพียงพอกับความต้องการ สังเกตจากประเทศที่กำลังพัฒนาในแถบอัฟริกาและเอเชียบางประเทศประชาชนที่เป็นเด็กส่วนมากมีร่างกายซูบผอม ตาโต ทั้งนี้เนื่องจากการขาดอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารประเภทโปรตีน ถึงแม้อันตรายจากการขาดอาหารประเภทนี้ไม่เกิดรุนแรงและเฉียบพลันแต่จะค่อย ๆ เพิ่มความรุนแรงมากขึ้น จากการคาดคะเนขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) พบว่าในปีค.ศ. 2000 ทั่วโลกจะมีการขาดแคลนอาหารโปรตีนถึง 22 ล้านตัน(Vilenchichและ Akhatar,1971) ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรโดยคิดเป็น 70 ล้านคนต่อปี (Ghose, 1969) และคาดว่าอย่างน้อยอีก 30 ปี จำนวนประชากรโลกจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าของจำนวนประชากรในปัจจุบัน (Worgan และคณะ ,1973) นอกจากนี้พื้นที่ทางการเกษตรมีอยู่อย่างจำกัดและการเก็บเกี่ยวผลผลิตในแต่ละปียังได้ไม่เต็มที่นัก ทั้งนี้เนื่องจากพื้นที่ทางการเกษตรบางส่วนได้ถูกภัยธรรมชาติทำลาย เช่น น้ำท่วม ไฟป่าและความแห้งแล้ง เป็นต้น ถึงแม้จะมีความพยายามในการแก้ปัญหาและส่งเสริมเทคโนโลยีใหม่ ๆ ในการผลิตแล้วก็ตาม แต่ปัญหาการขาดแคลนก็ยังคงมีอยู่ ดังนั้นจึงมีการศึกษาหาแหล่งอาหารโปรตีนชนิดใหม่ซึ่งต้องมีความปลอดภัยและเหมาะสมสำหรับเป็นอาหารมนุษย์และสัตว์ได้ โดยแหล่งอาหารโปรตีนนี้ผลิตได้จากจุลินทรีย์ จึงเรียกผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ว่า โปรตีนเซลล์เดียว

เหตุผลที่มีการศึกษาหาแหล่งอาหารจากจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์มีขนาดเล็ก ใช้พื้นที่ในการผลิตน้อยมีอัตราการเจริญสูงในระยะสั้น เป็นอาหารโปรตีนที่ไม่ต้องอาศัยผลผลิตทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบ สามารถควบคุมและสังเคราะห์แสงขึ้นเองได้ (Tanneubaum, 1971) นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังประกอบด้วยสารอาหารต่างๆ หลายชนิดโดยเฉพาะมีปริมาณโปรตีนในเซลล์สูงซึ่งนับเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่อยู่ในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา ปัญหาการขาดแคลนอาหารโดยเฉพาะโปรตีนเป็นปัญหาที่ต้องได้รับการแก้ไขอย่างเร่งด่วนและมีประสิทธิภาพ เพื่อให้ประชาชนมีสุขภาพอนามัยที่ดี โปรตีนเซลล์เดียวหรือโปรตีนจากจุลินทรีย์จึงได้รับความสนใจมากทั้งนี้เนื่องจากให้ผลผลิตสูงและมีต้นทุนในการผลิตต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหรือวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมาผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการแยกเชื้อจุลินทรีย์ในดิน โดยใช้อาหารที่มีเมทานอล 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวคัดเลือก
2. เพื่อศึกษาวิธีการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อที่แยกได้ โดยใช้เมทานอลเป็นวัตถุดิบ
3. เพื่อศึกษาหาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญของโปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิต
4. เพื่อศึกษาวิธีการหมักโปรตีนเซลล์เดียวในถังหมัก

ขอบเขตของงานวิจัย

1. แยกเชื้อจุลินทรีย์ในดินที่ย่อยสลายเมทานอลได้ เพื่อใช้เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ในการผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว
2. ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของโปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิต
3. ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวในถังหมัก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่มีประโยชน์ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเมทานอล
2. สามารถทราบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว
3. สามารถเข้าใจถึงวิธีในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว
4. สามารถหาแหล่งอาหารโปรตีนใหม่และนำมาใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1. โปรตีนเซลล์เดียว

ความต้องการโปรตีนในแต่ละประเทศจะแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นกับสภาวะทางเศรษฐกิจของประเทศนั้นๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเพิ่มแหล่งโปรตีนโดยวิธีต่าง ๆ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงการใช้จุลินทรีย์มาเป็นแหล่งโปรตีน เพราะเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มแหล่งโปรตีนที่มีประสิทธิภาพและสอดคล้องกับความต้องการในปัจจุบัน โปรตีนที่ผลิตนี้ เรียกว่าโปรตีนเซลล์เดียว (Single Cell Protein : SCP)

คำว่าโปรตีนเซลล์เดียว (Single Cell Protein) หรือเขียนย่อ ๆ ว่า SCP ถูกบัญญัติขึ้นโดย Massachusette Institute of Technology โดยศาสตราจารย์ C.L. Wilson ในปี ค.ศ. 1966 หมายถึงโปรตีนจากจุลินทรีย์ ได้แก่ สาหร่าย เชื้อรา แบคทีเรียและยีสต์ โดยไม่จำเป็นจะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีเซลล์เดียวแต่รวมถึงจุลินทรีย์ที่มีหลายเซลล์ด้วย (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

ในโปรตีนเซลล์เดียวมีวิตามินหลายชนิดในปริมาณสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิตามินบี 12 ซึ่งจัดเป็นวิตามินที่มีความสำคัญในด้านโภชนาการโดยใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมโปรตีนในสัตว์ปีกและหมูที่ใช้โปรตีนจากพืชเป็นโปรตีนหลัก (วรรณา วงศ์ชวลิตกุล, 2528)

โปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะมีปริมาณโปรตีนสูงและประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด โดยปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนในโปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะแตกต่างกันและส่วนมากจะมีเมไทโอนีนต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับมาตราฐานที่กำหนดโดย FAO (Food and Agriculture Organization) ดังตารางที่ 1,2และ3 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1

แสดงปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนเซลล์เดียวจากสาหร่าย
ที่ใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นวัตถุดิบ

กรดอะมิโน	*Chlorella sorokiniana* (g / 100 g dry cells)	*Chlorella regularis* (g / 100 g dry cells)	มาตราฐาน FAO (g / 100 g dry cells)
Alanine	5.9	7.3	-
Arginine	5.6	5.8	-
Aspartic acid	5.9	8.8	-
Cystine	-	0.7	-
Glutamic acid	9.3	11.8	-
Glycine	4.8	5.4	-
Histidine	1.4	1.8	-
Isoleucine	3.4	4.2	4.2
Leucine	4.0	8.1	4.8
Lysine	7.8	7.7	4.2
Methionine	1.8	1.3	2.2
Phenylalanine	2.7	5.1	2.8
Proline	4.0	4.3	-
Serine	2.2	3.0	-
Threonine	3.2	3.6	-
Tryptophan	1.4	1.5	1.4
Tyrosine	2.7	2.6	-
Valine	5.1	5.9	4.2

ที่มา : อรพิน ภูมิภมร, 2532

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2

แสดงปริมาณกรดอะมิโนของยีสต์ที่ใช้เมทานอลเป็นวัตถุดิบ

กรดอะมิโน	*Pichia pinus* (g / 100 g dry cells)	มาตราฐาน FAO (g / 100 g dry cells)
Aspartic acid	12.40	-
Serine	5.09	-
Glutamic acid	7.60	-
Proline	0.67	-
Glycine	6.37	-
Alanine	1.80	-
Cystine	7.55	-
Tyrosine	5.30	-
Histidine	2.20	-
Arginine	2.01	-
Threonine	2.37	2.80
Valine	3.50	4.20
Methionine	2.03	2.20
Isoleucine	3.20	4.20
Leucine	8.10	4.80
Phenylalanine	4.40	2.80
Lysine	4.48	4.20

ที่มา : Rashad และคณะ ,1990

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3
แสดงปริมาณกรดอะมิโนของแบคทีเรียที่ใช้เมทานอลเป็นวัตถุดิบ

กรดอะมิโน	*Pseudomonas* sp. (g / 100 g dry cells)	มาตราฐาน FAO (g / 100 g dry cells)
Arginine	5.2	-
Lysine	6.5	4.2
Histidine	1.9	-
Phenylalanine	4.2	2.8
Tyrosine	2.6	2.8
Leucine	8.2	4.8
Isoleucine	5.3	4.2
Methionine	2.2	2.2
Valine	6.7	4.2
Alanine	7.9	-
Glycine	5.9	-
Proline	3.7	-
Glutamic acid	11.6	-
Serine	3.4	-
Threonine	4.6	2.8
Aspartic acid	10.1	-
Tryptophan	1.5	1.4
Cystine	0.41	2.0

ที่มา : Miura และคณะ ,1979

การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวเริ่มแรกใช้เป็นอาหารสัตว์ เพราะการนำมาใช้เป็นอาหารมนุษย์จะเกิดปัญหาคือ จุลินทรีย์มีปริมาณกรดนิวคลีอิกมากประมาณ 6-11 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในร่างกายมนุษย์ไม่มีเอนไซม์ย่อยได้ ทำให้เกิดกรดยูริกในเลือดเพิ่มขึ้นเป็นเหตุให้เกิดโรคเกาท์ (gout) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาจมีผลกระทบต่อระบบทางเดินอาหารทำให้เกิดท้องเสียได้ ดังนั้นจึงไม่นิยมนำโปรตีนเซลล์เดียวมาใช้เป็นอาหารมนุษย์ แต่นิยมใช้เป็นอาหารสัตว์แทน

ในปี ค.ศ. 1973 Scrimshaw ได้ทำการศึกษาพบว่าปริมาณกรดนิวคลีอิกที่เหมาะสมต่อมนุษย์ คือไม่เกิน 2 กรัมต่อวัน ซึ่งเป็นข้อจำกัดของโปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตได้คือ ต้องมีปริมาณกรดนิวคลีอิกไม่เกิน 2 กรัมต่อ 100 กรัมโปรตีน ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิธีการลดปริมาณกรดนิวคลีอิกในโปรตีนเซลล์เดียว ดังนี้ (Castro และคณะ,1971,Viikari และLindo ,1971, Hedenskog และ Ebbinghaus,1972,Sinskey และ Tannenbaum,1975 และ)คือ

1. ควบคุมการเกิดกรดนิวคลีอิกโดยการลดอัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
2. การสกัดกรดนิวคลีอิกด้วยสารเคมี เช่น กรด ด่าง ฟีนอล เป็นต้น เป็นการแยกกรดนิวคลีอิกออกจากโปรตีน ซึ่งวิธีนี้โปรตีนจะถูกทำลายด้วย
3. การย่อยสลายกรดนิวคลีอิกโดยใช้วิธีทางเอนไซม์
4. ปรับปรุงพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อให้มีปริมาณโปรตีนในเซลล์สูงและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เก็บไว้

Abou-Zeid และคณะ (1995) ได้ศึกษาวิธีการกำจัดกรดนิวคลีอิกในโปรตีนเซลล์เดียวที่ได้จาก *Candida lipolytica* YB-423 ที่ใช้ gas-oil เป็นวัตถุดิบ กำจัดโดยใช้ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์ยีสต์ 5 กรัม แช่ในน้ำเดือด 10 นาที และนำไปแช่ในน้ำเย็น พบว่า สามารถลดปริมาณกรดนิวคลีอิกได้มากคือ กำจัด RNA ได้ 75 เปอร์เซ็นต์ และ DNA 81 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังทำให้ปริมาณโปรตีนสูงขึ้นคือ จาก 42 เปอร์เซ็นต์ เป็น 67.50 เปอร์เซ็นต์

2. <u>คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว</u>

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวมีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อราและสาหร่าย ซึ่งคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวมีดังนี้ (ดวงพร คันธโชติ , 2530)

1. เจริญได้เร็วในอาหารที่มีราคาถูก ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นนั้น ๆ
2. เจริญได้ดีในอาหารที่มีองค์ประกอบง่าย ๆ ไม่ซับซ้อน มีความต้องการวิตามินและ growth factor ต่าง ๆ น้อยหรือไม่ต้องการเลย
3. คงลักษณะทางพันธุกรรมได้ดี และไม่กลายพันธุ์ง่ายเมื่อเลี้ยงติดต่อกันเป็นเวลานาน
4. การแยกและการเก็บเกี่ยวเซลล์สามารถทำได้ง่าย
5. มีความต้านทานต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ทราบคุณสมบัติทางพันธุกรรม สรีรวิทยาและสามารถปรับปรุงพันธุ์ได้
7. ใช้แหล่งพลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ
8. หลังจากผ่านกระบวนการหมักแล้วมีวัสดุเหลือทิ้งน้อยหรือไม่มีเลย
9. ไม่เป็นพิษหรือทำให้เกิดภูมิแพ้
10. ให้ปริมาณโปรตีนสูง โปรตีนที่ได้จะต้องมีกรดอะมิโนที่มีคุณค่า
11. เก็บรักษาได้ง่าย เช่น การทำให้แห้ง

3. <u>วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว</u>

ในสภาพการณ์ปัจจุบัน วัตถุดิบที่เหมาะสมนำมาใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวควรเป็นวัตถุดิบที่หาซื้อง่ายและราคาถูก สะดวกในการขนส่งไปยังโรงงานผลิต ถูกย่อยด้วยจุลินทรีย์ได้ มีความคงตัวและสามารถเก็บไว้ได้นาน (ดุษณี ธนะบริพัฒน์, 2534) นอกจากนี้ต้องมีการเตรียมที่ไม่ยุ่งยาก ง่ายต่อการนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ มีประสิทธิภาพและให้ผลผลิตสูง และไม่มีผลต่อการเก็บเกี่ยวเซลล์ (Large และ Bamforth, 1988)

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ยกเว้นสาหร่ายสามารถใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรืออุตสาหกรรมเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารประกอบคาร์บอนและคาร์โบไฮเดรต (Davis, 1976) เช่น นอร์มัล-อัลเคน มีเทน แก๊สธรรมชาติ เมทานอล เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ คาร์โบไฮเดรต เซลลูโลสและของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมหเกษตรซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4

แสดงสับสเตรทชนิดต่าง ๆ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้สับสเตรทนั้น ๆ ได้

สับสเตรท	เชื้อจุลินทรีย์
คาร์บอนไดออกไซด์	*Spirulina*
	Rhodopseudomonas
ชานอ้อย	*Cellulomonas*
เปลือกกล้วย	*Pichia*
ฟางข้าว	*Trichoderma*
	Saccharomyces
	Candida

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สับสเตรท	เชื้อจุลินทรีย์
แป้งมันสำปะหลัง	*Aspergillus*
น้ำตาลจากอ้อยหรือหัวบีท	แบคทีเรียทุกชนิด
หางนม	*Aeromonas*
ของเสียจากโรงงานสุรา	ยีสต์
แป้ง	*Bacillus*
	Candida
	Saccharomyces
ซังข้าวโพด	*Chaetomium*
ข้างสาลี	*Rhodopseudomonas*
มูลสัตว์	*Pseudomonas*
เซลลูโลส	*Thermomonospora*
ของเสียจากโรงงานกระดาษ	*Paecilomyces*
ของเสียจากโรงงานเนื้อ	*Bacillus*
ของเสียจากโรงงานผัก	เชื้อผสมของเชื้อรา
นอร์มัล-อัลเคน	*Achromobacter*
	Pseudomonas
	Acinetobacter
	Corynebacterium
มีเทน	*Methylococcus*
เมทานอล	*Methylophilus*
	Methylomonas
เอทานอล	*Acinetobacter*
	Candida
	Rhodopseudomonas
กรดซิตริก	*Torulopsis*
กากกาแฟ	*Trichoderma*

ที่มา : Large และ Bamforth, 1988

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4 จะพบว่าวัตถุดิบหลายชนิดสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้ รวมไปถึงของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมและเกษตรด้วย ซึ่ง Davis (1976) ได้แบ่งวัตถุดิบสำหรับผลิตโปรตีนเซลล์เดียวออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ คาร์โบไฮเดรตและสารประกอบคาร์บอน

3.1 คาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส รวมถึงของเหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรม สามารถจำแนกได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ๆคือเซ็กคาไรด์และพอลิเซ็กคาไรด์ (saccharide and polysaccharide) โดยเซ็กคาไรด์จะมีองค์ประกอบแบบง่าย ๆ คือ ประกอบด้วยน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนมากสามารถนำไปใช้ได้ง่าย ตัวอย่างของวัตถุดิบที่มีเซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ กากน้ำตาล หางนม น้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษและน้ำทิ้งจากโรงงานมันฝรั่ง

พอลิเซ็กคาไรด์มี 2 ชนิด คือแป้งและเซลลูโลส โดยแป้งจะได้จากเมล็ดธัญพืชหรือมัน-สำปะหลัง เวลาใช้ต้องนำมาผ่านกรรมวิธีก่อนโดยใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้ ส่วนเซลลูโลสต้องนำมาย่อย (Hydrolysis) เพื่อเป็นเซ็กคาไรด์ ตัวอย่างเช่น ไม้ ชานอ้อย ซังข้าวโพด

คาร์โบไฮเดรตที่จุลินทรีย์ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวส่วนใหญ่เป็นของ-เสียทางการเกษตรหรือผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งข้อดีของการใช้ของเสียเหล่านี้คือ เป็นการนำของเสียกลับมาใช้ประโยชน์ใหม่ ลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมและมีราคาถูก แต่มีข้อจำกัดคือการหาวัตถุดิบเหล่านี้ขึ้นกับฤดูกาลและสภาพภูมิอากาศ

3.1.1 วัตถุดิบที่เป็นเซ็กคาไรด์

1. กากน้ำตาล สามารถหาได้จากโรงงานน้ำตาลที่ได้จากอ้อยหรือหัวบีท ขึ้นกับท้องถิ่นที่มีส่วนประกอบของกากน้ำตาลจากอ้อยและหัวบีท ในปี ค.ศ. 1994 Nigam ได้ทำการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากกากน้ำตาลที่ได้จากอ้อย พบว่าได้ปริมาณโปรตีน 42 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาในการผลิต 48 ชั่วโมง

2. น้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ (spent sulfite waste liquor)

3. น้ำทิ้งจากโรงงานมันฝรั่ง (potato waste water)

4. น้ำทิ้งจากโรงงานผงชูรส (monosodium glutamate waste water) โดยในปีค.ศ. 1988 Yiao ทำการศึกษาพบว่า น้ำทิ้งจากโรงงานผงชูรสประกอบด้วยแป้งและ Glutamic acid อยู่ในปริมาณมาก ถ้าปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติจะทำให้เกิดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมได้ จึงนำน้ำทิ้งนี้มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยใช้เชื้อยีสต์ *Candida tropicalis* พบว่าให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนในปริมาณสูงถึง 54.4 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดค่า COD ได้ 69 เปอร์เซ็นต์ และค่า BOD 54 เปอร์เซ็นต์

5. น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเนย (Whey) มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองประกอบด้วย น้ำตาลแล็กโทส 5 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 1 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.3 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า 0.6 เปอร์เซ็นต์ (ดวงพร คันธโชติ, 2530) โดยพบว่าเชื้อ *Kluveromyces fragilis* สามารถย่อยสลายแล็กโทสได้และเป็นเชื้อที่นำมาผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวได้ดี โดยมีช่วงของอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 30-35 องศาเซลเซียส (Vananuvat และ Kinsella ,1975, Delaney และคณะ,1975 และ Ghaly และ Singh,1989) ขณะที่ *Saccharomyces cerevisiae* ไม่สามารถย่อยสลายได้ เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ lactose permease และβ-galactosidase (Dickson, 1980) ต่อมา Ghaly และSingh (1989) ศึกษาเรื่องการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากหางนมโดยใช้เชื้อ *Kluveromyces fragilis* NRS 5790 พบว่าเชื้อนี้สามารถใช้แล็กโทสได้ 93 เปอร์เซ็นต์ ในการเจริญและให้ผลผลิต 0.78 กรัมเซลล์ต่อกรัมแล็กโทส

6. กากของเสียจากผลไม้ต่าง ๆ เช่น กากส้ม กากสับปะรด กากมะม่วง เป็นต้น โดยต้องนำมาผ่านกระบวนการต่าง ๆ ก่อน เช่น ย่อยด้วยกรด ฆ่าเชื้อด้วยความร้อน จึงจะสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวได้ ตัวอย่างเช่น การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากกากมะม่วงโดยใช้เชื้อ *Pichia pinus* โดยนำมาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกก่อน พบว่ากากมะม่วงนี้มีส่วนประกอบของกลูโคสเป็นส่วนมาก พบวิตามินและไซโลสเล็กน้อย (Jwanny และคณะ,1989) และเมื่อนำมาเป็นอาหารสำหรับผลิตโปรตีนเซลล์เดียวพบว่าได้โปรตีน 62.2 เปอร์เซ็นต์ (Rashad และคณะ,1990)

3.1.2 วัตถุดิบที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์

พอลิแซ็กคาไรด์เป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ แป้งและเซลลูโลส

1. แป้ง ได้แก่ แป้งที่ได้จากเมล็ดธัญพืชและมันสำปะหลัง ซึ่งเมล็ดธัญพืชโดยทั่วไปจะมีแป้งเป็นส่วนมากและมีโปรตีนเพียงเล็กน้อย มักขาดกรดอะมิโนที่จำเป็น เช่น ข้าวสาลีขาดไลซีนและทริปโทเฟน พืชตระกูลถั่วมักขาดเมไทโอนีน ไลซีนและทริปโทเฟน ดังนั้นการนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว จึงเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารของเมล็ดธัญพืชเหล่านี้ ส่วนมันสำปะหลังประกอบด้วยแป้งเป็นส่วนมาก มีโปรตีนเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ มีหลายประเทศนิยมนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตโปรตีนเซลล์เดียว เนื่องจากราคาถูก หาง่ายและมีทุกฤดูกาล

2. เซลลูโลส เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบของพืชทุกชนิด ซึ่งเป็นของเหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ในธรรมชาติเซลลูโลสจะอยู่ร่วมกับลิกนิน เรียกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) มีข้อเสียคือไม่สามารถย่อยสลายลิกนินได้ จึงต้องกำจัดลิกนินก่อนโดยกระบวนการทางเคมีหรือฟิสิกส์ ตัวอย่างของวัตถุดิบที่เป็นเซลลูโลสคือ ชานอ้อยซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจำพวกเซลลูโลสที่มีส่วนประกอบดังนี้ เซลลูโลส 50-60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เฮมิเซลลูโลส 10-20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง นอกนั้นเป็นลิกนินและเถ้า เมื่อนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวให้ผลผลิตสูงคือ 19.4 กรัมต่อลิตร (Rodriguez และ Gallarodo,1993) ต้องนำมาผ่านกระบวนการโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ก่อนจึงให้ประสิทธิภาพดี (Rodriquez-Vazquez และคณะ,1992) เช่น การเลี้ยงเชื้อ *Cellulomonas flavigena* และ *Xanthomonas* sp. ในชานอ้อยที่มีการกำจัดลิกนินออกไป 60 เปอร์เซ็นต์ และ 27 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยใช้ด่างเข้มข้น จะทำให้ผลผลิตโปรตีนเซลล์เดียวเพิ่มขึ้น (Rodriquez-Vazquez และคณะ,1992) ส่วนข้าวเปลือกซึ่งเป็นเฮมิเซลลูโลสเมื่อนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยนำมาผ่านกระบวนการโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ก่อนทำให้มีลิกนินและเฮมิเซลลูโลสลดลง เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus terreus* จะให้ผลผลิตสูง (Hussein และคณะ,1992)

3.2 สารประกอบคาร์บอน

จุลินทรีย์ที่สามารถใช้สารประกอบคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานได้แก่ ยีสต์และแบคทีเรียหลายชนิด สารประกอบคาร์บอนที่อยู่ในสภาพของเหลว เช่น เมทานอล นอร์มัล-อัลเคน เอทานอล และในสภาพแก๊ส เช่น มีเทน โพรเพน เป็นต้น จุดเริ่มต้นที่มีการสนใจใช้สารประเภทนี้เป็นวัตถุดิบ เนื่องจากบริษัทต่าง ๆ หันมาสนใจที่จะใช้สารประกอบ นอร์มัล-อัลเคน ของปิโตรเลียมเป็นวัตถุดิบเพราะมีปริมาณมาก ราคาถูกและมีความบริสุทธิ์สูง เช่น บริษัท Imperial Chemical Industry (ICI) ผลิต *Methylophilus methylotrophus* จากเมทานอลซึ่งผลิตได้จากการสังเคราะห์แก๊สธรรมชาติ มีเทน น้ำมันหรือถ่านหิน แบคทีเรีย ยีสต์และราบางชนิดสามารถใช้เมทานอลผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวได้ดังตารางที่ 5 ซึ่งพบว่า obligate methylotrophic bacteria สามารถเจริญบน C_1 compound ได้อย่างเดียว ส่วน facultative methylotrophic bacteria ,ยีสต์และราบางชนิดสามารถย่อยสลายสารประกอบคาร์บอนสายยาวได้ ในทางกลับกันพบว่าแบคทีเรียและยีสต์ส่วนมากไม่สามารถใช้ C_1 compound และเมทานอลได้เลย (Wulf และAnneliese,1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5

แสดงชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญบนเมทานอลได้ดี

---

1. **Obligate methylotrophic bacteria**

Methyolobacter	*Methylocystis*
Methylococcus	*Methylosinus*
Methylomonas	

2. **Facultative methylotrophic organisms**

a. แบคทีเรีย

Arthrobacter	*Protaminobacter*
Bacillus	*Pseudomonas*
Hyphomicrobium	*Rhodopseudomonas*
Klebsiella	*Streptomyces*
Micrococcus	*Vibrio*

b. ยีสต์

Candida boidimii	*Pichia haplophilia*
Candida parapsilosis	*Pichia lindnerii*
Hansenula capsulata	*Pichia pastoris*
Hansenula henricii	*Torulopsis glabrata*
Hansenula minuta	*Torulopsis methanolovescens*
Hansenula nonfermentans	*Torulopsis methanosorbosa*
Hansenula wickerhamii	*Torulopsis molischiana*
	Torulopsis memodendra

c. เชื้อรา

Gliocladium delinquesxens

Paecilomyces varioti

Trichoderma lignorum

ที่มา : Wulf และ Anneliese , 1990

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการหมักเมทานอลเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวพบว่าแบคทีเรียให้ผลผลิตได้ดีกว่ายีสต์ เพราะว่าเจริญได้เร็ว มีปริมาณโปรตีนสูง ให้ผลผลิตดีและต้องการอาหารที่มีส่วนประกอบแบบง่าย ๆ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6

แสดงอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่สามารถย่อยสลายเมทานอลได้

เชื้อจุลินทรีย์	μ_{max} (h^{-1})
Pseudomonas rosea (ICI)	0.38-0.50
Protaminobacter ruber	0.10
Pseudomonas extorquens	0.18
Methylomonas methanolica	0.53
Pseudomonas B45	0.198
Kloeckera sp. 2201	0.075
Hansenula polymorpha	0.22
Torulopsis glabrata	0.11

ที่มา : Wulf และ Anneliese , 1990

เหตุที่มีการใช้เมทานอลเป็นสับสเตรทในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวเนื่องจากว่าเมทานอลมีข้อได้เปรียบกว่าสารประกอบคาร์บอนตัวอื่น ๆ คือ

1. เป็นแหล่งวัตถุดิบที่หาได้ตลอดเวลาจากแก๊สธรรมชาติหรือถ่านหิน
2. สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้
3. ไม่มีความเป็นพิษ เนื่องจากใช้ในรูปของของเหลวและมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ดีจึงปนกับสารละลายอื่นที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้
4. การเก็บเกี่ยวเซลล์จะไม่มีกากติดมา
5. มีราคาถูกเมื่อเทียบกับสับสเตรทชนิดอื่น ดังแสดงในตารางที่ 7
6. มีความบริสุทธิ์สูง
7. มีความคงตัวและเก็บรักษาได้นาน
8. ง่ายต่อการนำไปใช้เนื่องจากมีความหนืดต่ำ
9. เกิดการปนเปื้อนได้ยากเนื่องจากมีจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถเจริญบนเมทานอลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7

แสดงราคาของเมทานอลเปรียบเทียบกับสับสเตรทอื่น ๆ ที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญได้

สับสเตรท	ปริมาณคาร์บอน (%นน.)	ราคา (US$/ตัน)	ราคา (US$/หน่วยคาร์บอน)
เมทานอล	37.5	150	400
กลูโคส	40	290	725
ซูโครส	42	660	1570
กากน้ำตาล	20	70	350
แป้งข้าวโพด	40	70-100	175-250
เอทานอล	52	560	1080
กรดแอซีติก	40	550	1370

ที่มา : Large และ Bamforth,1988

สำหรับกระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยใช้เชื้อ *Methylophilus methylotrophus* ที่เจริญบนเมทานอลได้มีตัวอย่างการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้พันธุวิศวกรรม (Windass และคณะ,1980) เพื่อให้มีผลผลิตเพิ่มขึ้น

Haggstrom (1969) ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเมทานอลโดยใช้เชื้อผสมที่คัดแยกได้จากดินกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนที่มีขนาด 1x0.5 ไมครอน พบว่า ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอช 6.0-6.3 ปริมาณเมทานอลอยู่ระหว่าง 1-2 มิลลิลิตรต่อลิตร ได้ผลผลิตเป็น 4.5 กรัมต่อลิตรและมีปริมาณโปรตีน 73 เปอร์เซ็นต์

Snedecon และ Cooney (1974) ได้ศึกษาเรื่องการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเมทานอลที่อุณหภูมิสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส พบว่า ได้ผลผลิต 0.42 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล ผลิตกรดอะมิโนที่จำเป็น ปริมาณสูงและโปรตีน 71 เปอร์เซ็นต์

Amano และคณะ (1975) ทำการคัดแยกเชื้อที่ย่อยสลายเมทานอลจากตัวอย่างดินในประเทศญี่ปุ่น พบว่า เชื้อที่เหมาะสมที่จะนำมาผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวคือเชื้อ *Methylomonas methanolica* มีลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนขนาด 0.8-1.5x2.0 ไมครอน เคลื่อนที่ได้โดยใช้ flagella เมื่อนำมาเลี้ยงในถังหมักได้โปรตีนสูงถึง 73.1 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อมาในปีเดียวกัน Cooney และคณะทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเมทานอล พบว่าเมทานอลมีข้อดีคือ ราคาถูก สามารถหาได้ตลอดเวลา มีคุณภาพสูงเนื่องจากมีความบริสุทธิ์สูงถึง 99.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายน้ำได้ดี มีจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถเจริญบนเมทานอลได้ จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ยากและง่ายต่อการเก็บรักษา เมื่อเลี้ยง *Hansenula polymorpha* DL-1 แบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 1 ลิตร ให้เมทานอลในอัตรา 5 มิลลิลิตรต่อลิตร จะได้ปริมาณโปรตีน 45 เปอร์เซ็นต์

Kim และ Ryu (1976) ได้ศึกษาหาอาหารที่เหมาะสมเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวให้มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นโดยคัดแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายเมทานอลได้จากตัวอย่างดินในประเทศเกาหลี ได้เชื้อ *Methylomonas* sp. มีอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) 0.5 ต่อชั่วโมง โดยนำมาหมักแบบต่อเนื่องได้ปริมาณเซลล์ 0.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อัตราการเจือจาง 0.2 ต่อชั่วโมง ได้ปริมาณโปรตีน 71.5 เปอร์เซ็นต์ และให้กรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง

Faust และคณะ (1977) ศึกษาหาสปีชีส์ใหม่ของ *Methylomonas* โดยคัดแยกเชื้อจากตะกอนของน้ำเสีย (sludge) พบสปีชีส์ใหม่คือ *Methylomonas clara* และเมื่อนำมาหมักแบบต่อเนื่องและขยายขนาดจาก 30 ลิตร จนถึง 3,000 ลิตร เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้น จากการทดลองและคำนวณผลพบว่าสามารถให้ผลผลิตสูงถึง 50 ตันต่อปี และถ้ามีการพัฒนาระบบให้ดีต่อไปในอนาคตสามารถให้ผลผลิตได้สูงถึง 100 ตันต่อปี นอกจากนั้นยังให้ปริมาณโปรตีนได้สูงถึง 80-85 เปอร์เซ็นต์

Ogata และคณะ (1977) ศึกษาการใช้เมทานอลของเชื้อแบคทีเรีย *Methylomonas aminofaciens* พบว่าสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ และให้กรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง

ต่อมาในปีค.ศ. 1979 Miura และคณะได้ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเมทานอลโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน พบว่าได้ผลิตผล (productivity) สูง 6.2 กรัมเซลล์ต่อลิตร ปริมาณเซลล์ 32.5 กรัมเซลล์ต่อลิตร และผลผลิต (yield) 0.448 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องที่มีเมทานอล 72.6 กรัมเมทานอลต่อลิตร และอัตราการเจือจาง 0.19 ต่อชั่วโมง ซึ่งให้ปริมาณโปรตีนสูงถึง 68 เปอร์เซ็นต์

Nawawy และ Gnan (1983) ทำการคัดแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายเมทานอลจากตัวอย่างดิน น้ำนมดิบและน้ำทิ้งจากการหมักดอง โดยใช้อาหารที่มีเมทานอล 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าได้เชื้อ *Pseudomonas* sp. ซึ่งให้ปริมาณเซลล์สูงคือ 0.4 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล ปริมาณโปรตีน 65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าเป็นปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับเชื้อชนิดอื่นที่หาได้จากการทดลองนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถาบันวิทยบริการ พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Omar และ Omar (1987) ทำการจัดจำแนก *Enterobacter aerogenes* โดยอาศัยการใช้เมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ให้ผลผลิตสูงและลดปริมาณกรดนิวคลีอิก โดยใช้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สามารถลดกรดนิวคลีอิกได้ 72.6 เปอร์เซ็นต์

มีผู้สนใจศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยใช้เมทานอลเป็นวัตถุดิบเป็นจำนวนมากซึ่งสามารถแสดงผลผลิตของโปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตได้ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8

แสดงผลผลิตของโปรตีนเซลล์เดียวต่อน้ำหนักของ C_1 compound สับสเตรท

เชื้อจุลินทรีย์	สับสเตรท	ผลผลิตของเซลล์ (กรัมเซลล์/กรัมสับสเตรท)	ที่มา
Methylomonas sp.	เมทานอล	0.48	Goto และคณะ (1978)
Methylomonas clara	เมทานอล	0.4-0.6	Sittig (1983)
Methylomonas methanolica	เมทานอล	0.48	Dostalek และ Molin (1975)
Methylophilus methylotrophus	เมทานอล	0.5	Gow และคณะ (1975)
Methylococcus capsulatus	มีเทน	1.0-1.03	Harwood และ Pirt (1972)
Pseudomonas sp. + *Hyphomicrobium* sp.	มีเทน	0.99	Wilkinson และ Harrison (1973)

ที่มา : Large และ Bamforth,1988

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

28855

4. ประเภทของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

หลักเกณฑ์ในการเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อนำมาผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวควรมีคุณลักษณะดังนี้ (Ward,1992)

1. สามารถใช้คาร์บอน พลังงานและแหล่งไนโตรเจนเป็นสับสเตรทได้
2. ควรมีอัตราการเจริญจำเพาะ และให้ผลผลิตที่สูง
3. สามารถเจริญในช่วงที่มี พีเอช และอุณหภูมิ กว้าง ๆ ได้
4. ต้องการอัตราการให้อากาศและการควบคุมการเกิดฟอง
5. สามารถเจริญได้ในถังหมัก
6. มีความปลอดภัยไม่ก่อให้เกิดโรคหรือผลิตสารพิษ
7. เก็บเกี่ยวผลผลิตได้ง่าย
8. สามารถผลิตโปรตีน RNA และส่วนประกอบอื่นที่มีคุณค่าทางอาหารได้
9. มีความคงตัวเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก

จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียวมีทั้งสาหร่าย แบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ โดยได้มีการศึกษาและทดลองใช้จุลินทรีย์มากชนิดเพื่อคัดเลือกมาผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไปดังนี้

4.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียสามารถใช้ผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวได้เพราะมีปริมาณโปรตีนสูงอยู่ในช่วง 60-65 เปอร์เซ็นต์ (Ward, 1992) และมีอัตราการเจริญสูงกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (วราวุฒิ ครุสง, 2529) ผลิตกรดอะมิโนสูงกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น และผลิตกรดอะมิโนที่จำเป็นได้เช่น ไลซีน สามารถใช้วัตถุดิบได้หลายอย่าง และเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูงได้ดี จึงไม่จำเป็นต้องให้ระบบหล่อเย็น (cooling)ในกระบวนการหมัก ซึ่งกระบวนการหมักแบคทีเรียง่ายต่อการให้อากาศ สามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่ายโดยการตกตะกอน เช่น การหมุนเหวี่ยง (centrifuge) แต่มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถใช้เป็นอาหารมนุษย์ได้เพราะมี ปริมาณ RNA สูงถึง 15-25 เปอร์เซ็นต์ (Ward,1992)

4.2 ยีสต์

สายพันธุ์ยีสต์หลายชนิดนิยมนำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดียวที่ใช้เป็นอาหารมนุษย์และสัตว์มานานแล้ว โดยใช้วัตถุดิบจำพวกคาร์โบไฮเดรตและของเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตรที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต โดยเสียค่าใช้จ่ายในเรื่องวัตถุดิบในราคาต่ำ นิยมผลิต *Candida* sp. มากที่สุด เพราะเจริญได้รวดเร็วทั้งในอาหารเพนโทสหรือเฮกโซส (สุมาลี เหลืองสกุล, 2527)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การที่นิยมใช้ยีสต์ผลิตโปรตีนเซลล์เดียวเนื่องจากมีข้อดีหลายชนิดดังนี้

1. ให้ปริมาณโปรตีนและวิตามินบีรวมสูงสุด ที่พบมากคือ thiamine (B_1) และ riboflavin (B_2)
2. มีการยอมรับยีสต์เป็นอาหารมากกว่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น
3. ยีสต์มีปริมาณกรดนิวคลีอิกต่ำ สามารถนำมาใช้เป็นอาหารได้
4. ผลผลิตยีสต์ที่ได้จะมีปริมาณของกรดอะมิโนหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย และกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะมีปริมาณแตกต่างกันไป
5. การเก็บเกี่ยวผลผลิตสามารถทำได้ง่ายกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น
6. ยีสต์สามารถเจริญได้ในวัตถุดิบที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่ำ

4.3 เชื้อรา

มีเชื้อราหลายชนิดที่ใช้เป็นอาหารมานานโดยเฉพาะเห็ดใช้เป็นอาหารมนุษย์อย่างแพร่หลายเช่น *Agaricus campestris, Cortinellus berkelyanes, Volvariella volvaceae* (วราวุฒิ ครูส่ง,2529) และพบว่าเชื้อรา Class Deuteromycetes มีอัตราการเจริญที่รวดเร็ว โดยสามารถใช้วัตถุดิบต่าง ๆ ได้ดี เช่น มันเทศ ข้าวโพด ข้าว มันสำปะหลัง กากน้ำตาล เยื่อกระดาษ ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร เป็นต้น ในเส้นใยของเชื้อราประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นเทียบเท่ากับเคซีน(casein) นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อราสามารถแพร่บนผิวหน้าของอาหารแข็งต่าง ๆ ได้ แทงลงในเนื้อเยื่อของวัตถุดิบต่าง ๆ ได้โดยไม่ต้องนำมาผ่านกรรมวิธีการย่อยก่อน เมื่อเลี้ยงให้ขยายเซลล์และเก็บรวบรวมเซลล์สามารถกระทำได้โดยผ่านกระบวนการกรอง แต่มีข้อเสียคือ มีอัตราการเจริญต่ำ

4.4 สาหร่าย

สาหร่ายจัดเป็น autotrophic microorganism โดยมีลักษณะเฉพาะดังนี้

1. สามารถสังเคราะห์โปรตีนที่มีคุณภาพสูงได้
2. เพาะเลี้ยงได้ทุกฤดูกาลเพราะสามารถสังเคราะห์แสงได้
3. อุดมด้วยวิตามินบีรวมและวิตามินซี
4. ใช้พลังงานจากดวงอาทิตย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าพืชบกทั่วไป
5. สะสมคาร์โบไฮเดรตและไขมันได้ในปริมาณมาก
6. สามารถใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนได้
7. ต้องการน้ำในปริมาณน้อย
8. สามารถเจริญได้ในที่ค่อนข้างแห้งแล้งและบริเวณที่ไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ได้แก่ *Scenedesmus actus* และ *Spirulina maxima* ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้สาหร่ายในรูปอาหารเสริมโปรตีนกันมาก เนื่องจากสาหร่ายมีปริมาณโปรตีนสูงเมื่อเทียบกับแหล่งโปรตีนชนิดอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สาหร่าย *Chlorella* 6-7 กรัมต่อวัน ก็เพียงพอต่อความต้องการของมนุษย์แล้ว (Calloway, 1973)

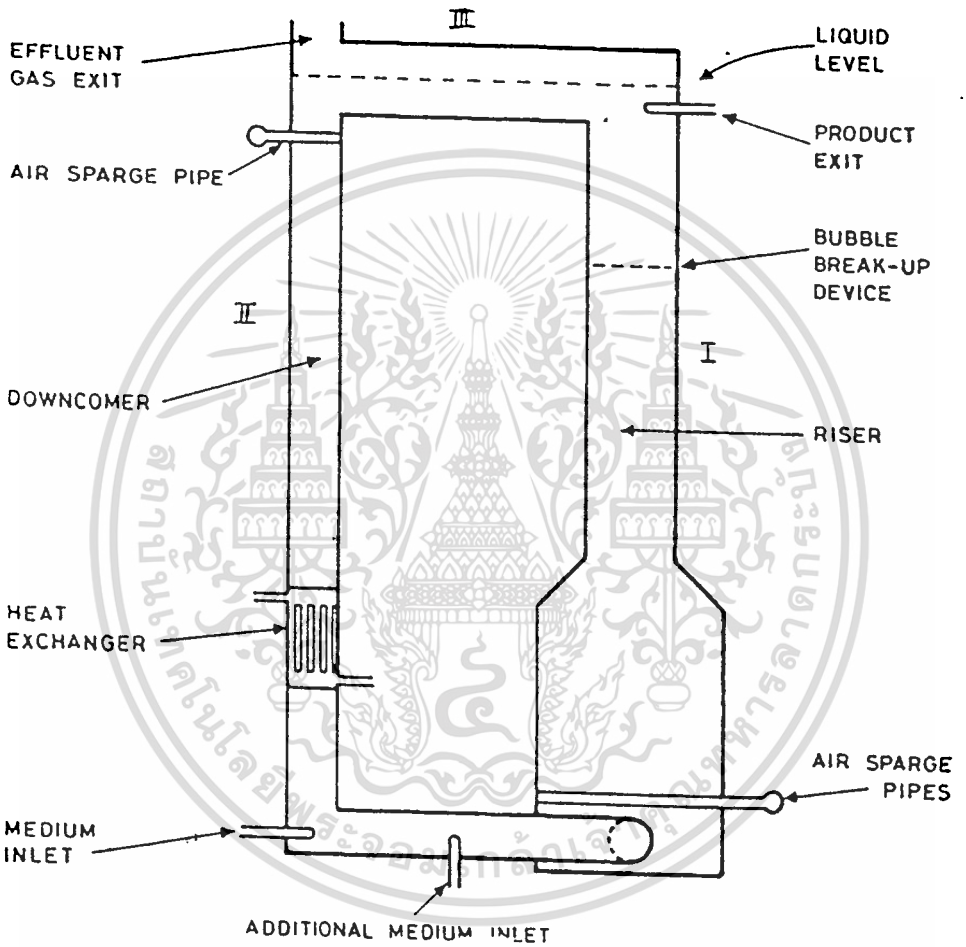
5. <u>กระบวนการหมักโปรตีนเซลล์เดียว</u>

Imperial Chemical Industries (ICI) เป็นบริษัทแรกที่มีการพัฒนากระบวนการหมักโปรตีนเซลล์เดียวที่ใช้เมทานอลเป็นสับสเตรทแบบต่อเนื่องโดยผลิตเป็นการค้า โดยศึกษาผลของออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์และความเข้มข้นของเมทานอลที่มีผลต่อผลผลิตของโปรตีนเซลล์เดียวและศึกษาความแตกต่างของความดันระหว่างที่ด้านล่างและที่ผิวของถังหมัก ดังภาพที่ 1 ซึ่งเป็นถังที่รวมระหว่างถังหมักแบบ air lift และ loop reactor เข้าด้วยกัน มีความจุ 37 ลูกบาศก์เมตร สูง 30 เมตร ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ (Norris และ Richmond,1981)

1. air lift column
2. down-flow tube ที่มีระบบการกำจัดความร้อน
3. พื้นที่ว่างสำหรับปล่อยแก๊ส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 1



แสดง ถังหมักของ ICI แบบ "ICI pressure cycle fermenter"

ที่มา : Norris และ Richmond,1981

ระบบนี้มีความสามารถในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้ 1,000 ตันต่อปี โดยทำงานที่พีเอช 6.5-6.9 และอุณหภูมิ 34-37 องศาเซลเซียส เชื้อที่ใช้ในการผลิตคือ *Pseudomonas methylotrophus* ที่แยกโดย ICI ซึ่งให้ผลผลิตดังตารางที่ 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9

แสดงผลผลิตของโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อ *Pseudomonas methylotrophus* ของ ICI

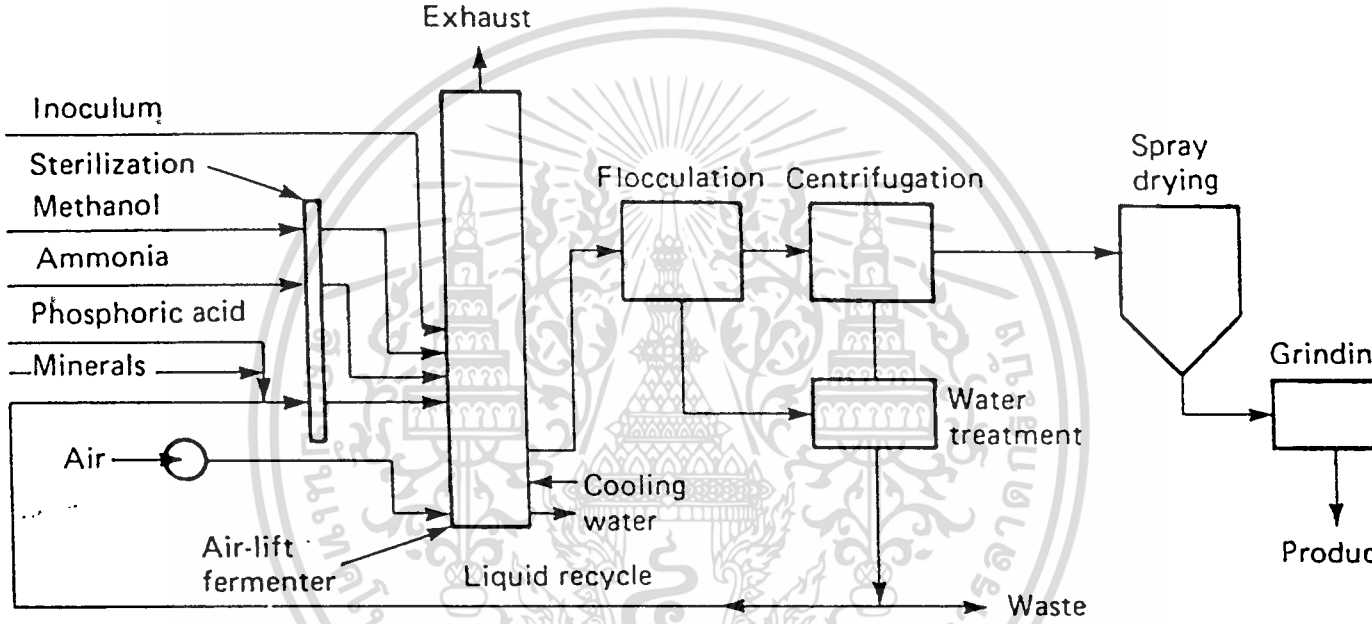
องค์ประกอบต่าง ๆ	ผลผลิต
โปรตีนหยาบ	83-83 (%)
โปรตีนบริสุทธิ์	59-64 (%)
น้ำหนักเซลล์แห้ง	4-30 (กรัมต่อลิตร)
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{max})	0.38-0.5 (ต่อชั่วโมง)
ผลผลิต (Yield)	0.5 (กรัมต่อกรัม)

ที่มา : Gow และคณะ, (1975)

ต่อมา ICI ได้มีการพัฒนาระบบการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยใช้เชื้อ *Methylophilus methylotrophus* ดังแสดงในภาพที่ 2 เป็นการหมักโดยทำให้ความดันอากาศเคลื่อนที่ มีแหล่งไนโตรเจนเป็นแก๊สแอมโมเนีย ควบคุมพีเอช ในช่วง 6.0-7.0 มีอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ 0.5 ต่อชั่วโมง และได้ผลผลิต 0.5 กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเตรท การเก็บเกี่ยวเซลล์ทำได้โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) หรือทำให้แห้ง นอกจากนี้ยังสามารถนำของเหลวที่เหลือจากการหมักกลับไปใช้ในระบบใหม่ได้อีก (Ward,1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2



แสดงกระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเมทานอล

ที่มา : Litchfield (1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. คุณภาพและความปลอดภัยของโปรตีนเซลล์เดียว

โปรตีนเซลล์เดียวผลิตเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์และมนุษย์ ฉะนั้นจึงควรมีคุณค่าทางอาหารและมีความปลอดภัยสูง ซึ่งในตารางที่ 10 ได้แสดงถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ของโปรตีนเซลล์เดียวเปรียบเทียบกับโปรตีนจากพืชและสัตว์

ตารางที่ 10

แสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ของโปรตีนเซลล์เดียวเปรียบเทียบกับถั่วและนมผง

องค์ประกอบต่าง ๆ (%)	Alkane Yeast	Methanol Bacterium	*Fusarium graminearum*	สาหร่าย	ถั่วเหลือง	นมผง
โปรตีน	60.0	80.0	44.3	72.6	42.0	34.0
ไขมัน	9.0	9.5	13.8	7.3	4.0	1.0
กรดนิวคลีอิก	5.0	15.0	-	-	-	-
เกลือแร่	6.0	9.5	3.1	4.7	6.5	8.0
กรดอะมิโน	54.0	65.0	-	-	40.0	-
ความชื้น	4.5	2.8	0	3.6	10.0	5.0

ที่มา : Ward, (1992)

ในโปรตีนเซลล์เดียวพบว่ากรดอะมิโนมีความสำคัญมากโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนตามมาตราฐานของ FAO ซึ่งการเปรียบเทียบนี้แบคทีเรียบางชนิดมีกรดอะมิโน เช่น เมไทโอนีนสูงกว่ามาตราฐานของ FAO ส่วนยีสต์ เชื้อราและถั่วเหลืองจะไม่มีเมไทโอนีน

สำหรับ RNA ซึ่งนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารมนุษย์ไม่ควรเกิน 2 กรัมต่อวัน เพราะถ้ารับประทานในปริมาณมากจะทำให้กรดยูริกในเลือดเพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถทำให้เกิดโรคเกาท์ ฉะนั้นโปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตได้ควรมีการกำจัดกรดนิวคลีอิกออกก่อนโดยใช้ด่างหรือความร้อน เป็นต้น (Ward,1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 อาหารที่ใช้สำหรับแยกเชื้อและการเพาะเลี้ยงเชื้อ (แสดงสูตรและวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก.)

1. Colby and Zatman medium
2. Nutrient Agar (NA)
3. อาหารชนิดต่าง ๆที่ใช้สำหรับการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ

1.2 สารเคมี (Analytical grade) ซึ่งแสดงวิธีเตรียมในภาคผนวก ข.

1. Gram's stain
2. Bovine Serum Albumin (BSA)
3. Folin-Ciocalteu reagent
4. Methanol
5. Sodium carbonate (Na_2CO_3)
6. Sodium hydroxide (NaOH)
7. Copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$)
8. Sodium potassium tartrate ($NaKC_4H_4O_6.4H_2O$)
9. Chromotropic acid
10. Phosphoric acid
11. Potassium permanganate ($KMnO_4$)
12. Sodium bisulfite (Na_2HSO_4)
13. Sulfuric acid (H_2SO_4)

1.3 อุปกรณ์และเครื่องแก้วต่าง ๆ

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
2. เครื่องเขย่า (shaker)
3. กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) Hermle รุ่น ZK 380
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) ORION model SA520
6. สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV/VIS spectrophotometer) UNICAM 8620
7. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
8. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
9. ถังหมัก (fermenter) โดยมีเครื่องกวน รุ่น 502D และเครื่องเติมอากาศ รุ่น 504
10. ตู้อบแห้ง (hot air oven)
11. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
12. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow) Faster รุ่น Bi 48
13. เครื่องกรองแบคทีเรีย
14. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 10-100 ไมโครลิตร และ 200-1000 ไมโครลิตร
15. vortex mixer
16. ตู้เย็นสำหรับเก็บสารเคมี
17. ขวดสำหรับเก็บสารเคมี
18. เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ

2. <u>วิธีการดำเนินการวิจัย</u>

2.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ในดินที่สามารถย่อยสลายเมทานอลได้

เชื้อที่จะนำมาศึกษาเป็นเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินโดยวิธี spread plate ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. ทำตัวอย่างดินให้อยู่ในสภาพแขวนลอย (suspension) โดยใส่ตัวอย่างดิน 1 กรัมลงในน้ำกลั่นที่ทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer จากนั้นทำให้เจือจางที่ 1:10 , 1:100 , ,1:1,000 และ 1:10,000 ตามลำดับ

2. ปิเปตต์ suspension ของดินที่เจือจางตามที่เตรียมไว้ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Colby and Zatman medium เพื่อเป็นการแยกเชื้อที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเมทานอลเป็นส่วนประกอบ

3. ใช้แท่งแก้วงอรูปตัว L ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์แล้วเผาไฟ เกลี่ยให้ suspension ของตัวอย่างกระจายบนผิวของอาหารให้ทั่วถึง (ความเจือจางละ 2 ซ้ำ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน เมื่อครบเวลาที่บ่มเชื้อแล้วนำมาคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีลักษณะแตกต่างกันเก็บไว้บนอาหารผิวเอียง (agar slant)

2.2 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์

1. นำเชื้อที่คัดเลือกได้มาลาก (streak) บนอาหารแข็งให้เป็นทางยาว เผาปลายอีกครั้งแล้วลากจากเส้นสุดท้ายที่ลากไว้ จำนวนเชื้อจะลดน้อยลงตามลำดับ เรียกวิธีนี้ว่า cross streak plate technique

2. นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน เมื่อครบเวลาที่บ่มเชื้อแล้วนำมาคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีลักษณะแตกต่างกัน โดยคัดเลือกเฉพาะที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ เก็บไว้บนอาหารผิวเอียง

3. นำเชื้อที่ได้จากข้อ 2 มาทำการ cross streak ซ้ำอีก 2-3 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อที่ได้นี้มีความบริสุทธิ์จริง จากนั้นเก็บไว้บนอาหารผิวเอียงเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

2.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการติดสีแกรม

1. นำเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วมาลากลงบนอาหารแข็งในจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน

2. สังเกตลักษณะรูปร่าง สีและขนาดของโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหาร

3. นำเชื้อมาทำการย้อมสีแกรม จากนั้นนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อดูว่าเชื้อที่ได้เป็นแกรมบวกหรือแกรมลบ รวมทั้งสังเกตรูปร่าง ขนาดและการเรียงตัวของเซลล์

2.4 การศึกษาหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่แยกได้

การคัดเลือกเชื้อที่เหมาะสมเพื่อนำไปผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวสามารถกระทำโดยนำเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดมาวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowryและคณะ(1951) แสดงวิธีการวิเคราะห์ในภาคผนวก ค. โดยนำเซลล์มาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล ตั้งในน้ำเดือด 10 นาทีแล้วจึงนำมาวัดปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับ Bovine Serum Albumin (BSA) จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่มีปริมาณโปรตีนสูงสุดเพื่อนำมาศึกษาต่อไป

2.4.1 การศึกษาหาปริมาณเมทานอลที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่แยกได้

1. นำเชื้อที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหาร Colby and Zatman medium ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีเมทานอลที่ฆ่าเชื้อแล้วผสมอยู่ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2. นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. วัดอัตราการเจริญของเชื้อทุก ๆ 2 ชั่วโมง โดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เทียบกับอาหารที่ไม่มีเชื้อ โดยวัดจนถึงระยะที่เซลล์เจริญสูงสุด นอกจากนั้นยังวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณเมทานอลที่เหลือโดยวิธี Colorimetric ตามที่แสดงไว้ในภาคผนวก ค. (Boss และ Rahway ,1948)

4. นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟโดยเทียบกับเวลา

2.4.2 การศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่แยกได้

1. นำเชื้อที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหาร Colby and Zatman medium ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีเมทานอลที่ฆ่าเชื้อแล้วผสมอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมตามที่หาได้จากข้อ 2.4.1 โดยเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร เป็นแอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์และโพแทสเซียมไนเตรต 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4.1

2.4.3 การศึกษาหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่แยกได้

1. นำเชื้อที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหาร Colby and Zatman medium ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีเมทานอลที่ฆ่าเชื้อแล้วผสมอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมตามที่หาได้จากข้อ 2.4.1 และมีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมตามที่หาได้จากข้อ 2.4.2 โดยมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นใหม่ดังนี้คือ 0.1, 0.5และ1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4.1

2.4.4 การศึกษาหาค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่แยกได้

1. นำเชื้อที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหาร Colby and Zatman medium ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีเมทานอลที่ฆ่าเชื้อแล้วผสมอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมตามที่หาได้จากข้อ 2.4.1 มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมตามที่หาได้จากข้อ 2.4.2 และมีปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมที่หาได้จากข้อ 2.4.3 โดยมีการเปลี่ยนค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 6 ,7 และ8ตามลำดับ และทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4.1

2.5 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อที่แยกได้

นำเชื้อที่แยกได้มาทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อตาม Bergey's Manual (Holt และคณะ, 1994) เพื่อให้ทราบว่าเชื้อที่ศึกษาอยู่เป็นเชื้อชนิดไหน โดยแสดงวิธีการทดสอบในภาคผนวก ค.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การศึกษาการเจริญของเชื้อในถังหมัก

2.6.1 การศึกษาหาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

1. นำเชื้อที่แยกได้มาเลี้ยงในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ที่บรรจุอาหารอยู่ 1.0 ลิตร โดยมีปัจจัยที่เหมาะสมต่าง ๆ ที่หาได้ตามข้อ 3.2.4 ใช้เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการให้อากาศ 1 vvm. ความเร็วในการกวน 250, 500 และ 750 รอบต่อนาที ตามลำดับ

2. วัดอัตราการเจริญของเชื้อทุก ๆ 2 ชั่วโมง โดยทำการวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เทียบกับอาหารที่ไม่มีเชื้อ วัดจนถึงระยะที่เซลล์เจริญสูงสุด นอกจากนั้นยังวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณเมทานอลที่เหลือ

3. นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟโดยเทียบกับเวลา

2.6.2 การศึกษาหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในถังหมัก

1. นำเชื้อที่แยกได้มาเลี้ยงในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ที่บรรจุอาหารอยู่ 1.0 ลิตร โดยมีปัจจัยที่เหมาะสมต่าง ๆ ที่หาได้ตามข้อ 2.4 ใช้เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการให้อากาศ 1.5 vvm. ความเร็วในการกวน 250, 500และ750 รอบต่อนาที ตามลำดับ

2. วัดอัตราการเจริญของเชื้อทุก ๆ 2 ชั่วโมง โดยทำการวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เทียบกับอาหารที่ไม่มีเชื้อ วัดจนถึงระยะที่เซลล์เจริญสูงสุด นอกจากนั้นยังวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณเมทานอลที่เหลือ

3. นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟโดยเทียบกับเวลา และเทียบกับกราฟที่หาได้จากข้อ 2.6.1 เพื่อหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อเชื้อในถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ในดินที่สามารถย่อยสลายเมทานอลได้

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเมทานอลจากตัวอย่างดินโดยใช้ดินบริเวณท่อน้ำทิ้งจากห้องปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานครและดินโคลนบริเวณเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร มาทำการทดลองเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอลผสมอยู่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ สามารถแสดงผลได้ในตารางที่ 11 และจากการทดลองพบว่า เชื้อที่แยกได้จากดินส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนสั้น มีโคโลนีกลมนูน สีขาว เหลืองและส้ม มีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 30-60 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเชื้อหมายเลขที่ 11 ให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุดคือ 64.1 เปอร์เซ็นต์ จึงคัดเลือกเชื้อตัวนี้มาใช้ตลอดการทดลอง

Amano และคณะ (1975) ได้ทำการทดลองโดยนำดินโคลนในประเทศญี่ปุ่น 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายดินนี้มา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารที่มีเมทานอล 1.0 เปอร์เซ็นต์ผสมอยู่ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 96 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าเชื้อที่เจริญส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น จากนั้นนำเชื้อที่ได้ถ่ายลงในอาหารแข็งที่เติมวุ้น 2 เปอร์เซ็นต์ จะเกิดโคโลนีภายใน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อที่มีอัตราการเจริญสูงสุดมาใช้ทำการทดลองต่อไป

Faust และคณะ (1977) ทำการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างดินที่สามารถย่อยสลายเมทานอลได้ ซึ่งเชื้อที่พบส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรีย แกรมลบ เป็นท่อนสั้น จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้นี้มาเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ถึง 2 วันแล้วหาน้ำหนักเซลล์แห้งและคัดเลือกเชื้อที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดมาทำการทดลองต่อไป

Nawawy และ Gnan (1983) ทำการคัดแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายเมทานอลได้จากตัวอย่างปุ๋ย ดิน และน้ำนมดิบ โดยนำมาเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีเมทานอลผสมอยู่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และทำการคัดแยกเชื้อที่เจริญได้เร็วมาใช้ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากที่กล่าวมานี้พบว่าหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกเชื้อที่เหมาะสมเพื่อมาทำการทดลองต่อไปนั้นมีหลายข้อ เช่น เชื้อที่ให้โปรตีนสูงสุด เชื้อที่มีอัตราการเจริญเร็ว หรือเชื้อที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด ทั้งนี้ขึ้นกับการทดลองว่าต้องการอะไร ซึ่งในการทดลองนี้ต้องการเชื้อที่ให้โปรตีนสูงสุดเพื่อนำมาผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวดังนั้นจึงใช้ปริมาณโปรตีนเป็นตัวคัดเลือกเชื้อ

ตารางที่ 11

แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปร่างและการติดสีแกรม

และปริมาณโปรตีนของเชื้อที่แยกได้จากดิน

เชื้อจุลินทรีย์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	รูปร่างและการติดสีแกรม	โปรตีน (%)
1	โคโลนีกลมนูน สีขาว ผิวเรียบมัน	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	53.5
2	โคโลนีกลมนูน ใส ผิวเรียบมัน	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	58.5
3	โคโลนีกลมแบน สีขาว ผิวเรียบมัน	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	42.3
4	โคโลนีกลมนูน ใส ผิวเรียบมัน	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	48.7
5	โคโลนีกลมแบน ใส ผิวเรียบมัน	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	46.8
6	โคโลนีกลมแบน ขาวขุ่น ผิวเรียบมัน	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	32.4
7	โคโลนีกลมแบน ขาวขุ่น ขอบหยัก	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	49.2
8	โคโลนีกลมแบน สีขาว ผิวเรียบมัน	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	55.7
9	โคโลนีกลมนูน สีขาว ผิวเรียบมัน	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	45.1
10	โคโลนีกลมแบน ใส ผิวขรุขระ	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	53.7
11	โคโลนีกลมนูน สีเหลือง ขอบหยัก	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	64.1
12	โคโลนีกลมนูน สีเหลือง ขอบหยัก	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	54.6
13	โคโลนีกลมนูน สีเหลือง ผิวเรียบมัน	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	44.8
14	โคโลนีกลมนูน สีเหลือง ขอบหยัก	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	30.9
15	โคโลนีกลมนูน สีส้ม ขอบหยัก	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	49.6
16	โคโลนีกลมนูน สีส้ม ผิวเรียบมัน	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	57.6
17	โคโลนีกลมนูน สีส้ม ผิวเรียบมัน	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	52.4
18	โคโลนีกลมนูน สีขาว ผิวเรียบมัน	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	49.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	รูปร่างและการติดสีแกรม	โปรตีน (%)
19	โคโลนีกลมแบน สีส้ม ผิวเรียบมัน	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	55.2
20	โคโลนีกลมนูน สีส้ม ผิวเรียบมัน	รูปท่อนสั้น แกรมลบ	50.1

2. <u>การศึกษาหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่แยกได้</u>

2.1 ผลของการหาปริมาณเมทานอลที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่แยกได้

จากการเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้จากดินในอาหาร Colby and Zatman ที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณเมทานอลที่เติมลงไปจาก 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็น 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับนั้น สามารถแสดงผลการทดลองได้ดังตารางที่ 12 และภาพที่ 3 ซึ่งพบว่าปริมาณเมทานอลที่ใช้เป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญของเชื้อ กล่าวคือ ถ้าให้ในปริมาณมากจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ดังภาพที่ 3 พบว่าอาหารที่มีเมทานอลเข้มข้น1.5 เปอร์เซ็นต์ นั้นเชื้อมีช่วงระยะปรับตัวที่นาน คือ 0-18 ชั่วโมง และใช้เวลา 45 ชั่วโมงจึงถึงระยะที่เชื้อเจริญสูงสุด นอกจากนั้นยังให้น้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่าอาหารที่มีเมทานอล 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหารที่มีเมทานอลเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ นั้นมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกันคือมีช่วงระยะเวลาในการปรับตัว 0-15 ชั่วโมง และใช้เวลา 42 ชั่วโมง จึงถึงระยะที่เชื้อเจริญสูงสุด แต่เมื่อพิจารณาจากตารางที่ 12 พบว่าอาหารที่มีเมทานอลเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าผลผลิตซึ่งเป็นค่าของเซลล์ที่ผลิตได้ 1 กรัมต่ออาหารที่ใช้ไป 1 กรัม มากกว่าคือ 0.55 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล มีปริมาณโปรตีน 68.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเซลล์ 2.0 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจริญจำเพาะ 0.12 ต่อชั่วโมง ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Nawawyและ Gnan (1983) ที่ผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในอาหารที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลผลิต 0.4 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล โปรตีน 65 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณที่เหมาะสมและนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

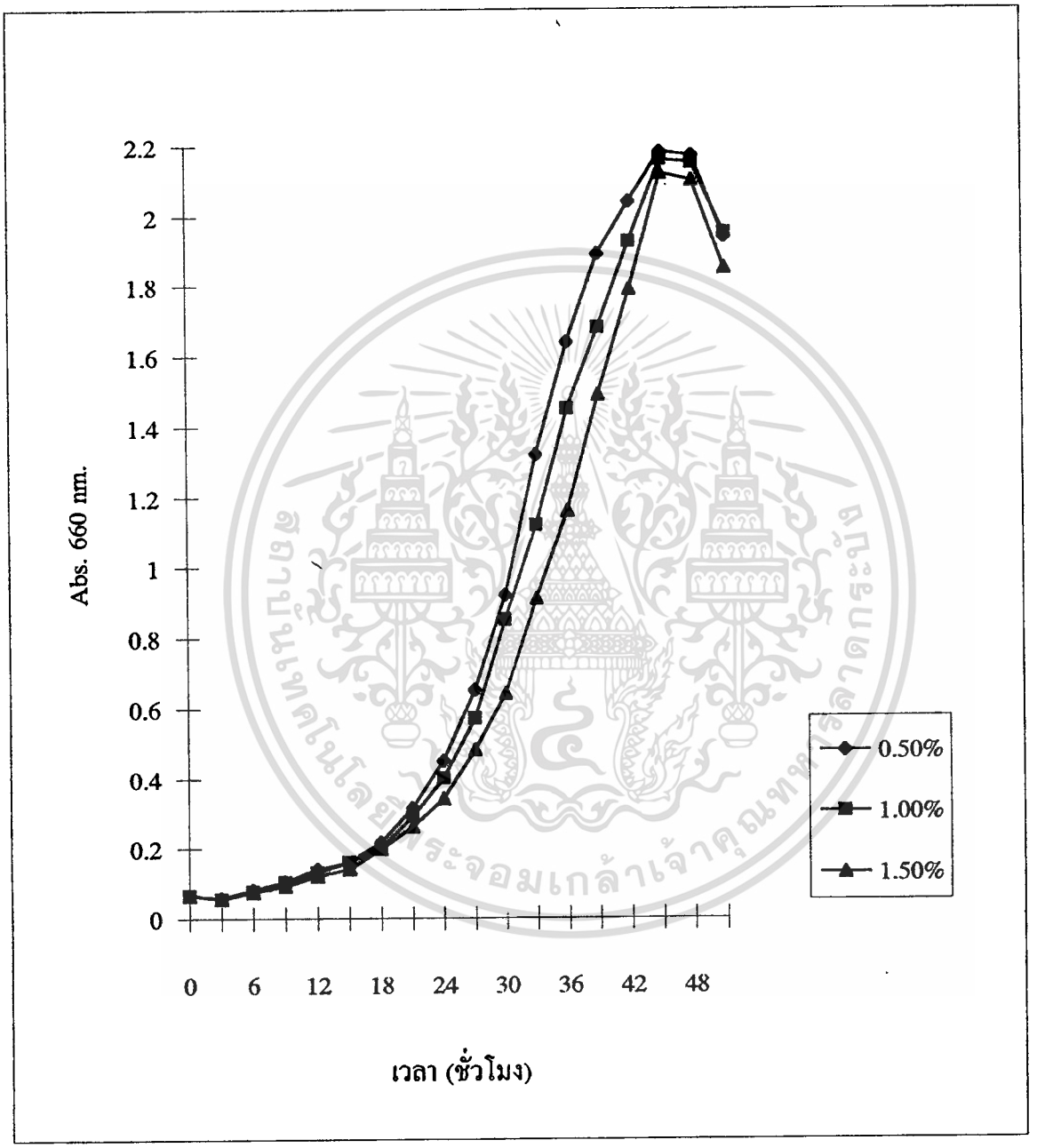
ตารางที่ 12

แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิต ปริมาณโปรตีนและปริมาณเซลล์ของเชื้อที่แยกได้ในอาหารที่มีเมทานอลต่าง ๆ กัน

ปริมาณเมทานอล (%)	μ (h^{-1})	ผลผลิต ($Y_{x/s}$) (กรัมเซลล์/กรัมเมทานอล)	โปรตีน (%)	ปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
0.5	0.12	0.55	68.5	2.0
1.0	0.11	0.39	65.3	1.99
1.5	0.08	0.27	63.7	1.95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 3



การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีปริมาณเมทานอลต่าง ๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ผลของการหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่แยกได้

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการทดลองนี้มี 3 แหล่ง คือ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียม-คลอไรด์และโพแทสเซียมไนเตรตที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร โดยเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเดิมคือ แอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งได้ผลการทดลองดังตารางที่ 13 และภาพที่ 4 พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ แอมโมเนียมซัลเฟต รองลงมาคือ แอมโมเนียมไนเตรต ซึ่งมีอัตราการเจริญที่สูงกว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น โดยแอมโมเนียมไนเตรตมีช่วงระยะเวลาในการปรับตัว 0-15 ชั่วโมง และใช้เวลา 42 ชั่วโมงจึงถึงระยะที่เชื้อมีการเจริญสูงสุด นอกจากนั้นยังให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.10 ต่อชั่วโมง ผลผลิต 0.43 กรัมเมทานอลต่อกรัมเซลล์ ปริมาณโปรตีน 62.1 เปอร์เซ็นต์และปริมาณเซลล์ 1.74 กรัม แต่เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนตามสูตรอาหารของ Colby and Zatman medium คือแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าแหล่งไนโตรเจนใหม่ทั้ง 3 ชนิดมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ผลผลิต โปรตีนและปริมาณเซลล์ต่ำกว่าแหล่งไนโตรเจนเดิมคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งมีอัตราการเจริญจำเพาะ 0.12 ต่อชั่วโมง ผลผลิต 0.55 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล ปริมาณโปรตีน 68.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเซลล์ 2.0 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 13) ดังนั้นจึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ

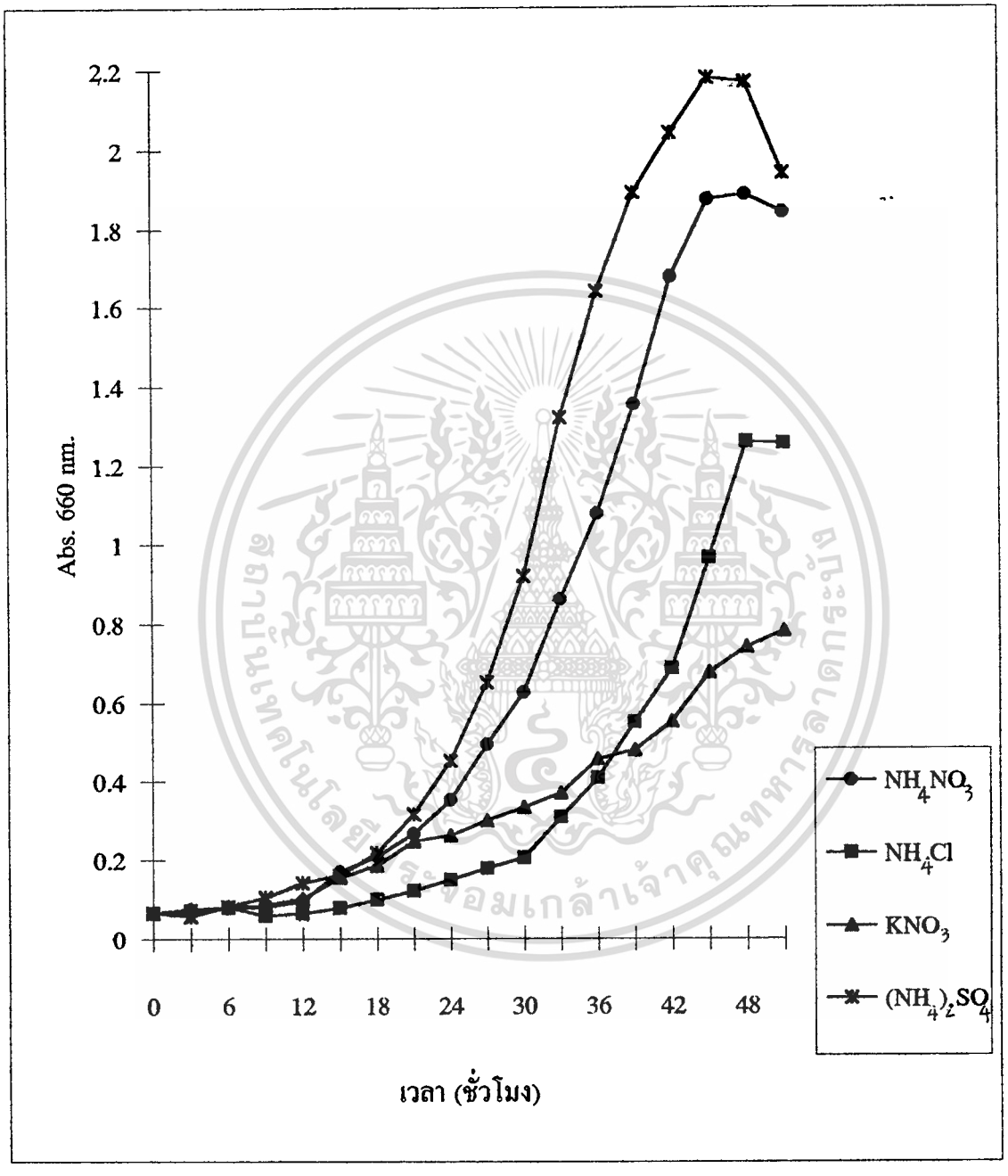
ตารางที่ 13

แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิต ปริมาณโปรตีนและปริมาณเซลล์ของเชื้อที่แยกได้ในอาหารที่แหล่งไนโตรเจน ๆ กัน

แหล่งไนโตรเจน	μ (h^{-1})	ผลผลิต ($Y_{x/s}$) (กรัมเซลล์/กรัมเมทานอล)	โปรตีน (%)	ปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
$(NH_4)_2SO_4$	0.12	0.55	68.5	2.0
NH_4NO_3	0.10	0.43	62.1	1.74
NH_4Cl	0.07	0.35	60.5	1.16
KNO_3	0.05	0.32	58.6	0.72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4



การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ผลของการหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่แยกได้

ผลการศึกษาหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่แยกได้แสดงผลในตารางที่ 14 และภาพที่ 5 พบว่าอาหารที่มีแอมโนเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเจริญที่สูงสุดคือ มีช่วงระยะเวลาในการปรับตัว 0-12 ชั่วโมง และใช้เวลา 48 ชั่วโมง จึงถึงระยะที่เชื้อที่อัตราการเจริญสูงสุด (ภาพที่ 5) นอกจากนั้นยังให้อัตราการเจิญจำเพาะ ผลผลิต โปรตีนและปริมาณเซลล์สูงที่สุด คือ 0.15 ต่อชั่วโมง 0.57 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล 69.4 เปอร์เซ็นต์ และ 2.12 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 14) ในขณะที่แอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญของเชื้อน้อยมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้นข้นสูงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ดังนั้นจึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ

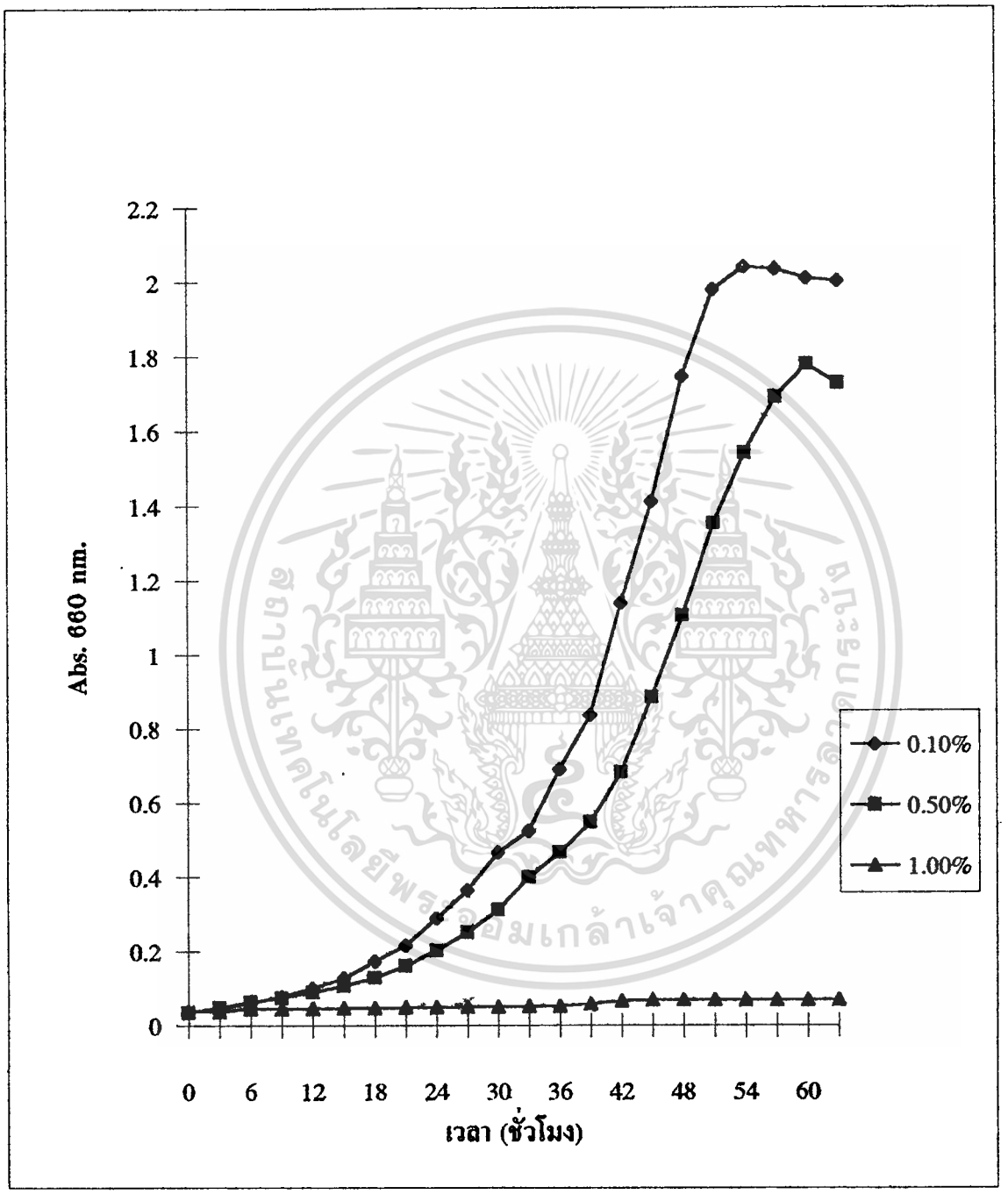
ตารางที่ 14

แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิต ปริมาณโปรตีนและปริมาณเซลล์ของเชื้อที่แยกได้ในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ กัน

$(NH_4)_2SO_4$ (%)	μ (h^{-1})	ผลผลิต ($Y_{x/s}$) (กรัมเซลล์/กรัมเมทานอล)	โปรตีน (%)	ปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
0.1	0.15	0.57	69.4	2.12
0.5	0.09	0.50	65.8	1.64
1.0	0	0.39	63.2	0.06

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 5



การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตต่าง ๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ผลของการหาค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่แยกได้

ผลการศึกษาหาค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่แยกได้แสดงผลในตารางที่ 15 และภาพที่ 6 พบว่า ที่พีเอช 8 เชื้อมีอัตราการเจริญน้อย ในขณะที่การเจริญของเชื้อสูงสุดที่พีเอช 7 คือมีระยะเวลาในการปรับตัว 0-12 ชั่วโมง และใช้เวลา 45 ชั่วโมงจึงถึงระยะที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด (ภาพที่ 6) ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียเจริญได้น้อยในอาหารที่เป็นด่าง แต่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่เป็นกลางหรือกรดอ่อน เมื่อพิจารณาที่ พีเอช 7 ให้ผลผลิตสูงที่สุด คือ 0.55 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล โปรตีน 69.1 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเจริญจำเพาะ 0.15 ต่อชั่วโมง และปริมาณเซลล์ 2.10 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 15) ซึ่งคล้ายกับผลการทดลองของ Kim และ Ryu (1976) ที่หาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่สามารถย่อยสลายเมทานอลเพื่อนำมาผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว โดยทำการทดลองพบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Methylomonas* sp. อยู่ในช่วง 7.0 ถึง 7.5 และพบว่าช่วงที่ดีที่สุดคือ พีเอช 7.3 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้พีเอช 7 เป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ

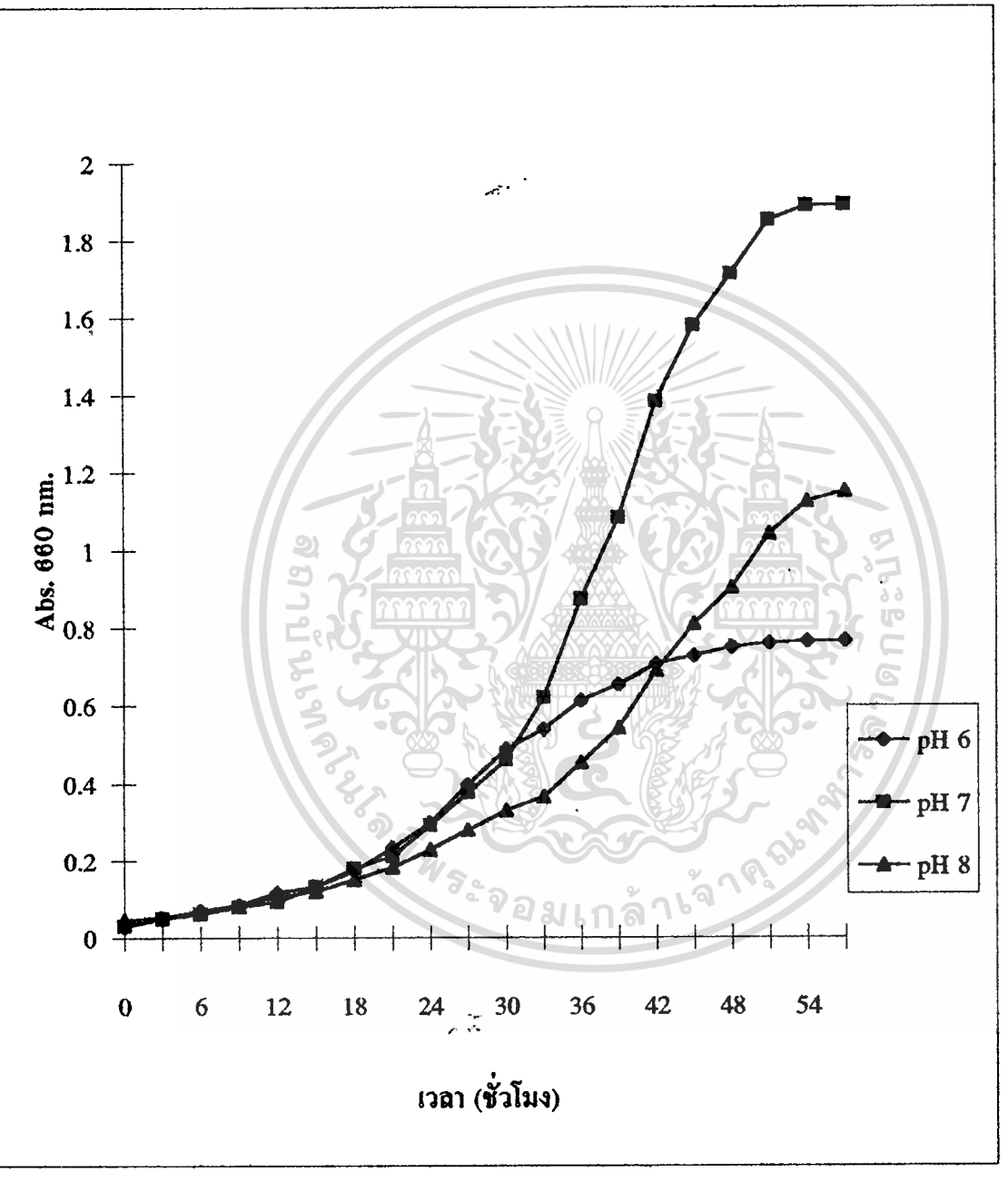
ตารางที่ 15

แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิต ปริมาณโปรตีนและปริมาณเซลล์ของเชื้อที่แยกได้ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่าง ๆ กัน

pH	μ (h^{-1})	ผลผลิต ($Y_{x/s}$) (กรัมเซลล์/กรัมเมทานอล)	โปรตีน (%)	ปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
6.0	0.09	0.23	66.2	0.70
7.0	0.15	0.55	69.1	2.10
8.0	0.08	0.35	67.8	1.03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 6



การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่าง ๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ผลของการเจริญของเชื้อที่แยกได้ในอาหารที่เหมาะสม

ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อที่แยกได้ในอาหารที่เหมาะสมแสดงผลในตารางที่ 16 และภาพที่ 7 พบว่าระยะเวลาในการเจริญของเชื้อเร็วขึ้นกว่าเดิม คือมีช่วงระยะเวลาในการปรับตัว 0-9 ชั่วโมง และใช้เวลา 45 ชั่วโมงจึงถึงระยะที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด ทั้งนี้เนื่องจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร Colby and Zatman ที่ดัดแปลงโดยมีการเติมเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 7 และพบว่า เชื้อสามารถให้ผลผลิตที่มากขึ้นคือ อัตราการเจริญจำเพาะ 0.14 ต่อชั่วโมง ผลผลิต 0.611 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล โปรตีน 72.2 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเซลล์ 2.18 กรัมต่อลิตร

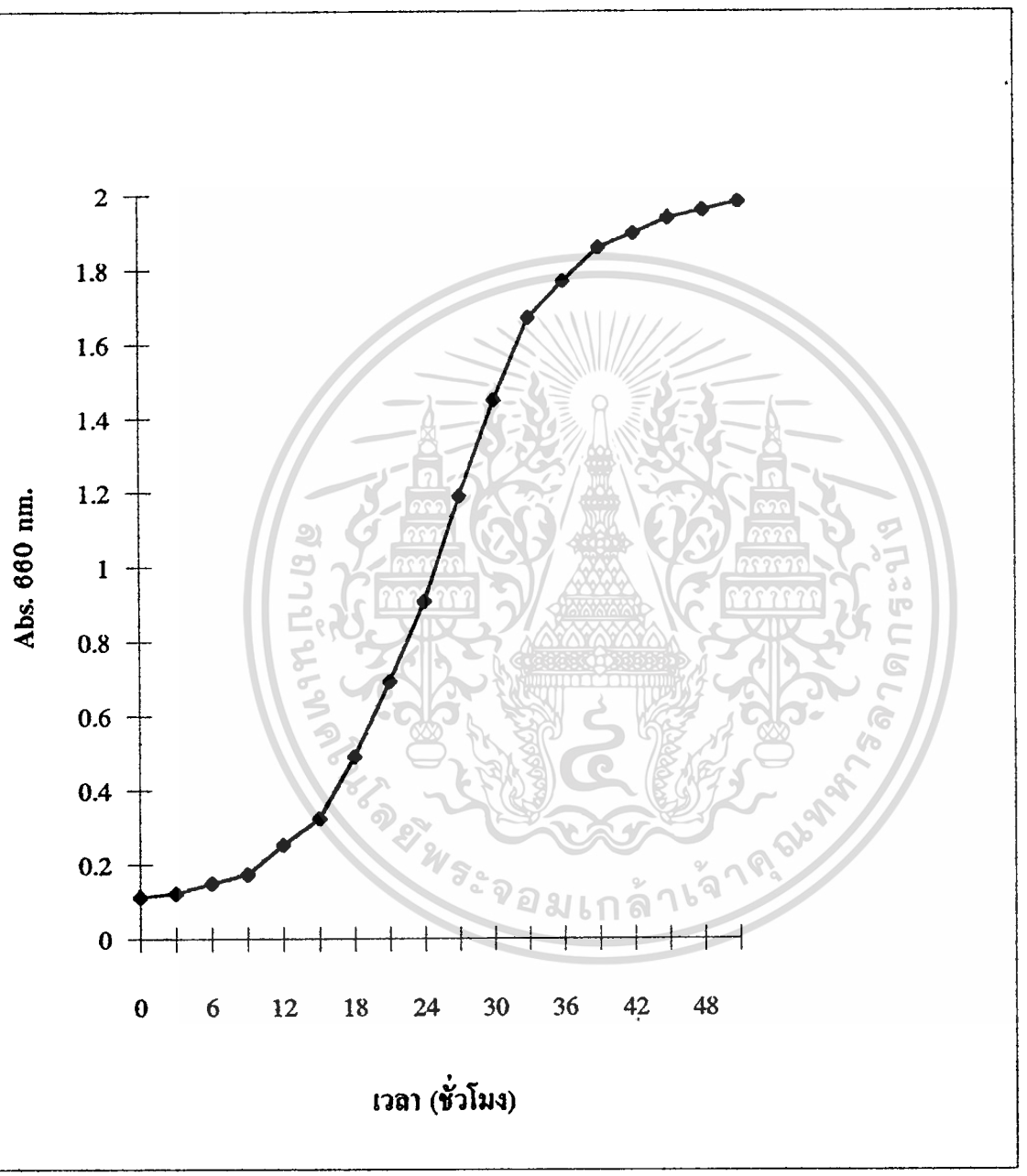
ตารางที่ 16

แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิต ปริมาณโปรตีนและปริมาณเซลล์ของเชื้อที่แยกได้ในอาหารที่เหมาะสม

เชื้อจุลินทรีย์	μ (h^{-1})	ผลผลิต ($Y_{x/s}$) (กรัมเซลล์/กรัมเมทานอล)	โปรตีน (%)	ปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
เชื้อที่แยกได้จากดิน	0.14	0.611	72.2	2.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 7



การเจริญของเชื้อในอาหารที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. <u>การจัดจำแนกชนิดของเชื้อที่แยกได้</u>

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อทำให้ทราบว่าเชื้อที่ศึกษาอยู่นั้นเป็นเชื้อชนิดใดและสามารถทราบคุณสมบัติต่าง ๆ ของเชื้อเพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการศึกการต่อไปได้ ซึ่งเมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อตาม Bergey's Manual พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังนี้คือ

มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นขนาด 0.3x2 ไมครอน เคลื่อนที่ได้โดยใช้ flagella ไม่สร้างสปอร์ติดสีแกรมลบ

ลักษณะโคโลนีบน Nutrient agar ที่ 37 องศาเซลเซียส 3 วัน มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-4 มิลลิลิเมตร สีเหลืองอ่อน กลมขอบหยัก

เมื่อทดสอบทางชีวเคมีได้ผลดังตารางที่ 17 และ 18 ซึ่งจากการทดสอบพบว่าเชื้อที่คัดแยกได้จากดินนี้คือเชื้อ *Pseudomonas* sp. เป็นเชื้อประเภท Methylotroph สามารถย่อยสลายเมทานอลได้ ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับ Miura และคณะ (1979) ที่จัดจำแนกชนิดของเชื้อที่สามารถย่อยสลายเมทานอลได้เชื้อชนิดเดียวกันคือ *Pseudomonas* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 17

แสดงผลการจัดจำแนกชนิดของเชื้อตาม Bergey's Manual

การทดสอบ	ผลการทดสอบ
Catalase reaction	+
Oxidase reaction	+
Methyl red test	+
Voges-Proskauer reaction	+
Utilization of citrate (Simmon's Citrate agar)	-
Gelation	-
Hydrolysis of starch	+
Production of indole	-
Production of hydrogen sulfide	-
Reduction of nitrate	+
Denitrification reaction	+
Utilization of inorganic nitrogen	
- NH_4^+	+
- NO_3^-	+
Urease reaction	+
Oxidation-Fermentation test	oxidation (glucose)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 18
แสดงผลการย่อยสลายน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของเชื้อที่แยกได้จากดิน

ชนิดของน้ำตาล	การผลิตกรด	การเกิดแก๊ส
L-Arabinose	-	-
D-Xylose	-	-
D-Glucose	+	-
D-Mannose	+	-
D-Fructose	+	-
D-Galactose	-	-
Maltose	+	-
Sucrose	+	-
Lactose	-	-
Trehalose	+	-
D-Sorbitol	-	-
D-Mannitol	+	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การเจริญของเชื้อในถังหมัก

4.4.1 ผลการศึกษาหาความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในถังหมัก

การเจริญของเชื้อขึ้นกับอัตราการให้อากาศและความเร็วในการกวน ซึ่งผลการทดลองของความเร็วรอบในการกวนในถังหมักต่อการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในอาหาร Colby and Zatman medium ที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเป็น 7.0 ให้อากาศ 1 vvm. และใช้ความเร็วในการกวนต่าง ๆ กันคือ 250,500 และ 750 รอบต่อนาที ตามลำดับ ปรากฏผลดังนี้คือที่ความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที ได้อัตราการเจริญจำเพาะ ผลผลิต ปริมาณโปรตีนและปริมาณเซลล์สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 19 สำหรับการกวนที่ 750 รอบต่อนาที ถึงแม้ว่าจะทำให้ออกซิเจนละลายได้ดีและช่วยให้อาหาร ออกซิเจนและเชื้อคลุกเคล้าได้ทั่วตลอดถังหมักก็ตาม แต่การใช้ความเร็วที่มากเกินไปทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญได้ ส่งผลให้เกิดออกซิเจนภายในถังหมักมากเกินไปจึงทำให้เกิดฟองล้นออกมาเป็นเหตุให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่ายจึงไม่สามารถทำการทดลองที่ความเร็วรอบ 750 รอบต่อนาทีได้ และในกรณีที่ความเร็วรอบของการกวนเป็นไปอย่างช้า ๆ จะทำให้ออกซิเจนจากฟองอากาศละลายในอาหารได้น้อย เชื้อเกาะกันเป็นกลุ่ม ทำให้เชื้อที่อยู่ภายในกลุ่มได้รับออกซิเจนและอาหารน้อยจึงมีอัตราการเจริญไม่เต็มที่ (ปราโมทย์ ศิริโรจน์,2521) จากการทดลองนี้จะเห็นว่าเมื่อใช้ความเร็วรอบในการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการเจริญของเชื้อจะต่ำกว่าความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที ดังแสดงในภาพที่ 8

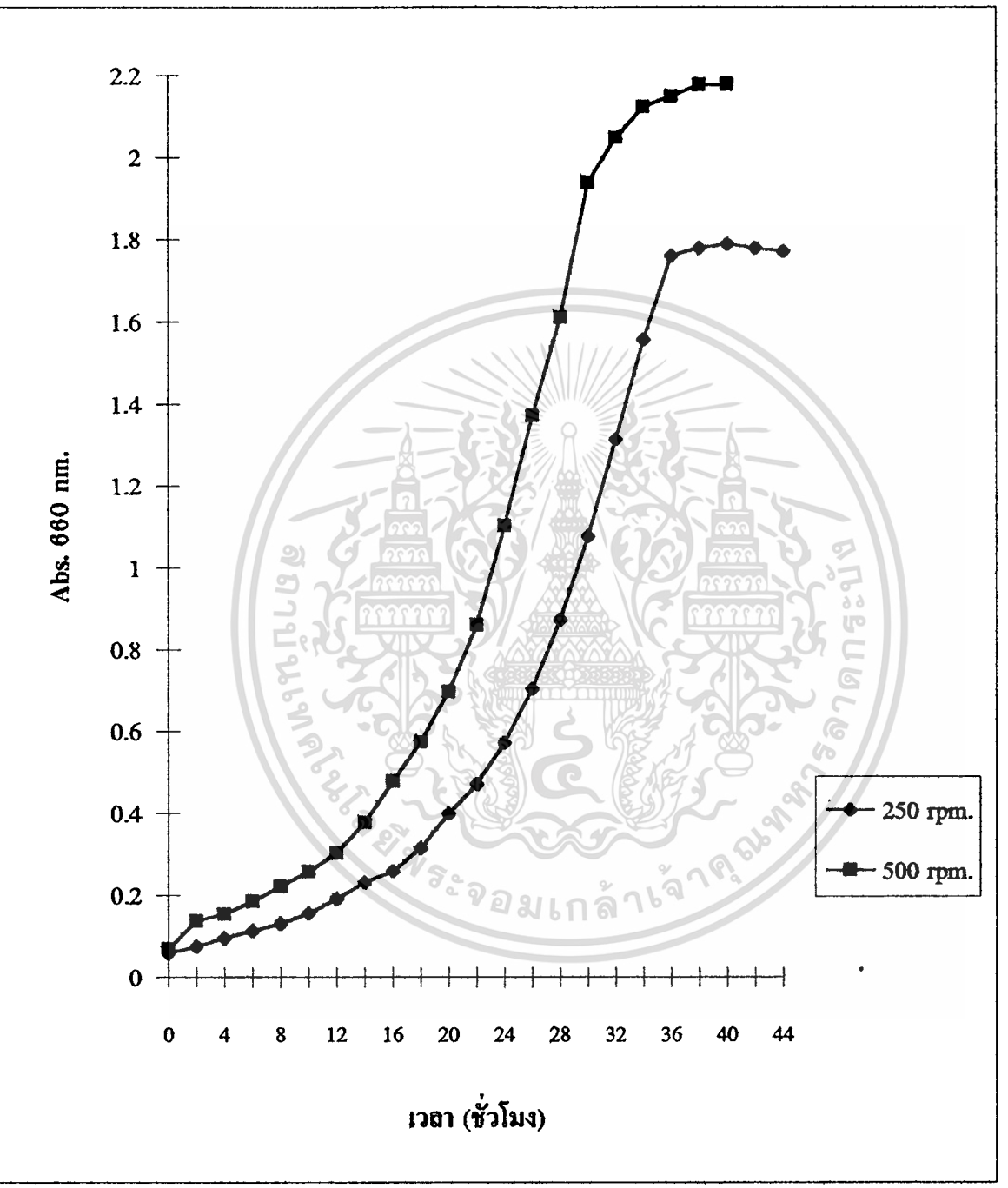
ตารางที่ 19

แสดงผลการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในถังหมัก
ที่มีอัตราการให้อากาศ 1 vvm.. และความเร็วในการกวนต่าง ๆ กัน

ความเร็วในการกวน (รอบต่อนาที)	μ (h^{-1})	ผลผลิต ($Y_{x/s}$) (กรัมเซลล์/กรัมเมทานอล)	โปรตีน (%)	ปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
250	0.14	0.61	68.01	2.21
500	0.21	0.65	72.8	2.28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 8



การเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1 vvm. และความเร็วในการกวน 250 และ 500 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในถังหมัก

เมื่อได้ความเร็วที่เหมาะสมคือ 500 รอบต่อนาทีแล้วทำการหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม สามารถแสดงผลได้ในตารางที่ 20 และภาพที่ 9 พบว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm. ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.25 ต่อชั่วโมง ผลผลิต 0.72 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล โปรตีน 73.07 เปอร์เซ็นต์และปริมาณเซลล์ 2.44 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าเมื่อเทียบกับการให้อากาศ 1 vvm. ทั้งนี้เป็นเพราะว่าเมื่อให้อากาศ 1 vvm. อัตราการละลายของออกซิเจนจากฟองอากาศไม่พอกับอัตราการใช้ออกซิเจนของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่มีอัตราการเจริญเป็นแบบ logarithmic growth และเมื่อให้อากาศ 1.5 vvm. เชื้อสามารถใช้ออกซิเจนจากฟองอากาศเพียงพอหรือมากกว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของเชื้อในขณะที่มีการเจริญ (ปราโมทย์ ศิริโรจน์,2521) จึงทำให้มีอัตราการเจริญสูงสุด ใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Haggstrom (1969) ที่ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเมทานอลโดยใช้เชื้อที่แยกได้จากดิน เลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 1-2 มิลลิลิตรต่อลิตร ได้ปริมาณโปรตีน 73 เปอร์เซ็นต์ และ Amano และคณะ (1975) ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่สามารถย่อยสลายเมทานอลได้ ให้ปริมาณโปรตีน 73.1 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm. เชื้อใช้ระยะปรับตัว 0-5 ชั่วโมง และใช้เวลา 24 ชั่วโมงจึงถึงระยะที่เชื้อเจริญสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับ ที่ 1 vvm. ใช้เวลา 34 ชั่วโมง (ภาพที่ 9) แสดงว่าเชื้อต้องการอากาศในปริมาณมากเพื่อให้การเจริญเร็วขึ้น และในภาพที่ 10 เป็นการแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อกับการใช้อาหารและปริมาณเซลล์ที่ผลิตได้ พบว่าเชื้อมีการใช้อาหารในการสร้างเซลล์จนหมดและได้ปริมาณเซลล์ 2.44 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง

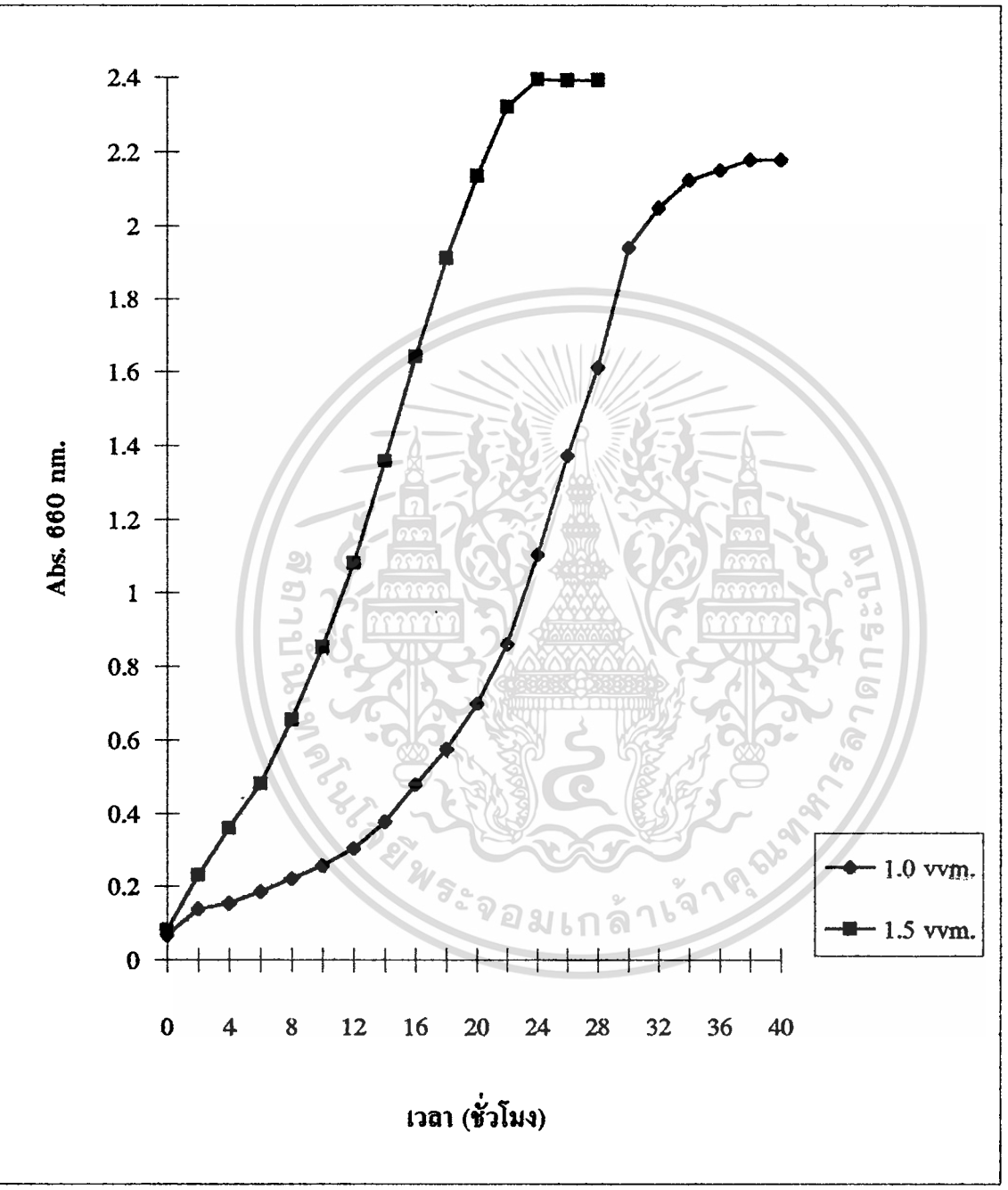
ตารางที่ 20

แสดงผลการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในถังหมักที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาทีและมีอัตราการให้อากาศต่าง ๆ กัน

อัตราการให้อากาศ (vvm.)	μ (h^{-1})	ผลผลิต ($Y_{x/s}$) (กรัมเซลล์/กรัมเมทานอล)	โปรตีน (%)	ปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
1.0	0.21	0.65	72.80	2.28
1.5	0.25	0.72	73.07	2.44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

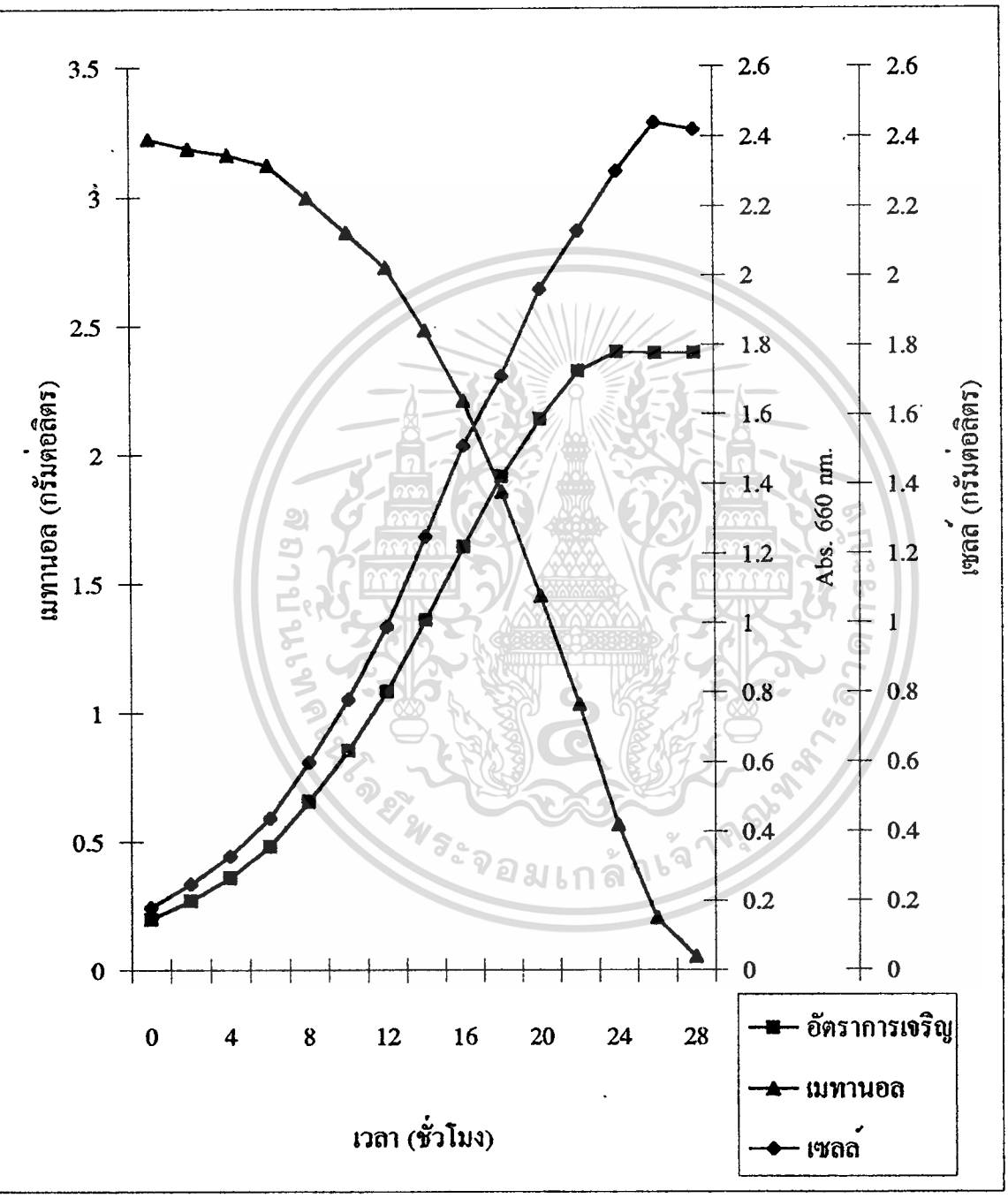
ภาพที่ 9



การเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในถังหมักที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศต่าง ๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 10



แสดงความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. กับการใช้อาหารและปริมาณเซลล์ในถังหมักที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศ 1.5 vvm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเมทานอลโดยทำการคัดเลือกเชื้อจากดินที่สามารถย่อยสลายเมทานอลได้จากแหล่งดินโคลนและดินบริเวณท่อน้ำทิ้งจากห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ พบว่ามีเชื้อหลายชนิดที่สามารถย่อยสลายเมทานอลได้ ซึ่งเชื้อส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนสั้น และได้คัดเลือกเชื้อที่มีปริมาณโปรตีนสูงสุดคือ 64.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำมาใช้เป็นเชื้อในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวต่อไป ซึ่งเมื่อทำการจัดจำแนกเชื้อตาม Bergy's Manual พบว่าเชื้อที่ได้นี้คือเชื้อ *Pseudomonas* sp. ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถย่อยสลายเมทานอลได้

จากการศึกษาหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Colby and Zatman medium สูตรดัดแปลงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนและปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้นและใช้ระยะเวลาในการปรับตัวลดลงได้ผลดังนี้คือ แหล่งคาร์บอนใช้เมทานอลเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ แหล่งไนโตรเจนใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 7 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.14 ต่อชั่วโมง ผลผลิต 0.611 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล ปริมาณโปรตีน 72.2 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเซลล์ 2.18 กรัมต่อลิตร นอกจากนั้นยังมีระยะปรับตัวของเชื้อ 0-9 ชั่วโมงและใช้เวลา 45 ชั่วโมงจึงถึงระยะที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด และเมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตรการใช้อาหาร 1 ลิตรและหาความเร็วในการกวนและอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ โดยใช้ความเร็วในการกวน 3 ระดับ คือ 250 , 500 และ 750 รอบต่อนาที พบว่าที่ความเร็ว 750 รอบต่อนาที ไม่สามารถทำการทดลองได้เนื่องจากมีความเร็วที่สูงเกินไปทำให้อาหารเกิดฟองและความดันภายในถังหมักมากขึ้นด้วย ซึ่งในโรงงานอุตสาหกรรมการหมักจะไม่นิยมใช้ความเร็วที่สูงเพราะเป็นการสิ้นเปลืองพลังงานทำให้ต้นทุนการผลิตสูงและยังทำให้อายุการใช้งานของเครื่องสั้นลง จากการทดลองได้ความเร็วที่เหมาะสมคือ 500 รอบต่อนาที ที่มีอัตราการให้อากาศ 1.5 vvm. ได้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.25 ต่อชั่วโมง ผลผลิต 0.72 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล โปรตีน 73.07 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ 2.44 กรัมต่อลิตร นอกจากนั้นมีระยะปรับตัว 0-5 ชั่วโมงและใช้เวลา 24 ชั่วโมง จึงถึงระยะที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ดวงพร คันธโชติ. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2530.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง, 2534.

ปราโมทย์ ศิริโรจน์. การคัดเลือกสายพันธุ์และการเลี้ยงยีสต์ที่มีโปรตีนสูงในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปอาหารถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2521.

วรรณา วงศ์ชวลิตกุล. " โปรตีนเซลล์เดียว ". วารสารอาหารและอุตสาหกรรมเกษตร. ปีที่2 ฉบับที่ 1(2528) : 1-5.

วราวุฒิ ครูส่ง. เทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2529.

สุมาลี เหลืองสกุล. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร, 2527.

อรพิน ภูมิภมร. " โปรตีนเซลล์เดียวกับโภชนาการ ". วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่4 ฉบับที่ 3(2532) : 23-35.

Abou-Zeid, A.A., Khan, J.A. and Abulnaja, K.O. " On Methods for Reduction of Nucleic Acids Content in a Single-Cell Protein from Gas Oil ". Bioresource Tech. 52 (1995) PP. 21-24.

Amano, Y. and others. " Isolation and Characterization of *Methylomonas methanolica* nov. sp. ". J. Ferment. Technol. 6 (1975) PP.315-326.

Boss, R.N. and Rahway, N.J. " Quantitative Colorimetric Microdetermination of Methanol with Chromotropic Acid Reagent ". Anal. Chem. 20 (1948) P.964.

Calloway, D.H. Single Cell Protein : The Place of SCP in Man's Diet. London : Academic Press, 1973.

Castro, A.C., Sinskey, A.J. and Tanneubaum, S.R. " Reduction of Nucleic Acid Content in *Candida* Yeast Cells by Bovine Pancretic Ribonuclease A Treatment ". Appl. Microbiol. 3 (1971) PP. 422-427.

Cooney, C.L., Levine, D.W. and Snedecor, B. " Production of Single-Cell Protein from Methanol ". Food Tech., 5 (1975) PP. 33-42.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Davis, P. Single Cell Protein II. New York : Academic Press, 1976.

Delaney, R.A.M., Kennedy, R. and Waley, B.D. " Composition of *Saccharomyces fragilis* Biomass Grown on Lactose Permeate ". J. Sci. Food Agri.12 (1975) PP. 1177-1186.

Dickson, R.C. " Expression of a foreign eukaryotic gene in *Saccharomyces cerevisiae* : β-Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* ". Gene.10 (1980) P. 347.

Dostalek, M. and Molin, N. Single Cell Protein. Cambridge : MIT Press, 1975.

Faust, U., Prave, P. and Sukatshhu, D.A. " Continuous Biomass Production from Methanol by *Methylomonas clara* ". J. Ferment. Technol. 6 (1977) PP. 609-614.

Ghaly. A.E. and Singh. R.K. " Pollution Potential Reduction of Cheese Whey Through Yeast Fermentation ". Appl. Biochem. 3 (1989) PP. 181-203.

Ghose, T.K. " Food of Future ". Process Biochem. 12 (1969) PP. 43-46.

Golzapple, M.T. and Humphrey, A.E. " The Effect of Organosolvent Preteratment on the Enzymatic Hydrolysis of Polar ". Biotechnol. Bioeng. 26 (1984) PP. 670-676.

Goto, S. and others. " Isolation of Methanol-assimilating Bacteria and Optmium Medium Composition". J. Ferment. Technol. 56 (1978) PP. 516-523.

Gow , J.S. and others. Single Cell Protein II. Cambridge : MIT Press, 1975.

Haggstrom, L. " Studies on Methanol Oxidizing Bacteria ". Biotechnol. Bioeng. 11 (1969) PP.1043-1054.

Harwood, J.H. and Pirt, S.J. " Quantitative Aspects of Growth of the Methane-oxidizing Bacterium *Methylococcus capsulatus* on Methane in Shake Flask and Continuous Culture ". J. Appl. Bacterial. 35 (1972) PP. 597-607.

Hedenskog, G. and Ebbinghaus, L. " Reduction of Nucleic Acid Content of Single-cell Protein Concentrates ". Biotechnol. Bioeng. 14 (1972) PP. 447-457.

Holt, J.G. and others. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore : Williams and Wilkins Co., 1994.

Hussein, A.M., Elaside, H. and Yasin, M.H. " Bioçonversion of Hemicellulose of Rice Hull Black Liquor into Single-Cell Protein ". J. Chem. Tech. 53 (1992) PP. 147-152.

Jwanny, E.W., Rashad, M.M. and Moharib, S. " Microbial Biomass Protein and Polysaccharide Production from Vegetable Processing Waste ". J. Basic Microbiol. 29 (1989) PP. 3-8.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kim, J.H. and Ryu, D.Y. " Optimization of Medium and Maximization of Biomass Productivity in Production of Single-Cell Protein from Methanol ". J. Ferment. Technol. 6 (1976) PP. 427-436.

Large, P.J. and Bamforth, C.W. Methylotrophy and Biotechnology. New York : John Wiley and Sons Ltd., 1988.

Litchfield, J.H. " Single-Cell Protein ". Science. 219 (1983) PP. 740-746.

Lowry, O.H. and others. " Protein Measurement with the Foiln Phenol Reagent ". J. Biol. Chem. 193 (1951) PP. 276-304.

Miura, Y. and others. " Production of Single Cell Protein from Methanol by a Bacterium ". J. Ferment. Technol. 2 (1979) PP. 124-129.

Nawawy, A.S. and Gnan, S.O. " Isolation and Propagation of New Methanol-utilizing Microorganism ". Biotechnol. Bioeng. 20 (1983) PP. 863-865.

Nigam, P. " Processing of Sugar-Beet Plup in Simultaneous Saccharification and Fermentation for the Production of a Protein-Enriched Product ". Process Biochem. 2 (1994) PP. 331-336.

Norris, J.R. and Richmond, M.H. Essays in Applied Microbiology. England : John Wiley and Sons Ltd., 1981.

Ogata, K. and others. " Amino Acid Formation by Methanol utilizing Bacteria ". J. Ferment. Technol. 2 (1977) PP. 444-451.

Omar, G. amd Omar, A.A. " Single-Cell Protein from Methanol with *Enterobacter aerogenes* ". Biotechnol. Bioeng. 29 (1987) PP. 355-357.

Rashad, M.M., Moharib, S.A. and Jwanny, E.W. " Yeast Conversion of Mango Waste or Methanol to Single Cell Protein and Other Metabolites ". Biol. Waste. 32 (1990) PP. 277-284.

Rodriguez, H. and Gallarodo,R. " Single-Cell Protein Production from Bagasses Pith by a Mixed Bacterial Culture " . ACTA Biotechnol. 13 (1993) PP. 141-149.

Rodriquez-Vazquez, R., Viaalnueva, G. and Rios-Leal, L. " Sugar Cane Bagasses Pith Dry Pretreatment for Single Cell Protein Production ". Bioresource Technol. 39 (1992) PP. 17-22.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Scrimshaw, N.S. Single-cell protein for human consumption : An overview. Cambridge : MIT Press,1973.

Sinskey, A.J. and Tanneubaum, S.R. Removal of nucleic acids in SCP. Cambridge : MIT Press, 1975.

Sittig, W. International Symposium on Single-Cell Proteins. Paris : Technique et Documentation, 1983.

Snedecon, B. and Cooney, C.L. " Thermophilic Mixed Culture of Bacteria Utilizing Methanol for Growth ". Appl. Microbiol. 6 (1974) PP. 112-117.

Tanneubaum, S.R. " Single-Cell Protein : Food of the Future ". Food Tech. 25 (1971) PP. 962-966.

Vananuvat, P. and Kinsella, J.E. " Production of Yeast Protein from Crude Lactose by *Saccharomyces fragilis* : Batch Culture and Continuous Culture Studies ". J.Food Sci. 2 (1975) PP. 336-341.

Viikari, L. and Lindo, M. " Reduction of Nucleic Acid Content of SCP ". Process Biochem. 6(1971) PP. 41-44.

Vilenchich, R. and Akhatar, W. "Microbiological synthesis of protein" Process Biochem. 4 (1971) PP.41-44.

Ward, O.P. Fermentation Biotechnology : Principles,Process and Products. England : John Wiley and Sons Ltd., 1992.

Wilkinson, T.G. and Harrison, D.E.F. "The Affinity for Actions in Mixed Bacterial Population Growing on Methane in Continuous Culture ". J. Appl. Bacteriol. 36 (1973) PP.309-313.

Windass, J.D. and others. " Improved Conversion of Methanol to Single-cell Protein by *Methylophilus methylotrophus* ". Nature. 287 (1980) PP. 396-401.

Worgan, J.T. and Rolls, G.A. World suppiles of protein from unconventional sources. New York : Academic Press, 1973.

Wulf, C. and Anneliese, C. Biotechnology : a textbook of industrial microbiology. Massachusetts : Sinauer Associates, 1990.

Yiao, H. " Single-Cell Protein from Wastewater of Monosodium Glutamate Manufacture ". Process Biochem. 56 (1988) PP. 176-179.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเหล่านี้เตรียมในปริมาตร 1 ลิตร

1. Ammonium sulfate broth

1. $(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
2. K_2HPO_4	1.0	กรัม
3. $MgSO_4$	0.5	กรัม
4. $FeSO_4$	0.4	กรัม
5. $CaCO_3$	5.0	กรัม

2. Christensen's urea medium

Basal medium ประกอบด้วย

1. Peptone	1.0	กรัม
2. Glucose	1.0	กรัม
3. KH_2PO_4	2.0	กรัม
4. NaCl	5.0	กรัม
5. Agar	20.0	กรัม

ต้มส่วนผสมทั้งหมดจนละลาย ปรับพีเอช ให้เป็น 6.8-6.9 เติม phenol red 0.04% 20 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นประมาณ 52 องศาเซลเซียส เติมสารละลายยูเรียที่มีความเข้มข้น 20 % ซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองแล้วลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วใช้ปิเปตต์ที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดอาหารดังกล่าวใส่หลอดทดสอบแล้วนำไปวางทำ slant

3. Colby and Zatman medium

1. K_2HPO_4	1.20	กรัม
2. KH_2PO_4	0.62	กรัม
3. $CaCl_2.6H_2O$	0.05	กรัม
4. $MgSO_4.7H_2O$	0.20	กรัม
5. NaCl	0.10	กรัม
6. $FeCl_3.6H_2O$	1.00	มิลลิกรัม
7. $(NH_4)_2SO_4$	0.50	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. $CuSO_4.5H_2O$	5.00	ไมโครกรัม
9. $MnSO_4.5H_2O$	10.00	ไมโครกรัม
10. $Na_2MoO_4.2H_2O$	10.00	ไมโครกรัม
11. H_3BO_3	10.00	ไมโครกรัม
12. $ZnSO_4.7H_2O$	70.00	ไมโครกรัม
13. $CoCl_2.6H_2O$	5.00	ไมโครกรัม
14. Purified agar	15.00	กรัม

ปรับ พีเอช เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทำให้เย็นที่ 50 องศาเซลเซียส เติมเมทานอลซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองลงไป 0.1 เปอร์เซ็นต์

4. Fermentation Carbohydrate medium

1. Beef extract	3.0	กรัม
2. Peptone	5.0	กรัม
3. น้ำตาล	10.0	กรัม
4. Bromthymol blue 1.6%	4.0	มิลลิลิตร
5. พีเอช 6.8-7.0		

การเตรียมน้ำตาลแต่ละชนิด ควรเตรียมหลอดทดสอบที่ใส่หลอดดักแก๊สไว้แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จึงเตรียมน้ำตาลใส่หลอดละประมาณ 6 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอเพียง 10 ปอนด์ เป็นเวลา 10 นาที รีบยกออกมาแช่ในน้ำเย็น ทั้งนี้เพื่อป้องกันน้ำตาลแตกตัว เพราะจะเสียคุณสมบัติของน้ำตาลแต่ละชนิดไป

5. Hugh and Leifson's O-F medium

Basal medium ประกอบด้วย

1. Peptone	2.0	กรัม
2. KH_2PO_4	0.3	กรัม
3. NaCl	5.0	กรัม
4. Agar	3.0	กรัม
5. Bromthymol blue 0.2% aq. sol^n	15.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบ basal medium แล้วปรับพีเอชให้ได้ประมาณ 7.1 เติม Bromthymol blue 1.6% จำนวน 4 มิลลิลิตร ลงไปเป็นอินดิเคเตอร์ เติมกลูโคส 10 กรัม ผสมลงในอาหาร สีของอาหารจะเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน บรรจุใส่หลอดทดสอบประมาณ 6-7 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่า-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อที่ความดันไอ 115องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

6. MR-VP medium (Difco)

1. Buffered Peptone	7.0	กรัม
2. Dipotassium Phosphate	5.0	กรัม
3. Bacto-Dextrose	5.0	กรัม
4. พีเอช 6.9 ที่ 25 องศาเซลเซียส		

7. Nitrate broth

1. $NaNO_2$	1.0	กรัม
2. K_2HPO_4	1.0	กรัม
3. $MgSO_4$	0.3	กรัม
4. Na_2CO_3	1.0	กรัม
5. NaCl	0.5	กรัม
6. $FeSO_4$	0.4	กรัม

8. Nutrient agar

1. Beef extract	3.0	กรัม
2. Peptone	5.0	กรัม
3. Agar	15.0	กรัม

9. Nutrient gelatin medium

1. Beef extract	3.0	กรัม
2. Peptone	5.0	กรัม
3. Gelatin	120.0	กรัม

10. Simmon's citrate agar (Difco)

1. $MnSO_4$	0.2	กรัม
2. $(NH_4)H_2PO_4$	1.0	กรัม
3. K_2HPO_4	1.0	กรัม
4. NaCl	5.0	กรัม
5. Sodium citrate	2.0	กรัม
6. Bacto-Bromthymol blue	0.08	กรัม
7. Bacto-Agar	15.0	กรัม
8. พีเอช 6.8 ที่ 25 องศาเซลเซียส		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. Starch agar

1. Beef extract	3.0	กรัม
2. Peptone	5.0	กรัม
3. Potato starch	10.0	กรัม
4. Agar	15.0	กรัม

12. Triple Sugar Iron Agar (Difco)

1. Bacto-Beef extract	3.0	กรัม
2. Bacto-Yeast extract	3.0	กรัม
3. Bacto-Peptone	15.0	กรัม
4. Proteose-Peptone	5.0	กรัม
5. Bacto-Lactose	10.0	กรัม
6. Saccharose	10.0	กรัม
7. Bacto-Dextrose	1.0	กรัม
8. Ferrous sulfate	0.2	กรัม
9. NaCl	5.0	กรัม
10. Sodium trisulfate	0.3	กรัม
11. Bacto-Phenol Red	0.024	กรัม
12. Bacto-Agar	12.0	กรัม
13. พีเอช 7.4 ที่ 25 องศาเซลเซียส		

13. Tryptone broth

1. Tryptone	10.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน

1.1 สารละลาย A ประกอบด้วย

1. 1N NaOH	1	ลิตร
2. Na_2CO_3	20	กรัม

1.2 สารละลาย B ประกอบด้วย

1. $CuSO_4.5H_2O$	0.5	กรัม
2. $NaKC_4H_4O_6.4H_2O$	1.0 % (นน./มล.)	

1.3 สารละลาย C ประกอบด้วย

1. สารละลาย A	50	ส่วน
2. สารละลาย B	1	ส่วน

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์แมงกานีส

1. Phosphoric acid 50% เจือจาง 10 เท่า
2. Potassium permanganate 5%
3. Sulfuric acid concentrate
4. Sodium bisulfite reagent saturated solution
5. Chromotropic acid 2%

3. 3% Hydrogen peroxide solution

1. H_2O_2	3.0	กรัม
2. H_2O	100	มิลลิลิตร

4. Kovac's solution

1. p-dimethyl-aminobenzaldehyde	5.0	กรัม
2. Amyl alcohol หรือ butyl alcohol	75	มิลลิลิตร
3. HCl concentrate	25	มิลลิลิตร

ผสม p-dimethyl-aminobenzaldehyde กับ alcohol ใน water bath อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส 5 นาที ขณะปล่อยให้เย็นริน HCl ลงไป เขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาใส่ไว้ในตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Lugol's iodine

1. Iodine	5.0	กรัม
2. KI	10.0	กรัม
3. น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย KI ในน้ำจนหมด แล้วค่อย ๆ เติมผลึกไอโอดีนลงไปจนละลายหมด เติมน้ำให้สารละลายนี้เจือจาง 5 เท่า

6. Methyl red solution

1. methyl red	0.8	กรัม
2. Ethanol 95%	300	มิลลิลิตร
3. น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

ละลายสี methyl red ใน Ethanol 95% แล้วจึงเติมน้ำกลั่น

7. Voges-Proskauer test solution

7.1 solution A

1. alpha napthol	10	กรัม
2. Ethanol 95%	100	มิลลิลิตร

ละลาย alpha napthol ใน Ethanol 95% เก็บใส่ขวดสีชา

7.2 Solution B

1. KOH	20	กรัม
2. น้ำ	100	มิลลิลิตร

ละลาย KOH ในน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา

8. Bromthymol blue solution 1.6 %

1. Bromthymol blue	1.6	กรัม
2. Ethyl alcohol	100	มิลลิลิตร

9. Nessler's reagent

1. KI	7.0	กรัม
2. HgI	10.0	กรัม
3. KOH	10.0	กรัม
4. น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลาย KI และ HgI ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ละลาย KOH ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็น จากนั้นผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกันเติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร ทิ้งให้ตกตะกอนแล้วนำส่วนใสมาใช้เป็นน้ำยาทดสอบ

10. Trommsdorf's reagent

1. $ZnCl_2$	20.0	กรัม
2. ZnI_2 หรือ KI	2.0	กรัม
3. Starch	4.0	กรัม

ละลาย $ZnCl_2$ ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดแล้วค่อย ๆ เติมแป้งลงไปช้า ๆ พร้อมทั้งคนตลอดเวลา ต้มต่อไปจนแป้งละลายมากที่สุดหรือจนสารละลายเกือบใส เติม ZnI_2 หรือ KI ลงไป และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำมากรองเอาส่วนใสเป็นน้ำยาทดสอบ

11. Diphenylamine solution

1. Diphenylamine	0.7	กรัม
2. H_2SO_4 concentrate	60	มิลลิลิตร
3. HCl concentrate	11.3	มิลลิลิตร
4. น้ำกลั่น	28.8	มิลลิลิตร

ละลาย Diphenylamine ลงไปใน H_2SO_4 concentrate และน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้เย็น ค่อย ๆ เติม HCl concentrate ลงไปอย่างช้า ๆ ทิ้งไว้ค้างคืนเพื่อให้ตะกอนนอนก้น

12. Oxidase test solution

12.1 Solution A

1. Alpha napthol	1.0	กรัม
2. Ethyl alcohol 95%	100	มิลลิลิตร

12.2 Solution B

1. p-aminodimethylaniline HCl	1.0	กรัม
2. น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.
วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้วิธีของ Lowry

1. ใช้สารตัวอย่างปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรใส่ลงในสารละลาย 1N NaOH 0.5 มิลลิลิตร เพื่อละลายโปรตีนในเซลล์ และบ่มในน้ำเดือดนาน 10 นาที

2. เติมสารละลาย C ลงไป 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3. เติม Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1 ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ Bovine Serum Albumin (BSA)

2. การวิเคราะห์เมทานอลโดย Colorimetric method

1. นำสารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ผสมกับ phosphoric acid 3 หยด และ potassium permanganate 5 หยด เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

2. หยด sodium bisulfite ลงไป 3 หยด เขย่าให้เข้ากัน

3. ทำสารตัวอย่างให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติม sulfuric acid ที่ทำให้เย็นแล้ว 4 มิลลิลิตร และ chromotropic acid 4 หยด

4. บ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. ทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง

6. เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

7. ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตร โดยเทียบกับเมทานอลที่ทราบความเข้มข้น

3. วิธีการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

3.1 การทดสอบแคตาเลส

1. หยด H_2O_2 ที่มีความเข้มข้น 3 หรือ 30% 1 หยด ลงบนสไลด์
2. ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อลงไปทำการผสมให้เข้ากัน

ผลบวก เกิดฟองแก๊ส

ผลลบ ไม่มีฟอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การทดสอบออกซิเดส

1. ปลูกเชื้อลงบน NA Slant บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2. หยดสารละลาย A และ B อย่างละ 2-3 หยด ลงไปเขย่าและเอียงไปมาภายในหลอดตามแนวที่ปลูกเชื้อ

ผลบวก เกิดสีน้ำเงินภายใน 2 นาที

ผลลบ ไม่เปลี่ยนแปลง

3.3 การทดสอบ MR

1. ปลูกเชื้อลงในอาหาร MR-VP บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน
2. หยด methyl red 5-6 หยด ลงไปต่ออาหารที่มีเชื้อ 5 มิลลิลิตร

ผลบวก สีแดงสด

ผลลบ เหลืองหรือส้ม

3.4 การทดสอบ VP

1. ปลูกเชื้อลงใน MR-VP บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2. ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่สะอาด
3. เติม 0.6 มิลลิลิตร ของ 5% α-napthol solution
4. เติม 0.2 มิลลิลิตรของ 40% KOH เขย่าให้เข้ากัน

ผลบวก สีแดง

ผลลบ สีเหลือง

3.5 การทดสอบอินโดล

1. ปลูกเชื้อลงในอาหาร tryptone broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เติม Kovacs' reagent 0.5 มิลลิลิตร ลงไป

ผลบวก สีแดงที่ผิวชั้นบน

ผลลบ ไม่เกิดสี

3.6 การทดสอบการใช้ซิเตรต

1. ปลูกเชื้อลงบนผิวอาหาร Simmons' Citrate agar โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อทำให้เป็นจุด (point inoculation)

2. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-28 ชั่วโมง (สูงสุด 7วัน)

ผลบวก มีการเจริญอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นน้ำเงิน

ผลลบ ไม่มีการเจริญ สีของอาหารไม่เปลี่ยน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การทดสอบการย่อยเจลาติน

1. ปลูกเชื้อใน nutrient gelatin medium ในลักษณะแทงลงไปในอาหาร (Stab) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2. ตรวจผลโดยนำหลอดอาหารที่มีเชื้อมาแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 30 นาที

ผลบวก อาหารเหลว แสดงว่าเกิดการย่อยสลายเจลาติน

ผลลบ อาหารแข็ง แสดงว่าไม่เกิดการย่อยสลายเจลาติน

3.8 การทดสอบการย่อยแป้ง

1. ปลูกเชื้อลงในอาหาร starch agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เทสารละลายไอโอดีนหรือ Lugol's iodine บนผิวหน้าอาหาร

ผลบวก อาหารเป็นสีน้ำเงิน แต่บริเวณรอบโคโลนีไม่มีสี

ผลลบ อาหารเป็นสีน้ำเงินหมด

3.9 การทดสอบการเกิดไนเตรต

1. ปลูกเชื้อลงในอาหาร nitrate broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. หยดน้ำยา diphenylamine 1หยดลงในจานหลุม ใช้แท่งแก้วจุ่มอาหารจากหลอดที่มีเชื้อลงในน้ำยาทดสอบ 1 หยด

ผลบวก เกิดสีน้ำเงิน

ผลลบ ไม่เปลี่ยนแปลง

3.10 การทดสอบการเกิดแอมโมเนียม

1. ปลูกเชื้อลงในอาหาร ammonium broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. หยด H_2SO_4 ที่เจือจางแล้ว 1:3 ผสมกับน้ำยา Trommsdorf's reagent 1-2 หยด ใช้แท่งแก้วจุ่มอาหารที่มีเชื้อลงในน้ำยาทดสอบ

ผลบวก เกิดสีน้ำเงินแกมม่วงทันที

ผลลบ ไม่เปลี่ยนแปลง

3.11 การทดสอบการเกิด Denitrification

1. ปลูกเชื้อในอาหาร nitrate broth ที่มีหลอดดักแก๊สอยู่ 1 หลอด

2. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ผลบวก เกิดแก๊สในหลอกดักแก๊ส

ผลลบ ไม่เกิดแก๊ส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.12 การทดสอบการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์

1. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) แตะเชื้อลงใน triple sugar iron agar slant โดยขีดไปมา (streak) ที่พื้นผิวเอียงแล้วแทงลง (stab) ไปที่ส่วนก้นหลอด เรียกว่าทำ butt

2. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ผลบวก เกิดแก๊สสีดำที่ก้นหลอด

ผลลบ ไม่เกิดแก๊ส

3.13 การทดสอบยูเรียเอส

1. ปลูกเชื้อลงให้เป็นจุดในอาหาร Christensen's urea

2. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลทุกวัน

ผลบวก อาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีบานเย็น

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี

3.14 การทดสอบการเกิดการออกซิไดส์และการหมัก

1. ปลูกเชื้อลงในอาหาร Hugh and Leifson's O-F medium ชนิดละ 2 หลอด โดยการแทงตรงลงไป

2. หลอดหนึ่งทำให้อยู่ในสภาพขาดอากาศโดยเทพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปิดผิวหน้าประมาณ 2 เซนติเมตร

3. บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

oxidation อาหารเปลี่ยนจากเขียวเป็นเหลืองเฉพาะหลอดที่ไม่ได้เทพาราฟิน

fermentation เกิดการเปลี่ยนสีทั้ง 2 หลอด

3.15 การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต

1. ปลูกเชื้อที่ต้องการทดสอบลงไปใน fermentation carbohydrate medium

2. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3. ตรวจผลโดยดูการเปลี่ยนสีของอาหารและดูการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส

ผลบวก

1. อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แต่ไม่มีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าเชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วได้เฉพาะกรด

2. อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและมีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าเชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วได้กรดและแก๊ส

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี

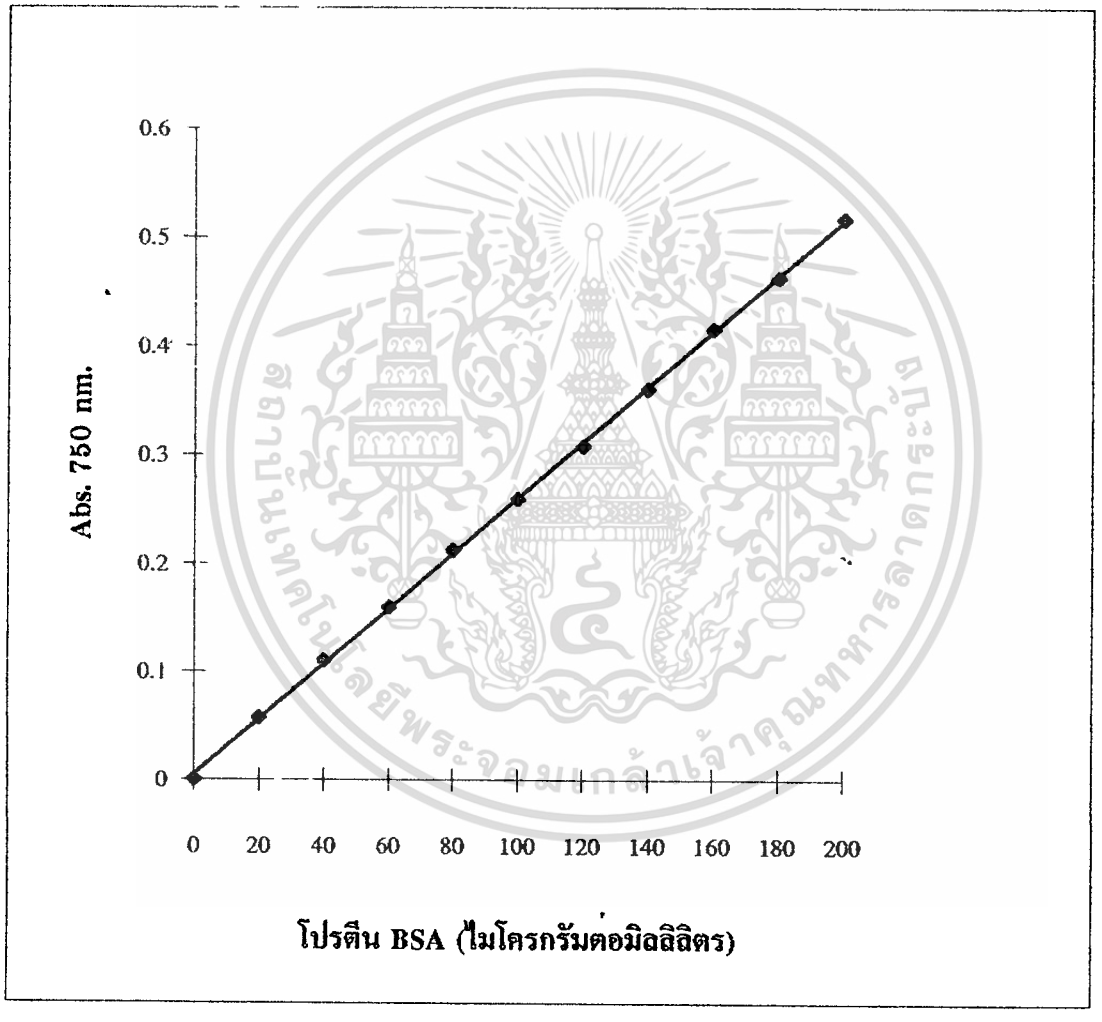
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

กราฟมาตราฐาน

1. กราฟมาตราฐานของโปรตีน

ภาพที่ 11

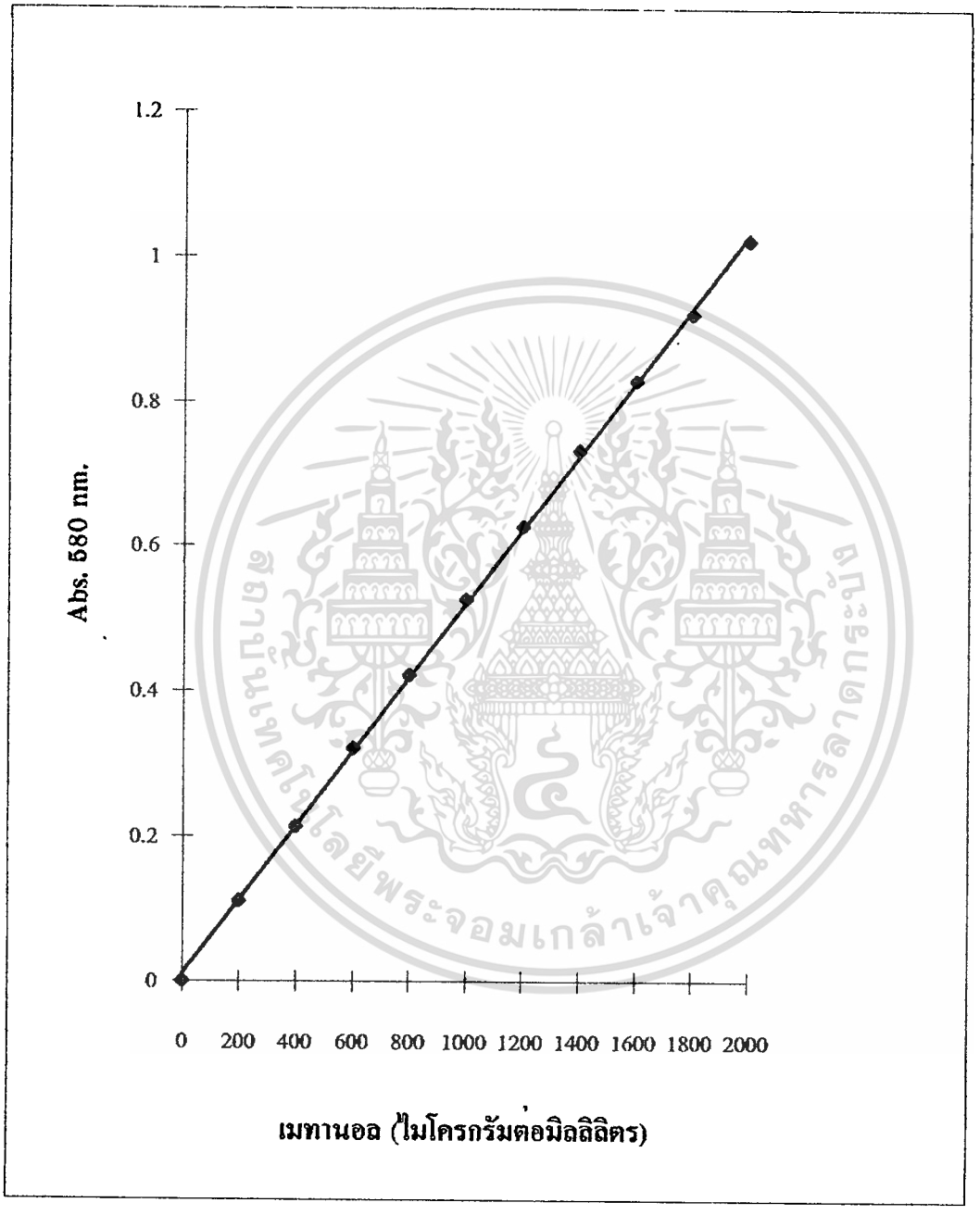


กราฟมาตราฐานของโปรตีน Bovine Serum Albumin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กราฟมาตราฐานของเมทานอล

ภาพที่ 12

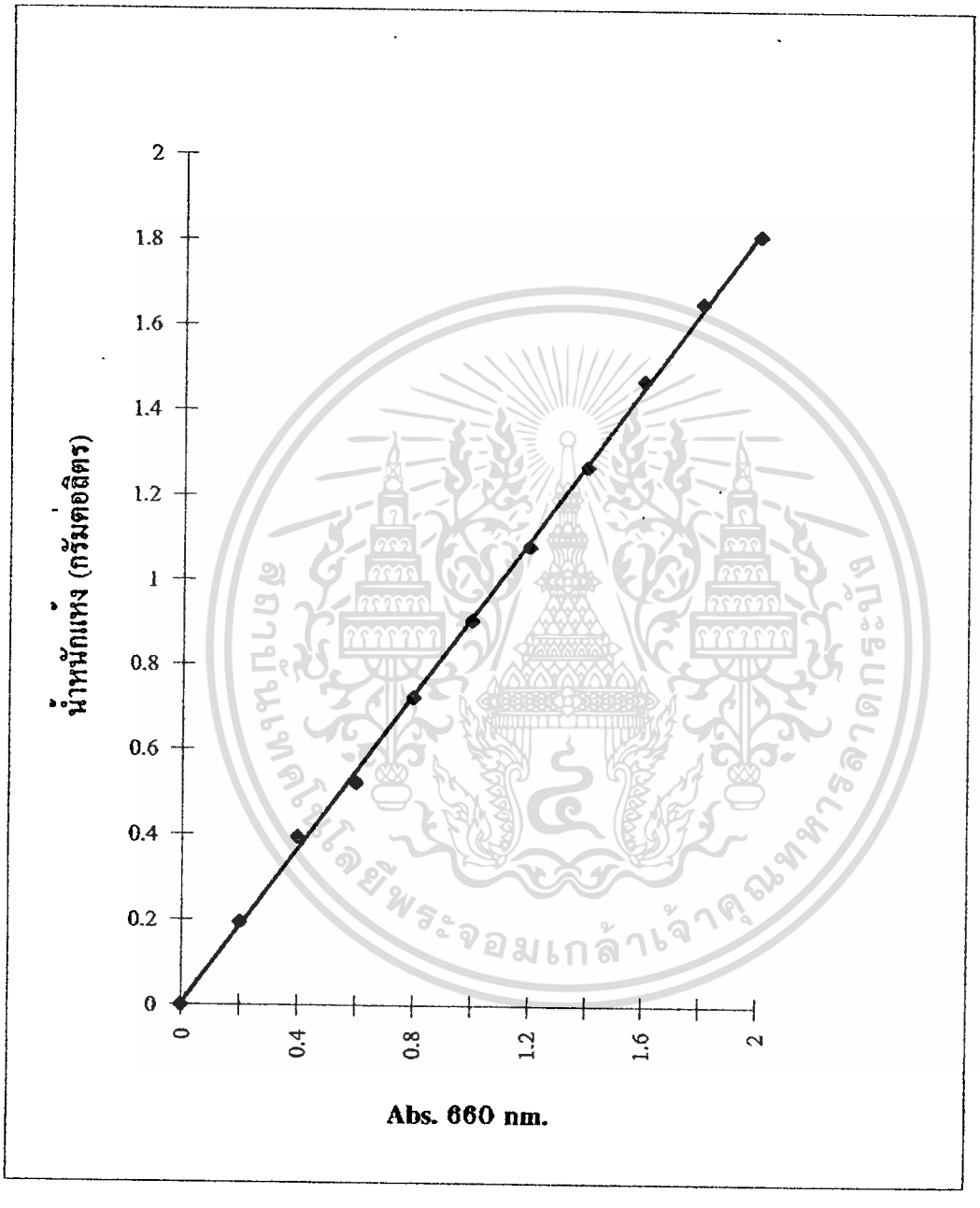


กราฟมาตราฐานของเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. กราฟมาตราฐานระหว่าง Absorbance กับน้ำหนักเซลล์

ภาพที่ 13



กราฟมาตราฐานระหว่าง Absorbance กับน้ำหนักเซลล์ของเชื้อ *Pseudomonas* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวมยุรา ศรีกัลยานุกูล เกิดวันที่ 31 ธันวาคม 2513 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชนบท คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปีการศึกษา 2535

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้