สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์จากเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082

นายดุสิต ลิขิตสุภิณ
นายปิยเชษฐ์ สิทธิเขตรกรณ์
นายยศธนา กรินทรากุล

ป.ต.
ว 7642 ก
2547

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 62185
วัน,เดือน,ปี 31 ก.ค. 2549

b 11610840
i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Production of Ribonucleotides by *Hansenula anomala* TISTR 5082

Mr.Dusit likitsupin

Mr.Piyachet Sittikedkorn

Mr.Yostana Krintrakul

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

Academic Year 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์จากเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082

นักศึกษา นายดุสิต ลิขิตสุภิณ
นายปิยเชษฐ์ สิทธิเขตรกรณ์
นายยศธนา กรินทรากุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.วีนา ชูโชติ	
กรรมการ ผศ.ลินจง สุขลำภู	
กรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์จากเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082

นักศึกษา นายดุสิต ลิขิตสุภิณ

นายปิยเชษฐ์ สิทธิเขตรกรณ์

นายยศธนา กรินทรากุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2547

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์ จากเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 โดยใช้อาหาร YM ดัดแปลง ที่มีน้ำมะพร้าวเป็นแหล่งอาหาร เพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย น้ำมะพร้าวปริมาตร 75 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น คือ 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อยีสต์ผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.84 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 ในการเลี้ยงในฟลาสก์เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีและเมื่อนำไปเลี้ยงในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 10 ลิตร พบว่าที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม จะให้ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์สูงสุดเท่ากับ 0.92 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Production of Ribonucleotides by *Hansenula anomala* TISTR 5082

Name Mr.Dusit Likitsupin

Mr.Piyachet Sittikedkorn

Mr.Yostana Krintrakul

Department Applied Biology

Program Industrial Microbiology

Academic Year 2004

Special Project Advisor Assoc.Prof.Dr.Nuanphan Naranong

ABSTRACT

Optimum medium for ribonucleotide production by *Hansenula anomala* TISTR 5082 was studied in modified YM-broth containing coconut water as substrate. The yeast was grown under aerobic condition at 30 °C for 72 hrs. It was found that the optimized medium to be consisted of the following compositions : coconut water 75 % , sucrose 10 g/l , ammonium sulfate 3 g/l and initial pH of 5.0. The maximum ribonucleotide production in shake flask was 0.84 g/l at 72 hrs. with the shaking speed of 250 rpm. In a 10-L fermenter, the highest ribonucleotide production was 0.92 g/l at 60 hrs. of cultivation at the agitation speed of 400 rpm and the aeration rate of 1.5 vvm when cultivated at the same medium.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และสามารถทำสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์ที่ปรึกษาซึ่งท่านได้ช่วยเอาใจ ให้คำแนะนำด้วยดีเสมอมา และกรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษา ผศ.วีนา ชูโชติ ประธานกรรมการ และ ผศ.ลินจง สุขลำภู กรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ ทั้งนี้ยังขอบคุณ คุณวิทยา เขียวเขิน คุณประสิทธิ์ แผ้วบาง คุณเอกภพ ภาเรือง และคุณอนิทัต ทองจันทร์ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่ช่วยกรุณาให้ยืมอุปกรณ์และสารเคมี และเจ้าหน้าที่ธุรการด้วย ทำให้การทดลองเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

สุดท้ายนี้ คณะผู้จัดทำขอขอบคุณเพื่อนๆ ที่ช่วยเหลือ และให้ยืมอุปกรณ์ให้การทำโครงงานพิเศษนี้บรรลุไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

พฤษภาคม 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	15
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	20
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	41
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสูงสุดของไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวปริมาตรต่างๆ กัน 22

ตารางที่ 4.2 แสดงน้ำหนักแห้ง พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวที่มีปริมาตรต่างๆ กัน 23

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสูงสุดของไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM ดัดแปลงที่มี น้ำมะพร้าวปริมาตรต่างๆ กัน ที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด 26

ตารางที่ 4.4 แสดงน้ำหนักแห้ง พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวที่มีปริมาตรต่างๆ กัน ที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด 27

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสูงสุดของไรโบนิวคลีโอไทด์ในสูตรอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวที่มีปริมาตรต่างๆ กัน ที่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัดกับไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด 28

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสูงสุดของไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีปริมาณต่างๆ กัน 31

ตารางที่ 4.7 แสดงน้ำหนักแห้ง พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์ ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณต่างๆ กัน 32

ตารางที่ 4.8 แสดงไรโบนิวคลีโอไทด์ น้ำหนักแห้ง ออกซิเจนละลาย พีเอช และน้ำตาลทั้งหมดเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็มและอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที 36

ตารางที่ 4.9 แสดงไรโบนิวคลีโอไทด์ น้ำหนักแห้ง ออกซิเจนละลาย พีเอช และน้ำตาลทั้งหมดเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม และอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 4.10 แสดงไรโบนิวคลีโอไทด์ น้ำหนักแห้ง ออกซิเจนละลาย พีเอช และน้ำตาลทั้งหมดเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็มและอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที 38

ตารางที่ 4.11 แสดงไรโบนิวคลีโอไทด์ น้ำหนักแห้ง ออกซิเจนละลาย พีเอช และน้ำตาลทั้งหมดเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็มและอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที 39

ตารางที่ 4.12 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสูงสุดของไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีอัตราการให้อากาศต่างๆ กันและอัตราการกวนต่างๆ กัน 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 ต้นกำเนิดของอะตอมต่างๆในเพียวรีน 5
รูปที่ 2.2 วิถีการสังเคราะห์ IMP 6
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ azaserine 7
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ aminopterine (R=H) และ methotrexate (amethopterine, R=CH_3) 8
รูปที่ 2.5 วิถีการสังเคราะห์ AMP, GMP และ IMP 9
รูปที่ 4.1 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 50 เปอร์เซ็นต์ 21
รูปที่ 4.2 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์ 21
รูปที่ 4.3 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 100 เปอร์เซ็นต์ 22
รูปที่ 4.4 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด 25
รูปที่ 4.5 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด 25
รูปที่ 4.6 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด 26
รูปที่ 4.7 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.8 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร 30

รูปที่ 4.9 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 7 กรัมต่อลิตร 31

รูปที่ 4.10 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที 34

รูปที่ 4.11 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม และอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที 34

รูปที่ 4.12 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที 35

รูปที่ 4.13 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม และอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ไรโบนิวคลีโอไทด์ (ribonucleotides) หรือ 5'-ไรโบนิวคลีโอไทด์ (5'-ribonucleotides) เป็นวัตถุปรุงแต่งรสอาหาร (flavor enhancer) ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า ไรโบไทด์ (ribotide) ประกอบด้วย ไดโซเดียมไอโนซิเนต (disodium inosinate, 5'-IMP=5'-inosine monophosphate) และไดโซเดียม-กัวโนเลต (disodium guanylate, 5'-GMP=5'-guanosine monophosphate) ในอัตราส่วน 1:1 ไรโบนิวคลีโอไทด์นี้ใช้ปรุงแต่งกลิ่นรสของอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น ซุปสำเร็จรูป บะหมี่กึ่งสำเร็จรูป ผลิตภัณฑ์เนื้อและอาหารเหลวต่างๆ เป็นต้น โดยใช้ไรโบนิวคลีโอไทด์เพียงเล็กน้อยก็สามารถปรุงแต่งและเสริมรสชาติของอาหารให้มีมากขึ้นขณะรับประทาน และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (ภักดี, 2521) ในการเพิ่มรสชาติที่ได้จากสารจำพวกนี้เรียกว่า Umami taste เป็นรสชาติที่ต่างจากรสชาติพื้นฐานทั่วไปทั้ง 4 รสคือ รสหวาน เค็ม เปรี้ยว และขม นอกจากใช้เป็นสารเพิ่มรสชาติอาหารแล้วนิวคลีโอไทด์และนิวคลีโอไซด์ยังใช้ในการผลิตยาจำพวก biologically active agents ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นการทำงานของระบบเมแทบอริสมของร่างกาย เช่น CDP-choline ใช้กระตุ้นคนไข้ที่มีอาการหมดสติและกระตุ้นการทำงานของตับอ่อน ATP ใช้เป็นสารกระตุ้นการทำงานของหัวใจและเส้นเลือดในสมอง อีกทั้งยังใช้ในการกระตุ้นการทำงานของกล้ามเนื้อทั่วไป adenosine ใช้ในการรักษาอาการเส้นเลือดหัวใจทำงานไม่ปกติ FAD ใช้ในการรักษาอาการขาดวิตามินบี 2 (เสาวนีย์ ,2547)

เชื้อยีสต์ที่ผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์ได้จากการทดลองของ Kim; Lee and Lee (2001) คือ *Candida* spp. *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces rouxii* และ *Hansenula anomala* พบว่าเชื้อ *H. anomala* จะผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์ได้มากที่สุด ดังนั้นเราจึงเลือกเชื้อ *H. anomala* มาทำการศึกษาการผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ

สำหรับประเทศไทยมีการใช้ไรโบนิวคลีโอไทด์ในอุตสาหกรรมอาหารเป็นจำนวนมาก แต่ส่วนใหญ่จะนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นถ้าเราสามารถผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์ใช้เองได้โดยหาวัตถุดิบที่มีราคาถูกมาเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อผลิตสารปรุงรสของอาหาร แหล่งวัตถุดิบที่น่าสนใจคือน้ำมะพร้าวซึ่งมีสารอาหารเพียงพอสำหรับการเจริญของยีสต์ เป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีมากในประเทศและเหมาะสมสำหรับการผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งอาหารในการผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์โดยใช้เชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082

2. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 และผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์ในระดับฟลาสก์

3. เพื่อศึกษาการเจริญและผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์ในระดับถังหมักแบบใบพัดกวนของเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาผลของยีสต์สกัดและมอลต์สกัดในการผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์
2. ศึกษาความเข้มข้นของน้ำมะพร้าว แอมโมเนียมซัลเฟต และการผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์
3. ศึกษาอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนในถังหมักแบบใบพัดกวน
4. เปรียบเทียบการเจริญในระดับฟลาสก์และระดับถังหมัก

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Hansenula anomala* TISTR 5082 เพื่อใช้ในการผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์ในระดับฟลาสก์และถังหมัก และการนำน้ำมะพร้าวที่เหลือทิ้งจากร้านค้ามาใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อลดต้นทุนการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ไรโบนิวคลีโอไทด์

2.1.1 ประวัติและวิวัฒนาการของไรโบนิวคลีโอไทด์

ตามเอกสารที่เกี่ยวข้องมักเรียกไรโบนิวคลีโอไทด์สั้นๆ ว่า นิวคลีโอไทด์ ซึ่งส่วนมากจะหมายถึง IMP (inosine monophosphate) และ GMP (guanosine monophosphate) สารทั้งสองนี้มีฟอสเฟตต่อที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของไรโบส IMP ได้เริ่มเป็นที่รู้จักในฐานะวัตถุปรุงแต่งรสอาหารร่วมกับ MSG (monosodium L-glutamate)

ในขณะนั้นได้มีการผลิต MSG เพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งรสอาหารเป็นอุตสาหกรรม โดยการไฮโดรไลส์โปรตีนจากการหมักโดยตรงหรือการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ยังไม่มีการผลิต IMP เพื่อใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งรสอาหารเป็นอุตสาหกรรม ทั้งนี้เพราะโครงสร้างและพื้นฐานทางชีวเคมีและคุณสมบัติของ IMP ยุ่งยากซับซ้อนกว่า MSG ตัวอย่าง เช่น MSG มี 2 ไอโซเมอร์คือ แอล- (L-) และ ดี- (D-) ไอโซเมอร์ แต่ IMP มี 3 ไอโซเมอร์ คือ 2', 3' และ 5'-ไอโซเมอร์ และแอล-กลูตาเมตเป็นสารประกอบธรรมชาติของโปรตีน แต่ดี-กลูตาเมตไม่เป็น ส่วน IMP เป็นสารประกอบธรรมชาติของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) การศึกษาทางชีวเคมีของกรดนิวคลีอิกช้ากว่าพวกโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต จึงทำให้ความรู้หรือความก้าวหน้าเกี่ยวกับ IMP น้อยกว่าของแอลกลูตามิค (วราภรณ์, 2526)

2.1.2 แหล่งที่พบและชนิดของไรโบนิวคลีโอไทด์

Kuninaka; Masajiro and Sakaguchi (1964) เริ่มศึกษาการใช้เอนไซม์ที่ทำให้อาร์เอ็นเอแตกตัวโดย จุลินทรีย์ และรสของสารที่ได้จากการสลายตัวของอาร์เอ็นเอได้พบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของ อาร์เอ็นเอสามารถผลิตได้จาก *Aspergillus* sp. และใช้ *Aspergillus oryzae* ในศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์นั้น การสลาย RNA ของ *A. oryzae* จะได้ 3'-IMP แต่จะมีกลิ่นรสน้อยหรือไม่มีกลิ่นรสเลย เมื่อใช้ alkaline hydrolyse RNA จะได้สารผสมของ 2'-IMP และ 3'-IMP ซึ่งไม่มีกลิ่นรสเช่นกัน ส่วน 5'-IMP ที่เตรียมจากเนื้อกระต่ายมีกลิ่นรสเฉพาะตัวที่ดี จะเห็นว่า มีเพียง 5'-IMP เท่านั้นที่ให้กลิ่นรส แต่การเตรียม 5'-IMP จากอาร์เอ็นเอเป็นเรื่องที่ทำได้ยากเนื่องจากอาร์เอ็นเอเป็นโพลีนิวคลีโอไทด์ที่มีนิวคลีโอไซด์เหมือนกันต่อเข้าด้วยกัน เพราะฉะนั้นเมื่ออาร์เอ็นเอถูกทำให้สลาย การแตกพันธะจะเกิดที่ตำแหน่ง 3' หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5'-phosphodiester linkage ส่วนมากการใช้เอนไซม์ในการย่อยอาร์เอ็นเอจะทำให้ linkage ที่ 3'-phosphodiester ซึ่งจะแตกออกและทำให้เกิด 2'- และ 3'-nucleoside ส่วนการที่จะได้ 5'-nucleotides จากอาร์เอ็นเอนั้นเป็นการยากทั้งทางเอนไซม์และทางเคมี ทำให้การผลิต 5'-nucleotides ในรูปแบบอุตสาหกรรมยังเป็นไปได้ยาก Kurtzman and Loren (1964) ได้ค้นพบวิธีการผลิต 5'-นิวคลีโอไทด์ในปี ค.ศ.1957 และแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ phosphodiesterase จะทำให้พันธะ 5'-phosphodiester ในอาร์เอ็นเอแตกออก และเกิด 5'-นิวคลีโอไทด์ จะผลิตได้จากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Penicillium citrinum* เอนไซม์จากจุลินทรีย์สามารถผลิต 5'-นิวคลีโอไทด์ได้เช่น 5'-AMP (adenosine monophosphate), 5'-GMP (guanosine monophosphate), 5'-CMP (cytidine monophosphate) และ 5'-UMP (uridine monophosphate) ผลิตได้จากอาร์เอ็นเอของยีสต์ ส่วน 5'-IMP จะผลิตได้จากการเปลี่ยน 5'-AMP โดยปฏิกิริยาดีอะมิเนชั่น 5'-AMP

ดังนั้นวิธีการย่อยอาร์เอ็นเอโดยอาศัยเอนไซม์ 5'-phosphodiesterase ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์สามารถผลิต 5'-IMP และ 5'-GMP ได้ ซึ่งเป็นสารปรุงแต่งรสอาหารและยังพบว่า 5'-GMP มีกลิ่นรสที่เข้มกว่า 5'-IMP (Kuninaka; Masajiro and Sakaguchi 1964)

2.1.3 ประโยชน์ของไรโบนิวคลีโอไทด์

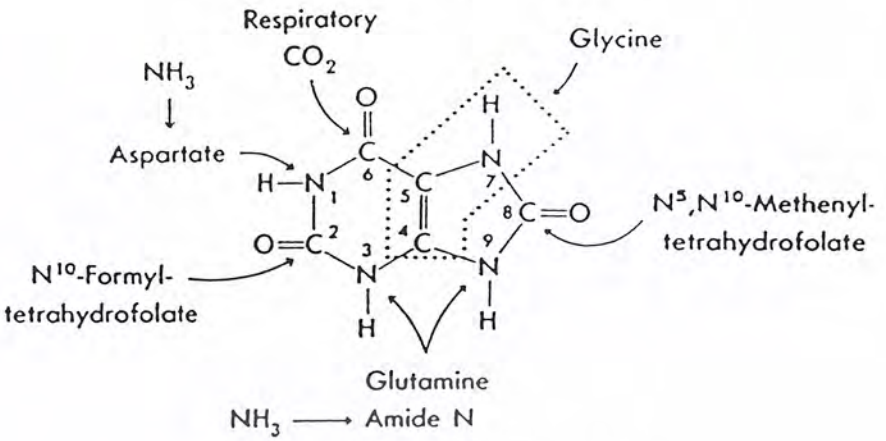
ไรโบนิวคลีโอไทด์ใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสของอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น ซุบสำเร็จรูป บะหมี่กึ่งสำเร็จรูป ผลิตภัณฑ์เนื้อและอาหารเหลวต่างๆ เป็นต้น (ภักดี, 2521) และใช้เป็นตัวช่วยเพิ่มกลิ่นรสของ monosodium glutamate (MSG) พบว่า 5'-IMP และ 5'-GMP เพียงเล็กน้อยก็สามารถเพิ่มกลิ่นรสของ MSG ได้ (Kuninaka; Masajiro and Sakaguchi 1964)

2.2 การผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์

2.2.1 วิถีการสังเคราะห์ไรโบนิวคลีโอไทด์

การสังเคราะห์เพียวรีนนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตเกิดขึ้นจากสารชีวโมเลกุลเล็กๆ หลายตัวด้วยกันคือ ไรโบสฟอสเฟต ไกลซีน กรดโฟลิคซึ่งจะทำงานอยู่ในรูปของโคเอ็นไซม์ คือ tetrahydropolate แอสปาเตท กลูตามีน และคาร์บอนไดออกไซด์ จากการทดสอบโดยใช้ไอโซโทป (isotope) หรือการใช้สารกัมมันตรังสี พบว่าอะตอมต่างๆในเพียวรีนมีต้นกำเนิดมาจากสารหลายตัวดังกล่าว ดังแสดงในรูปที่ 2.1

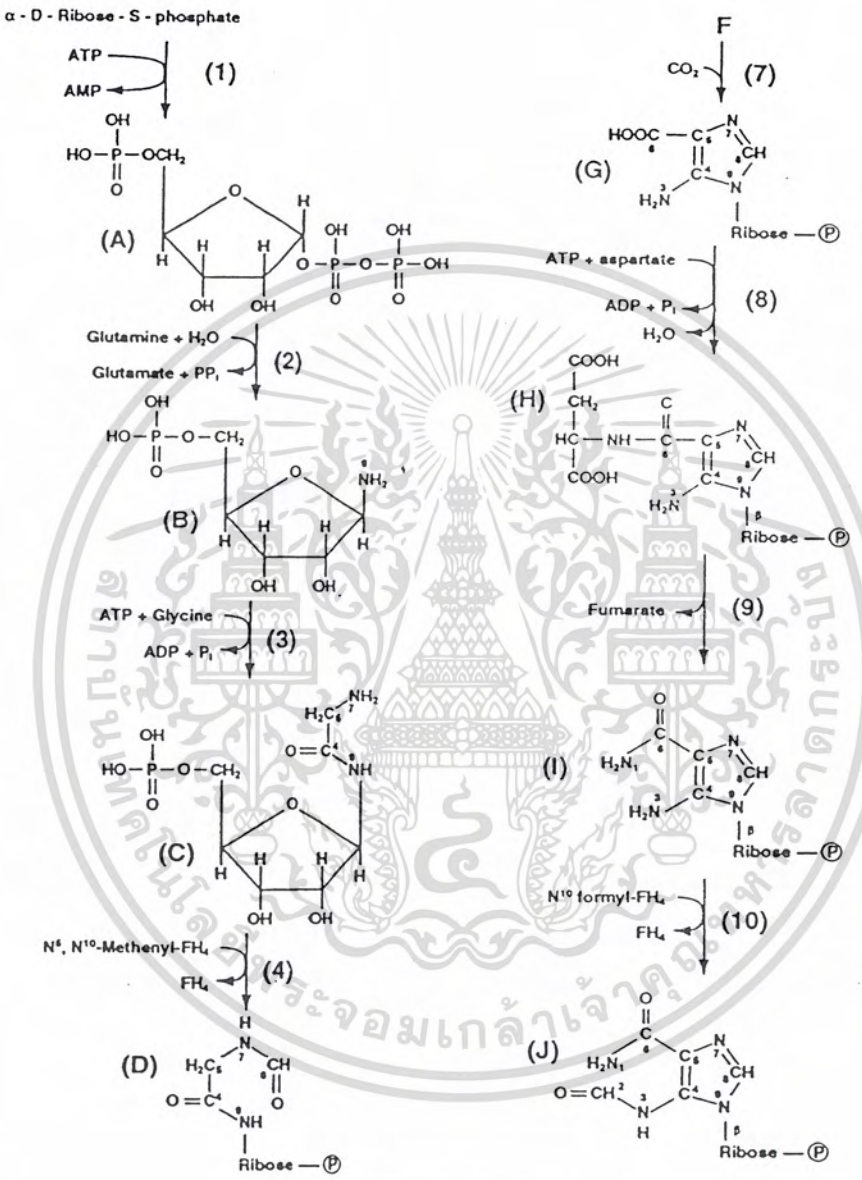
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ต้นกำเนิดของอะตอมต่างๆในเพียวรีน
ที่มา : พรงาม (2541)

การสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยหลายปฏิกิริยาด้วยกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.2 เริ่มจากปฏิกิริยาแรกโดยฟอสฟอริเลชัน (phosphorylation) ของ ribose-5-phosphate ผลที่ได้คือ phosphoribosylpyrophosphate เรียกย่อๆว่า PRPP (โมเลกุล A ในรูปที่ 2.2) เอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยานี้เรียกว่า PRPP synthetase ปฏิกิริยาที่สองคือ ปฏิกิริยาระหว่าง PRPP และกลูตามีนถูกเร่งด้วยเอนไซม์ amidophosphoribosyl transferase ผลที่ได้คือ 5′-phosphoribosyl-1-amine (โมเลกุล B ในรูปที่ 2.2) ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อไปอีกเก้าปฏิกิริยาด้วยกันดังรูปที่ 2.2 เพื่อให้ได้เพียวรีนนิวคลีโอไทด์ตัวแรกคือ inosine 5′-monophosphate (IMP) โดยการสังเคราะห์ IMP จากสารตั้งต้น ribose-5-phosphate จะเกิดขึ้นในไซโตพลาสซึมของเซลล์และใช้ 5 ATP เพื่อให้ได้หนึ่งโมเลกุลของ IMP การควบคุมการสังเคราะห์ IMP ที่สำคัญคือปฏิกิริยาที่ 2 ในรูปที่ 2.2 คือ เอนไซม์ PRPP amidotransferase ถ้า IMP มีความเข้มข้นมากในเซลล์จะเกิดการยับยั้ง PRPP amidotransferase แต่จะมีสารที่มีรูปร่างคล้ายกลูตามีนและสามารถต่อต้านการเกิดมะเร็งได้ คือ azaserine (รูปที่ 2.3) จะเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาที่ 2 และ 5 ในวิถีการสังเคราะห์ IMP ส่วน aminopterine และ methotrexate (รูปที่ 2.4) ซึ่งจะเป็นสารที่ยับยั้งเอนไซม์โฟเลท โดยยับยั้งเอนไซม์ dihydrofolate reductase จะยับยั้งปฏิกิริยาที่ 4 และ 10 ในวิถีการสังเคราะห์ IMP (พรงาม, 2541)

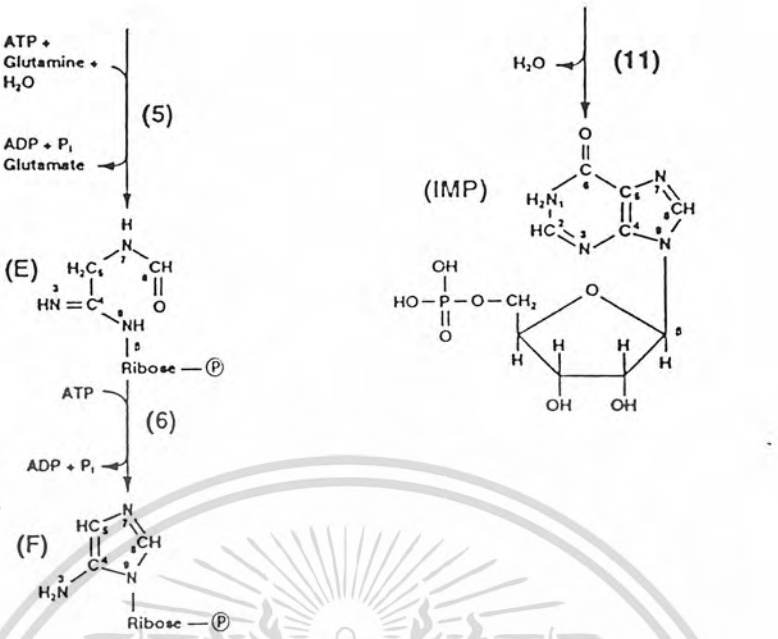
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 วิถีการสังเคราะห์ IMP

ที่มา : พรงาม (2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

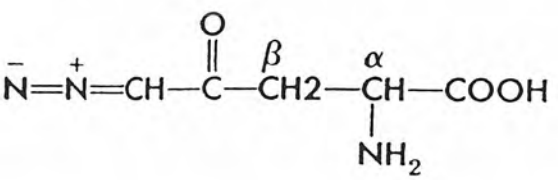


รูปที่ 2.2 (ต่อ) วิถีการสังเคราะห์ IMP

ที่มา : พรงาม (2541)

ตัวกลางในวิธีการสังเคราะห์ IMP คือ A = phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP); B = 5′-phosphoribosyl-amine; C = 5′-phosphoribosylglycinamide; D = 5′-phosphoribosyl-N-formylglycinamide; E = 5′-phosphoribosyl-N-formyl glycinamide; F = 5′-phosphoribosyl-5-aminoimidazole; G = 5′-phosphoribosyl-5-aminoimidazole-4-carboxylate; H = 5′-phosphoribosyl-5-aminoImidazole-4-N-succinocarboxamide; I = 5′-phosphoribosyl-5-aminoimidazole-4-carboxamide; J = 5′-phosphoribosyl-5-formamidoimidazole-4-carboxamide

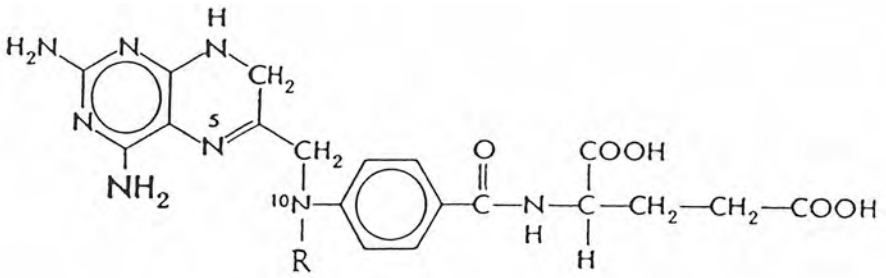
เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ 1 = PRPP synthetase; 2 = PRPP amidotransferase; 3 = phosphoribosylglycinamide synthetase; 4 = phosphoribosylglycinamide formyltransferase; 5 = phosphoribosylformyl glycinamide synthetase; 6 = phosphoribosylaminpimidazole synthetase; 7 = phosphoribosylaminoimidazole carboxylase; 8 = phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthetase; 9 = adenylsuccinate lyase; 10 = phosphoribosylaminoimidazolecarboxanamide formyltransferase; 11 = IMP cyclohydrolase.



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ azaserine

ที่มา : พรงาม (2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



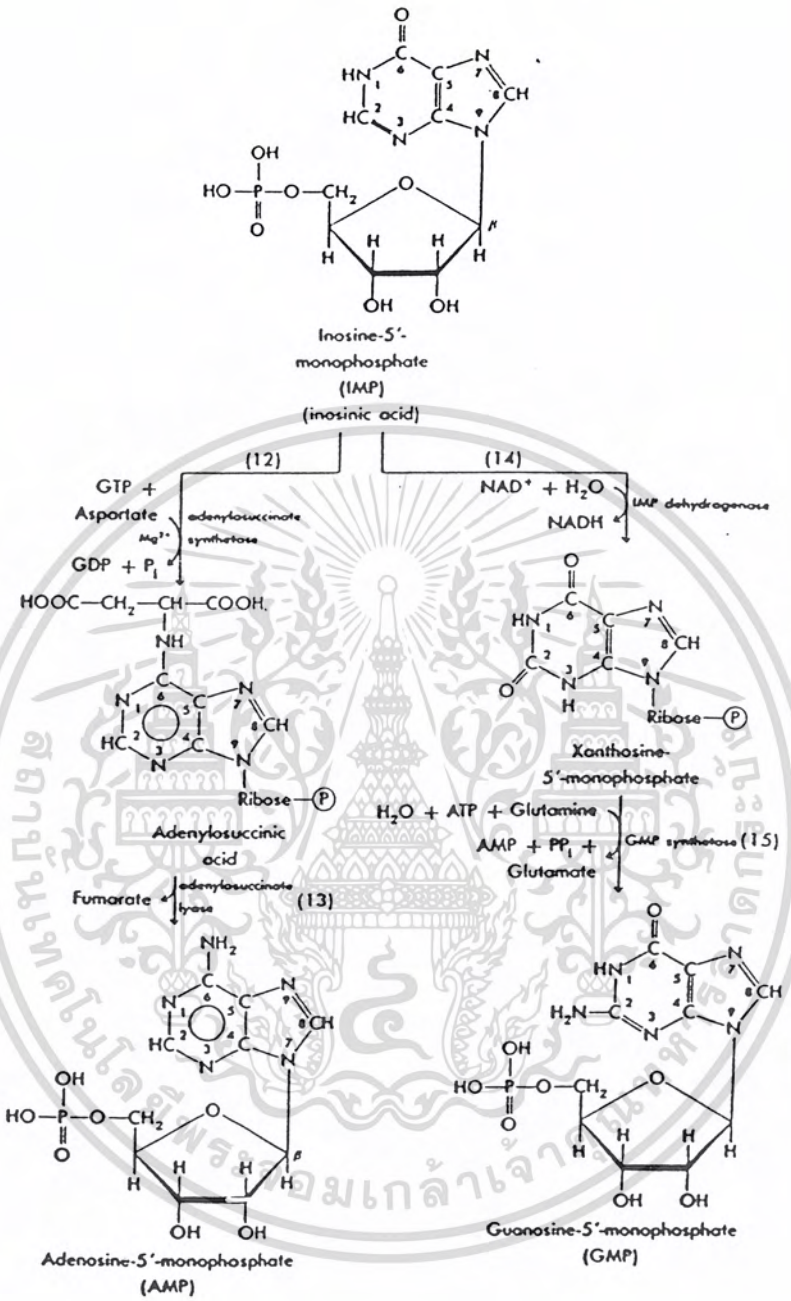
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ aminopterine (R=H) และ methotrexate (amethopterine, R=CH_3)
ที่มา : พรงาม (2541)

2.2.2 การสังเคราะห์ AMP และ GMP จาก IMP

การสังเคราะห์เพียวรีนนิวคลีโอไทด์ทั้งสองตัวคือ AMP และ GMP มีสารตั้งต้นมาจาก IMP ทั้งคู่ จากรูปที่ 2.5 จะสังเกตได้ว่าในการสังเคราะห์ AMP จะต้องใช้ GTP มาใช้ในการสังเคราะห์ ส่วน GMP จะต้องใช้ ATP ในการสังเคราะห์เพราะเมื่อเซลล์มีระดับ ATP สูงขึ้นจะไปกระตุ้นให้ IMP กลายไปเป็น GMP

ถ้าปริมาณ GMP มีมากเกินไปจะทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ GMP ขึ้น โดยจะไปยับยั้งเอนไซม์ IMP dehydrogenase (ปฏิกิริยาที่ 14 ในรูปที่ 2.5) และจะกระตุ้นเอนไซม์ adenylosuccinate synthetase ในปฏิกิริยาที่ 12 (รูปที่ 2.5) เช่นเดียวกับ AMP ถ้ามีปริมาณมากเกินไปจะไปยับยั้งเอนไซม์ adenylosuccinate synthetase ในปฏิกิริยาที่ 12 แต่จะกระตุ้นเอนไซม์ IMP dehydrogenase นอกจากนี้ AMP และ GMP จะสามารถยับยั้งเอนไซม์ PRPP amidotransferase ในปฏิกิริยาที่ 2 (รูปที่ 2.4) ได้ด้วย ดังนั้นการสังเคราะห์เพียวรีนนิวคลีโอไทด์ IMP, GMP และ AMP ถูกควบคุมโดยการยับยั้งด้วยผลผลิตของการสังเคราะห์ หรือเรียกว่า " product inhibition" ซึ่งกลไกดังกล่าวจะช่วยให้สิ่งมีชีวิตสามารถเลือกสังเคราะห์เฉพาะเพียวรีนนิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งได้ตามที่ร่างกายต้องการ (พรงาม, 2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 วิถีการสังเคราะห์ AMP, GMP และ IMP

ที่มา : พรงาม (2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ไรโบนิวคลีโอไทด์

Shimizu; et.al. (1983) กับ Tsuchida; et.al. (1984) ได้ทำการปรับปรุงพันธุ์เชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ในการผลิต GMP และ IMP ตามลำดับ โดย Shimizu; et.al. (1983) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ AJ11870 โดยทำการปรับปรุงพันธุ์เชื้อด้วยการเติมตัวยับยั้งพิวรีน หรือ ยีนส์ที่เป็นตัวยับยั้ง decoyinine ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งน้ำที่กรองได้จากการเลี้ยงเชื้อจะมี GMP.Na_2 เท่ากับ 1.66 กรัมต่อลิตร ส่วน Tsuchida; et.al. (1984) ได้ทำการแยก *B. subtilis* ที่กลายพันธุ์เพื่อใช้สำหรับปรับปรุงการผลิต IMP ให้ดียิ่งขึ้นโดยได้ทำการดัดแปลงพลาสมิด pHE 17 ในยีนส์ PRPP amidotransferase เชื้อที่ใช้ทำการแยกนั้นคือ *B. subtilis* AJ11914 ซึ่งจะได้ IMP เท่ากับ 2.3 กรัมต่อลิตร โดยสายพันธุ์เดิมจะผลิตได้เพียง 1.2 กรัมต่อลิตร

Ishibashi; Hirauma and Yamada (1986) ได้ทำการศึกษาถึงการผลิต IMP ของเชื้อต่างๆ เช่น *Corynebacterium equi, B. ammoniagenes* หรือ *B. subtilis* โดยการผสมกลูโคสและอินโนซีน หรือ ไฮโปแซนทีน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างกระบวนการหมักโดยเขาได้พบว่า *c. equi* AJ11914 ที่เลี้ยงในอาหารที่ใส่กลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.6 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 เปอร์เซ็นต์ soybean protien hydrolyzate 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดกลูตามิก 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยเมื่อผ่านไป 2 วัน จะมีการเติมกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ และไฮโปแซนทีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เข้าไปอีก ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณ disodium IMP hydrate เท่ากับ 26.9 กรัมต่อลิตรกับปริมาณ IMP ที่ไม่เติมไฮโปแซนทีนเท่ากับ 16.3 กรัมต่อลิตร

Tomita; et.al. (1990)ได้ศึกษาปริมาณ IMP ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus ammoniagenes* โดยการเติมแอล-โพรีน (L-proline) ลงไปในระหว่างการเลี้ยงเชื้อโดย Tomita; et.al. (1990) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *B. ammoniagenes* KY13184 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ กลูโคส เปปโตน เนื้อสกัด ยีสต์สกัด ยูเรีย แอล-ซิสทีน (L- cysteine) แคลเซียมแพนโททีเนต ไบโอติน ไทอะมีนไฮโดรคลอริก อะดีนีน กัวนีน และเกลือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติมแอล-โพรีน 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มอีก 80 ชั่วโมง ซึ่งจะได้ปริมาณ IMP เท่ากับ 8.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าอาหารที่ไม่เติมแอล-โพรีน ต่อมาในปี 1998 Tomita และ Nakanishi ได้ทำการเลี้ยงเชื้ออีกตัวคือ *Corynebacterium* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ต้องใช้ แอล-โพรีนและสามารถผลิต IMP ได้ในปริมาณสูงขึ้นเป็น 28.7 กรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ *B. ammoniagenes* KY13184 จะผลิต IMPได้ 26.3 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 น้ำมะพร้าว

2.3.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับน้ำมะพร้าว

มะพร้าว (*Cocos nucifera* Linn.) เป็นพืชในตระกูลปาล์ม ปลูกมากในแถบจังหวัดภาคใต้และภาคกลาง โดยที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีเล็กน้อย มะพร้าวเป็นพืชที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายๆทางอุตสาหกรรม เช่น น้ำใช้ผลิตน้ำส้มสายชูและวุ้นสวรรค์ เนื้อมะพร้าวใช้ทำเป็นมะพร้าวแห้ง เพื่อสกัดน้ำมัน ทำเป็นมะพร้าวเส้นอบแห้ง ใช้ทำเป็นกะทิสด กะลามะพร้าวใช้ทำเป็นถ่าน และเส้นใยใช้ทำพรมมะพร้าว เป็นต้น จากการศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์มะพร้าวในน้ำมะพร้าวสามารถใช้เป็นเครื่องดื่มได้ มีน้ำตาลประมาณร้อยละ 2 การทำวุ้นสวรรค์ น้ำส้มสายชู น้ำมัน และมะพร้าวเส้นอบแห้ง

เนื้อมะพร้าวอ่อนยังใช้บริโภคเป็นของหวานที่ดี ส่วนเนื้อมะพร้าวแก่สามารถนำมาสกัดน้ำกะทิใช้สำหรับปรุงอาหารต่างๆ ได้ ส่วนอื่นๆ ของมะพร้าว เช่น กะลามะพร้าว ใยมะพร้าว ราก ลำต้น ฯลฯ ยังสามารถนำไปใช้แปรสภาพเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้ (ไพบูลย์และคณะ 2527)

2.3.2 ส่วนประกอบของน้ำมะพร้าว

อัจฉรา (2510) ได้ศึกษาเปรียบเทียบหาส่วนประกอบของน้ำตาลในน้ำมะพร้าวอ่อนและน้ำมะพร้าวแก่ พบว่าในน้ำมะพร้าวอ่อน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วยส่วนที่บริโภคได้ 100 กรัม แคลอรี 30 กรัม น้ำ 91.9 กรัม แคลเซียม 22.7 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 6.6 มิลลิกรัม เหล็ก 0.2 มิลลิกรัม วิตามิน ซี 1.6 มิลลิกรัม และในน้ำมะพร้าวแก่ 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วยส่วนที่บริโภคได้ 100 กรัม คาร์โบไฮเดรต 2.1 กรัม เถ้า 0.5 กรัม แคลเซียม 20.7 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 25.4 มิลลิกรัม เหล็ก 0.4 มิลลิกรัม วิตามิน ซี 1.4 มิลลิกรัม วิตามินบีรวม

Gonzalez (1914) ศึกษาเรื่องน้ำตาลในน้ำมะพร้าวแก่และน้ำมะพร้าวอ่อน พบว่าในน้ำมะพร้าวแก่และน้ำมะพร้าวอ่อนจะน้ำตาลอยู่หลายชนิด โดยน้ำมะพร้าวอ่อนปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีน้ำตาล 5.5 กรัม และในน้ำมะพร้าวแก่มี 2 กรัม ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์น้ำตาลจะเห็นว่าเป็นน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนใหญ่ เห็นได้ว่าเมื่อมะพร้าวอ่อนมีการเจริญเติบโตปริมาณน้ำตาลก็มีการเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย และพบว่าในน้ำมะพร้าวแก่และน้ำมะพร้าวอ่อน 100 มิลลิลิตร จะมีของแข็งทั้งหมดแตกต่างกันโดยน้ำมะพร้าวอ่อนจะมีของแข็งทั้งหมด 2.5 กรัม และน้ำมะพร้าวแก่จะมีของแข็งทั้งหมด 6 กรัม ซึ่งจะตรงข้ามกับปริมาณน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vanderbelt (1945) พบว่าในน้ำมะพร้าวแก่ 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วยวิตามินบีรวม ดังนี้คือ กรดนิโคตินิก 0.64 ไมโครกรัม กรดแพนโททีนิก 0.52 ไมโครกรัม ไบโอติน 0.02 ไมโครกรัม ไรโบฟลาวิน 0.01 ไมโครกรัม และกรดโฟลิก 0.003 ไมโครกรัม และยังประกอบด้วยสารอนินทรีย์ซึ่งอยู่ในรูปของโปแตสเซียม

Child and Nathanael (1950) วิเคราะห์น้ำมะพร้าวแก่ในขั้นต้น พบว่าใน 100 มิลลิลิตร มีส่วนประกอบดังนี้ ของแข็งทั้งหมด 4.71 กรัม น้ำตาลทั้งหมด 2.08 กรัม organic solid identified 2.01 กรัม และจากการวิเคราะห์รายละเอียดปรากฏว่าประกอบด้วยของแข็งทั้งหมด 4.93 กรัม ซูโครส 1.14 กรัม กลูโคส 0.12 กรัม ฟรุกโตส 0.83 กรัม น้ำตาลทั้งหมด 3.09 กรัม sulphate ash 0.64 กรัม

Santoso; et.al. (1995) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบและสารอาหารในน้ำมะพร้าว พบว่าในน้ำมะพร้าวแก่มีน้ำหนักแห้งเป็น 6.55 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนที่ไม่บริสุทธิ์ (crude protein) 9.36 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ปริมาณไขมันรวม 2.67 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง คาร์โบไฮเดรต 79.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโตสเท่ากับ 9.24, 26.7 และ 25.7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ พบกรดอินทรีย์พวกทาร์ทาลิก ซิตริก มาลิก อะซิติก เท่ากับ 2.4, 24.8, 30.7 และ 1.3 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และยังได้พบวิตามินและแร่ธาตุต่างๆ ดังนี้ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินซี เท่ากับ 0.01 , 0.01 และ 7.08 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ แร่ธาตุที่พบคือ แคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม โซเดียม ฟอสฟอรัส และ กำมะถัน เท่ากับ 0.57, 0.17, 4.64, 0.29, 0.23 และ 0.07 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี ทองแดง โบรอน และอลูมิเนียม เท่ากับ 14.4, 2.94, 3.51, 5.32, 14.3 และ 11.6 พีพีเอ็ม ตามลำดับ

2.3.3 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยน้ำมะพร้าว

เพ็ญพรรณ (2505) รายงานว่าสามารถทำน้ำส้มสายชูจากน้ำมะพร้าวได้ วิภาและนภา (2517) ทดลองใช้น้ำมะพร้าวเลี้ยงเชื้อราบางชนิดปรากฏว่าน้ำมะพร้าวซึ่งไม่ได้เติมสารอะไรเลย สามารถใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราได้ดีมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ potato dextrose agar สายชลและนภา (2517) รายงานการใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงและเก็บเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกและกรดน้ำส้ม ซึ่งโดยปกติเป็นแบคทีเรียที่เลี้ยงยาก ปรากฏว่าได้ผลดีเช่นกันและเชื้อจะตายช้ากว่าเมื่อเลี้ยงใน MRS-medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรายงานของปราโมทย์ (2517) ซึ่งทดลองเลี้ยงยีสต์ในน้ำมะพร้าวพบว่าในน้ำมะพร้าวมีน้ำตาลและเกลือแร่เพียงพอที่จะเลี้ยงยีสต์ได้ จึงเห็นได้ว่าน้ำมะพร้าวมีองค์ประกอบทางอาหารเพียงพอที่เซลล์จะเจริญได้เป็นอย่างดี

อโณทัย (2519) ได้ทดลองเลี้ยงยีสต์อาหารสัตว์จำนวน 3 ชนิด คือ *Saccharomyces cerevisiae, Candida tropicalis* และ *Candida utilis* โดยใช้น้ำมะพร้าวซึ่งไม่ได้เติมสารใดๆ ได้ดีพอๆ กับเมื่อเลี้ยงใน YM-broth และศึกษาการเจริญของเชื้อ *C. utilis* โดยใช้น้ำมะพร้าวเติมสารบางชนิด พบว่าได้น้ำหนักแห้ง 12.015 กรัมต่อลิตร crude protein 57.106 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง true protein 49.034 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง คาร์โบไฮเดรต 28.880 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และ กรดนิวคลีอิก 8.072 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และเมื่อวิเคราะห์ค่า BOD พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำมะพร้าวสามารถลดค่า BOD ลงได้ 95 เปอร์เซ็นต์

น้ำมะพร้าวสามารถใช้เลี้ยงเชื้อ *Acetobacter aceti* sub sp. *Xylinum* ให้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่าวุ้นสวรรค์ ในการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวจะต้องมีการเติมสาร $NH_4H_2PO_4$ $MgSO_4.7H_2O$ และแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ได้แผ่นวุ้นหนาไม่น้อยกวา 1.5 ซม. นำแผ่นวุ้นมาปรุงแต่งด้วยน้ำเชื่อมใช้รับประทานเป็นของหวานได้ (ไพบูลย์และคณะ 2527)

น้ำมะพร้าวได้ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูแบบหยุดนิ่ง โดยเปรียบเทียบเชื้อระหว่าง *Acetobacter aceti* และ *Acetobacter rancens* ซึ่งจากการทดลองพบว่า *Acetobacter aceti* ให้ผลผลิตสูงกว่า การใช้น้ำมะพร้าวเลี้ยงเชื้อดังกล่าวจะต้องเติมแอลกอฮอล์ในปริมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และ inoculum size 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของน้ำมะพร้าว 1:1 มะพร้าวอายุ 9-12 เดือน ใช้เป็นวัตถุดิบในการศึกษาวิจัยมะพร้าวเส้นอบแห้งโดยใช้เครื่องอบอาหารแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆกัน มะพร้าวอายุ 12 เดือนอบที่ 80 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที จะให้มะพร้าวเส้นอบแห้งดีที่สุด (ไพบูลย์และคณะ 2527)

Overbeeck (1942) ทดลองเลี้ยงต้นอ่อนของ Datura stromonium โดยใช้น้ำมะพร้าว พบว่ามีสารที่ช่วยให้เจริญเติบโตได้ดีและมีอิทธิพลต่อการเจริญซึ่งจะมีอยู่สามชนิด คือชนิดที่หนึ่งเป็นพวกที่ถูกทำลายด้วยความร้อน (thermolabile) และอีกสองชนิดเป็นพวกที่ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน (thermostable) ซึ่งพวกพวกที่ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนจะเป็นพวกฮอร์โมนซึ่งเร่งการเจริญของพืชและพบว่า indoleacetic acid (IAA)

Caplin and Steward (1948) มีการทดลองนำน้ำมะพร้าวมาเป็นอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย เชื้อราและต้นอ่อนของกล้วยไม้ โดยที่ในน้ำมะพร้าวมีสารที่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของต้นอ่อนของพืชและ thermostable growth factor ซึ่งอาจเป็น IAA และเมื่อใช้น้ำมะพร้าวปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15 เปอร์เซ็นต์และ IAA เติมลงใน basal medium เลี้ยงเนื้อเยื่อรากของแครอทจะช่วยเพิ่มกลุ่มของเนื้อเยื่อมากขึ้น

Steward; Caplin and Miller (1951) ได้ใช้น้ำมะพร้าวเลี้ยงเนื้อเยื่อของหัวมันฝรั่ง พบว่าจะทำให้เกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มน้ำหนักสดและเกิด callus ได้ดีขึ้นกว่าเดิม สรุปได้ดังนี้ 1) น้ำมะพร้าวอ่อนที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองเร่งการเจริญได้ดี ส่วนน้ำมะพร้าวที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยนึ่งด้วยความดันไอจะยับยั้งการเจริญ 2) น้ำมะพร้าวแก่จะยับยั้งการเจริญของต้นอ่อน ซึ่งสารที่ยับยั้งนั้นเป็นพวกที่ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน 3) กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของน้ำมะพร้าวแก่ที่มีต่อต้นอ่อนจะมากขึ้นเมื่อเติมเนื้อมะพร้าวแก่ แต่เนื้อมะพร้าวอ่อนส่งเสริมการเจริญของต้นอ่อนอาจจะมีอยู่ในน้ำมะพร้าวและเนื้อมะพร้าว

Carew and Schwarting (1958) ทำการเลี้ยงต้นอ่อนของข้าวไรน์ (*Secale cereale* var. *Canadian Spring*) โดยใช้น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เติมด้วยสารอื่นอีกเล็กน้อย พบว่าสามารถเจริญเติบโตเพิ่มน้ำหนักสดได้มากถึง 94.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักดั้งเดิม

Mauney (1960) ได้ทดลองสูตรอาหารที่ส่วนประกอบของน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอ่อนของฝ้าย พบว่าเพิ่มทั้งอัตราการเจริญของต้นอ่อนและส่งเสริมให้มีการเจริญต่อไปอย่างเป็นปกติได้ โดยจะได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 มิลลิเมตร ซึ่งจะเป็นสองเท่าของสูตรอาหารที่ไม่ได้เติมน้ำมะพร้าว และพบว่าน้ำมะพร้าวที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองสามารถเร่งการเจริญมากกว่าที่นึ่งฆ่าเชื้อได้ดีกว่า

Rao and Avadhani (1963) ทดลองใช้น้ำมะพร้าวเติมลงในสูตรอาหาร พบว่าใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดของกล้วยไม้ *Vanda* spp. ให้งอกเป็นต้นอ่อนได้ดีกว่าอาหารชนิดอื่น ซึ่งทำให้น้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อเพิ่มได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ของเมื่อเริ่มต้นสำหรับการเลี้ยงต้นอ่อนของกล้วยไม้ในขวดนั้นได้มีผู้เติมน้ำมะพร้าวลงไปในสูตรอาหารต่างๆ กัน เช่น Yamada Knudson'C และ modified Vacin and Went medium พบว่าได้ผลดียิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

ยีสต์ที่เรานำมาทำการศึกษาคือ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ได้รับมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย แล้วนำมาทำการเก็บเป็น Stock culture ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส บนอาหาร Yeast - Malt extract agar slant (YM-agar slant) โดยจะทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 2 เดือน เพื่อที่จะนำมาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.2 วัตถุดิบและสารเคมี

- น้ำมะพร้าวแก่
- น้ำตาลกลูโคส
- น้ำตาลซูโครส
- เปปโตน
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)
- ยีสต์สกัด
- มอลต์สกัด
- วุ้นผง
- น้ำกลั่น
- แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- กรดซัลฟูลิกเข้มข้น
- สารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (ภาคผนวก ข-2)
- กรดไรโบนิวคลีอิกจาก Tolura yeast (Sigma Chemical Co.)
- กรดไฮโดรคลอลิกเข้มข้น
- สารละลายออร์ซินอล 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข-3)
- เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข-3)
- กรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) (ภาคผนวก ข-3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์

- ไมโครปิเปตขนาด 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
- ทิปขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร
- หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 10 มิลลิลิตร
- คิวเวตแก้ว
- จานเพาะเชื้อ
- ปิเปตขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ขนาด 60, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร
- ฟลาสก์ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
- ขวดปรับปริมาตรขนาด 25, 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
- โถดูดความชื้น
- ชุดกรอง
- ชุดถังหมักขนาด 10 ลิตร (รุ่น Biostat C ยี่ห้อ B. Braun Biotech international)
- อ่างน้ำร้อน (ยี่ห้อ Clifton)
- หม้อนึ่งความดัน (ยี่ห้อ Hirayama)
- สเปกโตโฟรโตมิเตอร (รุ่น DR/4000V ยี่ห้อ HACH)
- เครื่องเขย่า (ยี่ห้อ Gallenkamp)
- เครื่องชั่งสาร (ยี่ห้อ Sartorius)
- เครื่องวัดพีเอช (รุ่น HM-7E ยี่ห้อ TOA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (รุ่น Falcon 6/300 ยี่ห้อ Sanyo)
- ตู้ปลอดเชื้อ (ยี่ห้อ Insco)
- ตู้อบลมร้อน (รุ่น SD 53 ยี่ห้อ WTB binder)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

ทำการเตรียมอาหาร YM ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร และมอลต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 เติมอาหารลงไปปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ที่มีความจุ 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่หม้อความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเขี่ยเชื้อยีสต์ *Hansenula anomala* TISTR 5082 อายุ 24 ชั่วโมง จาก YM-agar slant จำนวน 1 ลูป ใส่ลงในอาหารที่ YM ที่เตรียมไว้ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไป วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วทำการเจือจางกล้าเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.3 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองขั้นต่อๆ ไป

3.4.2 ศึกษาปริมาตรน้ำมะพร้าวที่เหมาะสม

เตรียมสูตรอาหารดัดแปลงซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร และมอลต์สกัด 1 กรัมลิตร เติมน้ำมะพร้าวปริมาณต่างๆ กันดังนี้คือ 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 เติมอาหารแต่ละชนิดลงไปปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ที่มีความจุ 250 มิลลิลิตร โดยแต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่หม้อความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.4.1 ลงไปในแต่ละฟลาสก์ ฟลาสก์ละ 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักแห้ง

จากนั้นเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์ในสูตรอาหารดัดแปลงเดียวกันที่เติมน้ำมะพร้าวในปริมาณต่างๆ กันแต่ไม่เติมยีสต์สกัดและมอลต์สกัด เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
62185

3.4.3 ศึกษาหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม

นำสูตรอาหารที่ให้ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์สูงสุดในข้อ 3.4.2 ซึ่งประกอบด้วย น้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร เติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณต่างๆ กัน ดังนี้คือ 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 เติมอาหารแต่ละชนิดลงไปปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ที่มีความจุ 250 มิลลิลิตร โดยแต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่หม้อความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.4.1 ลงไปในแต่ละฟลาสก์ ฟลาสก์ละ 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักแห้ง เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมไปใช้ในเลี้ยงระดับถังหมักต่อไป

3.4.4 ศึกษาการเพาะเลี้ยงในถังหมัก

นำสูตรอาหารที่ให้ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์สูงสุดในข้อ 3.4.3 มาทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร เติมอาหารสูตรเหมาะสมจำนวน 5 ลิตร ซึ่งประกอบด้วยน้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 ใส่ลงในถังหมักแล้วทำการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 25 นาที เมื่ออาหารเย็นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.4.1 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร (5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรของอาหาร) ลงในถังหมักที่มีอาหารที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้ว ทำการเลี้ยงในถังหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งจะแยกการเลี้ยงในถังหมักเป็น 4 ครั้งๆ ละ 72 ชั่วโมง โดยจะทำการศึกษาถึงอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนดังนี้

- อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม
- อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม
- อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม
- อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม

เมื่อกำหนดอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศเรียบร้อยแล้ว แล้วทำการเลี้ยงต่อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.5.1 หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข-1)

3.5.2 วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-Sulphulic acid (ภาคผนวก ข-2)

3.5.3 วิเคราะห์หาปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์โดยวิธีออร์ซินอล (ภาคผนวก ข-3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

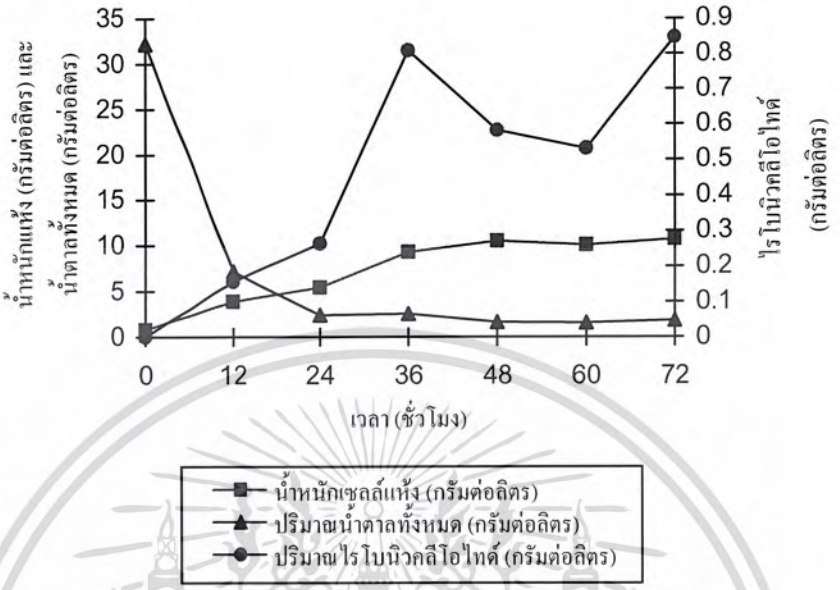
4.1 ผลการศึกษาการเลี้ยงยีสต์ในระดับฟลาสก์

4.1.1 ผลการศึกษาปริมาตรของน้ำมะพร้าว

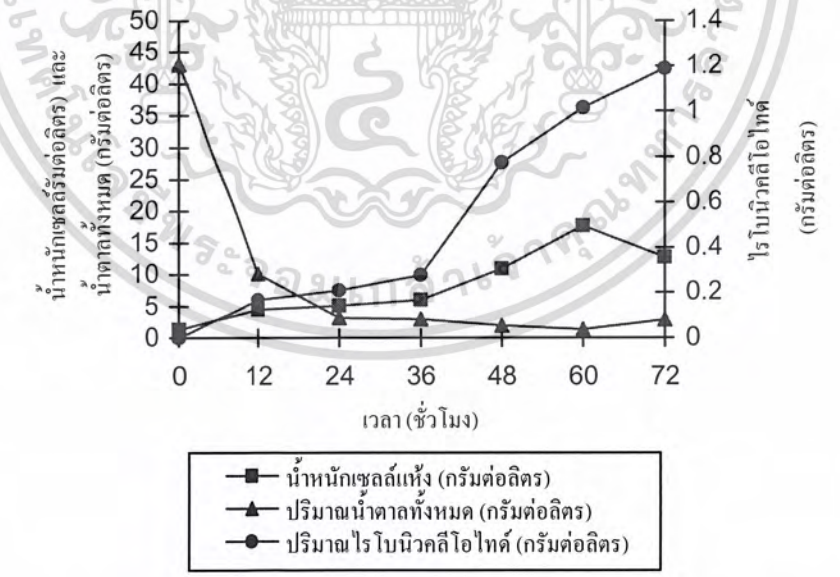
การเลี้ยงเชื้อยีสต์ในสูตรอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวปริมาตรต่างๆ กัน พบว่าที่ปริมาตรน้ำมะพร้าว 100 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1.02 กรัมต่อลิตร และมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 14.90 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.3) ซึ่งได้ผลการทดลองใกล้เคียงกับที่ปริมาตรน้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาตรไรโบนิวคลีโอไทด์สูงสุดเท่ากับ 1.19 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 มีน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 17.72 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2) และที่ปริมาตรน้ำมะพร้าว 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุดเท่ากับ 0.85 กรัมต่อลิตร และมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 10.71 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1) สาเหตุที่ปริมาตรน้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์และ 100 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์ และน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.2) เพราะน้ำมะพร้าวมีสารอาหารและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อยีสต์นอกจากสารอาหารและแร่ธาตุแล้วในน้ำมะพร้าวยังประกอบด้วยน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์ สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ทำให้ได้ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์ และน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น (Santaso; et.al. 1995) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของวิภาและนภา (2517) ทดลองใช้น้ำมะพร้าวเลี้ยงเชื้อราบางชนิดปรากฏว่าน้ำมะพร้าวซึ่งไม่ได้เติมสารอะไรเลยสามารถใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราได้ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับ potato dextrose agar

เมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติของสูตรอาหาร YM ดัดแปลงที่มีปริมาตรน้ำมะพร้าว 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1) ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาตรน้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์ มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์เพราะมีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์และน้ำหนักแห้งสูงสุด เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

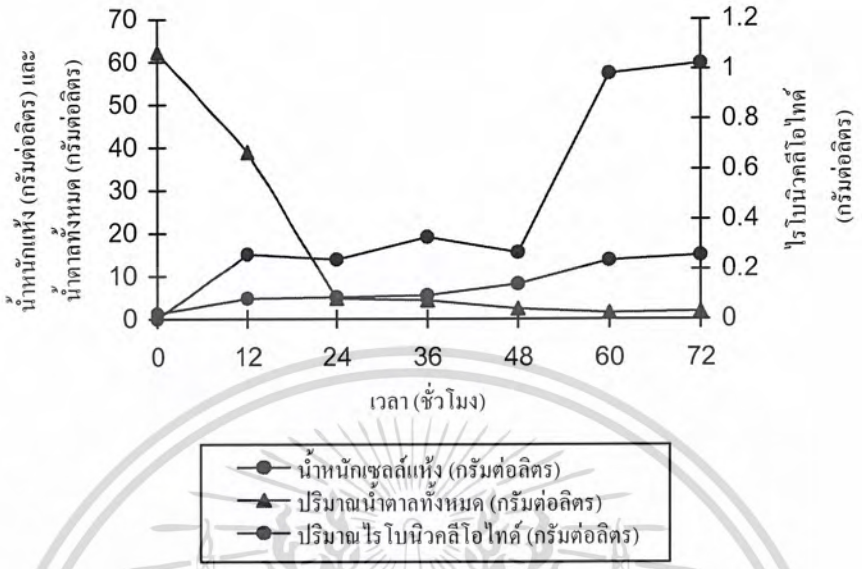


รูปที่ 4.1 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 50 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.2 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสูงสุดของไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวปริมาตรต่างๆ กัน

ปริมาตรน้ำมะพร้าว (ร้อยละ)	ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)
50	0.847[a]
75	1.188[a]
100	1.022[a]

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยสูงสุดของไรโบนิวคลีโอไทด์ที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงน้ำหนักแห้ง พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวที่มีปริมาตรต่างๆ กัน

น้ำมะพร้าว (%)	เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ไรโบนิวคลีโอไทด์ (กรัมต่อลิตร)
50	0	5.5	0.75	32.15	0.00
	12	3.5	3.89	7.17	0.16
	24	3.1	5.40	2.40	0.26
	36	2.5	9.30	2.54	0.81
	48	2.4	10.48	1.65	0.58
	60	2.4	10.09	1.56	0.53
	72	2.4	10.71	1.81	0.85
75	0	5.5	1.31	43.04	0.00
	12	3.8	4.49	10.11	0.17
	24	3.3	5.11	3.17	0.21
	36	3.2	5.93	2.90	0.28
	48	2.5	10.91	1.92	0.77
	60	2.4	17.72	1.35	1.01
	72	2.4	12.80	2.85	1.19
100	0	5.5	1.27	62.28	0.00
	12	4.0	4.72	38.86	0.26
	24	3.4	5.12	4.79	0.24
	36	3.4	5.51	4.32	0.33
	48	3.2	8.23	2.38	0.27
	60	2.5	13.78	1.43	0.99
	72	2.5	14.90	1.81	1.02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

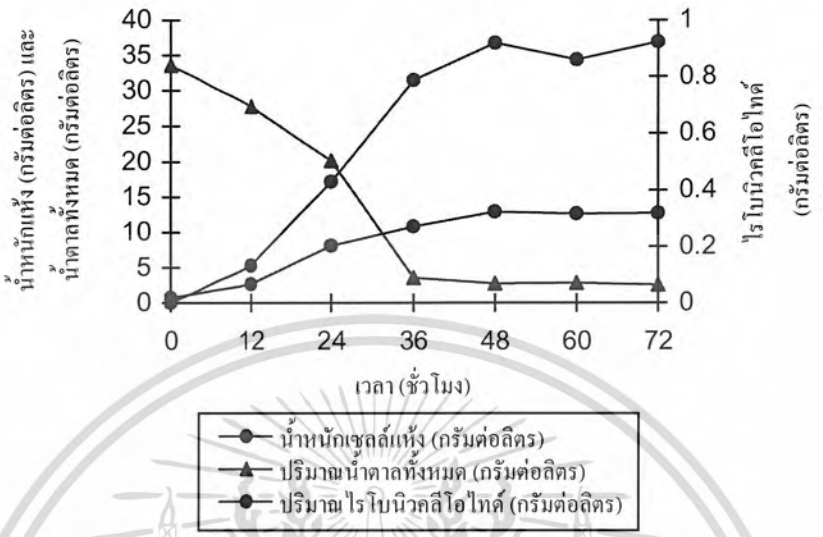
4.1.2 ผลการศึกษาปริมาตรน้ำมะพร้าวที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด

ขั้นตอนนี้ได้ทำการเลี้ยงยีสต์โดยใช้สูตรอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวปริมาตรต่างๆ กัน ที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด พบว่าที่ปริมาตรน้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณ ไรโบนิวคลีโอไทด์มากที่สุดเท่ากับ 1.06 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 15.67 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.5) ที่ปริมาตรน้ำมะพร้าว 50 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.92 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 12.88 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4) และที่ปริมาตรน้ำมะพร้าว 100 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์น้อยสุดเท่ากับ 0.88 กรัมต่อลิตรและมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 12.59 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.6) สาเหตุที่ปริมาตรน้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์มีปริมาณไรโบ-นิวคลีโอไทด์และน้ำหนักแห้งสูงสุด (ตารางที่ 4.4) เพราะในน้ำมะพร้าวเป็นแหล่งที่มีสารอาหารและแร่ธาตุสำคัญที่ยีสต์สามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ ทำให้มีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์และน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น (Santoso; et.al. 1995) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ อโณทัย (2519) ได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อยีสต์อาหารสัตว์จำนวน 3 ชนิด คือ *Saccharomyces cerevisiae, Candida tropicalis* และ *Candida utilis* โดยใช้น้ำมะพร้าวที่ไม่เติมสารใดๆ ซึ่งได้ผลดีพอๆ กับการเลี้ยงเชื้อในอาหาร YM

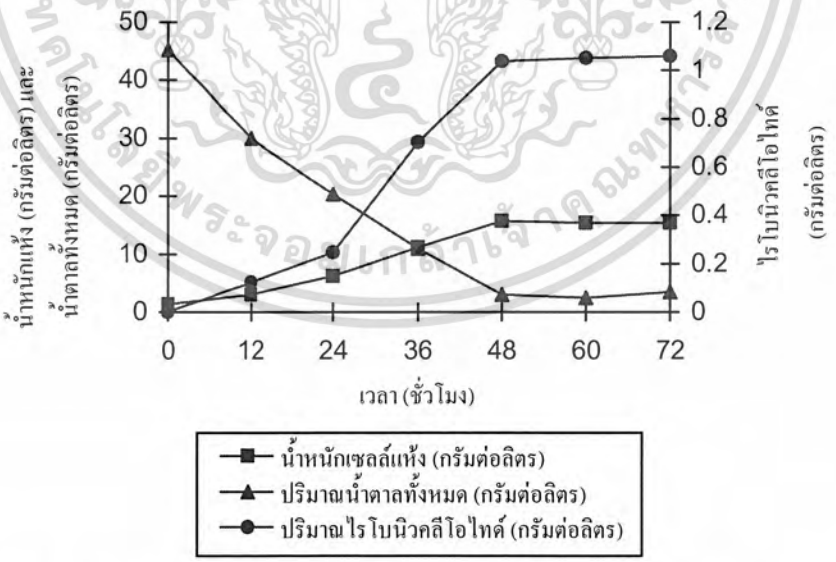
เมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติของสูตรอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3) ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์ เพราะมีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์และน้ำหนักแห้งสูงสุด

นำผลการทดลองมาเปรียบเทียบค่าทางสถิติระหว่างสูตรอาหาร YM ดัดแปลงที่มีปริมาตรน้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์ ที่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด (ตารางที่ 4.2) กับที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด (ตารางที่ 4.4) พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.5) ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์ที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไปเนื่องจากมีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์และน้ำหนักแห้งสูงสุดและเป็นการลดต้นทุนในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

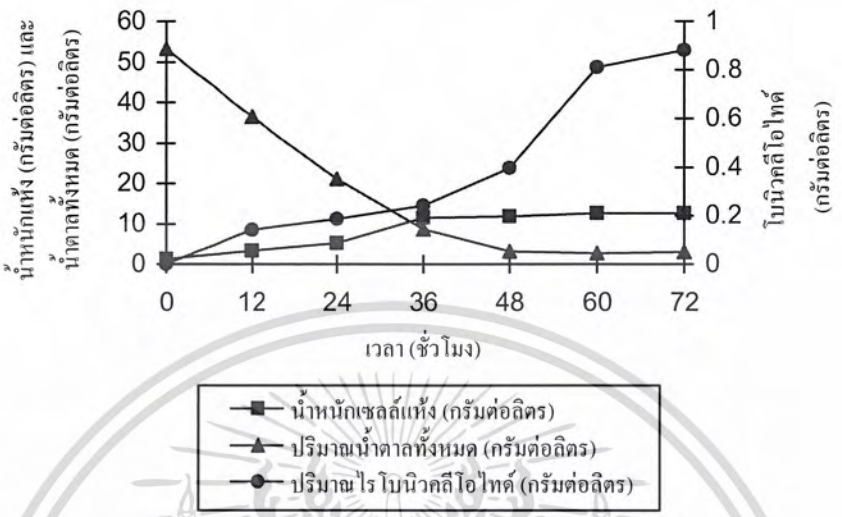


รูปที่ 4.4 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด



รูปที่ 4.5 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสูงสุดของไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวปริมาตรต่างๆ กัน ที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด

ปริมาตรน้ำมะพร้าว (ร้อยละ)	ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)
50	0.924[a]
75	1.058[a]
100	0.882[a]

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยสูงสุดของไรโบนิวคลีโอไทด์ที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงน้ำหนักแห้ง พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวที่มีปริมาตรต่างๆ กัน ที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด

น้ำมะพร้าว (%)	เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ไรโบนิวคลีโอไทด์ (กรัมต่อลิตร)
50	0	5.2	0.71	33.54	0.00
	12	3.8	2.60	27.72	0.13
	24	2.5	8.08	20.13	0.43
	36	2.2	10.81	3.57	0.79
	48	2.2	12.88	2.75	0.92
	60	2.2	12.62	2.84	0.86
	72	2.2	12.71	2.54	0.92
75	0	5.1	1.32	45.19	0.00
	12	4.1	2.95	30.01	0.12
	24	3.3	6.17	20.38	0.25
	36	2.6	11.20	10.98	0.70
	48	2.2	15.67	3.04	1.04
	60	2.2	15.34	2.48	1.05
	72	2.2	15.33	3.47	1.06
100	0	5.1	1.29	53.17	0.00
	12	4.2	3.24	36.58	0.14
	24	3.3	5.22	21.14	0.19
	36	3.4	11.54	8.73	0.24
	48	3.4	11.76	3.10	0.40
	60	2.8	12.57	2.71	0.81
	72	2.9	12.59	3.00	0.88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสูงสุดของไรโบนิวคลีโอไทด์ในสูตรอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวที่มีปริมาตรต่างๆ กัน ที่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัดกับไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด

ยีสต์สกัดและมอลล์สกัด	ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)
เติม	1.188[a]
ไม่เติม	1.058[a]

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยสูงสุดของไรโบนิวคลีโอไทด์ที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

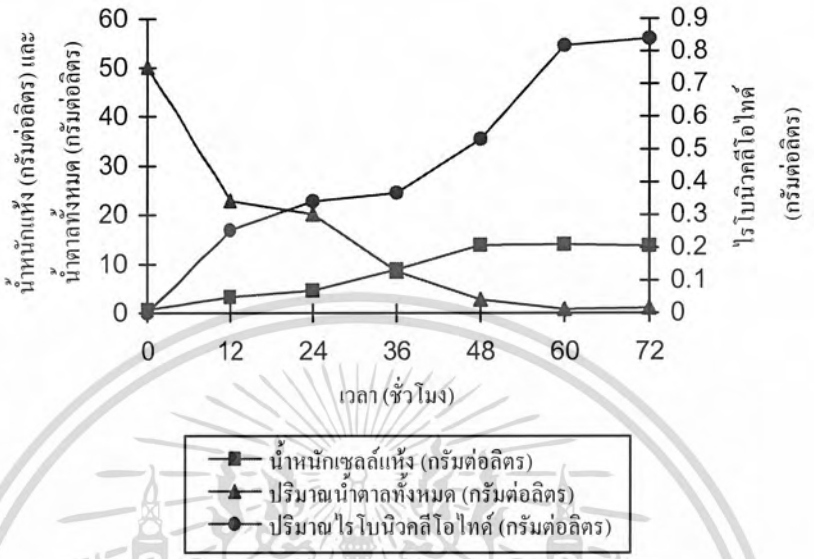
4.1.3 ผลการศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 4.1.2 จึงได้นำสูตรอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด มาทำการศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม พบว่าที่ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร พบว่าในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.84 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 14.05 กรัมต่อลิตร (ตาราง 4.7 และรูปที่ 4.7) ที่ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 มีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.87 กรัมต่อลิตร และมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 16.17 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.8) และที่ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 7 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.88 กรัมต่อลิตร และมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 16.18 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.9) จะเห็นได้ว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร มีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์ และน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร ก็เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อยีสต์เพราะแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้เนื่องจากไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารสำคัญต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ซึ่งยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้แอมโมเนียมได้ดี โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟต (Rose and Harison 1969)

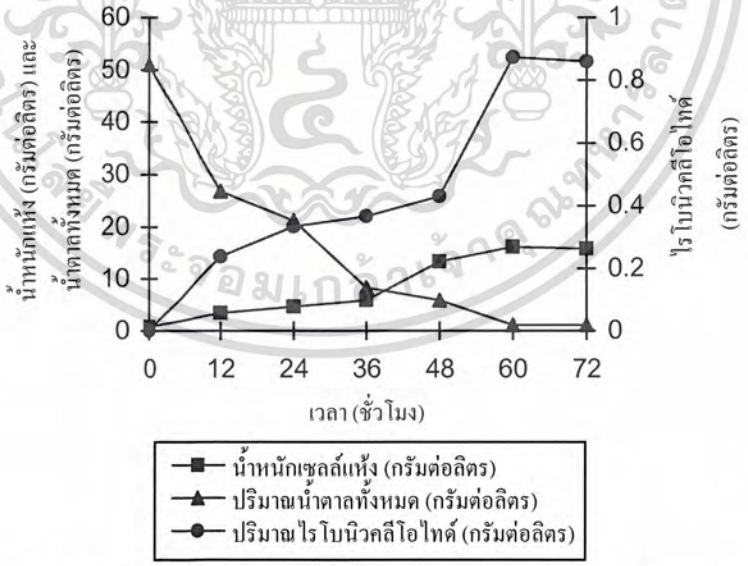
เมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติของสูตรอาหาร YM ดัดแปลงที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.6) ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร มาใช้ในการเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการทดลอง

ดังนั้นจึงเลือกใช้สูตรอาหาร YM ดัดแปลงที่มีปริมาตรน้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร เป็นส่วนประกอบ เพื่อศึกษาในระดับถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 10 ลิตร แบบแบตช์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

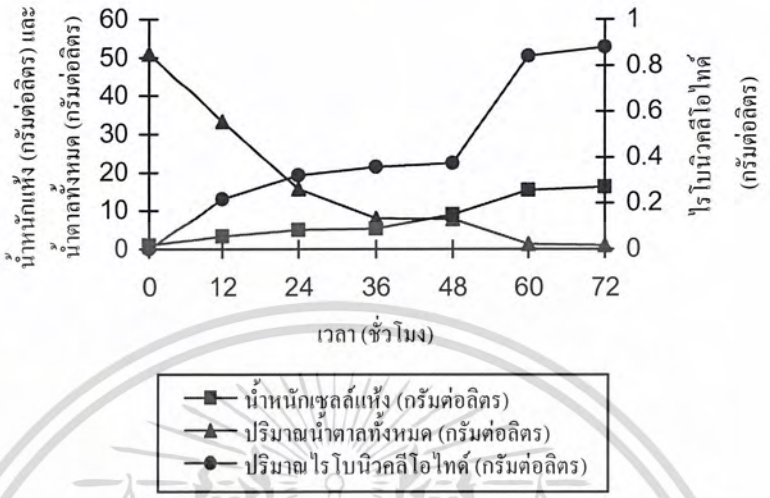


รูปที่ 4.7 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.8 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 7 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสูงสุดของไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีปริมาณต่างๆ กัน

แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)
3	0.840[a]
5	0.873[a]
7	0.879[a]

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยสูงสุดของไรโบนิวคลีโอไทด์ที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงน้ำหนักแห้ง พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าว 75 เปอร์เซ็นต์ ไม่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณต่างๆ กัน

แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ไรโบนิวคลีโอไทด์ (กรัมต่อลิตร)
3	0	5.2	0.69	50.12	0.00
	12	3.7	3.26	22.91	0.25
	24	2.5	4.62	20.19	0.34
	36	2.5	8.92	8.50	0.37
	48	2.5	13.88	2.80	0.53
	60	2.1	14.05	0.77	0.82
	72	2.0	13.76	1.10	0.84
5	0	5.2	0.73	50.89	0.00
	12	4.0	3.48	26.77	0.24
	24	3.3	4.70	21.20	0.33
	36	3.3	5.93	8.30	0.37
	48	3.0	13.38	5.93	0.43
	60	2.3	16.17	1.06	0.87
	72	2.3	15.75	1.08	0.86
7	0	5.2	0.99	51.02	0.00
	12	4.2	3.41	33.29	0.22
	24	3.3	4.97	15.82	0.32
	36	3.3	5.38	8.12	0.36
	48	3.1	9.00	7.92	0.37
	60	2.6	15.44	1.33	0.84
	72	2.5	16.18	1.07	0.88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาการเลี้ยงยีสต์ในระดับถังหมักแบบใบพัดกวน

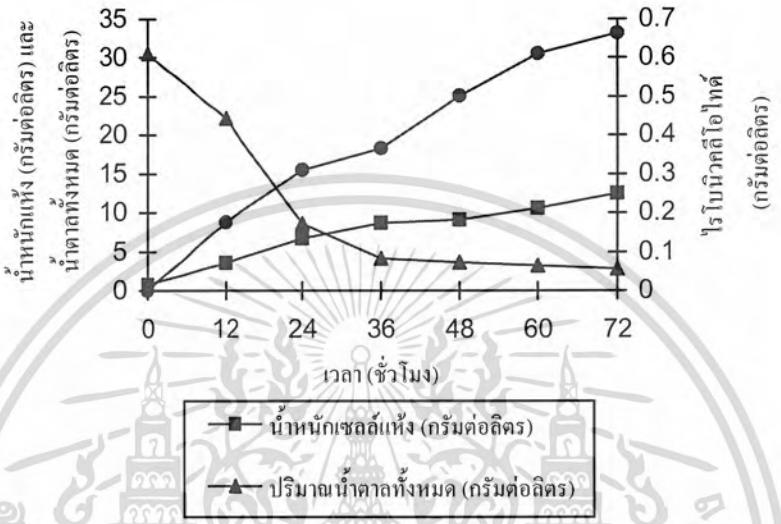
นำสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงระดับฟลาสก์ มาทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์ ในระดับถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบแบตช์ โดยศึกษาอัตราการกวนระดับต่างๆ กัน คือ 200 และ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศต่างๆ กัน คือ 1.0 และ 1.5 วีวีเอ็ม

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการเลี้ยงที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการ ให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม ในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.66 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักแห้งเท่ากับ 12.48 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.10) ในขณะที่อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.73 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักแห้งเท่ากับ 15.53 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.11) เมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 วีวีเอ็ม ในชั่วโมงที่ 60 มีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.75 กรัมต่อลิตร และในชั่วโมงที่ 72 มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 16.78 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.12) ในขณะที่ในอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ในชั่วโมงที่ 60 มีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.92 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 18.54 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.13) จากผลการทดลองพบว่า อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม มีปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์และน้ำหนักแห้งมากกว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม เมื่อเพิ่มอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 มีผลทำให้ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์และน้ำหนักแห้ง มากกว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม เช่นเดียวกับที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศจะทำให้ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์และน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากความเร็วรอบที่สูงขึ้นสามารถตีฟองอากาศให้กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอและทั่วถึงทำให้ทุกจุดในถังหมักมีออกซิเจนทั่วถึงกันหมด ทำให้เชื้อได้รับออกซิเจนเพียงพอในการเจริญเติบโตทำให้ได้ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์มากขึ้น

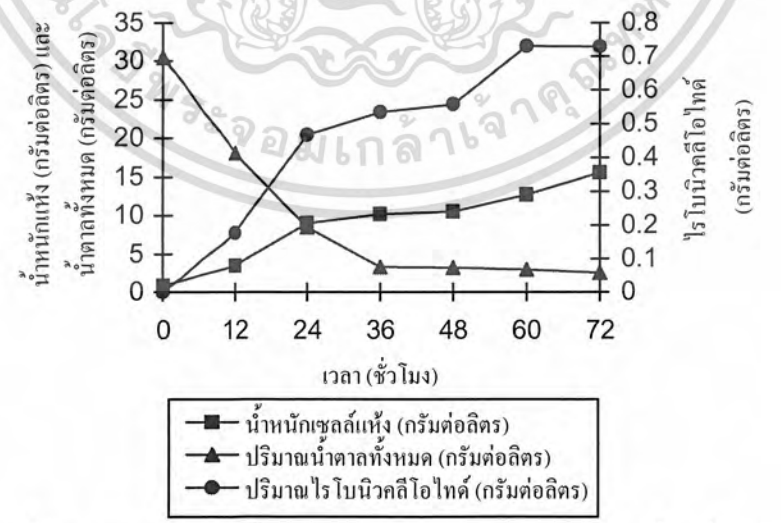
เมื่อพิจารณาจากค่าสถิติ (ตารางที่ 4.12) พบว่าสภาวะที่มีอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 และ 1.5 วีวีเอ็ม และที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 และ 1.5 วีวีเอ็ม จะให้ปริมาณไรโบนิวคลีไทด์ที่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นสภาวะที่มีอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็มกับอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม จะให้ปริมาณไรโบ-นิวคลีไทด์ที่ไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เพราะฉะนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในระดับถังหมักแบบใบพัดกวนแบบแบตช์ เพื่อใช้ผลิตไรโบ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิวคลีโอไทด์ได้ดีที่สุดคือ สภาวะที่มีอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม จะได้ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.92 กรัมต่อลิตร

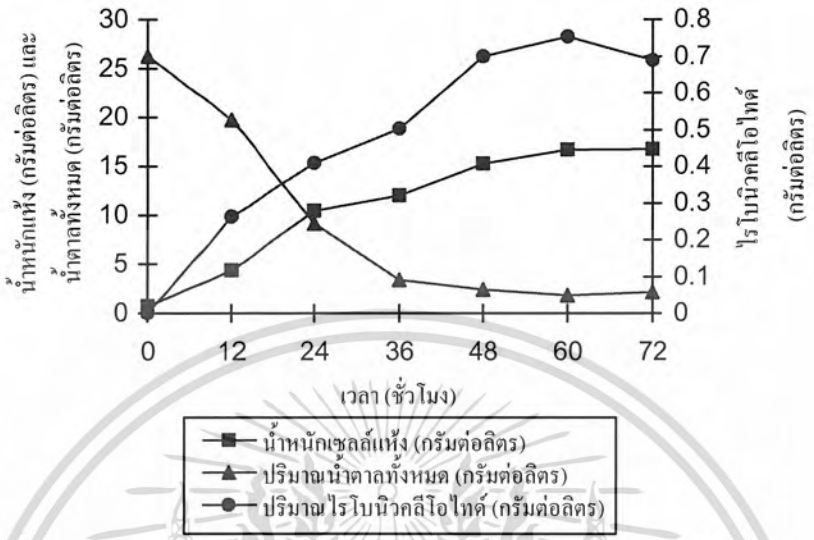


รูปที่ 4.10 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่อัตราการให้อากาศ 1 วีวีเอ็ม และอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

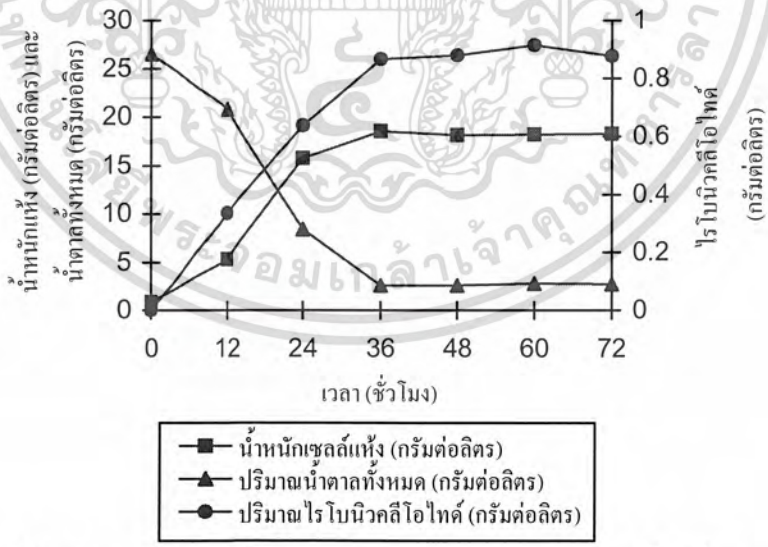


รูปที่ 4.11 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม และอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.13 แสดงน้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลงที่อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม และอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงไรโบนิวคลีโอไทด์ น้ำหนักแห้ง ออกซิเจนละลาย พีเอช และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลง ที่อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็มและอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ออกซิเจนละลาย (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ไรโบนิวคลีโอไทด์ (กรัมต่อลิตร)
200	0	5.17	100.0	0.77	30.57	0.00
	12	4.16	0.0	3.54	22.15	0.18
	24	3.19	0.0	6.73	8.64	0.31
	36	3.27	0.0	8.65	4.12	0.37
	48	3.31	0.0	9.12	3.65	0.50
	60	3.35	0.0	10.63	3.24	0.61
	72	3.47	0.0	12.48	2.82	0.66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงไรโบนิวคลีโอไทด์ น้ำหนักแห้ง ออกซิเจนละลาย พีเอช และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลง ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม และอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ออกซิเจนละลาย (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ไรโบนิวคลีโอไทด์ (กรัมต่อลิตร)
200	0	5.16	100.0	0.80	30.45	0.00
	12	4.61	0.3	3.42	18.10	0.18
	24	3.03	0.0	8.97	8.47	0.47
	36	2.96	0.0	10.17	3.26	0.54
	48	2.97	0.0	10.52	3.18	0.56
	60	2.99	7.2	12.67	2.92	0.73
	72	2.62	8.9	15.53	2.53	0.73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงไรโบนิวคลีโอไทด์ น้ำหนักแห้ง ออกซิเจนละลาย พีเอช และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลง ที่อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็มและอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ออกซิเจนละลาย (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ไรโบนิวคลีโอไทด์ (กรัมต่อลิตร)
400	0	5.14	100.0	0.74	26.20	0.00
	12	4.11	1.0	4.37	19.75	0.26
	24	2.68	36.7	10.42	9.15	0.41
	36	2.22	73.4	12.03	3.37	0.50
	48	2.24	92.9	15.28	2.44	0.70
	60	2.24	95.0	16.70	1.82	0.75
	72	2.25	95.3	16.78	2.16	0.69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 แสดงไรโบนิวคลีโอไทด์ น้ำหนักแห้ง ออกซิเจนละลาย พีเอช และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในอาหาร YM ดัดแปลง ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็มและอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ออกซิเจนละลาย (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ไรโบนิวคลีโอไทด์ (กรัมต่อลิตร)
400	0	5.14	100.0	0.85	26.46	0.00
	12	3.77	2.7	5.27	20.82	0.34
	24	2.37	25.3	15.73	8.39	0.64
	36	2.21	90.1	18.54	2.56	0.87
	48	2.20	99.5	18.17	2.57	0.88
	60	2.33	100.0	18.21	2.81	0.92
	72	2.26	100.0	18.29	2.73	0.88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสูงสุดของไรโบนิวคลีโอไทด์เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM ดัดแปลงที่มีอัตราการให้อากาศต่างๆ กันและอัตราการกวนต่างๆ กัน

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	อัตราการให้อากาศ (วีวีเอ็ม)	ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)
200	1.0	0.664[c]
200	1.5	0.730[b]
400	1.0	0.753[b]
400	1.5	0.915[a]

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยสูงสุดของไรโบนิวคลีโอไทด์ที่กำกับไว้ในแต่ละคอลัมน์ด้วยอักษรเหมือนกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์จากเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาพบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วย น้ำมะพร้าวปริมาตร 75 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 5.0

จากการเลี้ยงเชื้อ *Hansenula anomala* TISTR 5082 ในระดับฟลาสก์แบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.84 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 และน้ำหนักแห้งเท่ากับ 14.05 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไรโบนิวคลีโอไทด์ในระดับถังหมักแบบแบตช์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดียวกันในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยมีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ ได้ทำการศึกษาอัตราการกวนที่ 200 และ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 และ 1.5 วีวีเอ็ม พบว่าอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์สูงสุดเท่ากับ 0.92 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 และน้ำหนักแห้งเท่ากับ 18.54 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36

ข้อเสนอแนะ

- การหาไรโบนิวคลีโอไทด์จากการทดลองนี้เป็นการวิเคราะห์โดยรวม หากต้องการหาสารในรูป IMP และ GMP ซึ่งเป็นสารปรุงรสจะต้องทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่ละเอียดกว่านี้
- หลังจากสกัดไรโบนิวคลีโอไทด์ ควรใช้เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease) ร่วมด้วย เพื่อเพิ่มผลผลิตให้มีปริมาณมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ปราโมทย์ ศิริโรจน์. 2517. **การทดลองเลี้ยงเชื้อยีสต์ด้วยน้ำมะพร้าว** กรุงเทพฯ: ปัญหาพิเศษปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์และอักษรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรงาม ลิ้มตระกูล. 2541. **ชีวเคมีของกรดนิวคลีอิก**. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เพ็ญพรรณ พุ่มชูศรี. 2505. **การทำน้ำส้มจากผลไม้และน้ำผลไม้** กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี คณะกสิกรรมและสัตว์บาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, นงลักษณ์ สุทธิวนิช, ไพศาล วุฒิจำนง และ นัยทัศน์ ภู่ศรัณย์. 2527. **การใช้มะพร้าวและผลพลอยได้ทางอุตสาหกรรมเกษตรอย่างมีประสิทธิภาพของภาคใต้**. หาดใหญ่: คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ภักดี โพธิศิริ. 2521. เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับวัตถุปรุงแต่งรสอาหารและผงชูรสบางประเภท. **การอนามัยและสิ่งแวดล้อม**. 1(3): 99-107.

วราภรณ์ วรเศรต. 2526. **การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์ในอาหารโดย HPLC**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิภา ผลสมบุญ และนภา โล่ห์ทอง. 2517. การใช้กล้วยชนิดต่างๆ มันเทศและน้ำมะพร้าวแกงเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา **รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยาครั้งที่ 13 สาขาพืช** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สายชล ชิวปรีชา และนภา โล่ห์ทอง. 2517. การใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงและเก็บเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกและกรดน้ำส้ม **รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ครั้งที่ 13 สาขาพืช** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2547. **แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ: เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์**. นครปฐม: สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดล.

อโณทัย คมเศวต. 2519. **การศึกษาการเจริญของยีสต์โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ**. กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัจฉรา มีวาสนา. 2510. การแสดงส่วนประกอบของอาหารพื้นเมืองของประเทศ **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.** 9(1-4): 1-29.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Caplin, S.M. and Steward, F.C. 1948. Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. **Science** 108(10):655-657.

Carew, D.P. and Schwarting, A.E. 1958. Production of rye embryo callus. **Bot. Gaz.** 199(4): 237-239.

Child, R. and Nathaneal, W.R.N.1950. Changes in the sugar composition of coconut water during maturation and germination. **J. Sci. Food Agric.**, 1: 326-329.

Dubois, M., Gillrs, K.A., Hamiton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, S. 1956. Colorimetric method for Determination of sugars and Related Substances. **Anal. Chem**. 28: 350-356.

Gonzalez, B.M. yS. 1914. *Plilippine Agric. & Forester*. 3, 25. Cited in Child, R. and Nathanael, W.R.N.1950. Changes in the sugar composition of coconut water during maturation and germination. **J. Sci. Food Agric.**, 1: 326-329.

Herbert, D., Phipps, P. J.and Strange, R. E. 1971. Chemical analysis of microbial cells, pp. 308-328. *In* Norris, J. R. and Ribbons, D.W.. **Methods in Microbiology Volume 5B**. Academic Press, London.

Ishibashi, M., Hirauma, H. and Yamada, Y. (1986). **Jpn. Kokai Tokkyo Koho** 61132195.

Kim, J.H., Lee, B.H. and Lee, J.S. 2001. Production of ribonucleotides by autolysis of *Hansenula anomala* grown on Korean ginseng steaming effluent. **Bioscience and Bioengineering**. Vol.93, No.3, pp. 318-321.

Kuninaka, A., Masajiro, K. and Sakaguchi,,K.I. 1964. History and development of flavor nucleotides. **Food Technol**. 18(3): 287-293.

Kurzman, C. H. and Loren, B. S. 1964. The flavor modifying properties of disodium inosinate. **Food Technol**. 18(9): 1467-1469.

Mauney, J.R. 1960. The culture in vitro of immature cotton embryos. **Bot.Gaz.** 122:205-209.

Overbeeck,V.J. 1942. **Cold spr. Harb. Symp. quant. Biol**. 10:126. Cited in Caplin, S.M. and Steward, F.C. 1948. Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. **Science**. 108(10):655-657.

Rao, A.N. and Avadhani, P.N. 1963. Some aspects of vitro culture of Vanda seeds. **Proceedings of the fourth world orchid conference**. p. 194-202.

Ronald, M.A. 2000. **Yeast Fermentation Broth**, In : Handbook of microbiology media. Lawrence, C.P. USA : CPC Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง ทำซ้ำ หรือเผยแพร่ต่อเชิงการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ลบเครื่องหมายการค้าและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rose, A.H. and Harrison, J.S. 1969. **The Yeasts.** Vol.1. Biology of yeast. Academic Press. London and New York.

Santoso, U., Kubo, K., Ota, T., Tadokoro, T. and Maekawa, A. 1995. Nutrient composition of *kopyor* coconuts (*Cocos nucifera* L.). **Food chem.** Vol. 57, No. 2, pp. 229-304.

Shimizu, K., Tsuchida, T., Kawashima, N., Tanaka, T. and Enei, H. (1983b). **Jpn. Kokai Tokkyo Koho** 58175492.

Steward, F.C., Caplin, S.M. and Miller, F.K. 1951. A Tissue culture from potato tuber: the synergistic action of 2,4-D and coconut milk. **Science**. 113:518-520.

Tomita, K., Nakanishi, T., Teshiba, S. and Furuya, A. (1990a). **Jpn. Kokai Tokkyo Koho** 02234690.

Tsuchida, T., Shimizu, K., Kawashima, N. and Enei, H. (1984). **Jpn. Kokai Tokkyo Koho** 59028470.

Vanderbelt, J.M. 1945. Nutritive value of coconut. **Nature**. 156: 174-175. Cited in Child, R. 1964. **Coconut**. P. 198-200.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

1. Yeast Malt Extract Agar (YM Agar) (Ronald, 2000)

ส่วนผสม ต่อ 1 ลิตร

- ผงวุ้น 20 กรัม
- กลูโคส 10 กรัม
- เปปโตน 5 กรัม
- ยีสต์สกัด 3 กรัม
- มอลต์สกัด 3 กรัม

พีเอช 6.5 ± 0.2

หมายเหตุ : ถ้าต้องการเตรียม YM-broth ไม่ต้องเติมผงวุ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. การหาน้ำหนักแห้ง

นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากการกรองมาอบในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเข้าเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำไปชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง นำค่าที่ได้ไปหักลบกับน้ำหนักแห้งของกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแห้งแน่นอน และคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

2. การวิเคราะห์หาน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol – sulphuric acid (Dubois; et.al. 1956)

วิธีนี้เป็นการใช้กรดเข้มข้นย่อยให้พอลิแซ็กคาไรด์เป็นโมเลกุลเดี่ยวซึ่งสามารถจะวัดน้ำตาลได้ประมาณ 1 – 100 ไมโครกรัมและเป็นวิธีที่รวดเร็วที่จะใช้วิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดแบบไม่เฉพาะเจาะจง เพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิวซ์ หรือ neutral sugar ทั้งชนิดที่เป็นโมโนแซ็กคาไรด์และพอลิแซ็กคาไรด์ ก็สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ได้

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์

ละลายฟีนอล 5 กรัม ในน้ำกลั่น คนจนละลายหมด ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.1.2 กรดซัลฟูริกเข้มข้น

2.1.3 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ละลายน้ำตาลกลูโคสในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ คือ 10, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 วิธีการวิเคราะห์

2.2.1 นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลมา 1 มิลลิลิตร

2.2.2 เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.2.3 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตรตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เขย่าแรงๆ ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อีก 20 นาที

2.2.4 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากกราฟมาตรฐาน

2.2.5 ทำแบลงก์โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างและดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2-2.2.4

2.3 เขียนกราฟมาตรฐาน

2.3.1 นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 10, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาอย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ตามลำดับ

2.3.2 ทำตามขั้นตอนที่ 2.2.2-2.2.5

2.3.3 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังแสดงในรูปที่ ข-1

2.4 การคำนวณ

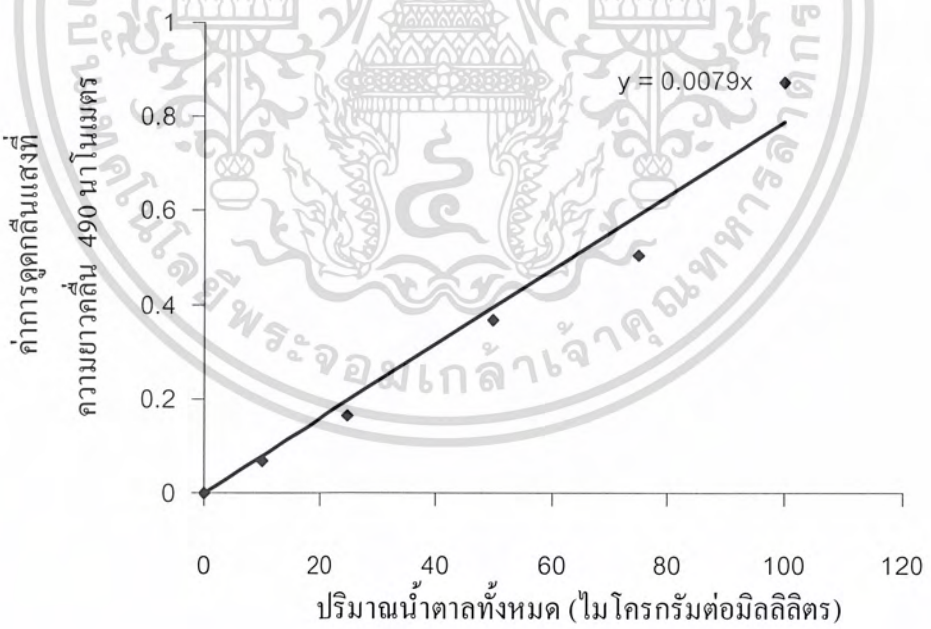
ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชัน} \times 1{,}000}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
0	0
10	0.068
25	0.163
50	0.369
75	0.507
100	0.873



รูปที่ ข-1 กราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดไรโบนิวคลีอิก (Herbert; Phipps and Strange 1971)

สารละลายออร์ซินอลจะทำปฏิกิริยากับน้ำตาลเพนโตส ในที่นี้คือน้ำตาลไรโบส ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งในโมเลกุลของกรดไรโบนิวคลีอิก เมื่อกรดไรโบนิวคลีอิกถูกย่อยด้วยกรดจะได้เป็นเบส ฟอสเฟต และน้ำตาลไรโบส น้ำตาลไรโบสจะทำปฏิกิริยากับออร์ซินอล ให้เป็นสารประกอบสีเขียว เมื่อมี Fe^{3+} อยู่

3.1 สารเคมี

3.1.1 สารละลายกรดไรโบนิวคลีอิกมาตรฐาน

ละลายกรดไรโบนิวคลีอิกจาก Tolura yeast (Sigma Chemical Co.) 20 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรจากนั้นนำสารละลายกรดไรโบนิวคลีอิกมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ คือ 20, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.1.2 สารละลาย ก

ละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 2.5 กรัม ในน้ำกลั่นเล็กน้อย ปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร

3.1.3 สารละลาย ข

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น

3.1.4 สารละลาย ค

ละลายออร์ซินอล 1 กรัม ในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (เก็บได้ประมาณ 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส)

3.1.5 สารละลายออร์ซินอล

นำสารละลาย ก 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ข 40 มิลลิลิตร และสารละลาย ค 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (สารละลายนี้ต้องเตรียมเมื่อใช้เท่านั้น)

3.1.6 กรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) 0.5 นอร์มัล

นำกรดเปอร์คลอริก 43.1 มิลลิลิตร มาปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 วิธีการย่อยกรดไรโบนิวคลีอิกภายในเซลล์ด้วยกรดเปอร์คลอริก

ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไรโบนิวคลีอิกภายในเซลล์ยีสต์ จะต้องทำการย่อยกรดไรโบนิวคลีอิกที่อยู่ภายในเซลล์โดยใช้กรดเปอร์คลอริกเสียก่อนมีขั้นตอนดังนี้

3.2.1.1 นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง

3.2.1.2 นำเซลล์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

3.2.1.3 เติมกรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) 0.5 นอร์มัล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เขย่าทุก 5 นาที เมื่อครบ 30 นาที นำออกมาแช่น้ำเย็นทันที

3.2.1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แยกสารละลายส่วนใสเก็บไว้

3.2.1.5 นำสารละลายที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไรโบนิวคลีอิกด้วยวิธี orcinol method

3.2.2 วิธีการวิเคราะห์กรดไรโบนิวคลีอิก

3.2.2.1 นำตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.2.2.2 เติมสารละลายออร์ซินอลปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.2.2.3 นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที โดยต้องปิดฝาให้สนิท

3.2.2.4 ทำให้เย็นลงทันที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 670 นาโนเมตร

3.2.2.5 ทำแบลงก์โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างและดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.2-3.2.2.4

3.3 เขียนกราฟมาตรฐาน

3.3.1 นำสารละลายกรดไรโบนิวคลีอิกมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 20, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาอย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ตามลำดับ

3.3.2 ทำตามขั้นตอน 3.2.2.2-3.2.2.5

3.3.3 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดไรโบนิวคลีอิกมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังแสดงในรูปที่ ข-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การคำนวณ

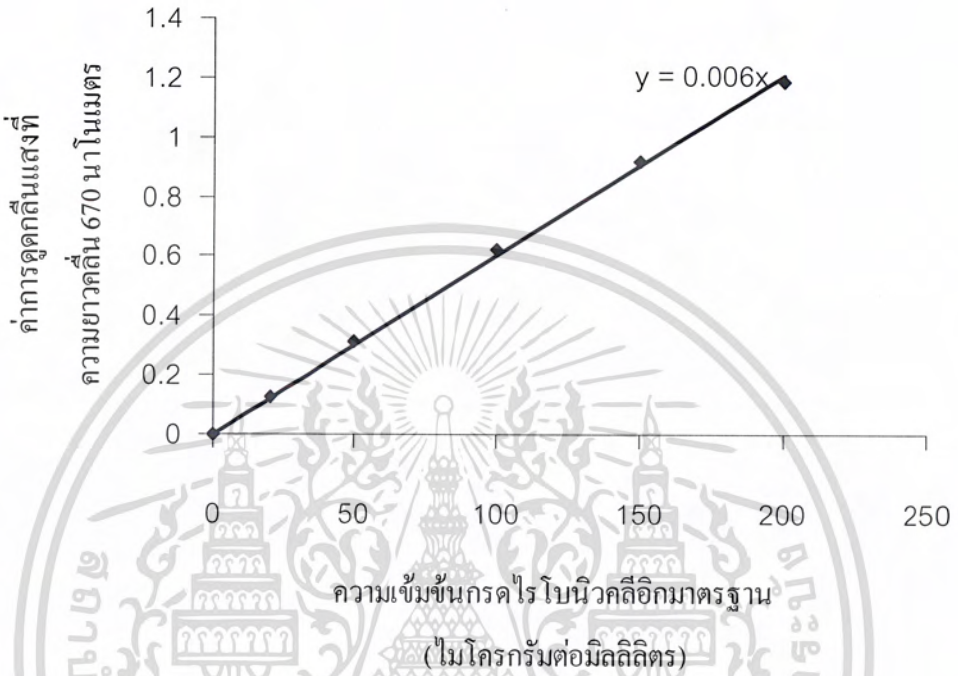
ปริมาณกรดไรโบนิวคลีอิก (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 670 x ความเจือจางx ปริมาตรส่วนใสที่ได้}}{\text{ความชัน x 1,000 x ปริมาตรน้ำหมักที่เก็บ}}$$

ตารางที่ ข-2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดไรโบนิวคลีอิก ที่ความยาวคลื่น 670 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กรดไรโบนิวคลีอิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 670 นาโนเมตร
0	0.000
20	0.108
50	0.298
100	0.619
150	0.929
200	1.191

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

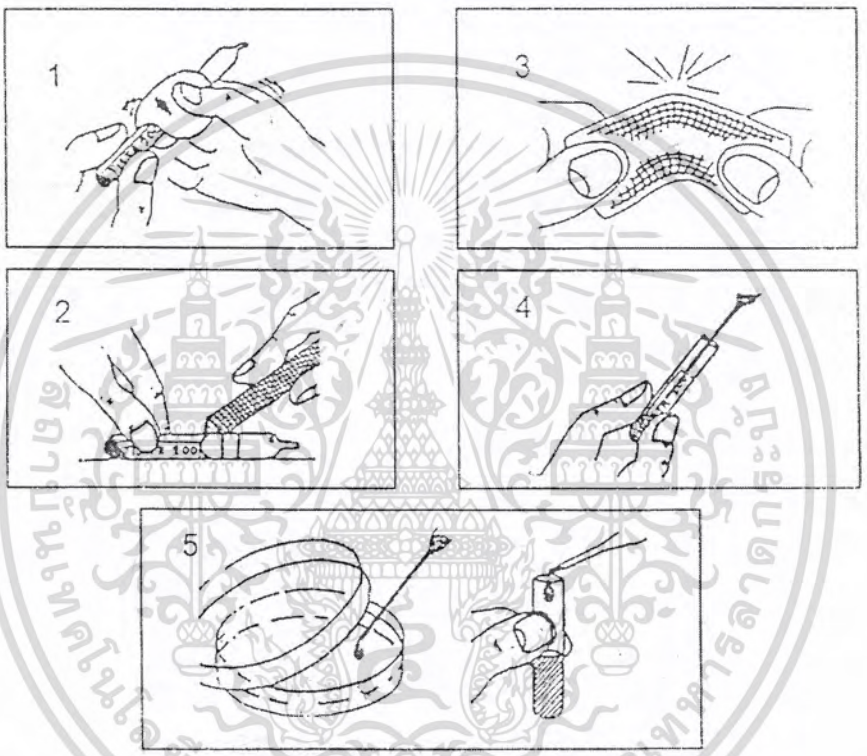


รูปที่ ข-2 กราฟสารละลายมาตรฐานกรดไรโบนิวคลีอิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
วิธีการเพาะจุลินทรีย์จากหลอดเชื้อแห้งแข็ง

วิธีการเพราะจุลินทรีย์จากหลอดเชื้อแห้งแข็ง (Revival of Freeze-Dried Cultures)



1. ใช้ผ้ากลอสชุบแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ พอหมาดเช็ดบริเวณรอบๆ หลอดบรรจุจุลินทรีย์ (ampoule) จากนั้นใช้ตะไบสำหรับเลื่อยแก้ง เลื่อยลงบนหลอดบริเวณกึ่งกลางสำลีให้เป็นรอยลึกลงไปในเนื้อแก้ง
2. ใช้ผ้ากลอสที่มีความหนาพอประมาณชุบแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ พอหมาดหุ้มหลอดบรรจุจุลินทรีย์
3. เปิดหลอดบรรจุจุลินทรีย์โดยทำการหักหลอดบรรจุจุลินทรีย์บริเวณที่ใช้ตะไบเลื่อยไว้ ซึ่งจะใช้สองมือจับผ้ากลอสที่หุ้มหลอดบรรจุจุลินทรีย์ไว้ แล้วใช้นิ้วหัวแม่มือกดเบาๆ บริเวณรอยตะไบ ทำด้วยความระมัดระวังโดยไม่ต้องออกแรงมากเพราะจะทำให้เนื้อแก้วบริเวณที่หักแตกละเอียด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ดึงปลายหลอดบรรจุจุลินทรีย์และสำลีทิ้งในขวดน้ำยาฆ่าเชื้อ ใช้ Pasture pipette ดูดอาหารเหลวที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ (ประมาณ 0.3-0.4 มิลลิลิตร) ถ่ายลงในหลอดบรรจุจุลินทรีย์เพื่อละลายสารผสมเซลล์จุลินทรีย์ในหลอด ต้องทำในสภาพที่ปลอดเชื้อ
5. ใช้ Pasture pipette ดูดสารละลายผสมเซลล์จุลินทรีย์หยดลงบนจานอาหารแข็ง (agar plate) ที่มีสูตรเดียวกับอาหารเหลว จำนวน 1 หยด ส่วนสารละลายเซลล์จุลินทรีย์ที่เหลือทั้งหมดถ่ายใส่ลงในอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่ใช้ในข้อ 4 สำหรับเซลล์จุลินทรีย์ที่หยดลงบนจานอาหารแข็งใช้ห่วงเหล็ก (loop) ฆ่าเชื้อเขี่ยกระจายเชื้อ (streak plate) ให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว
6. จุลินทรีย์ที่ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว (ทั้งในจานอาหารแข็งและในหลอดอาหารเหลว) นำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม เพื่อดูการเจริญของจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้