



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำเสียโรงงานแปรงมันสำปะหลัง

Production of Single Cell Protein from Cassava Processing Wastewater

นาย ไกรยศ แซ่ลิ้ม
นาย ศุภศิลา มณีรัตน์

หัวหน้าโครงการวิจัย
ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256109A1080057

สัญญาเลขที่ 31/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำเสียโรงงานแป้งมันสำปะหลัง

Production of Single Cell Protein from Cassava Processing Wastewater

หัวหน้าโครงการวิจัย

นาย ไกรยศ แซ่ลี้

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

นาย ศุภศิลป์ มณีรัตน์

คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

พฤศจิกายน 2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำเสียโรงงานแป้งมันสำปะหลังโดยงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 31/2561

คณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์ ที่ปรึกษาโครงการวิจัยสำหรับคำแนะนำในการทำวิจัยครั้งนี้

รวมทั้งขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย
มิถุนายน 2562

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษารั้งนี้เพื่อคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีศักยภาพในการการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว และหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแปงมันสำปะหลัง จากยีสต์ทั้งหมด 7 สปีชีส์ ได้แก่ *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR5033, *Trichosporon cutaneum* TISTR5040, *Candida famata* TISTR5098, *C. tropicalis* TISTR5136, *C. utilis* TISTR5352, *Pichia farinose* TISTR5105 และ *Schwanniomyces alluvius* TISTR5164 ซึ่งได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) พบว่ามีเพียงยีสต์ 3 สปีชีส์ ได้แก่ *T. cutaneum* TISTR5040, *C. famata* TISTR5098 and *S. fibuligera* TISTR5033 ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแปงในอาหาร YPC (Yeast extract-Peptone-Cassava medium) อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อยีสต์ *T. cutaneum* จัดอยู่ในระดับความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 2 (Biosafety-Level 2) จึงไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นเชื้อยีสต์ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

การคัดเลือกเชื้อยีสต์ต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งแปงมันสำปะหลัง ได้แก่ บ่อน้ำทิ้งรวม (Combined wastewater, CW) น้ำทิ้งก่อนเข้าระบบ UASB (Before UASB, B-UASB) และน้ำทิ้งหลังระบบ UASB (After UASB, A-UASB) พบว่าเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวที่ดีที่สุด คือ *P. farinose* TISTR5105

การศึกษหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งที่ได้จากบ่อน้ำทิ้งรวมโดยเชื้อยีสต์ *P. farinose* TISTR5105 โดยใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนอง ศึกษาผลของปัจจัย 3 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอชของอาหารเริ่มต้น และปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวคือ การเลี้ยงเชื้อยีสต์ *P. farinose* TISTR5105 มในน้ำทิ้งที่ได้จากบ่อน้ำทิ้งรวมที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 36.49 องศาเซลเซียส โดยสภาวะดังกล่าวสามารถผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้เท่ากับ 3.81 กรัมต่อลิตร และมีพีเอชของอาหารสุดท้ายเท่ากับ 3.87

คำสำคัญ: โปรตีนเซลล์เดียว, มันสำปะหลัง, น้ำทิ้ง, เทคนิคพื้นผิวตอบสนอง

Abstract

Objectives of this study was to screen yeast strains that potential for single cell protein (SCP) production and to optimize the single cell protein production from cassava processing wastewater. Seven yeast species such as *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR5033, *Trichosporon cutaneum* TISTR5040, *Candida famata* TISTR5098, *C. tropicalis* TISTR5136, *C. utilis* TISTR5352, *Pichia farinose* TISTR5105 and *Schwanniomyces alluvius* TISTR5164, were obtained from Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR). Only three yeast species (*T. cutaneum* TISTR5040, *C. famata* TISTR5098 and *S. fibuligera* TISTR5033) showed a clear zones around the colonies on YPC agar plate. However, *T. cutaneum* are classed as BSL-2 in biosafety classification. It is not suitable for single protein production.

Screening of yeast for single cell protein production from cassava processing wastewater from different sources (Combined wastewater, Before UASB, After UASB). It was found that *P. farinose* TISTR5105 showed the highest production of single cell protein from combined wastewater.

Response Surface Methodology (RSM) was used to determine optimum condition for single cell protein production from combined wastewater by *P. farinose* TISTR5105. Three independent variables investigated in this experiment were temperature, initial pH of medium and inoculum size. The maximum production of single cell protein from combined wastewater by *P. farinose* TISTR5105 was optimized for conditions like an initial medium pH of 4.0 with 10 % (v/v) inoculum size at and incubated at 36.49 °C using RSM. Under optimum conditions the predicted maximum single cell protein production was 3.81 g/L and final medium pH of 3.87.

Keywords: single cell protein, cassava, wastewater, Response Surface Methodology

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	17
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	22
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	46
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก	49
ประวัตินักวิจัย	53

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง	4
4-1	การเจริญของเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YM broth	22
4-2	ลักษณะของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า	23
4-3	การย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อยีสต์บนอาหาร YPC agar	24
4-4	ปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ในน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังที่ระยะเวลาต่างๆ	31
4-5	ปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ในน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังที่ระยะเวลาต่างๆ	32
4-6	ร้อยละผลผลิตจำเพาะ (Specific product yield, Y_p/x) ของยีสต์ในน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง (ป้อนน้ำทิ้งรวม) ที่ระยะเวลาต่างๆ	33
4-7	ปริมาณโปรตีนของเชื้อ <i>P. farinosa</i> TISTR5105 จากแผนการทดลองแบบ CCD	34
4-8	น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ <i>P. farinosa</i> TISTR5105 จากแผนการทดลองแบบ CCD	35
4-9	ค่าพีเอชของเชื้อ <i>P. farinosa</i> TISTR5105 จากแผนการทดลองแบบ CCD	35
4-10	ร้อยละผลผลิตจำเพาะ (Specific product yield, Y_p/x) ของเชื้อ <i>P. farinosa</i> TISTR5105 จากแผนการทดลองแบบ CCD	36
4-11	ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ (ก.) และค่าพีเอช (ข.)	38
4-12	การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลการหาปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ (ก.) และค่าพีเอช (ข.)	38
4-13	การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัยของการหาปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ (ก.) และค่าพีเอช (ข.)	39
4-14	ผลการตอบสนองระหว่างอุณหภูมิและพีเอช (ก), ระหว่างอุณหภูมิและหัวเชื้อเริ่มต้น (ข) และระหว่างหัวเชื้อเริ่มต้นกับพีเอช (ค) ต่อปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์	43
4-15	ผลการตอบสนองระหว่างอุณหภูมิและพีเอช (ก), ระหว่างอุณหภูมิและหัวเชื้อเริ่มต้น (ข) และระหว่างหัวเชื้อเริ่มต้นกับพีเอช (ค) ต่อค่าพีเอช	44
4-16	การทำนายระดับที่เหมาะสมของการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อ <i>P. farinosa</i> TISTR5105	45

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1	5
องค์ประกอบทางเคมีของน้ำเสียจากเครื่องเซฟเตอร์ของโรงงานแป้งมันสำปะหลัง	
2-2	5
ลักษณะของน้ำเสียจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง	
2-3	7
องค์ประกอบทางเคมีของจุลินทรีย์ของโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อจุลินทรีย์	
2-4	8
จุลินทรีย์และสับเสรดที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว	
2-5	9
ปริมาณโปรตีนขอเชื้อจุลินทรีย์ในสับเสรดเฉพาะที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว	
2-6	13
แผนการทดลองประกอบศูนย์กกลาง (Central Composite Design, CCD) ของตัวแปรอิสระ (Independent variables)	
3-1	20
ตัวแปรชนิดต่างๆ ที่เลือกใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อยีสต์ <i>P. farinosa</i> TISTR5105	
3-2	21
สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อยีสต์ <i>P. farinosa</i> TISTR5105 จากแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)	
4-1	25
ระดับความปลอดภัยทางชีวภาพของเชื้อยีสต์	
4-2	27
คุณสมบัติของน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง	
4-3	29
ปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ในน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังที่ระยะเวลาต่างๆ	
4-4	30
ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ในน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังที่ระยะเวลาต่างๆ	
4-5	30
ร้อยละผลผลิตจำเพาะ (Specific product yield, Y_p/x) ของยีสต์ในน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง (บ่อน้ำทิ้งรวม) ที่ระยะเวลาต่างๆ	
4-6	37
สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะความเหมาะสมของการโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อ <i>P. farinosa</i> TISTR5105 จากแผนการทดลองแบบ CCD พร้อมค่าการคาดคะเนกับค่าที่ได้จากการทดลอง	
4-7	40
แสดงค่าความแปรปรวนของการหาปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์จากเชื้อ <i>P. farinosa</i> TISTR5105	
4-8	40
การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์สมการถดถอยของการหาปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์	
4-9	41
แสดงค่าความแปรปรวนของการค่าพีเอชจากเชื้อ <i>P. farinosa</i> TISTR5105	

ตารางที่		หน้า
4-10	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์สมการถดถอยของ การหาค่าพีเอช	41

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single cell protein, SCP) หมายถึง จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารมนุษย์หรืออาหารสัตว์ ซึ่งอาจอยู่ในรูปโปรตีนที่สกัดออกมาจากเซลล์แล้ว หรืออาจอยู่ในรูปเซลล์จุลินทรีย์ทั้งเซลล์ก็ได้ (สมใจ ศิริโชค, 2544) ส่วนใหญ่การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยววัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ ปัจจุบันปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การผลิตอาหารสัตว์ลดลง ส่งผลให้ราคาของอาหารสัตว์มีมูลค่าสูงขึ้น แม้ว่าจะมีการนำเอาวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตรมาใช้ทดแทนแก้ปัญหาดังกล่าว แต่ก็ไม่เพียงพอเนื่องจากมีการนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตรมาใช้เป็นพลังงานทดแทน เช่น นำไปหมักให้ได้เป็นเอทานอล เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวอาจเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับแก้ปัญหาดังกล่าวมาข้างต้น

มันสำปะหลังเป็นพืชที่ปลูกง่าย ทนทานต่อสภาพดินฟ้าอากาศที่แปรปรวน สามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ๆ ดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และมันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อประเทศไทยรองจาก ข้าว และยางพารา โดยไทยเป็นผู้ส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังอันดับหนึ่งของโลกที่ครอบคลุมตลาดโลกถึง 90% จากปริมาณการค้าของโลก จังหวัดสระแก้วเป็นแหล่งผลิตมันสำปะหลังที่สำคัญของประเทศ และเป็นแหล่งผลิตที่ใหญ่ที่สุดในภาคตะวันออก อีกทั้งยังมีโรงงานแป่งมันสำปะหลัง กระบวนการผลิตแป่งมันสำปะหลังมีการใช้น้ำเป็นจำนวนมาก ทำให้มีน้ำทิ้งหรือน้ำทิ้งจำนวนมากเช่นกัน เป็นผลให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา การนำเอาน้ำทิ้งจากโรงงานแป่งมันสำปะหลังมาใช้ประโยชน์ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวก็เป็นอีกวิธีหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าให้กับน้ำทิ้ง และเป็นวิธีการบำบัดน้ำทิ้งเพื่อช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. จัดเก็บข้อมูล และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งของโรงงานแป่งมันสำปะหลัง
2. การคัดเลือกสายพันธุ์ของยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว
3. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากน้ำทิ้งของโรงงานแป่งมันสำปะหลัง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานแป่งมันสำปะหลังในจังหวัดสระแก้ว นำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งที่ได้ เช่น ค่าพีเอช ค่าซีโอดี (COD) ค่าบีโอดี (BOD) ปริมาณคาร์บอนทั้งหมด ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณแอมโมเนีย เป็นต้น จากนั้นศึกษาหาสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ตลอดจนศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแป่งมันสำปะหลัง

1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

แม้ว่าจะมีการศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแป่งมันสำปะหลังมาแล้วในอดีต แต่องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งในแต่ละโรงงานมีความซับซ้อนและแตกต่างกัน ซึ่งอาจจะทำให้ผลที่แตกต่างกัน อีกทั้งเป็นการออกแบบทดลองแบบทีละปัจจัย (One factor at a time) ซึ่งไม่สามารถทราบผลของปัจจัยที่มีร่วมกันได้ รวมทั้งใช้ระยะเวลานานหากทำการศึกษาหลายปัจจัย การทดลองครั้งนี้จึงออกแบบการทดลองศึกษาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวมา ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแป่งมันสำปะหลังต่อไป

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นข้อมูลพื้นฐานการศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแป่งมันสำปะหลัง
2. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับองค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานแป่งมันสำปะหลังเบื้องต้น
3. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแป่งมันสำปะหลัง
4. ได้สายพันธุ์ยีสต์และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแป่งมันสำปะหลัง เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2

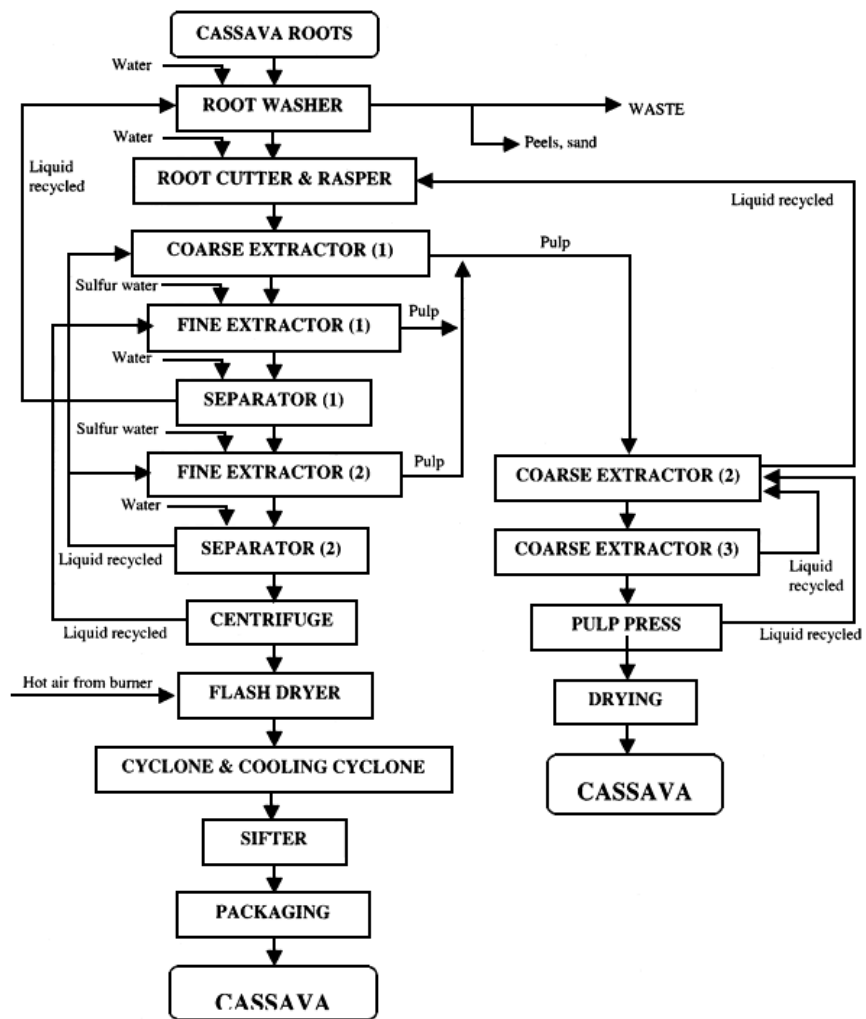
ตรวจเอกสาร

1. มันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง มีชื่อเรียกต่างๆ กัน เช่น cassava, mandioca, yucca, tapioca และ manioc ถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกาใต้ ในทางพฤกษศาสตร์มันสำปะหลังเป็นพืชวงศ์ใบเลี้ยงคู่ ตระกูล Eupobiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Monihot esculenta* Crantz. เป็นพืชที่เพาะปลูกมากในประเทศไทยเขตร้อน และเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังทั้งสิ้น 6.7 ล้านไร่ และมีกำลังการผลิตประมาณ 20 ล้านตันหัวมันต่อปี สามารถนำรายได้เข้าประเทศไทยปีละประมาณ 2 หมื่นล้านบาท นิยมปลูกกันมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออก ส่วนภาคอื่นๆ มีปลูกบ้างเล็กน้อย

เนื่องจากหัวของมันสำปะหลังมีแป้งในปริมาณมากแต่มีสารอื่นๆ เช่น โปรตีน ไขมัน ในปริมาณต่ำ จึงเป็นแหล่งแป้งบริสุทธิ์ชั้นเลิศ ที่สามารถสกัดออกมาได้ง่ายและมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ได้อย่างหลากหลาย คุณสมบัติที่สำคัญของแป้งมันสำปะหลังคือ แป้งสีขาว ไม่มีกลิ่น กาว แป้งเปียกใสและมีความเหนียวสูง ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้แป้งมันสำปะหลังมีความสะดวกและพร้อมที่จะนำไปใช้ผสมกับสารแต่งกลิ่นรสและสารแต่งสี นอกจากนี้มันสำปะหลังยังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมแปรรูปอีกมากมาย เช่น แป้งตัดแปรร ผงชูรส สารให้ความหวาน และแอลกอฮอล์ เป็นต้น

กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง ดังแสดงในภาพที่ 2-1 ซึ่งน้ำเสียได้มาจาก 4 แหล่ง ได้แก่ น้ำล้างมันสำปะหลัง น้ำเสียจากเครื่องตีแคนเตอร์ (decanter) น้ำเสียจากเครื่องเซพาเรเตอร์ (separator) I และ II และน้ำเสียนรวม ซึ่งองค์ประกอบของน้ำเสียโรงแป้งมันสำปะหลัง ดังแสดงในตารางที่ 2-1 และ 2-2



ภาพที่ 2-1 กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง
ที่มา: Ratanawaraha et al. (2019)

ตารางที่ 2-1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำเสียจากเครื่องเซฟวาเรเตอร์ของโรงงานแป่งมันสำปะหลัง

	เซฟวาเรเตอร์	เซฟวาเรเตอร์ I	เซฟวาเรเตอร์ II
พีเอช	1.5-6.0	6.0-6.2	6.0
ซีโอดี (ก./ล.)	3.2-16.7	16-17	5.2-5.3
ไนโตรเจน (มก./ล.)	40-170	240-270	72-73
โปรตีนที่ละลายได้ (มก./ล.)	1-3	0-1	0-0.3
แป้ง (ก./ล.)	10-17	9-22	8-22
CN (มก./ล.)	0-13	0-2	0
Ca (มก./ล.)	33-36	10-520	0-450
Mg (มก./ล.)	0-850	0-600	0-476
Mn (มก./ล.)	0-16	1-25	0-11
Fe (มก./ล.)	0-0.5	0-3	0-1

ที่มา: พูนสุข ประเสริฐสรรพ (2558)

ตารางที่ 2-2 ลักษณะของน้ำเสียจากโรงงานแป่งมันสำปะหลัง

พารามิเตอร์*	น้ำเสีย		น้ำเสียจากเครื่องตีแคนเตอร์	
	ช่วง	ค่าเฉลี่ย	ช่วง	ค่าเฉลี่ย
พีเอช	3.4-6.5	5.4	5.6-6.6	6.1
บีโอดี (BOD)	2,580-16,880	6,280	700-30,750	20,410
ซีโอดี (COD)	4,950-36,840	13,990	33,660-70,500	45,560
ไนโตรเจนอินทรีย์	83.6-375	190	460-910	670
แอมโมเนีย	1.3-30.1	9.8	18.6-89.7	43.3
ไนโตรเจน				

*หน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร ยกเว้นค่าพีเอช

ที่มา: พูนสุข ประเสริฐสรรพ (2558)

2. โปรตีนเซลล์เดียว (Single cell Protein)

โปรตีนเซลล์เดียว (Single cell protein, SCP) ถูกนิยามครั้งแรกในปี ค.ศ 2968 โดย Massachusetts Institute of Technology (MIT) เพื่อใช้แทนคำว่า โปรตีนจุลินทรีย์ (microbial protein) และคำว่าปิโตรโปรตีน (petroprotein) โปรตีนเซลล์เดียวเป็นโปรตีนที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ หรือโปรตีนที่ได้จากการสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ ไม่ว่าจะเป็นสาหร่าย (algae) แบคทีเรีย (bacteria) รา (fungi) และยีสต์ (yeast) (Srividya et al., 2013) แม้ว่าการนำจุลินทรีย์มาเป็นอาหารในมนุษย์จะไม่ยอมรับสำหรับบุคคลบางกลุ่ม แต่ก็มีความคิดการนำจุลินทรีย์มาบริโภคในคนและสัตว์ถือว่าจะเป็นประโยชน์ในอนาคต หรือในบางพื้นที่ได้ เช่น ปัญหาการขาดแคลนอาหารโปรตีนจากเนื้อสัตว์ ใช้เป็นแหล่งอาหารสัตว์ เป็นต้น นอกจากนี้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อจุลินทรีย์ยังช่วยในการแก้ปัญหามลภาวะ และเป็นการใช้ประโยชน์ของวัสดุเหล่านั้นอีกด้วย

จุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ในอาหารราคาถูกและหาได้ง่าย
2. เจริญเติบโตในอาหารที่มีส่วนประกอบต่างๆ
3. เป็นเชื้อที่มีความคงทนทางคุณลักษณะทางพันธุกรรมที่ดี ไม่กลายพันธุ์ง่าย
4. ทนต่อการปนเปื้อนต่อจุลินทรีย์อื่นได้
5. ทราบคุณสมบัติทางพันธุกรรม และสรีรวิทยา
6. ผลิตวัสดุเศษเหลือ (by product) น้อยหรือไม่มีเลย
7. แยกและเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่าย
8. ให้ปริมาณโปรตีนสูง
9. ไม่เป็นพิษและทำให้เกิดอาการภูมิแพ้
10. เก็บรักษาได้ง่าย

ถึงแม้ว่าการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวสามารถใช้จุลินทรีย์ได้หลายชนิด แต่ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวมากที่สุด สายพันธุ์ที่นิยมนำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ได้แก่ *Candida*, *Hansenula*, *Pichai*, *Torulopsis* และ *Saccharomyces* เป็นต้น (Suman et al., 2015) สาเหตุเนื่องจาก

1. ง่ายต่อการเก็บเกี่ยว เนื่องจากยีสต์มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย
2. ให้ปริมาณกรดมาลิก (malic acid) ในระดับที่สูง
3. ให้กรดอะมิโนไลซีน (lysine) และทรีโอนีน (threonine) สูง
4. สามารถเจริญในสภาวะที่เป็นกรดได้
5. มีประวัติที่ยาวนานในการนำมาใช้ประโยชน์

อย่างไรก็ตามก็ยังมีข้อเสีย เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อแบคทีเรีย คือ

1. อัตราการเจริญต่ำกว่าเชื้อแบคทีเรีย
2. ปริมาณโปรตีนที่ได้น้อยกว่าแบคทีเรีย
3. ปริมาณเมไทโอนีน (methionine) น้อยกว่าแบคทีเรีย

ตารางที่ 2-3 องค์ประกอบทางเคมีของจุลินทรีย์ของโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อจุลินทรีย์

องค์ประกอบ	เชื้อรา	สาหร่าย	ยีสต์	แบคทีเรีย
โปรตีน (Protein)	30-45	40-50	45-55	50-55
ไขมัน (Fat)	2-5	7-20	2-6	1-3
เถ้า (Ash)	9-14	8-10	5-10	3-7
กรดอะมิโน (Nucleic acid)	7-10	3-8	6-12	8-12

ที่มา: Nasser et al. (2011)

ดังนั้นในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว จึงจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. ราคาของวัตถุดิบที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ แม้ว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญในอาหารที่หลากหลาย แต่การใช้วัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมและทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งอาหารในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว นอกจากจะเป็นการลดต้นทุนแล้ว ยังเป็นการลดมลพิษได้อีกด้วย
2. ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ต้องใช้จุลินทรีย์ที่มีอัตราการเจริญที่เร็ว และให้ผลผลิตสูง โดยปกติแบคทีเรียจะมีอัตราการเจริญประมาณ 0.3 - 0.2 ชั่วโมง ยีสต์มีอัตราการเจริญประมาณ 1.0 - 3.0 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อราจะมีอัตราการเจริญประมาณ 4.0 - 12.0 ชั่วโมง
3. ประหยัดเนื้อที่ในการผลิต การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตโปรตีนเซลล์จะใช้พื้นที่ในการผลิตน้อยกว่าการผลิตโปรตีนจากพืชหรือสัตว์ เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน
4. ให้ปริมาณโปรตีนสูง และมีกรดอะมิโนจำเป็น
5. ปลอดภัยต่อผู้บริโภค
6. อื่นๆ เช่น การใช้เทคโนโลยีการผลิตที่เหมาะสม ความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์ รวมถึงการใช้พลังงานและวิธีในการผลิต เป็นต้น

ตารางที่ 2-4 จุลินทรีย์และซับสเตรตที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

จุลินทรีย์	ซับสเตรต (substrate)
แบคทีเรีย <i>Aeromonas hydrophilla</i> <i>Aeromonas delvacuate</i> <i>Acinetobacter calcoaenticus</i> <i>Baccillus megaterium</i> <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Cellulomonas</i> sp. , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Thermomonospora fusca</i> <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Methylomonas methylotrophus</i> , <i>M. clara</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	Lactose n-Alkanes Ethanol Non-protein nitrogenous compound Cellulose, Hemicellulose Glucose, Amylose, Maltose Methanol Uric acid and other non- protein nitrogenous compound Glucose
Fungi <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Cephalosporium</i> <i>eichhorniae</i> , <i>Chaetomiun cellulolyticum</i> <i>Penecillium cyclopium</i> <i>Rhizopus chinesis</i> <i>Scytalidium acidophilium</i> , <i>Thricoderma</i> <i>viridae</i> , <i>Thricoderma alba</i>	Maltose, Glucose Cellulose, Hemicellulose Glucose, Lactose, Galactose Glucose, Maltose Cellulose, Pentose
Yeast <i>Amoco torula</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida utilis</i> <i>Candida novellas</i> <i>Candida intermedia</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ethanol Maltose, Glucose Glucose n-alkanes Lactose Lactose, Pentose, Maltose
Algae <i>Chlorella pyreniodosa</i> , <i>Chlorella sorokiana</i> , <i>Chondrus crispus</i> , <i>Scenedesmus</i> sp. <i>Spirulina</i> sp., <i>Porphyrium</i> sp.	Carbone dioxide through photosynthesis

ที่มา: Nasser et al. (2011)

ตารางที่ 2-5 ปริมาณโปรตีนของเชื้อจุลินทรีย์ในซบเสตเฉพาะที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

Organism	Substrate	Protein content (%)
<i>Aspergillus flavus</i>	Rice bran	10
<i>Aspergillus niger</i>	Apple pomace	17-20
	Banana wastes	18
	Rice bran	11
	Stickwater	49
	Potato starch processing waste	38
	Waste liquor	50
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Rice bran	10
<i>Aspergillus oryzae</i>	Rice bran (deoiled)	24
<i>Candida crusei</i>	Cheese whey	48
<i>Candida tropicalis</i>	Molasses	56
	Bagasse	31
<i>Candida utilis</i>	Poultry litter;	29
	Waste capsicum powder	48
	Potato starch industry waste	46
<i>Chrysonilia sitophilia</i>	Lignin	39
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Rice bran	10
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Brewery's spent grains hemicellulosic hydrolysate	32
	Rice bran	10
<i>Fusarium semitectum and sp1 and sp2</i>	Rice bran	10
<i>Fusarium venenatum</i>	Glucose (Product:Quorn™)	44
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Spoiled date palm fruits	49
<i>Kefir sp.</i>	Cheese whey	54
	Orange pulp, molasses, brewer's spent grain, whey, potato pulp, malt spent rootlets	24-39
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Cheese whey	43
	Orange pulp, molasses, brewer's spent grain, whey, potato pulp	59
<i>Monascus ruber</i>	Rice bran	10
Unspecified, marine yeast	Prawn shell wastes	61-70
<i>Penicillium citrinum</i>	Rice bran	10
<i>Pleurotus florida</i>	Wheat straw	63
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Orange pulp, molasses, brewer's spent grain	24
<i>Trichoderma harzianum</i>	Cheese whey filtrate	34
<i>Trichoderma virideae</i>	Citrus pulp	32
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Inulin, crude oil, glycerol waste	48-54
	hydrocarbons	

ที่มา:Ritala et al. (2017),

แม้ว่าการศึกษาดั้งเดิมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำเสียโรงงานแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นการทดลองแบบทีละปัจจัย (One factor at a time) โดยศึกษาปัจจัยที่สนใจ (Factor) แล้วกำหนดให้ปัจจัยอื่นๆ คงที่ และเมื่อได้ค่าผลการทดลองที่ดีที่สุดแล้วจึงเปลี่ยนระดับของปัจจัยที่ศึกษาและเมื่อให้ผลการทดลองที่ดีที่สุดแล้ว จึงเปลี่ยนไปศึกษาปัจจัยตัวที่สอง และทำอย่างนี้ไปเรื่อยๆ จนครบปัจจัยที่ต้องการศึกษา ซึ่งวิธีการทดลองนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ เนื่องจากมีข้อดี คือ ขั้นตอนการทดลองไม่ยุ่งยาก แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อเสีย คือ ไม่สามารถทราบผลของปัจจัยที่มีร่วมกันได้ รวมทั้งใช้ระยะเวลานานหากทำการศึกษาหลายปัจจัย นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้จากวิธีดังกล่าวอาจให้ผลการทดลองได้ไม่ดีที่สุด (Box, 2006; Giesbrecht and Gumpertz, 2004)

มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี และคณะ (2556) ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเปลือกสับปรดด้วยการหมักร่วมกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยใช้แผนการทดลองแบบ 4x3 factorial แบบ CRD แบ่งเป็น 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัย A คือ ช่วงเวลาในการหมัก และปัจจัย B ชนิดของเชื้อที่ใช้ในการหมัก *S. cerevisiae* *B. subtilis* และเชื้อผสมระหว่างเชื้อทั้งสอง พบว่าการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* กับ *B. subtilis* จะให้ค่าโปรตีนสูงกว่าเชื้อแบบเดี่ยว และระยะเวลาการหมักที่ 30 วัน จะให้ค่าโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 10.8 เปอร์เซ็นต์

ปิยทัศน์ พุ่มทองตรู (2535) ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากฟางข้าว พบว่าปริมาณโปรตีนของ *Cellulomonas* sp., *Cellulomonas* sp. ร่วมกับ *Alcaligenes faecalis*, *Trichoderma viride* และ *T. viride* ร่วมกับ *Candida utilis* เท่ากับ 26.37, 31.67, 13.08 และ 15.67 กรัมต่อ 100 กรัมโปรตีนเซลล์เดียว ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์โปรตีนของ *Cellulomonas* sp. ร่วมกับ *A. faecalis* และ *T. viride* ร่วมกับ *C. utilis* ที่ผ่านการสกัดโปรตีนเท่ากับ 32.56 และ 17.93 กรัมต่อ 100 กรัมโปรตีนเซลล์เดียว สำหรับปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายของผลผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากทุก การทดลองก็มีปริมาณใกล้เคียงมาตรฐานกรดอะมิโนที่ WHO อ้างอิง ยกเว้น cystine ที่มีปริมาณต่ำกว่า

การทดลองทางสถิติ (Experimental design) ซึ่งเป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยที่สนใจ โดยใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์มาประยุกต์ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่มีความครอบคลุม รวมทั้งลดระยะเวลา และทรัพยากรในการทดลอง เช่น การทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial) เป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ต้องการศึกษาได้ในเวลาเดียว นอกจากนี้ยังทราบผลของปัจจัยที่มีผลร่วมกัน (Interaction) (Box et al., 2005) แต่การทดลองแบบนี้จะมีชุดทดลองเป็น

จำนวนมากหากมีระดับของปัจจัยที่ต้องการศึกษาหลายระดับ ดังนั้นจึงนิยมทำการทดลองเพียงสองระดับเท่านั้น

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) เป็นการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของผลตอบสนอง ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์และสถิติในการวางแผนการทดลอง และมีการประยุกต์ใช้ RSM อย่างกว้างขวางในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์และด้านอุตสาหกรรม นอกจากนี้วิธี RSM มีแผนการทดลองที่นิยมใช้อยู่ 2 แผนการทดลอง คือ (i) แผนการทดลองแบบบ็อกซ์วิลสัน (Box-Wilson experimental design) และ (ii) แผนการทดลองแบบบ็อกซ์เบ็นเคน (Box-Behnken design) แต่ที่นิยมใช้คือแผนการทดลองแบบบ็อกซ์วิลสัน เนื่องจากการทดลองดังกล่าวสามารถแก้ปัญหาของการออกแบบ 3^n factorial designs ในการศึกษาปัจจัยที่มากกว่า 2 ตัวแปรเชิงปริมาณ และให้การทดลองที่ครอบคลุมกว่าแผนการทดลองแบบบ็อกซ์เบ็นเคน ซึ่งต้องทำการทดลองค่อนข้างมากในการออกแบบ 3^n factorial designs ดังนั้นเพื่อลดจำนวนของการทดลอง (Box and Wilson, 1951) ได้คิดค้นแผนการทดลองประกอบศูนย์กลาง (Central Composite Design, CCD) ซึ่งพัฒนาจากแผนการทดลองแบบแฟคเทอเรียลที่มีระดับปัจจัย 2 ระดับ (2^n factorial design) อย่างไรก็ตามแผนการทดลองแบบ CCD จึงเพิ่มระดับการทดลองแฟคเทอเรียลที่จุดศูนย์กลาง (Center) และแนวแกน (Axial) โดยแบ่งเป็น 5 ระดับ คือ ระดับต่ำสุด ($-\alpha$) ต่ำ (-1) กลาง (0) สูง (+1) และระดับสูงสุด ($+\alpha$) (Cochran and Cox, 1992) เพื่อสร้างรูปแบบความสัมพันธ์ที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้งหรือตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสองได้ และในการวางแผนการทดลอง CCD มีจำนวนการทดลองเท่ากับ $2^n + (2n + 6)$ สำหรับการทดลองที่มีปัจจัยหรือตัวแปรต้น 4 ตัวแปร ดังแสดงในตารางที่ 3 มีจำนวนการทดลองทั้งหมด 30 การทดลอง เปรียบเทียบกับ 3^n factorial designs มีจำนวนการทดลองทั้งหมด 81 การทดลอง สำหรับรหัสของปัจจัยหรือตัวแปรอิสระในการวางแผนการทดลองสามารถคำนวณจากสมการ

$$x_i = (X_i - X_{cp}) / \Delta X_i$$

x_i คือ รหัสที่ใช้ในการวางแผนการทดลองแบบ CCD

X_i คือ ค่าจริงของระดับปัจจัยในการทดลอง

X_{cp} คือ ค่าจริงของระดับกลางของปัจจัยในการทดลอง

ΔX_i คือ ผลต่างของระดับปัจจัย

นอกจากนี้วิธีการนี้ให้ความสำคัญกับความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นกับผลตอบสนอง ความสัมพันธ์ดังกล่าวแสดงเป็นสมการพหุนามกำลังสอง (Myers and Montgomery, 1995) ดังแสดงในสมการ คือ

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii}X_i^2 + \sum_{i,j=1}^4 \beta_{ij}X_iX_j$$

โดยที่ β_0 คือ ค่าคงที่

β_i คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรงโดย i คือ ลำดับของตัวแปร

β_{ii} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นโค้งโดย i คือ ลำดับของตัวแปร

β_{ij} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่มีผลร่วมกันโดย i และ j คือ ลำดับของตัวแปร

คำนวณผลความคลาดเคลื่อนผลรวมของกำลังสอง (Sum square) ความเบี่ยงเบนความคลาดเคลื่อนของผลรวมกำลังสอง (Mean square) และความมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value) โดยใช้ ANOVA ผลรวมกำลังสองทั้งหมดคำนวณได้จากสมการ (Sum Square total, SSto)

$$SSto = \sum y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{N}, (Df = N-1)$$

Y_i คือ ผลการตอบสนองที่ได้แต่ละชุดการทดลอง

N คือ จำนวนการทดลองทั้งหมด

ผลรวมกำลังสองของเชิงเส้นตรง (Sum square regression linear, SSrl) เชิงเส้นโค้ง (Sum square regression quadratic, SSrq) และผลรวมกัน (Sum square regression interaction, Ssri) ของรูปแบบความสัมพันธ์ลำดับที่สอง คำนวณได้ดังนี้

ตารางที่ 2-6 แผนการทดลองประกอบศูนย์กลาง (Central Composite Design, CCD) ของตัวแปรอิสระ (Independent variables)

Run	Independent variables			
	A	B	C	D
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	-2	0	0	0
18	+2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	+2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	+2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	+2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0

ที่มา: (Song et al., 2007)

$$SSrl = \sum_{i=1}^n b_i g_i \quad (Df = n)$$

b_i คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรง โดย i คือ ลำดับของตัวแปร

g คือ ผลรวมของค่าตอบสนองคูณกับเมตริก X' ในเทอมของเชิงเส้นตรงโดย i
คือ ลำดับของตัวแปร

n คือ จำนวนปัจจัย

$$SSrq = \sum_{i=1}^n b_{ii} g_i^2 \quad (Df = n)$$

b_{ii} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นโค้ง โดย i คือ ลำดับของตัวแปร

g_i คือ ผลรวมของค่าตอบสนองคูณกับเมตริก X' ในเทอมของเชิงเส้นโค้งโดย i
คือ ลำดับของตัวแปร

n คือ จำนวนปัจจัยหรือตัวแปรในการศึกษา

$$SSri = \sum_{i,j=1}^n b_{ij} g_i g_j \quad (Df = m \frac{(m-1)}{2})$$

b_{ij} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่มีผลร่วมกัน โดย i และ j คือ ลำดับของตัวแปร

$g_i g_j$ คือ ผลรวมของค่าตอบสนองคูณกับเมตริก X' ในเทอมที่มีผลร่วมกัน โดย i
คือ ลำดับของตัวแปร

m คือ จำนวนตัวแปรที่มีผลร่วมกัน

ผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย (Sum Square regression, SSr) คำนวณได้จาก

$$SSr = SSrl + SSrq + SSri \quad (Df = n \frac{(n+3)}{2})$$

ผลรวมความคลาดเคลื่อนกำลังสองของการทดลอง (Sum Square error, SSe) คำนวณได้

$$\text{จาก } SSe = SSto - SSr \quad (Df = N \frac{(n+3)}{2})$$

คำนวณความเบี่ยงเบนกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย (Mean square regression,

$$MSr) \text{ คำนวณได้จาก } MSr = \frac{SSr}{Df_{SSr}}$$

SSr คือ ผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย

Df_{SSr} คือ องศาอิสระของผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย

ความแตกต่างมีนัยสำคัญ (p-value) ของสมการพหุนามกำลังสองหรือรูปแบบสมการถดถอย คำนวณได้จากสมการ

$$F = \frac{MSr}{MSe}$$

ผลจากการคำนวณความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสมการพหุนามกำลังสองโดยสมการข้างต้นสามารถคำนวณค่า F-value เพื่อหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเทียบค่าที่ได้จากการคำนวณโดยสมการกับค่าที่ได้จากตารางแจกแจง F ซึ่งกำหนดค่าองศาอิสระ (Degree of freedom) เท่ากับจำนวนองศาอิสระของผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย (Df₁) และจำนวนองศาอิสระของผลรวมกำลังสองของความคลาดเคลื่อนกำลังสอง (Df₂) (ไพโรโรจน์ วิริยารีย์, 2544) โดยกำหนดให้ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ดังนั้นหากค่า F-value ที่ได้จากการคำนวณมากกว่าค่า F-value จากตาราง F แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าตอบสนอง (Y) และปัจจัยหรือตัวแปรที่ศึกษาสามารถอธิบายด้วยความสัมพันธ์ลำดับที่สอง (Quadratic model)

Jalasutram และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อ *Candida utilis* จากวัสดุรองพื้นในฟาร์มเลี้ยงไก่ที่ผ่านการย่อย (digested poultry litter, DPL) และไม่ผ่านการย่อย (undigested poultry litter, UPL) โดยการมีการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพินผิวตอบสนอง โดยมีปัจจัยการศึกษา ได้แก่ ปริมาณของ UPL ปริมาณของยีสต์สกัด (yeast extract) และพีเอช พบว่าปริมาณการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อ *C. Utilis* เพิ่มขึ้น 29 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ปริมาณของ UPL ปริมาณของยีสต์สกัด (yeast extract) และพีเอช เท่ากับ 5.6 เปอร์เซ็นต์ 2.3 เปอร์เซ็นต์ และพีเอช 7.0 ตามลำดับ

Rachamontree และคณะ (2015) ใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีพินผิวตอบสนอง ในการศึกษาผลของปริมาณแหล่งคาร์บอน ปริมาณแหล่งไนโตรเจน และระยะเวลาบ่มต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อ *Pichia kudriavzevii* MSY-2 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อ *P. kudriavzevii* MSY-2 ประกอบด้วยปริมาณของแหล่งคาร์บอน 24.77 กรัมต่อลิตร ปริมาณแหล่งไนโตรเจน 72.97 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 47.47 ชั่วโมง จะได้ปริมาณของโปรตีนสูงสุด 3.77 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยปริมาณโปรตีน 66.8 กรัมต่อ 100 กรัมเซลล์แห้ง

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ประโยชน์จากน้ำเสียโรงงานแป้งมันสำปะหลังในการผลิตโปรตีน เซลล์เดียว เพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจในเชิงพาณิชย์ และเพื่อช่วยแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อม

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ

1. ตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง

ตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังได้รับการอนุเคราะห์จาก บริษัท เอี่ยมบุรพา จำกัด

2. เชื้อยีสต์

เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เป็นเชื้อยีสต์ที่สั่งซื้อจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ได้แก่

- 1.1 *Saccharomycopsis fibuligera* (*S. fibuligera*) TISTR5033
- 1.2 *Trichosporon cutaneum* (*T. cutaneum*) TISTR5040
- 1.3 *Candida famata* (*C. famata*) TISTR5098
- 1.4 *Pichia farinose* (*P. farinose*) TISTR5105
- 1.5 *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) TISTR5136
- 1.6 *Schwanniomyces alluvius* (*S. alluvius*) TISTR5164
- 1.7 *Candida utilis* (*C. utilis*) TISTR5352

3. วัสดุ

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และสารเคมี

- Yeast Malt extract medium (YM) เตรียมดั่งภาคผนวก ก
- Yeast extract-Peptone- Cassava medium (YPC medium) เตรียมดั่งภาคผนวก
- PDB medium ยี่ห้อ HiMedia บริษัท HiMedia Laboratory Pvt. Ltd., India

3.2 สารเคมี

- สารละลายไอโอดีน (Lugal's iodine)
- No. 0.5 Mcfarland Standard ยี่ห้อ HiMedia บริษัท HiMedia Laboratory Pvt. Ltd., India

4. อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งแบบดิจิตอล ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Ohaus, รุ่น ARB120, USA)
2. เครื่องชั่งแบบดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (METTLER TOLEDO, รุ่น S220, Switzerland)
4. ตู้บ่มเชื้อ (BINDER GmbH, รุ่น RL11-21896, Germany)
5. อ่างน้ำร้อน (WB 29, Memmert, Korea)
6. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (TOMMY, รุ่น Green-INSX700, Japan)

7. ตู้ชีวนิรภัย (Biological Safety Cabinet) (Class II Type A2) (JSR, รุ่น JSCB-1200SB, Korea)
8. เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อยีสต์

นำเชื้อยีสต์ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. fibuligera* TISTR5033, *T. cutaneum* TISTR5040, *C. famata* TISTR5098, *P. farinose* TISTR5105, *C. tropicalis* TISTR5136, *S. alluvius* TISTR5164 และ *C. utilis* TISTR5352 ที่ได้ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) มาเลี้ยงลงในอาหาร YM broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเย้าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 - 72 ชั่วโมง นำไปแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ streak ลงบนอาหาร YM agar ที่ คัดเลือกโคโลนีเดียว แล้วนำไปทดสอบสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของยีสต์ โดยการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิคการเตรียมสไลด์สด (wet mount) นำโคโลนีที่คัดเลือกได้มาเก็บเชื้อไว้ในอาหาร YM broth ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร (% v/v) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทำการทดลอง

2. การศึกษาลักษณะบางประการของยีสต์

2.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ยีสต์ในอาหารเหลว

นำเชื้อยีสต์ที่ได้มาเลี้ยงลงในอาหาร YM broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 - 72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญในอาหารเหลว และนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิคการเตรียมสไลด์สด (wet mount)

2.2 การศึกษาคคุณสมบัติในการย่อยแป้งมันสำปะหลังในอาหาร YPC agar

นำเชื้อยีสต์ที่ได้มาเลี้ยงลงบนอาหาร YPC agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 - 72 ชั่วโมง แล้วรดด้วยสารละลายไอโอดีน (Lugal's iodine) ที่ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วทดสอบการละลายไอโอดีนออก สังเกตบริเวณวงใสที่เกิดขึ้น แล้วมาหาประสิทธิภาพของการย่อยแป้งจาก อัตราส่วนของบริเวณวงใสต่อขนาดของโคโลนี

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง

การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังจาก บริษัท เอี่ยมบุรพา จำกัด จำนวน 3 แหล่ง ได้แก่ บ่อน้ำทิ้งรวม น้ำทิ้งก่อนเข้าระบบ UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) และน้ำทิ้งหลังระบบ UASB เป็นต้น จากนั้นนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของน้ำทิ้งของโรงงานแป้งมันสำปะหลัง เช่น ค่าพีเอช ค่าซีโอดี (COD) ค่าบีโอดี (BOD) ปริมาณคาร์บอนทั้งหมด ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณแป้ง เป็นต้น

- 1) อุณหภูมิ โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์

- 2) ค่าพีเอช (pH) โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 3) ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solids; TSS) โดยวิธีอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส
- 4) (Total Dissolved Solids; TDS) โดยวิธีอบแห้งที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส
- 5) ค่าบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand; BOD) โดยวิธีการ 5 Day BOD test
- 6) ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand; COD) โดยวิธีการ APHA, AWWA & WEF, 23nd ed 2017, Part 5220-D
- 7) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total Kjeldahl Nitrogen) โดยวิธีการ APHA, AWWA & WEF, 23nd ed 2017, Part 4500-N

4. การศึกษาหาสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

4.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อยีสต์ที่เก็บในกลีเซอรอลที่ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในอาหาร PDB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อได้ที่ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หรือ 1 % v/v ลงในอาหาร PDB broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง ทำซ้ำประมาณ 1-2 ครั้ง นำเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโดยปริมาตร (0.85% w/v NaCl) ประมาณ 2-3 ครั้ง แล้วจึงละลายตะกอนเซลล์กลับในสารละลาย 0.85% w/v NaCl ในปริมาตรเท่าเดิม จากนั้นนำมาปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 0.5 Mcfarland standard โดยใช้สารละลาย 0.85% w/v NaCl แล้วนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการศึกษาต่อไป

4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

นำเชื้อยีสต์ที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ *S. fibuligera* TISTR5033, *C. famata* TISTR5098 และ *P. farinose* TISTR5105 เป็นต้น มาเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นตามวิธีการในข้อ 4.1 จากนั้นนำหัวเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้มาเลี้ยงในตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานแปงมันสำปะหลังจาก จำนวน 3 แหล่ง ได้แก่ บ่อน้ำทิ้งรวม (Combined wastewater) น้ำทิ้งก่อนเข้าระบบ UASB (Before UASB) และน้ำทิ้งหลังระบบ UASB (After UASB) เป็นต้น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน แล้วนำไปวิเคราะห์หาการเจริญของเซลล์โดยการวัดค่าการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโปรตีน และค่าพีเอช คำนวณหาค่าร้อยละผลผลิตจำเพาะ (Specific product yield, Y_{p/x}) จากสมการข้างต้น จากนั้นคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่คุณสมบัติการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้ดีที่สุด

$$Y_{P/X} (\%) = \frac{\text{ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)}} \times 100$$

5. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยการวางแผนการทดลองแบบ Response surface methodology (RSM) โดยใช้เทคนิค Central Composite Design (CCD)

สำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อยีสต์ *P. farinose* TISTR5105 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรงมันสำปะหลัง (บ่อน้ำทิ้งรวม) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยการวางแผนการทดลองแบบ Response surface methodology (RSM) โดยใช้เทคนิค Central Composite Design (CCD) ซึ่งมีก็กำหนดค่าสูงสุดและต่ำสุดเป็น 5 ระดับ ได้แก่ -1.68, -1, 0, +1 และ +1.68 จากนั้นนำไปบ่มเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาการเจริญของเซลล์โดยการวัดค่าการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโปรตีน พีเอช และคำนวณหาค่าร้อยละผลผลิตจำเพาะ ($Y_{p/x}$)

ตารางที่ 3-1 ตัวแปรชนิดต่างๆ ที่เลือกใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อยีสต์ *P. farinose* TISTR5105

Variables	Symbol	Unit	ระดับ (Level)				
			-1.68	-1	0	+1	+1.68
อุณหภูมิ	X_1	°C	26.6	30.0	35.0	40.0	43.4
พีเอช	X_2	-	2.98	4.00	5.50	7.00	8.02
หัวเชื้อเริ่มต้น	X_3	%	0.6	3.0	6.5	10.0	12.4

ตารางที่ 3-2 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อยีสต์ *P. farinose* TISTR5105 จากแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

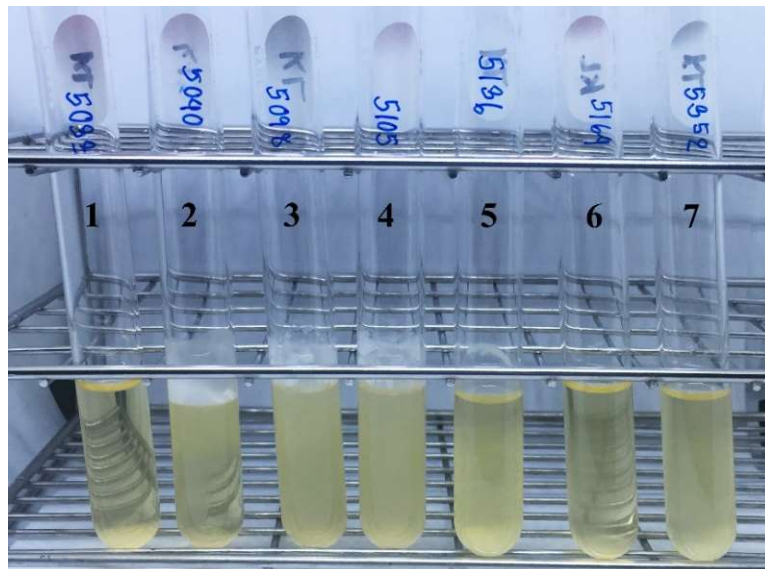
Run	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1.68	0	0
10	1.68	0	0
11	0	-1.68	0
12	0	1.68	0
13	0	0	-1.68
14	0	0	1.68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

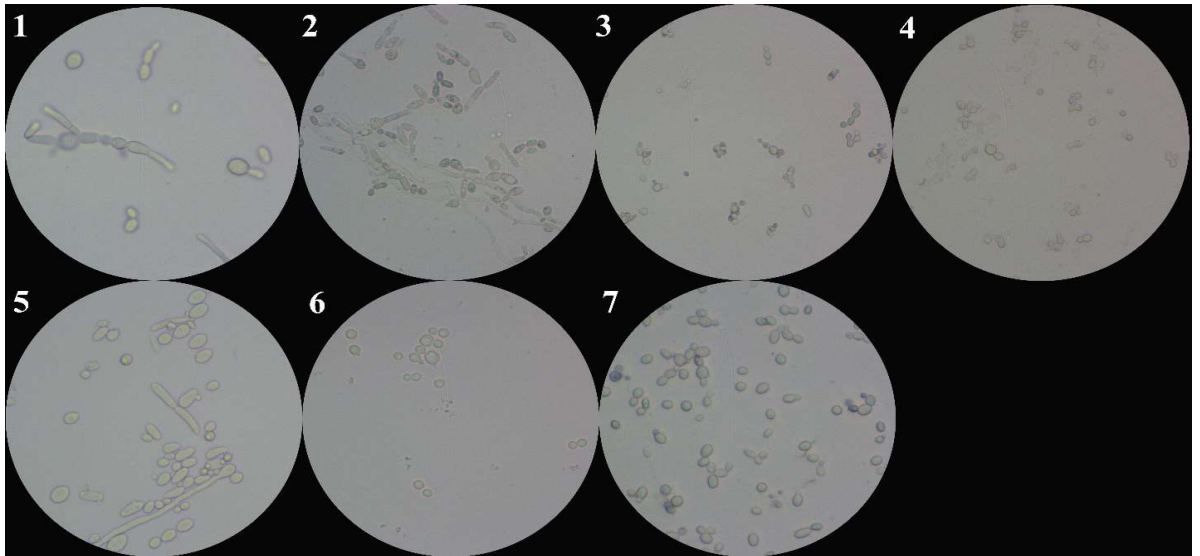
1. การศึกษาลักษณะบางประการของยีสต์

1.1. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ยีสต์ในอาหารเหลว

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเซลล์ยีสต์ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว YM broth ที่ป่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 - 72 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4-1 และ 4-2 พบว่า *S. fibuligera* TISTR5033 มีรูปร่างไข่จนถึงยาว การแตกหน่อเป็นแบบรอบเซลล์ (multilateral budding) มีลักษณะเส้นใยเทียม การเจริญในอาหารเหลว ไม่สร้างฝ้า มีการเกาะกันเป็นเม็ดกลม *T. cutaneum* TISTR5040 มีรูปร่างกลม รี จนถึงทรงกระบอก การแตกหน่อเป็นแบบรอบเซลล์ (multilateral budding) การเจริญในอาหารเหลว สร้างฝ้า *C. famata* TISTR5098 มีรูปร่างกลมจนถึงรูปไข่ การแตกหน่อเป็นแบบรอบเซลล์ (multilateral budding) การเจริญในอาหารเหลว สร้างฝ้า *P. farinosa* TISTR5105 มีรูปร่างกลมจนถึงรูปไข่ การแตกหน่อเป็นแบบรอบเซลล์ (multilateral budding) การเจริญในอาหารเหลว สร้างฝ้า *C. tropicalis* TISTR5136 มีรูปร่างกลม รี จนถึงทรงกระบอก การแตกหน่อเป็นแบบรอบเซลล์ (multilateral budding) การเจริญในอาหารเหลว สร้างฝ้าเล็กน้อย *S. alluvius* TISTR5164 TISTR5352 มีรูปร่างกลมจนถึงรูปไข่ การแตกหน่อเป็นแบบรอบเซลล์ (multilateral budding) การเจริญในอาหารเหลว ไม่สร้างฝ้า *C. utilis* TISTR5352 มีรูปร่างกลมจนถึงรูปไข่ การแตกหน่อเป็นแบบรอบเซลล์ (multilateral budding) การเจริญในอาหารเหลว ไม่สร้างฝ้า



ภาพที่ 4-1 การเจริญของเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YM broth



ภาพที่ 4-2 ลักษณะของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

หมายเหตุ	1	คือ	เชื้อ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> TISTR5033
	2	คือ	เชื้อ <i>Trichosporon cutaneum</i> TISTR5040
	3	คือ	เชื้อ <i>Candida famata</i> TISTR5098
	4	คือ	เชื้อ <i>Pichia farinosa</i> TISTR5105
	5	คือ	เชื้อ <i>Candida tropicalis</i> TISTR5136
	6	คือ	เชื้อ <i>Schwanniomyces alluvius</i> TISTR5164
	7	คือ	เชื้อ <i>Candida utilis</i> TISTR5352

1.2. การศึกษาคุณสมบัติในการย่อยแป้งมันสำปะหลังในอาหาร YPC agar

การศึกษาคูณสมบัติในการย่อยแป้งของเซลล์ยีสต์ในอาหารเหลว YM agar ซึ่งมีแป้งมันสำปะหลัง 3 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 - 72 ชั่วโมง และทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังบนอาหารแข็ง คือ การเกิดวงใส (clear zone) เมื่อหยดด้วยสารละลายไอโอดีนลงบนอาหาร YPC agar แสดงดังภาพที่ 4-3 พบว่าเชื้อ *T. cutaneum* TISTR5040, *C. famata* TISTR5098 และ *S. fibuligera* TISTR5033 สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้



ภาพที่ 4-3 การย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อยีสต์บนอาหาร YPC agar

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาระดับความปลอดภัยทางชีวภาพของเชื้อยีสต์ ดังแสดงในตารางที่ 4-1 พบว่าเชื้อทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. fibuligera*, *C. famata*, *P. farinosa*, *C. tropicalis*, *S. alluvius* และ *C. utilis* จัดอยู่ในระดับความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 1 (Biosafety-Level 1) เป็นเชื้อในกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อผู้ปฏิบัติงานและชุมชนระดับต่ำ เชื้อที่ไม่ก่อโรคในมนุษย์หรือให้เกิดอันตรายต่อบุคลากรที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการและสิ่งแวดล้อมน้อยมาก แต่พบว่าเชื้อ *Trichosporon cutaneum* จัดอยู่ในระดับความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 2 (Biosafety-Level 2) กล่าวคือเป็นเชื้อในกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อผู้ปฏิบัติงานระดับกลางและระดับความเสี่ยงต่อชุมชนระดับต่ำ เชื้อในกลุ่มนี้ไม่ก่อให้เกิดโรครุนแรงในมนุษย์ หรือติดต่อทางอากาศได้ ยาก ดังนั้นในการศึกษาต่อไป จึงเลือกเชื้อ *S. fibuligera* TISTR5033, *C. famata* TISTR5098, *P. farinosa* TISTR5105, *C. tropicalis* TISTR5136, *S. alluvius* TISTR5164 และ *C. utilis* TISTR5352 ในการทำการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4-1 ระดับความปลอดภัยทางชีวภาพของเชื้อยีสต์

เชื้อยีสต์	TISTR	การประยุกต์ใช้*	แหล่งที่แยก*	ระดับความปลอดภัยทางชีวภาพ (Biosafety Level; BSL)**
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	5033	การผลิตเอนไซม์อะไมเลส (amylase production)	ไวน์ข้าว	BSL1
<i>Trichosporon cutaneum</i>	5040	การผลิตเอนไซม์อะไมเลส	-	BSL2
<i>Candida famata</i>	5098	การผลิตเอนไซม์อะไมเลส	ข้าวหมาก	BSL1
<i>Pichia farinosa</i>	5105	การผลิตโปรตีนเซลล์เดียว	น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตมันสำปะหลัง	BSL1
<i>Candida tropicalis</i>	5136	การผลิตโปรตีนเซลล์เดียว	-	BSL1
<i>Schwanniomyces alluvius</i>	5164	-	-	BSL1
<i>Candida utilis</i>	5352	-	นมควายหมัก	BSL1

* ข้อมูลมาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

** ข้อมูลมาจาก American Type Culture Collection (ATCC) โดยแบ่งระดับความปลอดภัยออกเป็น 4 ระดับ คือ

1. ความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 1 (Biosafety-Level 1; BSL1) เป็นการทำงานกับเชื้อในกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อผู้ปฏิบัติงานและชุมชนระดับต่ำ เชื้อที่ไม่ก่อโรคในมนุษย์หรือให้เกิดอันตรายต่อบุคลากรที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการและสิ่งแวดล้อมน้อยมาก

2. ความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 2 (Biosafety-Level 2; BSL2) เป็นการทำงานกับเชื้อในกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อผู้ปฏิบัติงานระดับกลางและระดับความเสี่ยงต่อชุมชนระดับต่ำ เชื้อในกลุ่มนี้ไม่ก่อให้เกิดโรครุนแรงในมนุษย์ หรือติดต่อทางอากาศได้ยาก

3. ความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 3 (Biosafety-Level 3; BSL3) เป็นการทำงานกับเชื้อในกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อผู้ปฏิบัติงานระดับสูงและระดับความเสี่ยงต่อชุมชนระดับต่ำ เชื้อในกลุ่มนี้ เป็นเชื้อก่อโรคที่รุนแรงต่อมนุษย์และสัตว์ แต่เป็นโรคที่มีสามารถรักษาให้หาย

4. ความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 4 (Biosafety-Level 4; BSL4) เป็นการทำงานกับเชื้อในกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อผู้ปฏิบัติงานระดับสูงและระดับความเสี่ยงต่อชุมชนระดับสูง เชื้อในกลุ่มนี้เป็นเชื้อก่อโรคที่รุนแรงหรือทำให้คนหรือสัตว์ให้เสียชีวิตได้ โดยเมื่อติดเชืเหล่านี้ยังไม่มียวิธีการรักษา

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง

องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังที่ได้จากบริษัท เอี่ยมบุรพา จำกัด 3 แหล่ง ได้แก่ บ่อน้ำทิ้งรวม (Combined wastewater, CW) น้ำทิ้งก่อนเข้าระบบ UASB (Before UASB, B-UASB) และน้ำทิ้งหลังระบบ UASB (After UASB, A-UASB) แสดงในตารางที่ 4-2 โดยเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำทิ้งกับค่ามาตรฐานน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม ตามประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม พบว่าน้ำทิ้งที่ได้จากบ่อน้ำทิ้งรวม มีค่าปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด ปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมด ค่าบีโอดี ค่าซีโอดี และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด สูงกว่าน้ำทิ้งก่อนเข้าระบบ UASB และน้ำทิ้งหลังระบบ UASB

น้ำทิ้งจากบ่อน้ำทิ้งรวม (Combined wastewater, CW) มีอุณหภูมิ 37.8 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 5.38 ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solids; TSS) เท่ากับ 3,800 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolved Solids; TDS) เท่ากับ 13,418 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand; BOD) เท่ากับ 8,805 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand; COD) เท่ากับ 22,860 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจน (Total Kjeldahl Nitrogen; TKN) เท่ากับ 384 มิลลิกรัมต่อลิตร

น้ำทิ้งจากบ่อน้ำทิ้งก่อนเข้าระบบ UASB (Before UASB, B-UASB) มีอุณหภูมิ 39.3 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 3.34 ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solids; TSS) เท่ากับ 3,400 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolved Solids; TDS) เท่ากับ 7,421 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand; BOD) เท่ากับ 7,835 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand; COD) เท่ากับ 19,180 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจน (Total Kjeldahl Nitrogen; TKN) เท่ากับ 353 มิลลิกรัมต่อลิตร

น้ำทิ้งจากบ่อน้ำทิ้งหลังระบบ UASB (After UASB, A-UASB) มีอุณหภูมิ 38.9 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 6.15 ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solids; TSS) เท่ากับ 1,600 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolved Solids; TDS) เท่ากับ 1,373 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand; BOD) เท่ากับ 1,657 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand; COD) เท่ากับ 3,220 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจน (Total Kjeldahl Nitrogen; TKN) เท่ากับ 266 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4-2 คุณสมบัติของน้ำทิ้งจากโรงงานแปรงมันสำปะหลัง

พารามิเตอร์ (parameters)	หน่วย	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง*			มาตรฐาน***
		CW	B-UASB	A-UASB	
อุณหภูมิ	°C	37.8	39.3	38.9	ไม่เกิน 40
ค่าพีเอช (pH)		5.38	3.34	6.15	5.5-9.0
ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด** (Total Suspended Solids; TSS)	mg/L	3,800	3,400	1,600	ไม่เกิน 50
ของแข็งละลายน้ำทั้งหมด** (Total Dissolved Solids; TDS)	mg/L	13,418	7,421	1,373	ไม่เกิน 3,000
ค่าบีโอดี** (Biochemical Oxygen Demand; BOD)	mg/L	8,805	7,835	1,657	ไม่เกิน 20
ค่าซีโอดี** (Chemical Oxygen Demand; COD)	mg/L	22,860	19,180	3,220	ไม่เกิน 120
ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด** (Total Kjeldahl Nitrogen; TKN)	mg/L	384	353	266	ไม่เกิน 100

* CW คือ บ่อน้ำทิ้งรวม, B-UASB คือ น้ำทิ้งก่อนเข้าระบบ UASB และ A-UASB คือ น้ำทิ้งหลังระบบ UASB

** ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

*** ประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม นิคมอุตสาหกรรม และเขตประกอบการอุตสาหกรรม ลงวันที่ 29 มีนาคม พ.ศ. 2559

3. การศึกษาหาสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

การศึกษาหาสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแป่งมันสำปะหลัง โดยนำเชื้อยีสต์ ได้แก่ *S. fibuligera* TISTR5033, *C. famata* TISTR5098 และ *P. farinose* TISTR5105 มาเลี้ยงในตัวอย่างน้ำทิ้งโรงงานแป่งมันสำปะหลังจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ บ่อน้ำทิ้งรวม (Combined wastewater, CW) น้ำทิ้งก่อนเข้าระบบ UASB (Before UASB, B-UASB) และน้ำทิ้งหลังระบบ UASB (After UASB, A-UASB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน แล้วนำไปวิเคราะห์หาการเจริญของเซลล์โดยการวัดค่าการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโปรตีน และค่าพีเอช ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4-3, 4-4 และ 4-5 และภาพที่ 4-4, 4-5 และ 4-6 พบว่าเชื้อยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่สามารถเจริญในน้ำทิ้งจากบ่อน้ำทิ้งก่อนเข้าระบบ UASB (Before UASB, B-UASB) และบ่อน้ำทิ้งหลังระบบ UASB (After UASB, A-UASB) แต่สามารถเจริญได้ในน้ำทิ้งจากบ่อน้ำทิ้งรวม (Combined wastewater, CW)

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ กับน้ำทิ้งโรงงานแป่งมันสำปะหลังจากแหล่งต่างๆ ที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่าเชื้อ *S. fibuligera* TISTR5033 ให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุด ประมาณ 1.31 ± 0.19 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 3 วัน ในขณะที่เชื้อ *C. famata* TISTR5098 ให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุด ประมาณ 3.65 ± 0.08 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 4 วัน และเชื้อ *P. farinose* TISTR5105 ให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุด ประมาณ 3.10 ± 0.14 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 2 วัน

เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ กับน้ำทิ้งโรงงานแป่งมันสำปะหลังจากแหล่งต่างๆ ที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่าเชื้อ *S. fibuligera* TISTR5033 ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด ประมาณ 0.21 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 2 วัน ในขณะที่เชื้อ *C. famata* TISTR5098 ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด ประมาณ 0.50 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 4 วัน และเชื้อ *P. farinose* TISTR5105 ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด ประมาณ 0.51 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 3 วัน

เมื่อพิจารณาร้อยละผลผลิตจำเพาะ (Specific product yield, $Y_{p/x}$) ของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ กับน้ำทิ้งโรงงานแป่งมันสำปะหลังจากแหล่งต่างๆ ที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่าเชื้อ *S. fibuligera* TISTR5033 ให้ร้อยละผลผลิตจำเพาะสูงสุด ประมาณร้อยละ 20.32 ที่ระยะเวลา 2 วัน ในขณะที่เชื้อ *C. famata* TISTR5098 ให้ร้อยละผลผลิตจำเพาะสูงสุด ประมาณร้อยละ 19.23 ที่ระยะเวลา 2 วัน และเชื้อ *P. farinose* TISTR5105 ให้ร้อยละผลผลิตจำเพาะสูงสุด ประมาณร้อยละ 18.76 ที่ระยะเวลา 1 วัน

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์ ปริมาณโปรตีน และ ร้อยละผลผลิตจำเพาะ (Specific product yield, Y_p/x) ของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ กับน้ำทิ้งโรงงาน แป้งมันสำปะหลังจากแหล่งต่างๆ ที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่าเชื้อ *P. farinose* TISTR5105 เป็นสายพันธุ์ยีสต์ที่ดีที่สุด เนื่องจากให้ปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์ ปริมาณโปรตีน และร้อยละผลผลิตจำเพาะ (Specific product yield, Y_p/x) เหมาะสมที่สุด กล่าวคือการเลี้ยงเชื้อ *P. farinose* TISTR5105 ในน้ำทิ้งจากบ่อน้ำทิ้งรวม เป็นระยะเวลา 3 วัน จะได้ปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์ เท่ากับ 3.21 ± 0.07 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.51 ± 0.03 กรัมต่อลิตร และร้อยละผลผลิตจำเพาะ (Specific product yield, Y_p/x) เท่ากับร้อยละ 15.95

ตารางที่ 4-3 ปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์ (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ในน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังที่ระยะเวลาต่างๆ

ยีสต์	แหล่งน้ำทิ้ง*	ระยะเวลา (วัน)					
		0	1	2	3	4	5
<i>S. fibuligera</i>	CW	$0.93 \pm 0.08^{Ba**}$	0.95 ± 0.05^{Ba}	1.05 ± 0.03^{Bb}	1.31 ± 0.19^{Ac}	1.34 ± 0.00^{Ac}	1.37 ± 0.01^{Ac}
TISTR5033	B-UASB	1.02 ± 0.06^A	1.01 ± 0.01^A	1.01 ± 0.11^A	1.10 ± 0.28^A	1.00 ± 0.06^A	1.06 ± 0.07^A
	A-UASB	0.92 ± 0.09^A	0.86 ± 0.11^A	0.74 ± 0.08^A	0.75 ± 0.08^A	0.80 ± 0.11^A	0.86 ± 0.11^A
<i>C. famata</i>	CW	1.01 ± 0.25^{Ca}	0.94 ± 0.03^{Ca}	0.95 ± 0.17^{Cb}	2.51 ± 0.13^{Bb}	3.65 ± 0.08^{Aa}	3.93 ± 0.06^{Aa}
TISTR5098	B-UASB	1.16 ± 0.18^A	1.04 ± 0.04^A	1.04 ± 0.03^A	0.97 ± 0.13^A	1.00 ± 0.08^A	1.08 ± 0.06^A
	A-UASB	0.84 ± 0.02^A	0.88 ± 0.12^A	0.99 ± 0.11^A	0.88 ± 0.17^A	0.95 ± 0.18^A	0.98 ± 0.08^A
<i>P. farinose</i>	CW	0.81 ± 0.14^{Ba}	0.73 ± 0.06^{Bb}	3.10 ± 0.14^{Aa}	3.21 ± 0.07^{Aa}	3.18 ± 0.01^{Ab}	3.21 ± 0.01^{Ab}
TISTR5105	B-UASB	1.04 ± 0.09^A	0.96 ± 0.06^A	0.96 ± 0.04^A	0.97 ± 0.04^A	0.98 ± 0.06^A	1.03 ± 0.11^A
	A-UASB	0.86 ± 0.07^A	0.85 ± 0.04^A	0.72 ± 0.05^A	0.73 ± 0.04^A	0.79 ± 0.14^A	0.76 ± 0.06^A

* CW คือ บ่อน้ำทิ้งรวม, B-UASB คือ น้ำทิ้งก่อนเข้าระบบ UASB และ A-UASB คือ น้ำทิ้งหลังระบบ UASB

** ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p > 0.05$) และตัวอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4-4 ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรงมันสำปะหลังที่ระยะเวลาต่างๆ

ยีสต์	แหล่งน้ำทิ้ง*	ระยะเวลา (วัน)					
		0	1	2	3	4	5
<i>S. fibuligera</i>	CW	0.13±0.01 ^{Ba**}	0.13±0.00 ^{Bb}	0.21±0.03 ^{Ab}	0.23±0.00 ^{Ac}	0.24±0.02 ^{Ab}	0.25±0.03 ^{Ab}
	B-UASB	0.20±0.01 ^A	0.23±0.01 ^A	0.20±0.01 ^A	0.21±0.01 ^A	0.21±0.01 ^A	0.23±0.03 ^A
	TISTR5033 A-UASB	0.19±0.02 ^A	0.19±0.01 ^A	0.18±0.01 ^A	0.19±0.00 ^A	0.20±0.01 ^A	0.20±0.01 ^A
<i>C. famata</i>	CW	0.14±0.01 ^{Ca}	0.15±0.01 ^{Ca}	0.18±0.02 ^{Cb}	0.33±0.03 ^{Bb}	0.50±0.05 ^{Aa}	0.49±0.03 ^{Aa}
	TISTR5098 B-UASB	0.22±0.01 ^A	0.23±0.00 ^A	0.21±0.00 ^A	0.21±0.01 ^A	0.22±0.01 ^A	0.21±0.01 ^A
	A-UASB	0.19±0.00 ^A	0.19±0.01 ^A	0.21±0.01 ^A	0.19±0.01 ^A	0.20±0.00 ^A	0.19±0.02 ^A
<i>P. farinose</i>	CW	0.12±0.02 ^{Ca}	0.14±0.00 ^{Cb}	0.28±0.01 ^{Ba}	0.51±0.03 ^{Aa}	0.48±0.05 ^{Aa}	0.47±0.00 ^{Aa}
	TISTR5105 B-UASB	0.23±0.02 ^A	0.22±0.01 ^A	0.22±0.00 ^A	0.23±0.01 ^A	0.21±0.02 ^A	0.24±0.02 ^A
	A-UASB	0.18±0.01 ^A	0.17±0.00 ^A	0.17±0.01 ^A	0.16±0.00 ^A	0.18±0.00 ^A	0.18±0.00 ^A

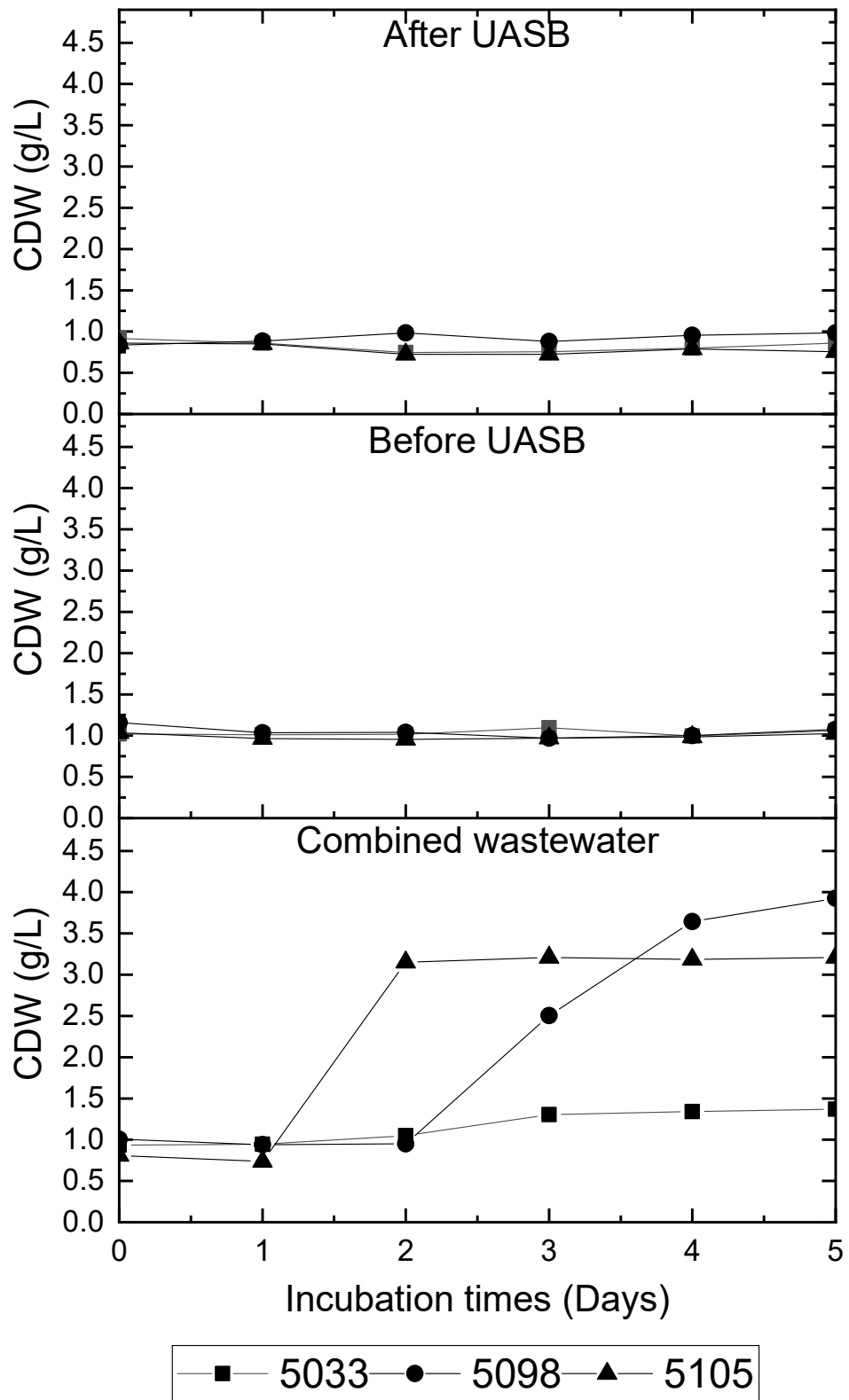
* CW คือ บ่อน้ำทิ้งรวม, B-UASB คือ น้ำทิ้งก่อนเข้าระบบ UASB และ A-UASB คือ น้ำทิ้งหลังระบบ UASB

** ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p>0.05$) และตัวอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p>0.05$)

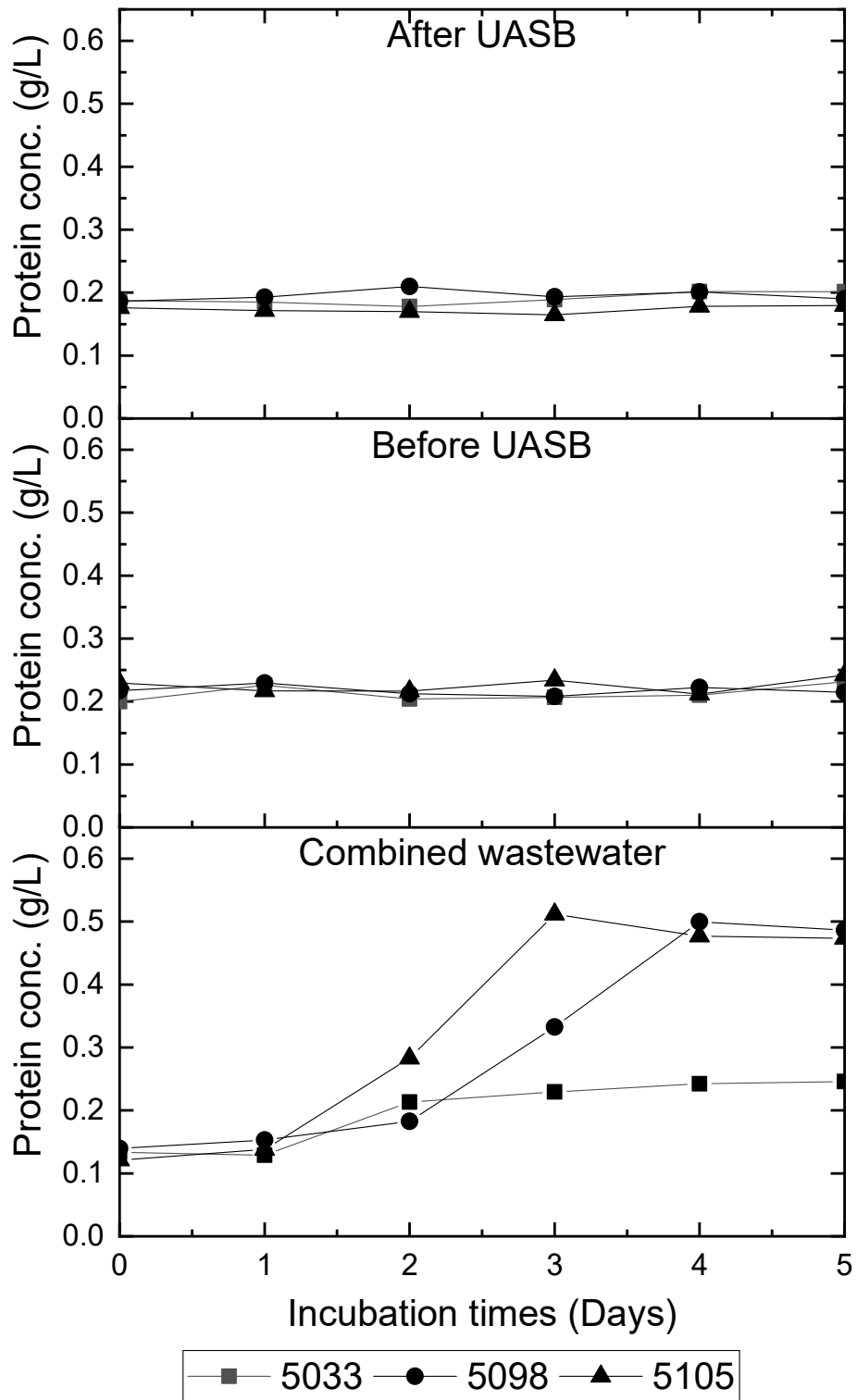
ตารางที่ 4-5 ร้อยละผลผลิตจำเพาะ (Specific product yield, $Y_{P/C}$) ของยีสต์ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรงมันสำปะหลัง (บ่อน้ำทิ้งรวม) ที่ระยะเวลาต่างๆ

ยีสต์	ข้อมูล*	ระยะเวลา (วัน)					
		0	1	2	3	4	5
<i>S. fibuligera</i>	P (g/L)	0.13±0.01	0.13±0.00	0.21±0.03	0.23±0.00	0.24±0.02	0.25±0.03
	C (g/L)	0.93±0.08	0.95±0.05	1.05±0.03	1.31±0.19	1.34±0.00	1.37±0.01
	$Y_{P/C}$ (%)	14.26	13.65	20.32	17.58	18.10	17.94
<i>C. famata</i>	P (g/L)	0.14±0.01	0.15±0.01	0.18±0.02	0.33±0.03	0.50±0.05 ^{Aa}	0.49±0.03
	C (g/L)	1.01±0.25	0.94±0.03	0.95±0.17	2.51±0.13	3.65±0.08 ^{aA}	3.93±0.06
	$Y_{P/C}$ (%)	13.89	16.29	19.23	13.27	13.71	12.39
<i>P. farinose</i>	P (g/L)	0.12±0.02	0.14±0.00	0.28±0.01	0.51±0.03	0.48±0.05	0.47±0.00
	C (g/L)	0.81±0.14	0.73±0.06	3.10±0.145	3.21±0.07	3.18±0.01	3.21±0.01
	$Y_{P/C}$ (%)	14.97	18.76	8.98	15.95	14.97	14.75

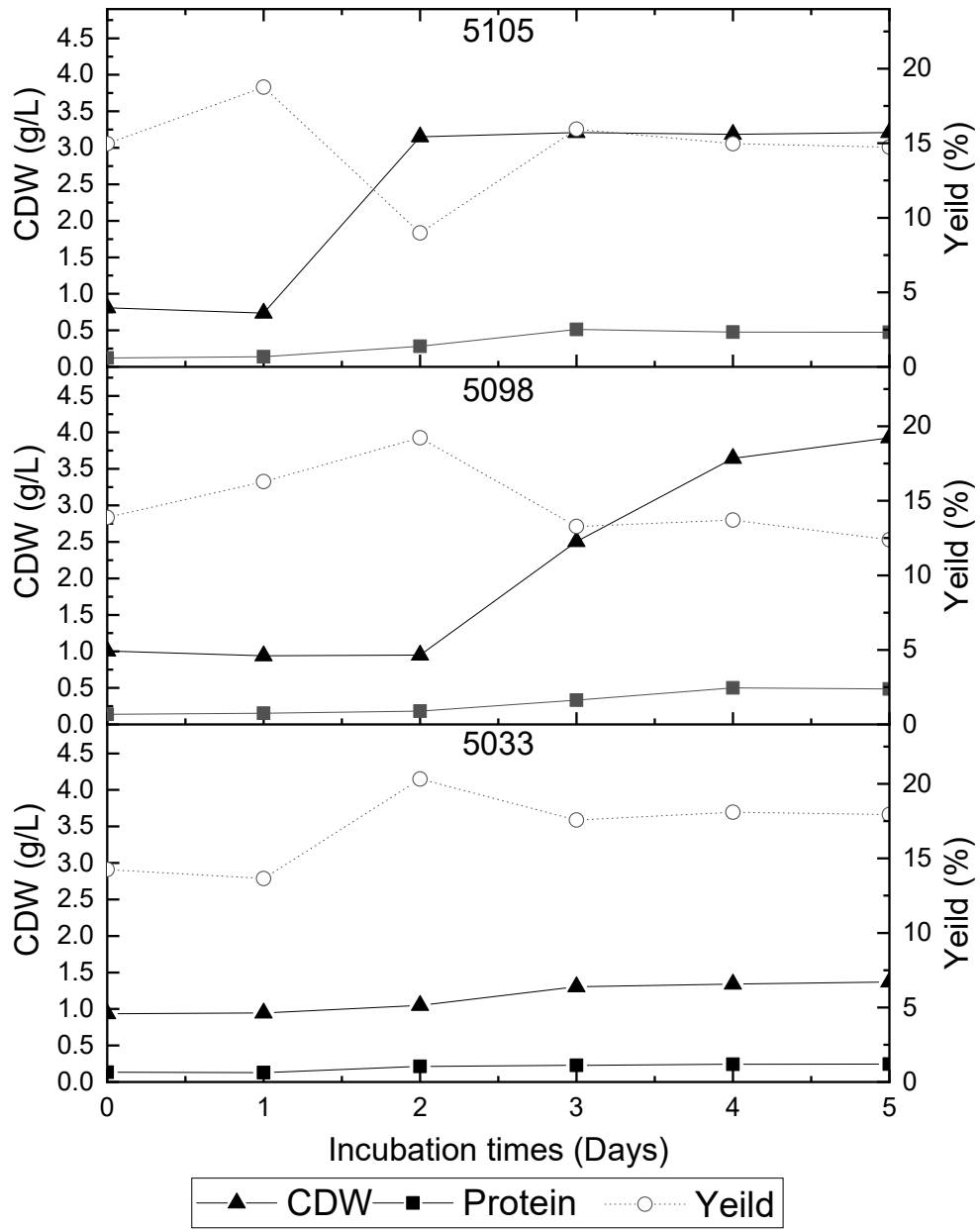
* P คือ ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร), C คือ ปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์ (กรัมต่อลิตร) และ $Y_{P/C}$ คือ ค่าร้อยละผลผลิตจำเพาะ (Specific product yield, $Y_{P/C}$)



ภาพที่ 4-4 ปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ในน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังที่ระยะเวลาต่างๆ



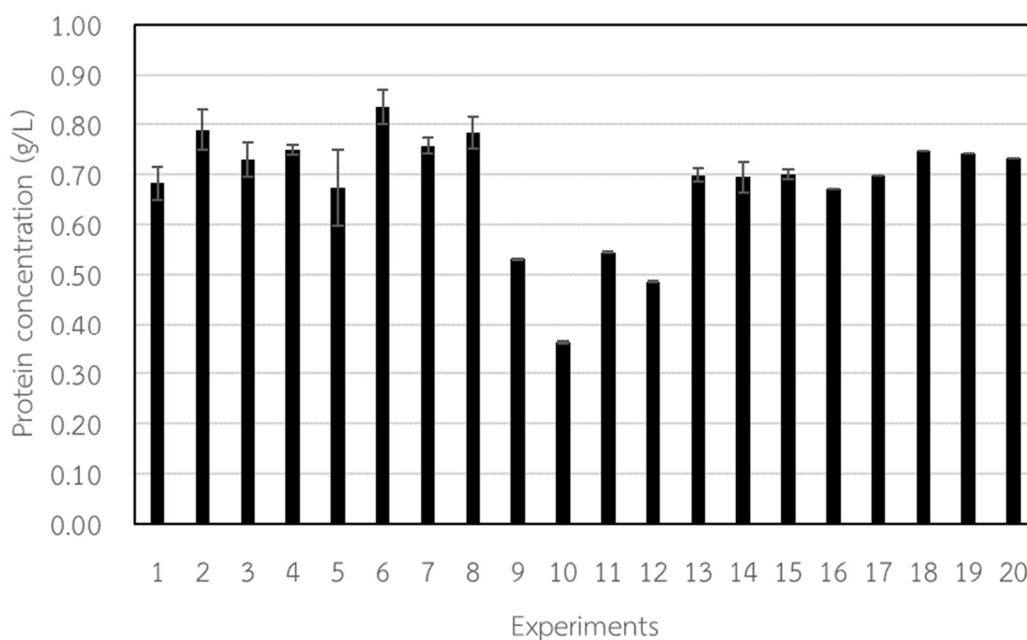
ภาพที่ 4-5 ปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปงมัน
 สำปะหลังที่ระยะเวลาต่างๆ



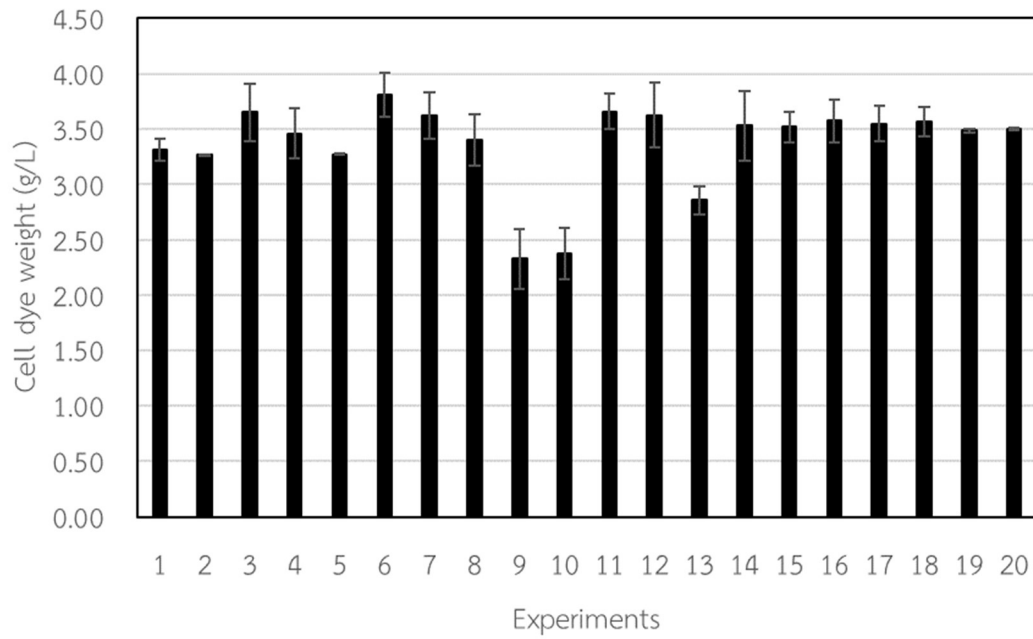
ภาพที่ 4-6 ร้อยละผลผลิตจำเพาะ (Specific product yield, Y_p/x) ของยีสต์ในน้ำทิ้งจากโรงงาน แป้งมันสำปะหลัง (ป่อน้ำทิ้งรวม) ที่ระยะเวลาต่างๆ

4. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยการวางแผนการทดลองแบบ Response surface methodology (RSM) โดยใช้เทคนิค Central Composite Design (CCD)

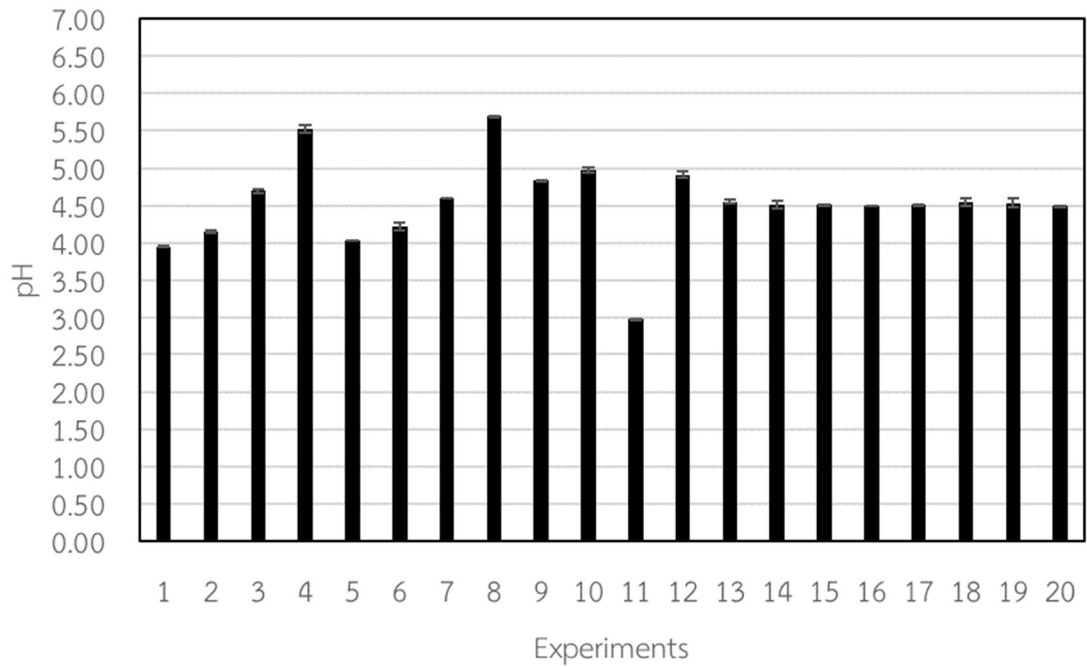
การศึกษการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อ *P. farinose* TISTR5105 ในน้ำทิ้งจากบ่อน้ำทิ้งรวม ในครั้งนี้ใช้การออกแบบแบบ Central composite design (CCD) ซึ่งมีที่กำหนดค่าสูงสุดและต่ำสุดเป็น 5 ระดับ ได้แก่ -1.68, -1, 0, +1 และ +1.68 จากนั้นนำไปบ่มที่เป็นระยะเวลา 3 วัน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4-5 และภาพที่ 4-7, 4-8, 4-9 และ 4-10 พบว่า ปริมาณน้ำหนักรวมแห้งจากเชื้อ *P. farinose* TISTR5105 อยู่ในช่วงระหว่าง 2.33 – 3.81 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณน้ำหนักรวมแห้งสูงสุดคือ ชุดการทดลองที่ 2 และปริมาณน้ำหนักรวมแห้งต่ำสุดคือ ชุดการทดลองที่ 12 ในขณะที่ปริมาณโปรตีนจากเชื้อ *P. farinose* TISTR5105 อยู่ในช่วงระหว่าง 0.36 – 0.83 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณโปรตีนสูงสุดคือ ชุดการทดลองที่ 6 และปริมาณโปรตีนต่ำสุดคือ ชุดการทดลองที่ 10 ค่าพีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ *P. farinose* TISTR5105 อยู่ในช่วงระหว่าง 2.98 – 5.69 โดยพีเอชสูงสุดคือ ชุดการทดลองที่ 8 และปริมาณโปรตีนต่ำสุดคือ ชุดการทดลองที่ 11 และร้อยละผลผลิตจำเพาะ (Specific product yield, Y_p/x) ของเชื้อ *P. farinose* TISTR5105 อยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 24.44 – 13.40 โดยร้อยละผลผลิตจำเพาะสูงสุดคือ ชุดการทดลองที่ 2 และปริมาณโปรตีนต่ำสุดคือ ชุดการทดลองที่ 12



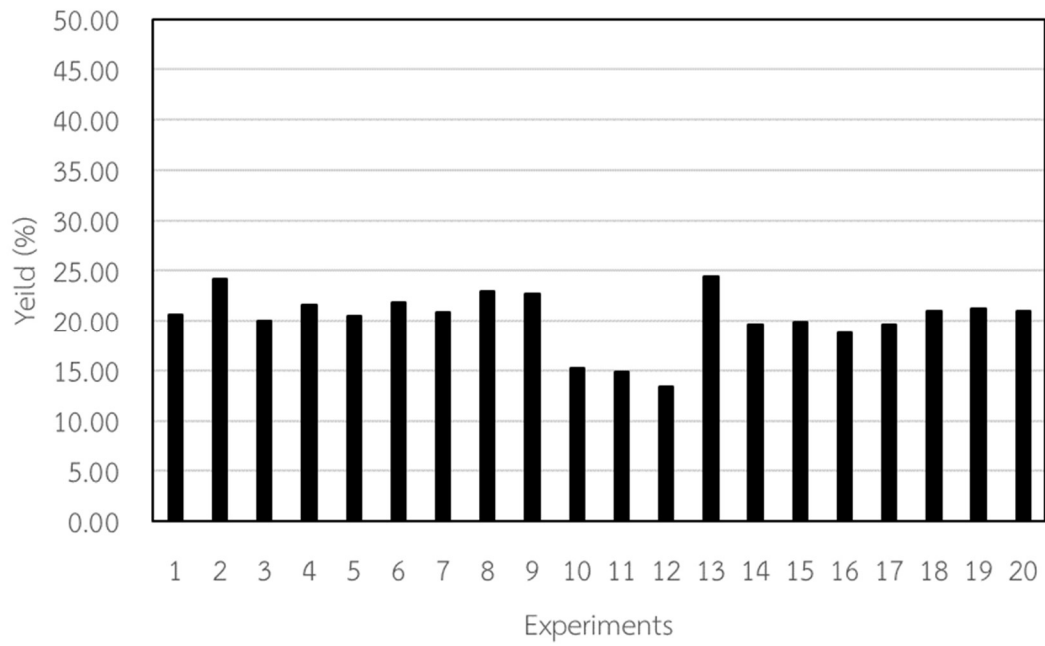
ภาพที่ 4-7 ปริมาณโปรตีนของเชื้อ *P. farinosa* TISTR5105 จากแผนการทดลองแบบ CCD



ภาพที่ 4-8 น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *P. farinosa* TISTR5105 จากแผนการทดลองแบบ CCD



ภาพที่ 4-9 ค่าพีเอชของเชื้อ *P. farinosa* TISTR5105 จากแผนการทดลองแบบ CCD



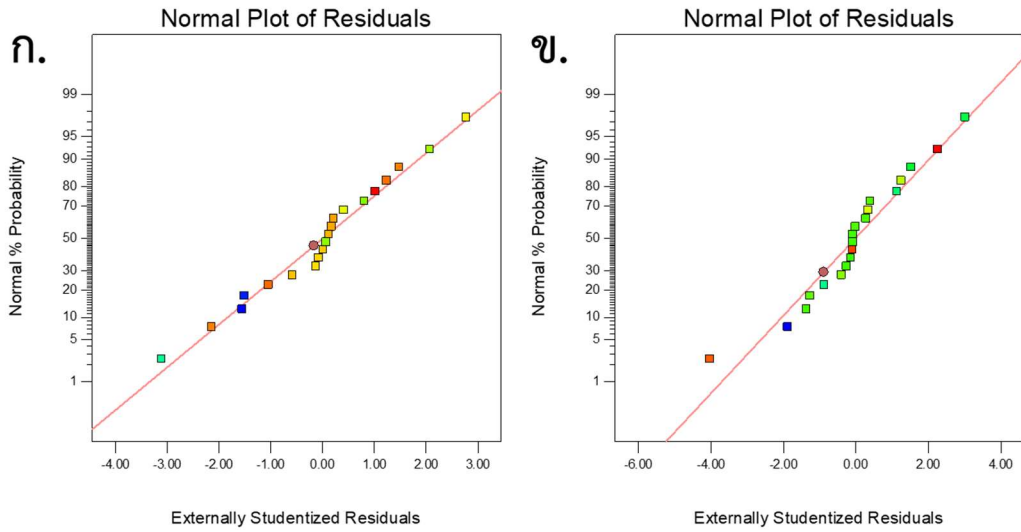
ภาพที่ 4-10 ร้อยละผลผลิตจำเพาะ (Specific product yield, Y_p/x) ของเชื้อ *P. farinosa* TISTR5105 จากแผนการทดลองแบบ CCD

ตารางที่ 4-6 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะความเหมาะสมของการโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อ *P. farinosa* TISTR5105 จากแผนการทดลองแบบ CCD พร้อมค่าการคาดคะเนกับค่าที่ได้จากการทดลอง

Experiments	Factors			Response			
	อุณหภูมิ (°C)	พีเอช	ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น (%)	CDW (g/L)	Protein conc. (g/L)	pH	Yeild (%)
1	30	4	3	15.93	8.30	3.96	20.61
2	40	4	3	26.17	13.97	4.16	24.18
3	30	7	3	16.09	11.62	4.70	20.01
4	40	7	3	25.73	12.08	5.53	21.65
5	30	4	10	18.41	8.96	4.03	20.55
6	40	4	10	28.89	4.30	4.22	21.90
7	30	7	10	18.85	16.19	4.59	20.92
8	40	7	10	26.78	7.34	5.69	23.01
9	26.591	5.5	6.5	6.21	11.30	4.83	22.76
10	43.409	5.5	6.5	22.73	7.31	4.98	15.28
11	35	2.97731	6.5	28.62	6.48	2.98	14.87
12	35	8.02269	6.5	29.02	13.50	4.92	13.40
13	35	5.5	0.613725	24.35	13.35	4.56	24.44
14	35	5.5	12.3863	27.04	8.58	4.52	19.68
15	35	5.5	6.5	29.18	6.16	4.51	19.91
16	35	5.5	6.5	30.23	5.84	4.50	18.79
17	35	5.5	6.5	29.01	6.62	4.51	19.63
18	35	5.5	6.5	28.97	6.22	4.55	20.95
19	35	5.5	6.5	30.11	6.38	4.54	21.28
20	35	5.5	6.5	29.46	5.76	4.49	20.95

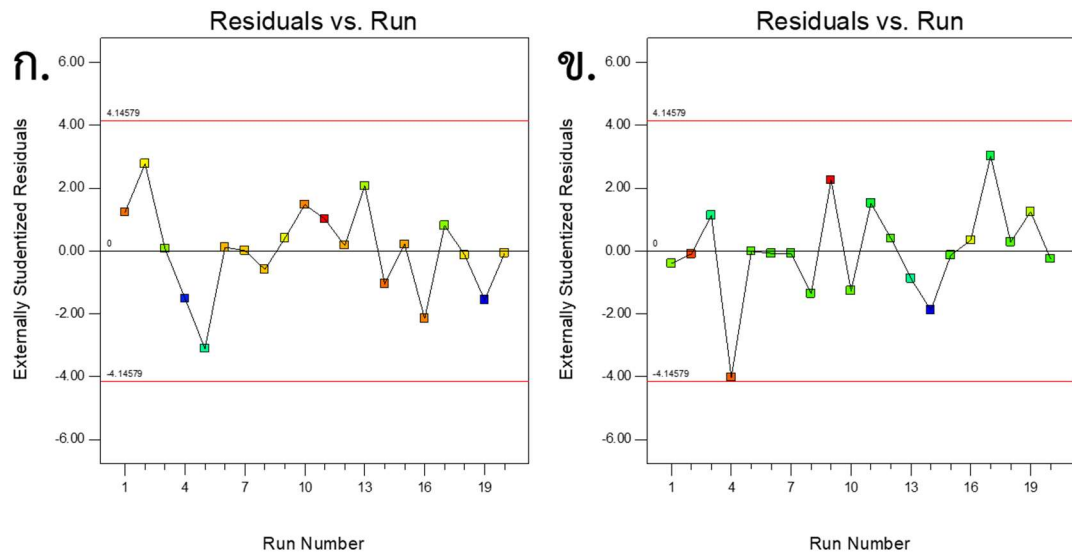
การตรวจสอบคุณภาพข้อมูลเบื้องต้น ประกอบด้วย

1. การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ ซึ่งเป็นการตรวจสอบส่วนตกค้างของข้อมูลว่ามีการกระจายของค่าส่วนตกค้าง ดังแสดงในภาพที่ 4-11 พบว่าข้อมูลมีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรง แสดงให้เห็นว่าส่วนตกค้างจากการทดลองหาปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์ และค่าพีเอช ไม่แสดงสิ่งผิดปกติ สรุปได้ว่าค่าส่วนตกค้างมีการแจกแจงปกติ



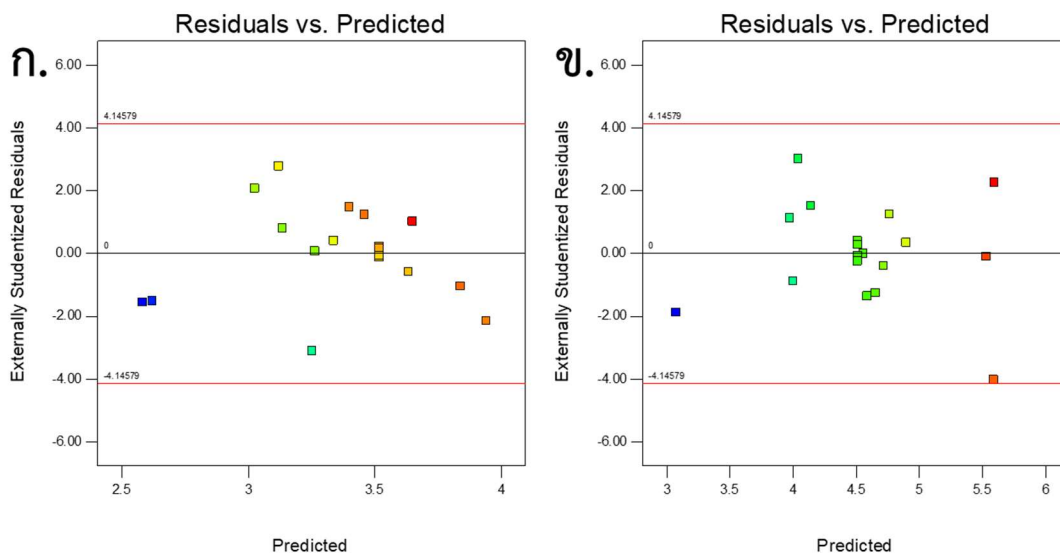
ภาพที่ 4-11 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ (ก.) และค่าพีเอช (ข.)

2. การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล ดังแสดงในภาพที่ 4-12 พบว่าส่วนตกค้างของผลการทดลองหาปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ และค่าพีเอช ไม่มีรูปแบบแน่นอนหรือไม่สามารถประมาณรูปที่แน่นอนได้ มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ แสดงว่าข้อมูลมีความเป็นอิสระ



ภาพที่ 4-12 การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลการหาปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ (ก.) และค่าพีเอช (ข.)

3. การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน ดังแสดงในภาพที่ 4-13 พบว่าส่วนตกค้างของผลการทดลองหาปริมาณน้ำหนักร่องแห้งของเซลล์ และค่าพีเอช มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอทั้งทางบวกและลบ แสดงให้เห็นว่าข้อมูลมีความเสถียรของความแปรปรวน



ภาพที่ 4-13 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัยของการหาปริมาณน้ำหนักร่องแห้งของเซลล์ (ก.) และค่าพีเอช (ข.)

ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square: R-Sq) เป็นค่าที่บอกร้อยละการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามที่สามารถอธิบายได้ด้วยตัวแปรอิสระในสมการถดถอย ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4-7 และ 4-9 พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจของปริมาณน้ำหนักร่องแห้งของเซลล์เท่ากับ 0.7512 หรือ 75 เปอร์เซ็นต์ และค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจของพีเอชเท่ากับ 0.9884 หรือ 98 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปสร้างสมการทำนายเพื่อหาค่าผลตอบสนองได้

จากตารางที่ 4-7 ตัวแปรอิสระที่มีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำหนักร่องแห้งของเซลล์ ซึ่งมีค่า p-value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ อิทธิพลของกำลังสองของอุณหภูมิ (X_1^2) นอกจากนี้ยังพบว่าสมการกำลังสอง (quadratic equations) เป็นสมการที่ใช้ศึกษาปัจจัยและการตอบสนองแบบพื้นผิวที่ดีที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงผลดังตารางที่ 4-8 นอกจากนี้จากตารางที่ 4-9 ตัวแปรอิสระที่มีอิทธิพลต่อค่าพีเอช ซึ่งมีค่า p-value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 ได้แก่ อิทธิพลของอุณหภูมิ (X_1) อิทธิพลของพีเอช (X_2) อิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิกับพีเอช (X_1X_2) อิทธิพลของกำลังสองของอุณหภูมิ (X_1^2) และอิทธิพลของกำลังสองของพีเอช (X_2^2) นอกจากนี้ยังพบว่าสมการกำลังสอง (quadratic equations) เป็นสมการที่ใช้ศึกษาปัจจัยและการตอบสนองแบบพื้นผิวที่ดีที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงผลดังตารางที่ 4-10

ตารางที่ 4-7 แสดงค่าความแปรปรวนของการหาปริมาณน้ำหนักรักษาของเซลล์จากเชื้อ *P. farinosa* TISTR5105

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	2.28	9	0.25	3.36	0.0364	significant
$A-X_1$	1.890E-003	1	1.890E-003	0.025	0.8775	
$B-X_2$	0.013	1	0.013	0.17	0.6908	
$C-X_3$	0.18	1	0.18	2.33	0.1577	
AB	0.10	1	0.10	1.32	0.2766	
AC	0.039	1	0.039	0.51	0.4918	
BC	0.044	1	0.044	0.59	0.4619	
A^2	1.52	1	1.52	20.07	0.0012	
B^2	0.25	1	0.25	3.30	0.0994	
C^2	0.010	1	0.010	0.14	0.7204	
Residual	0.76	10	0.076			
Lack of Fit	0.75	5	0.15	113.60	< 0.0001	significant
Pure Error	6.598E-003	5	1.320E-003			
Cor Total	3.04	19				
Std. Dev.	0.27	R-Squared	0.7512			
Mean	3.37	Adj R-Squared	0.5273			
C.V. %	8.16	Pred R-Squared	-0.8901			
PRESS	5.74	Adeq Precision	7.000			
-2 Log Likelihood	-8.75	BIC	21.21			
		AICc	35.70			

ตารางที่ 4-8 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์สมการถดถอยของการหาปริมาณน้ำหนักรักษาของเซลล์

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	
Linear	0.7845	< 0.0001	-0.1129	-0.6665	
2FI	0.8267	< 0.0001	-0.2818	-0.8943	
Quadratic	0.0043	< 0.0001	0.5273	-0.8901	Suggested
Cubic	0.8558	< 0.0001	0.3504	-43.7472	Aliased

ตารางที่ 4-9 แสดงค่าความแปรปรวนของการค่าพีเอชจากเชื้อ *P. farinosa* TISTR5105

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	6.58	9	0.73	94.44	< 0.0001	significant
<i>A-X</i> ₁	0.83	1	0.83	106.56	< 0.0001	
<i>B-X</i> ₂	4.01	1	4.01	517.47	< 0.0001	
<i>C-X</i> ₃	1.195E-003	1	1.195E-003	0.15	0.7028	
<i>AB</i>	0.30	1	0.30	38.51	0.0001	
<i>AC</i>	8.128E-003	1	8.128E-003	1.05	0.3298	
<i>BC</i>	7.031E-004	1	7.031E-004	0.091	0.7694	
<i>A</i> ²	0.80	1	0.80	102.86	< 0.0001	
<i>B</i> ²	0.50	1	0.50	64.68	< 0.0001	
<i>C</i> ²	6.504E-003	1	6.504E-003	0.84	0.3811	
Residual	0.077	10	7.747E-003			
<i>Lack of Fit</i>	0.075	5	0.015	32.20	0.0008	significant
<i>Pure Error</i>	2.333E-003	5	4.667E-004			
Cor Total	6.66	19				
Std. Dev.	0.088	R-Squared	0.9884			
Mean	4.56	Adj R-Squared	0.9779			
C.V. %	1.93	Pred R-Squared	0.9115			
PRESS	0.59	Adeq Precision	40.509			
-2 Log Likelihood	-54.31	BIC	-24.36			
		AICc	-9.87			

ตารางที่ 4-10 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์สมการถดถอยของการหาค่าพีเอช

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	
Linear	< 0.0001	< 0.0001	0.6744	0.5014	
2FI	0.4786	< 0.0001	0.6667	0.5426	
Quadratic	< 0.0001	0.0008	0.9779	0.9115	Suggested
Cubic	0.0276	0.0031	0.9926	0.5616	Aliased

รูปแบบสมการถดถอยของการหาปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เหมาะสมที่ได้ ดังนี้

$$Y_{CDW} = 3.52 + 0.012X_1 + 0.030X_2 + 0.11X_3 - 0.11X_1X_2 + 0.069X_1X_3 - 0.074X_2X_3 - 0.32X_1^2 + 0.13X_2^2 - 0.027X_3^2$$

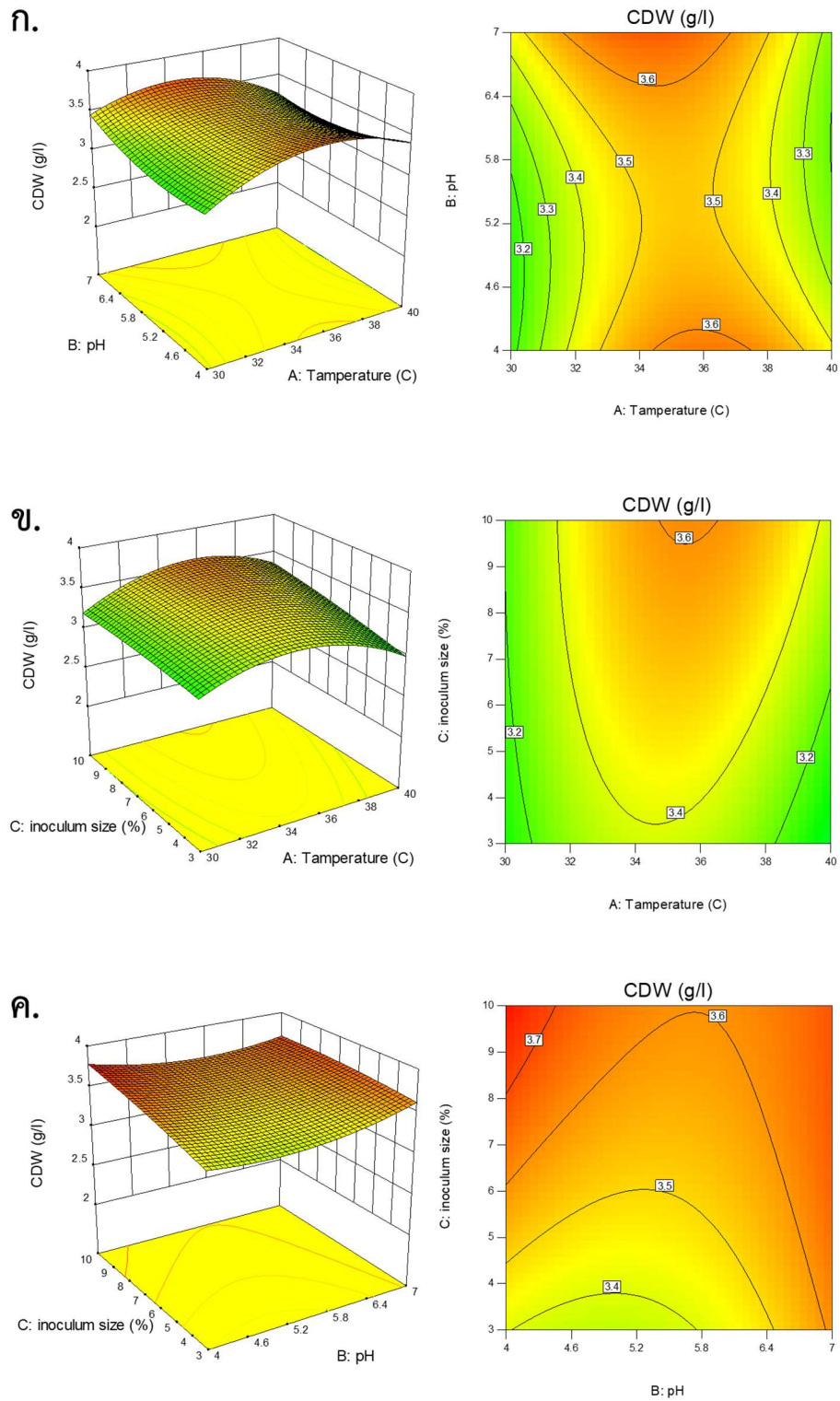
รูปแบบสมการถดถอยของการหาค่าพีเอช ดังนี้

$$Y_{pH} = 4.51 + 0.25X_1 + 0.54X_2 + 0.0093X_3 + 0.19X_1X_2 + 0.032X_1X_3 - 0.0093X_2X_3 + 0.24X_1^2 - 0.19X_2^2 + 0.021X_3^2$$

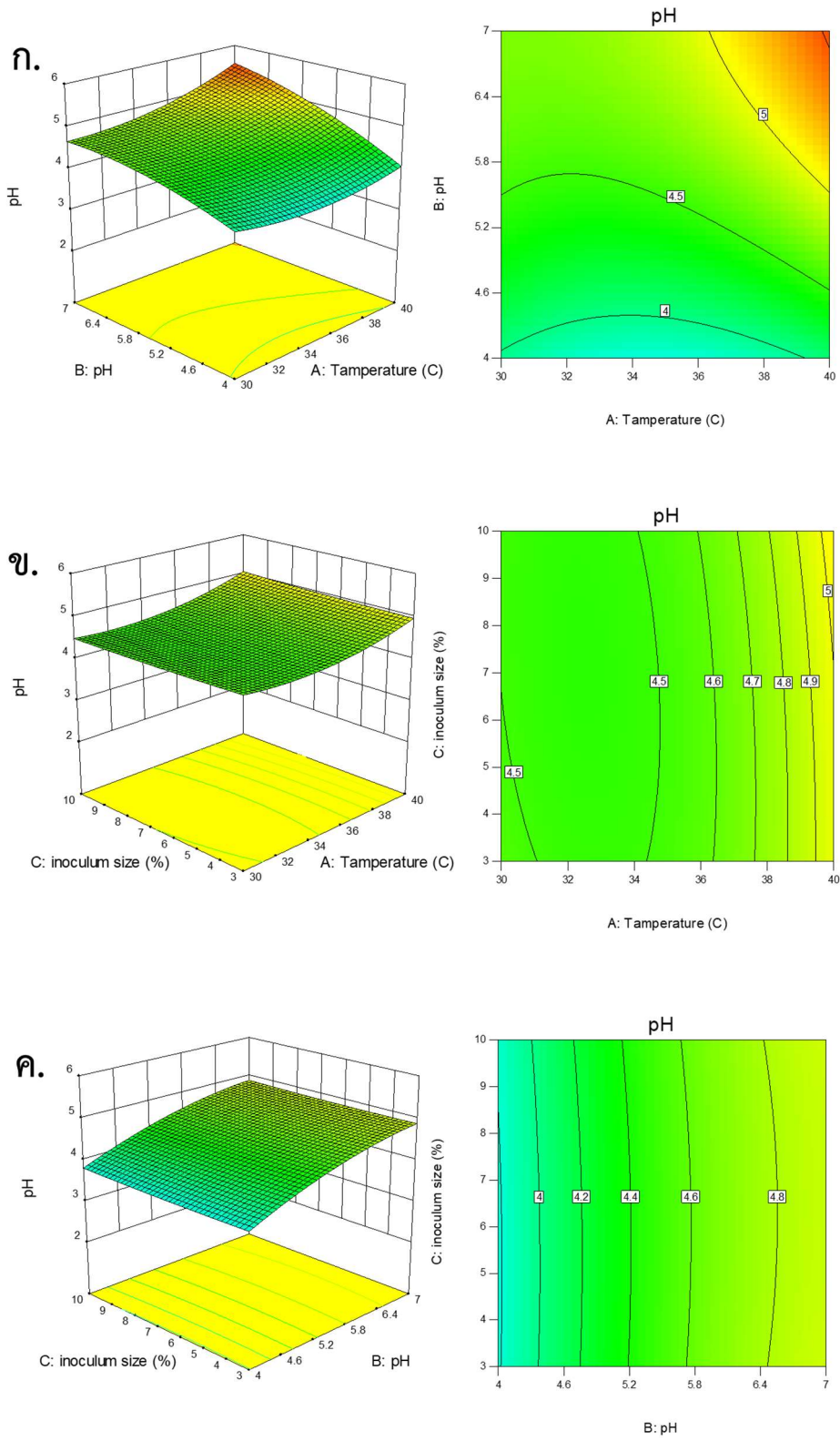
จากสมการสังเกตได้ว่าตัวแปร X_1 , X_2 และ X_3 มีอิทธิพลทางบวก (มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก) ต่อค่าตอบสนอง (Y) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าว จะทำให้ค่าปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์จะมีค่าสูงขึ้นตามไปด้วย

เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของเซลล์หรือพีเอชกับตัวแปรอิสระต่างๆ ได้แก่ ระหว่างอุณหภูมิและพีเอช (ก), ระหว่างอุณหภูมิและหัวเชื้อเริ่มต้น (ข) และระหว่างหัวเชื้อเริ่มต้นกับพีเอช (ค) แสดงดังภาพที่ 4-14 พบว่าอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อมีผลต่อปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์เชื้อ *P. farinosa* TISTR5105 ในขณะที่อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อ และพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียจะมีผลต่อค่าพีเอชของน้ำทิ้งสุดท้าย อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้น ไม่มีผลต่อปริมาณปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์เชื้อ *P. farinosa* TISTR5105 และค่าพีเอชของน้ำทิ้งสุดท้าย

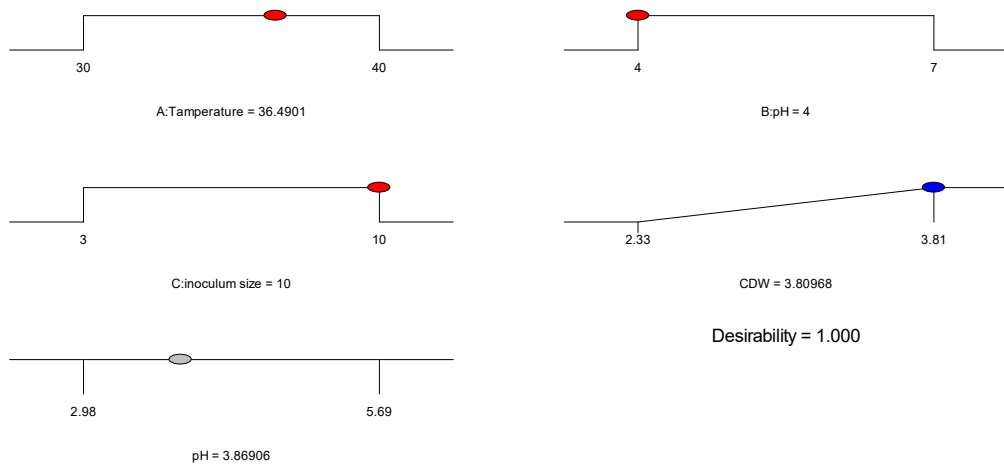
ดังนั้นจากผลการทดลองจึงสามารถทำนายระดับที่เหมาะสมของการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยเชื้อ *P. farinosa* TISTR5105 จากโปรแกรม Design Expert แสดงดังภาพที่ 4-16 พบว่าระดับที่เหมาะสมของการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยเชื้อ *P. farinosa* TISTR5105 คือ การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 36.49 องศาเซลเซียส ในน้ำทิ้งจากบ่อรวมที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.0 และเติมหัวเชื้อเริ่มต้นลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ได้ปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3.81 กรัมต่อลิตร และพีเอชของอาหารสุดท้ายเท่ากับ 3.87



ภาพที่ 4-14 ผลการตอบสนองระหว่างอุณหภูมิและพีเอช (ก), ระหว่างอุณหภูมิและหัวเชื้อเริ่มต้น (ข) และระหว่างหัวเชื้อเริ่มต้นกับพีเอช (ค) ต่อปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์



ภาพที่ 4-15 ผลการตอบสนองระหว่างอุณหภูมิและพีเอช (ก), ระหว่างอุณหภูมิและหัวเชื้อเริ่มต้น (ข) และระหว่างหัวเชื้อเริ่มต้นกับพีเอช (ค) ต่อค่าพีเอช



ภาพที่ 4-16 การทำนายระดับที่เหมาะสมของการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเชื้อ *P. farinosa* TISTR5105

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาเชื้อยีสต์ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. fibuligera* TISTR5033, *T. cutaneum* TISTR5040, *C. famata* TISTR5098, *P. farinose* TISTR5105, *C. tropicalis* TISTR5136, *S. alluvius* TISTR5164 และ *C. utilis* TISTR5352 เบื้องต้น พบว่าเชื้อ *T. cutaneum* TISTR5040, *C. famata* TISTR5098 และ *S. fibuligera* TISTR5033 สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาระดับความปลอดภัยทางชีวภาพของเชื้อยีสต์พบว่าเชื้อ *Trichosporon cutaneum* จัดอยู่ในระดับความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 2 (Biosafety-Level 2) จึงไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นเชื้อยีสต์ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว จึงเลือกเชื้อ *S. fibuligera* TISTR5033, *C. famata* TISTR5098 และ *P. farinosa* TISTR5105

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังที่ได้จากบริษัท เอี่ยมบุรพา จำกัด 3 แหล่ง ได้แก่ บ่อน้ำทิ้งรวม (Combined wastewater, CW) น้ำทิ้งก่อนเข้าระบบ UASB (Before UASB, B-UASB) และน้ำทิ้งหลังระบบ UASB (After UASB, A-UASB) พบว่าน้ำทิ้งที่ได้จากบ่อน้ำทิ้งรวม มีค่าปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด ปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมด ค่าบีโอดี ค่าซีโอดี และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงสุด รองลงมาคือ น้ำทิ้งก่อนเข้าระบบ UASB และน้ำทิ้งหลังระบบ UASB ตามลำดับ

การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว พบว่า เชื้อ *P. farinose* TISTR5105 เป็นสายพันธุ์ยีสต์ที่ดีที่สุด เนื่องจากให้ปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์ ปริมาณโปรตีน และร้อยละผลผลิตจำเพาะ (Specific product yield, Yp/x) ดีที่สุด

การศึกษากการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อ *P. farinose* TISTR5105 ในน้ำทิ้งจากบ่อน้ำทิ้งรวม ด้วยโปรแกรม Design Expert พบว่า ระดับที่เหมาะสมของการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยเชื้อ *P. farinosa* TISTR5105 คือ การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 36.49 องศาเซลเซียส ในน้ำทิ้งจากบ่อรวมที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.0 และเติมหัวเชื้อเริ่มต้นลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ได้ปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3.81 กรัมต่อลิตร และพีเอชของอาหารสุดท้ายเท่ากับ 3.87 นอกจากนี้สามารถทำนายสมการการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อ *P. farinose* TISTR5105 ในน้ำทิ้งจากบ่อน้ำทิ้งรวมดังนี้

$$Y_{CDW} = 3.52 + 0.012X_1 + 0.030X_2 + 0.11X_3 - 0.11X_1X_2 + 0.069X_1X_3 - 0.074X_2X_3 - 0.32X_1^2 + 0.13X_2^2 - 0.027X_3^2$$

เอกสารอ้างอิง

- ปิยทัศน์ พุ่มทองตรู, 2535. การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากฟางข้าว. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. บัณฑิตวิทยาลัย.
- พูนสุข ประเสริฐสรุภ. 2558. การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือทางอุตสาหกรรมเกษตร. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์ โอ. เอส. พรินติ้ง เฮ้าส์, กรุงเทพฯ
- มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี, พรพรรณ แสนภูมิ, วราภรณ์ กิจพิพิธ, กฤติยา เลิศคุณหะเกียรติ, 2556. การศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเปลือกสับปะรดโดยใช้ยีสต์และบาซิลลัสซับติลิสเพื่อพัฒนาเป็นอาหารสัตว์. แก่นเกษตร 41, 80–68.
- Box, G.E.P., 2006. Improving Almost Anything: Ideas and Essays, Revised Edition, Revised Edition edition. ed. Wiley-Interscience, Hoboken, NJ.
- Box, G. E. P., Hunter, J. S., Hunter, W. G., 2005. Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery, 2nd Edition, 2nd edition. ed. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.
- Box, G.E.P., Wilson, K.B., 1951. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol. 13, 1–45.
- Cochran, W.G., Cox, G.M., 1992. Experimental Designs, 2nd Edition, 2 edition. ed. Wiley, New York.
- Giesbrecht, F.G., Gumpertz, M.L., 2004. Planning, Construction, and Statistical Analysis of Comparative Experiments, 1 edition. ed. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.
- Jalasutram, V., Kataram, S., Gandu, B., Anupaju, G. R., 2012. Single cell protein production from digested and undigested poultry litter by *Candida utilis*: optimization of process parameters using response surface methodology. Clean Technologies and Environmental Policy. 15, 265–273. doi:10.1007/s10098-012-0504-3
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., 1995. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using Designed Experiments. Wiley.
- Nasseri, A.T., Rasoul-Amini, S., Morowat, M.H. and Ghasemi, Y. 2011. Single cell protein: production and process. American Journal of Food Technology. 6(2), 103-116.

- Rachamontree, P. , Phusantisampan, T. , Woravutthikul, N. , Pornwongthong, P. , Sriariyanun, M., 2015. Selection of *Pichia kudriavzevii* strain for the production of single-cell protein from cassava processing waste. International Journal of Bioengineering and Life Sciences. 9, 466–470.
- Ratanawaraha, C., Senanarong, N.,and Suriyapan, P. 2019. Status of cassava in Thailand implications for future research and development. Available Source: <http://www.fao.org/docrep/009/y1177e/y1177e04.htm>. Accessed Data: 30 May 2019.
- Ritala, A., Häkkinen, S.T., Toivari, M. and Wiebe, M.G. 2017. Single cell protein—State-of- the- art, industrial landscape and patents 2001– 2016. Frontiers in Microbiology, 8, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>.
- Song, X. , Zhang, X. , Kuang, C. , Zhu, L. , Guo, N. , 2007. Optimization of fermentation parameters for the biomass and DHA production of *Schizochytrium limacinum* OUC88 using response surface methodology. Process Biochem. 42, 1391–1397. doi:10.1016/j.procbio.2007.07.014
- Srividya, A R, V J Vishnuvarthan, M Murugappan, and Prajakt Gopal Dahake. 2013. Single Cell Protein - A Review. International Journal for Pharmaceutical Research Scholars, V-2, I-4, 472-485.
- Suman, G., Nupur, M., Anuradha, S., and Pradeep, B. 2015. Single cell protein production: a review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 4(9), 251-262.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Yeast Malt medium (YM medium)

ประกอบด้วย

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ถ้าเป็นอาหารแข็ง เติมผงวุ้นลงไป 20 กรัม จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอร์นต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

2. Yeast extract-Peptone- Cassava medium (YPC medium)

ประกอบด้วย

Yeast extract	0.5	กรัม
Peptone	0.5	กรัม
แป้งมันสำปะหลัง	30	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ถ้าเป็นอาหารแข็ง เติมผงวุ้นลงไป 20 กรัม จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอร์นต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

สารเคมี

1. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate; Na_2CO_3)
2. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
3. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Rochelle salt; $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH)
5. โฟลินฟีนอลรีเอเจนต์ (Folin-Ciocateu's phenol reagent)
6. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA)

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล
2. เตรียมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 1.0 เปอร์เซ็นต์
3. เตรียมสารละลาย alkali copper โดยผสมสารละลายในข้อ 1. ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับสารละลายในข้อ 2. ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้)
4. เตรียมสารละลาย Folin-Ciocateu's reagent โดยการเจือจางสารโฟลินฟีนอลรีเอเจนต์กับน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 (เตรียมก่อนใช้)

วิธีการวิเคราะห์

- 1) วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน
 - ก. เตรียมสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมินให้มีความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
 - ข. ปิเปตสารละลายในข้อ ก. มาความเข้มข้นละ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (blank ใช้ น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตรแทน)
 - ค. เติมสารละลาย alkali copper ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
 - ง. เติมสารละลาย Folin-Ciocateu's reagent ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
 - จ. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ฉ. นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

2) การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปหาปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับข้อ 1)

