สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเวย์ โดยใช้ *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5057

T 0 4 3 9 7 1

นางสาวพรศรี ก้องเกียรติศักดิ์
นายวุฒิเมธ ธาตุทองเหลือง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 43971
วัน, เดือน, ปี 18 ต.ค. 2545

.b.....
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
11/4/2022

Single cell protein from cheese whey by *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5057

Miss.Pornsri Kongkiattisak

Mr. Wuttimet Tadthongleung

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the

Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเวย์ โดยใช้ *Kluyvermyces marxianus* TISTR 5057
โดย	นางสาวพรศรี ก้องเกียรติศักดิ์
	นายวุฒิเมธ ธาตุทองเหลือง
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล

ภาคชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ.ระนอง) หัวหน้าภาควิชา

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ.ระนอง) ประธานกรรมการ

.....

(ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล) กรรมการ

.....

(ผศ.วันชัย สุทธินุ่น) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเวย์ เชื้อใช้ *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5057
นักศึกษา	นางสาวพรศรี ก้องเกียรติศักดิ์
	นายวุฒิเมธ ธาตุทองเหลือง
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2544

บทคัดย่อ

Kluyveromyces marxianus TISTR 5057 นำมาใช้เป็นเชื้อต้นในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว โดยมีเวย์ที่ได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็งเป็นวัตถุดิบในการผลิต พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ(μ)มีค่า 0.08 ต่อชั่วโมง ที่ 20 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ชนิดนี้โดยใช้เวย์ที่ไม่ผ่านการเจือจางด้วยน้ำ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 โดยปริมาตรเวย์ พีเอชเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ 4.0 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 30 องศาเซลเซียส และความเร็วของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ชนิดนี้ โดยจะให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 9.7 กรัมต่อลิตร และสามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 76 เซลล์ยีสต์ที่ได้มีปริมาณโปรตีน ร้อยละ 31.18 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และ ไขมัน ร้อยละ 19.02 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Single Cell Protein from Cheese whey by *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5057
Name	Miss.Pornsri Kongkiattisak
	Mr. Wuttimet Tadthongleung
Special Project Advisor	Assist. Prof. Duangjai Ochaikul
Department	Applied Biology
Academic Year	2001

ABSTRACT

Kluyveromyces marxianus TISTR 5057 was used as starter culture for single cell protein production with whey from cheese processing as a raw material. Specific growth rate of the yeast was 0.08 per hour at 20 hour cultivation when undiluted whey was used as medium. The optimum conditions for cell production by *K. marxianus* were studies. It was found that the maximum cell mass was 9.7 g/l when 15% (v/v) of the starter culture was inoculated in the medium with an intial pH of 4.0 in shake flask culture at 30 ^{0}C with shaking of 200 rpm. The yeast reduced 76% of the COD. It was found that 31.18% (w/w) of protein and 19.02% (w/w) of fat were abtained from *K.marxianus* TISTR 5057

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ทางคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานภาษาที่ใช้ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ.ระนอง ประธานกรรมการ และผศ.วันชัย สุทธินุ่น กรรมการพิจารณาโครงงาน ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำในโครงงานพิเศษนี้อย่างดียิ่งเสมอมา ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้สำหรับการทดลอง สุดท้ายนี้ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจจัดทำโครงงานพิเศษนี้

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	1
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	
2.1 ผลิตภัณฑ์เนยแข็ง	3
2.2 กระบวนการผลิตเนยแข็ง	11
2.3 โปรตีนเซลล์เดียว	15
2.4 คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว	16
2.5 ประเภทจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว	17
2.6 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว	23
2.7 คุณค่าทางอาหารของเซลล์ยีสต์	24
2.8 ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว	26
2.9 การยอบรับของผู้บริโภค และความเป็นพิษของโปรตีนเซลล์เดียว	27
2.10 การลดปริมาณกรดนิวคลีอิค	30
2.11 แนวโน้มการใช้โปรตีนเซลล์เดียวในอนาคต	32
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	
3.1 วัสดุอุปกรณ์	33
3.2 วิธีการทดลอง	34
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	
4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณลักษณะทางกายภาพของเวย์ที่ได้จากการผลิตเนยแข็ง	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 การศึกษาอัตราการเจริญสูงสุดของเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5057 ในเวย์ 37

4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเวย์ โดย *K. marxianus* TISTR 5057

4.3.1 อัตราการเจือจางเวย์ 39

4.3.2 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 41

4.3.3 พีเอชเริ่มต้น 42

4.3.4 อุณหภูมิ 44

4.3.5 ความเร็วรอบ 45

4.4 องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์ที่ผลิตได้ 46

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ 47

เอกสารอ้างอิง 50

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 53

ภาคผนวก ข. วิธีการวิเคราะห์คุณลักษณะน้ำเสีย 54

ภาคผนวก ค. วิธีการหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์ 68

ภาคผนวก ง. วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ 69

ภาคผนวก จ. กราฟมาตรฐานของ Lowry method และ ตารางของ Shaffer และ Hartmann 72

ภาคผนวก ฉ. ตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ 75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทำเนยแข็งชนิดต่างๆ 4

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดอะมิโนของยีสต์ ปลาป่น และถั่วเหลือง 21

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ยีสต์ที่ใช้เป็นอาหาร 25

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบกรดอะมิโนจากเซลล์ยีสต์ชนิดต่างๆและ FAO reference protein 25

ตารางที่ 5 แสดงองค์ประกอบของวิตามินในเซลล์ชนิดต่างๆ 26

ตารางที่ 6 ลักษณะของเวย์ที่ได้จากการผลิตเนยแข็ง ของโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา 36

ตารางที่ 7 ผลของการเลี้ยงเชื้อ *K. marxianus* TISTR 5057 ในเวย์ 37

ตารางที่ 8 อัตราการเจือจางเวย์ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *K. marxianus* TISTR 5057 40

ตารางที่ 9 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ เชื้อ *K. marxianus* TISTR 5057 ที่เหมาะสมต่อการผลิต โปรตีนเซลล์เดียว 41

ตารางที่10 พีเอชที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *K. marxianus* TISTR 5057 43

ตารางที่11 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *K. marxianus* TISTR 5057 44

ตารางที่12 ความเร็วรอบที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจาก *K. marxianus* TISTR 5057 45

ตารางที่ 13 องค์ประกอบทางเคมีของเชื้อ *K. marxianus* TISTR 5057 ที่เลี้ยงในเวย์ ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ร้อยละ 15 ปรับพีเอชเริ่มต้น เป็น 4.0 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็วรอบในการ เลี้ยงเชื้อ 200 รอบต่อนาที 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 รูปกระบวนการผลิตเนยแข็งเกาด้า 11

รูปที่ 2 รูปกระบวนการผลิตเนยแข็งเช็ดดา 13

รูปที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660นาโนเมตรของ *K. marxianus* TISTR 5057 ที่เลี้ยงในเวย์ 38

รูปที่ 4 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *K. marxianus* TISTR 5057 ที่เลี้ยงในเวย์ 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

เวย์(whey) เป็นของที่เหลือทิ้งที่ได้จากการผลิตเนยแข็ง เนย และเคซีน มีส่วนประกอบที่แตกต่างกันขึ้นกับแหล่งที่มา เมื่อปล่อยออกไปสู่สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจะก่อให้เกิดมลภาวะ การนำเวย์มาแปรรูปเป็นโปรตีนโดยกระบวนการหมักเป็นเทคนิคที่เป็นประโยชน์ เวย์มีองค์ประกอบที่สำคัญคือ น้ำตาลแลคโตส ร้อยละ 5 โปรตีน ร้อยละ 0.7 เถ้า ร้อยละ 0.5 และน้ำ ร้อยละ 94 (Daniels,1985) น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะยีสต์ที่ใช้น้ำตาลแลคโตสได้ Bernstein และคณะ(1997) ทดลองผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* ในเวย์โดยอาศัยถังหมักที่มีน้ำหล่อเย็น เมื่อผ่านเครื่องระเหยและเครื่องทำแห้ง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีลักษณะเป็นผงแห้ง ภายในเซลล์ของยีสต์ประมาณครึ่งหนึ่งของน้ำหนักแห้งจะเป็นโปรตีนดิบ ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนร้อยละ 80 กรดนิวคลีอิคร้อยละ 12 และแอมโมเนียร้อยละ 8 คุณค่าทางโภชนาการของยีสต์แห้งขึ้นกับคุณภาพของโปรตีนและวิตามินที่มีอยู่ในเซลล์ยีสต์ (Rose และ Harrison,1970)

การหมักเวย์โดยใช้จุลินทรีย์ต่างๆมีการศึกษากันมากมาย เช่น การใช้ *Saccharomyces fragilis* (Amundson , 1967 ; Bechtle and Clayton , 1971 ; Knight et al., 1972 ; Wasserman , 1960 , 1961 , 1962) ยีสต์จะใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งพลังงานและให้ปริมาณโปรตีนเป็นที่น่าพอใช้ รวมทั้งสามารถลดค่า BOD ได้สูง

ในการศึกษานี้เป็นการนำยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5057 มาเลี้ยงในเวย์ที่ได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็ง และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเวย์ที่ได้จากการผลิตเนยแข็ง เช่น ปริมาณน้ำตาลแลคโตส ของแข็งทั้งหมด ของแข็งแขวนลอย ความเป็นกรด-ด่าง โปรตีน ไนโตรเจน
2. ศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5057 เช่น อัตราการเจือจางเวย์ ความเป็นกรด-ด่างของอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ความเร็วของเครื่องเขย่าในการเลี้ยงเชื้อ

3. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนเซลล์เดียว ซึ่งเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษามา

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเวย์ที่ได้จากการผลิตเนยแข็ง และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5057 ในเวย์ รวมทั้งศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนเซลล์เดียว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นแนวทางในการเพิ่มแหล่งอาหารโปรตีนที่มีประสิทธิภาพ และสอดคล้องกับความต้องการในปัจจุบัน

2. สามารถนำเวย์ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งที่ได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็ง นำกลับมาใช้ใหม่และเพื่อก่อให้เกิดการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ และมีมูลค่าสูงขึ้น ขณะเดียวกันก็สามารถลดมลภาวะสิ่งแวดล้อมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
บทตรวจเอกสาร

2.1 ผลิตภัณฑ์เนยแข็ง

การทำเนยแข็งเป็นกระบวนการหมักที่เก่าแก่ที่สุดวิธีหนึ่ง การทำเนยแข็งเป็นวิธีถนอมอาหารที่มีคุณค่าและมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจโลก มีเนยแข็งมากกว่า 700 ชนิดที่มีการผลิตทั่วโลกโดยวิธีต่างๆกัน ซึ่งนมที่ใช้ทำเนยแข็งควรเป็นนมที่ปราศจากสารปฏิชีวนะ หรือสารเคมีอื่นๆ และไม่มีกลิ่นรสที่เสียอีกด้วย นมที่ใช้อาจอยู่ในรูปของนมดิบ นมที่ผ่านการให้ความร้อนหรือนมพาสเจอไรซ์ เนยแข็งที่มีการผลิตมีอยู่หลายชนิดขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำที่เหลืออยู่ในเนยแข็ง เช่น เนยแข็งชนิดนิ่มจะมีปริมาณของน้ำ 50 – 80 เปอร์เซ็นต์ เนยแข็งชนิดกึ่งนิ่มจะมีปริมาณของน้ำ 45 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเนยแข็งชนิดแข็งจะมีปริมาณของน้ำน้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เนยแข็งยังแบ่งเป็น เนยแข็งชนิดไม่บ่ม ซึ่งผ่านกระบวนการหมักขั้นตอนเดียว และเนยแข็งชนิดบ่มที่อาศัยกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ในระหว่างการบ่มด้วย เพื่อให้ได้กลิ่นรสและเนื้อสัมผัสที่ต้องการ เนยแข็งชนิดนิ่มนิยมบริโภคสดๆ เช่น คอทเทจ และเบเกอร์ซีส หรือนำมาผ่านกระบวนการบ่มเป็นระยะเวลาสั้นๆ เช่น คาร์เมมเบิร์ด บรี และเบล พีส ชีส ถึงแม้ว่าคุณสมบัติของเนยแข็งแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน แต่กระบวนการผลิตทั่วๆไปจะเหมือนกัน ขั้นตอนการผลิตเนยแข็งดังนี้

1.1 **การให้ความร้อนกันนม** นมหลายชนิดสามารถนำมาใช้ในการทำเนยแข็งได้ เช่น นมวัว นมควาย นมแกะ นมกวาง และนมจามจุรี นมที่นำมาใช้อาจใช้ในรูปของนมดิบที่มีคุณภาพดี แต่ในปัจจุบันนมที่ใช้ในการผลิตเนยแข็งในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จะต้องผ่านกรรมวิธีการให้ความร้อนโดยวิธีใดวิธีหนึ่งเสียก่อน เช่นการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าการพาสเจอไรซ์นม หรือการพาสเจอไรซ์น้ำนมโดยวิธี HTST (high temperature short time)

นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่นๆ ที่ใช้ทำลายจุลินทรีย์ในน้ำนมนอกเหนือจากการใช้ความร้อน เช่น การใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในการทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ โดยการใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปในน้ำนมที่มีอุณหภูมิ 49 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาหนึ่งเพื่อทำลายเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นก็นำน้ำนมมาเติมแคทาเลส เพื่อจำกัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่อาจหลงเหลืออยู่ในน้ำนมให้หมดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นมที่ใช้ทำเนยแข็งจะมีปริมาณไขมันแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของเนยแข็ง เช่นในการผลิตครีมชีส จะใช้ครีมซึ่งมีปริมาณไขมันสูงกว่าน้ำนมทั่วๆไปในขณะที่การทำเนยแข็งคอจเทจจะใช้นมขาดมันเนยในการผลิต สำหรับสีของเนยแข็งอาจนำมาทำให้ขาวโดยใช้เบนซอยล์เปอร์ออกไซด์ หรือทำให้เข้มขึ้นโดยการใช้สีสังเคราะห์หรือสีที่สกัดจากธรรมชาติ

1.2. **การบ่มเนยแข็ง** เป็นการใส่เชื้อแบคทีเรียลงไปในน้ำนมที่เตรียมไว้แล้ว เชื้อแบคทีเรียที่ใช้อาจอยู่ในรูปแช่แข็ง หรือ lyophilizes หรืออยู่ในรูปของเหลวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในหางนม หรืออาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเป็นเชื้อเริ่มต้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของเนยแข็งที่ต้องการผลิต ตัวอย่างเช่น การทำเนยแข็งเชดดาร์ จะใช้ *Streptococcus cremoris* และหรือ *Streptococcus lactis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียพวกแลคติกที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง เป็นต้น

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทำเนยแข็งชนิดต่างๆ (Altas,1989)

เนยแข็ง	จุลินทรีย์ที่ใช้
คอทเทจ (Cottage)	*Streptococcus lactis , Lueconostoc citrivorum, Streptococcus cremoris*
ครีม (Cream)	*Streptococcus diacetilactis เนยแข็งชนิดนิ่ม บ่มเป็นเวลา 1 – 5 เดือน*
บรี (Bree)	*Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris , Penicillium camemberti , Penicillium candidum , Brevibacterium linens*
คาเมมเบิร์ด (Carmembert)	*Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris , Penicillium camemberti , Penicillium candidum*
ลิมเบอร์เกอร์ (Limburger)	*Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris , Brevibacterium linens*
บลู (Blue)	*Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris , Penicillium roqueforti , Penicillium gluacum*
บริก (Brick)	*Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris , Brevibacterium linens*
กอร์กอนโซลา (Gorgonzola)	*Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris , Penicillium roqueforti , Penicillium gluacum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนยแข็ง	จุลินทรีย์ที่ใช้
มอนเทอเรย์ (Monterey)	*Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris*
มูนสเตอร์ (Muenster)	*Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris , Brevibacterium linens*
โรคีฟอร์ต (Roquefort)	*Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris , Penicillium roqueforti , Penicillium gluacum*
เชดดาร์ (Cheddar)	*Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris , Streptococcus durans , Lactobacillus casei*
คอลบี (Colby)	*Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris , Streptococcus durans , Lactobacillus casei*
อีดัม (Edam)	*Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris*
กูดา (Gouda)	*Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris*
กลูแยร์ (Gruyere)	*Streptococcus lactis , Streptococcus thermophilus , Lactobacillus helviticus , Propionibacterium shermanii ,*
สวิส (Swiss)	*Lactobacillus bulgaricus , Propionibacterium freudenreichii*
พาร์มีซาน (Parmesan)	*Streptococcus lactis , Streptococcus thermophilus , Lactobacillus helviticus , Propionibacterium shermanii , Lactobacillus bulgaricus , Propionibacterium freudenreichii*
โรมาโน (Romano)	*Streptococcus lactis , Streptococcus thermophilus , Streptococcus cremoris , Lactobacillus bulgaricus*
	Streptococcus thermophilus , Lactobacillus bulgaricus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 **การตกตะกอนน้ำนม** ในการทำเนยแข็งจะต้องกำจัดน้ำออกจากนมโดยการเปลี่ยนรูปน้ำนมให้อยู่ในสถานะของแข็งหรือกึ่งแข็งโดยการใช้สารตกตะกอนหรือกรดหรือทั้งสองอย่างรวมกัน อัตราการตกตะกอนของน้ำนมขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ พีเอช องค์ประกอบของน้ำนม ปริมาณแคลเซียมที่มีอยู่ในน้ำนม การให้ความร้อนกับน้ำนม และปริมาณของสารตกตะกอนที่ใช้ เป็นต้น

สารที่ใช้ในการตกตะกอนเพื่อให้น้ำนมจับเป็นก้อนในการทำเนยแข็งที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือเรนเนต ที่สกัดได้จากกระเพาะวัว ซึ่งเรนเนตนี้จะประกอบด้วยเอนไซม์ที่ทำให้นมตกตะกอนคือเอนไซม์ไซโมซินและเพปซิน หน้าที่ของเรนเนตคือการเปลี่ยนน้ำนมให้กลายสภาพเป็นเจลหรือก้อนนม(curd) ซึ่งประกอบด้วยแคลเซียม เคซีเนต ไขมัน วิตามินที่ละลายในไขมันและน้ำบางส่วน น้ำหรือของเหลวที่เหลือส่วนบนเรียกว่า เวย์(whey) มีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบ วิตามินที่ละลายน้ำ เกลือแร่ และแลคตัลบูมิน การใช้เรนเนตจะทำให้น้ำนมจับตัวกันเป็นก้อนภายในเวลา 15 ถึง 30 นาที เท่านั้น ในขณะที่การจับตัวเป็นก้อนของนมโดยที่ไม่ใช้เรนเนตจะกินเวลานานถึง 16 ชั่วโมง อัตราการใช้เรนเนตจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดเนยแข็งที่ต้องการผลิต

ในปัจจุบันนี้เรนเนตที่ได้จากกระเพาะวัวไม่สามารถหาได้ง่ายจึงมีราคาแพง ดังนั้นจึงการใช้เอนไซม์อื่นๆผสมกับเรนเนต เอนไซม์นี้ได้มาจากเชื้อรา *Mucor miche* , *M. pusillus* , *Endothia parasiticus* ซึ่งในปัจจุบันมีการผลิตเอนไซม์เรนเนตจากเชื้อราเพื่อเป็นการค้าและมีการใช้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสหรัฐอเมริกา มีการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ในการผลิตเนยแข็งถึง 60 เปอร์เซ็นต์

1.4 **การตัด** ก้อนนมที่ได้จะถูกนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆด้วยมีดตัดเนยแข็ง ขนาดของก้อนนมที่ตัดได้มีความสำคัญ โดยจะเพิ่มพื้นผิวของก้อนนมให้มากขึ้น มีผลทำให้หางนมถูกไล่ออกไปมากขึ้นและทำให้ก้อนนมหดตัวแข็งขึ้น ถ้าขนาดของก้อนนมที่ตัดมีขนาดเล็กจะช่วยเพิ่มพื้นผิวได้มากและเป็นการไล่ความชื้นและหางนมออกไปมากยิ่งขึ้น ซึ่งก้อนนมขนาดเล็กเช่น 1 – 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะทำให้ได้เนยแข็งที่มีความชื้นต่ำในขณะที่ก้อนนมขนาดใหญ่เช่น 4 – 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะทำให้ได้เนยแข็งที่มีความชื้นสูง

1.5 **การต้ม** วัตถุประสงค์หลักของการต้มก้อนนมก็เพื่อลดปริมาณความชื้นในก้อนนมให้ลดลงไปอีก และช่วยให้ก้อนนมแข็งตัวมากขึ้น การต้มก้อนนมจะต้องเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอย่างช้าๆ เช่น 0.2 – 0.5 องศาเซลเซียสทุกๆ 5 นาที แล้วจึงเพิ่มขึ้นค่อนข้างรวดเร็ว 1.5 – 2.0 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิที่ต้องการ ซึ่งในการผลิตเนยแข็งแต่ละชนิดจะใช้อุณหภูมิต่างกัน เช่น เนยแข็งเชดดาร์จะใช้อุณหภูมิ 37 – 39 องศาเซลเซียส และเนยแข็งคอทเทจจะใช้อุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส สาเหตุที่ต้องค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆก็เพื่อป้องกันการแข็งตัวที่ผิวหน้าของก้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นม เป็นเหตุให้ไม่สามารถไล่หางนมออกมาได้ ในระหว่างการต้มนมนี้จะต้องมีการคนก้อนนมไปด้วย เพื่อช่วยให้ก้อนนมแข็งขึ้นและไล่หางนมออกมามากขึ้น เป็นการควบคุมการสร้างกรดของจุลินทรีย์ ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย ช่วยให้ลักษณะเนื้อก้อนนมดี และช่วยควบคุมปริมาณความชื้นในผลิตภัณฑ์เนยแข็งให้มีปริมาณตามต้องการ

1.6 **การกำจัดหางนม** หลังจากการต้มก้อนนมแล้วจะต้องกำจัดหางนมออกโดยใช้วิธีระบายหางนมออกจากถังที่มีก้อนนมและหางนมอยู่ปนกัน ในการระบายหางนมออกจะต้องระวังไม่ให้มีการสูญเสียก้อนนมไปด้วย หรืออาจใช้วิธีตักเอาก้อนนมออกจากหางนม ก้อนนมที่แยกได้อาจนำมาใส่ในแบบพิมพ์เพื่อให้เป็นรูปร่างตามต้องการ

1.7 **การเกาะกันของก้อนนม** เพื่อให้ก้อนนมเป็นเนื้อเดียวกันและได้ก้อนนมที่มีขนาดใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยให้มีการผลิตกรดแลคติคเพิ่มขึ้นด้วย

1.8 **การใส่เกลือในก้อนนม** เกลือโซเดียมคลอไรด์ จะถูกนำมาใช้กับก้อนนมโดยวิธีต่างๆ เช่น

- การเติมเกลือป่นลงบนก้อนนมในถัง เช่น การทำเนยแข็งเชดดาร์หรือ
- การเติมเกลือลงในส่วนผสมที่เป็นครีม เช่น เนยแข็งคอทเทจ

การเติมเกลือเป็นการช่วยให้กลิ่นรส และลักษณะเนยแข็งที่ได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยควบคุมการผลิตกรดแลคติค ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียและลดปริมาณความชื้นในเนยแข็งที่ผลิตได้

1.9 **การอัดก้อนนม** ขั้นตอนนี้ในบางครั้งอาจกระทำก่อนการใส่เกลือ (เช่นในกรณีของเนยแข็งที่แช่ในน้ำเกลือ) หรือหลังการใส่เกลือ (เช่นการทำเนยแข็งเชดดาร์) โดยก้อนนมจะถูกนำมาใส่ในแบบพิมพ์ที่เรียกว่าฮูป และอัดให้แน่นโดยการใช้ก้อนน้ำหนักหรือแรงดันไฮดรอลิกที่ 0.4 – 1.5 กก.ต่อตร.ซม. เป็นเวลา 1 – 48 ชั่วโมง การอัดก้อนนมอาจจะทำในแนวนอนหรือแนวตั้งก็ได้ การอัดก้อนนมจะช่วยให้เนยแข็งมีรูปร่างตามที่ต้องการ ช่วยให้เนยแข็งมีความแน่น และหางนมจะถูกไล่ออกไปจนหมดในการอัดก้อนนม ในการทำเนยแข็งบางชนิดไม่จำเป็นต้องนำก้อนนมมาอัดให้แน่น ตัวอย่างเช่น เนยแข็งที่มีความชื้นสูง เช่น เนยแข็งคอทเทจ

1.10 **การบ่มเนยแข็ง** ใช้กับการผลิตเนยแข็งบางชนิดทำได้โดยการนำเนยแข็งที่ผลิตได้มาวางไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ และความชื้นเป็นเวลานานตั้งแต่เป็นเดือน จนถึงเป็นปีนานที่สุดเป็นเวลา 4 ปี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดเนยแข็งที่ต้องการ อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มอยู่ระหว่าง 2 – 16 องศาเซลเซียส เช่นเนยแข็งเชดดาร์ จะบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสความชื้น 85 เปอร์เซ็นต์ หรือที่อุณหภูมิระหว่าง 2 – 7 องศาเซลเซียสความชื้นไม่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์และเอนไซม์ในเนยแข็งมีผลต่อการบ่มเนยแข็ง โดยจุลินทรีย์และเอนไซม์จะเป็นตัวการย่อยไขมัน โปรตีน และสารประกอบอื่นๆในเนยแข็งทำให้ได้กลิ่นรสและลักษณะเฉพาะตัวของเนยแข็งแต่ละชนิด ในการบ่มเนยแข็งในปัจจุบันจะใช้ระยะเวลาในการบ่มให้น้อยลงเพื่อเป็นการประหยัดเวลาโดยการเร่งให้กระบวนการบ่มเร็วขึ้น โดยการเพิ่มอัตราการย่อยสลายโปรตีนหรือไขมันในเนยแข็งให้เร็วขึ้น เช่น การใช้เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* คือนิวเทรสมา ช่วยในการบ่มวิธีนี้จะลดระยะเวลาการบ่มเนยแข็งลงได้ถึงครึ่งหนึ่งของระยะเวลาเดิมเช่น เนยแข็งที่มีกลิ่นรสปานกลางจะลดระยะเวลาการบ่มจาก 4 เดือนเป็น 2 เดือน และเนยแข็งที่มีกลิ่นรสแรงจะลดเวลาจาก 12 เดือนเป็น 6 เดือน นอกจากนี้วิธีอื่นที่ใช้ในการลดระยะเวลาการบ่ม คือ การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตเนยแข็ง โดยเอนไซม์โปรติเนส และเพปทิเดสในเชื้อแบคทีเรียจะเป็นตัวเร่งการบ่มเนยแข็งให้เร็วขึ้น

เนยแข็งที่ไม่มีการบ่มจะเสียได้ง่ายมาก เพราะมีกรดและเกลืออยู่น้อย ไม่พอที่จะป้องกันการเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ได้ จึงต้องเก็บไว้ในตู้เย็นเสมอ การเสียอาจเกิดขึ้นได้โดยจุลินทรีย์ทุกชนิด

เนยแข็งที่มีการบ่ม ก่อนทำการบ่มเนื้อจะเหนียวและยืดหยุ่น ขณะนำไปบ่มเนยจะมีกลิ่นรสเฉพาะ เนื้อของเนยจะเปลี่ยนจากนิ่มมาเป็นครึ่งเหลวและมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีทำให้ได้สารประกอบไนโตรเจนที่ละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น เช่น กรดอะมิโนและแอมโมเนีย ในระยะนี้ถ้าบักเตรีที่ใช้ในการบ่มไม่ว่องไว เนยแข็งอาจเสียได้ เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น แบคทีเรียที่ย่อยโปรตีนทำให้เนยแข็งมีรสขม จุลินทรีย์กลุ่มโคลิฟอร์มแบคมีเรีย *Clostridium sp. Bacillus sp.* หรือยีสต์บางชนิดซึ่งสามารถหมักน้ำตาลแลคโตสให้แก๊สเกิดขึ้น ตะกอนที่บ่มจึงมีลักษณะเป็นโพรงและมีกลิ่นรสไม่ดี

ในการทำเนยแข็งจำเป็นต้องมีการเติมหัวเชื้อลงในนมเพื่อให้จุลินทรีย์ในหัวเชื้อผลิตกรดและเกิดการหมักขึ้น หัวเชื้อที่เติมลงในนมคือ

หัวเชื้อแลคติค (starter lactic culture)

การให้ความร้อนแก่นมนอกจากจะทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียและก่อให้เกิดโรคแล้วยังทำลายเชื้อแบคทีเรียที่จำเป็นในการหมักนมด้วย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องถ่ายเชื้อที่ต้องการใช้ในการหมักลงในนม จุลินทรีย์ที่เตรียมขึ้นนี้จะเรียกว่า " หัวเชื้อ " (starter culture) หัวเชื้อนี้จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในนมหมักดังนี้

1. การผลิตกรดแลคติคซึ่งเป็นผลจากการหมักน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติคจะให้กลิ่นที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวและยังให้กลิ่นรสเปรี้ยวด้วยในระหว่างการหมักนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลิตสารประกอบหอมระเหย ได้แก่ diacetyl และ acetaldehyde ซึ่งให้กลิ่นรสเฉพาะต่อผลิตภัณฑ์นมหมัก

3. สารประกอบอื่นๆที่อาจเกิดขึ้น เช่น แอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในระหว่างการผลิตคีเฟอร์ และ คูมิส

4. ป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เนื่องจากสภาพกรดในผลิตภัณฑ์นมเหล่านี้

อย่างไรก็ตาม การศึกษาและเข้าใจถึงลักษณะของหัวเชื้อแลคติคทั้งในด้านชนิดของหัวเชื้อและการเก็บรักษาหัวเชื้อจะช่วยให้การหมักเป็นไปในลักษณะที่ต้องการมากยิ่งขึ้น ดังนี้

ชนิดของหัวเชื้อ (starter classification)

ชนิดของหัวเชื้อที่ใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมัก ได้แก่

1. หัวเชื้อที่มีเพียงสายพันธุ์เดียว เช่น *Streptococcus lactis* , *Streptococcus cremoris* หรือ *Streptococcus lactis* subsp. *diacetyllactis*

2. หัวเชื้อที่เตรียมจากการใช้เชื้อผสมมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ ซึ่งมีข้อดีคือ ถ้าเกิดphage (เชื้อไวรัสที่เข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียซึ่งทำให้ความสามารถในการหมักหรือกิจกรรมของเชื้อสูญเสียไป)ชนิดหนึ่งเกิดขึ้นการหมักยังคงดำเนินต่อไป หัวเชื้อที่เตรียมขึ้นนี้นิยมในประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดาและเนเธอร์แลนด์

คุณภาพของหัวเชื้อ ขึ้นกับความสามารถในการผลิตกรด อัตราการเติบโต ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ phage และความสามารถในการสร้างกลิ่นรส เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์

<u>เชื้อที่ใช้ในการผลิตกรด</u> ได้*แก่ Streptococcus thermophilus Streptococcus cremoris Streptococcus lactis* และ *Lactobacillus acidofilus*

<u>เชื้อที่สร้างกรดและกลิ่น</u> ได้แก่ *Lactobacillus lactis Lactobacillus helviticus Lactobacillus bulgalicus* และ *Streptococcus lactis* subsp. *diacetyllactis*

<u>เชื้อที่ใช้สำหรับการสร้างกลิ่น</u> ได้แก่ *Propionibacterium shermanii Leuconostoc cremoris* และ *Leuconostoc dextranicum*

การผลิตกรดแลคติค กรดอะซิติค ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ diacetyl และ acetaldehyde จากน้ำตาลแลคโตสและกรดซิตริค มีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อแลคติคและการเกิดกลิ่นรสเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก ปฏิกิริยาการหมักจะเกิดเป็นลูกโซ่ โดยใช้ทั้งระบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

homofermentative (การหมักที่ให้ผลิตภัณฑ์หลักเพียงชนิดเดียว) ซึ่งใช้กลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารให้เป็นกรดแลคติคเป็นส่วนใหญ่และสารชนิดอื่นแต่ไม่มีการสร้างก๊าซ ได้แก่ *Lactobacillus delbrueckii* , *L. lactis* , *L. bulgaricus* และ *L. plantarum*

heterofermentative (การหมักที่ให้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด) ซึ่งใช้กลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลในอาหาร 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อการผลิตกรดแลคติค และอีก 20 – 25 เปอร์เซ็นต์ผลิตกรดอะซิติค และเอทิลแอลกอฮอล์ ได้แก่ *L. hilgadii* , *L. fructivorans* และ *L. ruminis*

สำหรับการเปลี่ยนแปลงแบบ homofermentative ของ lactobacillus และ streptococcus จะย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสให้เป็นกลูโคสและกาแลคโตส กรดpyruvic ที่เกิดขึ้นจะเป็นไปตามแนวทางของ Emden – Meyerhof glycolytic pathway hexose monophosphate shunt pathway Leloir pathway และ D – galactose – 6 – phosphate pahtway

การย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสในนมให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตสด้วยเอนไซม์เบตา กาแลคโตซิเดส จะเร่งการเจริญของเชื้อ lactic streptococci ให้สารที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็นจำนวนมากและสะสมในนมหมักโดยเชื้อใช้น้ำตาลแลคโตสและกรดซิตริคเป็นสารอาหาร

ส่วนลักษณะการหมักแบบ homofermentation ของเชื้อ lactobacillus จะขึ้นกับปริมาณของสารอาหารและการให้อากาศ ถ้ามีการจำกัดความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสจะก่อให้เกิดเกลือแลคแตท เกลืออะซิเตท และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แต่ถ้าการหมักเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่มีอากาศเชื้อจะผลิตกรดอะซิติค อย่างไรก็ตามหัวเชื้อสามารถสร้างกรดได้เพิ่มขึ้นโดยการกำจัดออกซิเจนที่มีอยู่ในนมออกไป

อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อชนิดต่าง ๆ

แบคทีเรียแต่ละชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญต่างกันสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียตามอุณหภูมิที่เจริญได้ 4 ประเภท คือ

1. ไซโครไฟล์ หมายถึง แบคทีเรียที่ชอบความเย็น เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ -5 ถึง 5 องศาเซลเซียส และเจริญได้อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิประมาณ 12 – 15 องศาเซลเซียส
2. ไซโครโทรฟ หมายถึง แบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง –5 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง คือ 20 – 30 องศาเซลเซียส
3. เมโซไฟล์ หมายถึง แบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
4. เทอร์โมไฟล์ หมายถึง แบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียพวกนี้ส่วนใหญ่สร้างสปอร์และแบ่งเป็น 2 พวก ตามอุณหภูมิที่สปอร์สามารถงอกและเจริญได้ดี ดังนี้

- facultative thermophile คือแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งที่อุณหภูมิสูงที่ 50 – 60 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 38 องศาเซลเซียส
- obligate thermophile คือแบคทีเรียที่มีสปอร์ที่ไม่สามารถงอกและเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย บางชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 77 องศาเซลเซียส และแบคทีเรียชนิดนี้มี สปอร์ที่ทนความร้อนได้ดีกว่ากล่าวคือ สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิสูงมากถึง 121 องศาเซลเซียส ได้นานกว่า 60 นาที

เชื้อแบคทีเรียชนิดเทอร์โมไฟล์นี้เป็นเชื้อที่จะพบในหัวเชื้อที่ใช้สำหรับทำเนยแข็งและในก้อนเนยแข็ง ตังอย่างเช่น *L. helviticus* , *L. delbrueckii* เป็นต้น

2.2 กระบวนการผลิตเนยแข็ง

2.2.1 กระบวนการผลิตเนยแข็งเกาด้า

นมผ่านเครื่อง พาสเจอร์ไรส์

↓ 75 องศาเซลเซียส 15นาที

รอให้นมมีอุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส กวนเบาๆและมีการเติม

กรดแลคติกทีละหยด 20 มล.

↓

เมื่อนมได้อุณหภูมิ 30 – 32 องศาเซลเซียส แล้วเติมสตาร์เตอร์โดยใช้

สตาร์เตอร์(เชื้อCHN - 11) 1 ซองละลายในน้ำ 200 มล.

แคลเซียมคลอไรด์(CaCl2)อิ่มตัว 40 มล. โพแทสเซียมไนเทรต 15 กรัม

↓ กวนต่ออีก 40 นาที

เติมเรนเนท 10 กรัม ที่ละลายในน้ำ 100 มล.

↓ กวน 3 นาที และพักให้เกิดเคิร์ด 45 – 60 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัดเคิร์ทเป็นชิ้นเล็ก โดยใช้ใบมีดกวน 25 นาที

↓

ระหว่างรอตัดเคิร์ท เตรียมน้ำร้อน 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 1.5 ถัง

ระบายน้ำเวย์ออกครั้งที่ 1 ประมาณ 1/3 (1.75 ถัง)

↓

เติมน้ำร้อน 60 องศาเซลเซียส ที่เตรียมไว้ 1 – 1.5 ถังอย่างช้าๆ กวนด้วย

↓

เพิ่มอุณหภูมิประมาณ 20 นาที จนได้อุณหภูมิ 38 – 40 องศาเซลเซียส

↓

กวนอีก 25 นาที โดยใส่ใบตัดเคิร์ทด้วย

ระบายน้ำออกครั้งที่ 2 ปล่อยน้ำเวย์ออกเกือบหมด

ให้ท่วมผิวเคิร์ทประมาณ 1 นิ้ว

ทับน้ำหมักด้วยถังใส่น้ำ ½ ถังทิ้งไว้ 20 นาที

↓

ตัดเคิร์ทเป็นก้อนใหญ่ 12 ก้อนเพื่อแบ่งใส่พิมพ์ 12 อัน

กดน้ำหนักลูกตุ้ม ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง

↓

แกะเนยแข็งออกจากพิมพ์ ทิ้งไว้ค้างคืน

↓

วันรุ่งขึ้น แช่ก้อนเนยแข็งในน้ำเกลือ 24 – 30 ชั่วโมง

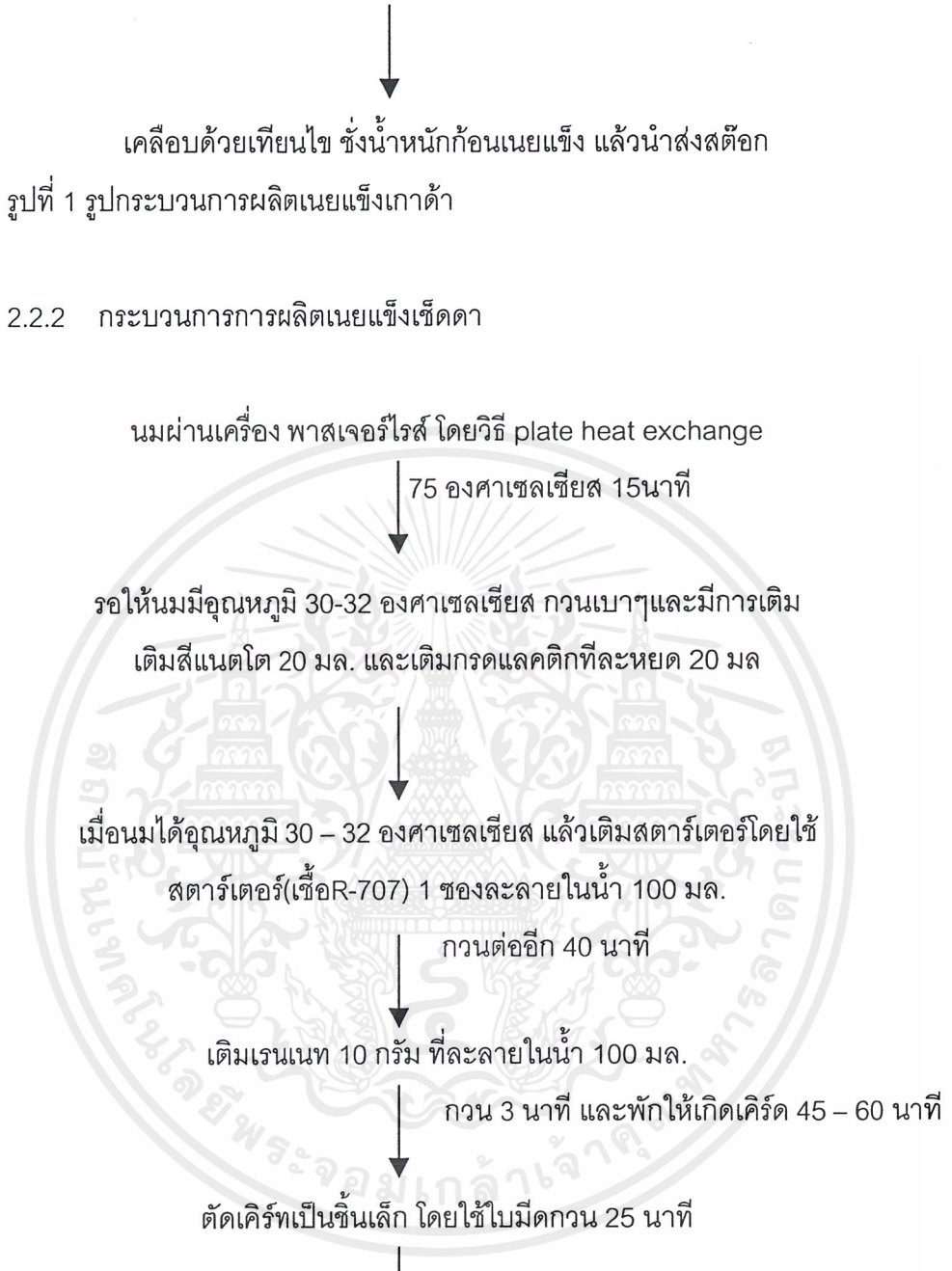
↓

นำก้อนเนยขึ้นจากน้ำเกลือ แล้วผึ่งให้แห้ง 2 วัน

↓

เช็ดน้ำยา เดลโวซิท(0.2กรัมละลายในน้ำสะอาด 10 ลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 รูปกระบวนการผลิตเนยแข็งเกาด้า

2.2.2 กระบวนการการผลิตเนยแข็งเช็ดดา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พักให้เคิร์ดเกาะตัวเชื่อมกัน 30 นาที

↓

ตัดเคิร์ดเป็นก้อนใหญ่

↓

พลิกกลับก้อนเคิร์ดทุก 10 นาที
ครั้งที่ 1 , ครั้งที่ 2 , ครั้งที่ 3 ,
ครั้งที่ 4 ให้น้ำเวย์มีพีเอช 5.5 – 5.6

↓

ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ

↓

คลุกเกลือ 400 กรัม และนวด 10 นาทีจนเกลือละลาย(ผิวชั้นมันเงา)

↓

บรรจุใส่พิมพ์กลม 12 ก้อน กดน้ำหนักทิ้งไว้ค้างคืน

↓

แกะเนยแข็งออกจากพิมพ์

↓

เช็ดน้ำยา เดลโวซิท (0.2กรัมละลายในน้ำสะอาด 10 ลิตร)

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากนั้นทิ้งให้แห้ง 2 วัน เคลือบด้วยเทียนไข แล้วนำไป

ชั่งน้ำหนักก้อนเนยแข็ง ส่งสต๊อก

รูปที่ 2 กระบวนผลิตเนยแข็งเชดดาร์

2.3 โปรตีนเซลล์เดียว

ในปัจจุบันประชากรของโลกได้มีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว ในขณะที่พื้นที่ทำการเกษตร การกสิกรรม และการประมง เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์นั้นมีจำนวนลดลง โดยเฉพาะแหล่งอาหารจำพวกโปรตีน ทำให้การปรับปรุงพันธุกรรมของแหล่งอาหารประเภทโปรตีนเหล่านั้นสามารถให้ผลผลิตที่มีโปรตีนสูง แต่ก็พบว่าอาจไม่เพียงพอ ต่อความต้องการโดยเฉพาะในช่วงระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 1 และ 2 จึงได้มีการศึกษาแหล่งอาหารชนิดอื่นเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีน หรือเป็นส่วนเสริมโปรตีนที่ได้จากเนื้อสัตว์หรือจากพืชโดยจะต้องมีคุณค่าทางอาหารที่ใกล้เคียงกัน ต่อมาได้มีความสนใจที่จะนำจุลินทรีย์มาใช้เป็นแหล่งโปรตีน จนกระทั่งเมื่อ 25 ปีที่แล้วจึงได้มีการเริ่มผลิตโปรตีนเซลล์เดียวขึ้น ซึ่งนับเป็นอีกวิธีหนึ่งที่เหมาะสมที่จะใช้ในการแก้ไขปัญหาการขาดแคลนโปรตีนของโลก โปรตีนที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์นี้เรียกว่าโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protien หรือ SCP) หมายถึง การนำจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มาใช้เป็นแหล่งโปรตีน โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ใช้จะมีลักษณะเป็นโปรตีนเซลล์เดียว หรือเป็นเส้นใย(filament) โปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตได้นั้นอาจนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารโดยตรง หรือเป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์และสัตว์ สาเหตุที่นำจุลินทรีย์มาใช้ผลิตเป็นแหล่งอาหารนั้น เนื่องจากให้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ต่อหน่วยเวลาสูงกว่าโปรตีนจากแหล่งอื่นๆ(ดุษณี,2537)

ประโยชน์ของการใช้จุลินทรีย์ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวสรุปได้ดังนี้

1. จุลินทรีย์สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วและเป็นจำนวนมาก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แบคทีเรียและยีสต์สามารถเพิ่มจำนวนได้ทุกๆ 0.5 – 2 ชั่งโมง และ 1 – 3 ชั่วโมงตามลำดับในขณะที่สาหร่ายและราใช้เวลา 2 – 6 ชั่วโมง และ 4 – 12 ชั่วโมง ตามลำดับ ในการเพิ่มจำนวน
2. การปรับปรุงพันธุ์จุลินทรีย์สามารถทำได้ง่ายกว่าการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ เพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดียิ่งขึ้น เช่น มีอัตราการเจริญเร็วขึ้น ปริมาณกรดอะมิโนมากขึ้น และอื่นๆ
3. จุลินทรีย์ประกอบด้วยปริมาณโปรตีนและคุณค่าทางอาหารอื่นๆที่เป็นประโยชน์
4. จุลินทรีย์สามารถเจริญได้เป็นจำนวนมากในพื้นที่จำกัดและต้องการน้ำในปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้อย สามารถผลิตได้ตลอดเวลาในถังหมักขนาดใหญ่ และไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อมเช่น ดิน ฟ้า อากาศ เหมือนเช่นการเพาะปลูกพืช

5 จุลินทรีย์สามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิดในการเจริญ รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม แอลกอฮอล์จากอุตสาหกรรมปิโตรเลียมและกระบวนการหมัก และเซลลูโลสจากพืช

6. ปัญหาเกี่ยวกับของเสียของจุลินทรีย์มีน้อยเมื่อเทียบกับการผลิตอาหารโดยกระบวนการอื่นๆ

2.4 คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวมีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และสาหร่าย คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว มีดังนี้(ดวงพร,2530)

1. เจริญได้เร็วในอาหารที่มีราคาถูก
2. เจริญได้ดีในอาหารที่มีองค์ประกอบง่ายๆ ไม่ซับซ้อน มีความต้องการวิตามิน และปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญต่างๆน้อยหรือไม่ต้องการเลย และให้ผลผลิตสูง
3. คงลักษณะทางพันธุกรรมได้ดีและไม่กลายพันธุ์ง่ายๆ เมื่อเลี้ยงติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน
4. การแยก และเก็บเกี่ยวเซลล์สามารถทำได้ง่าย
5. มีความต้านทานต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ และใช้กระบวนการหมักอย่างง่ายๆ ในการเจริญในถังหมัก
6. ทราบคุณลักษณะทางพันธุกรรม สรีระวิทยาและสามารถปรับปรุงพันธุ์ได้
7. ใช้แหล่งพลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ
8. หลังจากผ่านการหมักไปแล้ว มีวัสดุเหลือทิ้งน้อยหรือไม่มีเลย
9. ไม่เป็นพิษทั้งในระยะสั้นและระยะยาว ไม่ทำให้เกิดภูมิแพ้และปลอดภัยต่อการบริโภค
10. มีคุณค่าทางอาหารให้ปริมาณโปรตีนสูง โปรตีนที่ได้จะต้องมีกรดอะมิโนที่มีคุณค่า
11. เก็บรักษาง่าย เช่น การทำให้แห้ง และง่ายต่อการขนส่ง
12. ต้นทุนการเพาะเลี้ยงเซลล์และการเก็บเกี่ยวเซลล์ต้องสามารถแข่งขันกับแหล่งโปรตีนอื่นๆได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.5 ประเภทของจุลินทรีย์ที่ผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว

สาหร่าย

สาหร่ายจัดเป็นพวก phototropic microorganism คือใช้พลังงานแสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงานในการรีดิวซ์ สารอนินทรีย์(CO_2)ให้เป็นสารอินทรีย์ ข้อดีของสาหร่ายคือมีโปรตีนสูงประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้งและโปรตีนที่มีคุณภาพ เพาะเลี้ยงได้ทุกฤดู อุดมด้วยวิตามินซีและวิตามินบีรวม ใช้พลังงานแสงอาทิตย์อย่างมีประสิทธิภาพ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและไขมันในสัดส่วนที่น่าพอใจ สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ในการเจริญเติบโตใช้น้ำปริมาณน้อย สามารถเจริญได้ในที่แห้งแล้งและเก็บเกี่ยวผลง่าย สำหรับพวกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน(blue-green algae) บางชนิดยังสามารถตรึงไนโตรเจนได้ด้วย ข้อเสียของพวกนี้คืออัตราการเจริญต่ำกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นและถ้าเลี้ยงในถังหมักมีปัญหาการให้ CO_2และแสงแก่เซลล์แต่ละตัว(ดวงพร,2530)

สาหร่ายที่ได้รับความสนใจใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีน ได้แก่ *Chlorella sp. Scenedesmus sp. Spirulina sp. Coelastrum sp. Uronema sp. Dunaliella sp.*

ความแตกต่างในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขึ้นกับวัตถุที่ใช้คือ

1. ระบบที่ใช้น้ำจืด เติมธาตุอาหาร แหล่งคาร์บอนและใช้แสงอาทิตย์ สาหร่ายที่เลี้ยงโดยวิธีนี้ใช้เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์
2. ระบบที่ใช้น้ำทิ้งจากบ้านเรือนหรือโรงงานอุตสาหกรรม ไม่ต้องเติมธาตุอาหารและแหล่งคาร์บอน ในระบบนี้จะมีแบคทีเรียปนเปื้อน ใช้ในการกำจัดน้ำเสียโดยมีผลพลอยได้คืออาหารสัตว์ ถ้าไม่มีสารพิษหรือจะใช้เป็นแหล่งพลังงานก็ได้
3. การเพาะเลี้ยงระบบปิด คือการใช้ถังหมัก(fermentor) ภายใต้แสงอาทิตย์หรือแสงประดิษฐ์(Artificial light)

ความต้องการสารอาหารสำหรับการเจริญของสาหร่ายนั้นต้องการน้อยมากคือต้องการแสง น้ำ CO_2 และเกลืออนินทรีย์ต่างๆน้ำที่ใช้จะเป็นน้ำจืดหรือน้ำเค็มก็ได้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ สำหรับราคาในการผลิต เช่นการผลิตสาหร่าย *Chlorella sp.* ที่มีการศึกษาไว้พบว่าจะตกประมาณ 20 – 50 เซนต์ต่อปอนด์ ซึ่งเป็นราคาที่สูงพอสมควร แต่ถ้าเลี้ยงในน้ำทิ้งเช่นน้ำทิ้งจากบ้านเรือนจะตกประมาณ 3 – 6 เซนต์ต่อปอนด์

คุณค่าทางอาหารของสาหร่าย สาหร่ายจะมีปริมาณโปรตีนประมาณ 55 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักแห้ง มีกรดอะมิโนจำเป็นครบแต่จะมีเมทิโอนินต่ำ ส่วนไลซีนและทรีโอนินสูงอุดมด้วยวิตามินบีและซี β- carotene และวิตามินเคในปริมาณที่มาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
43971

เชื้อรา

เชื้อราเป็นแหล่งอาหารของมนุษย์มานานก็คือเห็ดซึ่งเป็นโปรตีนเซลล์เดียวที่มุนษย์สามารถบริโภคได้โดยตรง เช่น *Agaricus campestris* จะใช้เป็นแหล่งอาหารในยุโรป ส่วนในประเทศจีนก็นิยมรับประทานเห็ด *Cortinellus berkelyanus* และเห็ด *Volvaria volvacea* เมื่อสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ประเทศเยอรมันได้เลี้ยงราพวก *Geotrichum candidum* เป็นแหล่งอาหารเสริมของมนุษย์ เพราะขาดแคลนพวกโปรตีนและวิตามิน ส่วนพวกเชื้อรา *Geotrichum lactis* ก็เหมาะที่จะผลิตเป็นอาหารเพราะว่าใช้หางนม(whey) และ sulfite waste liqour ปัจจุบันการใช้เชื้อราจะต้องเสริมด้วยเมทไทโอนิน กรดกลูตามิต วิตามินบี2 และวิตามินบี12 ทั้งนี้เพราะส่วนประกอบของกรดอะมิโนในเชื้อราใกล้เคียงกับ จุลินทรีย์อื่นๆคือมี sulfur amino acid ต่ำ และเชื้อราจะมีวิตามินบีทุกชนิดในระดับต่ำ(ดวงพร,2530)

เชื้อราที่มีแนวโน้มว่าสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีน เพราะว่ามีอัตราการเจริญเร็วและสามารถใช้วัสดุต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น มันฝรั่ง ข้าวโพด ข้าว มันสำปะหลัง โมลาส เยื่อกระดาษและของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนแหล่งของไนโตรเจนคือเกลืออนินทรีย์ไนโตรเจน

ข้อดีของเชื้อราคือ สามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิดรวมทั้งของเสียที่มีปริมาณเซลลูโลสสูง และยังเจริญได้หลายรูปแบบ เช่น ในรูปแบบเซลล์เดียว(pellet) ซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวได้ง่าย หรือการเจริญแบบใยรา นอกจากนี้เชื้อรายังมีคุณค่าทางอาหารและรสชาติดี มีลักษณะคล้ายเนื้อสัตว์ เชื้อราที่สามารถนำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้เช่น *Fusarium* sp. , *Rhizopus* sp.เป็นต้น

Gonzales และคณะ(1985) ได้ศึกษาการนำของเสียจากกระบวนการแปรรูปสับปะรดมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma viride* ในการหมักแบบ solid state เพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวเป็นอาหารสัตว์ พบว่ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 1.2 – 1.6 ของน้ำหนักแห้ง

บริษัท United Paper Mills ประเทศฟินแลนด์ การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากโรงงานน้ำทิ้งผลิตกระดาษที่กำจัดซัลเฟอร์ไดออกไซด์แล้วเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังมีการเติมสาร เช่น โพแทสเซียมคลอไรด์ กรดฟอสฟอริก และแอมโมเนียลงไปในอาหารด้วย และใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า “ เปกิโลโปรตีน” (Pekilo protein) มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 55 – 60 และสามารถใช้เป็นอาหารสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย

แบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารได้เพราะมีปริมาณโปรตีนสูงร้อยละ 47 – 87 แล้วแต่ชนิดของแบคทีเรียและมีอัตราการเจริญเร็วกว่าจุลินทรีย์จากกลุ่มอื่น กล่าวคือแบคทีเรียใช้เวลาในการแบ่งตัวเพียง 20 – 30 นาที ในขณะที่ยีสต์ใช้เวลา 2 – 3 ชั่วโมง สาหร่ายและราใช้เวลานานกว่า 16 ชั่วโมง นอกจากนี้แบคทีเรียประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็นหลายชนิดโดยเฉพาะไลซีนที่เหมาะต่อความต้องการของร่างกาย ยกเว้นกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ข้อดีของการใช้แบคทีเรียในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวคือ มีอัตราการเจริญเร็ว ให้ปริมาณโปรตีนที่สูง และสามารถใช้แหล่งไฮโดรคาร์บอน แต่มีข้อกำจัดคือ แบคทีเรียมีขนาดเล็กมาก (0.5-5.0 ไมครอน) ทำให้เก็บเกี่ยวเซลล์ได้ยาก

ในประเทศไต้หวันก็มีการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถใช้ไฮโดรคาร์บอนได้โดยใช้วิธีการคล้ายคลึงกัน และได้สายพันธุ์ของเชื้อ *Pseudomonas* 5401 ซึ่งสามารถย่อยเอ็น-พาราฟินจากน้ำมันดิบ หรือส่วนอื่นๆที่ได้จากโรงกลั่น โดยมีเกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 36 – 38 องศาเซลเซียส พบว่าได้น้ำหนักแห้งสูงถึง 16 กรัมต่อลิตร และจากการเลี้ยงเชื้อโดยการหมักแบบต่อเนื่องที่ dilution rate 0.12 ต่อชั่วโมง จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งคงที่ 10 กรัมต่อลิตร เมื่อเก็บเกี่ยวเซลล์โดยวิธีหมุนเหวี่ยง และนำมาผ่านตัวทำละลายเพื่อกำจัดไฮโดรคาร์บอนที่หลงเหลืออยู่และนำมาทำให้แห้งและบด จะได้ปริมาณสูงถึง 73.62 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม โดยจะมีกรดอะมิโนจำเป็นมากกว่ายีสต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไลซีนและเมทไทโอนีน นอกจากนี้ยังประกอบด้วยวิตามินบีต่างๆด้วย(ดุษณี,2537)

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้โดยใช้กากมันสำปะหลัง และน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศที่ผลิตมันสำปะหลังเป็นอันดับหนึ่งของโลก จากการศึกษาถึงการเจริญของเชื้อ *Rhodocyclus gelatinosus* (ชื่อเดิม *Rhodopseudomonas gelatinosa*) บนกากมันสำปะหลังที่เก็บไว้ในที่มืดและมีออกซิเจน พบว่าได้โปรตีน 56 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 2.45 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 26.42 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า 3.21 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีนจะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็น เช่น เมทไทโอนีน ไลซีน ลิวซีน และเฟนนิล อะลานีน นอกจากนี้ยังมีวิตามินที่จำเป็น เช่น วิตามินบี2 วิตามินบี12 วิตามินอี และกรดนิโคตินิก (nicotinic acid) โปรตีนเซลล์เดียวจากแบคทีเรียที่ผลิตได้นี้สามาถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารปลาได้ โดยสามารถทดแทนการใช้ปลาป่นได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เมื่อนำมาเลี้ยงปลาทาง(*Carassius asratus*) อายุ 2 เดือน เป็นเวลา 122 วัน ปรากฏว่าไม่มีอาการเป็นพิษหรืออาการผิดปกติแต่อย่างใด นอกจากนี้ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียยังให้น้ำหนักปลามากกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารปลาเพียงอย่างเดียวถึง 22.62 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการนำแบคทีเรีย *Rhodobacter sphaeroides* P47 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ให้ผลผลิตสูงเมื่อใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานและมีปริมาณวิตามินบี12 และคาโรทีนอยด์ (carotenoid) สูงมาผสมกับเชื้อ Rhodocyclus gelatinosus (noparatnarapron et al;1987) โดยการใช้กากมันสำปะหลังแห้งที่ได้จากการผลิตแป้งมันในจังหวัดชลบุรี เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมให้ผลผลิตดีกว่าการเลี้ยงเชื้อเดี่ยวๆใช้ระยะเวลาในการเจริญสั้นลง และยังพบว่าเซลล์ของ *Rc. gelatinosus* อุดมไปด้วยวิตามินบี12 ในขณะที่เซลล์ของ *Rc. gelatinosus* P47 จะประกอบด้วยวิตามินอี ซึ่งวิตามินเหล่านี้จำเป็นต่อการเจริญของสัตว์ โดยเฉพาะวิตามินอีจะมีความสำคัญต่อการพัฒนาการสืบพันธุ์ของสัตว์ด้วย(ดุษณี,2537)

ยีสต์

ยีสต์เป็นโปรตีนเซลล์เดียวที่มีการนำมาใช้กันมากที่สุด เนื่องจากยีสต์มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์และสัตว์ การใช้ยีสต์เป็นอาหารมีมานานตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 ชาวเยอรมันได้บริโภคยีสต์เป็นอาหารเสริมโปรตีน ซึ่งยีสต์ที่ใช้ในการบริโภคคือ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งอาหาร และในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ในประเทศเยอรมันก็มีการผลิต Torula yeast(*Candida utilis*) จากของเสียจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษเป็นวัตถุดิบและจากน้ำตาลที่ได้จากการใช้กรดย่อยเนื้อไม้ โปรตีนที่ผลิตได้นี้ใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับมนุษย์ นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถใช้ผลพลอยได้จากทางเกษตรหรืออุสาหกรรมเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ เช่น กากน้ำตาล วัตถุดิบพวกแป้ง หางนม ผลไม้ และน้ำทิ้งจากโรงงานต่างๆ เป็นต้น(ดวงพร,2530)

ยีสต์ประกอบด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันปริมาณมาก และเป็นแหล่งวิตามินบีรวมสูงสุดแหล่งหนึ่ง แหล่งโปรตีนจากยีสต์จะมีคุณค่าทางอาหารใกล้เคียงกับโปรตีนจากพืช มีกรดอะมิโนจำเป็นเกือบทุกชนิดยกเว้นเมทไทโอนีนและซีสทีน โปรตีนของเซลล์ยีสต์จะมีประมาณ 45 – 55 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ตารางที่ 1 แสดงถึงกรดอะมิโนที่สำคัญต่างๆ ในรูปของเปอร์เซ็นต์โปรตีนทั้งหมดของยีสต์ในแหล่งวัตถุดิบต่างๆเปรียบเทียบกับโปรตีนที่สกัดจากถั่วเหลืองและปลาป่น โดยพบว่ายีสต์มีคุณค่าทางอาหารเทียบเท่ากับแหล่งอาหารจากถั่วเหลือง และถ้ามีการเสริมด้วยเมทไทโอนีนจะทำให้คุณค่าทางอาหารที่ได้เทียบเท่ากับปลา (Senez,1972)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดอะมิโนของยีสต์ ปลาป่น และถั่วเหลือง (หน่วยเป็นกรัมต่อ 16กรัมไนโตรเจน) (Senez,1972)

กรดอะมิโน	ยีสต์จี(G)	ยีสต์แอล(L)	ปลาป่น	ถั่วเหลือง
ไอโซลิวซีน	5.1	5.3	4.6	5.4
ลิวซีน	7.4	7.8	7.3	7.7
เฟนนิลอะลานิน	4.3	4.8	4.0	5.1
ไทโรซีน	3.6	4.0	2.9	2.7
ทรีโอนีน	4.9	5.4	4.2	4.0
ทริปโทเฟน	1.4	1.3	1.2	1.5
วาลีน	5.9	5.8	5.2	5.0
อาร์จินีน	5.1	5.0	5.0	7.7
ฮิสทิดีน	2.1	2.1	2.3	2.4
ไลซีน	7.4	7.8	7.0	6.5
ซีสเทอีน	1.1	0.9	1.0	1.4
เมทไทโอนีน	1.8	1.6	2.6	1.4
กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบทั้งหมด	2.9	2.5	3.6	2.8

ยีสต์จี เป็นยีสต์สายเชื้อที่เพาะเลี้ยงบน n – alkane อย่างเดียว

ยีสต์แอล เป็นยีสต์สายเชื้อที่เพาะเลี้ยงบน n – alkane ผสมกับน้ำมันก๊าซ

Candida utilis เป็นยีสต์ที่นิยมใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวมากที่สุด และมีปริมาณโปรตีนสูง ได้มีการศึกษาถึงการนำ *C. utilis* มาเลี้ยงในอาหารต่างๆ เช่น Lawford et al (1979) ได้นำ *C. utilis* Y – 900 มาเลี้ยงในกากน้ำตาลโดยใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง พบว่าได้โปรตีนจากยีสต์ 50 – 55 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีคุณค่าใกล้เคียงกับโปรตีนจากถั่วเหลือง นอกจากนี้กรดอะมิโนจำเป็นที่จำเป็นหลายชนิดที่พบในยีสต์สามารถนำมาใช้เป็นอาหารเสริมในธัญพืชได้ เช่น ข้าวสาลีที่ขาดไลซีนและทรีโอนีน เป็นการเพิ่มคุณค่าอาหารพวกธัญพืชเหล่านี้

จากการศึกษาถึงการเจริญของยีสต์ในน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ พบว่า *C. utilis* เป็นยีสต์เพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถใช้น้ำตาลไซเลส (xylose) ในน้ำทิ้งนั้นได้ (Peppler,1978) ซึ่งใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ เยอรมันตะวันออก รัสเซีย เชคโกสโลวาเกีย สหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่น ได้มีการผลิต *C. utilis* จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตกระดาษ พบว่าปริมาณยีสต์ที่ผลิตได้มีประมาณ 5000 ตันต่อปี นอกจากนั้นยังมีการศึกษาถึงการเลี้ยง *C. utilis* ในน้ำทิ้งโรงงานต่างๆ เช่น การนำน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตสับปะรดกระป๋องมาเลี้ยงเชื้อ *C. utilis* ซึ่งในระหว่างกระบวนการผลิตสับปะรดกระป๋องนั้นจะมีน้ำค้นจากสับปะรดบางส่วนที่ปนมากับน้ำทิ้งโรงงานและน้ำทิ้งเหล่านี้จะต้องนำมาผ่านกรรมวิธีเพื่อลดค่า บี.โอ.ดี. ก่อนที่จะปล่อยออกไป จากการศึกษาถึงการนำน้ำทิ้งจากโรงงานสับปะรดกระป๋องมาใช้เลี้ยงเชื้อยีสต์และรา 10 ชนิดโดยกระบวนการหมักแบบครั้งคราว พบว่า *C. utilis* เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการลดค่า ซี.โอ.ดี. เมื่อนำ *C. utilis* มาเลี้ยงในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง จะพบว่าที่ dilution rate 0.33 ต่อชั่วโมงจะเหมาะต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ และลดค่าซี.โอ.ดี. ได้สูงสุด (Prior,1984) ราล(Rale,1984) ได้ศึกษาการนำน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตสับปะรดกระป๋องในประเทศอินเดียมาเลี้ยงเชื้อยีสต์ *C. utilis* และ *Hansenula sydowiorum* จะให้โปรตีน 19 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Vananuwat และ Kisella(1975) ศึกษาการผลิตยีสต์โปรตีนจากแลคโตส โดย *Saccharomyces fragilis* พบว่ามีการใช้น้ำตาลแลคโตสมากกว่าร้อยละ 90 ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ได้สูงสุด 11 กรัมต่อลิตร ขณะเดียวกันสามาถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 74

Bernstein และคณะ(1977) ศึกษาการนำเวย์ที่ได้จากการผลิตเนยแข็งมาผลิตโปรตีน และแอลกอฮอล์ พบว่าการใช้ *Saccharomyces fragilis* เลี้ยงในเวย์สภาพที่ให้อากาศในปริมาณสูงหลังการเก็บเกี่ยวเซลล์ นำมาวิเคราะห์พบว่าเซลล์ยีสต์ที่ได้มีโปรตีนสูงจึงนำไปทดลองกับสัตว์พบว่าไม่มีความเป็นพิษ

พันธ์ณรงค์ จันแสงศรี(2542) ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเวย์ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวน พบว่าการใช้ *K. fragilis* TISTR 5057 เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยมีเวย์เป็นวัตถุดิบ เซลล์ยีสต์อายุ 12 ชั่วโมง เป็นเซลล์ที่มีอัตราการเจริญสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ร้อยละ 20 โดยปริมาตรในเวย์ซึ่งมีน้ำตาลแลคโตสเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และอาศัยเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนปริมาตร 3 ลิตร พบว่าเซลล์ยีสต์สร้างมวลเซลล์มากที่สุดภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ ความเป็นกรด – ด่าง 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มวลเซลล์แห้งที่ได้ร้อยละ 1.7 ของเวย์ที่ใช้

ยีสต์ที่นำมาใช้เป็นแหล่งอาหาร

1. *Saccharomyces sp.* ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ เหล้าต่างๆ เซลล์ที่ผ่านขบวนการผลิตแล้วไม่ว่าจะเป็น brewer's yeast หรือ distiller's yeast

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถนำมาใช้กำจัดรสขมออกแล้วปรับปรุงรส โดยการเอาเซลล์มาล้างน้ำทำให้เจือจางด้วย NaOH แล้วล้างน้ำอีกครั้งแล้วเติม NaCl และphosphoric acid ให้เป็นกรดเล็กน้อย นอกจากนี้แล้วยังสามารถเลี้ยงได้โดยตรงโดยใช้โมลาสเป็นวัตถุดิบ

2. Torula yeast (fodder yeast) คือเชื้อ *Candida utilis* ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวมากที่สุด เพราะเจริญเร็วที่สุด เลี้ยงง่าย โปรตีนสูง ใช้อาหารได้หลายชนิดรวมทั้งน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม เป็นน้ำตาลที่ใช้ยากสำหรับเชื้ออื่นๆ

3. Waldhof process ใช้ *C. utilis* ใน sulfite liqour ใช้ถังหมักแบบต่อเนื่องของ Waldhof ได้โปรตีน 55 – 60 เปอร์เซนต์

4. DSM. Oxanene-water process ใช้ *Candida lipolytica* และ *Trichoderma cutaneum* ในน้ำทิ้งจากการออกซิไดซ์ cyclohexane ได้โปรตีน 54 – 67 เปอร์เซ็นต์

5. n-paraffin และ gas oil process ใช้ *Candida lipolytica* โดยใช้ hydrocarbon เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

นอกจากนี้หางนมยังเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่งที่ใช้ในการผลิตยีสต์มาเป็นแหล่งอาหารของมนุษย์และสัตว์ และพบว่าเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว คือ *Kluyveromyces fragilis* และ *K. lactis* เนื่องจากมีความสามารถในการใช้น้ำตาลแลคโตส

2.6 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

วัตถุดิบสำหรับผลิตโปรตีนเซลล์เดียวแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ คือ ไฮโดรคาร์บอน และ คาร์โบไฮเดรต (ดวงพร,2530)

1. ไฮโดรคาร์บอน ซึ่งมีทั้งอยู่ในสภาพเป็นของเหลวเช่น เมทานอล เอธานอล n-paraffin และไฮโดรคาร์บอนในสภาพแก๊ส เช่น methane n-butane propane ethan เป็นต้น จุดเริ่มต้นที่สนใจใช้สารประเภทนี้เป็นวัตถุดิบเริ่มโดยบริษัท Britis Petrolium (BP) Kanegafuchi Chemical Industry Company Ltd. Dainippon Ink, Chemical Company Ltd. ต่างสนใจที่จะใช้สารประกอบ n-alkane ของปิโตรเลียมเป็นวัตถุดิบเพราะมีปริมาณมากราคาถูก และมีความบริสุทธิ์สูง

2. คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส รวมทั้งของเหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรม ซึ่งได้จากแหล่งต่างๆ เช่น

2.1 กากน้ำตาล ได้จากโรงงานผลิตน้ำตาล ซึ่งจะเป็นน้ำตาลที่ได้จากอ้อยและหัวบีท ขึ้นกับท้องถิ่น

2.2 น้ำทิ้งจากโรงงานทำกระดาษ (Spent sulfite waste liqour)

2.3 น้ำทิ้งจากโรงงานมันฝรั่ง (potato waste water)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเนย (whey) มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลือง ประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส 5 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 1 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า 0.6 เปอร์เซ็นต์

2.5 น้ำตาลโมเลกุลใหญ่ แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ แป้งและเซลลูโลส โดยวัตถุดิบพวกนี้ต้องผ่านกระบวนการทางเคมีหรือเอนไซม์เพื่อย่อยให้เป็นน้ำตาลก่อน หลังจากนั้นจึงนำไปเลี้ยงจุลินทรีย์

2.6 เมล็ดธัญพืช โดยทั่วไปจะมีแป้งเป็นส่วนใหญ่ โปรตีนมีเพียงเล็กน้อยและมักขาดกรดอะมิโนจำเป็น เช่น ข้าวสาลีขาดไลซีนและทริปโตเฟน พืชตระกูลถั่วขาดเมไทโอนีนและทริปโตเฟน ดังนั้นการนำมาเป็นวัตถุดิบผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจึงเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหาร

2.7 มันสำปะหลัง มีแป้งเป็นส่วนใหญ่ มีโปรตีนเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ในหัวมันสำปะหลัง มันสำปะหลังถูกใช้เป็นอาหารหลักของประชากรแถบบราซิล แอฟริกาตะวันตก และอินโดนีเซีย มีหลายประเทศนิยมใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตโปรตีนเซลล์เดียว เนื่องจากราคาถูก หาง่าย และมีทุกฤดูกาล

2.8 เซลลูโลส เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบของพืชทุกชนิด ซึ่งเป็นของเหลือใช้จากการเกษตรและอุสาหกรรมการเกษตร ในสหรัฐอเมริกา ประมาณว่ามีของเหลือใช้จากการเกษตรสูงถึง 200 ล้านตันต่อปีและขยะจากที่อยู่อาศัยพบว่า 40 – 50 เปอร์เซ็นต์ของขยะที่ทิ้งเป็นพวกเซลลูโลส ชายอ้อยก็เป็นของเหลือทิ้งจำพวกเซลลูโลสที่มีส่วนประกอบดังนี้ คือ ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ เซลลูโลส 50 – 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง hemicellulose 10 – 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง นอกนั้นเป็นลิกนินและเถ้า

2.7 คุณค่าทางอาหารของเซลล์ยีสต์

ภายในเซลล์ยีสต์มีส่วนประกอบของสารและเกลือแร่จำนวนมาก ซึ่งเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นอาหารของคนและสัตว์ โดยเฉพาะโปรตีนซึ่งเฉลี่ยแล้วในเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยโปรตีนทั้งหมดประมาณ 45 – 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก (ดวงพร,2530)

โดยทั่วไปพบว่าเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 22 – 23 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็น Tre halose 33 เปอร์เซ็นต์ glucan 27 เปอร์เซ็นต์ mannan 21 เปอร์เซ็นต์ และ glycogen ส่วนไขมันในเซลล์ยีสต์โดยทั่วไปประมาณ 2 – 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วย triglyceride lecithin และ ergosterol และยีสต์ที่พบว่ามีปริมาณไขมันในเซลล์มากที่สุดคือ *R. gracilis* เกลือแร่ที่พบในเซลล์ยีสต์ประมาณ 6 – 8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนมากเป็นโพแตสเซียมและฟอสฟอรัส ที่พบบ้างเล็กน้อยคือ แคลเซียม แมกนีเซียม ซิลิกอน คลอไรด์ เหล็ก และตะกั่ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ยีสต์ที่ใช้เป็นอาหาร (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง)

Constituent	*S. cerevisiae* Molasses	*Candida utilis* Sulphite liqour	*S. fragilis* Milk whey	*S. cerevisiae* Beer
Protein	50	55	54	45
Lipid	6	5	1	6
Moisture	5	6	7	6
Ash	7	8	9	8
Sodium	0.3	0.001	-	0.2

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบกรดอะมิโนจากเซลล์ยีสต์ชนิดต่างๆ และ FAO reference protein

Amino acid	FAO Reference Protein	Content in yeast (g/16 gN)		
		S. cerevisiae In molasses	*C. utilis* sulfite liqour	*C. utilis* in molasses
Lysine	4.2	8.2	6.7	10.7
Valine	4.2	5.5	6.3	5.7
Leucine	4.8	7.9	7.0	8.1
Isoleucine	4.2	5.5	5.3	7.3
Threonine	2.8	4.8	5.5	4.8
Methionine	2.2	2.5	1.3	1.4
Phenylalanine	2.8	4.4	4.3	4.1
Cystine	2.0	2.6	0.7	0.3
Trytophan	-	1.2	1.2	0.5
Histidine	-	4.0	1.9	2.8
Tyrosine	-	5.0	3.3	1.4
Arginine	-	5.0	5.4	4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงองค์ประกอบของวิตามินในเซลล์ชนิดต่างๆ

Vitamin	Content in dry product (μg/g)		
	S. cerevisiae In molasses	*C. utilis* sulfite liqour	*C. utilis* in molasses
Thiamine HCl	165	130	25
Riboflavin	100	45	50
Nicine	585	400	355
Pyridoxin HCl	20	30	-
Folacine	13	21	20
Calcium – d pantothenate	100	40	120
Biotin	0.5	0.8	2
P – aminobenzene	160	11	-
Choline chloride	2710	2860	5500
Inositol	3000	4500	-

จากที่กล่าวมาจึงเห็นได้ว่ายีสต์เหมาะที่จะเป็นอาหารเพราะมนุษย์รู้จักมานานและเป็นที่ยอมรับ มีอัตราการเจริญเร็ว ไม่เป็นเชื้อโรคและรู้คุณสมบัติทางด้านพันธุกรรมและชีวเคมีเป็นอย่างดีเพราะศึกษานานแล้ว แต่ข้อเสียของยีสต์ก็มีบ้างคือ กรดนิวคลีอิคค่อนข้างสูงประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโปรตีนไม่สูงเท่าแบคทีเรีย

2.8 การยอมรับของผู้บริโภคและความเป็นพิษของโปรตีนเซลล์เดียว

ปัญหาของการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวอยู่ที่ความปลอดภัย คุณค่าทางอาหารและการยอมรับของผู้บริโภค เนื่องจากว่าอาหารที่ทำจากโปรตีนเซลล์เดียวนั้นประกอบด้วยจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่เคยปรากฏว่ามีการใช้หรือยอมรับในรูปอาหารมาก่อน (Beech et al,1985) ก่อนที่นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโปรตีนเซลล์เดียวมาใช้เป็นอาหารสัตว์หรืออาหารมุนษย์ก็ตาม ควรมีการทดสอบเพื่อให้แน่ใจว่าไม่เป็นพิษหรือเป็นอันตรายต่อการบริโภค ซึ่งใช้ในการบริโภคสำหรับมนุษย์นั้น ปริมาณกรดนิวคลีอิคที่มีอยู่ในโปรตีนเซลล์เดียวจะมีความสำคัญมากกว่าการใช้เป็นอาหารสัตว์ พบว่าโปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่เจริญใน ale wort หรือกากน้ำตาล *S. uvarum* ที่เลี้ยงใน beer wort *Candida utilis* ที่เจริญในกากน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาลหรือน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตกระดาษ และ *Kluyveromyces* ที่เลี้ยงในหางนมเป็นโปรตีนเซลล์เดียวที่ปลอดภัยต่อการบริโภคสำหรับมนุษย์ (Reed,1982)

ข้อควรระวังของโปรตีนเซลล์เดียวได้แก่

วัตถุดิบ วัตถุดิบบางชนิดที่ใช้ในการผลิตอาจเป็นสารก่อมะเร็ง เช่น เอ็นพาราฟิน หรือไฮโดรคาร์บอนบางชนิด (Reed,1982;Smith,1988) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า เบเกอร์ยีสต์จากประเทศฝรั่งเศส อังกฤษ และรัสเซีย ยีสต์ที่ใช้เป็นอาหารในยุโรปและยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำมันก๊าซหรือไฮโดรคาร์บอนที่ได้มาจากโรงงานอุตสาหกรรมปิโตรเคมีเหล่านี้มีไฮโดรคาร์บอนอยู่ 13 ชนิด รวมทั้งไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสารก่อมะเร็งด้วย ได้แก่ 3,4 – เบนซ์ไพรีน(3,4 - benzpyrene) 1,2,5,6 – ไดเบนแซนทราซีน (1,2,5,6 - dibenzanthracene) และเมทิลโคแลนทรีน (methylcholanthrene) (Grimmer,1974;Riviere,1977)ถึงแม้ว่าปริมาณของสารที่พบในยีสต์เหล่านี้จะมีอยู่ต่ำกว่า 0.0002 พีพีเอ็ม หรือเพียงเศษหนึ่งในร้อยของที่พบในเนื้อสัตว์รมควันก็ตาม การทดสอบการเกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองก็ยังมีความจำเป็นอยู่มาก(ดุษณี,2537)

สารละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจุลินทรีย์ การใช้ด่างในการสกัดโปรตีนจากจุลินทรีย์อาจมีอันตรายได้ (Lindblom,1973) เนื่องจาก Woodard และ Short(1973) ได้ศึกษาพบว่าด่างที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองนั้น มีสารพิษไลซิโนอะลานิน ซึ่งเป็นอันตรายต่อไตอยู่ด้วย โดยการสกัดโปรตีนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พีเอชสูงกว่า 10 หรือที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พีเอชสูงกว่า 8 จะทำให้เกิดไลซิโนอะลานินบางชนิดได้

การปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Payer(1975) ได้ตรวจพบว่าสารพิษจากสิ่งแวดล้อมสามารถปนเปื้อนมากับสาหร่ายได้ แม้ว่าปริมาณที่พบจะมีน้อยกว่าอาหารชนิดอื่นๆโลหะบางชนิดที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจติดมากับโปรตีนเซลล์เดียวได้ นอกจากกระบวนการผลิตจะต้องถูกสุขลักษณะ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรค หรือจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษด้วย นอกจากการปนเปื้อนของสารพิษและจุลินทรีย์อื่นๆที่ไม่ต้องการแล้ว จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจะต้องไม่เป็นเชื้อโรค หรือสามารถสร้างสารพิษได้ด้วย

นอกจากจะต้องระมัดระวังการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ปริมาณกรดนิวคลีอิคที่มีอยู่ในโปรตีนเซลล์เดียวก็เป็นปัญหาสำคัญของการบริโภคของมนุษย์ เนื่องจากโปรตีนเซลล์เดียวมีปริมาณกรดนิวคลีอิคอยู่สูงกว่าโปรตีนจากพืชและสัตว์ และมนุษย์ไม่มีเอนไซม์ยูเรตออกซิเดส (urate oxidase) หรือยูริเคส (uricase) ดังนั้นการบริโภคกรดนิวคลีอิคจะทำให้ระดับของกรดยูริกในเส้นเลือดสูงขึ้น ซึ่งมีผลทำให้เกิดโรคเก๊าท์ได้ ซึ่งกลุ่ม Protein Advisory Group (PAG) ขององค์การสหประชาชาติจะเป็นผู้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับความปลอดภัย และคุณค่าทางอาหารของโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์เดียว โดยแนะนำว่าค่ากำหนดในการบริโภคกรดนิวคลีอิคจากโปรตีนเซลล์เดียวไม่ควรเกิน 2 กรัมต่อวัน หรือถ้าบริโภครวมกับอาหารอื่นๆก็ต้องไม่เกิน 4 กรัมต่อวัน

การทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์โปรตีนเซลล์เดียวจะต้องทดสอบความเป็นพิษทั้งในระยะสั้นและระยะยาวโดยใช้สัตว์ทดลองหลายชนิดด้วยกัน เพื่อให้แน่ใจว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ปลอดภัยต่อการบริโภค ซึ่งการทดสอบนี้จะต้องใช้ระยะเวลาและค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรตีนเซลล์เดียวส่วนใหญ่มักจะใช้เป็นอาหารสัตว์มากกว่าอาหารมนุษย์ สัตว์ทดลองที่ใช้กันมากในการทดลองความเป็นพิษและคุณค่าของโปรตีนเซลล์เดียว คือ หนู จากการศึกษาของ Worgan(1976) โดยศึกษาถึงอาการเกิดพิษอย่างเฉียบพลันในหนูทดลอง 5 ตัวที่ได้รับเชื้อรา *Fusarium semitectum* ในปริมาณ 40 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าไม่ปรากฏอาการแต่อย่างใด และเมื่อทำการผ่าซากหนูก็พบว่าปกติเช่นกัน นอกจากนี้ยังศึกษาพบว่าไม่เกิดอาการเป็นพิษอย่างเรื้อรัง และการใช้เชื้อรานี้เลี้ยงหมูและไก่ไม่ปรากฏอาการใดๆ เช่นกัน Duthie(1975) ได้ทดลองการนำเชื้อรา *Pennicillium notatum – chrysogenum* มาเลี้ยงหนูและไก่ก็พบว่าไม่ปรากฏอาการเป็นพิษต่อสัตว์แต่อย่างใด และจากการทดลองการนำเชื้อ *Fusarium graminearum* มาใช้เลี้ยงสัตว์เป็นระยะเวลานาน ก็ไม่แสดงอาการเป็นพิษเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีการทดลองเกี่ยวกับการใช้โปรตีนเซลล์เดียวเลี้ยงสัตว์เปรียบเทียบกับอาหารชนิดอื่นๆ พบว่าไก่ที่เลี้ยงด้วย 20 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่เจริญในน้ำมัน จะวางไข่ได้ในปริมาณปกติเช่นเดียวกันกับในหมู ซึ่งพบว่าการใช้โปรตีนเซลล์เดียวเลี้ยงหมูเป็นระยะเวลานาน ก็ไม่ทำให้เกิดอาการเจริญเติบโต การย่อยอาหารหรือการให้น้ำนมผิดปกติแต่อย่างใด และจากการทดลองนำสาหร่าย *Scenedesmus acutus* มาเลี้ยงในปริมาณสูงถึง 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักร่างกาย พบว่าไม่เกิดอาการเป็นพิษแต่อย่างใด นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อให้ปริมาณสาหร่ายสูงถึง 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักหนูขาว หนูขาวจะไม่เกิดอาการแพ้ที่ผิวหนังเช่นกัน

การนำผลิตภัณฑ์โปรตีนเซลล์เดียวมาใช้เป็นแหล่งอาหาร จะต้องนำมาวิเคราะห์หาคุณค่าของอาหารในแง่โปรตีนและกรดอะมิโน วิเคราะห์การย่อยโปรตีน(Protein digestibility) หาสัดส่วนของประสิทธิภาพของโปรตีน (protein efficiency ratio,PER) และหาสัดส่วนของโปรตีนสุทธิ(net protein ratio,NPR) โดยใช้เคซีนเป็นมาตราฐาน(ค่าที่ได้จะเรียกว่า biological value หรือBV) หรือวิเคราะห์หาค่าการใช้โปรตีนสุทธิ(net protein utilization,NPU)เป็นต้น ตัวอย่างเช่นค่า PER ของสาหร่ายจะอยู่ระหว่าง 2.09 – 2.6 ค่า PER ของยีสต์ *C. utilis* จะอยู่ระหว่าง 0.9- 1.4 และค่า PER ของยีสต์ *S. cerevisiae* จะเท่ากับ 1.7 ในขณะที่เคซีนจะมีค่า PER เท่ากับ 2.5 (Bressani,1968;Litchfield,1979) ซึ่ง Young และ Pellett(1991) ได้ให้ความเห็นว่าคุณค่าของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนเพื่อนำมาใช้เป็นอาหารของมนุษย์ และได้เสนอแนะว่าควรมีการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน กรดอะมิโน และการย่อยโปรตีน รวมถึงการหาค่ากรดอะมิโนที่นำมาใช้ได้โดยการใช้สัตว์ทดลองเป็นตัววิเคราะห์และนำมาเปรียบเทียบกับโปรตีนในอาหารอื่นๆ จากการศึกษาถึงคุณค่าของโปรตีนเซลล์เดียวที่เป็นอาหารมนุษย์ เช่น ไมโครโปรตีนจากเชื้อรา *F. graminearum* พบว่าค่า BV จะเป็น 84 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า BV ของโปรตีนในน้ำนมที่มีค่าเท่ากับ 85 และค่าการย่อยโปรตีนและค่า NPU ของเชื้อรานี้เท่ากับ 78 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่นมมีค่าการย่อยโปรตีนเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ และค่า NPU เป็น 80 เปอร์เซ็นต์

มีรายงานเกี่ยวกับการทดลองให้โปรตีนเซลล์เดียวในมนุษย์ พบว่าให้ผลแตกต่างออกไปตั้งแต่อาการปกติ จนถึงอาการไม่สบาย ระบบทางเดินอาหารเป็นพิษ ผิวหนังลอกเป็นเกล็ด และอื่นๆ ซึ่งอาการเหล่านี้จะปรากฏชัดขึ้นในกรณีที่มีการบริโภคโปรตีนเซลล์เดียวในปริมาณมาก ในการศึกษาถึงผลของโปรตีนเซลล์เดียวในมนุษย์ ควรใช้ตัวอย่างอย่างน้อย 25 คน หรือ 50 คน จึงจะเหมาะสม นอกเหนือจากนี้ก็พบว่าการบริโภคโปรตีนเซลล์เดียวสำหรับมนุษย์ส่วนใหญ่สามารถยอมรับได้ อย่างไรก็ดีการใช้โปรตีนเซลล์เดียวเป็นอาหารของมนุษย์ควรนำมาผ่านกรรมวิธีแปรรูปก่อนที่จะนำมาใช้บริโภคจะเป็นการเหมาะสมกว่า

ปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการบริโภคนอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้ว ได้แก่ ผนังเซลล์ที่ย่อยไม่ได้ สีของจุลินทรีย์ที่น่ารังเกียจโดยเฉพาะอย่างยิ่งสีของสาหร่าย และกลิ่นรสที่ไม่พึงปราถนาเช่นในกรณีของสาหร่ายและยีสต์ นอกจากนี้ในการบริโภคเซลล์ควรทำให้เซลล์ตายเสียก่อนเนื่องจากว่าการบริโภคเซลล์ที่มีชีวิตเข้าไป อาจมีผลทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ในลำไส้ และทำให้เกิดการหมักขึ้น ซึ่งมีผลทำให้เกิดสารพิษพวกเอมีน(amine) หรืออาจมีการใช้วิตามินบีในลำไส้มนุษย์ได้ วิธีการฆ่าเซลล์ที่ได้ผลและง่ายคือการใช้หม้อนึ่งอัดไอในการทำลายเซลล์สาหร่าย และการทำให้แห้งของเซลล์ยีสต์และแบคทีเรีย ซึ่งมีผลทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายและเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหาร นอกจากนี้อาจนำเซลล์ของยีสต์มาผสมกับน้ำมันพืชและให้ความร้อนที่ 170 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงแยกเอาเซลล์ออกจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีไขมัน 7 – 15 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 1 – 15 เปอร์เซ็นต์ และมีกลิ่นรสที่ดี

2.9 การลดปริมาณกรดนิวคลีอิค

โดยปกติเซลล์ที่มีอัตราการเจริญสูงจะมีปริมาณกรดนิวคลีอิคอยู่สูง เซลล์จุลินทรีย์จะมีกรดนิวคลีอิกอยู่สูงถึง 8 – 25 กรัมต่อโปรตีน 100 กรัม ยกเว้นเชื้อราที่มีปริมาณต่ำกว่าโปรตีนเซลล์เดียวอื่นๆ ถ้าหากมนุษย์บริโภคโปรตีนจากจุลินทรีย์จะทำให้เกิดกรดยูริก(uric acid) ในเลือดปริมาณมาก ซึ่งไม่สามารถขับออกโดยไตได้ ยังผลให้เกิดการสะสมของผลึกของกรดยูริกตามข้อต่อ

เอกสารนี้ถูกสงวนลิขสิทธิ์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกาย ทำให้เกิดโรคเก๊าท์ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการลดปริมาณกรดนิวคลีอิกในโปรตีนเซลล์เดียว กรดนิวคลีอิกในจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเป็นอาร์เอ็นเอ ได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อใช้ในการควบคุมปริมาณอาร์เอ็นเอในโปรตีนเซลล์เดียว(Sinskey and Batt,1987) เช่น

1 การเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญของเซลล์ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีการเจริญช้าจะมีปริมาณกรดนิวคลีอิกน้อยกว่าจุลินทรีย์ที่มีอัตราการเจริญเร็ว

2 การย่อยกรดนิวคลีอิกโดยใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ เพื่อให้ได้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งสามารถถูกกำจัดออกจากเซลล์ได้โดยการชะล้าง การใช้ด่างในการย่อย เป็นวิธีทางเคมีวิธีหนึ่ง ส่วนการใช้เอนไซม์ RNAase ที่อยู่ภายในเซลล์หรือภายนอกเซลล์จุลินทรีย์นั้นเป็นกระบวนการย่อยทางชีววิทยา

ตัวอย่างการลดปริมาณกรดนิวคลีอิกในเซลล์ของยีสต์โดยกระบวนการทางเคมี ได้แก่

1 การใช้แอมโมเนียเหลว
2 การใช้ด่าง
3 การใช้กรดเกลือต่างๆ
4 การใช้กรดหรือด่าง
5 การใช้กระบวนการ succinylation
6 การใช้กระบวนการ phosphorylation
7 การใช้วิธี sulfitolysis
8 การใช้วิธี reversible acylation

ข้อเสียของการใช้กรดหรือด่างในการลดปริมาณกรดนิวคลีอิกคือ จะทำให้เกิดไลซิโนอะลานิน(lysinoalanine) และผลิตภัณฑ์เป็นพิษอื่นๆ(Litchfield,1991)แต่การนำเซลล์มาทำให้แตกทางกายภาพ เช่น ในกรณีของยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* โดยนำเซลล์มาผ่านความร้อนที่ 85 องศาเซลเซียส พีเอช 10.5 นาน 4 ชั่วโมง จะช่วยลดการเกิดไลซิโนอะลานินให้เหลือเพียง 0.49 กรัมต่อไนโตรเจน 16 กรัม เมื่อเทียบกับการนำเซลล์มาผ่านความร้อนที่ 63 องศาเซลเซียส พีเอช 12.5 นาน 2 ชั่วโมง(ซึ่งจะมีไลซิโนอะลานิน 3.59 กรัมต่อไนโตรเจน 16 กรัม)

การลดปริมาณกรดนิวคลีอิกในเซลล์ของยีสต์โดยการใช้เอนไซม์ ได้แก่

1. การใช้ความร้อน (heat shock) กระตุ้นเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส(ribonuclease) ในเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำงาน เช่น การใช้ความร้อนที่ 68 องศาเซลเซียส กระตุ้นเอนไซม์ของเซลล์ *Candida utilis* แล้วนำมาบ่มที่ 52.5 องศาเซลเซียส จะทำลายกรดนิวคลีอิกได้ หรือการใช้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส กระตุ้นเซลล์ *S. cerevisiae* และนำมาบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดการย่อยตัวเอง เป็นต้น

2. การนำเซลล์มาปรับสภาพที่ 30 องศาเซลเซียส และนำมาผ่านความเย็น (cold shock) ที่ 0 องศาเซลเซียส เพื่อกระตุ้นให้เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส และนำมาบ่มที่ 50 – 55 องศาเซลเซียส การย่อยเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์

3. การย่อยเซลล์ด้วยโซเดียมไฮคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 5.6 และนำมาผ่านความร้อนที่ 50 – 60 องศาเซลเซียส

4. การเติมเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสลงไปเพื่อช่วยย่อยเซลล์ เช่น bovine pancreatic ribonuclease

2.10 ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

1. แหล่งของสับสเตรทที่ใช้ เช่น หางนม กากน้ำตาล แอลกอฮอล์ เป็นต้น

2. พีเอชที่เหมาะสม สำหรับการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ อย่างกรณีของยีสต์พีเอชประมาณ 4.5 –5.5 ซึ่งค่อนข้างเป็นกรด เพื่อยับยั้งไม่ให้ แบคทีเรีย สามารถเจริญได้

3. อุณหภูมิที่เหมาะสม โดยทั่วไปเมื่อมีอุณหภูมิสูงขึ้น จุลินทรีย์สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว แต่เมื่อถึงจุดๆหนึ่ง มันจะลดการเจริญเติบโตลง ดังนั้น ได้มีการศึกษามาแล้วว่าอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับผลิตเป็นการค้า คือ 28 องศาเซลเซียส

4. ความต้องการอากาศของจุลินทรีย์ ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ กรณีของยีสต์ ยีสต์เป็นพวก facultative anaerobe คือสามารถเจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน โดยสภาวะที่มีออกซิเจน ยีสต์จะสามารถออกซิไดส์แหล่งคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำทำให้ปริมาณเซลล์ต่อวัตถุดิบที่ใช้สูง แต่ภายใต้สภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน ยีสต์จะเกิดการหมักวัตถุดิบทำให้เกิดการสะสมของสาร เช่น เอทานอล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

5. ลักษณะการเกิดฟองในการเลี้ยงยีสต์แบบใช้ออกซิเจนมันจะทำให้เกิดฟองขึ้นมากทำให้ออกซิเจนไม่สามารถละลายลงไปในอาหารได้ ดังนั้นจึงต้องมีการกำจัดฟองที่เกิดขึ้น โดยการใช้เครื่องกำจัดฟองอากาศเชิงกล หรือเติมสารกำจัดฟอง เช่น กรดไขมัน กลีเซอรอล เป็นต้น

6. ความปลอดภัยและการยอมรับของผู้บริโภค ซึ่งโปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตได้ จะต้องเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค คือไม่เกิดความเป็นพิษต่อผู้บริโภคนั่นเอง

7. ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ภายในถังหมัก ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ เช่น มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะเกิดเป็นเส้นใยหรือไม่ เป็นต้น

8. ส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ได้ เช่น ปริมาณโปรตีน ปริมาณอาร์เอ็นเอ จะต้องมีอยู่ในปริมาณที่เหมาะสม และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

9. โครงสร้างของผลิตภัณฑ์สุดท้าย

2.11 แนวโน้มการใช้โปรตีนเซลล์เดียวในอนาคต

โปรตีนเซลล์เดียวเป็นอาหารที่มีโปรตีนสูงและสามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลานาน การใช้ประโยชน์หลักของโปรตีนเซลล์เดียว คือ เป็นอาหารสัตว์โดยจะเป็นการทดแทนการใช้วัตถุดิบที่มีโปรตีนเช่น อาหารถั่วเหลือง หรืออาหารปลาป่น การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวค่อนข้างเสียค่าใช้จ่ายสูง กระบวนการผลิตส่วนใหญ่ต้องกระทำภายใต้สภาวะปราศจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ อุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตต้องมีการนำมาทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ โปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตได้จะต้องไม่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคมนุษย์ นอกเหนือจากการใช้โปรตีนเซลล์เดียวเพื่อเป็นอาหารสัตว์ การใช้โปรตีนเซลล์เดียวเพื่อเป็นอาหารมนุษย์ก็มีแนวโน้มที่ดี เช่น *Spirulina* , *Candida utilis* , *Kluyveromyces fragilis* , *Saccharomyces carlsbergensis* , *S. cerevisiae* และ *Fusarium graminearum* สามารถใช้เป็นอาหารโปรตีนที่สำคัญในอนาคต นอกจากนี้สารที่ได้จากการย่อยสลายของเซลล์เหล่านี้ก็ยังสามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารต่างๆได้ด้วย การที่โปรตีนเซลล์เดียวจะมีบทบาทสำคัญในวงการอาหารหรือไม่ ขึ้นอยู่กับการพัฒนากระบวนการผลิตให้ดีขึ้น โดยอาศัยวิศวกรรมเคมีมาใช้ในการพัฒนากระบวนการหมักทางอุตสาหกรรม การลดต้นทุนการผลิต และการพัฒนาคุณภาพของโปรตีนเซลล์เดียวโดยการปรับปรุงสายเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโดยวิธีพันธุวิศวกรรมหรือวิธีดีเอ็นเอเทคโนโลยี ในการลดปริมาณกรดนิวคลีอิคในเซลล์ หรือการปรับปรุงเพื่อให้เซลล์ผลิตกรดอะมิโนเพิ่มมากขึ้น เป็นต้น ซึ่งในอนาคตอันใกล้เป็นที่คาดกันว่าผลิตภัณฑ์อาหารที่มีคุณค่าสูงที่ได้จากโปรตีนจุลินทรีย์ จะมีการนำมาใช้ประโยชน์มากยิ่งขึ้น(ดุษณี,2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์ ใช้เชื้อ *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5057 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ
   - 2.1 อาหาร YM (ยีสต์สกัดร้อยละ 0.3 มอลต์สกัดร้อยละ 0.3 กลูโคสร้อยละ 1.0)
   - 2.2 เวย์ที่ได้จากการผลิตเนยแข็งของโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา
3. เครื่องมือและอุปกรณ์
   - 3.1 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
   - 3.2 เครื่องชั่งชนิด 4 ตำแหน่ง
   - 3.3 เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (spectophotometer)
   - 3.4 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
   - 3.5 เครื่องเขย่า (shaker)
   - 3.6 เครื่องอบลมร้อน (hot air oven)
   - 3.7 เครื่องนึ่งฆ่าเชื่อไอน้ำ (autocarve)
   - 3.8 เดซิเคเตอร์ (desicator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเวย์

วิเคราะห์ค่าซีโอดี ของแข็งแขวนลอย ของแข็งทั้งหมด(ด้วยวิธี AHHA , AWWA และ WPCF(1985)) ค่าพีเอช ปริมาณไขมัน ปริมาณกรดแลคติค ปริมาณน้ำตาลแลคโตส และปริมาณโปรตีน

2. การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

นำเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* จาก Slant 1 ลูป ถ่ายลงใน YM broth ที่มีปริมาตร 50 มล. ใน flask ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ 660 นาโนเมตร ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ค่า OD เป็น 0.5 ด้วย YM broth จะได้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น

3. ศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ*Kluyveromyces marxianus* TISTR 5057ในเวย์

นำเวย์ที่ผ่านการกรองปริมาตร 50 มล. ในflask ขนาด 250 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 2. เติมลง 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร(2.5 มล.) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่า OD ที่ 660 นาโนเมตร โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมงนาน 24 ชั่วโมง หาอัตราการเจริญสูงสุดของเชื้อ

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเวย์

4.1 ศึกษาอัตราการเจือจาง

นำเวย์ที่ผ่านการกรอง มาทำการเจือจางในอัตรา 1:0 1:1 1:2 1:5 (โดยใช้น้ำกลั่นในการเจือจาง) ปริมาตร 50 มล. ใส่flask 250 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 2. เติมลง 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเวย์(2.5 มล.) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่มีอัตราการเจริญสูงสุดที่ได้ศึกษามาจากข้อ 3. นำไปวิเคราะห์หา น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าซีโอดี พีเอช ปริมาณโปรตีน และหาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ

4.2 ศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้น

นำเวย์ที่ผ่านการกรองที่ทำการเจือจางที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.1 ปริมาตร 50 มล ใส่flask 250 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 2. เติมลงในปริมาตร 5 10 15 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเวย์ นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่มีอัตราการเจริญสูงสุดที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาได้จากข้อ 3. นำไปวิเคราะห์หา น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าซีโอดี พีเอช ปริมาณโปรตีน และหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

4.3 ศึกษาพีเอชเริ่มต้น

นำเวย์ที่ผ่านการกรองที่ทำการเจือจางที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ4.1 นำมาปรับพีเอชที่ 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 และ6.0 ปริมาตร 50 มล. ใส่flask 250 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 2. ในปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จาก 4.2 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่มีอัตราการเจริญสูงสุดที่ศึกษาได้จากข้อ 3. นำไปวิเคราะห์หา น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าซีโอดี พีเอช ปริมาณโปรตีนและหาค่าความเป็นกรด- ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม

4.4 ศึกษาอุณหภูมิ

นำเวย์ที่ผ่านการกรองที่ทำการเจือจางที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ4.1 นำมาปรับพีเอชที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.3 ปริมาตร 50 มล ใส่flask ขนาด 250 มล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 2. ในปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จาก 4.2 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่มีอัตราการเจริญสูงสุดที่ศึกษาได้จากข้อ 3. นำไปวิเคราะห์หา น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าซีโอดี พีเอช ปริมาณโปรตีนและหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ

4.5 ศึกษาความเร็วรอบของเครื่องเขย่า

นำเวย์ที่ผ่านการกรองที่ทำการเจือจางที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ4.1 นำมาปรับพีเอชที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.3 ปริมาตร 50 มล ใส่flask ขนาด 250 มล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที นำกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 2. ในปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จาก 4.2 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 150 200 250 รอบต่อนาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 4.4 เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่มีอัตราการเจริญสูงสุดที่ศึกษาได้จากข้อ 3. นำไปวิเคราะห์หา น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าซีโอดี พีเอช ปริมาณโปรตีน และหาความเร็วของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง และ วิจารณ์

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณลักษณะทางกายภาพของเวย์ที่ได้จากการผลิตเนยแข็ง

ผลของการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของเวย์จากการผลิตเนยแข็ง ของโครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา (ตารางที่ 6) พบว่า เวย์ มีพีเอชเท่ากับ 5.1 ค่าซีโอดี 96,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแข็งทั้งหมดเท่ากับ 35,560 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแข็งแขวนลอยเท่ากับ 1,874 มิลลิกรัมต่อลิตร ไขมันร้อยละ 0.625 กรดแลคติกร้อยละ 0.172 น้ำตาลแลคโตสร้อยละ 4.7 โปรตีนร้อยละ 3.06

ตารางที่ 6 ลักษณะของเวย์ที่ได้จากการผลิตเนยแข็ง ของโครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา

พารามิเตอร์	ความเข้มข้น *
พีเอช	5.1
ซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	96,000
ของแข็งทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	35,560
ของแข็งแขวนลอย (มิลลิกรัมต่อลิตร)	1,874
โปรตีน (ร้อยละ)	3.06
กรดแลคติก (ร้อยละ)	0.172
น้ำตาลแลคโตส (ร้อยละ)	4.7
ไขมัน (ร้อยละ)	0.625

* ยกเว้นค่าพีเอช

** เวย์ที่ใช้วิเคราะห์ผ่านการกรองแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

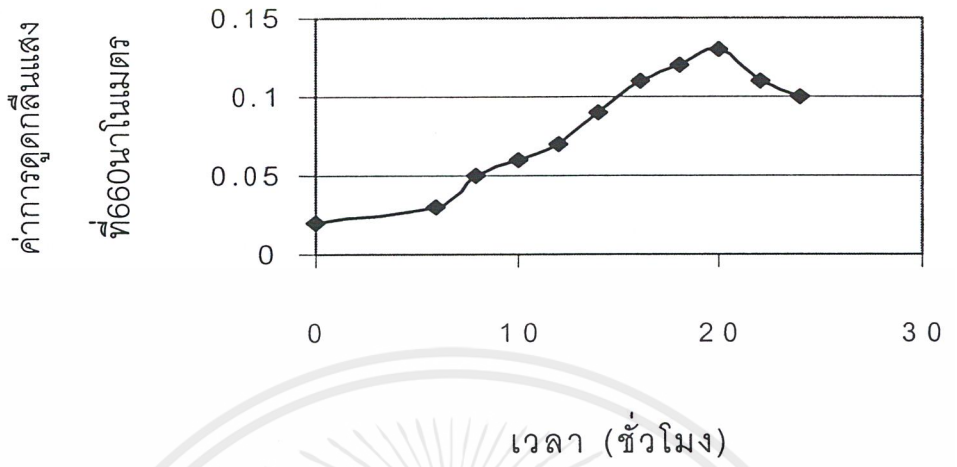
4.2 **การศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ** *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5057 **ในเวย์**

ผลของการเลี้ยงเชื้อ *K. marxianus* TISTR 5057 ในเวย์ (ตารางที่ 7) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 660 และ น้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า *K. marxianus* TISTR 5057 มีอัตราการเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อ 20 ชั่วโมง โดยมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.13 และ น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 8.32 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อมีอัตราการเจริญจำเพาะ(μ) คือ0.08ต่อชั่วโมง

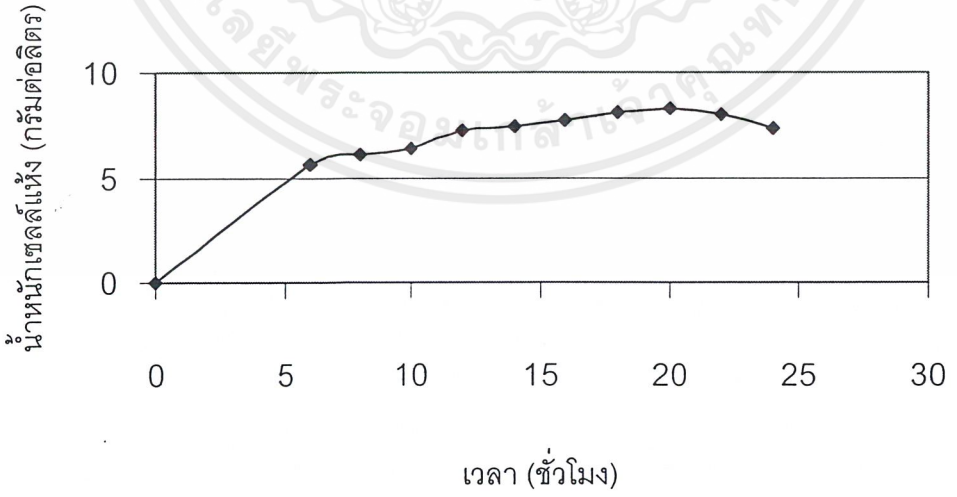
ตารางที่ 7 ผลของการเลี้ยงเชื้อ *K. marxianus* TISTR 5057 ในเวย์

ชั่วโมง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.02	0
6	0.03	5.65
8	0.05	6.12
10	0.06	6.34
12	0.07	7.23
14	0.09	7.45
16	0.11	7.74
18	0.12	8.14
20	0.13	8.32
22	0.11	7.96
24	0.10	7.37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรของ *K. marxianus* TISTR 5057 ที่เลี้ยงในเวย์



รูปที่ 4 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *K. marxianus* TISTR 5057 ที่เลี้ยงในเวย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเวย์ โดย *K. marxianus* TISTR 5057

4.3.1 อัตราการเจือจางเวย์

ผลของการเลี้ยงเชื้อ *K. marxianus* TISTR 5057 ในเวย์ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:0 1:1 1:2 และ 1:5 ภายใต้สภาวะการให้อากาศบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 ชั่วโมง (ตารางที่ 8) พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในเวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น (1:0) เชื้อจะให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 1.37 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่า ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในเวย์ที่อัตราการเจือจาง 1:1 1:2 และ 1:5 โดยที่อัตราการเจือจางเหล่านี้จะมีปริมาณโปรตีน 0.97 0.72 และ 0.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อชนิดนี้ที่ได้จากการใช้เวย์โดยไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น พบว่ามีค่าสูงสุดเช่นกัน โดยพบว่ามีค่า 9.79 กรัมต่อลิตร ที่ 20 ชั่วโมง ขณะที่การใช้เวย์ที่อัตราการเจือจาง 1:1 1:2 และ 1:5 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 5.15 3.75 และ 2.33 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

สำหรับการลดลงของค่าซีโอดีพบว่าให้ผลในทางเดียวกันกับการเพิ่มน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ ที่อัตราการเจือจางเวย์ 1:0 เชื้อสามารถลดค่าซีโอดีได้สูงสุดร้อยละ 86 ขณะที่การใช้เวย์ที่อัตราการเจือจาง 1:1 1:2 และ 1:5 ค่าซีโอดีลดลงร้อยละ 72 61 และ 57 ตามลำดับ และเมื่อนำค่าปริมาณโปรตีน น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าซีโอดีที่ลดลงจากการใช้เวย์ในอัตราการเจือจางต่างๆ มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าเวย์ที่อัตราการเจือจางทั้ง 4 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางภาคผนวกที่ ฉ-1 ฉ-2 และ ฉ-3) ซึ่งผลการทดลองจะสอดคล้องกับการศึกษาของ พงศ์ธร เพียรพิทักษ์ และ สยาม ประเสริฐกุล (2541) ซึ่งได้เลี้ยง *Candida tropicallis* TISTR 5136 ในน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปไก่ โดยพบว่าที่อัตราการเจือจางน้ำทิ้ง 1:0 จะได้น้ำหนักเซลล์แห้ง และการลดลงของค่าซีโอดีสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำทิ้งที่อัตราการเจือจางอื่น จึงได้เลือกใช้เวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่นมาใช้ในการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 อัตราการเจือจางเวย์ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *K. marxianus* TISTR 5057

อัตราการเจือจาง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีน (กรัมต่อลิตร)	พีเอชสุดท้าย	ซีโอดีที่ลดลง (ร้อยละ)
1:0	9.79	1.37	5.3	86
1:1	5.15	0.97	5.2	72
1:2	3.75	0.72	5.2	61
1:5	2.33	0.47	5.3	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 **ปริมาณเชื้อเริ่มต้น**

การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจาก *K. marxianus* TISTR 5057 ในเวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นดังนี้ ร้อยละ 5 ,10 ,15 20 และ 25 พบว่า การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 จะให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 1.32 กรัมต่อลิตร ขณะที่การใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 10 20 และ 25 จะให้ปริมาณโปรตีน 0.91 1.01 0.63 0.65 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อชนิดนี้ที่ได้จากการใช้เวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น และ ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 จะมีค่าสูงสุดเช่นกัน โดยพบว่ามีค่า 12.66 กรัมต่อลิตรที่ 20 ชั่วโมง ขณะที่การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 10 20 และ 25 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 9.63 9.72 9.62 และ 9.64 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับค่าซีโอดีที่ลดลง โดยพบว่าการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 เชื้อสามารถลดค่าซีโอดีของเวย์ได้สูงสุดร้อยละ 79 ขณะที่การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 10 20 และ 25 ลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 60 62 52 53 ตามลำดับ เมื่อนำค่าเหล่านี้มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 ปริมาณโปรตีน น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าซีโอดีที่ลดลงจะแตกต่างทางสถิติกับการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 10 20 และ 25 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางภาคผนวก ฉ-4 ฉ-5 และ ฉ-6) จึงเลือกใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 ในการศึกษาต่อไป ขณะที่การศึกษาของ พันธ์ณรงค์ จันทร์แสงศรี (2542) ซึ่งได้เลี้ยง *K . fragilis* TISTR 5057 ในเวย์ พบว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 20 จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด

ตารางที่ 9 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ เชื้อ *K. marxianus* TISTR 5057 ที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละ)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีน (กรัมต่อลิตร)	พีเอชสุดท้าย	ซีโอดีที่ลดลง (ร้อยละ)
5	9.63	0.91	5.8	60
10	9.72	1.01	5.75	62
15	12.66	1.32	5.75	79
20	9.62	0.63	5.85	52
25	9.64	0.65	5.8	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 **พีเอชเริ่มต้น**

จากการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจาก *K.marxianus* TISTR 5057 ในเวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 โดยมีพีเอชเริ่มต้นดังนี้ 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.0 จะให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ 1.57 กรัมต่อลิตร ขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 3.0 3.5 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 จะให้ปริมาณโปรตีน 0.48 1.11 1.05 0.73 0.97 และ 0.89 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อชนิดนี้ที่ได้จากการใช้เวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น และ ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 ที่พีเอชเริ่มต้น 4 จะมีค่าสูงสุดเช่นกัน โดยพบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้ง 9.69 กรัมต่อลิตร ที่ 20 ชั่วโมง ขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 3.0 3.5 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 4.84 8.86 8.57 8.54 8.72 และ 7.88 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับค่าซีโอดีที่ลดลง โดยพบว่าที่พีเอช 4.0 เชื้อสามารถลดค่าซีโอดีของเวย์ได้สูงสุด ร้อยละ 71 ส่วนที่พีเอช 3.0 3.5 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 เชื้อสามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 29 60 49 45 53 และ 32 ตามลำดับ เมื่อนำค่าเหล่านี้มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าที่พีเอชเริ่มต้น 4.0 จะให้ปริมาณโปรตีน และ ค่าซีโอดีที่ลดลง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้พีเอชเริ่มต้นอื่น (ตารางภาคผนวกที่ ฉ-7 ฉ-8 และ ฉ-9) จึงได้เลือกใช้พีเอชเริ่มต้น 4.0 ในการศึกษาต่อไป จากการทดลองของ พันธ์ณรงค์ จันทร์แสงศรี (2542) ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเวย์ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวน โดยใช้ *K. fragilis* TISTR 5057 พบว่าพีเอชเริ่มต้น 5.0 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อนี้ และโดยทั่วไปเซลล์ยีสต์สามารถมีชีวิตอยู่ได้ภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่าง ต่างๆตั้งแต่ 3.6 ถึง 6.0 อย่างไรก็ตาม ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์อยู่ระหว่าง 4.5-5.0 การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรด-ด่างต่ำมากๆ จะทำให้เซลล์ยีสต์ดูดซับวัตถุให้สีส่งผลให้มวลเซลล์ที่ได้มีสีเข้ม (Reed และ Nagodawithana ,1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 พีเอชที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *K. marxianus* TISTR 5057

พีเอชที่ปรับ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีน (กรัมต่อลิตร)	พีเอชสุดท้าย	ซีโอดีที่ลดลง (ร้อยละ)
3.0	4.84	0.48	4.1	29
3.5	8.86	1.11	4.7	60
4.0	9.69	1.57	5.3	71
4.5	8.57	1.05	5.7	49
5.0	8.54	0.73	6.0	45
5.5	8.72	0.97	6.2	53
6.0	7.88	0.89	6.3	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 **อุณหภูมิ**

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจาก *K. marxianus* TISTR 5057 ในเวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเริ่มต้น 4.0 พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *K.marxianus* TISTR 5057 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ 1.60 กรัมต่อลิตร ขณะที่การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณโปรตีน 0.83 และ 1.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อชนิดนี้เมื่อเลี้ยงในเวย์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าสูงสุดเช่นกัน โดยพบว่ามีค่า 9.7 กรัมต่อลิตร ที่ 20 ชั่วโมง ขณะที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ35 องศาเซลเซียสน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 7.88 และ 8.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับค่าซีโอดีที่ลดลง พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 76 ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส สามารถลดค่าซีโอดีได้ ร้อยละ 65 และ 71 ตามลำดับ เมื่อนำค่าเหล่านี้มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส สำหรับปริมาณโปรตีน และค่าซีโอดีที่ลดลงจากการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจะให้ปริมาณโปรตีนและค่าซีโอดีที่ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ไม่แตกต่างกับการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (ตารางภาคผนวกที่ ฉ-10 ฉ-11 และ ฉ-12) จึงได้เลือกใช้การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไว้ศึกษาต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ John และคณะ (1975) โดยเลี้ยง *Saccharomyces fragilis* ในถังหมัก และใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อนี้ คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.0 จะให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด

ตารางที่ 11 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *K. marxianus* TISTR 5057

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีน (กรัมต่อลิตร)	พีเอชสุดท้าย	ซีโอดีที่ลดลง (ร้อยละ)
25	7.88	0.83	4.1	65
30	9.7	1.60	4.9	76
35	8.6	1.34	4.45	71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.5 ความเร็วรอบ

จากการศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจาก *K. marxianus* TISTR 5057 ในเวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเริ่มต้น 4.0 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ 1.62 กรัมต่อลิตร ขณะที่การเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเร็วรอบ 150 ,250 และ 300 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณโปรตีน0.75 0.78 0.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีจะมีค่าสูงสุด คือ 9.78 กรัมต่อลิตร ขณะที่การเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเร็วรอบ 150 250 และ 300 รอบต่อนาที จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.96 6.83 7.43 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าซีโอดีที่ลดลง พบว่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเชื้อสามารถลดค่าซีโอดีของเวย์ได้สูงสุด ร้อยละ 76 ส่วนที่ความเร็วรอบ 150 250 และ 300 รอบต่อนาที สามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 60 76 และ 73 ตามลำดับ เมื่อนำค่าเหล่านี้มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จะมีปริมาณโปรตีน และน้ำหนักเซลล์แห้ง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้ความเร็วรอบอื่นๆ แต่ค่าซีโอดีที่ลดลง จะไม่แตกต่าง กับการใช้ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที (ตารางภาคผนวกที่ ฉ-13 ฉ-14 และ ฉ-15) จึงได้เลือกใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ไว้ศึกษา

ตารางที่ 12 ความเร็วรอบที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจาก *K. marxianus* TISTR 5057

ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีน (กรัมต่อลิตร)	พีเอชสุดท้าย	ซีโอดีที่ลดลง (ร้อยละ)
150	5.96	0.75	4.7	60
200	9.78	1.62	4.2	76
250	6.83	0.78	4.35	67
300	7.43	0.81	5.1	73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์ที่ผลิตได้

จากการเลี้ยง *K. marxianus* TISTR 5057 ในเวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น ร้อยละ 15 ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็วรอบในการเลี้ยงเชื้อ 200 รอบต่อนาที (ตารางที่ 13) พบว่า จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะดังกล่าว เซลล์ยีสต์ที่ได้จะมีปริมาณโปรตีน ร้อยละ 31.68 (น้ำหนักเปียก) และ ไขมันร้อยละ 19.02 (น้ำหนักเปียก) ขณะที่โปรตีนในถั่วเหลือง (น้ำหนักเซลล์แห้ง) มีร้อยละ 29.75 และไข่ไก่ทั้งฟอง (น้ำหนักเปียก) มีร้อยละ 20.56

ตารางที่ 13 องค์ประกอบทางเคมีของเชื้อ *K. marxianus* TISTR 5057 ที่เลี้ยงในเวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ร้อยละ 15 ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็วรอบในการเลี้ยงเชื้อ 200 รอบต่อนาที

องค์ประกอบทางเคมี	ความเข้มข้น (ร้อยละ)
โปรตีน	31.68
ไขมัน	19.02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง และ ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการนำเวย์ที่ได้จากขบวนการผลิตเนยแข็งมาใช้เลี้ยง *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5057 เพื่อผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว พบว่า *K. marxianus* TISTR 5057 มีอัตราการเจริญสูงสุดในเวย์ที่ชั่วโมงที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง และมีอัตราการเจริญสูงสุด 0.08 ต่อชั่วโมง

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *K. marxianus* TISTR 5057 ในเวย์ โดยศึกษาอัตราการเจือจางเวย์ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนดังนี้ 1:0 1:1 1:2 และ 1:5 พบว่า การใช้เวย์โดยไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น จะให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ 1.37 กรัมต่อลิตร ขณะที่การใช้เวย์ที่อัตราการเจือจาง 1:1 1:2 และ 1:5 จะให้ปริมาณโปรตีน 0.97 0.72 และ 0.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อชนิดนี้ที่ได้จากการใช้เวย์โดยไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น พบว่ามีค่าสูงสุดเช่นกัน โดยพบว่ามีค่า 9.79 กรัมต่อลิตร ที่ 20 ชั่วโมง ขณะที่การใช้เวย์ที่อัตราการเจือจาง 1:1 1:2 และ 1:5 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 5.15 3.75 และ 2.33 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การใช้เวย์โดยไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น สามารถลดค่าซีโอดีได้สูงสุดร้อยละ 86

เมื่อนำปริมาณโปรตีนและน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าซีโอดีที่ลดลง ที่ได้จากการใช้เวย์ในอัตราการเจือจางต่างๆ มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจาก *K. marxianus* TISTR 5057 ในเวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นดังนี้ ร้อยละ 5 10 15 20 และ 25 พบว่า การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 จะให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 1.32 กรัมต่อลิตร ขณะที่การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 10 20 และ 25 จะให้ปริมาณโปรตีน 0.91 1.01 0.63 และ 0.65 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อชนิดนี้ที่ได้จากการใช้เวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น และ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 จะมีค่าสูงสุดเช่นกัน โดยพบว่ามีค่า 12.66 กรัมต่อลิตรที่ 20 ชั่วโมง ขณะที่การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 10 20 และ 25 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 9.63 9.72 9.62 และ 9.64 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ15 สามารถลดค่าซีโอดีได้สูงสุดร้อยละ 79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำปริมาณโปรตีน น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าซีโอดีที่ลดลง ที่ได้จากการใช้เวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น และใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในปริมาณต่างๆ มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับค่าความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจาก *K.marxianus* TISTR 5057 ในเวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 โดยมีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้ 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.0 จะให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ 1.57 กรัมต่อลิตร ขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 3.0 3.5 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 จะมีปริมาณโปรตีน 0.47 1.11 1.08 0.73 0.97 และ 0.89 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อชนิดนี้ที่ได้จากการใช้เวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น และ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 ที่พีเอชเริ่มต้น 4 จะมีค่าสูงสุดเช่นกัน โดยพบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้ง 9.69 กรัมต่อลิตร ที่ 20 ชั่วโมง ขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 3.0 3.5 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 4.84 8.86 8.57 8.54 8.72 และ 7.88 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับซีโอดีที่ลดลง พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0 สามารถลดค่าซีโอดีได้สูงสุดเช่นกัน คือร้อยละ 71

เมื่อนำค่าเหล่านี้มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.0 จะมีโปรตีน น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าซีโอดีที่ลดลง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้พีเอชเริ่มต้นต่างๆ

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจาก *K.marxianus* TISTR 5057 ในเวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเริ่มต้น 4.0 พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *K.marxianus* TISTR 5057 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ 1.60 กรัมต่อลิตร ขณะที่การเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 และ35 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณโปรตีน 0.83 และ1.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อชนิดนี้เมื่อเลี้ยงในเวย์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าสูงสุดเช่นกัน โดยพบว่ามีค่า 9.7 กรัมต่อลิตร ที่ 20 ชั่วโมง ขณะที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 7.88 และ 8.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การเลี้ยงเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส สามารถลดค่าซีโอดีได้สูงสุดเช่นกัน คือ ร้อยละ 76 เมื่อนำค่าเหล่านี้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะได้น้ำหนักเซลล์แห้ง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส สำหรับปริมาณโปรตีนและค่าซีโอดีที่ลดลง พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ปริมาณโปรตีนและค่าซีโอดีที่ลดลง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ไม่แตกต่างกับการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจาก*K.marxianus* TISTR 5057 ในเวย์ที่ไม่เจือจางด้วยน้ำกลั่น ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเริ่มต้น 4.0 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ 1.62 กรัมต่อลิตร ขณะที่การเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเร็วรอบ 150 250 และ 300 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณโปรตีน 0.75 0.78 และ 0.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีจะมีค่าสูงสุด คือ 9.78 กรัมต่อลิตร ขณะที่การเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเร็วรอบ 150 250 และ 300 รอบต่อนาที น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เท่ากับ 5.96 6.83 และ 7.43 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับค่าซีโอดีที่ลดลง พบว่า การใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เชื้อสามารถลดค่าซีโอดีได้สูงสุดร้อยละ 76 เมื่อนำค่าเหล่านี้มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า การใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จะมีปริมาณโปรตีน และน้ำหนักเซลล์แห้ง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้ความเร็วรอบอื่นๆ แต่ค่าซีโอดีที่ลดลง จะไม่แตกต่างกับการใช้ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว จากเวย์โดยใช้ *K.marxianus* TISTR 5057 พบว่า การใช้เวย์ที่ไม่เจือจางน้ำกลั่น เติมปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 4.0 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเลี้ยง 200 รอบต่อนาที และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะดังกล่าวจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 9.78 กรัมต่อลิตร ขณะเดียวกันสามารถลดค่าซีโอดีในเวย์ได้ร้อยละ 76 เมื่อนำยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมาวิเคราะห์องค์ประกอบ พบว่า มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 31.68 (น้ำหนักเปียก) (ไข่ไก่ มีโปรตีนร้อยละ 20.56 ถั่วเหลือง มีโปรตีนร้อยละ 29.75) ไขมันร้อยละ 19.02 (น้ำหนักเปียก)

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

1. ควรมีการศึกษาการเติมแหล่งแร่ธาตุต่างๆ ที่เหมาะสมลงในเวย์ เพื่อทำให้การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ดีขึ้น
2. ควรมีการศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากวัตถุดิบชนิดอื่น ๆ
3. ควรจะมีการศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ดวงพร คันธโชติ.2530.จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.: ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮ้าส์. กรุงเทพฯ

ดวงใจ โอชัยกุล, ประกายวัน สุรินทร์ศิริรัฐ,ปัญจพร สฤษดิชัยนันทา และรัชนีวัลย์ กลิ่นกลบ.2544. การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปไก่โดย *Candida tropicalis* TISTR 5136.วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง :14 - 21

ดุษณี ธนะบริพัฒน์,2537. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่2.โครงงานตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Altas,R.M.1989. Microbiology.Fundamentals and Applications. 2nd ed. Macmillan Publishing Company ,New York.

A.O.A.C.1990. Official of the Association of Official Chemical. The Association of Official Analytical Chemical. Washington D.C.

APHA, AWWA and WPCF. 1985. Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 16th ed. American Public Health Association. Washington D.C.

Bressini, R. 1968. The use of yeast in human foods. In Single Cell Protein , pp. 90 – 121 Edited by R. I. Mateles and S. R. Tannenbaum. TIM Press, Cambridge, Mass.

John, W and Sons. 2001.Alcohol Production from Cheese Whey Perneate Using Genetically Modified Flucculent Yeast Cells. Biotech. and Bioeng. 72: 508 – 514.

Korasic, N. 1972. In Food from Waste. Edited by G. G. Birch, K. J. Parker and J. T. Worgan. Applied Science Publishers Ltd.,London

Lindblom, M. 1974. The influence of alkali and heat treatment on yeast protein. Biotech. Bioeng. 16(11) : 1495 – 1506.

Litchfild, J. H. 1979. Production of Single Cell Protein for ues in food or feed. In Microbial Technology , Vol 1, pp. 93 – 155. 2nd ed. Edited by H. J. Peppler and D. Perlman.Academic Press, New York.

Payer, H. P. 1975. The contamination of micro-algae with some environmental toxins. In Symposium Microbial Production of Protein. Edited by F. Wagner. Verlag. Chemie, Weinheim, W. Germany.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peppler, H. J. 1978. Yeast. In Annual Report Ferment Process 2, pp. 191 – 202. Edited by D.Perlman and G. T. Tsao. Academic Press, New York.

Piror, B. A. 1984. Continous growth kinetics of *Candida utilis* in pineapple cannery effluent. Biotech. Bioeng. 26: 748 – 752

Pong, V and John, E. Kinsella. 1975.Production of Yeast Protein from Crude Lactose By *Saccharomyces fragilis*. Batch Culture Studies. Journal of Food Science. 40 :331-341.

Rale, V. B. 1984. SCP from pineapple (*Ananas sativa*.) cannery effuents. J. App. Microbiol. Biotech. 19: 106 – 109.

Rale, V. B. 1985. Production of feed yeast and yeast enriched livestock feed from cashew apple. MIRCEN J. 1: 205 – 211

Reed, G. 1982. Microbial biomass, single cell protein and other microbial products. In Presscolt and Dunn's Industrial Microbiology. 4th ed. Edited by G. Reed. AVI, Westport, Connecticut.

Sell, J. L.,Ashraf, M. and Bales, G. L. 1981. Nutrition Reports Int. 24: 229.

Senze, J. C. 1972. In protein from Hydrocarbon. Edited by H. G. de Pontanel. Academic Press, London.

Sinskey, A. J. and Batt, C. A. 1987. Fungi as a source of protein. In food and Beverage Mycology, pp. 435 – 471. 2nd ed. Edited by L. R. Beuchat. AVI, New York.

Woodard, J. C. and Short, D. D. 1973. Toxicity of alkai treated soy protein in rats. J. Nut.103 (4), 569-574

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อาหารสูตร YM

ประกอบด้วย

มอลต์สกัด	3	กรัม
ยีสต์สกัด	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

วิธีการวิเคราะห์คุณลักษณะน้ำเสีย

1.ซีโอดี (APHA,AWWA and WPCF, 1985)

วัสดุอุปกรณ์

1.อุปกรณ์กลั่นไหลกลับ

-ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร

-เครื่องควบแน่น

-เตาให้ความร้อน (hot plate)

2.บิวเรต

สารเคมี

1.สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.025 นอร์แมล

ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ซึ่งอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 12.259 กรัมในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟามิก ($NH_2 SO_3H$) 0.12 กรัม แล้วเจือจางจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2.Sulfuric acid reagent

ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 22 กรัม ในกรดซัลฟูริกเข้มข้น บรรจุขวดขนาด 1 ปอนด์ (2.65 ลิตร) เนื่องจากซิลเวอร์ซัลเฟตละลายยากมาก อาจต้องใช้เวลา 1-2 วัน จึงจะละลายหมด

3.สารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียซัลเฟตเข้มข้น 0.10 นอร์แมล

3.1 การเตรียมสารละลาย

ละลายเฟอรัสแอมโมเนียซัลเฟต $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$ จำนวน 39 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.2 การหาความเข้มข้นของสารละลาย

ปิเปตสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต (0.25 นอร์แมล) จำนวน 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร ทิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไว้ให้เย็น ไทเทรต ด้วยสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต เติมเฟอร์โรอิน 2-3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์

ความเข้มข้น (นอร์แมล) = $\frac{\text{ปริมาณสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (มล.)} * 0.25}{\text{ปริมาณสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มล.)}}$

4.สารละลายเฟอร์โรอิน

ละลาย 1-10 พีแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_6N_2.H_2O$) จำนวน 1.485 กรัม และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) จำนวน 0.695 กรัม เติมน้ำจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5.ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) ชนิดผง

6.เมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$) ชนิดผลึกบริสุทธิ์ หรือเป็นผง ใช้เป็นตัวกำจัดอนุภาคคลอไรด์ในอัตราส่วน $HgSO_4$ ต่อ Cl^- = 10:1

7.กรดซัลฟามิก (Sulfamic acid) ใช้ในกรณีที่กำจัดไนไตรท์เท่านั้น

วิธีการวิเคราะห์

1.เติมเมอร์คิวรีซัลเฟต 0.4 กรัม ลงในขวดกลม

2.เติมตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร หรือส่วนของตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มิลลิลิตร

3.เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร และลูกแก้ว (glass bead) 3-5 เม็ด

4.ค่อยๆเติม sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อละลายเมอร์คิวรีซัลเฟต ควรทำให้เย็นขณะเขย่า เพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียของสารที่เป็นไอในตัวอย่าง (อาจแช่ในอ่างน้ำ)

5.กลั่นด้วยอุปกรณ์กลั่นไหลกลับประมาณ 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น

6.ไทเทรตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เกินพอ ด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอร์โรอินเป็นอินดิเดเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากเขียวปนน้ำเงินไปเป็นน้ำตาลปนแดง

7.ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างน้ำ ทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง (ข้อ1-6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร) = $\frac{(A-B) * N * 8 * 1,000}{\text{ปริมาณตัวอย่าง (มล.)}}$

A คือ ปริมาณสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต blank

B คือ ปริมาณสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์แมล)

รูปภาคผนวกที่ 1 อุปกรณ์กลั่นไหลกลับ

2.ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl method (A.O.A.C.,1990)

วัสดุอุปกรณ์

1.ขวดย่อยโปรตีน (Kjeldahl flask) ขนาด 250-300 มิลลิลิตร

2.อุปกรณ์ให้ความร้อน (Heating mentle)

3.อุปกรณ์กลั่นโปรตีน (Semi – micro distillation)

4.ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร

5.ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร

6.ปิเปต

7.บิวเรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.ลูกแก้ว (glass bead)

9.กระดาษกรอง

สารเคมี

1.โซเดียมซัลเฟต

2.เมอร์คิวรีซัลเฟต

ละลายผงเมอร์คิวรีออกไซด์จำนวน 10 กรัม ในกรดซัลฟูริกเข้มข้น จำนวน 12 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำ 92 มิลลิลิตร

3.กรดซัลฟูริกเข้มข้น

4.โซเดียมไฮดรอกไซด์ 60 กรัม และโซเดียมไธโอซัลเฟต 5 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5.กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4

6.กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์แมล

7.อินดิเคเตอร์

ละลายเมธิลเรด 0.2 กรัม และเมทิลีนบลู 0.1 กรัม ในเอทานอล (95%) 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1.ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ประมาณ 0.5-1.0 กรัม ห่อให้มิดชิด ใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน

2.เติมโซเดียมซัลเฟต 2 กรัม และเมอร์คิวรีซัลเฟต 5 มิลลิลิตร

3.ใส่ลูกแก้ว

4.เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร

5.ย่อยบนอุปกรณ์ให้ความร้อน จนกระทั่งได้สารละลายใส

6.ปล่อยทิ้งให้เย็น

7.ล้างบริเวณคอขวดด้วยน้ำกลั่นที่ต้มร้อนจนทั่ว

8.ย่อยต่อจนกระทั่งหมดควัน

9.ทิ้งให้เย็นแล้วถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นล้างขวดย่อยให้หมดสารละลายตัวอย่าง แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

10.จัดอุปกรณ์กลั่นรวมทั้งเปิดสวิทซ์ไฟ และเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11.นำขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ 1-2 หยด เรียบร้อยแล้ว ไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้

12.เติมสารละลายตัวอย่างปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง

13.เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 60 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง

14.กลั่นนานประมาณ 10 นาที

15.ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์แมล จนกระทั่งสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง

16.ทำ blank ตามข้อ 1-14 โดยไม่ใส่ตัวอย่าง

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ) = $\frac{(A-B) * N * 14}{W}$

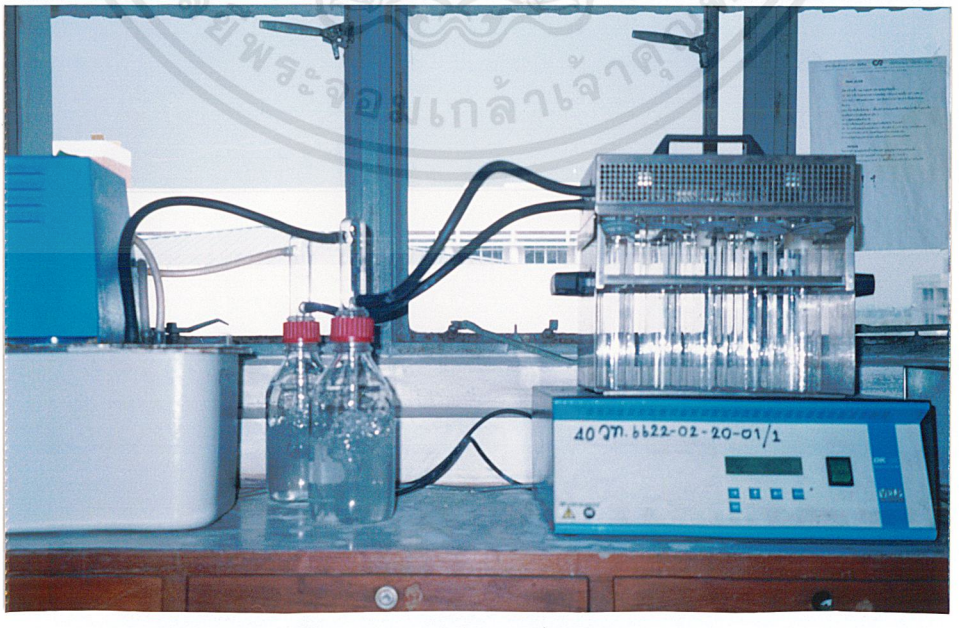
A คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง

B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริก (นอร์แมล)

กรณีคิดเป็นปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) คูณด้วย 6.25



รูปภาคผนวกที่ 2 เครื่องย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปภาคผนวกที่ 3 เครื่องกลั่น

3.ของแข็งทั้งหมด (Total solids) (APHA,AWWA and WPCF,1985)

วัสดุอุปกรณ์

1.ถ้วยกระเบื้องสำหรับระเหย

2.ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 103 องศาเซลเซียส

3.อ่างไอน้ำ

4.เดซิกเคเตอร์

5.เครื่องชั่งน้ำหนักชนิด 4 ตำแหน่ง

วิธีการวิเคราะห์

1.นำถ้วยระเหยล้างให้สะอาด อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2.ตวงตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่า ใส่ลงในถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

3.นำไประเหยให้แห้งในอ่างน้ำ

4.อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5.ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ประมาณ 45 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.ชั่งน้ำหนัก

ของแข็งทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร) = $\frac{\text{น้ำหนักของแข็ง (มิลลิกรัม)} * 1,000}{\text{มิลลิลิตรตัวอย่าง}}$

4.ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total suspended solids) (APHA,AWWA and WPCF,1985)

วัสดุอุปกรณ์

1.Glass fiber filter disks (Whatman GF/C,5.5 ซม.)

2.Gooch crusible

3.เครื่องดูดสุญญากาศ

4.ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 103 องศาเซลเซียส

5.เดซิเดเตอร์

6.เครื่องชั่งน้ำหนักชนิด 4 ตำแหน่ง

วิธีการวิเคราะห์

1.วางกระดาษกรองใน gooch crusible ผ่านน้ำกลั่นลงไปใช้เครื่องดูดอากาศ ดูดให้แห้ง นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องในเดซิเคเตอร์

3.ชั่งน้ำหนัก

4.นำ gooch crusible ที่เตรียมไว้ใส่ในเครื่องดูดสุญญากาศ ทำกระดาษกรองให้เปียกด้วยน้ำกลั่น เปิดเครื่องสุญญากาศ

5.วัดปริมาตรตัวอย่างสำหรับตัวอย่างที่มีสารแขวนลอยมากทำให้การกรองช้า ให้เลือกปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ซึ่งจะเท่ากับ 14 มิลลิลิตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เติมตัวอย่างลงไปใน gooch crusibleแล้วกรอง

6.ล้างด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 10 มิลลิลิตร 3 ครั้ง

7.ใช้เครื่องดูดอากาศดูดจนแห้ง

8.นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส

9.ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์

10.ชั่งน้ำหนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด = $\frac{\text{น้ำหนักของแข็ง (มิลลิกรัม)} * 1,000}{\text{มิลลิลิตรตัวอย่าง}}$

5.ปริมาณไขมัน (A.O.A.C.,1990)

วัสดุอุปกรณ์

1.กรวยแยก ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.บีกเกอร์ ขนาด 100 125 และ 250 มิลลิลิตร

3.เครื่องชั่งน้ำหนักชนิด 4 ตำแหน่ง

4.เดซิเคเตอร์

5.คีมคีบ

6.อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

7.ตู้อบความร้อนแห้ง

สารเคมี

1.เอทิลอีเทอร์

2.ปิโตรเลียมอีเทอร์

3.แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์

4.ฟีนอฟทาลีน 0.5 %

ชั่งฟีนอฟทาลีนอินดิเคเตอร์ 0.5 กรัม ละลายด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ และ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1.ปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ลงกรวยแยก เติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.เติมฟีนอฟทาลีน 3 หยด เพื่อช่วยให้เห็นชั้นของสารละลาย เติมเอทิลแอลกอฮอล์ 10 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก ปิดจุกและเขย่านาน 15 นาที

3.เติมเอทิลอีเทอร์ 25 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่าอย่างแรง 1 นาที แล้วเปิดจุกกรวยแยกเพื่อลดความดัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ 25 มิลลิลิตร ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ทำการถ่ายชั้นสารผสมอีเทอร์ (ชั้นของเหลวสีชมพู) ลงในบีกเกอร์

5.ทำการสกัดครั้งที่ 2 โดยเติมเอทิลแอลกอฮอล์ 5 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยกปิดจุกเขย่านาน 15 นาที

6.เติมเอทิลอีเทอร์ 15 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่าอย่างแรง 1 นาที และเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ 15 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่าอย่างแรง 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ถ่ายชั้นสารผสมอีเทอร์ลงในบีกเกอร์ใบเดิม

7.ทำการระเหยสารผสมอีเทอร์ โดยตั้งบีกเกอร์บนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 100 องศาเซลเซียส (ทำในตู้ควัน) จนแห้ง แล้วนำไปอบในตู้อบความร้อนแห้งที่ 100 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส (มากกว่า หรือ เท่ากับ 30 นาที) แล้วนำไปไว้ในเดซิเคเตอร์ นำไปชั่งน้ำหนัก

8.นำไปอบอีกครั้ง ชั่งน้ำหนักจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ หรือผลต่างค่าน้ำหนักคือ $\pm$ 0.005 กรัม

9.บีกเกอร์ที่อบไขมันเสร็จแล้วนำไปล้างไขมันออกด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ แล้วอบในตู้อบความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที ปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์นาน 30 นาที ชั่งน้ำหนัก

10.ทำคู่ blank ทุกครั้ง โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง โดย blank ที่ได้ควรมีสารตกค้างน้อยกว่า 0.002 กรัม

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{(C - A) - B * 100}{W}$$

A คือ น้ำหนักบีกเกอร์เปล่า (กรัม)

B คือ น้ำหนักของ blank (กรัม)

C คือ น้ำหนักบีกเกอร์รวมกับไขมัน (กรัม)

W คือ ปริมาณตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

6.ปริมาณกรดแลคติก (A.O.A.C.,1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์

1.ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.ขวดสีชา ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.ขวดปรับปริมาตร ขนาด1,000 มิลลิลิตร

4.บิวเรต

5.เครื่องชั่งน้ำหนักชนิด 4 ตำแหน่ง

สารเคมี

1.น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์

นำน้ำกลั่นต้มให้เดือดนาน 20 นาที 500 มิลลิลิตร

2.สารละลายฟีนอฟธาลีน

ชั่งฟีนอฟธาลีน 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ (95%) 100 มิลลิลิตร

3.สารละลายมาตรฐาน0.1 นอร์แมล โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดแก้วที่กันคาร์บอนไดออกไซด์ และเป็นแก้วที่ทนด่าง ก่อนนำมาใช้ให้นำมาหาความเข้มข้นก่อน โดยชั่ง แอซิดโพแทสเซียมพาธาเลท (Potassium hydrogen phathalate $COOH.C_6H_4.COOK$ analytical reagent) อบให้แห้ง 2 ชั่วโมง ที่ 120 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นลงในเดซิเคเตอร์ ชั่งอย่างละเอียด 0.3 กรัม เติมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 90-100 มิลลิลิตร เติมสารละลายพีนอฟธาลีน 3 หยด แล้วไทเทรตด้วยสารละลาย 0.1 นอร์แมล โซเดียมไฮดรอกไซด์

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (N)} = \frac{\text{กรัมของ } COOH.C_6H_4.COOK * 1,000}{\text{มิลลิลิตรของNaOH} * 204.22}$$

วิธีการวิเคราะห์

1.นำตัวอย่าง 10 กรัม เจือจางด้วยน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 100 มิลลิลิตร

2.เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด

3.ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 นอร์แมล โซเดียมไฮดรอกไซด์ จนกระทั่งถึงจุดยุติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณกรดแลคติก (ร้อยละ) = $\frac{\text{มิลลิลิตรของ NaOH} * \text{N ของ NaOH} * 90.08 * 100}{100 * 10}$

7.ปริมาณน้ำตาลแลคโตส (Shaffer และ Hartmann's , 1920-1921)

อุปกรณ์

1.บีกเกอร์ขนาดต่างๆ

2.ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร

3.หลอดทดลอง ขนาด 50 มิลลิลิตร

4.อ่างน้ำเดือด

สารเคมี

1.คอมไบไมโครรีเอเจนท์ (Combine micro reagent)

ชั่ง	- คอปเปอร์ซัลเฟต	($CuSO_4.5H_2O$)	5	กรัม
	- กรดทาร์ทาริก	(Tartaric acid)	7.5	กรัม
	- โซเดียมคาร์บอเนต	(Na_2CO_3 anhydrous)	40	กรัม
	- โพแทสเซียมไอโอเดต	(KI)	10	กรัม
	- โพแทสเซียมไอโอไดร์	(KIO_3)	0.7	กรัม
	- โพแทสเซียมออกซาเลท	(Potassium oxalate)	18.4	กรัม

นำโซเดียมคาร์บอเนต ละลายในน้ำอุ่น 400 มิลลิลิตร คนให้ทั่ว และเทใส่ใน คอปเปอร์ซัลเฟตที่รวมกับ กรดทาร์ทาริก ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร และ นำ โพแทสเซียมไอโอเดต โพแทสเซียมไอโอไดร์ และ โพแทสเซียมออกซาเลท มาละลายน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร จากนั้นเทลงในสารละลายคอปเปอร์ ทำให้เย็น และ ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

2.สารละลาย 1 นอร์แมล ซัลฟูริก (H_2SO_4)

นำกรดซัลฟูริกเข้มข้น 27 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำ และ ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.สารละลาย 0.1 นอร์แมล ไทโอซัลเฟต (Thiosulphate)

ชั่งโซเดียมไทโอซัลเฟต 25 กรัม และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 กรัม ละลายในน้ำและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งสารที่ได้อาจมีค่ามากกว่า 0.1 นอร์แมล เราสามารถหาค่าที่แน่นอนได้โดย เตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.1 นอร์แมล โพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(อบให้แห้งที่ 110 องศาเซลเซียส ชั่งให้ได้ 4.9033 กรัม ละลายในน้ำแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร) นำสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 25 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ที่มี โพแทสเซียมไอโอเดต 3 กรัม และ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจางให้เป็น 500 ถึง 600 มิลลิลิตร ทำการไทเทรตด้วยไทโอซัลเฟต และเติมน้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อใกล้ถึงจุดยุติ และเมื่อถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเขียวจาง ถ้าไทโอซัลเฟตที่นำมาใช้บริสุทธิ์ ปริมาณที่ใช้จะน้อยกว่า 25 มิลลิลิตรเล็กน้อย เมื่อจะนำมาใช้ให้ทำการปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 25 มิลลิลิตร (เช่น ถ้าทำการไทเทรตแล้วใช้ไทโอซัลเฟต 24.7 มิลลิลิตร เพราะฉะนั้น ทุกๆ 24.7 มิลลิลิตรของไทโอซัลเฟตต้องเติมน้ำกลั่น 0.3 มิลลิลิตร)

4.สารละลาย 0.005 นอร์แมล ไทโอซัลเฟต

นำสารละลาย 0.1 นอร์แมล ไทโอซัลเฟต (ที่ทำการปรับความเข้มข้นตาม ข้อ 3. แล้ว) 25 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำให้ได้ 500 มิลลิลิตร

5.เบสิกเลทอะซิเตท (Basic lead acetate) ร้อยละ 33

6.สารละลายฟอสเฟต ร้อยละ 10

ชั่ง $Na_2HPO_4.12\ H_2O$ 1 กรัม ละลายน้ำ 10 มิลลิลิตร

วิธีเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมฟีนอฟธาลีน 2 ถึง 3 หยดและทำให้เป็นกลางด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ เติม 1 มิลลิลิตรของ สารละลายเบสิกเลทอะซิเตท ผสมให้เข้ากัน เติม 3 มิลลิลิตรของ สารละลายฟอสเฟต แล้วทำให้เป็นกลาง จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้วดูดส่วนใสมาวิเคราะห์

วิธีการวิเคราะห์

1.เติมตัวอย่างที่เป็นส่วนใส 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มีคอมไบไมโครรีเอเจนท์ 5 มิลลิลิตร (ถ้ามีน้อยกว่า 5 มิลลิลิตร ให้ใช้น้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 10 มิลลิลิตร)

2.ปิดปากหลอดทดลองด้วยจุกคอร์กหลวมๆ เพื่อป้องกันการออกซิเดชันจากอากาศ แล้วนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือด จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีแดง แล้วทำให้เย็นทันที

3.เติม 1 นอร์แมลซัลฟูริก 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วไทเทรตด้วย 0.005 นอร์แมล ไทโอซัลเฟต โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์

4.ไทเทรตจนสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียว เป็น สีน้ำเงิน (ฟ้า)

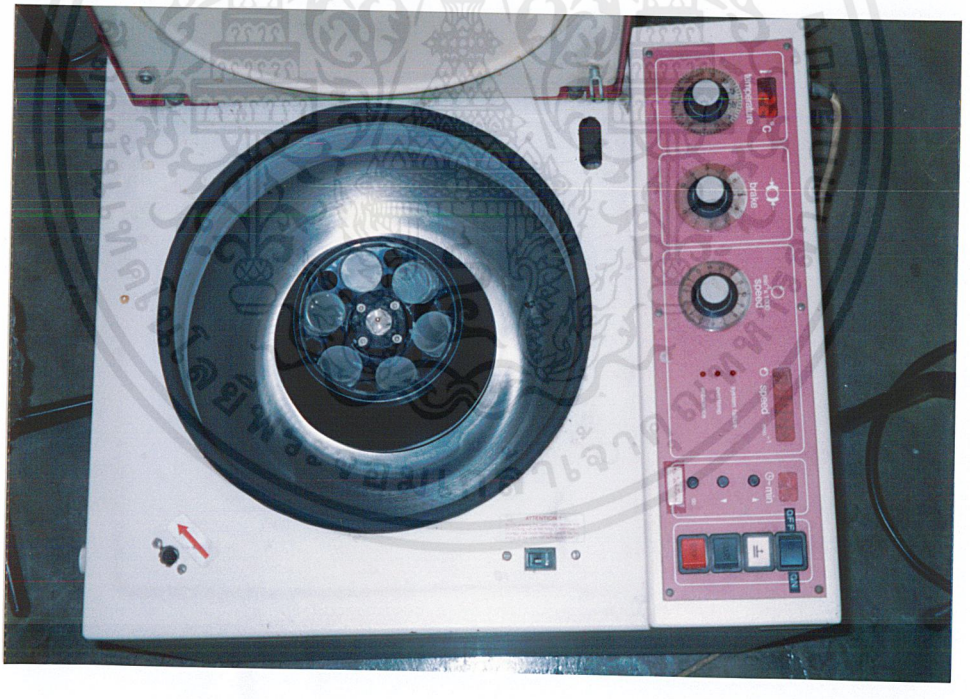
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างในการทำ blank

6.นำค่าผลต่างของปริมาณไทโอซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต ของ blank กับ ตัวอย่าง เปิดตาราง ของ Shaffer และ Hartmann

ค่าที่ได้จะเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลแลคโตสได้ดังนี้

ปริมาณน้ำตาลแลคโตส (ร้อยละ) = $\frac{\text{ค่าของปริมาณน้ำตาลกลูโคส} * 1.65 * 100}{\text{ปริมาณตัวอย่าง}}$



รูปภาคผนวกที่ 4 เครื่องปั่นเหวี่ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปภาคผนวกที่ 5 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิธีการหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์

การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์

วัสดุอุปกรณ์

1.กระทงอลูมิเนียม

2.เดซิเคเตอร์

3.ตู้อบความร้อนแห้ง

4.เครื่องปั่นเหวี่ยง

วิธีการวิเคราะห์

1.นำกระทงอลูมิเนียม อบที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำไปตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งที่แน่นอน

2.นำตัวอย่างที่มีเซลล์ยีสต์ ปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 8000 X g นาน 15 นาที

3.นำตะกอนที่ได้ใส่ในกระทงอลูมิเนียมที่อบไว้ แล้วนำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 24-48 ชั่วโมง

4.นำไปใส่ในเดซิเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

5.นำค่าน้ำหนักมาทำการคำนวณได้เป็นค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์

$$\text{น้ำหนักแห้ง} = \frac{(W2 - W1) * 1,000}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง}}$$

W1 คือน้ำหนักกระทงอลูมิเนียมเปล่า

W2 คือน้ำหนักกระทงอลูมิเนียมที่มีตะกอนเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ยีสต์

1.ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl method (A.O.A.C.,1990)

ปฏิบัติตามภาคผนวก ข. ข้อ 2

2.การหาปริมาณไขมัน (A.O.A.C.,1990)

สารเคมีและอุปกรณ์

1.ชุดสกัดไขมันประกอบด้วย ขวดใส่ตัวทำละลาย ซอคเลต (soxhlet) เครื่องควบแน่น (condenser) และ เตาให้ความร้อน

2.หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)

3.ปิโตรเลียมอีเทอร์

วิธีการวิเคราะห์

1.อบถ้วยที่ใช้สำหรับหาปริมาณไขมันที่มีขนาด 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2.ชั่งตัวอย่าง บนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ประมาณ 15 – 20 กรัม ห่อให้มิดชิด แล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยใยแก้วหรือสำลีเพื่อให้สารตัวทำละลายมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

3.นำหลอดตัวอย่างใส่ลงใน soxhlet

4.เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ลงในถ้วยหาปริมาณไขมัน ประมาณ 150 – 200 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา

5.ประกอบชุดอุปกรณ์สกัดไขมัน พร้อมกับเปิดอุปกรณ์ควบแน่น และเปิดสวิตซ์ไฟให้ความร้อน

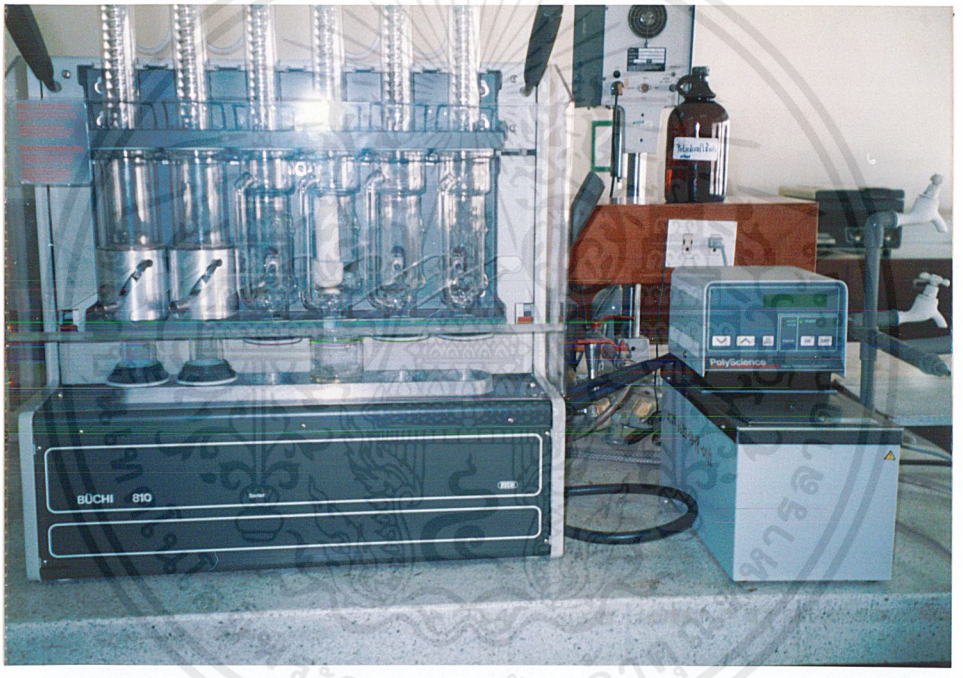
6.ใช้เวลาในการสกัดไขมันนาน 2 ชั่วโมง ระหว่างสกัดอาจมีการระเหยของปิโตรเลียมอีเทอร์ ดังนั้นจึงควรเฝ้าระวัง หากเห็นว่าปริมาณลดลงไปมากให้ทำการเติมปิโตรเลียมลงไปเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.เมื่อครบ 2 ชั่วโมง นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจาก soxhlet และ เก็บปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ค้างอยู่ในเครื่องกลั่นออก

8.นำถ้วยที่มีไขมันอยู่ไปตั้งทิ้งไว้ในตู้ควัน นาน 24 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนัก

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{100 * (\text{น้ำหนักถ้วยที่มีไขมัน} - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า})}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$



รูปภาคผนวกที่ 6 ชุดสกัดไขมัน

3.หาปริมาณโปรตีนในเซลล์ยีสต์ที่อยู่ในรูปของสารละลาย โดยวิธี Lowry method (Lowry,et al,1951)

สารเคมี

1.สารละลาย ก

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนท 2 กรัม ละลายใน โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์แมล 100 มิลลิลิตร

2.สารละลาย ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายโซเดียมโพแทสเซียมตาเตรท 2.7 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3.สารละลาย ค

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4.สารละลาย ง (เตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

สารละลาย ก 100 มิลลิลิตร + สาระละลาย ข 1 มิลลิลิตร + สารละลายค 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

5.สารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่ง BSA 0.02 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด แล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

6.Folin Ciocalteus phenol reagent

วิธีการทดลอง

1.นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ทำ 2 ซ้ำ

2.เติมสารละลาย ง 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.เติม Folin Ciocalteus phenol reagent 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เกิปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ วัด OD_{660}

4.นำค่า OD ที่ได้มาหาปริมาณโปรตีน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

5.ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้ BSA โดยเตรียม BSA ให้มีความเข้มข้นที่ 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำตามข้อ 1-4 ทำ 3 ซ้ำ

6.ถ้ามีปริมาณโปรตีนสูงกว่ากราฟมาตรฐานต้องเจือจางตัวอย่าง รายงานผลเป็นปริมาณโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

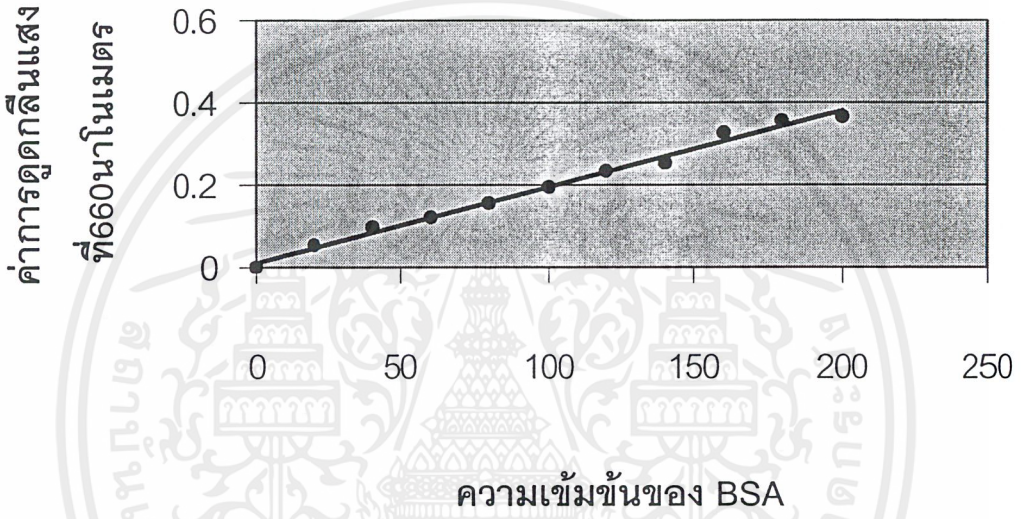
ภาคผนวก จ.

กราฟมาตรฐานของ Lowry method และ ตารางของ Shaffer และ Hartmann

ตารางภาคผนวกที่ จ-1 ค่า การดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานของ BSA

ความเข้มข้น BSA (μg/ml)	OD_{660}			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
20	0.073	0.060	0.071	0.068
40	0.130	0.061	0.139	0.110
60	0.095	0.162	0.202	0.153
80	0.131	0.214	0.159	0.168
100	0.197	0.223	0.259	0.226
120	0.205	0.310	0.261	0.259
140	0.283	0.229	0.321	0.278
160	0.312	0.450	0.241	0.334
180	0.345	0.262	0.434	0.347
200	0.301	0.403	0.419	0.374

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ 7 กราฟมาตรฐานของ Lowry method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-2 ตารางของ Shaffer และ Hartmann

0.005 N THIOSULPHATE	GLUCSOE	0.005 N THIOSULPHATE	GLUCOSE	0.005 N THIOSULPHATE	GLUCOSE	0.005 N THIOSULPHATE	GLUCOSE
cc.	mgm.	cc.	mgm.	cc.	mgm.	cc.	mgm.
0.3	0.067	4.1	0.622	8.1	1.159	12.1	1.649
0.4	0.086	4.2	0.634	8.2	1.173	12.2	1.662
0.5	0.105	4.3	0.647	8.3	1.186	12.3	1.674
0.6	0.125	4.4	0.660	8.4	1.198	12.4	1.687
0.7	0.142	4.5	0.672	8.5	1.211	12.5	1.700
0.8	0.157	4.6	0.685	8.6	1.224	12.6	1.713
0.9	0.173	4.7	0.698	8.7	1.237	12.7	1.728
1.0	0.191	4.8	0.713	8.8	1.249	12.8	1.742
		4.9	0.729	8.9	1.262	12.9	1.756
1.1	0.210	5.0	0.745	9.0	1.275	13.0	1.770
1.2	0.229						
1.3	0.247	5.1	0.759	9.1	1.288	13.1	1.785
1.4	0.263	5.2	0.772	9.2	1.300	13.2	1.800
1.5	0.279	5.3	0.784	9.3	1.313	13.3	1.813
1.6	0.294	5.4	0.797	9.4	1.326	13.4	1.827
1.7	0.306	5.5	0.810	9.5	1.339	13.5	1.842
1.8	0.319	5.6	0.822	9.6	1.354	13.6	1.856
1.9	0.332	5.7	0.837	9.7	1.368	13.7	1.871
2.0	0.344	5.8	0.852	9.8	1.382	13.8	1.885
		5.9	0.868	9.9	1.397	13.9	1.899
2.1	0.357	6.0	0.882	10.0	1.411	14.0	1.913
2.2	0.370						
2.3	0.382	6.1	0.892	10.1	1.424	14.1	1.928
2.4	0.395	6.2	0.902	10.2	1.435	14.2	1.942
2.5	0.408	6.3	0.911	10.3	1.446	14.3	1.956
2.6	0.421	6.4	0.926	10.4	1.457	14.4	1.971
2.7	0.434	6.5	0.940	10.5	1.469	14.5	1.984
2.8	0.446	6.6	0.955	10.6	1.480	14.6	1.997
2.9	0.461	6.7	0.969	10.7	1.491	14.7	2.010
3.0	0.477	6.8	0.983	10.8	1.502	14.8	2.022
		6.9	0.997	10.9	1.513	14.9	2.035
3.1	0.493	7.0	1.010	11.0	1.524	15.0	2.048
3.2	0.507						
3.3	0.520	7.1	1.023	11.1	1.535		
3.4	0.532	7.2	1.036	11.2	1.547		
3.5	0.545	7.3	1.048	11.3	1.558		
3.6	0 558	7.4	1.061	11.4	1.569		
3.7	0.571	7.5	1.074	11.5	1.580		
3.8	0.583	7.6	1.088	11.6	1.591		
3.9	0.596	7.7	1.102	11.7	1.602		
4.0	0.609	7.8	1.116	11.8	1.613		
		7.9	1.130	11.9	1.624		
		8.0	1.145	12.0	1.636		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ.

ตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-1 ความแตกต่างของปริมาณโปรตีนที่อัตราการเจือจางแตกต่างกัน

อัตราการเจือจาง	ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)
1:0	1.37 a
1:1	0.97 b
1:2	0.72 c
1:5	0.47 d

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ *

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-2 ความแตกต่างของน้ำหนักเซลล์แห้งที่อัตราการเจือจางแตกต่างกัน

อัตราการเจือจาง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1:0	9.79 a
1:1	5.15 b
1:2	3.75 c
1:5	2.33 d

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ *

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-3 ความแตกต่างของการลดลงของซีโอดีที่อัตราการเจือจางแตกต่างกัน

อัตราการเจือจาง	การลดลงของซีโอดี (ร้อยละ)
1:0	86 a
1:1	72 b
1:2	61 c
1:5	57 d

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ *

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-4 ความแตกต่างของปริมาณโปรตีนที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน

ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละ)	ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)
5	0.91 bc
10	1.01 bc
15	1.32 ab
20	0.63 cd
25	0.65 ab

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ *

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-5 ความแตกต่างของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน

ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละ)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
5	9.63 cd
10	9.72 cd
15	12.66 ab
20	9.62 cd
25	9.64 cd

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ *

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-6 ความแตกต่างของการลดลงของซีโอดีที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน

ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละ)	การลดลงของซีโอดี (ร้อยละ)
5	60 bc
10	62 bc
15	79 ab
20	52 cd
25	53 cd

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ *

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-7 ความแตกต่างของปริมาณโปรตีนที่พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

พีเอชเริ่มต้น	ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)
3.0	0.47 gh
3.5	1.11 cd
4.0	1.57 ab
4.5	1.05 de
5.0	0.73 ef
5.5	0.97 de
6.0	0.89 de

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ *

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-8 ความแตกต่างของน้ำหนักเซลล์แห้งที่พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

พีเอชเริ่มต้น	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
3.0	4.84 gh
3.5	8.86 cd
4.0	9.69 ab
4.5	8.57 de
5.0	8.54 de
5.5	8.72 cd
6.0	7.88 ef

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ *

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-9 ความแตกต่างของการลดลงของซีโอดีที่พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

พีเอชเริ่มต้น	การลดลงของซีโอดี (ร้อยละ)
3.0	29 hj
3.5	60 cd
4.0	71 ab
4.5	49 ef
5.0	45 fg
5.5	53 de
6.0	32 hi

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ *

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-10 ความแตกต่างของปริมาณโปรตีนที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)
25	0.83 cd
30	1.60 ab
35	1.34 ab

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ *

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-11 ความแตกต่างของน้ำหนักเซลล์แห้งที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
25	7.88 ef
30	9.70 ab
35	8.60 cd

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ *

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-12 ความแตกต่างของการลดลงของซีโอดีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	การลดลงของซีโอดี (ร้อยละ)
25	65 cd
30	76 ab
35	71 bc

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ *

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-13 ความแตกต่างของปริมาณโปรตีนที่ความเร็วรอบแตกต่างกัน

ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)
150	0.75 b
200	1.62 a
250	0.78 b
300	0.81 b

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ *

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-14 ความแตกต่างของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ความเร็วรอบแตกต่างกัน

ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
150	5.96 d
200	9.78 a
250	6.83 c
300	7.43 b

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ *

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-15 ความแตกต่างของการลดลงของซีโอดีที่ความเร็วรอบแตกต่างกัน

ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	การลดลงของซีโอดี (ร้อยละ)
150	60 c
200	76 a
250	67 b
300	73 a

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ *

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้