การผลิตไลซีนจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารโดยเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1253 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475

PRODUCTION OF LYSINE FROM FOOD INDUSTRIAL WASTES BY *Arthrobacter citreus* NRRL 1253 AND *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475

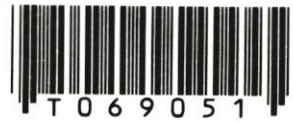
สายใจ เกียรติกิตติสรณ์
SAIJAI KIATKITTISORN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2550

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตไลซีนจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารโดยเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475

PRODUCTION OF LYSINE FROM FOOD INDUSTRIAL WASTES BY *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 AND *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475



สายใจ เกียรติกิตติสรณ์

SAIJAI KIATKITTISORN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

PRODUCTION OF LYSINE FROM FOOD INDUSTRIAL WASTES BY *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 AND *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475

SAIJAI KIATKITTISORN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2007

COPYRIGHT 2007

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไลซีนจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารโดยเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475
นักศึกษา	นางสาวสายใจ เกียรติกิตติสรณ์
รหัสประจำตัว	45064564
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
พ.ศ.	2550
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์

บทคัดย่อ

ผลการเปรียบเทียบการผลิตไลซีนระหว่างเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาล (40 กรัมต่อลิตร) และน้ำนึ่งปลาทูน่า (3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร) พบว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 26.18 และ 23.44 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการขยายขนาดการเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที พบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 มีการผลิตไลซีนสูงสุดเท่ากับ 28.11 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.095 ต่อชั่วโมง และผลผลิตไลซีนเท่ากับ 0.390 กรัมไลซีนต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณไนโตรเจนลดลงร้อยละ 76.44 และ 63.18 ตามลำดับ เมื่อทำการควบคุมพีเอชเท่ากับ 7.0 ในกระบวนการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาล (40 กรัมต่อลิตร) และน้ำนึ่งปลา ทูนา (3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร) พบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 30.02 กรัมต่อลิตร และให้ผลของอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.095 ต่อชั่วโมง มีอัตราการผลิตไลซีนทั้งหมดเท่ากับ 0.417 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณไนโตรเจนลดลงร้อยละ 75.21 และ 60.79 ตามลำดับ

Thesis	Production of Lysine from Food Industrial Wastes by *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475
Student	Miss Saijai Kiatkittisorn
Student ID	45064564
Degree	Master of Science
Year	2007
Thesis Adviser	Asst. Prof. Dr. Marisa Jatupornpipat

ABSTRACT

The effect of lysine production comparison between *A. citreus* NRRL 1258 and C. *glutamicum* ATCC 21475 in the same optimal modified lysine medium with 40 gl^{-1} molasses and 3 gl^{-1} tuna condensate was studied. At 72 hours, cultivation of *A. citreus* NRRL 1258 and C. *glutamicum* ATCC 21475 with this medium gave the maximum lysine production at 26.18 and 23.44 gl^{-1},respectively. Upon scale up to a 2 litres fermenter; the experiments were perfomed at 30 °C ; 700 rpm agitation speed and 1.0 vvm aeration rate, at 72 hours. the highest lysine production was obtained at 28.11 gl^{-1}. For kinetic studied, specific growth rate (μ) and overall productivity (Qp) were 0.095 $h^{-1}$and 0.390 $gl^{-1}h^{-1}$., respectively. While, the reducing sugar and nitrogen reduction were 76.44 and 63.18 % respectively.

Control of pH (at 7.0) during the cultivation of *A. citreus* NRRL 1258 in a modified lysine production media with 40 gl^{-1} molasses and 3 gl^{-1} tuna condensate gave the maximum lysine production of 30.02 gl^{-1} at 72 hr. The specific growth rate and the product yield reached maximum values of 0.095 h^{-1} and 0.417 $gl^{-1}h^{-1}$., respectively. The reducing sugar and nitrogen reduction were 75.21 and 60.79 %.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นในด้านต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ และมีค่ายิ่ง ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง รศ.ดวงใจ โอชัยกุล และ ดร.เหมือนหมาย อภินทนาพงศ์ ซึ่งเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ ดร. สุทธิพงศ์ เสถียรนพเกล้า สำหรับการอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในงานวิจัย และ กราบขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่สนับสนุนทุนสำหรับการวิจัย

กราบขอบพระคุณโรงงานน้ำตาลทรายนิวกรุงไทย ต.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี และโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด ต. นาดี จ. สมุทรสาคร ที่ให้การอนุเคราะห์วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย บัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านการติดต่อประสานงาน และอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์และสารเคมี

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ และน้อง ภาควิชาชีววิทยาทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

และที่สำคัญขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ซึ่งเป็นที่รักและเคารพที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

สายใจ เกียรติกิตติสรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง X

สารบัญภาพ XII

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 1

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทรายและกากน้ำตาล 3

2.1.1 องค์ประกอบของกากน้ำตาล 3

2.1.2 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายและผลพลอยได้ 5

2.1.3 การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของโรงงานผลิตน้ำตาลทราย 6

2.1.3.1 การนำกากน้ำตาลมาใช้เป็นปุ๋ย 6

2.1.3.2 การนำกากน้ำตาลมาใช้เป็นอาหารสัตว์ 6

2.1.3.3 การนำกากน้ำตาลมาใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก 7

2.2 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับปลาทูน่าและน้ำนึ่งปลาทูน่า 7

2.2.1 พันธุ์ปลาทูน่า 7

2.2.2 แหล่งที่มาและองค์ประกอบน้ำนึ่งปลาทูน่า 8

2.2.3 การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของโรงงานปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง 9

2.2.3.1 น้ำสกัดจากปลา (Fish extract) 9

2.2.3.2 แหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 9

2.2.3.3 น้ำมันปลา (Fish oil) 9

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2 วิธีการทดลอง....27
3.2.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและสมบัติทางกายภาพของกากน้ำตาล และน้ำนึ่งปลาทูน่า....27
3.2.2 การศึกษาลักษณะของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475....28
3.2.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ เชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475ในอาหารไลซีนสังเคราะห์....28
3.2.4 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลง ที่เติมกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน....28
3.2.5 การศึกษาผลการเติมกากน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญ และการผลิตไลซีน ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 2147....29
3.2.6 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475ในอาหารสูตรดัดแปลง ที่เติมน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจน....30
3.2.7 การศึกษาผลการเติมน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญ และการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475....30
3.2.8 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลง ที่เติมกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าที่เหมาะสมเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน....31
3.2.9 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในถังหมัก ระดับห้องปฏิบัติการขนาด 2 ลิตร....31
3.2.9.1 ผลของอัตราการกวน....31
3.2.9.2 ผลของการควบคุมพีเอช....32

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3 วิธีการวิเคราะห์ 32
3.3.1 การวิเคราะห์มวลชีวภาพ 32
3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณไลซีน 32
3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 32
3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน 32
3.3.5 การวิเคราะห์พีเอช 32
3.3.6 การวิเคราะห์ค่าทางจลนพลศาสตร์ 32
3.3.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ 32

บทที่ 4 ผลการทดลอง 33
4.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่า 33
4.2 การศึกษาลักษณะของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 35
4.3 การเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารไลซีนสังเคราะห์ 37
4.4 การเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน 41
4.5 การเติมกากน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus NRRL* 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 46
4.6 การเจริญของเชื้อ *A. citreus NRRL* 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจน 51
4.7 การเติมกากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus NRRL* 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 56
4.8 การการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าที่เหมาะสมเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน 60

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.9 การเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ขนาด 2 ลิตร 65
4.9.1 ผลของอัตราการกวน 65
4.9.2 ผลของการควบคุมพีเอช 71

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 73

บรรณานุกรม 76

ภาคผนวก ก 81
ภาคผนวก ข 84
ภาคผนวก ค 93
ภาคผนวก ง 98
ภาคผนวก จ 99
ภาคผนวก ฉ 113

ประวัติผู้เขียน 138

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 องค์ประกอบของกากน้ำตาล....4
2.2 ปริมาณสารอนินทรีย์ในกากน้ำตาล....5
2.3 แสดงพันธุ์ปลาทูน่า....8
2.4 สมบัติของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง....9
2.5 ปริมาณกรดอะมิโนที่พบในพืชและแหล่งอาหาร....12
4.1 องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของกากน้ำตาลจากโรงงานน้ำตาลทราย....34
4.2 องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำนึ่งปลาทูน่า....35
4.3 ค่าจลนพลศาสตร์และพารามิเตอร์การเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 เมื่อเลี้ยงในอาหารไลซีนสังเคราะห์....40
4.4 ค่าจลนพลศาสตร์และพารามิเตอร์การเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน....45
4.5 ผลของระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และ พีเอช โดยเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่อัตราส่วนต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 72 ชั่วโมง....47
4.6 ค่าพารามิเตอร์การผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ....48
4.7 ผลของระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และ พีเอช โดยเชื้อ *C.glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่อัตราส่วนต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 72 ชั่วโมง....50
4.8 ค่าพารามิเตอร์การผลิตไลซีนของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ....50

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.9 ค่าจลนพลศาสตร์และพารามิเตอร์การเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจน 55

4.10 ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และ พีเอชโดยเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัดที่อัตราส่วนต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 57

4.11 ค่าพารามิเตอร์การผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 58

4.12 ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และ พีเอช โดยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 59

4.13 ค่าพารามิเตอร์การผลิตไลซีนของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 60

4.14 ค่าจลนพลศาสตร์และพารามิเตอร์การเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าที่เหมาะสมเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน 64

4.15 ค่าจลนพลศาสตร์และพารามิเตอร์การเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ที่อัตราการกวนระดับต่างๆ 70

4.16 ผลของการควบคุมพีเอช (พีเอช 7) ต่อมวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน จากการเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในถังหมักขนด 2 ลิตร ที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ความเร็วในการกวน700 รอบต่อนาที . 72

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 องค์ประกอบพื้นฐานในกากน้ำตาล 4

2.2 แสดงกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย 5

2.3 กระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋องและวัสดุที่เหลือจากโรงงานผลิตปลาทูน่า 10

2.4 แสดงโครงสร้างไลซีน 11

2.5 แสดงโครงสร้างสามมิติของไลซีน 11

2.6 แสดงกระบวนการผลิตไลซีนโดยเชื้อจุลินทรีย์ 14

2.7 แสดงการผลิตไลซีนโดยกรรมวิธีทางเคมี 16

4.1 แสดงการย้อมติดสีแกรมและลักษณะของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 (ก) และ เชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 (ข) 36

4.2 ความสัมพันธ์ระหว่าง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และ พีเอช ที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อ *A. citreus* NRRL ในอาหารไลซีนสังเคราะห์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 ชั่วโมง 38

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่าง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และ พีเอช ที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารไลซีนสังเคราะห์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 ชั่วโมง 39

4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และ พีเอช ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 ชั่วโมง 42

4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และ พีเอช ของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 ชั่วโมง 44

4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และ พีเอช ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนยีสต์สกัด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 ชั่วโมง 52

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช ของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนยีสต์สกัด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 ชั่วโมง 54

4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และ พีเอช ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 ชั่วโมง 61

4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช ของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 ชั่วโมง 63

4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และ พีเอช ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอัตราการให้อากาศ1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที และความเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง 66

4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที และความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ...67

4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และ พีเอช ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที และความเร็วในการกวน 700 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง 68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน ของเชื้อ *A .citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าเมื่อเลี้ยงใน ถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ความเร็วใน การกวน 700 รอบต่อนาที ที่ควบคุมพีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 72

ค.1 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 95

ค.2 แสดงกราฟมาตราฐานไลซีน 97

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ไลซีน (lysine) เป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีน และจัดเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) หนึ่งในแปดชนิดที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสร้างเองได้ ต้องได้รับจากอาหารที่รับประทานเข้าไปเท่านั้น (สมใจ ศิริโภค. 2544) โดยไลซีนที่อยู่ในรูปโปรตีนของพืชจะมีปริมาณต่ำ ดังนั้นจึงต้องเติมลงไปในอาหารที่ได้จากพืชเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารซึ่งในปัจจุบันไลซีนนั้นจะเป็นกระบวนการผลิตไลซีนโดยเชื้อจุลินทรีย์ (ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2537) ปัจจุบันการผลิตไลซีนโดยกรรมวิธีทางเคมีมีต้นทุนการผลิตอยู่ในระดับที่สูง ดังนั้นการผลิตไลซีนด้วยเชื้อจุลินทรีย์ก็เป็นอีกกระบวนการที่น่าสนใจเนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถในการผลิตไลซีนได้ดี โดยไลซีนที่ถูกผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์จะถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์มาผสมในน้ำหมัก จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอะมิโนได้ มีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และแอคติโนมัยสีท แต่ที่นิยมใช้ในการผลิตกรดอะมิโนระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ แบคทีเรีย เนื่องจากเซลล์ของแบคทีเรียมีองค์ประกอบของโปรตีนสูง มีอัตราการเจริญสูงและสามารถใช้วัตถุดิบหลายชนิดในการผลิตได้ โดยเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตและปลดปล่อยกรดอะมิโนออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

ปัจจัยที่สำคัญสำหรับกระบวนการผลิตไลซีนอย่างหนึ่งคือ อาหารเลี้ยงเชื้อโดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไปขึ้นกับลักษณะเฉพาะของกระบวนการหมัก แต่โดยทั่วไปจะต้องมีส่วนประกอบของ น้ำ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามิน และออกซิเจน (สมใจ ศิริโภค. 2544) ดังนั้นการนำวัสดุเศษเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทรายมาใช้แทนแหล่งคาร์บอนและวัสดุเศษเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตปลาทูน่ากระป๋องมาใช้แทนแหล่งไนโตรเจน มาใช้ในกระบวนการหมักจะเป็นการนำเศษวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์และยังเป็นการช่วยลดมลภาวะสิ่งแวดล้อมได้อีกทาง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1. ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสังเคราะห์และอาหารที่ใช้กากน้ำตาลทดแทนแหล่งคาร์บอนและน้ำนึ่งปลาทูน่าทดแทนแหล่งไนโตรเจน

1.2.2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 จากอาหารที่ใช้กากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่า

1.2.3. เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC จากอาหารที่ใช้กากน้ำตาลทดแทนแหล่งคาร์บอนและน้ำนึ่งปลาทูน่าทดแทนแหล่งไนโตรเจน

1.2.4. คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์นำมาศึกษาอัตราการกวน และ การควบคุมพีเอชในการผลิตไลซีนจากอาหารที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการขนาด 2 ลิตร

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารไลซีนสังเคราะห์

1.3.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

1.3.3 ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อการเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475

1.3.4 ศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจน

1.3.5 ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อการเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 2147

1.3.6 ศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าที่เหมาะสมเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

1.3.7 ศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการขนาด 2 ลิตร

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตไลซีนโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมได้

1.4.2 เป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ประโยชน์และเป็นการลดมลภาวะสิ่งแวดล้อม

1.4.3 เป็นประโยชน์ในการวางแนวทางในการผลิตไลซีนในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทรายและกากน้ำตาล

อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องแต่ในปัจจุบันอุตสาหกรรมน้ำตาลของไทยกำลังเผชิญกับการเปลี่ยนแปลง โดยมีการนำสารให้ความหวานอื่นๆมาทดแทนการใช้น้ำตาลโดยน้ำตาลที่เราบริโภคกันอยู่ในชีวิตปรจำวันหรือเรียกกันว่า "น้ำตาล" นั้นหมายถึงน้ำตาลซูโครส ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลธรรมชาติ 2 ชนิด คือน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตส พืชส่วนใหญ่จะสะสมอาหารไว้ในรูปของแป้ง แต่มีพืชบางชนิดที่สามารถสังเคราะห์และเก็บพลังงานไว้ในรูปของน้ำตาลซูโครสได้ เช่น อ้อย อ้อยเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จำพวกหญ้าซึ่งเป็นตระกูลเดียวกับข้าวฟ่าง ข้าวโพด อ้อยประกอบด้วย 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นสารละลายซึ่งหมายถึง น้ำอ้อย และส่วนที่ไม่ละลาย เช่น กากอ้อย

กากน้ำตาล (Molasses) เป็นผลพลอยได้หรือผลิตภัณฑ์สุดท้ายของอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล ที่ได้จากการเหวี่ยงแยกน้ำตาลออกไปแล้วเป็นของเหลวที่มีความหนืดสูงมีสีน้ำตาลเข้มการแบ่งระดับคุณภาพของกากน้ำตาลสามารถแบ่งระดับคุณภาพของกากน้ำตาลเป็น 3 ประเภทโดยใช้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและความชื้นเป็นเกณฑ์ ดังนี้ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย .2541)

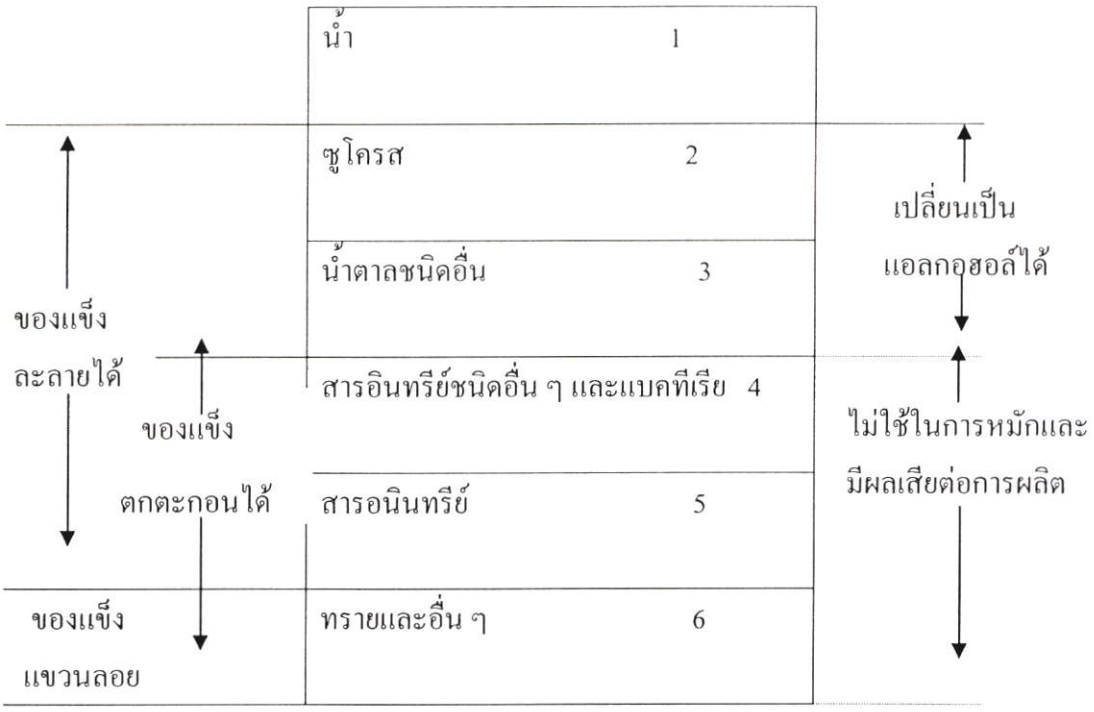
1. กากน้ำตาลระดับซุปเปอริเออร์แบล็คสแตรป (superior blackstrap molasses) ประกอบด้วยน้ำน้อยกว่าร้อยละ 23.4 และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมากกว่าร้อยละ 53.5

2. กากน้ำตาลระดับแบล็คสแตรป (blackstrap molasses) ประกอบด้วยน้ำระหว่างร้อยละ 23.5-26.4 และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดระหว่างร้อยละ 48.5-53.4

3. กากน้ำตาลระดับยูทิลลิตี้ (utility blackstrap) ประกอบด้วยน้ำร้อยละ 26.5 หรือมากกว่า และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดระหว่างร้อยละ 42.5- 48.4

2.1.1 องค์ประกอบของกากน้ำตาล

กากน้ำตาลประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 2.1 และสามารถจำแนกองค์ประกอบต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.1 และ 2.2



ภาพที่ 2.1 องค์ประกอบพื้นฐานในกากน้ำตาล
ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย (2541)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกากน้ำตาล

องค์ประกอบ	ร้อยละโดยน้ำหนัก
1. น้ำ	20.0
2. ซูโครส	35.0
3. กลูโคส หรือ เดกซ์โทรส	7.0
เลวูโลส หรือ ฟรักโทส	9.0
สารอื่น ๆ ที่ลดปริมาณหรือเปลี่ยนรูปได้ (reducing substances)	3.0
4. คาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ๆ เช่น ยาง แป้ง	4.0
สารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (nitrogenous compound)	4.5
กรดที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (non-nitrogeneous acid)	5.0
ไข (waxes) ฟอสฟอไลปิด (phospholipids) และ สเตอรอยด์ (steroids)	0.4
เม็ดสีและอื่น ๆ	0.1
5. สารอนินทรีย์	12.0

ที่มา: James (1985)

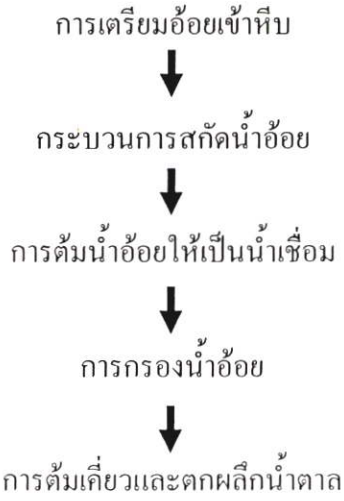
ตารางที่ 2.2 ปริมาณสารอนินทรีย์ในกากน้ำตาล

ปริมาณเถ้า	ร้อยละของเถ้า
ด่าง	
K_2O	30-50
CaO	7-15
Mg	2-14
Na_2O	0.3-0.9
Fe_2O_3/Al_2O_3	0.4-2.5
กรด	
SO_3	7-27
Cl	12-20
P_2O_5	1-10
SiO_2 และส่วนที่ไม่ละลาย	1-7

ที่มา: James (1985)

2.1.2 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายและผลพลอยได้

ในกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายสามารถแบ่งออกเป็นขั้นตอนได้ดังภาพที่2.2 (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย .2541)



ภาพที่ 2.2 แสดงกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย

กระบวนการในการผลิตน้ำตาลทรายดิบ สามารถแบ่งได้เป็น 5 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

การเตรียมอ้อยเข้าเข้าหีบคือการแปรรูปให้เหมาะสมกับการสกัดน้ำตาลจากอ้อยซึ่งมีขั้นตอนคือ การตัดอ้อย และ การเตรียมอ้อยโดยทำให้อ้อยมีขนาดที่เหมาะสมสำหรับการสกัด

กระบวนการสกัดน้ำอ้อย (Juice Extraction) ทำการสกัดน้ำอ้อยโดยผ่านอ้อยเข้าไปในชุดลูกหีบ (4-5 ชุด) และกากอ้อยที่ผ่านการสกัดน้ำอ้อยจากลูกหีบชุดสุดท้าย จะถูกนำไปเป็นเชื้อเพลิงเผาไหม้ภายในเตาหม้อไอน้ำ เพื่อผลิตไอน้ำมาใช้ในกระบวนการผลิต และน้ำตาทราย

การทำความสะอาด หรือทำใสน้ำอ้อย (Juice Purification) น้ำอ้อยที่สกัดได้ทั้งหมดจะเข้าสู่กระบวนการทำใส เนื่องจากน้ำอ้อยมีสิ่งสกปรกต่าง ๆ จึงต้องแยกเอาส่วนเหล่านี้ออกโดยผ่านวิธีทางกล เช่น ผ่านเครื่องกรองต่าง ๆและวิธีทางเคมี เช่น โดยให้ความร้อน และผสมปูนขาว

การกรองน้ำอ้อย หลังจากน้ำอ้อยถูกทำให้ใสและผ่านถังตกตะกอนออกมาแล้วจะถูกนำมารวมกันที่ถังพักก่อนจะถูกนำไปกรอง ส่วนตะกอนที่อยู่ก้นถังพักจะถูกส่งไปเข้าหม้อกรอง น้ำอ้อยใสที่กรองได้จะถูกส่งกลับมารวมในถังตกตะกอนอีกครั้ง

การต้ม เคี่ยวและตกผลึกน้ำตาล (Evaporation, Crystallization and Centrifugaling) น้ำอ้อยที่ผ่านการทำใสแล้วจะถูกนำเข้าสู่ชุดหม้อต้มเพื่อระเหยเอาน้ำออกโดยน้ำอ้อยข้นที่ออกมาจากหม้อต้มลูกสุดท้ายเรียกว่า (Syrup) น้ำเชื่อมที่ได้จากการต้มจะถูกนำเข้าหม้อเคี่ยวระบบสุญญากาศ (Vacuum Pan) เพื่อระเหยน้ำออกจนน้ำเชื่อมถึงจุดอิ่มตัว ที่จุดนี้ผลึกน้ำตาลจะเกิดขึ้น โดยที่ผลึกน้ำตาลและกากน้ำตาลที่ได้จากการเคี่ยวนี้จะเรียกว่า แมสิควิท (Messecuite) แมสิควิทที่ได้จากการเคี่ยวจะถูกนำไปปั่นแยกผลึกน้ำตาลออกจากกากน้ำตาล โดยใช้เครื่องปั่น (Centrifugals) ผลึกน้ำตาลที่ได้นี้จะเป็นน้ำตาลดิบ

2.1.3 การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของโรงงานผลิตน้ำตาลทราย

ในขั้นตอนการผลิตน้ำตาลทรายจะมีส่วนเหลือทิ้งจำพวกกากน้ำตาลสามารถนำมาดัดแปลงเพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่ผลิตภัณฑ์ใหม่ก่อให้เกิดการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า

2.1.3.1 การนำกากน้ำตาลมาใช้เป็นปุ๋ย

มีการนำกากน้ำตาลมาใช้เป็นปุ๋ยในประเทศที่มีการปลูกอ้อยมากเนื่องจากในกากน้ำตาลมีเกลือโปแตสเซียมและเกลือไนโตรเจนซึ่งจำเป็นสำหรับพืช โดยจะใส่กากน้ำตาลลงในร่องที่ไถกราดก่อนทำการเพาะปลูก

2.1.3.2 การนำกากน้ำตาลมาใช้เป็นอาหารสัตว์

การใช้กากน้ำตาลเป็นอาหารสัตว์มีมาตั้งแต่เริ่มผลิตน้ำตาลและมีการใช้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในกากน้ำตาลมีคาร์โบไฮเดรตในปริมาณสูง ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปน้ำตาลและมีวิตามินบีที่ละลายน้ำได้ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อลูกวัวและแกะที่กระเพาะไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินเองได้ กากน้ำตาลยังมีธาตุอาหารรองซึ่งจำเป็นต่อการมีสุขภาพดีของสัตว์ (ภาสกรม คณานุรักษ์. 2529)

2.1.3.2 การนำกากน้ำตาลมาใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก

การหมักเป็นกระบวนการที่สารอินทรีย์ถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปโดยการกระทำของตัวเร่งทางชีวเคมี ที่ได้มาจากจุลินทรีย์จำเพาะชนิดต่างๆ จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรีย ปัจจุบันได้มีการนำของเสียหรือผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมต่างๆมาประยุกต์ใช้เป็นสารอาหารให้กับจุลินทรีย์ในการหมัก ทำให้สามารถผลิตผลิตภัณฑ์มูลค่าสูงได้ กากน้ำตาลเป็นผลิตผลพลอยได้ที่มีการนำมาใช้กับอุตสาหกรรมการหมักอย่างกว้างขวางชนิดหนึ่ง

Liu *et al.* (1980) ทำการผลิตไลซีนจากเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 13032 โดยใช้ถังหมัก 5000 ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล 2500 ลิตร พีเอช 7.4 โดยทุกๆ 1 ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วยกากน้ำตาล 100 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 กรัม แคลเซียมคาบอเนต 50 กรัม ปรับปริมาตร 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น สภาวะในการหมักใช้อุณหภูมิ 32 - 33 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.3-0.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที การหมักใช้เวลา 70 ชั่วโมง สามารถผลิตไลซีนร้อยละ 4.4 ผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 30 ของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

Wang *et al.* (1993) ศึกษาการผลิตไลซีนโดยใช้เชื้อ *Brevibactrium sp.*P1-13 ในการหมักแบบกึ่งกะ ใช้อาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลทดแทนกลูโคส แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมอะซิเตต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ร้อยละ 9 3 0.2 และ 0.01 ตามลำดับ และมีการเติมอาหารที่มีกากน้ำตาลร้อยละ 30-37 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 2 เป็นระยะ จะทำให้ผลผลิตไลซีนเพิ่มขึ้น

2.2 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับปลาทูน่าและน้ำนึ่งปลาทูน่า

อุตสาหกรรมอาหารทะเลกระป๋องเป็นอุตสาหกรรมการผลิตเพื่อการส่งออกที่สำคัญของไทย ปัจจุบันอุตสาหกรรมประเภทนี้ได้เจริญรุดหน้าประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่มประเทศที่มีการพัฒนาด้านอุตสาหกรรมปลาทูน่าบรรจุกระป๋องที่เจริญรุดหน้าอย่างรวดเร็ว (Vecht-Lifshitz *et al.* 1990)

2.2.1 พันธุ์ปลาทูน่า

ปลาทูน่าหรือที่เรียกกันทั่วไปว่าปลาโอ ในอ่าวไทยมี 3 ชนิด ได้แก่ ปลาโอดำ (*Thunnus tonggol*) ปลาโอลาย (*Euthynnus affinis*) และปลาแกลบ (*Auxis thazard*) บางครั้งพบ ปลาโอท้องแถบ (*Katsuwonus pelamis*) ปลาโอครีบเหลือง (*Yhunnus albacares*) และปลาโอหลอด (*Auxis rochei*) แต่มีปริมาณน้อย แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงพันธุ์ปลาทูน่า

Scientific name	English name
Thunnus albacares	Yellow fin tuna
T.obesus	Bigeye tuna
T.alaunga	Albacore
T.tonggol	Longtail tuna
T.maccoyii	Southern bluefin
Euthynus affinis	Kawakawa
Katsuwonus pelamis	Skipjack tuna
Auxis thazard	Frigate tuna
A.rochei	Buliet tuna
A.thazaed and A.rochi	Frigate and bullet tuna
Sarda orientalis	Indo-Pacific bonito
Scombridac	Tunas NEI

ที่มา: ไพโรจน์ ซ้ายเกลี้ยง (2534)

2.2.2 แหล่งที่มาและองค์ประกอบน้ำนึ่งปลาทูน่า

ในกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋องแสดงดังภาพที่ 2.2 จะเกิดวัสดุเศษเหลือ (waste) ทั้งของแข็งและของเหลวคิดเป็นปริมาณร้อยละ 65 ปริมาณและสมบัติของวัสดุเศษเหลือแตกต่างกันขึ้นกับชนิด อายุ และพันธุ์ของปลา น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตมีปริมาณสูง แสดงดังตารางที่ 2.4 และแบ่งออกได้ 2 ชนิดคือ น้ำทิ้งที่มีปริมาณมากแต่มีผลกระทบต่อมลภาวะทางน้ำน้อย โดยมีค่าบีโอดีต่ำส่วนใหญ่เป็นน้ำล้างปลา ซึ่งมีการใช้น้ำประมาณ 200 แกลลอน (757 ลิตร) ต่อปลา 1 ตัน ของแข็งแขวนลอยในน้ำทิ้งส่วนใหญ่ประกอบด้วยเลือด เศษเนื้อ น้ำมันและไขมัน มีค่าปริมาณ 5,000 มิลลิลิตรต่อลิตร และน้ำทิ้งที่มีผลกระทบต่อมลภาวะทางน้ำมากที่สุดคือน้ำนึ่งปลา เนื่องจากมีค่าบีโอดีสูงอยู่ในช่วงระหว่าง 56,000 - 112,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 6

ตารางที่ 2.4 สมบัติของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง

ดัชนี	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ซีโอดี	2,273
บีโอดี	895
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	17,900
ปริมาณของแข็งแขวนลอย	1,081
กรีส	287

ที่มา: Jones (1974)

2.2.3 การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของโรงงานปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง

ในขั้นตอนการผลิตปลาทูน่าบรรจุกระป๋องจะมีส่วนเหลือทิ้งชนิดต่างๆซึ่งสามารถนำมาดัดแปลงเพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่ผลิตภัณฑ์ใหม่ ก่อให้เกิดการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า ได้แก่

2.2.3.1 น้ำสกัดจากปลา (Fish extract)

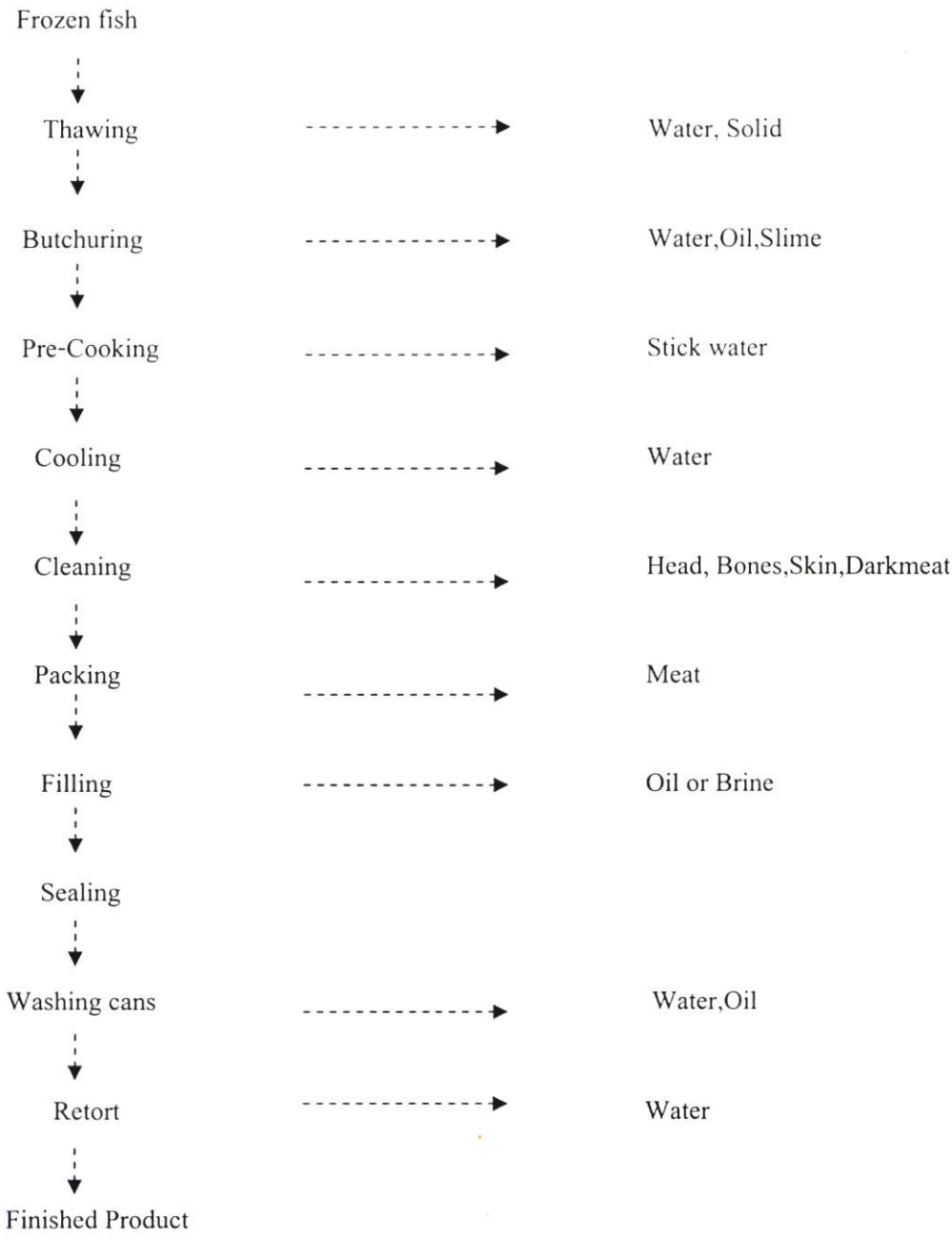
น้ำสกัดปลา เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำน้ำนึ่งปลาซึ่งมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์กลุ่มเอนโดเปปติเดสหรือความร้อน ทำให้ได้สารพวกเปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ มีสมบัติการละลายดี มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ใช้ประโยชน์เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร (บุศราภา ลีละวัฒน์ และ ปราณี อ่านเปรื่อง. 2536) ทำให้อยู่ในรูปเข้มข้นหรือรูปผงแห้ง ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารกุ้ง นอกจากนี้ยังใช้สารสกัดจากปลาทั้งในรูปเข้มข้นและผงในผลิตภัณฑ์บาบิคิวไก่ย่าง และเครื่องปรุงซุปปลาอัดก้อนในบะหมี่กึ่งสำเร็จรูป

2.2.3.2 แหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

น้ำนึ่งปลาทูน่าสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้ เช่นการทดลองของ สุวิทย์ สุวรรณโณ (2535) ที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อ *Rhodocyclus gelatinosus* R7 ได้ผลผลิตสูงสุด 5.6 กรัมต่อลิตร และการทดลองของ มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ (2537) ที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งของไนโตรเจนทดแทนยีสต์สกัดในการการสังเคราะห์รงควัตถุจากเชื้อ *Rhodocyclus gelatinosus* R7 ได้ปริมาณมวลชีวภาพ 6.61 กรัมต่อลิตร

2.2.3.3 น้ำมันปลา (Fish oil)

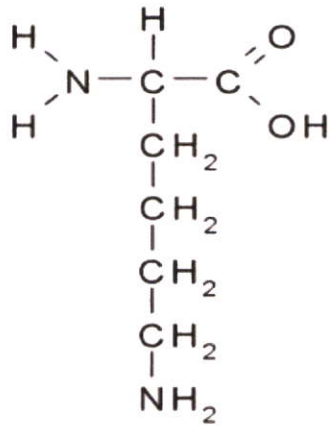
น้ำมันปลาสามารถแยกได้จากส่วนของเครื่องในและของเหลวที่ออกจากตัวปลาในช่วงของการให้ความร้อน มีการใช้น้ำมันปลาในอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง อาหารสัตว์ อุตสาหกรรมฟอกหนังเพื่อทำให้หนังนิ่ม ทำหมึกพิมพ์เพื่อช่วยให้หมึกติดทน อุตสาหกรรมผงซักฟอกเพื่อให้ความคงตัวของสี และเป็นผลดีต่อการทำความสะอาด อุตสาหกรรมสารหล่อลื่นเป็นส่วนผสมในการผลิตสารยับยั้งการกัดกร่อนของโลหะ และอุตสาหกรรมสีทาเรือเป็นต้น



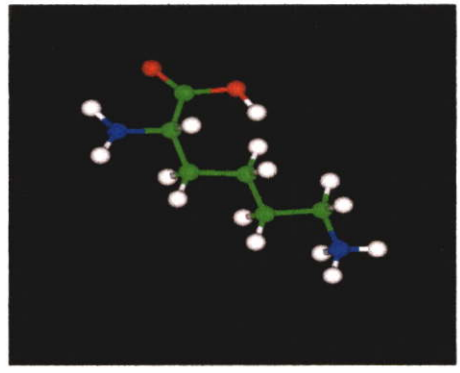
ภาพที่ 2.3 กระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋องและวัสดุที่เหลือจากโรงงานผลิตปลาทูน่า
ที่มา: ดัดแปลงจาก Soderguist *et al.* (1970)

2.3 สมบัติทั่วไปของไลซีน

ไลซีน ชื่อทั่วไปคือ 2,6 ไดอะมิโนเฮกซาโนอิก แอซิด (2,6 –diaminohexanoic acid) โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.4 และ 2.5 มีสูตรโมเลกุล คือ $C_6H_{14}N_2O_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 146.19 ละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะถูกย่อยสลายได้ที่อุณหภูมิ 224 องศาเซลเซียส มีค่าไอโซอิเลคตริก (isoelectric) 9.82 ค่า pKa 10.4 ไลซีนเป็นกรดอะมิโน 1 ใน 8 ชนิดที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย เนื่องจากร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้เองจำเป็นต้องได้รับจากการทานเข้าไป



ภาพที่ 2.4 แสดงโครงสร้างไลซีน
ที่มา: บุญพฤกษ์ จาฏามระ และคณะ (2532)



ภาพที่ 2.5 แสดงโครงสร้างสามมิติของไลซีน
ที่มา: เรืองลักขณา จามิกรณ์ (2541)

ตารางที่ 2.5 แสดงปริมาณกรดอะมิโนที่พบในพืชและแหล่งอาหาร

Constituent	Corn	Rice	Wheat	Soybean meal	Fish meal	Tankage	Dried skimmilk
Arginine	0.37	0.65	0.81	3.38	4.38	1.40	1.06
Histidine	0.22	0.18	0.38	1.12	1.24	2.05	0.78
Isoleucine	0.33	0.36	0.61	2.49	2.78	1.40	2.00
Leucine	0.95	0.62	0.96	3.48	4.48	5.74	3.09
Lysine	0.27	0.31	0.41	2.49	4.57	4.40	2.11
Methionine	0.18	0.18	0.19	0.63	1.75	0.76	0.91
Phynylalanine	0.42	0.38	0.72	2.20	2.26	0.78	1.73
Threonine	0.31	0.28	0.45	1.82	2.75	2.00	1.63
Tryptophane	0.09	0.13	0.24	0.76	0.68	0.61	0.46
Valine	0.43	0.5	0.69	2.45	3.03	4.18	2.29

ที่มา: Anderson and Jackson (1958)

2.4 กระบวนการผลิตกรดอะมิโน

การผลิตกรดอะมิโนอาจทำได้โดยการสังเคราะห์ทางเคมี การสกัด การหมัก และ การใช้เอนไซม์ (สมใจ ศิริโภค. 2544)

2.4.1 การสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis)

เป็นการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นต่างๆไปเป็นกรดอะมิโน ซึ่งจะใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนในรูป racemate เช่น D,L-methionine แล้วทำการแยกกรดอะมิโนในรูปแอลออกมา ส่วนรูปดีจะถูกนำกลับไปใช้ใหม่ หรืออาจทำการผลิตกรดอะมิโนในรูปแอลโดยตรงจากการใช้ precursor ที่เป็นพวก prochiral โดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาไครอล (chiral catalyst)

2.4.2 การสกัด (extraction)

ใช้การ hydrolysate โดยการเติมน้ำลงในโปรตีนหรือวัตถุดิบที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เช่น เคราติน (keratin) blood meal แล้วแยกทำให้บริสุทธิ์ กรดอะมิโนที่ได้จะอยู่ในรูปแอล (L-amino acid) ทั้งหมด

2.4.3 การหมัก (fermentation)

เป็นการใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดอะมิโนโดยใช้ซูโครส หรือกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน แบ่งได้เป็น 2 วิธีย่อยๆคือ การหมักโดยตรง และการผลิตเป็นสารเริ่มต้น ประโยชน์ที่สำคัญของการหมักคือ สามารถใช้วัตถุดิบซึ่งหมายถึงน้ำตาลที่มีราคาถูกได้ และสามารถผลิตกรดอะมิโนในรูปแอล (L-amino acid) ได้ แต่มีข้อเสียอยู่ตรงที่ว่าไม่สามารถผลิตกรดอะมิโนรูปดี (D-amino acid) ได้จะใช้ในการผลิต monosodiumglutamate L-glutamate L-lysine HCL และ L-threonine รวมถึงกรดอะมิโนกลุ่มที่เป็นอโรมาติก เช่น L-phenylalanine และ L-tryptophan ซึ่งในอดีตสามารถผลิตได้โดยการใช้เอนไซม์เท่านั้น

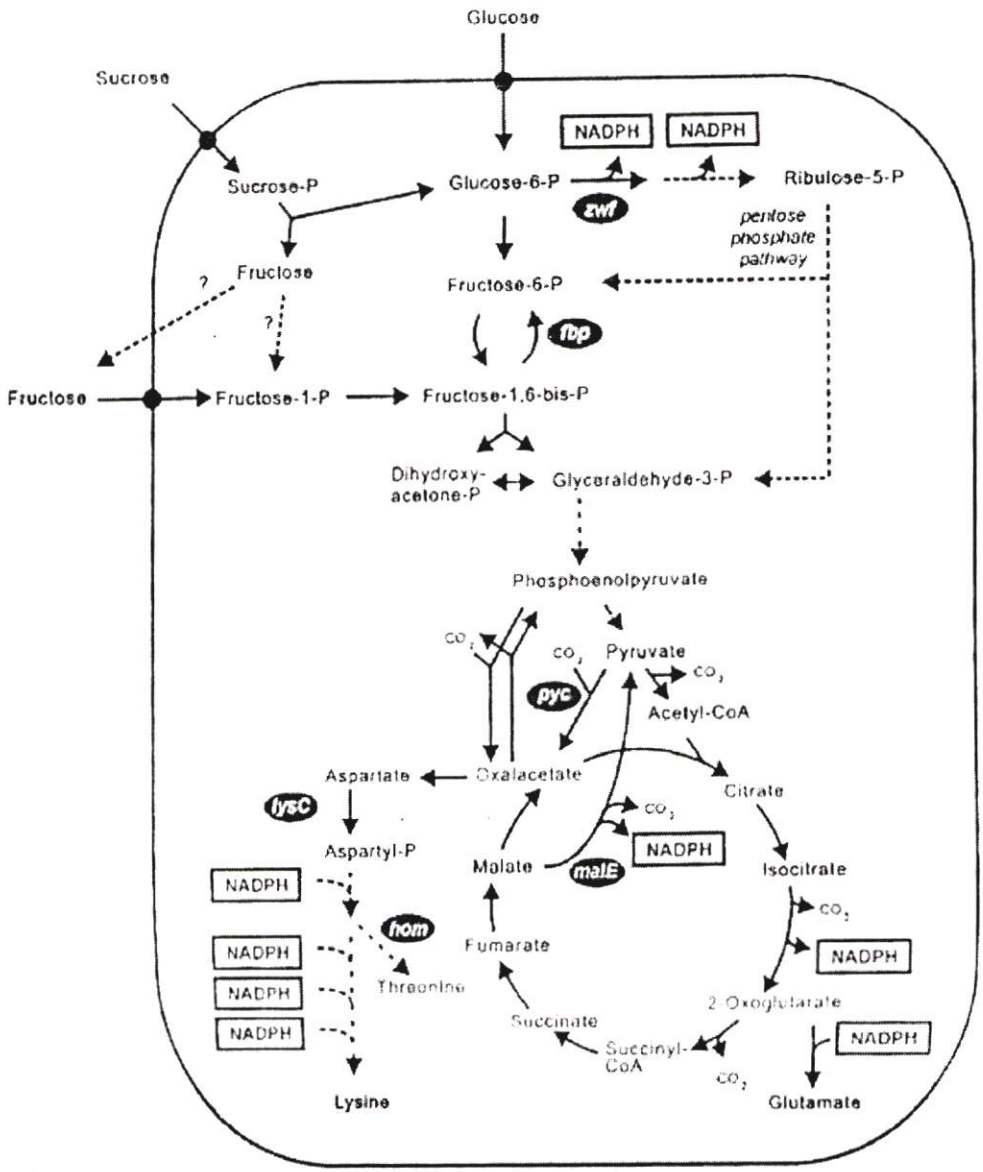
2.4.4 การใช้เอนไซม์ (enzymatic catalyst)

เป็นการใช้เอนไซม์จำเพาะในการผลิตกรดอะมิโนโดยใช้สับสเตรทต่างๆ โดยอาจใช้ในรูปตัวเซลล์หรือส่วนประกอบของเซลล์ก็ได้ และในกรณีที่การหมักเป็นแบบต่อเนื่องอาจใช้เอนไซม์ในรูปของเซลล์ตรึงได้ การผลิตจะขึ้นอยู่กับราคาและปริมาณของสับสเตรท รวมถึงกิจกรรมและความเสถียรของเอนไซม์ที่ใช้ และกระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิต ซึ่งวิธีนี้มีข้อเสียตรงที่สับสเตรทที่ใช้มีราคาค่อนข้างสูง แต่จะสามารถผลิตกรดอะมิโนได้ทั้งในรูปแอลและดี (L,D-amino acid) ส่วนกระบวนการผลิตไลซีนในระดับอุตสาหกรรมจะมีการผลิตไลซีนเป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์และสัตว์เนื่องจากสิ่งมีชีวิตจะสามารถใช้ได้เฉพาะแอล-ไลซีนเท่านั้น ในปัจจุบันนิยมผลิตไลซีนโดยใช้กระบวนการหมักจากจุลินทรีย์ เพราะมีความเหมาะสมทางด้านเศรษฐศาสตร์มากกว่าไลซีนที่ได้จากการหมักโดยจุลินทรีย์เป็นแอล-ไลซีน ซึ่งสิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้ได้ทันที

2.5 กระบวนการผลิตไลซีน

2.5.1 การผลิตไลซีนโดยจุลินทรีย์

การหมักโดยตรงหรือการใช้จุลินทรีย์ในการหมักโดยทำการหมักเชื้อจุลินทรีย์ในแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมกับการเจริญ และการผลิตไลซีนโดยมีการควบคุมสภาวะที่เหมาะสม เช่น การให้อากาศ อุณหภูมิ พีเอช ประโยชน์ที่สำคัญของการหมักคือ สามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกได้และสามารถผลิตกรดอะมิโนในรูปแอลได้ กระบวนการผลิตไลซีนโดยจุลินทรีย์ แสดงดังภาพที่ 2.6

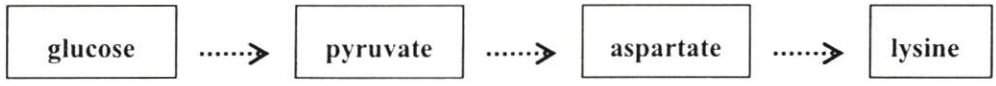


ภาพที่ 2.6 แสดงกระบวนการผลิตไลซีนโดยเชื้อจุลินทรีย์

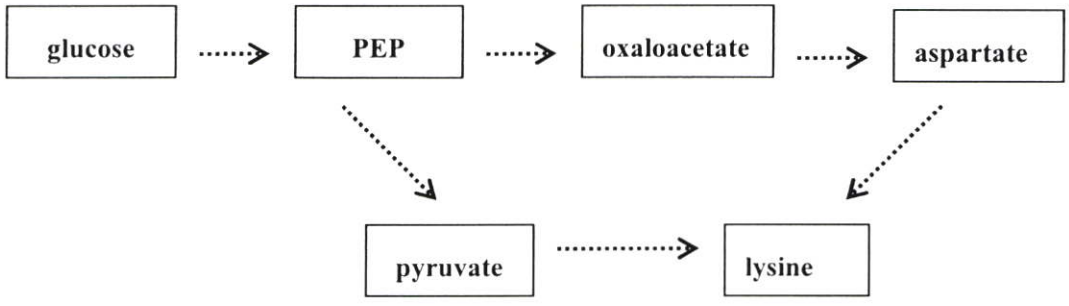
ที่มา: Georgi *et al.* (2005)

จากภาพที่ 2.6 แอล-ไลซีนที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์นั้นมักจะปล่อยออกมานอกเซลล์ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์ไลซีนของจุลินทรีย์จะประกอบด้วยวิถีพื้นฐาน 4 ขั้นตอนคือ (Shvinka *et al.* 1980)

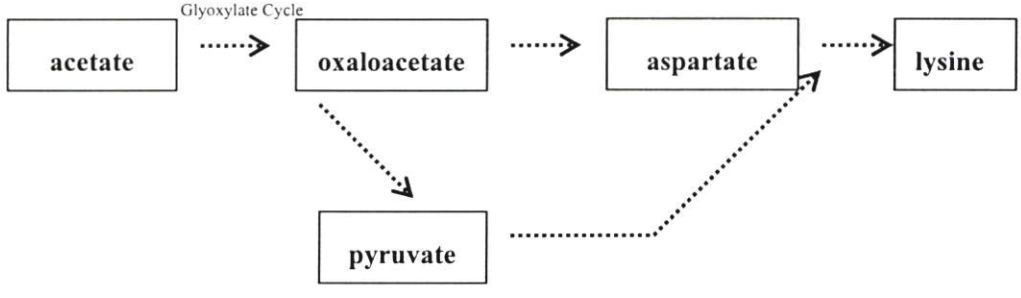
1. กระบวนการสังเคราะห์ไลซีนผ่านวิถีกรดคาร์บอกซิลิค (tricarboxylic acid cycle , TCA cycle)



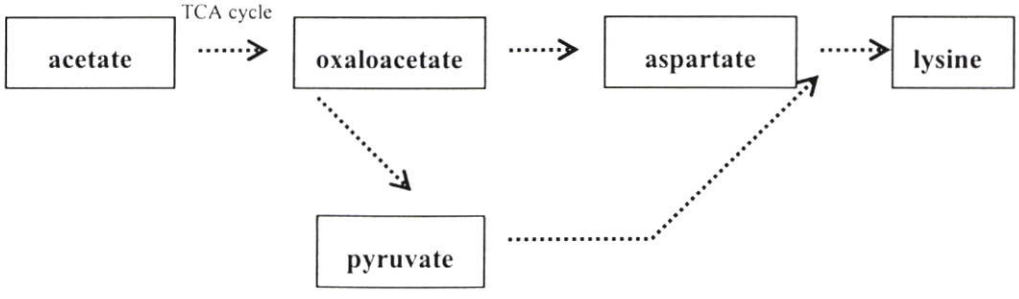
2. กระบวนการการสังเคราะห์ไลซีนผ่านวิถีไกลโคไลซีส (glycolysid pathway)



3. กระบวนการสังเคราะห์ไลซีนผ่านอะซิเตท ผ่านวิถีไกลออกซิเลต (glyoxylate pathway)



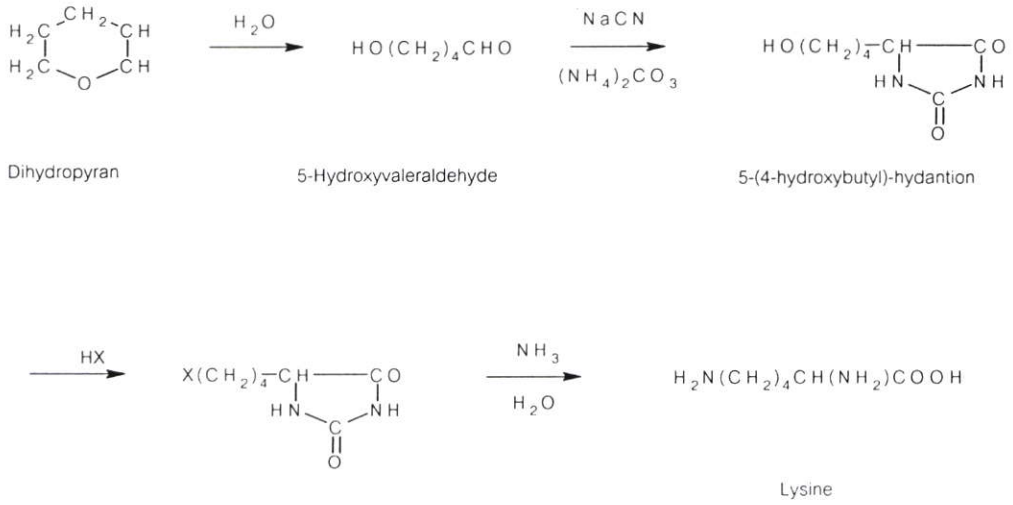
4. กระบวนการสังเคราะห์ไลซีนจากอะซิเตท ผ่านวิถีกรดไตรคาร์บอกซิลิค (tricarboxylic acid cycle , TCA cycle)



2.5.2 การผลิตไลซีนโดยวิธีการทางเคมี

การผลิตไลซีนโดยวิธีการทางเคมีจะเริ่มจากสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ เช่น piperidine dihydropyran caprolactam และ cyclohexone เป็นต้น ในกรณีที่ใช้ dihydropyran เป็นสารตั้งต้นในการผลิตจะเริ่มปฏิกิริยาโดยการเปิดวงแหวนของ dihydropyran ด้วยการดึงน้ำออกได้ 5-hydroxyvaleraldehyde ซึ่งจะนำสารนี้มาทำปฏิกิริยากับโซเดียมไซยาไนด์ หรือแอมโมเนียมคาร์บอเนต เกิดเป็น 5-(4-hydroxybutyl) เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนคลอไรด์ หรือไฮโดรเจนโบรไมด์ หมู่ไฮดรอกซิลของ hydantion จะถูกแทนที่ด้วยฮาโลเจน (halogen) จากนั้นฮาโลเจนจะถูกแทนที่ด้วยหมู่อะมิโนในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสภาพที่มีแอมโมเนียทำให้ได้ไลซีนเป็นผลผลิตสุดท้าย แสดงดังภาพที่ 2.7

เนื่องจากการผลิตโดยวิธีการทางเคมีไลซีนที่ได้จะเป็น ดีแอล-ไลซีน ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็น แอล-ไลซีน โดยนำดีแอล-ไลซีนมาทำปฏิกิริยากับแอล-กลูตามิก D-camphoric หรือ D-homocysteinic เกิด diastereoisomer 2 ชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติการละลายที่แตกต่างกัน จึงแยกจากกันได้โดยวิธีการตกผลึกแบบลำดับส่วน (fractional crystallization) โดยสารชนิดแรกคือ แอล-ไลซีน แอล-กลูตาเมท ซึ่งสามารถสกัดออกมาได้โดยใช้สารละลายของน้ำกับแอลกอฮอล์ จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกให้ได้เป็นแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์กับกรดกลูตามิก ส่วน ดี-ไลซีนที่ได้จะถูกนำไปทำปฏิกิริยากับด่างที่อุณหภูมิสูงได้ racemate ย้อนกลับไปใช้ในปฏิกิริยาเดิม (McPherson. 1966)



ภาพที่ 2.7 แสดงการผลิตไลซีนโดยกรรมวิธีทางเคมี

ที่มา: McPherson (1996)

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.6 จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตไลซีน

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไลซีน เช่น *Brevibacterium lactofermentum* (Tosaka *et al.*1979; *Kawahara et al.* 1990) *C. glutamicum* (Broer *et al.* 1993; Cremer *et al.* 1991;Kiss and Stephanopoulos.1991) *B. Flavum* (Shito and Sano 1969; Shvinka *et al.* 1980) Yeast and *Lactobacilli* (Odunfa *et al.* 2001) นิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในการผลิตไลซีนเนื่องจากเซลล์มีองค์ประกอบของโปรตีนสูง มีอัตราการเจริญสูงและสามารถใช้วัตถุดิบหลายชนิดในการผลิตได้ มีการพัฒนานำเชื้อราที่มีการเจริญและมีองค์ประกอบของโปรตีนสูงมาใช้ผลิตไลซีนเนื่องจากเชื้อราสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่ายกว่าจุลินทรีย์ประเภทอื่น เพราะรามีขนาดใหญ่ แต่จากการศึกษาพบว่าเชื้อราที่เลี้ยงในห้องทดลองมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าแบคทีเรียและยีสต์ ตลอดจนเชื้อราหลายชนิดจะสร้างสารพิษที่ทำลายยากออกมา

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างไลซีนของแบคทีเรีย

2.7.1 แหล่งคาร์บอน

กระบวนการหมักทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษาการผลิตไลซีนได้แก่ กลูโคส และซูโครสซึ่งมีทั้งซูโครสบริสุทธิ์และที่อยู่ในรูปของกากน้ำตาลจากหัวบีท (sugar beet molasses) หรือกากน้ำตาลจากอ้อย (sugar cane molasses) วัสดุที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) ข้าวโพด หญ้าหวาน ข้าวฟ่างบด (millet) แป้งมันสำปะหลัง (casava) แป้งมันเทศ (yam) (Umerie *et al.* 2000)

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสร้างเซลล์ (สมใจ ศิริโภค. 2544)

Bianchi *et al.* (2001) ศึกษาการผลิตไลซีนจากเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21543 โดยเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนจากกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมกลูคอเนต 130 กรัมต่อลิตร และ กลูโคส 50 กรัมต่อลิตรผสมโพแทสเซียมกลูคอเนต 65 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่ประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 30 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.4 กรัมต่อลิตร ไทอะมีน 300 ไมโครกรัมต่อลิตร และไบโอติน 400 ไมโครกรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่าการใช้กลูโคสผสมโพแทสเซียมกลูคอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 25 กรัมต่อลิตร

69051

Coello *et al.* (1992) ศึกษาการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21513 ใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที โดยจำกัดปริมาณของกลูโคสในอาหารที่ใช้สำหรับการผลิตไลซีน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์จะใช้คาร์บอนไปเพื่อการสร้างมวลเซลล์ แม้ว่าจะใช้ในอัตราการเจือจางของกลูโคสเพียง 9 กรัมต่อลิตร

Ekwealor and Obeta (2005) ทำการศึกษาการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *B. megaterium* SP 14 ที่เวลาการเพาะเลี้ยง 96 ชั่วโมง ให้ผลได้ของไลซีน 3.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้กลูโคสร้อยละ 8 เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมคลอไรด์ร้อยละ 4 เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

Georgi *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตไลซีนและกลูตามิกโดยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 13032 ในอาหารที่ใช้น้ำตาลชนิดต่างๆดังนี้คือ กลูโคส ฟรุคโตส กลูโคสผสมฟรุคโตส และซูโครส เปรียบเทียบการผลิตไลซีน พบว่าอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสจะสามารถทำให้เชื้อเจริญและผลิตไลซีนได้ดีกว่าอาหารที่ใช้ น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลกลูโคสผสมฟรุคโตส และน้ำตาลซูโครส

Hadj *et al.* (1996) ทำการศึกษาการผลิตไลซีนจากเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21513ในการหมักแบบกะ ที่ใช้อาหารที่มีกลูโคส 180 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักขนาด 15 ลิตร อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส พีเอช 7.2 จากผลการทดลองพบว่าปริมาณกลูโคสมีผลต่อการเจริญของมวลเซลล์และมีผลต่อการผลิตไลซีน

Paegle and Ruklisha (2003) ศึกษาการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *C. glutamicum* RC 115 ใช้น้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตไลซีน ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนที่เติมในอาหารเป็นระยะจาก 4 สูตร คือ สูตรที่ 1 ใช้ กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร สูตรที่ 2 ใช้ กลูโคส 4.5 ผสมอซิเตท 0.5 กรัมต่อลิตร สูตรที่ 3 ใช้กลูโคส 1 กรัม ผสมอซิเตท 4 กรัมต่อลิตร และ สูตรที่ 4 ใช้ กลูโคส 1 กรัม อะซิเตท 4 กรัม ไพรูเวท 1 กรัมต่อลิตร พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารจะให้อัตราการเจริญจำเพาะ 0.11 ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการใช้กลูโคสผสมกับอซิเตท

Shah *et al.* (2002) ทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่มีผลต่อการผลิตไลซีนของเชื้อ *C. glutamicum* โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้นของน้ำตาลระดับต่างๆ ดังนี้คือ ร้อยละ 6 7 8 9 10 11 และ 12 ตามลำดับ ที่สภาวะการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน พบว่า เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 21 กรัมต่อลิตร

Umerie *et al.* (2000) ศึกษาการผลิตไลซีนจากเชื้อ *B. laterosporus* โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบกะ ที่ควบคุมอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าที่ 160 รอบต่อนาที ทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ศึกษาการผลิตไลซีนโดยทำการเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนที่

แตกต่างกันคือ มันสำปะหลัง ข้าวโอ๊ต ลูกเดือย กล้วยกล้าย ข้าวฟ่าง มันฝรั่ง มันเทศ ซึ่งผลการทดลองพบว่าการใช้ลูกเดือย เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไลซีนจะสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 3 กรัมต่อลิตร

Shvinka *et al.* (1980) ศึกษาการสังเคราะห์ไลซีนโดยเชื้อ *B. flavum* โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้คือ กลูโคสและอะซิเตตพบว่า เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะได้ผลผลิตสูงสุดถึง 0.69 กรัมไลซีนต่อกรัมกลูโคส ส่วนเมื่อใช้อะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะได้ผลผลิตสูงสุด 0.60 กรัมไลซีนต่อกรัมอะซิเตต

2.7.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ คือพวกอนินทรีย์ไนโตรเจน แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เกลือไนเตรท หรืออาจจะใช้ยูเรีย และสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนพวกยีสต์สกัด (yeast extract) สารสกัดจากเนื้อสัตว์ (meat extract) (Bisaria *et al.* 1997) เปปโตน โพลีเปปโตน เคซีนไฮโดรไลเสท (casein hydrolysate) (Coello *et al.* 2000) กากถั่ว กากเมล็ดฝ้าย กากถั่วลิสง เมล็ดคอตตอน และ กากถั่วเหลือง ที่ผ่านการสกัดน้ำมันและไม่ผ่านการสกัดน้ำมัน (Umerie *et al.* 2000)

Shah *et al.*(2002) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *C. glutamicum* ทำการหาปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมที่อัตราส่วนร้อยละ 1 2 3 และ 4 ที่สภาวะการหมักอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จากการทดลองพบว่าเชื้อ *C. glutamicum* สามารถผลิตไลซีนสูงสุด 20 กรัมต่อลิตร

Coello *et al.* (2000) ศึกษาการผลิตไลซีนจากเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21543 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที ในอาหารที่มีการใช้น้ำหมักปลา 40 กรัมต่อลิตร แทนการใช้ยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า อาหารที่ใช้น้ำหมักปลา 40 กรัมต่อลิตรแทนการใช้ยีสต์สกัด สามารถผลิตมวลชีวภาพ 10 กรัมต่อลิตร และปริมาณไลซีน 30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำผลการทดลองวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการใช้น้ำหมักปลา 40 กรัมต่อลิตร และแทนยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร

Haidaris *et al.* (1978) ทำการผลิตไลซีนจากเชื้อ *S. cerevisiae* AEC45 พบว่าถ้ามีการเติมยูเรียลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มการผลิตไลซีนแต่ผลผลิตโดยรวมจะไม่เพิ่มขึ้น ส่วนการเติมกรดแอลฟา-คีโตอะดิพิก และกรดแอลฟา-อะมิโนอะดิพิก จะทำให้ผลผลิตโดยรวมเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 25

Umerie *et al.* (2000) ทำการศึกษาการผลิตไลซีนโดยกระบวนการหมักแบบกะโดยเชื้อ *B. laterosporus* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที ที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันคือ กากถั่ว กากถั่วเหลือง กากเมล็ดฝ้าย กากถั่วลิสง ปริมาณร้อยละ 1.0 โดยเปรียบเทียบกันระหว่างแหล่งไนโตรเจนที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกกับแหล่งไนโตรเจนที่ยังไม่ทำการสกัดน้ำมันออก พบว่าเมื่อใช้กากถั่วเหลืองที่ทำการสกัดน้ำมันออกไปก่อน(defatted) เป็นแหล่งไนโตรเจน จะให้ผลผลิต 5.67 กรัมต่อลิตร ซึ่งดีกว่าการใช้ถั่วที่ไม่ผ่านการสกัดน้ำมัน (non-defatted) ที่ให้ผลผลิต 4.78 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 4.0 พบว่าแหล่งไนโตรเจนจากธรรมชาติจะให้ผลผลิตไลซีนที่มากกว่า

2.7.3 แร่ธาตุ

แร่ธาตุมีความสำคัญ และต้องเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ แมกนีเซียมโพแทสเซียม ฟอสฟอรัส กำมะถัน แคลเซียมและคลอรีน นอกจากนี้ก็ยังมีแร่ธาตุที่ต้องการในปริมาณน้อยแต่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีก เช่น โคบอลต์ ทองแดง เหล็ก แมงกานีส โมลิบดินัมและสังกะสี แต่โดยทั่วไปมักจะพบเจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น น้ำแช่ข้าวโพด และฟาร์มามีเดีย ในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว ดังนั้นจึงอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นการเตรียมอาหารสังเคราะห์ (synthetic medium) จึงจำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารโดยตรง แร่ธาตุต่างๆที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ตามปกตินิยมใช้ในรูปสารอนินทรีย์ ได้แก่ KH_2PO_4, K_2HPO_4 ,$MgSO_4$, $FeSO_4$, KCl, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $CaCl_2$, H_3BO_3, $CuSO_4$, Na_2MoO_4 และNaH_2PO_4 (สมใจ ศิริโภค. 2544)

Coello *et al.* (1992) ทำการผลิตไลซีนในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เชื้อ *C. glutamicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที ค่าพีเอช 7.0 พบว่าเมื่อทำการจำกัดปริมาณฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อการผลิตไลซีนจะผลิตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอสเฟตอยู่ปริมาณต่ำ

2.7.4 วิตามิน

วิตามินเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิตจุลินทรีย์บางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินที่มันต้องการได้เอง แต่จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์ได้ จึงต้องมีการเติมวิตามินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งวิตามินที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ได้จากแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จากธรรมชาติอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดอะมิโน อาจมีการเติมวิตามินบางชนิด เช่น ไบโอติน ไทอะมีน นิโคตินาไมด์ แคลเซียมแพนโทธีเนท ไรโบฟลาวิน และวิตามินบี 12 (สมใจ ศิริโภค. 2540)

Shah *et al.* (2002) ศึกษาผลของวิตามินต่อการผลิตไลซีนด้วยเชื้อ *C. glutamicum* ในการหมักแบบกะ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที โดยแปรผันความเข้มข้นของไบโอติน และไทอะมีน ในอาหารที่ใช้ผลิตไลซีน พบว่าการใช้ ไบโอติน 50 ไมโครกรัมต่อลิตร และไทอะมีน 200 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 17.5 กรัมต่อลิตร

2.7.5 อุณหภูมิ

เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตมากเช่นกัน เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแตกต่างกันไป โดยส่วนใหญ่ในการผลิตไลซีนจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 28-33 องศาเซลเซียส (สมใจ ศิริโภค.2540) เช่นการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *S. cerevisiae* (Haidari *et al.* 1978) *C. glutamicum* ATCC 21513 (Kiss *et al.* 1991) *C. glutamicum* ATCC 21253 (Vallino *et al.* 1993)

Shah *et al.* (2002) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไลซีนจากเชื้อ *C. glutamicum* ในการหมักแบบกะ โดยแปรผันอุณหภูมิในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 27-35 องศาเซลเซียส พบว่าการหมักที่ใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 16 กรัมต่อลิตร

Kiss and Stephanopoulos (1991) ทำการผลิตไลซีนในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องด้วยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21253 ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถผลิตไลซีนได้ดีโดยจะให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.1 ต่อชั่วโมง อัตราการเจริญจำเพาะการผลิตผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 0.1 – 0.2 ต่อชั่วโมง

2.7.6 พีเอช

การผลิตจำเป็นต้องมีการควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมจึงจะได้ผลผลิตปริมาณสูง การควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำได้โดยการเติมสารประกอบบางอย่างลงไปเพื่อให้ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ อย่างไรก็ตามส่วนประกอบบางอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ฟอสเฟตก็มีสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ควบคุมพีเอช นอกจากนี้การใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอัตราส่วนที่สมดุลกันก็จะช่วยควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เนื่องจากสารพวกโปรตีนเปปไทด์และกรดอะมิโนก็มีสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ สารเคมีที่นิยมใช้ปรับค่าพีเอชได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Coello *et al.* 1992) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Kawahara *et al.* 1990)โดยทั่วไปแล้วในการผลิตไลซีนจะทำการควบคุมค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าอยู่ในช่วง 6.8-7.5 (สมใจ ศิริโภค. 2540)

Shah *et al.* (2002) ศึกษาการผลิตไลซีนจากเชื้อ *C. glutamicum* โดยกระบวนการหมักแบบกะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารที่ใช้ผลิตไลซีนในช่วงพีเอชตั้งแต่ 6 7 8 และ 9 พบว่าอาหารที่ใช้ผลิตไลซีนที่มีช่วงพีเอชอยู่ที่ 7.5 จะสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 16.5 กรัมต่อลิตร

2.7.7 การให้อากาศ

การสร้างกรดอะมิโนในกลุ่มกลูตาเมตและแอสพาร์เตทนั้น เปลี่ยนแปลงจากสารมัธยันต์ในวัฏจักรเครบส์ดังนั้นถ้ามีออกซิเจนมากพอจะทำให้มีสารมัธยันต์ในวัฏจักรเครบส์เกิดขึ้นจำนวนมากเป็นผลให้มีการผลิตกรดอะมิโนในกลุ่มนี้จำนวนมากด้วย

ความต้องการออกซิเจนของจุลินทรีย์จะขึ้นกับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยถ้าใช้แหล่งคาร์บอนซึ่งจุลินทรีย์สามารถเมแทบอไลซ์ได้อย่างรวดเร็วความเข้มข้นสูงจะทำให้จุลินทรีย์เจริญอย่างรวดเร็วและมีความต้องการออกซิเจนปริมาณสูงจนอาจเกินความสามารถในการให้อากาศของถังหมักได้ (สมใจ ศิริโภค. 2544)

Hadj *et al.* (1996) ผลิตไลซีนจากเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21513ในกระบวนการหมักแบบกะ ในถังหมักขนาด 15 ลิตร ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส พีเอช 7.2 ในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 180 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 60 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.8 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.01 กรัมต่อลิตร เฟอรัสซัล เฟต 0.01 กรัมต่อลิตร ไบโอติน 400 ไมโครกรัมต่อลิตร และไทอะมีน 300 ไมโครกรัมต่อลิตร ศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนพบว่า เมื่อมีการให้อากาศ 0.75 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที การผลิตไลซีนจะเพิ่มขึ้นร้อยละ 50

2.8 กระบวนการการเก็บเกี่ยวผลผลิต

กระบวนการแยกไลซีนสามารถทำได้โดยนำอาหารนั้นมาผ่าน ion-exchange column แล้วชะไลซีนออกจากเรซินโดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ หลังจากนั้นแอมโมเนียมที่ออกจากคอลัมน์จะถูกกำจัดออกในรูปของแอมโมเนียในขณะทำแห้ง ทำให้ได้ไลซีนอยู่ในรูปโมโนไฮโดรคลอไรด์ จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยวิธีการตกผลึก (recrystallization) การวัดปริมาณไลซีนในตัวอย่างทำได้หลายวิธี ทั้งวิธีการทางเคมี และวิธีการที่ใช้จุลินทรีย์ในการวิเคราะห์ โดยปกติมักวิเคราะห์ปริมาณไลซีนโดยการใช้จุลินทรีย์ เพราะไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์มากนัก และสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ประจำวันได้ จุลินทรีย์ที่ใช้คือ แบคทีเรีย ซึ่งจะมีความจำเพาะกับกรดอะมิโนชนิดนั้น ๆ ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก แบคทีเรียที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ *Streptococcus fecalis* และ *Leuconostoc mesenteroides* P-60 นอกจากจะใช้แบคทีเรียในการหาปริมาณกรดอะมิโนแล้ว ยังสามารถใช้ในการหาปริมาณวิตามินได้ การวัดหาปริมาณไลซีนในตัวอย่างสามารถทำได้ทั้งวิธีการทางเคมีและวิธีการที่ใช้จุลินทรีย์ในการวิเคราะห์ แต่ในปัจจุบันนิยมวิเคราะห์หาไลซีนโดยเครื่องมือวิเคราะห์ คือ HPLC เพราะเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วให้ผลที่แม่นยำ

2.9 ประโยชน์ของไลซีน

ไลซีนเป็นหนึ่งในกรดอะมิโนที่จำเป็นเนื่องจากร่างกายของมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเอง ดังนั้นร่างกายของมนุษย์จะได้รับกรดอะมิโนที่จำเป็นนี้โดยผ่านทางอาหารซึ่งปริมาณไลซีนส่วนใหญ่จะพบในกล้ามเนื้อของมนุษย์ไลซีนมีความสำคัญในการสร้างคอลลาเจนซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญของร่างกาย ประกอบกันเป็นกระดูก กระดูกอ่อน ผิวหนัง และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน การที่ไลซีนสามารถเปลี่ยนเป็นคอลลาเจนได้นั้นจะถูกควบคุมโดยวิตามินซี นอกจากนี้ไลซีนสามารถเปลี่ยนไปเป็นคาร์นิทีน (carnitine) ซึ่งคาร์นิทีนเป็นกรดอะมิโนที่ผลิตขึ้นภายในตับ เกิดจากการที่ไลซีนถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ทรานอะมิเนส (transaminase) ภายในตับซึ่งกระบวนการย่อยสลายนี้จะขึ้นอยู่กับวิตามินบี 6 วิตามินบี 3 วิตามินบี 2 วิตามินซี และเหล็ก และสามารถพบคาร์นิทีนได้ในกล้ามเนื้อ และอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ส่วนคนที่รับประทานแต่ผักจะทำให้อ่อนแอเนื่องจากมีกรดอะมิโนดังกล่าวข้างต้นไม่เพียงพอ (เสาวนีย์ ธรรมสถิต. 2547)

ทางอุตสาหกรรมอาหาร ไลซีนจะช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของอาหารจำพวกธัญพืช เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี ซึ่งโดยปกติแล้วอาหารพวกธัญพืชจะเป็นอาหารที่มีปริมาณไลซีนอยู่น้อย อีกทั้งไลซีนยังเป็นกรดอะมิโนที่มนุษย์ไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ ร่างกายจะได้รับกรดอะมิโนผ่านทางอาหาร โดยไลซีนจะมีความสำคัญในการสร้างคอลลาเจนซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญของร่างกายที่ประกอบกันเป็นกระดูก กระดูกอ่อน ผิวหนัง และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยวิตามินซีจะเป็นตัวควบคุมการเปลี่ยนแปลงของไลซีนไปเป็นคอลลาเจน นอกจากนี้ไลซีนสามารถเปลี่ยนไปเป็นคาร์ทีน (carntine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ผลิตขึ้นภายในตับ เกิดการที่ไลซีนถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ทรานอะมิเนส (transaminase) ภายในตับ ซึ่งกระบวนการย่อยสลายนี้จะขึ้นอยู่กับวิตามินบี 6 วิตามินบี 3 วิตามินบี 2 วิตามินซี ธาตุเหล็ก และกลูตามิก สามารถพบคารนิทีนได้ในกล้ามเนื้อ และอาหารประเภทสัตว์ ดังนั้นในคนที่รับประทานแต่ผักจะอ่อนแอ เนื่องจากในพืชมีกรดอะมิโนดังกล่าวไม่เพียงพอ

ทางการแพทย์และอุตสาหกรรมยา สามารถใช้ในรูปของสารอาหารที่บำรุงร่างกาย เช่นใช้ผสมในน้ำเกลือเพื่อฉีดเข้าเส้นเลือด เพื่อใช้เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดความอยากอาหารในผู้ป่วยระยะพักฟื้น ใช้ในส่วนประกอบในยาบรรเทาปวด ลดไข้ และแก้อักเสบ โดยจะใช้ในรูปของอนุพันธ์ของไลซีน เช่น ไลซีนซาลิไซเลท (lysine salicylate) ไลซีนสามารถเพิ่มการดูดแคลเซียมของลำไส้ และยังช่วยขับแคลเซียมออกจากปัสสาวะอีกด้วย (Slagle. 1998)

ทางอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ มักใช้ไลซีนในอาหารที่ใช้เลี้ยงสุกร เป็ด และไก่ โดยไลซีนจะช่วยให้ปริมาณกรดอะมิโนมีความสมดุลกับส่วนประกอบอื่นๆ ในอาหารมากขึ้น ช่วยให้สัตว์มีการเจริญเติบโตดี และได้เนื้อที่มีคุณภาพดีขึ้น โดยสัตว์จะสามารถเปลี่ยนแปลงไลซีนไปเป็นโปรตีนในร่างกายได้ ซึ่งไลซีนที่ใช้ในอาหารสัตว์ร้อยละ 98 จะอยู่ในรูปของไลซีน-โมโนไฮโดรคลอไรด์ ปริมาณไลซีนที่ใช้ผสมลงในอาหารสัตว์จะประมาณร้อยละ 0.5 (Cruger and Cruger. 1989)

ด้านอื่นๆ ไลซีนสามารถใช้เป็นสารเริ่มต้นในการผลิตสารต่างๆ เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางและไลซีนยังสามารถใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) TOMY SS-325 ; Tomy Seiko

เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) INNOVA 4330 ; New Brunswick Scient

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) UV 1601 ; Shimadzu

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานลิควิดโครมาโทกราฟี(High Performance Liquid Chromatography) C-R7A ; Shimadzu.ประกอบด้วย

ส่วนควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่; LC-10 AD VP

ส่วนวัดการดูดกลืนแสง UV ; SPD-10 A VP

ส่วนประมวลและบันทึกผล ; C-R7 Ae plus

ตู้ถ่ายเชื้อ (lamina air flow) Issco laminar air flow model ; Internal Scientific supply

เครื่องชั่งละเอียด 3 ตำแหน่ง PG 803 ; METTLER-TOLEDO

เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง BP 221S ; Scientific Promotion

เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) Falcon 6/300 ; MSE

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) Cyberscan 2000 ; EUTECH

ตู้อบลมร้อน (hot air oven) UML 600 ; Memmert

ตู้บ่มเชื้อ (incubator) BE 600 ; Memmert

ถังหมักขนาด 2 ลิตร (BIOSTAT B) ; B. Braun Biotech International

เครื่องย่อย (digestibility) รุ่น DK 20 Heading digester.

เครื่องกลั่น (distillation) Gerhardt รุ่น Vapodest 30 Scientific Promotion

กล้องจุลทรรศน์ CH 300 ; OLYMPUS

โถดูดความชื้น (desicator) GL32 ; Glaswerk Wertheim

ชุดกรองสุญญากาศ

เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) Scientific industries

ไมโครปิเปต Pipetman ; GILSON

คิวเวทควอส

3.1.2 สารเคมี

ยีสต์สกัด ; Scharlau

กลูโคส ; Merck

เปปโตน ; Scharlau

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ; Fluka

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ; Fluka

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ; Fluka

ไบโอติน ; Merck

ไทอะมีน ; Fluka

สารละลายมาตรฐานไลซีน ; Sigma

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ และ ปริมาณไนโตรเจน (ภาคผนวก ข)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำทิ้ง (ภาคผนวก ข)

3.1.3 วัตถุดิบ

3.1.3.1 กากน้ำตาลจากโรงงานน้ำตาลทรายนิวกรุงไทย ต.ท่ามะกา จ. กาญจนบุรี

นำวัตถุดิบที่เก็บมาในครั้งเดียวกันทำการเตรียมและเก็บรักษาโดยนำกากน้ำตาลทำการกรองเพื่อแยกตะกอนขนาดใหญ่ออก จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอนและแยกตะกอนขนาดเล็ก และนำมากรองด้วยกระดาษกรอง ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบวัตถุดิบ ตามภาคผนวก ข ทำการบรรจุในขวดปิดสนิทนำมาแช่แข็งเพื่อเก็บไว้ใช้สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.3.2 น้ำนึ่งปลาทูน่าจากโรงงาน ทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด ต.นาดี จ. สมุทรสาคร

นำวัตถุดิบที่เก็บมาในครั้งเดียวกันทำการเตรียมและเก็บรักษาโดยนำน้ำนึ่งปลาทูน่าทำการกรองเพื่อแยกตะกอนขนาดใหญ่ออก จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอนและแยกตะกอนขนาดเล็ก และนำมากรองด้วยกระดาษกรอง ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบวัตถุดิบ ตามภาคผนวก ข ทำการบรรจุในขวดปิดสนิทนำมาแช่แข็งเพื่อเก็บไว้ใช้สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.4 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.4.1 *A. citreus* NRRL 1258 จาก Northern Regional Research Centre, U.S.A. ในรูปแบบเซลล์แช่แข็งแบบแห้ง

3.1.4.2 *C. glutamicum* ATCC 21475 จาก American Type Culture Collection, U.S.A. ในรูปแบบเซลล์แช่แข็งแบบแห้ง

นำเชื้อในรูปแบบเซลล์แช่แข็งแบบแห้ง มาทำการเลี้ยงเชื้อใน nutrient borth (ภาคผนวก ก. 1) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงใน

อาหาร nutrient agar (ภาคผนวก ก.1) เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แยกโคโลนีเดี่ยวที่เจริญเก็บรักษาเป็นกล้าเชื้อต่อไป

3.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก.1)

Seed medium (ภาคผนวก ก.2)

Lysine production medium (ภาคผนวก ก.3)

อาหารสูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก.4-6)

3.1.6 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บในหลอดอาหาร NA slant มา 1 ลูป มาทำการเพิ่มปริมาณในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว seed medium (ภาคผนวก ก.2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความขุ่น 0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่า

นำวัตถุดิบกากน้ำตาลจากโรงงานผลิตน้ำตาลทรายมาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพตามวิธีต่างๆได้แก่ค่าพีเอชตามวิธี APHA,AWWA and WPCF (1992) ปริมาณเถ้า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลซูโครสตามวิธี Payne (1968) ดังภาคผนวก ข ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี Nelson (1994) ดังภาคผนวก ค และน้ำนึ่งปลาทูน่าทำการวิเคราะห์ พีเอช ปริมาณของแข็งทั้งหมด สารแขวนลอยและค่าซีโอดีตามวิธีตามวิธี APHA,AWWA and WPCF (1992) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดตามวิธี A.O.A.C. (1990) ดังภาคผนวก ข

3.2.2 การย้อมสีแกรมและการศึกษารูปร่างของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475

ทำการทดสอบการย้อมติดสีแกรมและรูปร่างลักษณะของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 โดยนำเชื้อแต่ละชนิดมาย้อมสีแกรมตามวิธี Tortora *et al.* (2001) (ภาคผนวก ค.1) การย้อมแกรมศึกษารูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมบวกและลบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

3.2.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารไลซีนสังเคราะห์

นำเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ทำการเลี้ยงในอาหาร lysine production (ภาคผนวก ก.3) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เติมเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 90 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ค) ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช (ภาคผนวก ข) ศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อได้แก่อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) อัตราการผลิตไลซีน (Qp) ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล (Yx/s) ผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาล (Yp/s) (ภาคผนวก ง)

นำเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ทำการเลี้ยงในอาหาร lysine production (ภาคผนวก ก.3) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เติมเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 90 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ค) ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช (ภาคผนวก ข) ศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อได้แก่อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) อัตราการผลิตไลซีน (Qp) ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล (Yx/s) ผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาล (Yp/s) (ภาคผนวก ง)

3.2.4 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ทำการเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาล (ภาคผนวก ก.4) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เติมเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 90 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช ศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อได้แก่อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการผลิตไลซีน ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาล

นำเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ทำการเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก.4) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เติมเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 90 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช ศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการผลิตไลซีน ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาล

3.2.5 การศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อการเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 2147

นำเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ทำการเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก.3) ที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคส โดยแปรผันความเข้มข้นของกากน้ำตาลให้มีปริมาณน้ำตาล 40 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 80 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช โดยวิเคราะห์ค่าทางสถิติวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely randomized design (CRD) ทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ

นำเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ทำการเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก.3) ที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคส โดยแปรผันความเข้มข้นของกากน้ำตาลให้มีปริมาณน้ำตาล 40 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 80 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช โดยวิเคราะห์ค่าทางสถิติวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely randomized design (CRD) ทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ

3.2.6 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจน

นำเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ทำการเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมน้ำนึ่งปลาทูน่า (ภาคผนวก ก.5) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เติมเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 90 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช ศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อได้แก่อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการผลิตไลซีน ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาล

นำเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ทำการเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมน้ำนึ่งปลาทูน่า (ภาคผนวก ก.5) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เติมเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 90 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช ศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อได้แก่อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการผลิตไลซีน ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาล

3.2.7 การศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อการเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 2147

นำเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 มาทำการเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก.3) ที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัด โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำนึ่งปลาทูน่าให้มีปริมาณไนโตรเจน 1 2 3 และ 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมที่ใช้ยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช โดยวิเคราะห์ค่าทางสถิติวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely randomized design (CRD) ทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ

นำเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 มาทำการเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก.3) ที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัด โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำนึ่งปลาทูน่าให้มีปริมาณไนโตรเจน 1 2 3 และ 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมที่ใช้ยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาล

รีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช โดยวิเคราะห์ค่าทางสถิติวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely randomized design (CRD) ทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ

3.2.8 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าที่เหมาะสมเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก.6) ที่เติมกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.5 และ 3.2.7 ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่าแบบควบคุมความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช ศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อได้แก่อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการผลิตไลซีน ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาล

เลี้ยงเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก.6) ที่เติมกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.5 และ 3.2.7 ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่าแบบควบคุมความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช ศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อได้แก่อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการผลิตไลซีน ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาล

3.2.9 การศึกษาการผลิตไลซีนในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการขนาด 2 ลิตร

3.2.9.1 การศึกษาผลของอัตราการกวน

เตรียมอาหารสูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก.6) ที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.5 และ 3.2.7 โดยใช้เชื้อที่สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุดในข้อ 3.2.8 ทำการเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที เติมหัวเชื้อลงไปปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ศึกษาความเร็วในการกวนที่ระดับต่างๆได้แก่ 250 500 700 รอบต่อนาที ตามลำดับ โดยมีอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช ศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อได้แก่อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการผลิตไลซีน ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาล โดยวิเคราะห์ค่าทางสถิติวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely randomized design (CRD) ทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ

3.2.9.2 การศึกษาผลของการควบคุมพีเอช

เตรียมอาหารสูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก.6) ที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.5 และ 3.2.7 โดยใช้เชื้อที่สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุดในข้อ 3.2.8 และอัตราการกวนที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.9.1 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมหัวเชื้อลงไปโดยใช้ปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยมีอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และควบคุมพีเอชเท่ากับ 7 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อได้แก่อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการผลิตไลซีน ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาล

3.3 วิธีการวิเคราะห์

3.3.1 การวิเคราะห์มวลชีวภาพ (ภาคผนวก ค.3)

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณไลซีน (ภาคผนวก ค.4)

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ค.2)

3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (ภาคผนวก ข.2)

3.3.5 การวิเคราะห์พีเอช ตามวิธี (ภาคผนวก ข.1)

3.3.6 การวิเคราะห์ค่าทางจลนพลศาสตร์ (ภาคผนวก ง)

การวิเคราะห์ค่าทางจลนพลศาสตร์โดยนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหา อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) อัตราการผลิตไลซีน (Qp) ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) ผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาล ($Y_{p/s}$)

3.3.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำค่าจากการวิเคราะห์มาทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธีการวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและสมบัติทางกายภาพของกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่า

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและสมบัติทางกายภาพของกากน้ำตาลจากโรงงานผลิตน้ำตาลทราย จำนวน 3 ครั้ง พบว่า กากน้ำตาลจากโรงงานผลิตน้ำตาลทราย มีค่าเฉลี่ย ดังนี้ พีเอช เท่ากับ 5.03 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเถ้าร้อยละ 55.13 21.86 และ 9.03 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.1 ผลที่ได้สอดคล้องกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมของกากน้ำตาลซึ่งประกอบด้วย ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (brix solid) วัดที่ 20 องศาเซลเซียส องศาบริกซ์ไม่น้อยกว่า 79 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar expressed as invert sugar) ไม่น้อยกว่าร้อยละ 50 ปริมาณเถ้าซัลเฟต (sulphated ash) ไม่เกินร้อยละ 11 และมีค่า พีเอช 5 - 6 กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลที่มีราคาถูกและกากน้ำตาลยังอุดมไปด้วยวิตามิน และ แร่ธาตุ กากน้ำตาลยังมีปริมาณน้ำตาลที่สูงสามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไลซีนได้ เช่นการทดลองของ Liu *et al.* (1980) ทำการผลิตไลซีนจากเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 13032 โดยทุกๆ 1 ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วยกากน้ำตาล 100 กรัม สามารถผลิตไลซีนร้อยละ 4.4 ผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 30 ของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ Wang *et al.* (1993) ทำการผลิตไลซีนโดยใช้เชื้อ *Brevibactrium sp.*P1-13 ในการหมักแบบกึ่งกะ ซึ่งมีการใช้อาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลทดแทนกลูโคส แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมอะซิเตต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ร้อยละ 9 3 0.2 และ 0.01 ตามลำดับ พบว่าเชื้อสามารถเจริญและผลิตไลซีนได้ดีในอาหารที่ใช้กากน้ำตาล จากสมบัติดังกล่าวของกากน้ำตาลจึงศึกษาการนำกากน้ำตาลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสในอาหารเพื่อผลิตไลซีนจากเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของกากน้ำตาลจากโรงงานผลิตน้ำตาลทรายนิวกรุงไทย

คุณลักษณะ	ร้อยละ
ของแข็งที่ละลายทั้งหมด วัดที่ 20 องศาเซลเซียส	88.20±2.2
น้ำตาลทั้งหมด	55.13±4.87
น้ำตาลรีดิวซ์	21.86±1.14
น้ำตาลซูโครส	33.27±1.73
เถ้าซัลเฟต	9.03±0.99
พีเอช	5.03±0.14

ค่าในตาราง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำนึ่งปลาทูน่า พบว่าน้ำนึ่งปลาทูน่าจากโรงงานผลิตปลาทูน่ามีค่า พีเอชเท่ากับ 6.07 ค่าซีโอดี 82,240 กรัมต่อลิตร ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 7,320 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นโปรตีนร้อยละ 4.58 และสัมพันธ์กับปริมาณของแข็งทั้งหมดที่มีค่าสูง 70,320 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.2 เนื่องจากของแข็งในน้ำนึ่งปลาทูน่าประกอบด้วยสารประกอบอินทรีย์ ค่าที่ได้ใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์น้ำนึ่งปลาทูน่าของ สุวิทย์ สุวรรณโณ (2535) ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำนึ่งปลาทูน่า ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อ *Rhodocyclus gelatinosus* R7 พบว่ามีค่าพีเอชเท่ากับ 6.05 ค่าซีโอดี และ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 157,080 และ 7,616 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับการทดลองของ มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ (2537) ที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์รงควัตถุของ *Rhodocyclus gelatinosus* R7 ที่เลี้ยงในน้ำนึ่งปลาทูน่าโดยทำการศึกษาองค์ประกอบของแร่ธาตุที่มีในน้ำนึ่งปลาทูน่าพบว่า มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสเฟต คลอไรด์ แมกนีเซียม และเหล็กเท่ากับ 7,616 378 71 0.04 และ 3.13 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์จะเห็นว่าน้ำนึ่งปลาทูน่าอุดมไปด้วยแหล่งของสารอาหารหลายๆชนิดโดยเฉพาะแหล่งไนโตรเจนและโปรตีน จึงใช้เป็นแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี จึงนำน้ำนึ่งปลาทูน่ามาศึกษาเพื่อใช้เป็น

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการผลิตไลซีนจากเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475

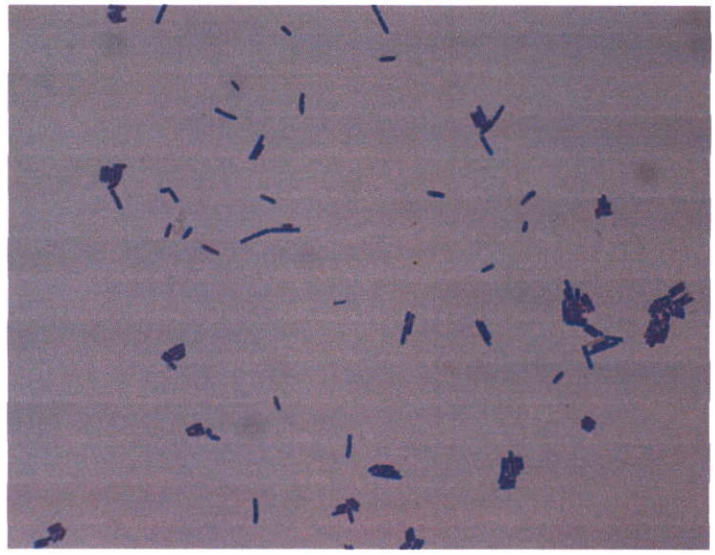
ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำนึ่งปลาทูน่าจากโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด

คุณลักษณะ	มิลลิกรัมต่อลิตร
พีเอช	6.07±0.05
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	70,320± 893
ค่าซีโอดี	82,240±3995
ไนโตรเจน	7,320±322

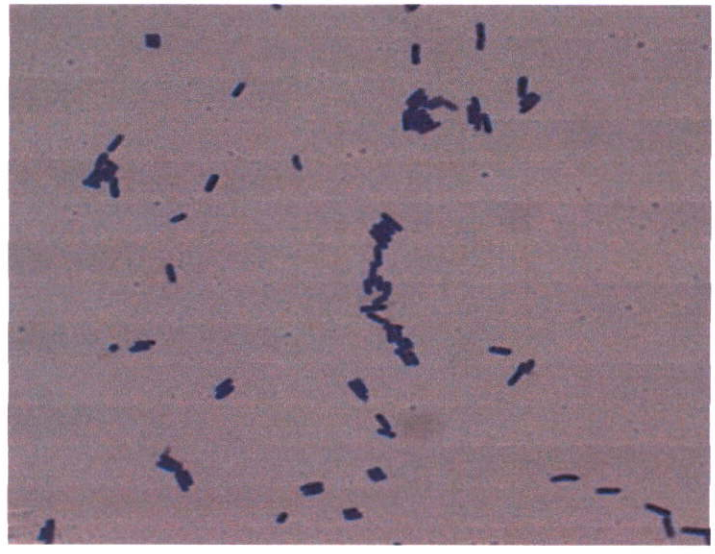
หมายเหตุ น้ำนึ่งปลาทูน่าผ่านการกรองแล้วก่อนนำมาวิเคราะห์
ค่าในตาราง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.1 การศึกษาการย้อมสีแกรมและรูปร่างของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475

จากการย้อมสีแกรมของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ได้ผลดังภาพที่ 4.1 ก และ 4.1 ข พบว่าลักษณะรูปร่างของเชื้อ เป็นรูปท่อนสั้นๆ ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนโดสปอร์ มีทั้งที่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆและเกาะเป็นกลุ่ม เนื่องมาจากองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันของแบคทีเรีย 2 กลุ่ม โดยแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงเนื่องจากมีผนังเซลล์ที่หนา ประกอบด้วยชั้นของของเปบติโดไกลแคน (peptidoglycan) ที่มีกรดไตรโคอิค (trichoic acid) และกรดไตรคูโรนิค (trichuronic acid) ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะหดรัดตัวเนื่องจากแอลกอฮอล์จะดึงน้ำออก (dehydration) ทำให้คงสี crystal violet – iodine complex ส่วนแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ที่บางกว่าประกอบด้วยชั้นของเอาท์เตอร์เมมเบรน (outer membrane) อยู่ชั้นนอกสุดและชั้นถัดไปเป็นเปบติโดไกลแคนบางๆ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีไขมันเป็นองค์ประกอบมากกว่าร้อยละ 30 ในชั้น outer membrane จึงละลายในแอลกอฮอล์ ทำให้ไม่สามารถคงสี crystal violet – iodine complex ไว้ได้ (งามนิจ นนทโส. 2537)



(ก)



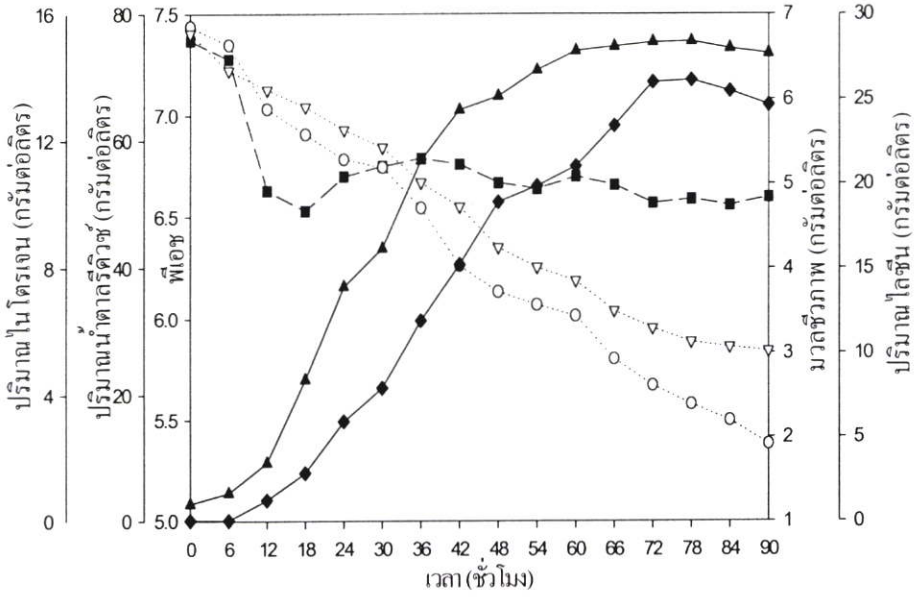
(ข)

ภาพที่ 4.1 แสดงการย้อมติดสีแกรมและลักษณะของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 (ก) และ เชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 (ข)

4.3 การเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารไลซีนสังเคราะห์

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารไลซีนสังเคราะห์ซึ่งมีองค์ประกอบ แสดงดังภาคผนวก ก.3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมงนำมาทำการวิเคราะห์ ค่าพีเอช มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้ ปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือ พบว่า ในช่วงแรกของการหมักหลังชั่วโมงที่ 6 พีเอชของอาหารมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว (พีเอช 6.53) จากพีเอชเริ่มต้น 7.4 หลังจากชั่วโมงที่18 ค่าพีเอชจะค่อยๆเพิ่มขึ้น (พีเอช 6.7) เนื่องมาจากมีการใช้สารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต จึงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกรดมากขึ้น เมื่อแอมโมเนียถูกใช้ไป (กำเนิด สุภัณวงษ์. 2534)

จากภาพที่ 4.2 การเจริญของเชื้อในช่วงแรกเริ่มทำการหมักเชื้อจะทำการปรับตัวโดยเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 จะเริ่มเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวนหลังจากเริ่มทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เชื้อจะเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่หลังชั่วโมงที่ 42 โดยค่ามวลชีวภาพจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและเริ่มคงที่ โดยชั่วโมงที่ 72 เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนและมีมวลชีวภาพสูงสุด 26.0 และ 6.67 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.57 ซึ่งปริมาณไลซีนและมวลชีวภาพของเชื้อจะสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนนั่นคือ ปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่ลดลงเหลือ 15.57 และ 7.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (จากเริ่มต้น 78 และ 15.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) จากการเจริญของเชื้อจะเห็นว่าน้ำหนักเซลล์จะสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลและปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่ลดลงในช่วงแรกจะถูกใช้ไปเพื่อการเจริญเนื่องจากเชื้อมีความต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโตสูงจะใช้คาร์บอนและไนโตรเจนเพื่อการเจริญและการเพิ่มปริมาณของเซลล์ทำให้ในช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อสามารถผลิตไลซีนได้ในปริมาณน้อย และเมื่อความต้องการของสารอาหารลดต่ำลงคาร์บอนและไนโตรเจนจึงถูกนำไปใช้เพื่อการผลิตไลซีน (Coello *et al.* 2000) เมื่อนำตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ปริมาณไลซี พบว่าปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเชื้อซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของน้ำตาลและไนโตรเจนที่ลดลง เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าจลนพลศาสตร์ ได้แก่อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) อัตราการผลิตไลซีน (Qp) ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) และผลผลิตไลซีนจากการใช้น้ำตาล ($Y_{p/s}$) พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.058 ต่อชั่วโมง 0.360 กรัมไลซีนต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.097 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล 0.459 กรัมไลซีนต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.3 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลและส่งผลต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258



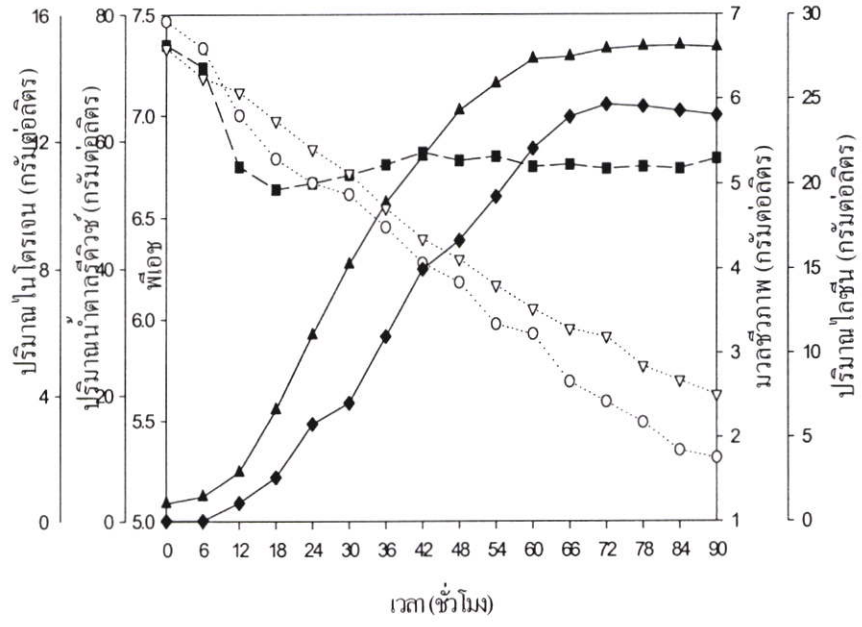
ภาพที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่าง มวลชีวภาพ (▲) ปริมาณไลซีน (♦) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (○) ปริมาณไนโตรเจน (▽) และ พีเอช (■) ที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารไลซีนสังเคราะห์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 ชั่วโมง

จากการเลี้ยงเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารไลซีนสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการวัดการเจริญของเชื้อโดยทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 90 ชั่วโมง นำมาทำการวิเคราะห์ ค่าพีเอช มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้ ปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือ ในช่วงแรกของการหมักหลังชั่วโมงที่ 6 พีเอชของอาหารมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว (พีเอช 6.64) หลังจากชั่วโมงที่ 18 ค่าพีเอชจะค่อยๆเพิ่มขึ้น (6.67) เมื่อนำตัวอย่างน้ำหมักมาทำการวิเคราะห์ พบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 24.65 กรัมต่อลิตร มีค่ามวลชีวภาพ 6.59 กรัมต่อลิตร การผลิตไลซีนและมวลชีวภาพของเชื้อจะสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนคือปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่ลดลงเหลือ 18.97 กรัมต่อลิตร และ 5.86 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (จากเริ่มต้น 78.95 และ 14.93 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าเชื้อจะใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส และแหล่งไนโตรเจนจากยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อการเจริญโดยปริมาณน้ำตาลและปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงใช่วงแรกจะถูกใช้ไปเพื่อการเจริญ แสดงดังภาพที่ 4.3 ผลการทดลองสอดคล้องกับการผลิตไลซีนของ Kiss *et al.* (1991) ที่ศึกษาการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *C. glutamicum* 21253 ในกระบวนการหมักแบบกะโดยการเจริญของเชื้อสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลที่ลดลงโดยเชื้อจะเข้าสู่

ระยะเพิ่มจำนวนหลังชั่วโมงที่ 18 น้ำหนักเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องพร้อมกับปริมาณไลซีนที่เพิ่มขึ้นโดยสามารถผลิตไลซีนได้ 23 กรัมต่อลิตร

เมื่อศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญพบว่ามีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.047 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตไลซีนเท่ากับ 0.342 กรัมไลซีนต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.090 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.410 กรัมไลซีนต่อกรัมน้ำตาล แสดงดังตารางที่ 4.3 ค่าที่ได้สูงกว่าการทดลองของ Paegle and Ruklisha (2003) ที่ทำการผลิตไลซีนจากเชื้อ *C. glutamicum* RC 115 ในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคสผสม อะซิเตทพบว่าเชื้อสามารถผลิตไลซีนได้โดยมีค่าจลนพลศาสตร์คือ มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.034 ต่อชั่วโมง ผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาล 0.150 กรัมไลซีนต่อกรัมน้ำตาล

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลและส่งผลต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจะทำการศึกษาการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสและหาอัตราส่วนของกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475



ภาพที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่าง มวลชีวภาพ (▲) ปริมาณไลซีน (♦) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (○) ปริมาณไนโตรเจน (▽) และ พีเอช (■) ที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารไลซีนสังเคราะห์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.3 ค่าจลนพลศาสตร์และพารามิเตอร์การเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 เมื่อเลี้ยงในอาหารไลซีนสังเคราะห์

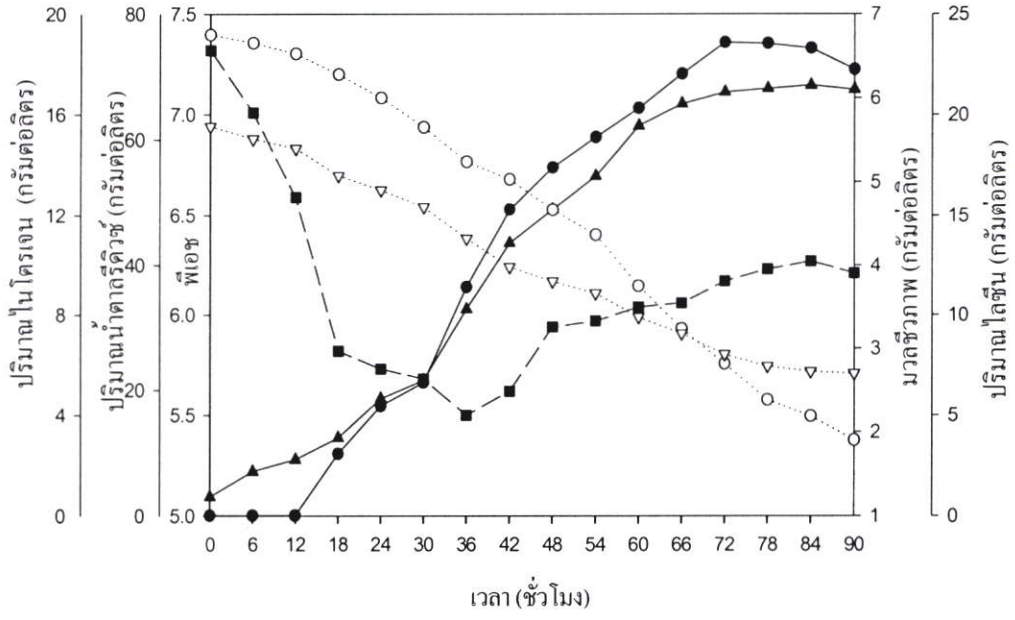
เชื้อ	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)	อัตราการผลิตไลซีน (Qp)	ผลผลิตมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล (Yx/s)	ผลผลิตไลซีนจากการใช้น้ำตาล (Yp/s)	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
A. citreus NRRL 1258	0.058	0.360	0.097	0.459	6.67	26.0	15.57	7.13	6.57
C. glutamicum ATCC 21475	0.047	0.342	0.090	0.410	6.59	24.65	18.97	5.86	6.74

4.4 การเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

ผลจากการเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมน้ำตาลจากกากน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส 80 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 90 ชั่วโมง พบว่าในช่วงแรกของการหมักชั่วโมงที่ (0-36) พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วมีค่าพีเอชต่ำสุดเท่ากับ 5.5 ในชั่วโมงที่ 36 ของการหมัก หลังจากชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเป็นต้นไป พบว่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (อยู่ในช่วง 5.62-6.27) จนกระทั่งช่วงท้ายของการเลี้ยง 90 ชั่วโมง พีเอชคงที่ประมาณ 6.21 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากช่วงแรกของการเจริญเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 อยู่ในระยะปรับตัว (lag phase) มีการปรับตัวเพื่อให้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากกากน้ำตาล ผลที่ได้สอดคล้องกับค่ามวลชีวภาพ ซึ่งในช่วงนี้ปริมาณมวลชีวภาพค่อย ๆ เพิ่มขึ้น (1.67 กรัมต่อลิตร) ที่เวลา 12 ชั่วโมง และหลังจากเวลา 12 ชั่วโมง เป็นต้นไป เชื้อจะเริ่มเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวน (log phase) ปริมาณมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นรวดเร็วและอย่างต่อเนื่องโดยมีค่าเท่ากับ 5.07 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 54 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 54 ของการเลี้ยงการเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ปริมาณมวลชีวภาพมีค่าสูงสุด 6.15 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 84 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4.4 ดังนั้นเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคส ส่วนการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส ที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 23.59 กรัมต่อลิตร มีค่ามวลชีวภาพ 6.07 กรัมต่อลิตร การเจริญของเชื้อสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่ลดลงอย่างต่อเนื่องโดยปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่ลดลงจะถูกใช้ไปเพื่อการเจริญ เนื่องจากเชื้อมีความต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโตสูงจะใช้คาร์บอนและไนโตรเจนเพื่อการเจริญและการเพิ่มปริมาณของเซลล์ทำให้ในช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อการผลิตไลซีนจะมีค่าน้อย และเมื่อความต้องการของสารอาหารลดต่ำลงคาร์บอนและไนโตรเจนจึงถูกนำไปใช้เพื่อการผลิตไลซีน สังเกตจากปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือมีค่าเท่ากับ 24.18 และ 6.42 กรัมต่อลิตร จากค่าเริ่มต้น (76.73 และ 15.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลในการเจริญและผลิตไลซีนได้ ซึ่งปริมาณไลซีนที่ผลิตได้สูงกว่าการทดลองของ Umerie *et al.* (2000) ที่ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆต่อการผลิตไลซีนจากเชื้อ *Bacillus laterosporus* ในกระบวนการหมักแบบกะควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที ที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโอ๊ด ลูกเดือย ข้าวฟ่าง มันฝรั่ง และ มันเทศ แทนน้ำตาลกลูโคส จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Bacillus laterosporus* สามารถผลิตไลซีนได้กับอาหารที่มี

การใช้แหล่งคาร์บอนทุกชนิดแต่สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 3 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้ลูกเดือยเป็นแหล่งคาร์บอน

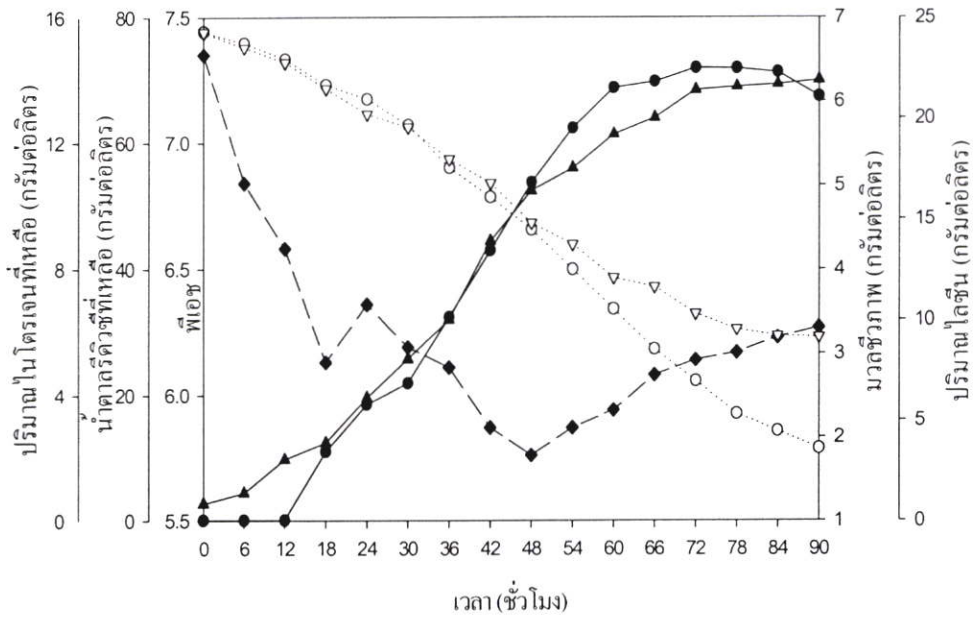
เมื่อศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.031 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตไลซีนเท่ากับ 0.327 กรัมไลซีนต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.092 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล และผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.448 กรัมไลซีนต่อกรัมน้ำตาล แสดงดังตารางที่ 4.4 จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถเจริญและผลิตไลซีนได้ในอาหารที่มีการใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลจากกากน้ำตาลต่อการผลิตไลซีนโดยใช้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ (▲) ปริมาณไลซีน (♦) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (○) ไนโตรเจนที่เหลือ (▽) และพีเอช (■) ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 ชั่วโมง

จากการเลี้ยงเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่มีการใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการวัดการเจริญของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 โดยทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 90 ชั่วโมง นำมาทำการวิเคราะห์ เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้ ปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือ แสดงดังภาพที่ 4.5 พบว่าในช่วงแรกของการหมักชั่วโมงที่ (0 - 48) พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.84 ที่เวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นพีเอชมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยมีค่าพีเอชต่ำสุดเท่ากับ 5.76 ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงเป็นต้นไป พบว่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (อยู่ในช่วง 5.87 - 6.27) จนกระทั่งช่วงท้ายของการเลี้ยงชั่วโมงที่ 90 พีเอชคงที่ประมาณ 6.27 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากช่วงแรกของการเจริญเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 อยู่ในระยะปรับตัว เพื่อให้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากกากน้ำตาล ผลที่ได้สอดคล้องกับค่ามวลชีวภาพ ซึ่งในช่วงแรกปริมาณมวลชีวภาพค่อย ๆ เพิ่มขึ้นชั่วโมงที่ 6 มีค่าประมาณ 1.33 กรัมต่อลิตร เชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวนปริมาณมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยมีค่าเท่ากับ 4.93 ที่เวลา 48 ชั่วโมง และหลังจากชั่วโมงที่ 48 การเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ปริมาณมวลชีวภาพมีค่าสูงสุด 6.25 กรัมต่อลิตร ดังนั้นเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 สามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 22.49 กรัมต่อลิตร มีค่ามวลชีวภาพ 6.13 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง การเจริญของเชื้อสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลและปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงอย่างต่อเนื่องสังเกตจากปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือมีค่าเท่ากับ 22.25 และ 6.59 กรัมต่อลิตร จากค่าเริ่มต้น (77.78 และ 15.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนส่งผลต่อการเจริญและผลิตไลซีนเช่นเดียวกับการทดลองของ Georgi *et al.*(2005) ที่เปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน และ กลูตามิก ของเชื้อ *C. glutamicum* ในอาหารที่ใช้น้ำตาลชนิดต่างๆคือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาล ฟรุคโตส และน้ำตาลซูโครส พบว่าอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร เชื้อจะสามารถใช้น้ำตาลในการเจริญและผลิตไลซีนได้ดีกว่าอาหารที่ใช้น้ำตาล ฟรุคโตส น้ำตาลกลูโคสผสมฟรุคโตส และน้ำตาลซูโครส

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าจลนพลศาสตร์ของการเจริญ พบว่ามีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.034 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตไลซีนเท่ากับ 0.312 กรัมไลซีนต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.089 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.404 กรัมไลซีนต่อกรัมน้ำตาล แสดงดังตารางที่ 4.4 จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 สามารถเจริญและผลิตไลซีนได้ในอาหารที่มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นการทดลองขั้นต่อไปจะทำการหาอัตราส่วนของน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตไลซีนของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475



ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ (▲) ปริมาณไลซีน (♦) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (○) ปริมาณไนโตรเจน (▽) พีเอช (■) เชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.4 ค่าจลนพลศาสตร์และพารามิเตอร์การเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A.citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อ	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)	อัตราการผลิตไลซีน (Qp)	ผลผลิตมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล (Yx/s)	ผลผลิตไลซีนจากการใช้น้ำตาล (Yp/s)	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
A. citreus NRRL 1258	0.031	0.327	0.092	0.448	6.07	23.59	24.18	6.42	6.17
C. glutamicum ATCC 21475	0.034	0.312	0.089	0.404	6.13	22.49	22.25	6.59	6.14

4.5 ผลของระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อการเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A.citreus* NRRL 1258 และ *C.glutamicum* ATCC 21475

เมื่อนำเชื้อ *A.citreus* NRRL 1258 ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรดัดแปลงที่มีการใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 40 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคส ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที ทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาทำการวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาล ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช แสดงดังตารางที่ 4.5

พบว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ *A.citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 25.14 กรัมต่อลิตร ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารชุดควบคุม (26.09 กรัมต่อลิตร) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาล 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (24.48 22.84 10.17 และ 8.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมจะส่งผลต่อการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ซึ่งปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ใกล้เคียงกับการผลิตไลซีนของ Coello *et al.* (2002) ที่ผลิตไลซีนจากเชื้อ *C. glutamicum* ในอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 140 150 และ 160 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาล 140 กรัมต่อลิตร สามารถให้ผลผลิตไลซีนสูงสุด 27.06 กรัมต่อลิตร ส่วนค่ามวลชีวภาพในอาหารชุดควบคุมมีค่าสูงสุดเท่ากับ 6.65 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาล 40 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (6.53 6.28 6.10 4.40 และ 2.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลจากกากน้ำตาลส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ โดยปริมาณน้ำตาลที่เหลือที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับอาหารชุดควบคุม (19.25 และ 19.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาล 40 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (18.04 21.34 33.66 และ 43.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แสดงว่าปริมาณน้ำตาลที่มากเกินความต้องการจะส่งผลต่อการเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สังเกตได้จากน้ำหนักเซลล์และปริมาณ ไลซีนที่เชื้อผลิตได้ ส่วนปริมาณไนโตรเจนที่เหลือที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร (7.71 กรัมต่อลิตร) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารชุดควบคุม (7.55 กรัมต่อลิตร) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาล 40 60 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (7.07 7.16 8.82 และ 9.37 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ โดยน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือจะแปรผกผันตามปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้ และพีเอชในอาหารมีค่าสูงสุดเมื่อใช้น้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร (6.57) ซึ่งแตกต่างกับพีเอชในอาหารชุดควบคุมและในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาล

60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (มีค่า 6.53 6.48 6.22 5.32 และ 5.25 ตามลำดับ) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงขึ้นจะส่งผลให้อาหารมีความเป็นกรดมากขึ้นซึ่งตามปกติแล้วการผลิตไลซีนจะเจริญได้ดีที่พีเอช 6.8 - 7.5 แสดงดังตารางที่ 4.5

จากผลการทดลองการใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันทั้ง 5 ความเข้มข้นส่งผลต่อ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือ และ พีเอชโดยเชื้อ *A.citreus* NRRL 1258 สามารถเจริญและผลิตไลซีนได้สูงสุด 25.14 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลจากกากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการทดลองของ Shah *et al.* (2002) ที่ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลระดับต่างๆ คือ ร้อยละ 6 7 8 9 10 11 และ 12 ตามลำดับ ในอาหารที่ใช้ผลิตไลซีน พบว่า เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 จะสามารถผลิตไลซีนได้ 21 กรัมต่อลิตร แสดงว่าความเข้มข้นของน้ำตาลส่งผลต่อการเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ และเมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาหาพารามิเตอร์การผลิตไลซีนพบว่าให้ค่าผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาลและผลผลิตไลซีนจากการใช้น้ำตาลสูงสุด 0.243 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล และ 1.144 กรัมไลซีนต่อกรัมน้ำตาล เมื่อใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.6 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลจากกากน้ำตาลที่ปริมาตร 40 กรัมต่อลิตร เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลต่อ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช โดยเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
ควบคุม	6.65^{a}	26.09^{a}	19.08^{d}	7.55^{c}	6.53^{b}
40	6.53^{b}	25.14^{a}	18.04^{e}	7.07^{d}	6.57^{a}
60	6.28^{c}	24.48^{ab}	19.25^{d}	7.16^{d}	6.48^{c}
80	6.10^{d}	22.84^{b}	21.34^{c}	7.71^{c}	6.22^{d}
100	4.40^{e}	10.17^{c}	33.66^{b}	8.82^{b}	5.32^{e}
120	2.79^{f}	8.04^{d}	43.46^{a}	9.37^{a}	5.25^{f}

หมายเหตุ

ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4.6 ค่าพารามิเตอร์การผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	Yx/s (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล)	Yp/s (กรัมไลซีนต่อกรัมน้ำตาล)
ควบคุม	0.090	0.428
40	0.243	1.144
60	0.125	0.600
80	0.084	0.390
100	0.048	0.153
120	0.020	0.105

เมื่อนำเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรดัดแปลงที่มีการใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 40 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที ทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาทำการวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาล ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช แสดงดังตารางที่ 4.7

เชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ที่เวลา 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 24.95 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารชุดควบคุม (24.93 กรัมต่อลิตร) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารที่ใช้น้ำตาลที่ระดับความเข้มข้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (23.53 22.30 8.32 6.46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) การเจริญของเชื้อมีค่ามวลชีวภาพ 6.47 และ 6.27 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารชุดควบคุม 6.53 กรัมต่อลิตร แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารที่ใช้น้ำตาลที่ระดับความเข้มข้น 80 100 120 กรัมต่อลิตร (6.20 4.60 และ 3.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำตาลที่เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารที่เหมาะสมจะส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ และการผลิตไลซีนเช่นเดียวกับการทดลองของ Bianchi *et al.* (2001) ที่ผลิตไลซีนจากเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21543 โดยเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากกลูโคสผสมโพแทสเซียมกลูคอเนตสามารถผลิตไลซีนได้ดีที่สุด 25 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณน้ำตาลที่เหลือที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารชุดควบคุม (19.44 และ 19.02 กรัมต่อลิตร) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารที่ใช้น้ำตาลที่ระดับความเข้มข้น 40 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (18.17

20.52 33.04 และ 44.44 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาล 40 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (6.82 7.52 7.93 8.68 และ 8.87 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารชุดควบคุม (7.06 กรัมต่อลิตร) และ พีเอชในอาหารที่ใช้น้ำตาลที่ระดับความเข้มข้น 40 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (มีค่า 6.62 6.46 6.15 5.23 และ 5.06) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับอาหารชุดควบคุม (6.76) ความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงขึ้นจะส่งผลให้อาหารมีความเป็นกรดมากขึ้นซึ่งตามปกติแล้วการผลิตไลซีนจะเจริญได้ดีที่พีเอช 6.8 - 7.5

จากผลการทดลองการใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 สามารถเจริญและผลิตไลซีนได้สูงสุด 24.95 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร โดยให้ปริมาณไลซีนและมวลชีวภาพมากกว่าในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาหาพารามิเตอร์การผลิตไลซีนพบว่าให้ค่าผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาลและผลผลิตไลซีนจากการใช้น้ำตาลสูงสุด 0.241 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล และ 1.142 กรัมไลซีนต่อกรัมน้ำตาล เมื่อใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.8 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลจากกากน้ำตาลที่ปริมาตร 40 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับการทดลองของ Paegle and Ruklisha (2003) ศึกษาการผลิตไลซีนโดยใช้น้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตไลซีนในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนที่เติมในอาหาร พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารจะให้อัตราการเจริญจำเพาะ 0.11 ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการใช้กลูโคสผสมกับอซิเตท Takiguchi *et al.* (1998) ทำการผลิตไลซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรสามารถผลิตไลซีนได้สูงกว่า 30 กรัมต่อลิตร และเมื่อเติม ลิวซีน ฟีนิวลาลานีน ไทโลซิน อย่างละ 400 มิลลิกรัมในอาหารจะสามารถผลิตไลซีนได้สูงกว่า 40 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.7 ผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลต่อ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช โดยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
ควบคุม	6.53^{a}	24.93^{a}	19.02^{d}	7.06^{e}	6.76^{a}
40	6.47^{ab}	24.95^{a}	18.17^{e}	6.82^{f}	6.62^{b}
60	6.27^{ab}	23.53^{b}	19.44^{d}	7.52^{d}	6.46^{c}
80	6.20^{b}	22.30^{c}	20.52^{c}	7.93^{c}	6.15^{d}
100	4.60^{c}	8.32^{d}	33.04^{b}	8.68^{b}	5.23^{e}
120	3.80^{d}	6.46^{e}	44.44^{a}	8.87^{a}	5.06^{f}

หมายเหตุ

ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4.8 ค่าพารามิเตอร์การผลิตไลซีนของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

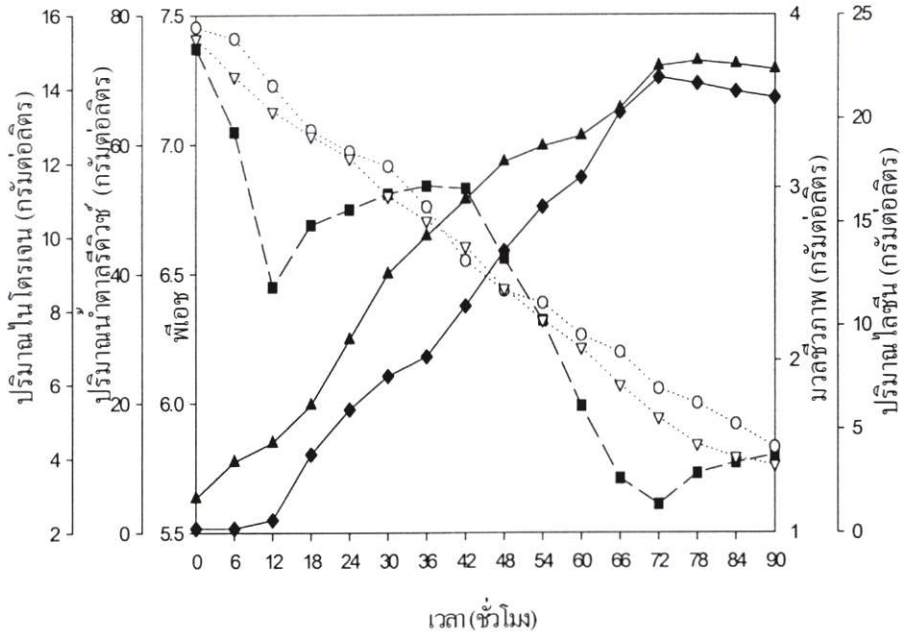
ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	Yx/s (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล)	Yp/s (กรัมไลซีนต่อกรัมน้ำตาล)
ควบคุม	0.087	0.408
40	0.241	1.142
60	0.125	0.580
80	0.084	0.375
100	0.050	0.124
120	0.034	0.085

4.6 การเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจน

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่มีการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนยีสต์สกัด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการวัดการเจริญโดยทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 90 ชั่วโมงนำมาทำการวิเคราะห์ เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของ พีเอช มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และไนโตรเจนที่เหลือ และนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าจลนพลศาสตร์การเจริญ พบว่าในช่วงแรกของการหมัก (0-12 ชั่วโมง) พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.05 ที่เวลา 6 ชั่วโมง และลดลงต่อเนื่อง โดยมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.45 ที่เวลา 12 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเป็นต้นไป พบว่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและลดลง (อยู่ในช่วง5.61-6.84) จนกระทั่งช่วงท้ายของการเลี้ยงชั่วโมงที่ 90 พีเอชคงที่ประมาณ 5.80 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากช่วงแรกของการเจริญเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 อยู่ในระยะปรับตัว มีการปรับตัวเพื่อให้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ผลที่ได้สอดคล้องกับค่ามวลชีวภาพ ซึ่งในช่วงนี้ปริมาณมวลชีวภาพค่อยๆ เพิ่มขึ้น และที่เวลา 18 ชั่วโมง เป็นต้นไปเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวนปริมาณมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยหลังจากชั่วโมงที่ 42 ของการเลี้ยงการเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ ปริมาณมวลชีวภาพมีค่าสูงสุด 3.73 กรัมต่อลิตร เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าโดยสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 21.97 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง มีค่ามวลชีวภาพเท่ากับ 3.70 กรัมต่อลิตรการเจริญของเชื้อสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่ลดลงอย่างต่อเนื่องสังเกตจากปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือมีค่าเท่ากับ 22.23 และ 5.11 กรัมต่อลิตร จากค่าเริ่มต้น (78.10 และ 15.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แสดงดังภาพที่ 4.6 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้แตกต่างกับการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไลซีนของ Umire *et al.* (2000) ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจาก กากถั่วเหลือง กากเมล็ดฝ้าย กากถั่วลิสง ร้อยละ 1.0 เปรียบเทียบกันระหว่างกากถั่วที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกกับกากถั่วที่ยังไม่ทำการสกัดน้ำมันออก พบว่าเมื่อใช้กากถั่วเหลืองที่ทำการสกัดนำมันออกไปก่อน (defatted) เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ผลผลิต 5.67 กรัมต่อลิตร ซึ่งดีกว่าการใช้กากถั่วที่ไม่ผ่านการสกัดน้ำมัน (non-defatted) ที่ให้ผลผลิต 4.78 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 4.0 พบว่าแหล่งไนโตรเจนจากธรรมชาติจะให้ผลผลิตไลซีนที่มากกว่า

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาจลนพลศาสตร์ของการเจริญพบว่ามีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.024 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตไลซีน 0.302 กรัมไลซีนต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้ไนโตรเจนเท่ากับ 0.244 กรัมเซลล์ต่อกรัมไนโตรเจน ผลผลิตของไลซีนจากการใช้ไนโตรเจนเท่ากับ 2.122 กรัมไลซีนต่อกรัมไนโตรเจน แสดงดังตารางที่ 4.9

จากการทดลองพบว่าเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถเจริญและผลิตไลซีนได้ในอาหารที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัดดังนั้นการทดลองขั้นต่อไปจะทำการหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

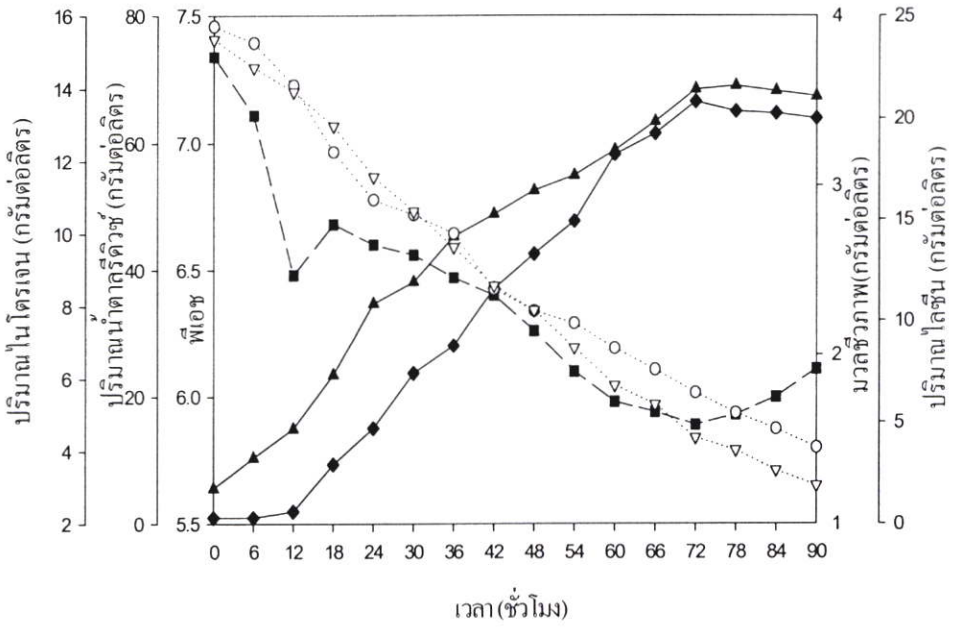


ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ (▲) ปริมาณไลซีน (♦) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (○) ปริมาณไนโตรเจน (▽) และ พีเอช (■) ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนยีสต์สกัดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 ชั่วโมง

จากการเลี้ยงเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่มีการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนยีสต์สกัด (ภาคผนวก ก.5) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการวัดการเจริญโดยทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 90 ชั่วโมง นำมาทำการวิเคราะห์ เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของพีเอช มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน น้ำตาลรีดิวซ์และไนโตรเจนที่เหลือ และนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าจลนพลศาสตร์การเจริญ พบว่า ในช่วงแรกของการหมัก (0 - 12 ชั่วโมง) พีเอชลดลง อย่างรวดเร็วมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.11 ที่เวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยมีค่าพีเอชต่ำสุดเท่ากับ 6.48 ที่เวลา 12 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเป็นต้นไป พบว่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและลดลง (อยู่ในช่วง 5.89 - 6.68) จนกระทั่งช่วงท้ายของการเลี้ยงชั่วโมงที่ 90

พีเอชคงที่ประมาณ 6.11 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากช่วงแรกของการเจริญเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 อยู่ในระยะปรับตัว มีการปรับตัวเพื่อให้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ผลที่ได้สอดคล้องกับค่ามวลชีวภาพ ซึ่งในช่วงนี้ปริมาณมวลชีวภาพค่อย ๆ เพิ่มขึ้นและที่เวลา 18 ชั่วโมงเป็นต้นไปเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวนปริมาณมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นรวดเร็ว หลังจากชั่วโมงที่ 36 การเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ ปริมาณมวลชีวภาพมีค่าสูงสุด 3.59 กรัมต่อลิตร แสดงดังภาพที่ 4.7 เชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 สามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมน้ำนึ่งปลาทูน่า โดยสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 20.82 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงมีค่ามวลชีวภาพเท่ากับ 3.57 กรัมต่อลิตร การเจริญของเชื้อสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่ลดลงอย่างต่อเนื่องสังเกตจากปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือมีค่าเท่ากับ 20.66 และ 4.37 กรัมต่อลิตร จากค่าเริ่มต้น (78.32 และ 15.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ)

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาจลนพลศาสตร์ของการเจริญพบว่ามี อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.023 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตไลซีนเท่ากับ 0.285 กรัมไลซีนต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้ไนโตรเจนเท่ากับ 0.215 กรัมเซลล์ต่อกรัมไนโตรเจน ผลผลิตของไลซีนจากการใช้ไนโตรเจนเท่ากับ 1.869 กรัมไลซีนต่อกรัมไนโตรเจน แสดงดังตารางที่ 4.9 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 สามารถเจริญและผลิตไลซีนได้ดีในอาหารที่มีการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนยีสต์สกัด เช่นเดียวกับการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไลซีนของ Coello *et al.* (2000) ที่ผลิตไลซีนจากเชื้อ *C. glutamicum* โดยใช้น้ำหมักปลาที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร แทนยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถเจริญและผลิตไลซีนได้ 30 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะทำการหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตไลซีนของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475



ภาพที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ (▲) ปริมาณไลซีน (♦) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (○) ปริมาณไนโตรเจน (▽) และพีเอช (■) ของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนยีสต์สกัดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.9 ค่าจลนพลศาสตร์และพารามิเตอร์การเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจน

เชื้อ	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)	อัตราการผลิตไลซีน (Qp)	ผลผลิตมวลเซลล์จากการใช้ไนโตรเจน (Yx/s)	ผลผลิตไลซีนจากการใช้ไนโตรเจน (Yp/s)	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
A. citreus NRRL 1258	0.024	0.302	0.244	2.122	3.70	21.97	22.23	5.11	5.61
C. glutamicum ATCC 21475	0.023	0.285	0.215	1.869	3.57	20.82	20.66	4.37	5.89

4.7 ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อการเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรดัดแปลงที่มีการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนยีสต์สกัด ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจน 1 2 3 และ 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหารที่ใช้ยีสต์สกัด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาทำการวิเคราะห์ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาล และไนโตรเจนที่เหลือ และ พีเอช

พบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด (23.39 และ 24.65 กรัมต่อลิตร) เมื่อใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่า 3 และ 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่า 1 และ 2 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร (17.58 และ 20.00 ตามลำดับ) และอาหารชุดควบคุม (26.37 กรัมต่อลิตร) ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ใกล้เคียงกับรายงาน Coello *et al.* (2000) ที่ผลิตไลซีนโดยใช้น้ำหมักปลาที่ความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร แทนการใช้ยีสต์สกัด จากการทดลองสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 20 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำหมักปลาที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ส่วนการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 เมื่อดูจากมวลชีวภาพพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างอาหารที่ใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่า 1 2 3 และ 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร (3.08 3.75 5.71 และ 6.31 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) กับอาหารชุดควบคุม (6.43 กรัมต่อลิตร) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลที่เหลือมีค่าสูงสุด 25.99 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่า 1 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารชุดควบคุมและอาหารที่ใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าความเข้มข้น 2 3 และ 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร (20.80 22.96 19.19 และ 16.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือมีค่าสูงสุด 7.44 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่า 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับอาหารชุดควบคุม (6.38 กรัมต่อลิตร) และอาหารที่ใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าความเข้มข้น 1 2 และ 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร (3.38 5.87 และ 6.82 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) จะสังเกตเห็นว่าที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ต่ำเชื้อจะสามารถใช้ไนโตรเจนในการเจริญได้มากกว่าน้ำตาล ส่วนพีเอชของอาหารมีค่าสูงสุด 6.99 เมื่อใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่า 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารชุดควบคุม (6.51) และอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่า 1 2 และ 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร (5.41 5.73 และ 6.46 ตามลำดับ) เนื่องจากในอาหารที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าความเข้มข้นสูงจะมีองค์ประกอบพวกอินทรีย์ไนโตรเจนในปริมาณมากจึงทำให้มีค่าพีเอชที่สูงแสดงดังตารางที่ 4.10

จากผลการทดลองการใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถเจริญและผลิตไลซีนได้สูงสุดเมื่อใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ความเข้มข้น 3 และ 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้ทางสถิติ พบว่าปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้ 23.39 และ 24.65 กรัมต่อลิตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ปริมาณไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้น 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาหาพารามิเตอร์การผลิตไลซีนพบว่าให้ค่าผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้ไนโตรเจนและผลผลิตไลซีนจากการใช้ไนโตรเจน 0.464 กรัมเซลล์ต่อกรัมไนโตรเจน และ 2.406 กรัมไลซีนต่อกรัมไนโตรเจน

ตารางที่ 4.10 ผลของความเข้มข้นไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ไนโตรเจนที่เหลือ และพีเอช โดยเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจนที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
ควบคุม	6.43[a]	26.37[a]	20.80[c]	6.38[c]	6.51[b]
1.0	3.08[e]	17.58[d]	25.99[a]	3.38[e]	5.41[c]
2.0	3.75[d]	20.00[c]	22.96[b]	5.87[d]	5.73[d]
3.0	5.71[c]	23.39[b]	19.19[d]	6.82[b]	6.46[c]
4.0	6.31[b]	24.65[b]	16.11[e]	7.44[a]	6.99[a]

หมายเหตุ

ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมี นัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4.11 ค่าพารามิเตอร์การผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	Yx/s (กรัมเซลล์ต่อกรัมไนโตรเจน)	Yp/s (กรัมไลซีนต่อกรัมไนโตรเจน)
ควบคุม	0.580	2.924
1.0	0.175	1.640
2.0	0.268	2.105
3.0	0.464	2.406
4.0	0.530	2.560

เชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ที่เวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 22.95 และ 23.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่า 3 และ 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ส่วนการเจริญของเชื้อเมื่อดูจากมวลชีวภาพจะเห็นว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างอาหารชุดควบคุม (6.40 กรัมต่อลิตร) และอาหารที่ใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร (3.13 3.59 4.36 และ 5.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมส่งผลต่ออัตราการเจริญและความสามารถในการผลิตไลซีนของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 2147 ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลที่เหลือมีค่าสูงสุด 24.26 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ความเข้มข้น 1 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณน้ำตาลที่เหลือของอาหารชุดควบคุม (19.50 กรัมต่อลิตร) และอาหารที่ใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้น 2 3 และ 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร (20.81 19.08 และ 17.88 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ส่วนไนโตรเจนที่เหลือมีค่าสูงสุด 6.76 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่ใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่า ที่ความเข้มข้น 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารชุดควบคุม (6.31 กรัมต่อลิตร) และอาหารที่ใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้น 1 2 และ 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร (2.33 5.08 และ 6.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) โดยในอาหารที่มีการใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่สูงเชื้อจะใช้น้ำตาลในการเจริญและผลิตไลซีนได้ดีกว่าไนโตรเจน และพีเอชในอาหารที่ใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าทุกระดับความเข้มข้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (5.35 5.63 6.39 และ 6.76) กับอาหารชุดควบคุม (6.72) แสดงว่าปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ความเข้มข้นแตกต่างกันจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเมื่อทำการหมัก แสดงดังตารางที่ 4.12

จากผลการทดลองการใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 สามารถเจริญและผลิตไลซีนได้สูงสุดเมื่อใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ความเข้มข้น 3 และ 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้ทางสถิติพบว่าปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้ 22.95 และ 23.27 กรัมต่อลิตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ปริมาณไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้น 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำผลการทดลองที่ได้มาหาพารามิเตอร์การผลิตไลซีนพบว่าให้ค่าผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้ไนโตรเจนและผลผลิตไลซีนจากการใช้ไนโตรเจน 0.313 กรัมเซลล์ต่อกรัมไนโตรเจน และ 2.275 กรัมไลซีนต่อกรัมไนโตรเจน ซึ่งปริมาณไลซีนที่เชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ผลิตได้ใกล้เคียงกับการทดลองของ Shan *et al.* (2002) ทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 1.5 2 2.5 3 3.5 และ 4 จากการทดลองสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 20 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 2.5

ตารางที่ 4.12 ผลของความเข้มข้นไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อ มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และ พีเอช โดยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจนที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
ควบคุม	6.40^{a}	25.00^{a}	19.50^{c}	6.31^{b}	6.72^{b}
1.0	3.13^{e}	16.86^{d}	24.26^{a}	2.33^{d}	5.35^{e}
2.0	3.59^{d}	20.36^{c}	20.81^{b}	5.08^{c}	5.63^{d}
3.0	4.36^{c}	22.95^{b}	19.08^{c}	6.37^{ab}	6.39^{c}
4.0	5.60^{b}	23.27^{b}	17.88^{d}	6.76^{a}	6.76^{a}

หมายเหตุ

ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

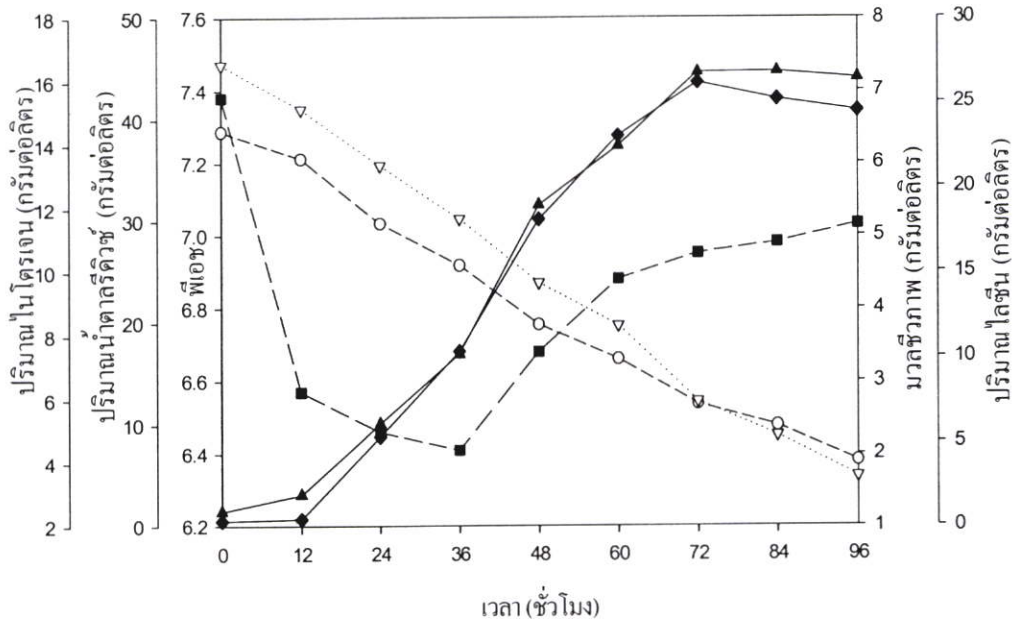
ตารางที่ 4.13 ค่าพารามิเตอร์การผลิตไลซีนของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	Yx/s (กรัมเซลล์ต่อกรัมไนโตรเจน)	Yp/s (กรัมไลซีนต่อกรัมไนโตรเจน)
ควบคุม	0.603	2.900
1.0	0.164	1.429
2.0	0.233	1.982
3.0	0.313	2.275
4.0	0.440	2.322

4.8 การเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ เชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าที่เหมาะสมเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

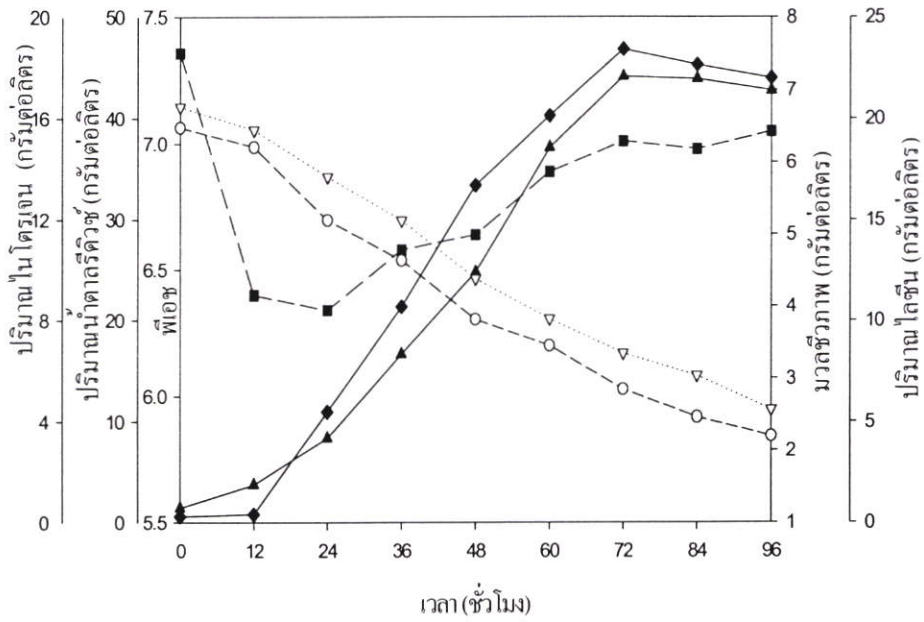
จากการทดลองนำอัตราส่วนที่เหมาะสมของความเข้มข้นน้ำตาลจากกากน้ำตาลและไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ใช้ในอาหารสำหรับผลิตไลซีน (ภาคผนวก ก.6) จากเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการวัดการเจริญของเชื้อโดยทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง นำมาทำการวิเคราะห์ เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของ พีเอช มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือ และนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าจลนพลศาสตร์การเจริญ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการผลิตไลซีน ผลผลิตมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ผลผลิตไลซีนจากการใช้น้ำตาล จากผลการทดลองพบว่า ในช่วงแรกของการหมัก (0 - 36 ชั่วโมง) พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วมีพีเอชเท่ากับ 6.57 ที่เวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยมีค่าพีเอชต่ำสุดเท่ากับ 6.41 ที่เวลา 36 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเป็นต้นไป พบว่า พีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (อยู่ในช่วง 6.68 - 7.03) จนกระทั่งช่วงท้ายของการเลี้ยงชั่วโมงที่ 90 พีเอชคงที่ประมาณ 7.03 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากช่วงแรกของการเจริญเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 อยู่ในระยะปรับตัว เพื่อให้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญได้ ผลที่ได้สอดคล้องกับค่ามวลชีวภาพ ซึ่งในช่วงนี้ปริมาณมวลชีวภาพค่อยๆ เพิ่มขึ้น และที่เวลา 18 ชั่วโมง เป็นต้นไปเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวนปริมาณมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นรวดเร็วและอย่างต่อเนื่อง หลังจากชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงการเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ปริมาณมวลชีวภาพมีค่าสูงสุด 7.26 กรัมต่อลิตร แสดงดังภาพที่ 4.8 โดยที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 มีค่ามวลชีวภาพ 7.25 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 26.18 กรัมต่อลิตร ที่พีเอช 6.95 มีปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือเท่ากับ

12.04 และ 5.94 กรัมต่อลิตร จากค่าเริ่มต้น (38.82 และ 16.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แสดงดังภาพที่ 4.13 จากผลการทดลองเมื่อนำมาคำนวณหาจลนพลศาสตร์ของการเจริญพบว่า มีอัตราการเจริญจำเพาะ 0.042 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตไลซีน 0.359 กรัมไลซีนต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล 0.233 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ผลผลิตไลซีนจากการใช้น้ำตาล 0.966 กรัมไลซีนต่อกรัมน้ำตาล แสดงดังตารางที่ 4.14



ภาพที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ (▲) ปริมาณไลซีน (♦) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (○) ปริมาณไนโตรเจน (▽) และ พีเอช (■) ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารที่มีอัตราส่วนที่เหมาะสมของความเข้มข้นน้ำตาลจากกากน้ำตาลและไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการวัดการเจริญของโดยทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง นำมาทำการวิเคราะห์ เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของพีเอช มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้ ปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือ แสดงดังภาพที่ 4.9 จากผลการทดลองพบว่าในช่วงแรกของการหมัก (0 - 24 ชั่วโมง) พีเอช ลดลงอย่างรวดเร็วมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.40 ที่เวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยมีค่าพีเอชต่ำสุดเท่ากับ 6.34 ที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเป็นต้นไป พบว่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (อยู่ในช่วง 6.58 - 7.05) จนกระทั่งช่วงท้ายของการเลี้ยงชั่วโมงที่ 90 พีเอชคงที่ประมาณ 7.05 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากช่วงแรกของการเจริญเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 อยู่ในระยะปรับตัว มีการปรับตัวเพื่อให้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนได้ ผลที่ได้สอดคล้องกับค่ามวลชีวภาพ ซึ่งในช่วงนี้ปริมาณมวลชีวภาพค่อย ๆ เพิ่มขึ้น และที่เวลา 12 ชั่วโมง เป็นต้นไปเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวนปริมาณมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นรวดเร็วและอย่างต่อเนื่อง หลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงการเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ ปริมาณมวลชีวภาพมีค่าสูงสุด 7.18 กรัมต่อลิตร โดยที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 23.44 กรัมต่อลิตร มีค่ามวลชีวภาพเท่ากับ 7.18 กรัมต่อลิตร ที่พีเอช 7.01 ปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือ 13.17 และ 6.69 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังภาพ 4.14 เมื่อนำผลการทดลองมาคำนวณหาจลนพลศาสตร์ของการเจริญ พบว่า อัตราการเจริญจำเพาะ 0.030 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตไลซีน 0.321 กรัมไลซีนต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล 0.231 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ผลผลิตของไลซีนจากการใช้น้ำตาล 0.893 กรัมไลซีนต่อกรัมน้ำตาล แสดงดังตารางที่ 4.14



ภาพที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ (▲) ปริมาณไลซีน (♦) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (○) ปริมาณไนโตรเจน (▽) และพีเอช (■) ของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.14 ค่าจลนพลศาสตร์และพารามิเตอร์การเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าที่เหมาะสมเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

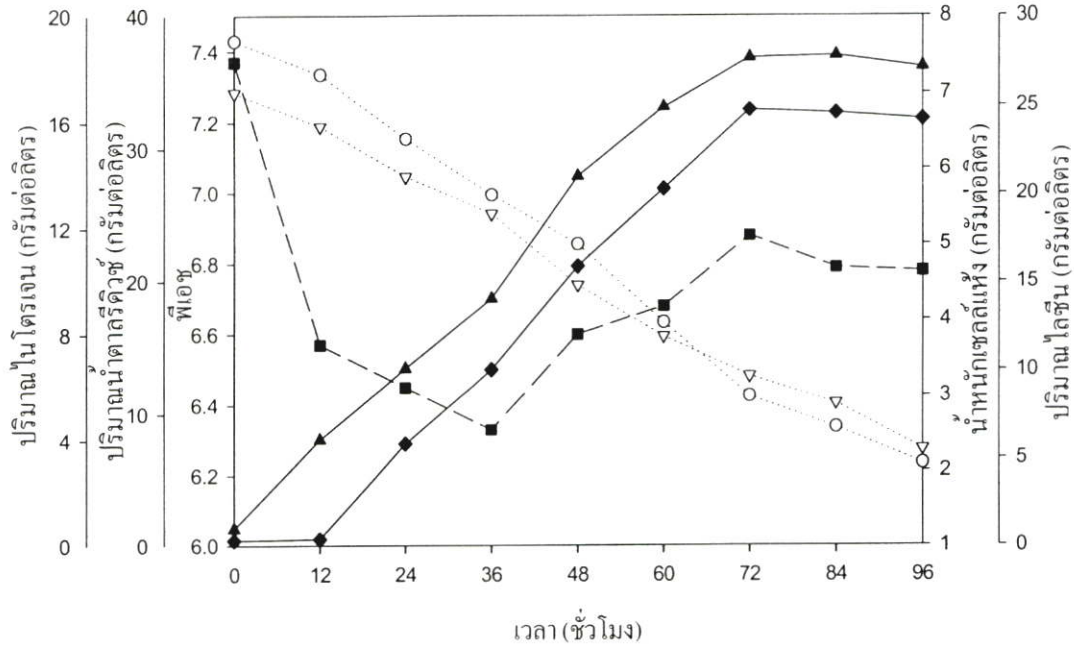
เชื้อ	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)	อัตราการผลิตไลซีน (Qp)	ผลผลิตมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล (Yx/s)	ผลผลิตไลซีนจากการใช้น้ำตาล (Yp/s)	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
A. citreus NRRL 1258	0.042	0.359	0.233	0.966	7.25	26.18	12.04	5.94	6.95
C. glutamicum ATCC 21475	0.030	0.321	0.231	0.893	7.18	23.44	13.17	6.69	7.01

จากการทดลองเมื่อทำการเปรียบเทียบการผลิตไลซีนระหว่างเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารที่มีการใช้กากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าทดแทนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนพบว่าเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถที่จะเจริญและผลิตไลซีนได้สูงกว่าการเจริญและผลิตไลซีนของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 เพื่อใช้ในการศึกษาการผลิตไลซีนในระดับถังหมักระดับห้องปฏิบัติการขนาด 2 ลิตร ต่อไป

4.9 การเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ขนาด 2 ลิตร

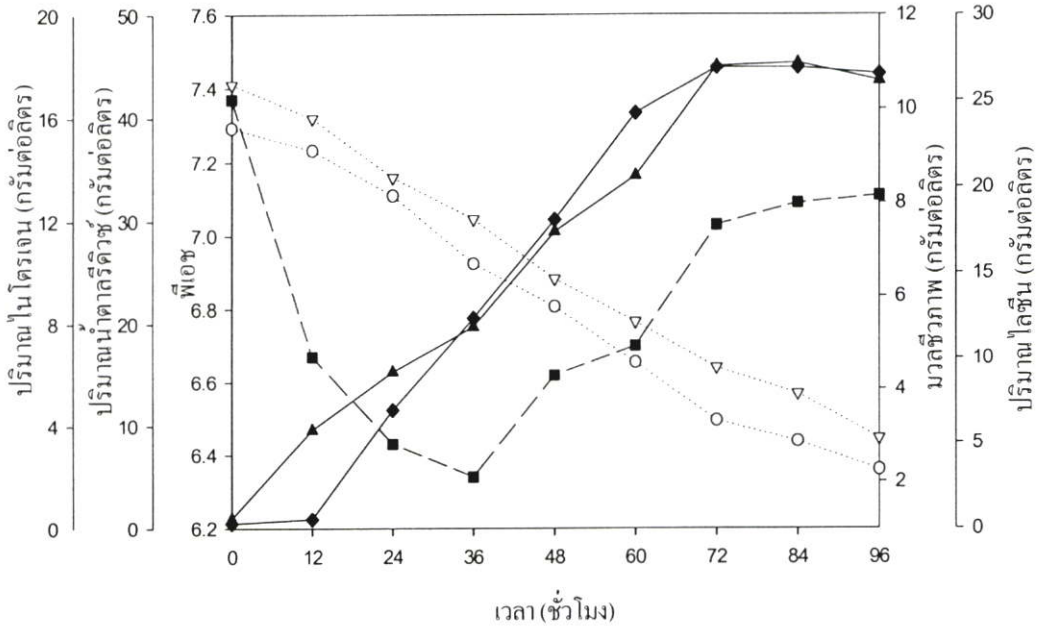
4.9.1 ผลของอัตราการกวน

ผลการผลิตไลซีนในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนระดับต่างๆกัน คือ 250 500 และ 700 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศเท่ากันที่ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ให้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.14 – 4.16 ตามลำดับ เมื่อใช้ความเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการเลี้ยง 96 ชั่วโมง พบว่าการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในช่วงแรกของการหมัก (0 - 36 ชั่วโมง) พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วมีค่าพีเอชต่ำสุดเท่ากับ 6.33 ที่เวลา 36 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเป็นต้นไป พบว่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (อยู่ในช่วง 6.60 – 6.88) จนกระทั่งช่วงท้ายของการเลี้ยงชั่วโมงที่ 96 พีเอชคงที่ประมาณ 6.78 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากช่วงแรกของการเจริญเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 อยู่ในระยะปรับตัว มีการปรับตัวเพื่อให้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากกากน้ำตาล ผลที่ได้สอดคล้องกับค่ามวลชีวภาพซึ่งในช่วงนี้ปริมาณมวลชีวภาพค่อยๆ เพิ่มขึ้นที่เวลา 12 ชั่วโมงเป็นต้นไปเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวนปริมาณมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นรวดเร็วและต่อเนื่อง หลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงการเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ ปริมาณมวลชีวภาพมีค่าสูงสุด 7.48 กรัมต่อลิตร และที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 24.75 กรัมต่อลิตร มีค่ามวลชีวภาพเท่ากับ 7.45 กรัมต่อลิตร ที่พีเอช 6.88 ปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือ 11.37 และ 6.44 กรัมต่อลิตร จากค่าเริ่มต้น (38.10 และ 17.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แสดงดังภาพ 4.10



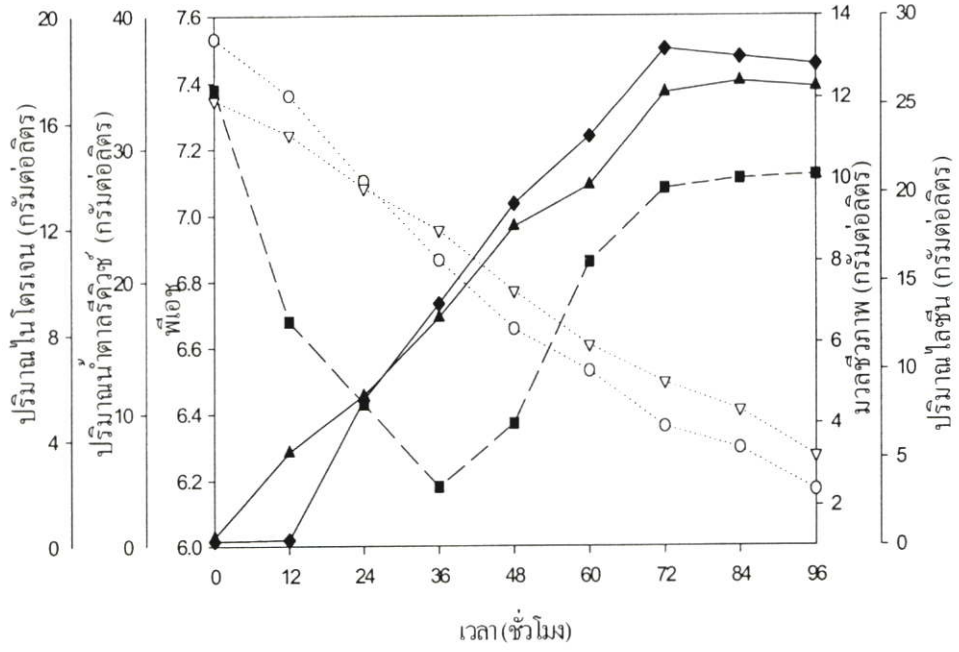
ภาพที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ (▲) ปริมาณไลซีน (♦) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (○) ปริมาณไนโตรเจน (▽) และ พีเอช (■) ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที และความเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

จากการใช้ความเร็วในการกวนที่ 500 รอบต่อนาที พบว่าการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในช่วงแรกของการหมัก (0 - 36 ชั่วโมง) พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วมีค่าพีเอชต่ำสุดเท่ากับ 6.34 ที่เวลา 36 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเป็นต้นไป พบว่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (อยู่ในช่วง 6.62 - 7.11) จนกระทั่งช่วงท้ายของการเลี้ยงชั่วโมงที่ 96 พีเอชคงที่ประมาณ 7.11 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากช่วงแรกของการเจริญเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 อยู่ในระยะปรับตัวเพื่อให้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากกากน้ำตาล ผลที่ได้สอดคล้องกับค่ามวลชีวภาพ ซึ่งในช่วงนี้ปริมาณมวลชีวภาพค่อย ๆ เพิ่มขึ้น และที่เวลา 12 ชั่วโมงเป็นต้นไปเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวน ปริมาณมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นรวดเร็วและต่อเนื่อง หลังจากชั่วโมงที่ 60 ของการเลี้ยงการเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ ปริมาณมวลชีวภาพมีค่าสูงสุด 10.97 กรัมต่อลิตร โดยที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 26.93 กรัมต่อลิตร มีค่ามวลชีวภาพเท่ากับ 10.91 กรัมต่อลิตร ที่พีเอช 7.03 ปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือ 10.51 และ 6.29 กรัมต่อลิตร จากค่าเริ่มต้น (39.02 และ 17.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แสดงดังภาพ 4.11



ภาพที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ (▲) ปริมาณไลซีน (♦) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (○) ปริมาณไนโตรเจน (▽) และพีเอช (■) ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที และความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

จากการใช้ความเร็วในการกวนที่ 700 รอบต่อนาที พบว่าการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในช่วงแรกของการหมัก (0 - 36 ชั่วโมง) พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วมีค่าพีเอชต่ำสุดเท่ากับ 5.89 ที่เวลา 36 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเป็นต้นไป พบว่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (อยู่ในช่วง 6.37 - 7.12) จนกระทั่งช่วงท้ายของการเลี้ยงชั่วโมงที่ 96 พีเอชคงที่ประมาณ 7.12 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากช่วงแรกของการเจริญเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 อยู่ในระยะปรับตัว มีการปรับตัวเพื่อให้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากกากน้ำตาล ผลที่ได้สอดคล้องกับค่ามวลชีวภาพซึ่งในช่วงนี้ปริมาณมวลชีวภาพค่อย ๆ เพิ่มขึ้นและที่เวลา 12 ชั่วโมง เป็นต้นไปเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวนปริมาณมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นรวดเร็ว หลังจากชั่วโมงที่ 60 ของการเจริญเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะเจริญคงที่ ปริมาณมวลชีวภาพมีค่าสูงสุด 12.39 กรัมต่อลิตร และที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 28.11 กรัมต่อลิตร มีค่ามวลชีวภาพเท่ากับ 12.13 กรัมต่อลิตร ที่พีเอช 7.08 ปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือ 9.01 และ 6.20 กรัมต่อลิตร จากค่าเริ่มต้น (38.24 และ 16.84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แสดงดังภาพ 4.12



ภาพที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ (▲) ปริมาณไลซีน (♦) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (○) ปริมาณไนโตรเจน (▽) และ พีเอช (■) ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที และความเร็วในการกวน 700 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาผลการทดลองจะเห็นว่าการใช้ความเร็วในการกวน 700 รอบต่อนาทีให้ผลการผลิตไลซีนสูงที่สุด 28.11 กรัมต่อลิตร รองลงมาได้แก่การใช้ความเร็ว 500 รอบต่อนาที และ 250 รอบต่อนาที ซึ่งให้การผลิตไลซีนเท่ากับ 26.93 กรัมต่อลิตร และ 24.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ Coello *et al.* (1992) ที่ผลิตไลซีนโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องโดยมีการใช้อัตราการกวนที่อัตราเร็ว 700 รอบต่อนาที และควบคุมพีเอชเท่ากับ 7.0 สามารถผลิตไลซีนได้ 16.90 กรัมต่อลิตร และจากการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 พบว่าเมื่อเพิ่มความเร็วในการกวนให้สูงขึ้นเชื้อก็จะสามารถผลิตไลซีนได้มากขึ้นอาจเนื่องมาจากการกวนด้วยความเร็วสูงจะช่วยให้อากาศมีการกระจายตัวได้ดีเนื่องจากในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลจะมีลักษณะข้นกว่าอาหารที่ใช้กลูโคสปกติและมีปริมาณฟองที่สูงดังนั้นการใช้การกวนที่สูงจะช่วยให้อากาศมีการกระจายตัวที่ดีช่วยให้เชื้อมีการเจริญได้ดีขึ้น

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาพารามิเตอร์ต่างๆ พบว่าการใช้ความเร็วในการกวนที่ระดับ 700 รอบต่อนาที ให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุด 0.095 และอัตราการผลิตไลซีน 0.390 กรัมไลซีนต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล 0.373 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ผลผลิตไลซีนจากการใช้น้ำตาล 0.952 กรัมไลซีนต่อกรัมน้ำตาล แสดงดังตารางที่ 4.15

จากผลการทดลองพบว่าการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุดเมื่อใช้อัตราการกวนที่ 700 รอบต่อนาที ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการทดลองของ Coello *et al.* (1992) ที่ศึกษาการผลิตไลซีนในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 และใช้อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที สามารถให้ผลผลิตของไลซีน 0.53 กรัมไลซีนต่อกรัมน้ำตาล

ตารางที่ 4.15 ค่าจลนพลศาสตร์และพารามิเตอร์การเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ที่อัตราการกวนระดับต่างๆ

อัตรา การกวน (รอบต่อนาที)	อัตราการ เจริญจำเพาะ (μ)	อัตราการ ผลิตไลซีน (Qp)	ผลผลิตมวลเซลล์ จากการใช้น้ำตาล (Yx/s)	ผลผลิตไลซีน จากการใช้น้ำตาล (Yp/s)	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจน ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
250	0.057	0.344	0.233	0.915	7.45^{c}	24.75^{c}	11.37^{a}	6.44^{a}	6.88^{c}
500	0.084	0.374	0.340	0.934	10.91^{b}	26.93^{b}	10.51^{b}	6.29^{b}	7.03^{b}
700	0.095	0.390	0.373	0.952	12.13^{a}	28.11^{a}	9.01^{c}	6.20^{c}	7.08^{a}

หมายเหตุ

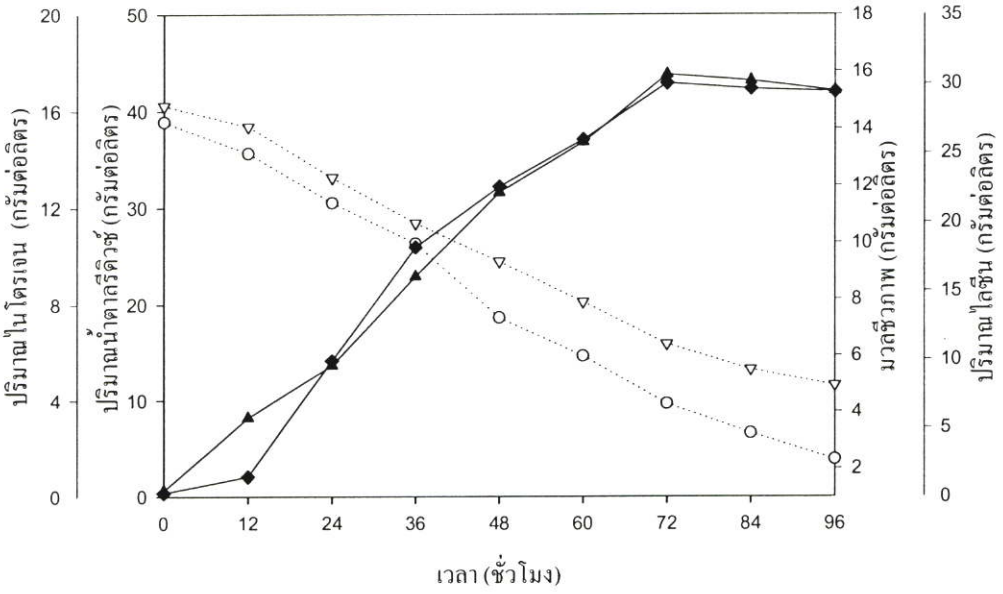
ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

4.9.2 ผลของการควบคุมพีเอช

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 เมื่อสังเกตผลของพีเอชในกระบวนการผลิตไลซีนจะพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่เริ่มต้นการหมักและพีเอชในอาหารจะมีการเปลี่ยนแปลงจนมีค่าอยู่ในช่วง 6.8 - 7.2 ทั้งนี้เนื่องมาจากองค์ประกอบของอาหารที่มีการเติมสารจำพวกเกลือแอมโมเนียมในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเมื่อแอมโมเนียมถูกใช้ไปจะเหลือสารพวกซัลเฟตซึ่งจะทำให้เกิดสภาวะเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะเติบโตเร่งจะทำการปล่อยไลซีนออกมาจึงทำให้พีเอชในอาหารมีค่าสูงขึ้นซึ่งตรงกับรายงานของ (สมใจ ศิริโภค. 2540 และ นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ.2544) กล่าวว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไลซีนอยู่ในช่วง 6.8 – 7.5 และสอดคล้องกับการทดลองการผลิตไลซีนของ (Coello *et al.* 1992; Hadj *et al.* 1996; Kiss and Stephanopoulos 1991; Vallino and Stephanopoulos. 1993) ที่ทำการคุมพีเอชในกระบวนการหมักให้มีค่าเท่ากับ 7.0 ดังนั้นในกระบวนการผลิตไลซีนจากเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร จึงทำการศึกษาผลของการคุมพีเอชในกระบวนการหมักโดยมีอัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวน 700 รอบต่อนาที ศึกษาการเจริญและอัตราการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง มาทำการวิเคราะห์มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และไนโตรเจนที่เหลือ พบว่าเมื่อเริ่มทำการหมักเชื้อจะทำการปรับตัว เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 จะเริ่มเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวนหลังจากเริ่มทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 30.02 กรัมต่อลิตร มีค่ามวลชีวภาพ 15.88 กรัมต่อลิตร ลักษณะการเจริญของเชื้อสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลและปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยปริมาณน้ำตาลและปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงในช่วงแรกจะถูกใช้ไปเพื่อการเจริญ เนื่องจากเชื้อมีความต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโตสูงจะใช้คาร์บอนและไนโตรเจนเพื่อการเจริญและการเพิ่มปริมาณของเซลล์ทำให้ในช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อสามารถผลิตไลซีนได้ในปริมาณน้อย และเมื่อความต้องการของสารอาหารลดต่ำลงคาร์บอนและไนโตรเจนจึงถูกนำไปใช้เพื่อการผลิตไลซีน แสดงดังภาพที่ 4.13

เมื่อนำตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ปริมาณไลซีนด้วยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) พบว่าปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเชื้อซึ่งจะสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่ลดลง โดยมีค่าเท่ากับ 9.64 และ 6.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาจลนพลศาสตร์ของการเจริญพบว่า มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.095 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตไลซีนเท่ากับ 0.417 กรัมไลซีนต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.501 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ผลผลิตไลซีนจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 1.018 กรัมไลซีนต่อกรัมน้ำตาล จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตไลซีนของเชื้อระหว่างสภาวะที่ควบคุมพีเอชและไม่มีการควบคุมพีเอชพบว่าเมื่อทำการควบคุมค่าพีเอชให้

เหมาะสมกับความต้องการของเชื้อจะทำให้เชื้อสามารถเจริญและปล่อยไลซีนออกมาได้ดีมากขึ้น แสดงดังตารางที่ 4.16



ภาพที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ (▲) ปริมาณไลซีน (♦) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (○) ปริมาณไนโตรเจน (▽) ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที และความเร็วในการกวน 700 รอบต่อนาที ที่ควบคุมพีเอช 7.0

ตารางที่ 4.16 ผลของการควบคุมพีเอช (พีเอช 7) ต่อมวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน จากการเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ความเร็วในการกวน 700 รอบต่อนาที

พารามิเตอร์	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจนที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
ควบคุมพีเอชเท่ากับ 7	15.88	30.02	9.64	6.36
*ชุดควบคุม (ไม่มีการควบคุมพีเอช)	7.25	26.18	12.04	5.94

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะของเชื้อ *A.citreus* NRRL 1258 และ เชื้อ *C.glutamicum* ATCC 21475 พบว่ามีลักษณะเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ มีทั้งที่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆและเกาะกันเป็นกลุ่ม

ผลการศึกษาการผลิตไลซีนในอาหารไลซีนสังเคราะห์พบว่าเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 26.0 กรัมต่อลิตร มวลชีวภาพ 6.67 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และไนโตรเจนที่เหลือ 21.46 และ 6.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.57 ที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการผลิตไลซีนของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ที่ผลิตไลซีนได้ 24.65 กรัมต่อลิตร มวลชีวภาพ 6.59 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และไนโตรเจนที่เหลือ 18.97 และ 5.86 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีค่าพีเอช 6.74 ที่เวลา 72 ชั่วโมง

การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่มีการแทนที่น้ำตาลกลูโคสด้วยน้ำตาลจากกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 23.59 กรัมต่อลิตร มีค่ามวลชีวภาพ 6.07 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลรีดิวซ์และไนโตรเจนที่เหลือเท่ากับ 24.18 และ 6.42 กรัมต่อลิตรตามลำดับ มีค่าพีเอช 6.17 ซึ่งสูงกว่าการเจริญของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ที่ผลิตไลซีนได้สูงสุด 22.49 กรัมต่อลิตร มีมวลชีวภาพ 6.13 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลรีดิวซ์และไนโตรเจนที่เหลือเท่ากับ 22.25 และ 6.59 กรัมต่อลิตรตามลำดับ มีค่าพีเอช 6.14

ผลของระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อการเจริญและผลิตไลซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 40 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุม พบว่า เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 25.14 กรัมต่อลิตร มีมวลชีวภาพ 6.53 ที่พีเอช 6.57 มีน้ำตาลรีดิวซ์และไนโตรเจนที่เหลือเท่ากับ 18.04 และ 7.07 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารชุดควบคุมที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ส่วนการเจริญของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 24.95 กรัมต่อลิตร มีค่ามวล ชีวภาพ 6.47 กรัมต่อลิตร ที่พีเอช 6.62 มีน้ำตาลรีดิวซ์และไนโตรเจนที่เหลือเท่ากับ 18.17 และ 6.82 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารชุดควบคุมที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงไลซีนสังเคราะห์ที่มีการแทนไนโตรเจนจากยีสต์สกัดด้วยน้ำนึ่งปลาทูน่า พบว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 21.97 กรัมต่อลิตร มีมวลชีวภาพ 3.70 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลรีดิวซ์และไนโตรเจนที่เหลือเท่ากับ 22.23 และ 5.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีค่าพีเอช 5.61 ซึ่งสูงกว่าการเจริญของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ที่ผลิตไลซีนได้สูงสุด 20.82 กรัมต่อลิตร มีมวลชีวภาพ 3.57 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลรีดิวซ์และไนโตรเจนที่เหลือเท่ากับ 20.66 และ 4.37 กรัมต่อลิตรตามลำดับ มีค่าพีเอช 5.89

ผลของระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อการเจริญและการผลิตไลซีนที่ระดับความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร พบว่าเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนได้ 23.39 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่า 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร มีมวลชีวภาพ 5.71 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลรีดิวซ์และไนโตรเจนที่เหลือเท่ากับ 19.19 และ 6.82 กรัมต่อลิตรตามลำดับ มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.46 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารที่ใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูที่ความเข้มข้น 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ส่วนการเจริญของเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 22.95 กรัมต่อลิตร มีมวลชีวภาพ 4.36 กรัมต่อลิตร มีค่าน้ำตาล รีดิวซ์และไนโตรเจนที่เหลือเท่ากับ 19.08 และ 6.37 กรัมต่อลิตรตามลำดับ มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.39 ตามลำดับ เมื่อใช้ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ความเข้มข้น 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของน้ำนึ่งปลาทูน่า 4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 และ *C.glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงไลซีนสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลและไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่า พบว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 26.18 กรัมต่อลิตร มีมวลชีวภาพ 7.25 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลรีดิวซ์และไนโตรเจนที่เหลือเท่ากับ 12.04 และ 5.94 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ที่พีเอชในอาหาร 6.95 ซึ่งสูงกว่าการเจริญของเชื้อ *C.glutamicum* ATCC 21475 ที่ผลิตไลซีนได้สูงสุด 23.44 กรัมต่อลิตร มีมวลชีวภาพ 7.18 กรัมต่อลิตร มีค่าน้ำตาลรีดิวซ์และไนโตรเจนที่เหลือเท่ากับ 13.17 และ 6.69 กรัมต่อลิตรตามลำดับ มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.01

ผลการศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร จากการเจริญของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 พบว่าการใช้ความเร็วในการกวน 700 รอบต่อนาที เชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนสูงที่สุด 28.11 กรัมต่อลิตร รองลงมาได้แก่การใช้ความเร็ว 500 รอบต่อนาที และ 250 รอบต่อนาที ซึ่งให้การผลิตไลซีนเท่ากับ 26.93 กรัมต่อลิตร และ 24.75 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

ผลการคุมพีเอชในกระบวนการหมักเท่ากับพีเอช 7 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ที่ความเร็วในการกวน 700 รอบต่อนาที พบว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมงสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 30.02 กรัมต่อลิตร มีมวลชีวภาพ 15.88 กรัมต่อลิตร มีค่าปริมาณน้ำตาลและปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ 9.64 และ 6.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าการผลิตไลซีนของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในระดับฟลาสก์ ที่ไม่มีการควบคุมพีเอช

จากการศึกษาทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถเจริญและผลิตไลซีนจากการใช้กากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนได้ดี ทั้งนี้หากมีการพัฒนากระบวนการผลิตหรือปรับปรุงอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นจะช่วยลดต้นทุนและระยะเวลาในการผลิตไลซีนในระดับอุตสาหกรรมได้ดียิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

งามนิจ นนทโส. 2537. **การย้อมสีเซลล์แบคทีเรีย.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2537. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.** ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2544. **จุลินทรีย์น่ารู้.** กรุงเทพฯ : องค์การค้าคุรุสภา.

บุญพฤกษ์ จาฏามระ และคณะ. 2532. **เคมีเล่ม 2.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์อักษรเจริญทัศน์.

บุศราภา ลีละวัฒน์ และปราณี อ่านเปรื่อง. 2536. การผลิตสารสกัดจากปลาอย่างต่อเนื่องโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโปรติเอสตรึงรูป.วารสารอาหาร ปีที่ 3 ฉบับที่ 23 หน้า 177 - 187.

ไพโรจน์ ช้ายเกลี้ยง. 2534. การประมงปลาทูน่าของประเทศไทย.**วารสารการประมง.** ปีที่4 ฉบับที่ 44 หน้า 343-372.

ภาสกร คณานุรักษ์. 2529. **อาหารสัตว์เบื้องต้น.** เล่ม 1. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2524. **กากน้ำตาลชนิดผลิตผลพลอยได้.** สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม.

มาริสา จาตุพรพิพัฒน์. 2537. "สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์รงควัตถุของ *Rhodocyclus gelatinosus* R7 ที่เลี้ยงในน้ำนึ่งปลาทูน่า". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เรืองลักขณา จามิกรณ์. 2541. **ชีวเคมีเบื้องต้น.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

สมใจ ศิริโภค. 2540. **การผลิตจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลซีน.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

สมใจ ศิริโภค. 2544. **จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.** กรุงเทพฯ : ศูนย์หนังสือกรุงเทพฯ

สุวิทย์ สุวรรณโน. 2535. "การเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในน้ำเสียของโรงงานแปรรูปอาหารทะเล". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทรายกระทรวงอุตสาหกรรม. 2541. **โครงการศึกษาวิจัยผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาล.** สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2547. **แบททีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพเซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์.** กรุงเทพฯ :โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซี่ยน.

Anderson, R.F. and Jackson, R.W. 1958. "Essential amino acids in microbial protein". **Appl. Microbiol.** 6(5):369–373.

A.O.A.C. 1980. **Official method of analysis**, 16 Edition Washington D.C : Association of official Analysis chemist.

APHA, AWWA and WPCF. 1992. **Standard Methodes for the Examination of Water and Wastewater** 18th ed. New York : American Public Health Association, Inc.,

Barascientific (Online). Avaible: http://www.gls.co.jp/technique/application/inertsearch/lc-a/lc-a007.html.2002.

Bioscience (Online). Avaible:http://www.bioscience.org/images/aminacid/lys3d.gif. 2000.

Bianchi, D., Bertrand, O., Hauqt, K. and Coello, N. 2001. "Effect of glucose acid as a secondary carbin source on non-growing L-lysine producers cells of *Corynebacterium glutamicum* Purification and properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase". **Enzyme Microb. Technol**. 28:754-759.

Bisaria, R., Madan, M. and Vasudevan, P. 1997. "Utilisation of agroresidues as animal feed through bioconversion". **Biores. Technol**. 59: 5-8.

Broer, S., Eggeling, L. and Kramer, R. 1993. "Strains of *Corynebacterium glutamicum* with different lysine productivities may have different lysine excretion systems". **Appl. Environ. Microbiol**. 59: 316-321.

Coello, N., Pan, J.G. and Lebeault, J.M. 1992. "Physiological aspects of L-lysine production :effect of nutritional limitations on a producing strain of *Corynebacterium glutamicum*". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 38: 259 - 269.

Coello, N., Brito, L. And Nonus, M. 2000. "Biosynthesis of L-lysine by *Corynebacterium glutamicum* grown on fish silage". **Biores. Technol**. 73: 221- 225.

Cremer, J., Eggeling, L. and Sahm, H. 1991. "Control of the lysine biosynthesis sequence by *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes". **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 1746 - 1752.

Cruger, W. and Cruger, A. 1989. Biotechnology : **A textbook of industrial microbiology**. 2nd ed. Sunderland : MA.Sinauer Associates.Inc.

Eison, H. and Haas, M.D. 2003. (Online). Avaible:http://www.healthy.net/asp/templates/article.asp?Page Type=article&ID=1744. 2000.

Ekwealor , I.A., and Obeta, J A N. 2005. "Studies on lysine production by *Bacillus megaterium*". **African J. Biotechnol.** 4 (7): 633-638.

Hadj, S.A., Deschamps, A.M. and Lebeault, J.M. 1996. "Process Analysis of L-lysine fermentation with *Corynebacterium glutamicum* under different oxygen and carbon dioxide supplies and redox potentials". **Process. Biochem**. 31(5): 493-497.

Haidaris, C.G. and Bhattacharjee, J.K. 1978. "Lysine production by thialysine-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*". **J. Ferment. Technol.** 56: 189-192.

Hua, Q., Yang, C. and Shimisu, K. 2000. "Metabolic control analysis for lysine synthesis using *Corynebacterium glutamicum* and experimental verification". **J. Biosci. Bioeng.** 90: 184-192.

Georgi, T., Rittmann, D. and Wendisch, V.F. 2005. "Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose,fructose and sucrose:Roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase". **Metab. Eng.** 7:291-301.

James, C.P.C. **Cane sugar handbook.**11th ed. New York : John Wiley & Sons, 1985.

Jones, H.R. 1974. Pollution control in poultry and seafood processing. Noyes Data Cooperation U.S.A. pp.215-253.

Kawahara, Y., Nnakamura, T., Yoshihara, Y., Ikedo, S. and Yoshii, H. 1990. "Effect of glycine betaine on the sucrose catabolism of an L-lysine producing mutant of *Brevibacterium lactofermentum*". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 34: 340- 343.

Kiss, R. D. and Stephanopoulos, G. 1991. "Metabolic Characterization of a L-lysine Producing Strain by Continuous Culture". **Biotechnol. Bioeng**. 39(5) : 565- 574.

Kiss, R.D. and Stephanopoulos, G. 1991. "Metabolic activity control of the L-lysine fermentation by restrained growth fed-batch strategies". **Biotechnol. Prog**. 7: 501-509.

Liu, Y.T. and Sang, S.L. 1980. "A potential fermentation product L-lysine from cane molasses in Taiwan". Proc.17th Congress ISSCT,Phelippines.

McPherson, A.T. 1966. **World Protein Resource**. Medical and Technical Publishing, Lancaster.

Nelson,N. 1994. "A Photometic adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose". **J. Bacteriol.** 48:413-427.

Odunfa, S.A., Adeniran, S.A., Teniola, O.D. and Nordstrom, J. 2001. "Evalution of lysine and methionine production in some lactobacilli and yeasts from *Ogi*". **Food Microbiol.** 63 : 159-163.

Paegle, L. and Ruklisha, M. 2003. "Lysine synthesis control in *Corynebacterium glutamicum* RC 115 in mixed substrate (glucose-acetate) medium". **J. Biotechnol.** 104: 123-128.

Paturau, J.M. 1982. "**By-products of the cane sugar industry. Sugar**"series,3.2nd ed. Amsterdam. Elsevier Pub.Co.

Payne, J.H. 1968. **Sugar Cane Factory Analytical Control.** Amsterdam. Elsevier Pub.Co.

Pham, C.B., Galvez, C.F. and Padolina, W.G. 1992. "Methionine production by batch fermentation from various carbohydrates". **ASEAN Food J.** 75:249-252.

Shah, A.H., Hameed, A., Ahmad, S. and Khan, G.M. 2002. "Optimization of Culture for L-lysine Fermentation by *Corynebacterium glutamicum*". Online **J. Biological Science**. 2 (3)151-156.

Shito, I and Sano, K. 1969. "Microbial production of L-lysine II.Production by mutants sensitive to threonine or methionine".**Gen. Appl. Microbiol**. 15:267-287.

Shivinka, J., Viesturs, U. and Rukliska, M. 1980. "Yield regulation of lysine biosynthesis in *Brevibacterium flavum*". **Biotechnol Bioeng**. 26: 897- 912.

Slagle,P. 1998.(Online).Avaible: http://www.thewayup.com

Soderguist, M.R., Williamson, K.J., Blanton, G.I., Philips, Jr., D.C., Law, D.K and Crawford, D.L. 1970. "Current Practice in Seafoods Processing Waste Treatment.Waste Pollution Control" Research Series 12060 ECF04/70.Environmental Protection Agency,Corvallis.

Takiguchi, N., Fukui, N., Shimizu, N., Shimizu, H. and Shioya, S. 1998. "Method of *Corynebacterium glutamicum* Fermentation Time Extension with High Lysine Production Rate by Leucine Addition". **J. Ferment. Bioeng.** 86 (2): 180 – 184.

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. 2001. **Microbiology and introduction**. 7th ed. San Francisco. :Addison Wesley Longman.Inc.

Tosaka, O., Hirakawa, H. and Takmami, K. 1979. "Effect of biotin levels on L-lysine formation in *Brevibacterium lactofermentum*" . **Agric. Biol. Chem.** 43:491- 495.

Umerie, S.C., Ekwealor, I.A. and Nwagbo, I.O. 2000. "Lysine production by *Bacillus laterosporus* from various carbohydrates and seed meals". **Biores. Technol.** 75:249- 252.

Vallino, J.J. and Stephanopoulos, G. 1993. "Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction". **Biotechnol. Bioeng.** 41: 633- 646.

Vecht-Lifshitz, S.E., Almas, K.A. and Zomer, E. 1990. "Microbial growth on peptones from fish industrial wastes".Let. **Appl. Microbiol.** 10: 183-186.

Wang, J.S. 1993. "Production of L-lysine by *Brevibacterium* sp.p1-13 in fed-batch fermentation using molasses medium". Report of the Taiwan Sugar Research Institute. 139: 33-41.

Weuster-Botz, D., Kelle, R., Frantzen, M. and Wandrey, C. 1997. "Substrate Controlled Fed-Batch Production of L-Lysine with *Corynebacterium glutamicum*". **Biotech. Prog.** 13: 387-393.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

ก.1 Nutrient broth (NB) and agar (NA)

เนื้อสกัด (Beef extrac)	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชอาหารให้ได้ 6.8 ส่วนการเตรียมอาหาร NA จะเติมวุ้น 15 กรัม ใน 1 ลิตรของ NB ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.2 Seed medium สูตรของ (Coello *et al.*2000)

กลูโคส	20	กรัม
ยีสต์สกัด	5	กรัม
NaCl	2.5	กรัม
Thiamine-HCl	300	ไมโครกรัม
ไบโอติน	400	ไมโครกรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชอาหารให้ได้ 7.2 หลังนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.3 Lysine Production Medium สูตรของ (Coello *et al.*2000)

$(NH_4)_2SO_4$	75	กรัม
ยีสต์สกัด	20	กรัม
กลูโคส	80	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.4	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	10	มิลลิกรัม
$FeSO_4.7H_2O$	10	มิลลิกรัม
Thiamine-HCl	300	ไมโครกรัม

ไบโอติน	400	ไมโครกรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชอาหารให้ได้ 7.4 หลังนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.4 อาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาล ดัดแปลงจาก (Coello *et al.* 2000)

$(NH_4)_2SO_4$	75	กรัม
ยีสต์สกัด	20	กรัม
น้ำตาลจากกากน้ำตาล	80	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.4	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	10	มิลลิกรัม
$FeSO_4.7H_2O$	10	มิลลิกรัม
Thiamine-HCl	300	ไมโครกรัม
ไบโอติน	400	ไมโครกรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชอาหาร ให้ได้ 7.4 หลังนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.5 อาหารสูตรดัดแปลงที่เติมน้ำนึ่งปลาทูน่า ดัดแปลงจาก (Coello *et al.*2000)

$(NH_4)_2SO_4$	75	กรัม
ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่า	2.0	กรัมไนโตรเจน
กลูโคส	80	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.4	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	10	มิลลิกรัม
$FeSO_4.7H_2O$	10	มิลลิกรัม
Thiamine-HCl	300	ไมโครกรัม

Thiamine-HCl	300	ไมโครกรัม
ไบโอติน	400	ไมโครกรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชอาหาร ให้ได้ 7.4 หลังนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.6 อาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่า ดัดแปลงจาก (Coello *et al.* 2000)

$(NH_4)_2SO_4$	75	กรัม
ไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่า	3.0	กรัมไนโตรเจน
น้ำตาลจากกากน้ำตาล	40	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.4	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	10	มิลลิกรัม
$FeSO_4.7H_2O$	10	มิลลิกรัม
Thiamine-HCl	300	ไมโครกรัม
ไบโอติน	400	ไมโครกรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชอาหาร ให้ได้ 7.4 หลังนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์องค์ประกอบของวัตถุดิบ

ข.1 ค่าพีเอช ตามวิธีของ APHA,AWWA and WPCF (1992)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
2. น้ำกลั่น
3. สารละลายพีเอชมาตรฐาน พีเอช 4.0,7.0 และ 10.0

วิธีวิเคราะห์

1. ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างแท่งแก้วอิเล็คโทรดให้สะอาดใช้กระดาษทิชชูซับน้ำให้แห้ง
2. ปรับเครื่องวัดพีเอชให้ได้ค่ามาตรฐานตามคำแนะนำในคู่มือของเครื่องวัดพีเอชโดยใช้สารละลายพีเอชมาตรฐานที่มีค่าพีเอชใกล้เคียงกับพีเอชของตัวอย่าง
3. ฉีดล้างแท่งแก้วอิเล็คโทรดด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ซับน้ำให้แห้ง
4. นำแท่งอิเล็คโทรดจุ่มลงในตัวอย่างน้ำ วัดค่าพีเอชและจดบันทึกไว้
5. เมื่อวัดค่าเสร็จแล้ว ล้างหัวอิเล็คโทรดให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งหนึ่ง

ข.2 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ตามวิธี Kjeldahl method ตามวิธีของ A.O.A.C. (1980)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวดย่อยตัวอย่างขนาด 250-300 มิลลิลิตร
2. อุปกรณ์ให้ความร้อน
3. อุปกรณ์กลั่นไนโตรเจน (semi-micro distillation)
4. ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
5. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
6. ปิเปต
7. บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร
8. ลูกแก้ว (glass bead)

สารเคมี

1. โซเดียมซัลเฟต
2. เมอร์คิวรีซัลเฟต ละลายเมอร์คิวรีออกไซด์จำนวน 10 กรัม ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำ 92 มิลลิลิตร
3. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 60 กรัมและโซเดียมไทโอซัลเฟต 5 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
5. กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ4
6. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์มอล
7. อินดิเคเตอร์ละลายเมธิลเรด 0.2 กรัมและเมทิลีนบลู 0.1 กรัม ในเอธานอล 95 ร้อยละ 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดย่อย
2. เติมโซเดียมซัลเฟต 2 กรัมและเมอร์คิวรีซัลเฟต 5 มิลลิลิตรเ ติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร
3. ทำการย่อยบนอุปกรณ์ให้ความร้อน จนกระทั่งได้สารละลายใส ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ล้างคอขวดด้วยน้ำกลั่น ถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
4. จัดอุปกรณ์กลั่น นำฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ 1-2 หยด นำไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรด
5. นำสารละลายตัวอย่างใส่ลงในช่องตัวอย่าง เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 60 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในช่องใส่ตัวอย่าง
6. ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วนกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง ทำแบลงก์ตามวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

การคำนวณ

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

กำหนดให้

A = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง

B = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับแบลงค์

W = ปริมาตรของตัวอย่าง

N = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)

ข.3 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ตามวิธีของ Payne (1968)

สารเคมี

1. กรดไฮโดรคลอริก 6.34 นอร์มอล
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 นอร์มอล
3. ฟีนอฟทารีนอินดิเคเตอร์
4. สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต
5. สารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทต
6. เมทิลลีนบลู

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่าง 0.375 กรัม ใส่ในภาชนะและใช้น้ำกลั่นประมาณ 20 มิลลิลิตร ละลายกากน้ำตาลให้เป็นเนื้อเดียวกันถ่ายใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 200 มิลลลิลิตร ให้ใช้น้ำกลั่นล้างสารละลายโดยไม่ควรให้สารละลายในฟลาสก์เกิน 60 มิลลิลิตร
2. ให้ความร้อน 65 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (โดยใส่เทอร์โมมิเตอร์ ในฟลาสก์) ยกขึ้นและใช้น้ำกลั่นฉีดล้างกากน้ำตาลที่ติดอยู่ลงไปให้หมด
3. เติม 6.34 นอร์มอล กรดไฮดรอครอริก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
4. หยดฟีนอฟทาลีนอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ลงในตัวอย่าง ทำให้เป็นกลางโดยไทเทรตกับ 6 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ (ให้ค่อยๆหยด โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากบิวเรต ลงในสารละลายตัวอย่างและทำการเขย่าไปด้วยเพื่อให้สารละลายผสมกัน ให้สังเกตสีของสารละลายที่เปลี่ยนไปจุดสมดุลย์พอดีสารละลายที่ได้จะเป็นสีน้ำตาลเข้ม) ทิ้งให้เย็น
5. ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรของสารละลาย นำตัวอย่างใส่ในบิวเรตและจดปริมาตรเริ่มต้นไว้เพื่อใช้เป็นปริมาตรเริ่มต้น
6. เปิดตัวอย่างจากบิวเรตปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทตปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 5 มิลลิลิตร ตั้งให้เดือดบนเตาให้ความร้อน ปล่อยให้เดือด 2 นาที
7. หยดสารละลายเมทิลลีนบลูเป็นอินดิเคเตอร์ สารละลายจะเป็นสีน้ำเงิน นำมาไทเทรตกับสารละลายน้ำตาลในบิวเรตโดยต้องทำการให้ความร้อนตลอดเวลาไทเทรตจนสีน้ำเงินในสารละลายหมดจดปริมาตรของตัวอย่างนำไปคำนวณหาค่าน้ำตาลจาก

สูตรการคำนวณ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{A \times 10}{C \times B}$$

กำหนดให้

A = ค่าที่เปิดจากตาราง11 จาก "SUGARCANE FACTORY ANALYTICAL CONTROL"

B = 0.375

C = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ไทเทรต

ข.4 ปริมาณน้ำตาลซูโครส ตามวิธีของ Payne (1968)

สารเคมี

1. กรดไฮโดรคลอริก 6.34 นอร์มอล
2. สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต
3. สารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทต
4. เมทิลลีนบลู

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างกากน้ำตาล 1.0 กรัม ใส่ในภาชนะและใช้น้ำกลั่นประมาณ 20 มิลลิลิตร ละลายกากน้ำตาลให้เป็นเนื้อเดียวกันถ่ายใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลลิลิตร ให้ใช้น้ำกลั่นล้างสารละลายโดยไม่ควรให้สารละลายในฟลาสก์เกิน 60 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ เขย่าและทำการกรองแล้วใส่ในบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร
3. ใช้ปิเปตดูดสารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทตปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 5 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
4. เติมสารละลายกากน้ำตาลจากบิวเรตลงไป 20 มิลลิลิตร นำขวดที่บรรจุสารละลายข้างต้นให้ความร้อนและทำการกวนตลอดเวลา รอให้เดือด 2 นาที
5. หยดสารละลายเมทิลลีนบลูเป็นอินดิเคเตอร์ สารละลายจะเป็นสีน้ำเงิน นำมาไทเทรตกับสารละลายน้ำตาลในบิวเรตโดยต้องทำการให้ความร้อนตลอดเวลาไทเทรตจนสีน้ำเงินในสารละลายหมดจดปริมาตรของตัวอย่างนำไปคำนวณหาค่าน้ำตาลจาก

สูตรการคำนวณ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ร้อยละ)} = \frac{A \times 10}{C \times B}$$

ปริมาณน้ำตาลซูโครส (ร้อยละ) = 0.95 (ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด – ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์)

กำหนดให้

A = ค่าที่เปิดจากตาราง11 จาก "SUGARCANE FACTORY ANALYTICAL CONTROL"

B = 1.0 กรัม

C = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ไทเทรต

ข.5 สารแขวนลอย ตามวิธีของ APHA,AWWA and WPCF (1992)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กระดาษกรองใยแก้ว (whatman GF/C) เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.7 เซนติเมตร
2. กรวยกรอง (buchner funnel) ความจุ 100 มิลลิลิตร
3. เครื่องดูดอากาศ (suction pump)
4. เตาอบแห้ง
5. โถดูดความชื้น (desicater)
6. เครื่องชั่งละเอียด

วิธีการวิเคราะห์

1. อบกระดาษกรองใยแก้วในเตาอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง
2. วางกระดาษกรองลงในกรวยกรองที่ต่อเข้ากับเครื่องดูดอากาศ
3. ใช้น้ำกลั่นฉีดให้กระดาษกรองเปียกเพื่อให้ติดแน่น
4. เทน้ำตัวอย่างที่ต้องการหาค่าลงบนกระดาษกรองโดยอาศัยแรงดูดจากเครื่องดูดอากาศ
5. ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างของแข็งที่ติดอยู่ข้างกรวยและรอจนแห้ง
6. ปิดเครื่องใช้ปากคีบ คีบกระดาษกรองใส่ภาชนะทนไฟ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส จนกว่าจะแห้ง ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง
7. ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง

การคำนวณ

$$\text{สารแขวนลอย (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (B-A) x 1000}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)}}$$

กำหนดให้

A = น้ำหนักกระดาษกรองก่อนอบ

B = น้ำหนักกระดาษกรองหลังอบ

ข.6 ของแข็งทั้งหมด ตามวิธีของ APHA,AWWA and WPCF (1992)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. จานระเหย (evaporating dish)
2. เครื่องอังน้ำ (water bath)
3. เดซิเคเตอร์
4. เตาอบแห้ง
5. เครื่องชั่งละเอียด

วิธีการวิเคราะห์

1. นำจานระเหยไปอบแห้งและมีน้ำหนักที่แน่นอนในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์และชั่งหาน้ำหนักของจานระเหย
2. ค่อยๆรินปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ต้องการลงในจานระเหย นำไปตั้งบนเครื่องอังไอน้ำ เมื่อน้ำระเหยหมด นำจานไปอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส จนแห้งและน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์
3. ชั่งหาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือน้ำหนักของของแข็งทั้งหมด

$$\text{ของแข็งทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (B-A) x 1000}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)}}$$

กำหนดให้

A = น้ำหนักจานระเหยก่อนอบ

B = น้ำหนักจานระเหยหลังอบ

ข.7 การหาปริมาณเถ้า ตามวิธีของ Payne (1968)

สารเคมี

กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 10

วิธีการทดลอง

1. นำถ้วยแพททินัมเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
2. นำถ้วยที่เผาแล้วทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์
3. ทำการชั่งน้ำหนักถ้วยเปล่า
4. นำตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์มาใส่ลงไปในถ้วยประมาณ 3-5 กรัม
5. ทำการให้ความร้อนบนเครื่องให้ความร้อน
6. นำมาให้ความร้อนในเตาที่มีอุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียสและทำการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 475-500 องสาเซลเซียส
7. นำเถ้าที่ได้มาทำการหยดกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 10 ให้ชุ่มและนำไปเผา
8. นำถ้วยมาทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์และทำการชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของถ้วย

สูตรการคำนวณ

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

กำหนดให้

A = น้ำหนักถ้วยเปล่า

B = น้ำหนักถ้วยรวมน้ำหนักตัวอย่างหลังเผา

C = น้ำหนักตัวอย่าง

ข.8 ซีโอดี ตามวิธีของ APHA,AWWA and WPCF (1992)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เครื่องควบแน่น (condenser)
3. เตาไฟฟ้า
4. บิวเรตต์ ขนาด 50 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต ($AgSO_4$) 22 กรัม ลงในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (ใช้เวลาในการละลาย 1-2 วัน)
2. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต (K2Cr2O7) 0.0417 M สารละลายมาตร

ฐานโพแทสเซียมไดโครเมต ซึ่งอบให้แห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หนัก 12.259 กรัม ลงในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. สารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตไทเทรนท์ เข้มข้น 0.25 M ละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2.6H_2O$) ชนิดเออาร์ 98 กรัม ในน้ำกลั่นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
4. สารละลายเฟอร์โรอินดิเคเตอร์
5. เมอร์คอวรีซัลเฟต ($HgSO_4$) ชนิดผงใช้กำจัดหมู่คลอไรด์
6. กรดซัลฟามิก เอ อาร์ ใช้กำจัดไนไตรท์

การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 30 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งให้เย็น นำมาไทเทรตด้วยสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้เฟอโรอินเป็นอินดิเคเตอร์ (2-3 หยด)

การคำนวณ

$$\text{โมลาริตี (M)} = \frac{\text{มิลลิลิตรของ 0.0417 M โพแทสเซียมไดโครเมต x 0.25}}{\text{มิลลิลิตรของเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต}}$$

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งเมอร์คิวรีซัลเฟต 0.4 กรัมใส่ขวดก้นกลม
2. ใส่ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 20 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่มีซิลเวอร์ซัลเฟตเจือจางปนอยู่ 30 มิลลิลิตร ใส่ลูกแก้ว (glass beads) 5-6 เม็ด ป้องกันการเดือดอย่างรุนแรง
4. เขย่าสารให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องควบแน่นกลั่นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น ล้างเครื่องด้วยน้ำกลั่นก่อนที่จะถอดเครื่องควบแน่นออกจากขวดก้นกลม
5. นำส่วนผสมมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทำให้เย็นลง แล้วจึงไทเทรตหาปริมาณของไดโครเมตที่มากเกินพอด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้เฟอร์โรอินดิเคเตอร์ใช้ 2-3 หยด จนกระทั่งสีของส่วนผสมเปลี่ยนจากสีน้ำเงินอมเขียวไปเป็นสีน้ำตาลแดง แสดงว่าถึงจุดยุติ
6. ใช้น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างเพื่อเป็นแบลงค์ เติมรีเอเจนต์ต่างๆที่ใช้และทำการรีฟลักซ์เช่นเดียวกับตัวอย่างทุกประการ

การคำนวณ

$$\text{ซีโอดี (มิลลิลิตรต่อลิตร)} = \frac{(A-B) \times C \times 8000}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)}}$$

กำหนดให้

A = มิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟที่ใช้กับสารตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟที่ใช้กับแบลงค์

C = โมลาริตี (M) ของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ค.1 การย้อมสีแกรม ตามวิธีของ Tortora *et al.* (2001)

การย้อมสีทำให้จำแนกแบคทีเรียออกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) และแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative)

สารเคมี

1. crystal violet
2. safranin
3. grame iodine solution
4. แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

วิธีการทดลอง

1. เกลี่ย (smear) เชื้อที่ต้องการย้อมบนสไลด์ที่ล้างสะอาด ทิ้งให้แห้งแล้ว heat fix โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง
2. หยดสี crystal violet บนเชื้อที่เกลี่ยนาน 1-2 นาที แล้วเทสีทิ้ง
3. หยด grame iodine solution บนเชื้อที่เกลี่ยนาน 2 นาที แล้วเททิ้งสารละลายไอโอดีนจะช่วยเซลล์ติดสีได้ดีขึ้น
4. นำสไลด์มาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาทีแล้วจึงล้างด้วยน้ำ
5. หยดสี safranin บนเชื้อที่เกลี่ยนาน 15-30 วินาที ล้างน้ำซับให้แห้งแล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ค.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Nelson (1994)

สารเคมี

1. สารละลาย Copper reagent

   เตรียมคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 10 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลายฟอสเฟตทาเทรตโดย ชั่ง $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($NaKC_4H_4O_6.4H_2O$) 40 กรัม เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) 120 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรเก็บในขวดสีชา 2 วัน กรองตะกอนออก จึงนำมาผสมกับสารละลายคอปเปอร์

2. สารละลาย Nelson's Arsenomolybdate color reagent

เตรียมโดยชั่ง $Na_2HAsO_4.7H_2O$ 3 กรัม ในน้ำ 25 มิลลิลิตร นำไปผสมกับแอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 25 กรัม ในน้ำ 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริก 21 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีชา บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 วัน

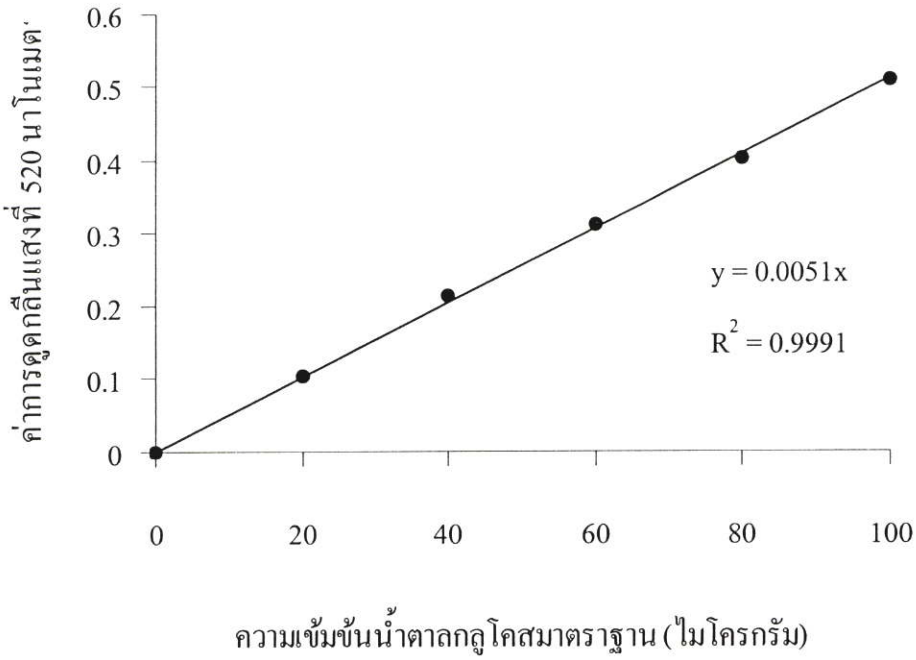
วิธีการสร้างกราฟมาตราฐานกลูโคส

1. เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายน้ำตาลเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายคอปเปอร์ลงไป 1 มิลลิลิตร
4. นำไปต้มในน้ำร้อนเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็น
5. เติมสารละลายเนลสันลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
6. เติมน้ำกลั่นลงไป 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาทีแต่ไม่ควรเกิน 40 นาที
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร
8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times 1000}$$

วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจนเหลือส่วนที่ใสมาทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดย ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายคอปเปอร์ลงไป 1 มิลลิลิตร
3. นำไปต้มในน้ำร้อนเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็น
4. เติมสารละลายเนลสันลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
5. เติมน้ำกลั่นลงไป 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาทีแต่ไม่ควรเกิน 40 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง



ภาพที่ ค.1 แสดงกราฟมาตราฐานน้ำตาลกลูโคส

ค.3 มวลชีวภาพ

สารเคมี

น้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมหลอดทดลองที่อบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. ดูดตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ใส่ในหลอดทดลอง
3. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินส่วนลอยเก็บเอาไว้เพื่อใช้วิเคราะห์
4. เติมน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงทำซ้ำเช่นนี้ 1-2 ครั้ง
5. รินส่วนลอยทิ้งนำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง
6. คำนวณหามวลชีวภาพ

การคำนวณ

$$\text{มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น.น หลอดทดลองและเซลล์แห้ง-น.น หลอดทดลอง}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

ค.4 ปริมาณไลซีนตามวิธีของ Barascientific (2002)

สารเคมี

1. น้ำกลั่นเกรด HPLC
2. เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ70
3. สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์
4. กรดฟอสโฟริกเข้มข้น
5. สารละลายไลซีนมาตรฐาน

อุปกรณ์

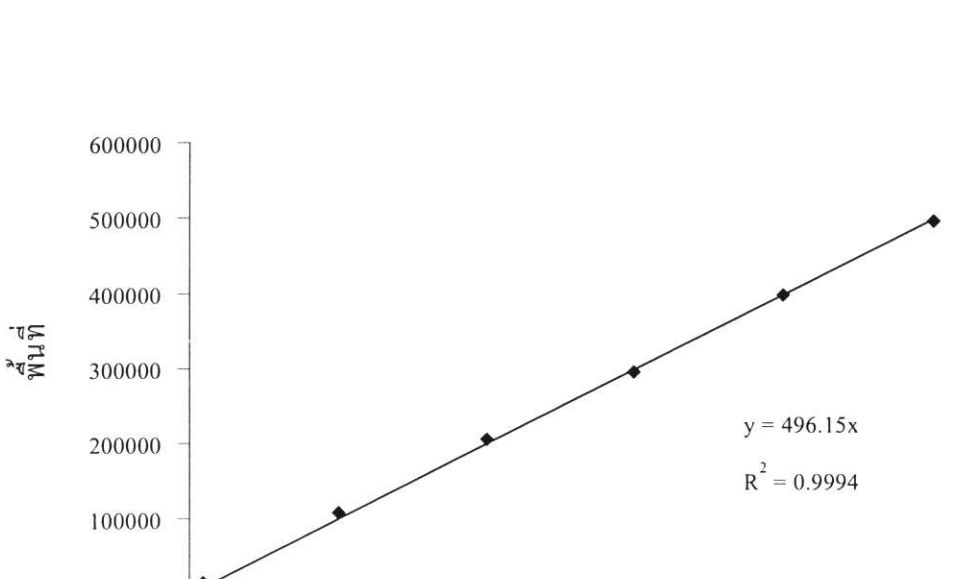
1. เครื่อง HPLC C-R7A ; Shimadzu; Japan ประกอบด้วย
2. ส่วนควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่; LC-10 AD VP
3. ส่วนวัดการดูดกลืนแสง UV ; SPD-10 A VP
4. ส่วนประมวลและบันทึกผล ; C-R7 Ae plus
5. คอลัมน์ C18 ODS 250 × 4.6 mm

วิธีการเตรียมกราฟมาตราฐาน

1. ทำการเตรียมสารละลายไลซีนมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครลิตร และทำการกรองผ่านกระดาษกรองก่อนนำไปทำการไล่อากาศ
2. ทำการฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่องวิเคราะห์ (HPLC) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่ผ่านการไล่อากาศออก เป็นเฟสที่เคลื่อนที่ ทำการควบคุมอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที นำค่าพื้นที่ใต้พีคมาทำการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไลซีนมาตราฐานกับค่าพื้นที่ใต้พีค

วิธีการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างน้ำหมักที่เก็บ ณ ช่วงเวลาต่างๆที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกแล้วนำสารละลายส่วนใสมาทำการกรองด้วยกระดาษกรองและทำการเจือจางด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์
2. นำตัวอย่างมาทำการไล่อากาศออกและทำการฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่องวิเคราะห์ (HPLC) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นเฟสที่เคลื่อนที่ โดยมีอัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และนำค่าพื้นที่พีคที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานไลซีน



ภาพที่ ค.2 แสดงกราฟมาตราฐานไลซีน

ภาคผนวก ง

การคำนวนค่าจลนพลศาสตร์

ง.1 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu t$$

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t}$$

กำหนดให้

X_0 = ปริมาณเซลล์เมื่อเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวน

X_t = ปริมาณเซลล์เมื่ออยู่ในระยะเพิ่มจำนวน

t = เป็นเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนจาก X_0 เป็น X_t

ง.2 อัตราการผลิตไลซีน (Qp)

$$\mathbf{Qp} = \Delta p/t$$

กำหนดให้

Δp = ผลได้ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

t = เป็นเวลาที่ผลิตภัณฑ์จำนวนสูงสุด

ง.3 ผลผลิตมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล (Yx/s)

$$\mathbf{Yx/s} = \Delta x/\Delta s$$

กำหนดให้

Δx = ผลได้ของมวลเซลล์ที่เกิดขึ้น

Δs = ปริมาณสับสเสรตที่ถูกใช้ไป

ง.4 ผลผลิตไลซีนจากการใช้น้ำตาล (Yp/s)

$$\mathbf{Yp/s} = \Delta p/\Delta s$$

กำหนดให้

Δp = ผลได้ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

Δs = ปริมาณสับสเสรตที่ถูกใช้ไป

ภาคผนวก จ

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ จ.1 แสดง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารไลซีนสังเคราะห์

เวลา	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	1.20	0.02	78.00	15.40	7.37
6	1.33	0.02	75.21	14.23	7.28
12	1.69	1.23	65.03	13.62	6.63
18	2.68	2.84	61.03	13.08	6.53
24	3.78	5.93	57.11	12.35	6.70
30	4.23	7.9	55.84	11.80	6.75
36	5.27	11.91	49.43	10.69	6.79
42	5.87	15.2	40.36	9.93	6.76
48	6.03	18.91	36.27	8.64	6.67
54	6.34	19.86	34.25	8.02	6.64
60	6.57	21.03	32.50	7.60	6.70
66	6.62	23.41	25.70	6.66	6.66
72	6.67	26.00	21.46	6.11	6.57
78	6.68	26.12	18.50	5.68	6.59
84	6.60	25.47	15.96	5.52	6.56
90	6.54	24.65	12.15	5.39	6.60

ตารางที่ จ.2 แสดง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารไลซีนสังเคราะห์

เวลา	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	1.21	0.03	78.95	14.93	7.35
6	1.29	0.03	74.71	14.00	7.24
12	1.58	1.07	64.07	13.55	6.75
18	2.33	2.59	57.25	12.65	6.64
24	3.22	5.80	53.51	11.76	6.67
30	4.05	7.06	51.67	11.00	6.71
36	4.78	11.00	46.53	9.91	6.76
42	5.32	14.97	40.88	8.94	6.82
48	5.86	16.66	37.81	8.30	6.78
54	6.18	19.25	31.26	7.47	6.80
60	6.47	22.06	29.69	6.74	6.75
66	6.50	23.93	22.15	6.11	6.76
72	6.59	24.65	18.97	5.86	6.74
78	6.62	24.54	15.68	4.92	6.75
84	6.63	24.28	11.21	4.47	6.74
90	6.61	24.03	10.00	4.01	6.79

ตารางที่ จ.3 แสดง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส

เวลา	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	1.23	0.03	76.73	15.53	7.32
6	1.38	0.03	75.42	15.04	7.01
12	1.67	0.03	73.66	14.66	6.59
18	1.93	3.08	70.39	13.58	5.82
24	2.40	5.46	66.67	13.01	5.73
30	2.62	6.63	62.03	12.33	5.68
36	3.47	11.41	56.54	11.08	5.50
42	4.27	15.29	53.73	9.93	5.62
48	4.67	17.39	48.89	9.35	5.94
54	5.07	18.89	44.90	8.87	5.97
60	5.67	20.33	36.67	7.91	6.04
66	5.93	22.03	29.80	7.25	6.06
72	6.07	23.59	24.18	6.42	6.17
78	6.11	23.54	18.44	5.94	6.23
84	6.15	23.30	15.85	5.74	6.27
90	6.10	22.25	12.02	5.66	6.21

ตารางที่ จ.4 แสดงมวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส

เวลา	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	1.20	0.03	77.78	15.53	7.35
6	1.33	0.03	75.95	15.04	6.84
12	1.73	0.03	73.33	14.56	6.58
18	1.93	3.44	69.22	13.72	6.13
24	2.47	5.78	66.93	12.91	6.36
30	2.93	6.85	62.81	12.49	6.19
36	3.40	10.13	56.05	11.48	6.11
42	4.33	13.40	51.41	10.72	5.87
48	4.93	16.78	46.18	9.45	5.76
54	5.20	19.49	39.93	8.77	5.87
60	5.60	21.49	33.66	7.72	5.94
66	5.80	21.80	27.29	7.43	6.08
72	6.13	22.49	22.25	6.59	6.14
78	6.17	22.46	17.00	6.11	6.17
84	6.20	22.27	14.26	5.90	6.23
90	6.25	21.06	11.50	5.85	6.27

ตารางที่ จ.5 แสดง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆที่เวลา 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
ควบคุม	6.65	26.09	19.08	7.55	6.53
40	6.53	25.14	18.04	7.07	6.57
60	6.28	24.48	19.25	7.16	6.48
80	6.10	22.84	21.34	7.71	6.22
100	4.40	10.17	33.66	8.82	5.32
120	2.79	8.04	43.56	9.37	5.25

ตารางที่ จ.6 แสดงมวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารที่ใช้ กากน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆที่เวลา 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
ควบคุม	6.53	24.93	19.02	7.06	6.76
40	6.47	24.95	18.17	6.82	6.62
60	6.27	23.53	19.44	7.52	6.46
80	6.20	22.30	20.52	7.93	6.15
100	4.60	8.32	33.04	8.68	5.23
120	3.80	6.46	44.44	8.87	5.06

ตารางที่ จ.7 แสดง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัด

เวลา	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	1.20	0.20	78.10	15.37	7.37
6	1.41	0.20	76.34	14.34	7.05
12	1.52	0.60	69.08	13.40	6.45
18	1.74	3.77	62.22	12.74	6.69
24	2.12	5.94	58.95	12.14	6.75
30	2.50	7.57	56.67	11.11	6.81
36	2.72	8.51	50.39	10.45	6.84
42	2.93	10.94	42.03	9.75	6.83
48	3.15	13.62	37.39	8.60	6.56
54	3.24	15.75	35.49	7.75	6.32
60	3.30	17.17	30.52	7.01	5.99
66	3.46	20.30	27.89	5.99	5.71
72	3.70	21.97	22.23	5.11	5.61
78	3.73	21.68	19.95	4.39	5.73
84	3.71	21.30	16.73	4.04	5.77
90	3.68	21.00	13.16	3.83	5.80

ตารางที่ จ.8 แสดง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัด

เวลา	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	1.21	0.30	78.32	15.35	7.34
6	1.39	0.30	75.75	14.58	7.11
12	1.56	0.60	69.08	13.92	6.48
18	1.88	2.93	58.63	12.98	6.68
24	2.30	4.70	51.05	11.57	6.60
30	2.43	7.42	48.69	10.62	6.56
36	2.70	8.78	45.75	9.63	6.47
42	2.83	11.59	36.99	8.57	6.40
48	2.97	13.30	33.53	7.88	6.26
54	3.06	14.91	31.57	6.85	6.10
60	3.21	18.20	27.65	5.81	5.98
66	3.38	19.24	24.27	5.29	5.94
72	3.57	20.82	20.66	4.37	5.89
78	3.59	20.34	17.44	4.03	5.93
84	3.56	20.25	14.95	3.48	6.00
90	3.53	20.00	12.01	3.06	6.11

ตารางที่ จ.9 แสดง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
ควบคุม	6.43	26.37	20.80	6.38	6.51
1	3.08	17.58	25.99	3.38	5.41
2	3.75	20.00	22.96	5.87	5.73
3	5.71	23.39	19.19	6.82	6.46
4	6.31	24.65	16.11	7.44	6.99

ตารางที่ จ.10 แสดง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้นต่างๆที่เวลา 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
ควบคุม	6.40	25.00	19.50	6.31	6.72
1	3.13	16.86	24.26	2.33	5.35
2	3.59	20.36	20.81	5.08	5.63
3	4.36	22.95	19.08	6.37	6.39
4	5.60	23.27	17.88	6.76	6.76

ตารางที่ จ.11 แสดง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนกลูโคสและยีสต์สกัด

เวลา	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	1.20	0.30	38.82	16.54	7.38
12	1.43	0.40	36.14	15.13	6.57
24	2.42	5.31	29.73	13.35	6.46
36	3.37	10.32	25.60	11.66	6.41
48	5.42	18.08	19.82	9.65	6.68
60	6.23	23.02	16.44	8.31	6.88
72	7.25	26.18	12.04	5.94	6.95
84	7.26	25.19	9.91	4.87	6.98
96	7.17	24.50	6.45	3.57	7.03

ตารางที่ จ.12 แสดง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนกลูโคสและยีสต์สกัด

เวลา	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	1.20	0.30	39.09	16.46	7.36
12	1.52	0.40	37.19	15.55	6.40
24	2.17	5.48	29.94	13.71	6.34
36	3.33	10.68	25.95	11.97	6.58
48	4.47	16.71	20.07	9.65	6.64
60	6.20	20.14	17.48	8.06	6.89
72	7.18	23.44	13.17	6.69	7.01
84	7.15	22.67	10.42	5.81	6.98
96	6.99	22.01	8.58	4.47	7.05

ตารางที่ จ.13 แสดง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจนและพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที

เวลา	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	1.22	0.29	38.10	17.14	7.37
12	2.41	0.36	35.62	15.86	6.57
24	3.35	5.81	30.78	13.96	6.45
36	4.27	10.01	26.54	12.55	6.33
48	5.89	15.86	22.81	9.86	6.60
60	6.81	20.25	16.90	7.93	6.68
72	7.45	24.75	11.37	6.44	6.88
84	7.48	24.58	9.01	5.43	6.79
96	7.33	24.22	6.27	3.68	6.78

ตารางที่ จ.14 แสดง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลง ที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที

เวลา	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	1.21	0.29	39.02	17.29	7.37
12	3.11	0.53	36.86	15.99	6.67
24	4.37	6.93	32.48	13.69	6.43
36	5.34	12.34	25.88	12.08	6.34
48	7.38	18.08	21.69	9.75	6.62
60	8.57	24.29	16.24	8.08	6.70
72	10.91	26.93	10.51	6.29	7.03
84	10.97	26.92	8.47	5.27	7.09
96	10.59	26.56	5.69	3.50	7.11

ตารางที่ จ.15 แสดง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน และพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลง ที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที

เวลา	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	1.22	0.29	38.24	16.84	7.38
12	3.32	0.36	34.05	15.56	6.68
24	4.70	8.27	27.57	13.52	6.43
36	6.62	13.75	21.63	11.94	5.89
48	8.85	19.40	16.42	9.64	6.37
60	9.85	23.23	13.25	7.60	6.86
72	12.13	28.11	9.01	6.20	7.08
84	12.39	27.66	7.41	5.14	7.11
96	12.26	27.24	4.25	3.41	7.12

ตารางที่ จ.16 แสดง มวลชีวภาพ ปริมาณไลซีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที และ ควบคุมพีเอชเท่ากับ 7

เวลา	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
0	1.21	0.27	38.89	16.22
12	3.78	2.91	35.61	15.37
24	5.65	9.9	30.53	13.25
36	8.79	18.17	26.34	11.38
48	11.75	22.54	18.65	9.79
60	13.51	25.97	14.65	8.11
72	15.88	30.02	9.64	6.36
84	15.66	29.61	6.57	5.3
96	15.31	29.41	3.84	4.63

ภาคผนวก ฉ

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ตารางที่ ฉ.1 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลต่อ มวลชีวภาพ โดยเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	35.770	5	7.154	3537.736	<0.001
Within Groups	.024	12	.002		
Total	35.795	17			

	N	Subset					
ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		1	2	3	4	5	6
120	3	2.79					
100	3		4.40				
80	3			6.10			
60	3				6.28		
40	3					6.53	
ควบคุม	3						6.65
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.00	1.000

ตารางที่ ฉ.2 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลต่อ ปริมาณไลซีน โดยเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	988.941	5	197.788	184.404	<0.001
Within Groups	12.871	12	1.073		
Total	1001.812	17			

	N	Subset			
ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		1	2	3	4
120	3	8.04			
100	3		10.17		
80	3			22.84	
60	3			24.48	24.48
40	3				25.14
ควบคุม	3				26.09
Sig.		1.000	1.000	.076	.094

ตารางที่ ฉ.3 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลต่อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเชื้อ *A .citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคส ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1636.313	5	327.263	6489.730	<0.001
Within Groups	.605	12	.050		
Total	1636.919	17			

	N	Subset				
ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		1	2	3	4	5
40	3	18.04				
ควบคุม	3		19.08			
60	3		19.25			
80	3			21.34		
100	3				33.66	
120	3					43.46
Sig.		1.000	.381	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.4 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลต่อ ปริมาณไนโตรเจน โดยเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.168	5	2.634	55.935	<0.001
Within Groups	.565	12	.047		
Total	13.733	17			

	N	Subset			
ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		1	2	3	4
ควบคุม	3	7.07			
40	3	7.16			
60	3		7.55		
80	3		7.71		
100	3			8.82	
120	3				9.37
Sig.		.621	.384	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.5 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลต่อ พีเอช โดยเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.640	5	1.128	2446.082	<0.001
Within Groups	.006	12	.000		
Total	5.645	17			

	N	Subset					
ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		1	2	3	4	5	6
120	3	5.25					
100	3		5.32				
80	3			6.22			
60	3				6.48		
ควบคุม	3					6.53	
40	3						6.57
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.6 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลต่อ มวลชีวภาพ โดยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19.964	5	3.993	149.733	<0.001
Within Groups	.320	12	.027		
Total	20.284	17			

	N	Subset			
ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		1	2	3	4
120	3	3.80			
100	3		4.60		
80	3			6.20	
60	3			6.27	6.27
40	3			6.47	6.47
ควบคุม	3				6.53
Sig.		1.000	1.000	.081	.081

ตารางที่ ฉ.7 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลต่อ ปริมาณไลซีนโดยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1113.537	5	222.707	566.237	<0.001
Within Groups	4.720	12	.393		
Total	1118.257	17			

	N	Subset				
ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		1	2	3	4	5
120	3	6.46				
100	3		8.32			
80	3			22.30		
60	3				23.53	
40	3					24.93
ควบคุม	3					24.95
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.969

ตารางที่ ฉ.8 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลต่อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1717.404	5	343.481	1793.425	<0.001
Within Groups	2.298	12	.192		
Total	1719.702	17			

	N	Subset				
ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		1	2	3	4	5
40	3	18.17				
ควบคุม	3		19.02			
60	3		19.44			
80	3			20.52		
100	3				33.04	
120	3					44.44
Sig.		1.000	.256	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.9 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลต่อ ปริมาณไนโตรเจน โดยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.565	5	2.113	259.785	<0.001
Within Groups	.098	12	.008		
Total	10.662	17			

	N	Subset					
ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		1	2	3	4	5	6
ควบคุม	3	7.06					
40	3		6.82				
60	3			7.52			
80	3				7.93		
100	3					8.68	
120	3						8.87
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.10 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลต่อ พีเอช โดยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.968	5	1.594	3415.012	<0.001
Within Groups	.006	12	.000		
Total	7.974	17			

	N	Subset					
ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		1	2	3	4	5	6
120	3	5.06					
100	3		5.23				
80	3			6.15			
60	3				6.46		
40	3					6.62	
ควบคุม	3						6.76
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.11 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อ มวลชีวภาพ โดยเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28.549	4	7.137	7233.706	<0.001
Within Groups	.010	10	.001		
Total	28.559	14			

	N	Subset				
ความเข้มข้นน้ำนึ่งปลาทูน่า (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		1	2	3	4	5
1.0	3	3.08				
2.0	3		3.75			
3.0	3			5.71		
4.0	3				6.31	
ควบคุม	3					6.43
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.12 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อ ปริมาณไลซีน โดยเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	152.360	4	38.090	45.733	<0.001
Within Groups	8.329	10	.833		
Total	160.688	14			

	N	Subset			
ความเข้มข้นน้ำนึ่งปลาทูน่า (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		1	2	3	4
1.0	3	17.58			
2.0	3		20.00		
3.0	3			23.39	
4.0	3			24.65	
ควบคุม	3				26.37
Sig.		1.000	1.000	.123	1.000

ตารางที่ ฉ.13 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อ ปริมาณน้ำตารีดิวซ์โดยเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	167.967	4	41.992	413.332	<0.001
Within Groups	1.016	10	.102		
Total	168.983	14			

	N	Subset				
ความเข้มข้นน้ำนึ่งปลาทูน่า (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		1	2	3	4	5
4.0	3	16.11				
3.0	3		19.19			
ควบคุม	3			20.80		
2.0	3				22.96	
1.0	3					25.99
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.14 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อ ปริมาณไนโตรเจนโดยเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	29.271	4	7.318	322.080	<0.001
Within Groups	.227	10	.023		
Total	29.498	14			

	N	Subset				
ความเข้มข้นน้ำนึ่งปลาทูน่า (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		1	2	3	4	5
1.0	3	3.38				
2.0	3		5.87			
ควบคุม	3			6.38		
3.0	3				6.82	
4.0	3					7.44
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.15 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อ พีเอช โดยเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.903	4	1.226	4838.329	<0.001
Within Groups	.003	10	.000		
Total	4.905	14			

	N	Subset				
ความเข้มข้นน้ำนึ่งปลาทูน่า (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		1	2	3	4	5
1.0	3	5.41				
2.0	3		5.73			
3.0	3			6.46		
ควบคุม	3				6.51	
4.0	3					6.99
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.16 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อ มวลชีวภาพ โดยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22.447	4	5.612	8502.485	<0.001
Within Groups	.007	10	.001		
Total	22.453	14			

	N	Subset				
ความเข้มข้นน้ำนึ่งปลาทูน่า (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		1	2	3	4	5
1.0	3	3.13				
2.0	3		3.59			
3.0	3			4.36		
4.0	3				5.60	
ควบคุม	3					6.40
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.17 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อ ปริมาณไลซีน โดยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	120.479	4	30.120	122.667	<0.001
Within Groups	2.455	10	.246		
Total	122.934	14			

	N	Subset			
ความเข้มข้นน้ำนึ่งปลาทูน่า (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		1	2	3	4
1.0	3	16.86			
2.0	3		20.36		
3.0	3			22.95	
4.0	3			23.27	
ควบคุม	3				25.00
Sig.		1.000	1.000	.452	1.000

ตารางที่ ฉ.18 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อ ปริมาณน้ำตารีดิวซ์ โดยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	71.690	4	17.922	128.495	<0.001
Within Groups	1.395	10	.139		
Total	73.085	14			

	N	Subset			
ความเข้มข้นน้ำนึ่งปลาทูน่า (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		1	2	3	4
4.0	3	17.88			
3.0	3		19.08		
ควบคุม	3		19.50		
2.0	3			20.81	
1.0	3				24.26
Sig.		1.000	.198	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.19 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อ ปริมาณไนโตรเจนโดยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	39.372	4	9.843	191.650	<0.001
Within Groups	.514	10	.051		
Total	39.886	14			

	N	Subset			
ความเข้มข้นน้ำนึ่งปลาทูน่า (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		1	2	3	4
1.0	3	2.33			
2.0	3		5.08		
ควบคุม	3			6.31	
3.0	3			6.37	6.37
4.0	3				6.76
Sig.		1.000	1.000	.739	.059

ตารางที่ ฉ.20 ค่าทางสถิติผลของความเข้มข้นไนโตรเจนจากน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อ พีเอช โดยเชื้อ *C. glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.011	4	1.253	6061.371	<0.001
Within Groups	.002	10	.000		
Total	5.013	14			

	N	Subset				
ความเข้มข้นน้ำนึ่งปลาทูน่า (กรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		1	2	3	4	5
1.0	3	5.35				
2.0	3		5.63			
3.0	3			6.39		
ควบคุม	3				6.72	
4.0	3					6.76
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.21 ค่าทางสถิติผลอัตราการกวนที่ความเร็วระดับต่างๆต่อ มวลชีวภาพ ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	35.377	2	17.689	4944.040	<0.001
Within Groups	.021	6	.004		
Total	35.399	8			

	N	Subset		
อัตราการกวน (รอบต่อนาที)		1	2	3
250	3	7.45		
500	3		10.91	
700	3			12.13
Sig.		1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.22 ค่าทางสถิติผลอัตราการกวนที่ความเร็วระดับต่างๆต่อ ปริมาณไลซีน ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17.458	2	8.729	1888.493	<0.001
Within Groups	.028	6	.005		
Total	17.486	8			

	N	Subset		
อัตราการกวน (รอบต่อนาที)		1	2	3
250	3	24.75		
500	3		26.93	
700	3			28.11
Sig.		1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.23 ค่าทางสถิติผลอัตราการกวนที่ความเร็วระดับต่างๆต่อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.585	2	4.292	312.306	<0.001
Within Groups	.082	6	.014		
Total	8.667	8			

	N	Subset		
อัตราการกวน (รอบต่อนาที)		1	2	3
700	3	9.01		
500	3		10.51	
250	3			11.37
Sig.		1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.24 ค่าทางสถิติผลอัตราการกวนที่ความเร็วระดับต่างๆต่อ ปริมาณไนโตรเจน ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.088	2	.044	32.268	.001
Within Groups	.008	6	.001		
Total	.096	8			

	N	Subset		
อัตราการกวน (รอบต่อนาที)		1	2	3
700	3	6.20		
500	3		6.29	
250	3			6.44
Sig.		1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ.25 ค่าทางสถิติผลอัตราการกวนที่ความเร็วระดับต่างๆต่อ พีเอช ของเชื้อ *A. citreus* NRRL 1258 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.063	2	.031	97.276	<0.001
Within Groups	.002	6	.000		
Total	.065	8			

	N	Subset		
อัตราการกวน (รอบต่อนาที)		1	2	3
250	3	6.88		
500	3		7.03	
700	3			7.08
Sig.		1.000	1.000	1.000

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสายใจ เกียรติกิตติสรณ์
วัน เดือน ปีเกิด	22 กรกฎาคม 2522
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีวิเคราะห์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลวิทยาเขตเทคนิคกรุงเทพฯ และศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2545