การผลิตยางธรรมชาติโปรตีนต่ำและโปรตีนเซลล์เดี่ยว

นางสาวสุทธิ์กมล สุทธิกุล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547
ISBN 974 -17 -6438 -3
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF LOW PROTEIN NATURAL RUBBER AND SINGLE CELL PROTEIN

Miss Suthkamol Suttikul

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974 - 17 - 6438 - 3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตยางธรรมชาติโปรตีนต่ำและโปรตีนเซลล์เดี่ยว
โดย	นางสาวสุทธิ์กมล สุทธิกุล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. เพียรพรรค ทัศคร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์)

……... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร. เพียรพรรค ทัศคร)

……อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

……กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. ภัทรพรรณ ประศาสน์สารกิจ)

……กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุทธิ์กมล สุทธิกุล : การผลิตยางธรรมชาติโปรตีนต่ำและโปรตีนเซลล์เดี่ยว. (PRODUCTION OF LOW PROTEIN NATURAL RUBBER AND SINGLE CELL PROTEIN) อ. ที่ปรึกษา : ดร. เพียรพรรค ทัศคร, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา จำนวน 152 หน้า. ISBN 974 -17 - 6438 -3.

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวของ *Endomycopsis fibuligera* TISTR 5097 และ *Candida utilis* TISTR 5001 ร่วมกับการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อหาปริมาณวัตถุดิบและภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวและเอนไซม์โปรตีเอส พบว่าใช้แป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร ในอาหารขั้นต่ำ ใช้เชื้อตั้งต้นของ *E. fibuligera* 7 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร) เลี้ยงเชื้อในถังหมักเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จึงเติมเชื้อตั้งต้นของ *C. utilis* 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (เข้มข้น 7 กรัมต่อลิตร) โดยควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 อัตราการกวน 250 รอบ / นาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เลี้ยงเชื้อต่อจนครบ 40 ชั่วโมง จึงเติมเชื้อตั้งต้นแบบ cell suspension ของ *B. subtilis* 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.0 เลี้ยงจนครบ 72 ชั่วโมง พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.91 กรัมต่อลิตร โปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 49.5 เปอร์เซ็นต์ มวลเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.527 และโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 2.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากหมักเสร็จสิ้นนำตัวเซลล์ที่ตกตะกอนออก แล้วเติมน้ำยางสด 35%DRC ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ร่วมกับสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 % ปริมาณ 1 phr ใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดปริมาณไนโตรเจนของยางดิบได้ 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยางดิบที่ได้มีปริมาณเถ้า ไนโตรเจน สิ่งสกปรก และสิ่งระเหยเท่ากับ 0.05, 0.17, 0.002 และ 0.23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีค่าการอ่อนตัวเริ่มต้น 30.7 ค่าดัชนีการอ่อนตัว 86.6 ค่าความหนืดมูนี 52.9 และดัชนีสี 5 โดยยางที่ได้มีลักษณะพื้นผิวและภาคตัดขวางไม่แตกต่างจากยางดิบชุดควบคุม

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4472456923 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: NATURAL RUBBER / DEPROTEINIZATION / SINGLE CELL PROTEIN / PROTEASE

SUTHKAMOL SUTTIKUL : PRODUCTION OF LOW PROTEIN NATURAL RUBBER AND SINGLE CELL PROTEIN. THESIS ADVISOR : PIENPAK TASAKORN, Ph.D. THESIS CO–ADVISOR : ASSOC. PROF. SONGSRI KULPREECHA, Ph.D. 152 pp. ISBN 974 - 17 - 6438 - 3.

Single cell protein production by *Endomycopsis fibuligera* TISTR 5097 and *Candida utilis* TISTR 5001 together with the production of protease by *Bacillus subtilis* TISTR 25 in minimal medium using cassava starch as a carbon source and ammonium sulphate as a nitrogen source has been studied. The objective is to find suitable substrate and optimum conditions. Suitable process operations have been found by using 15 g/l of cassava starch and 10 g/l of ammonium sulphate in minimal medium inoculated with 7% v/v of *E. fibuligera* (5 g/l) cultivated for 16 h then added 3% v/v inocculum of *C. utilis* (7 g/l). The pH was controlled at 5.5, temperature at 30 ^{O}C, agitation speed of 250 rpm and aeration rate of 1.0 vvm. A 10% v/v cell suspension of *B. subtilis* was added at the 40 th h and the cultivation continued until the 72 th h in the fermenter. Single cell protein yield from this process was 7.91 g/l dry weight, maximum cellular protein 49.5% , bio-mass per gram cassava 0.527 and highest protease activity 2.57 U / ml. After cell bio-mass removal, the broth was used for the deproteinization by adding 35% DRC of field latex 40 % v/v of broth and 1 phr of SDS (10% solution) into the broth with agitation speed of 100 rpm for 1 h. The yielded raw rubber has its nitrogen reduced by 70%. The physical properties of the raw rubber are 0.05% ash, 0.17% nitrogen, 0.002% dirt content and 0.23% volatile matter, P_0 30.7, PRI index 86.6, Moony viscosity 52.9 and color index 5. The surface and cross section characteristic of sample and control rubber have no different.

Field of study Biotechnology Student's signature……..

Academic year 2004 Advisor's signature…….

Co - advisor's signature…….

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. เพียรพรรค ทัศคร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยเหลือในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รวมทั้งช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ภัทรพรรณ ประศาสน์สารกิจ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของภาควิชาเคมีเทคนิค และเจ้าหน้าที่ศูนย์พัฒนาและบริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการสร้างเครื่องมือ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยยางที่ให้ความอนุเคราะห์ และอำนวยความสะดวกในการทดสอบสมบัติยางที่สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพและภาควิชาเคมีเทคนิค ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาเคมีเทคนิค ที่ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือด้วยดีมาตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่น้อง ที่คอยเป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……...ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……..จ
กิตติกรรมประกาศ……...ฉ
สารบัญ…… ช
สารบัญตาราง……...ฌ
สารบัญรูป……..…… ฎ
คำย่อ.....ฑ

บทที่

1. บทนำ……1
   1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของโครงการ……1
   1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย……2
   1.3 ขั้นตอนการวิจัย……...2
   1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย..……3

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……..4
   2.1 ยางธรรมชาติ……..……...4
      - น้ำยางสด……..……4
      - น้ำยางข้น……..……...11
      - การจับตัวของน้ำยาง……12
      - การรักษาสภาพน้ำยาง……..……....12
      - โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ……..13
   2.2 โปรตีนเซลล์เดี่ยว……..……17
      - การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว……..……18
      - วัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว……..……19
      - ประเภทของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว……...……23
   2.3 กระบวนการหมักแบบ Batch……..27
   2.4 เอนไซม์โปรตีเอส……...……29
      - ประเภทของเอนไซม์โปรตีเอส……...……...30

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

- การสร้างเอนไซม์และความสำคัญ.....31
- ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์.....32

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....34
3.1 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และสายพันธุ์จุลินทรีย์.....34
3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย.....38

4. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง.....50
4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์ที่ใช้ในการผลิต.....50
4.2 ปริมาณวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวในระดับขวดทดลอง.....53
4.3 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวในระดับถังหมัก.....66
4.4 การผลิตโปรตีเอสในถังหมัก.....82
4.5 การลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมัก.....88
4.6 สมบัติทางกายภาพของยางดิบที่ผลิตได้.....92
4.7 ลักษณะพื้นผิวและภาคตัดขวางของยางดิบที่ผลิตได้.....96

5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....98

รายการอ้างอิง.....101
ภาคผนวก.....107
ภาคผนวก ก. สูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์.....108
ภาคผนวก ข. กราฟมาตรฐานสำหรับใช้ในการวิเคราะห์.....111
ภาคผนวก ค. การเจริญเติบโตของเชื้อในการศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ และการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ.....113
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....152

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ส่วนประกอบของเนื้อยางแห้ง……	8
2.2	บริษัทผู้ผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุนทรีย์……	21
2.3	ชนิดของจุนทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวในเชิงพาณิชย์……..	26
2.4	การใช้เอนไซม์โปรตีเอสจากพืชและสัตว์……...	29
4.1	สมบัติทางกายภาพของยางดิบที่ผลิตได้……..……..……...	92
ค.1	การเจริญเติบโตของเชื้อ *E. fibuligera* TISTR 5097……	113
ค.2	การเจริญเติบโตของเชื้อ *C. utilis* TISTR 5001……..	114
ค.3	การเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25……...	115
ค.4	การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5 (g/l)…….	116
ค.5	การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 10 (g/l)……..	117
ค.6	การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 (g/l)……..	118
ค.7	การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 20 (g/l)……..	119
ค.8	น้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังปริมาณต่างๆ……..	120
ค.9	เปอร์เซ็นต์โปรตีนจริงภายในเซลล์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังปริมาณต่างๆ…….....	121
ค.10	การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 2 (g/l)……..	122
ค.11	การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 5 (g/l)……..	123
ค.12	การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 7 (g/l)……..	124
ค.13	การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 10 (g/l)……	125
ค.14	น้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณต่างๆ……..	126
ค.15	ปริมาณกรัมเซลล์ต่อแป้งมันสำปะหลังเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณต่างๆ…….....	127
ค.16	เปอร์เซ็นต์โปรตีนจริงภายในเซลล์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณต่างๆ…….....	128
ค.17	การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในถังหมักใช้อัตราการกวน 150 rpm……...	129
ค.18	การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในถังหมักใช้อัตราการกวน 200 rpm……...	130
ค.19	การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในถังหมักใช้อัตราการกวน 250 rpm……...	131
ค.20	การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในถังหมักใช้อัตราการกวน 300 rpm……...	132

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ค.21	ผลของอัตราเร็วในการกวนต่างๆที่มีต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง……..	133
ค.22	ผลของอัตราเร็วในการกวนต่างๆที่มีต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนจริงภายในเซลล์……...	134
ค.23	ผลของอัตราเร็วในการกวนต่างๆที่มีต่อปริมาณกรัมเซลล์ต่อแป้งมันสำปะหลัง……	135
ค.24	ผลของอัตราเร็วในการกวนต่างๆที่มีต่อโปรตีเอสแอคติวิตี……	136
ค.25	การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในถังหมักใช้อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm……	137
ค.26	การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในถังหมักใช้อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm……	138
ค.27	การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในถังหมักใช้อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm……	139
ค.28	ผลของอัตราการให้อากาศต่างๆที่มีต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง……...	140
ค.29	ผลของอัตราการให้อากาศต่างๆที่มีต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนจริงภายในเซลล์…….	141
ค.30	ผลของอัตราการให้อากาศต่างๆที่มีต่อปริมาณกรัมเซลล์ต่อแป้งมันสำปะหลัง……..	142
ค.31	ผลของอัตราการให้อากาศต่างๆที่มีต่อโปรตีเอสแอคติวิตี……..	143
ค.32	การเจริญเติบโตเมื่อใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* 5% v/v แบบ washed cell……	144
ค.33	การเจริญเติบโตเมื่อใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* 5% v/v แบบ cell suspension……...	145
ค.34	การเจริญเติบโตเมื่อใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* 10% v/v แบบ cell suspension…….	146
ค.35	การเจริญเติบโตเมื่อใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* 15% v/v แบบ cell suspension…….	147
ค.36	เปรียบเทียบโปรตีเอสแอคติวิตีเมื่อใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* ชนิดและปริมาณต่างๆ.....	148
ค.37	ผลของระยะเวลาในการกวนต่อการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ……	149
ค.38	ผลของปริมาณสารละลาย10 % SDS ต่อการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ……...	150
ค.39	ผลของอัตราเร็วในการกวนต่อการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ……..	151

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะอนุภาคยางธรรมชาติ……	6
2.2	สูตรโครงสร้างแบบต่างๆของพอลิไอโซพรีน……..……	6
2.3	ส่วนประกอบต่างๆของน้ำยางสดเมื่อหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง…	10
2.4	ไดอะแกรมแสดงขั้นตอนการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว……	19
2.5	การเตรียมวัตถุดิบเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว……	19
3.1	ถังหมักและชุดอุปกรณ์ควบคุมที่ใช้ในงานวิจัย……	35
4.1	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. fibuligera* TISTR 5097……..	50
4.2	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. utilis* TISTR 5001……	51
4.3	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25…….……	52
4.4	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5 (g/l).....	53
4.5	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 10 (g/l).....	54
4.6	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 (g/l).....	55
4.7	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 20 (g/l)……..	56
4.8	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง ปริมาณต่างๆ.....	57
4.9	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์โปรตีนจริงภายในเซลล์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี แป้งมันสำปะหลังปริมาณต่างๆ……..…..	58
4.10	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี แอมโมเนียมซัลเฟต 2 (g/l)….....	59
4.11	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี แอมโมเนียมซัลเฟต 5 (g/l)……	60
4.12	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี แอมโมเนียมซัลเฟต 7 (g/l)……	61
4.13	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี แอมโมเนียมซัลเฟต 10 (g/l)….....	62

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.14	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณต่างๆ.....	63
4.15	เปรียบเทียบปริมาณกรัมเซลล์ต่อแป้งมันสำปะหลังเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณต่างๆ……	64
4.16	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์โปรตีนจริงภายในเซลล์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณต่างๆ…….....	65
4.17	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในถังหมักใช้อัตราการกวน150 rpm….....	67
4.18	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในถังหมักใช้อัตราการกวน 200 rpm……...	68
4.19	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในถังหมักใช้อัตราการกวน 250 rpm……..……	69
4.20	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในถังหมักใช้อัตราการกวน 300 rpm…….....	70
4.21	ผลของอัตราเร็วในการกวนต่างๆที่มีต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง……..……	71
4.22	ผลของอัตราเร็วในการกวนต่างๆที่มีต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนจริงภายในเซลล์……...	72
4.23	ผลของอัตราเร็วในการกวนต่างๆที่มีต่อปริมาณกรัมเซลล์ต่อแป้งมันสำปะหลัง……	73
4.24	ผลของอัตราเร็วในการกวนต่างๆที่มีต่อโปรตีเอสแอคติวิตี……	74
4.25	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในถังหมักใช้อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm….....	75
4.26	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในถังหมักใช้อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm….....	76
4.27	รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในถังหมักใช้อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm….....	77
4.28	ผลของอัตราการให้อากาศต่างๆที่มีต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง……..…….	78
4.29	ผลของอัตราการให้อากาศต่างๆที่มีต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนจริงภายในเซลล์…….	79
4.30	ผลของอัตราการให้อากาศต่างๆที่มีต่อปริมาณกรัมเซลล์ต่อแป้งมันสำปะหลัง……..	80
4.31	ผลของอัตราการให้อากาศต่างๆที่มีต่อโปรตีเอสแอคติวิตี……..	81

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.32	รูปแบบการเจริญเติบโตเมื่อใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* 5% v/v แบบ washed cell…….....	82
4.33	รูปแบบการเจริญเติบโตเมื่อใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* 5% v/v แบบ cell suspension 64h.....	83
4.34	รูปแบบการเจริญเติบโตเมื่อใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* 5% v/v แบบ cell suspension 72h.....	84
4.35	รูปแบบการเจริญเติบโตเมื่อใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* 10% v/v แบบ cell suspension….....	85
4.36	รูปแบบการเจริญเติบโตเมื่อใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* 15% v/v แบบ cell suspension……...	86
4.37	เปรียบเทียบโปรตีเอสแอคติวิตีเมื่อใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* ชนิดและปริมาณต่างๆ……	87
4.38	ผลของระยะเวลาในการกวนต่อการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ……	89
4.39	ผลของปริมาณสารละลาย10 % SDS ต่อการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ……...	90
4.40	ผลของอัตราเร็วในการกวนต่อการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ……..	91
4.41	เปรียบเทียบปริมาณ เถ้า ไนโตรเจน สิ่งสกปรก และสิ่งระเหย ของที่ยางผลิตกับชุดควบคุม……...	93
4.42	เปรียบเทียบค่าความหนืดมูนี ค่าการอ่อนตัวเริ่มต้น และดัชนีความอ่อนตัว ของที่ยางผลิตกับชุดควบคุม……..	94
4.43	พื้นผิวของยางดิบแห้งชุดควบคุมเมื่อส่อง SEM …….	96
4.44	พื้นผิวของยางดิบแห้งที่ผลิตได้จากกระบวนการเมื่อส่อง SEM……..	96
4.45	ภาคตัดขวางของยางดิบแห้งชุดควบคุมเมื่อส่อง SEM ……...	97
4.46	ภาคตัดขวางของยางดิบแห้งที่ผลิตได้จากกระบวนการเมื่อส่อง SEM……	97
ข.1	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของลอรี.....	111
ข.2	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟูริก.....	111
ข.3	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีเอสแอคติวิตี.....	112

คำย่อ

ASTM	American Society for Testing and Materials
BSA	Bovine Serum Albumin
DRC	Dry Rubber Content
NB	Nutrient Broth
phr	part per hundred of rubber
P_0	initial plasticity
PRI	Plasticity Retention Index
rpm	round per min
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SEM	scanning electron microscope
TISTR	Thailand Institute of Science and Technological Research
U	Unit of enzyme activity
vvm	volume of air per volume of broth per min
YM	Yeast - Malt media

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของโครงการ

ในช่วงต้นทศวรรษ 1950 ประชากรโลกได้เผชิญกับปัญหาการขาดแคลนอาหารประเภทโปรตีน นักวิทยาศาสตร์พยายามศึกษาหาแหล่งอาหารประเภทโปรตีนสำหรับเป็นอาหารมนุษย์ (Food) หรือเป็นอาหารสัตว์ (Feed) โดยให้ความสำคัญแก่โปรตีนจากจุลินทรีย์ จึงเริ่มมีการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของจุลินทรีย์และการผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์ได้มีการพัฒนามากขึ้น ความต้องการนำโปรตีนเซลล์เดี่ยวของจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์เป็นอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์ ทำให้มีการศึกษาเรื่องการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากจุลินทรีย์มากยิ่งขึ้น โดยในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 1 และ 2 ประเทศแถบยุโรปมีการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารมนุษย์ โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตคือ *Candida. utilis* ซึ่งเป็นยีสต์ที่เจริญเติบโตได้เร็ว มีปริมาณโปรตีนสูง อุดมด้วยวิตามินบีรวม และเจริญเติบโตได้ในวัตถุดิบหลายชนิด (Rose,1979a) ในประเทศอังกฤษใช้ประโยชน์จากยีสต์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการทำเบียร์เป็นอาหารสัตว์ ส่วนประเทศไทยเริ่มมีการทดลองใช้ยีสต์เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ เนื่องจากแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ ซึ่งได้จากกากถั่วเหลืองและปลาป่นมีราคาสูงและหายาก ดังนั้นการผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์จึงเป็นแหล่งโปรตีนสำคัญอีกแหล่งหนึ่งที่สมควรนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ เพราะมีปริมาณโปรตีนสูงสามารถเลี้ยงได้ในระยะเวลาสั้น วัตถุดิบราคาถูก และประหยัดเนื้อที่ในการผลิต จากการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกอย่างรวดเร็ว นำมาสู่การขาดแคลนอาหารประเภทโปรตีน ดังนั้นโปรตีนจากจุลินทรีย์จึงมีความสำคัญอย่างมากในการเป็นแหล่งอาหารทดแทนแหล่งอาหารจากพืชและสัตว์ ซึ่งนับวันมีราคาแพงและหายากมากขึ้น ในอนาคตการขาดแคลนอาหารย่อมเป็นปัญหาใหม่สำหรับมนุษย์ เพราะอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกสูงมาก ในขณะที่อัตราการเพิ่มของอาหารคงที่และมีแนวโน้มลดลง นอกจากนั้นความต้องการแหล่งอาหารประเภทโปรตีนสำหรับใช้ในการเลี้ยงสัตว์มีมากขึ้น

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตยางธรรมชาติที่สำคัญของโลก รองลงมาคืออินโดนีเซีย และมาเลเซีย ยางธรรมชาติที่ผลิตได้เกือบทั้งหมดถูกส่งออกไปยังต่างประเทศ จึงสมควรที่ประเทศไทยจะปรับตัวเพื่อพัฒนาการผลิตและคุณภาพทั้งยางธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ยางให้สามารถแข่งขันกับต่างประเทศได้ รวมทั้งหาแนวทางเพื่อเพิ่มปริมาณการใช้ยางในประเทศให้มากขึ้นเพื่อทดแทนการนำเข้า ผลผลิตยางธรรมชาติส่งออกของไทย แบ่งออกเป็น 6 ประเภทคือ ยางแผ่นดิบ น้ำยางข้น

ยางแท่ง ยางแผ่นผึ่งแห้ง ยางเครพและอื่นๆ อุตสาหกรรมผลิตยางดังกล่าวของประเทศ ส่วนใหญ่เป็นอุตสาหกรรมขนาดกลางและขนาดย่อม ปัญหาสำคัญที่อุตสาหกรรมเหล่านี้ประสบอยู่คือ การขาดแคลนเทคโนโลยีการผลิต รวมทั้งปัญหาด้านวัตถุดิบที่คุณภาพไม่สม่ำเสมอ และมีผลไปถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้มาตรฐาน จึงจำเป็นที่จะต้องพัฒนาคุณภาพวัตถุดิบยางและผลิตภัณฑ์ยางให้ได้

ในช่วงประมาณ 10 ปี มานี้ มีรายงานการแพ้โปรตีนที่มาจากถุงมือยางธรรมชาติในโรงพยาบาลในต่างประเทศ ทำให้หลายประเทศที่สั่งนำเข้าผลิตภัณฑ์จากน้ำยางธรรมชาติพยายามที่จะกำหนดมาตรฐานเกี่ยวกับปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ ประเทศไทยซึ่งเป็นผู้ผลิตทั้งน้ำยางข้นและผลิตภัณฑ์จากน้ำยางข้นต้องพึ่งตลาดต่างประเทศเป็นหลัก จึงอยู่ในภาวะที่จะได้รับผลกระทบโดยตรง มีการศึกษาทั้งในและต่างประเทศเกี่ยวกับการกำจัดโปรตีนออกจากน้ำยางธรรมชาติ อีกทั้งมีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้ ซึ่งเป็นการแพ้ชนิดรุนแรง และบางรายอาจเสียชีวิตในเวลาเพียง 10 วินาที

การใช้เอนไซม์ในการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติจึงเป็นอีกแนวทางที่ควรศึกษาโดยเฉพาะเอนไซม์จากจุลินทรีย์ งานวิจัยนี้ใช้ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งมีสมบัติในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งคาดว่าน่าจะสามารถย่อยและลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติให้ลดน้อยลงได้ ในขณะเดียวกันก็มีการเลี้ยงเชื้อ *Endomycopsis fibuligera* TISTR 5097 และ *Candida utilis* TISTR 5001 เพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว เพื่อสามารถให้ประโยชน์ในการเป็นอาหารสัตว์ในกระบวนการผลิตที่มีการใช้สารอาหารเดียวกันได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อผลิตยางธรรมชาติที่มีโปรตีนน้อยลง ควบคู่ไปกับการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว

1.3 ขั้นตอนการวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2. การหาปริมาณวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวระดับขวดทดลอง
3. การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวในถังหมัก
4. ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสเพื่อใช้ในการย่อยโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ
5. ศึกษาการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติในถังหมัก
6. ทดสอบสมบัติทางกายภาพและตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยางแผ่นดิบแห้งที่ผลิตได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ได้วิธีการใหม่ในการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์
2. ได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนและวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโปรตีนทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมโปรตีนและสารอาหารที่จำเป็นในอาหารสัตว์ทดแทนอาหารเสริมที่มีราคาสูง ซึ่งเป็นการลดต้นทุนค่าอาหารสัตว์
3. เป็นการลดกระบวนการและวัตถุดิบโดยการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบผสม เพื่อผลิตทั้งตัวเซลล์โปรตีนที่ใช้ประโยชน์เป็นอาหารสัตว์ควบคู่กับการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสซึ่งคาดว่าจะกำจัดหรือลดโปรตีนที่มีอยู่ในน้ำยางธรรมชาติเพื่อแก้ปัญหาการแพ้โปรตีนในยางธรรมชาติได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2. 1 ยางธรรมชาติ

ต้นยางพาราซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Hevea brasiliensis* เป็นต้นไม้ที่เจริญงอกงามได้ดีในประเทศแถบร้อนที่มีดินร่วน ต้องการฝนไม่มากไม่น้อย ของเหลวที่ได้จากการกรีดต้นยางพาราจะเป็นน้ำยางธรรมชาติ ซึ่งโดยทั่วไปสามารถกรีดน้ำยางธรรมชาติจากต้นยางพาราได้ตั้งแต่อายุ 7 ปีไปจนถึง 30 ปี

1) น้ำยางสด

น้ำยางธรรมชาติเป็นส่วนของไซโตพลาสซึมที่อยู่ภายในท่อน้ำยาง สามารถทำให้ไหลออกมาจากท่อน้ำยาง โดยวิธีกรีด หรือเจาะ จะพบนิวเคลียสจำนวนมากติดอยู่ข้างๆท่อน้ำยาง แต่ไม่ค่อยพบปะปนอยู่ในส่วนน้ำยางหลังกรีด เป็นไปได้ว่านิวเคลียสนี้มีส่วนสำคัญในการควบคุมกระบวนการสร้างน้ำยางขึ้นมา สำหรับส่วนของไมโตคอนเดรีย สามารถตรวจพบปริมาณจำนวนมาก ติดอยู่ภายในส่วนของท่อน้ำยางที่ยังอ่อนอยู่ แต่จะมีปริมาณลดลงเมื่อท่อน้ำยางอายุมากขึ้น ในน้ำยางซึ่งกรีดได้จากต้นยางจะพบไมโตคอนเดรียปริมาณน้อยมาก

ส่วนของท่อน้ำยาง มีลักษณะเป็นท่อที่เกิดจากเซลล์ต่อกัน โดยตรงปลายของแต่ละเซลล์จะทะลุถึงกัน และมีส่วนเชื่อมโยงถึงกันเป็นตาข่าย หากดูตามแนวตัดขวางของท่อน้ำยาง จะเห็นเป็นรูปค่อนข้างกลมเรียงอยู่รอบแกนของลำต้น แต่ถ้าดูตามแนวลำต้น จะพบท่อน้ำยางเรียงเป็นแนวยาวเชื่อมติดกันหลายๆท่อ ซึ่งท่อน้ำยางจากท่อหนึ่งสามารถไหลไปอีกท่อหนึ่งได้ และท่อน้ำยางจะไหลเวียนจากขวาไปซ้าย เมื่อท่อน้ำยางถูกตัดจากการกรีดยาง น้ำยางธรรมชาติจึงไหลออกมาสู่ภายนอกเป็นน้ำยางสด

น้ำยางสดที่มาจากการกรีดจากต้นยางพารา มีลักษณะเป็นของเหลวสีขาวขุ่นเหมือนน้ำนม มีสภาพเป็นคอลลอยด์หรือสารแขวนลอย มีความหนาแน่นอยู่ระหว่าง 0.975 ถึง 0.98 กรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ประมาณ 6.5 ถึง 7.0 (เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรังสี , 2540)

น้ำยางสดมีลักษณะเป็นสารละลายคอลลอยด์ ชนิดไฮโดรโซล กล่าวคือเป็นสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย และมีอนุภาคยางลอยอยู่ แต่มีลักษณะพิเศษกว่าไฮโดรโซลทั่วไปคืออนุภาคยางมีลักษณะทั้งชอบน้ำ (hydrophilic) กระจายได้ง่ายเมื่อมีน้ำเป็นตัวกลาง และลักษณะที่

ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จึงไม่ยอมรวมกับน้ำ แต่ลักษณะไม่ชอบน้ำจะเด่นกว่า (เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตร์)

น้ำยางธรรมชาติเป็นสารที่ไม่บริสุทธิ์ เมื่อกรีดจากต้นยาง มีปริมาณของเนื้อยางแห้งอยู่ระหว่างร้อยละ 25 ถึง 45 ความแตกต่างระหว่างปริมาณสารที่เป็นของแข็ง และสารที่เป็นเนื้อยางแห้งประมาณร้อยละ 3 (แต่เมื่อนำน้ำยางมาปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแล้ว ความแตกต่างจะลดลงเหลือเพียงประมาณร้อยละ 1.5) ส่วนประกอบต่างๆในน้ำยาง สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่คือ (เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรังสี, 2540)

ส่วนที่เป็นเนื้อยางร้อยละ	35
ส่วนที่ไม่ใช่ยางร้อยละ	65
ส่วนที่เป็นน้ำร้อยละ	55
ส่วนของลูทอยด์และสารอื่นร้อยละ	10

(1) ส่วนของเนื้อยางแห้ง

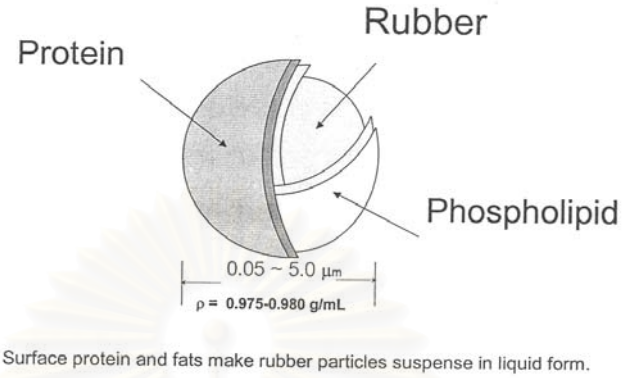
เนื้อยางเป็นเม็ดเล็กๆ รูปร่างคล้ายลูกแพร์ หรือเรียกว่า globules ประกอบด้วยสารไฮโดรคาร์บอนประมาณร้อยละ 92 และสารอย่างอื่นที่มิใช่ยางอีกร้อยละ 8 ปนอยู่ สารที่มิใช่ยางดังกล่าวนี้ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เกลือแร่ เรซิน และเอนไซม์ สิ่งที่มิใช่ยางเหล่านี้แม้ว่าจะมีเพียงปริมาณเล็กน้อยแต่ก็มีอิทธิพลเป็นอย่างมากต่อการอบความร้อนให้คงรูป และต่อสมบัติอื่นๆของยางเป็นอย่างมาก (พิชัย สราญรมย์, 2527) ทั้งนี้เนื่องจากสารเหล่านี้สามารถเป็นตัวเร่ง และตัวกระตุ้นอย่างอ่อนๆสำหรับการคงรูปของยางได้

- อนุภาคยาง

อนุภาคยางถูกห่อหุ้มด้วยสารจำพวกไขมัน และโปรตีน โดยโปรตีนนี้จะอยู่ชั้นนอก และอาจมีโลหะบางชนิดเช่นแมกนีเซียม โปตัสเซียม และทองแดงปะปนอยู่ปริมาณเล็กน้อยประมาณร้อยละ 0.5

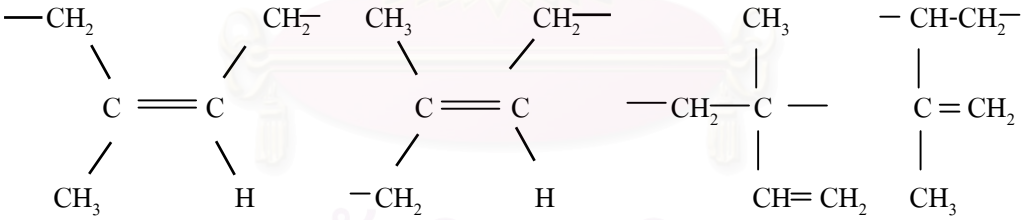
โดยปกติอนุภาคยางจะแขวนลอยในน้ำ มีความหนาแน่นเท่ากับ 0.92 กรัมต่อมิลลิลิตร ลักษณะอนุภาคยางเป็นรูปค่อนข้างทรงกลม มีขนาดอนุภาคแตกต่างกันมากคือ อยู่ระหว่าง 0.02 ถึง 2 ไมโครเมตร (200-20,000 อังสตรอม) อนุภาคยางส่วนใหญ่จะมีขนาดเกิน 0.4 ไมโครเมตร (4,000 อังสตรอม) มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยประมาณ 1.2 ไมโครเมตร เมื่อนำน้ำยาง

สดมาปั่นด้วยความเร็วสูง พบว่าอนุภาคยางที่มีขนาดใหญ่จะแยกตัวออกจากชั้นน้ำขึ้นมาอยู่ด้านบน ซึ่งสามารถแยกออกได้เป็นน้ำยางข้น ส่วนอนุภาคยางที่มีขนาดเล็กจะปนอยู่กับหางน้ำยาง สามารถแยกออกโดยการทำให้จับตัวเป็นก้อนด้วยกรด (เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรังสี, 2540)



รูปที่ 2.1 ลักษณะอนุภาคยางธรรมชาติ (เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรังสี, 2540)

จากการศึกษาพบว่า องค์ประกอบของยางธรรมชาติประกอบด้วยสารไฮโดรคาร์บอน คือ พอลิไอโซพรีน $((C_5H_8)_n)$ ซึ่งได้จากหน่วยของไอโซพรีนต่อกันแบบหัวต่อหาง ข้อที่น่าสังเกตอีกประการหนึ่งคือ พอลิไอโซพรีนสามารถเกิดเป็น ไอโซเมอร์ได้ ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างแบบต่างๆของพอลิไอโซพรีน (เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรังสี, 2540)

จากการศึกษาด้วยรังสีเอ็กซ์ พบว่ายางธรรมชาติประกอบด้วยสายโซ่โมเลกุลของพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างเกือบทั้งหมดเป็น ซีส-1,4 ดังนั้น ชื่อทางเคมีที่แท้จริงของยางธรรมชาติคือ ซีส-1,4 พอลิไอโซพรีน และจากการค้นคว้าด้วยไออาร์ ก็ยืนยันว่า ยางธรรมชาติประกอบด้วย ซีส-1,4 พอลิไอโซพรีน ประมาณร้อยละ 97

- โปรตีน

ส่วนของสารพวกโปรตีนที่ห่อหุ้มอยู่ตรงผิวรอบนอกของอนุภาคยาง จะมีอยู่ประมาณร้อยละ 25 ของโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำยาง ส่วนที่เหลือประมาณร้อยละ 50 จะอยู่ในชั้นน้ำ และอีกร้อยละ 25 จะปะปนอยู่ในส่วนของสารลูทอยด์ โปรตีนส่วนที่อยู่ในน้ำยางส่วนใหญ่เป็นชนิด แอลฟากลูบูลิน และฮีวิน

ส่วนนอกสุดของอนุภาคยาง มีโปรตีนห่อหุ้มอยู่ประมาณร้อยละ 1 ของอนุภาคยาง ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนชนิด แอลฟากลูบูลิน ซึ่งไม่ละลายในน้ำกลั่น แต่ละลายในกรด ด่าง และเกลือ มีค่าจุดไอโซอิเล็กทริกที่ pH 4.8 อนุภาคยางจะรวมตัวกันอย่างรวดเร็วที่ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของแอลฟากลูบูลินละลายได้น้อยที่สุด สำหรับโปรตีนที่ห่อหุ้มผิวรอบนอกของอนุภาคยางซึ่งเป็นพวกฮีวิน สามารถละลายในน้ำได้ มีค่าจุดไอโซอิเล็กทริกที่ pH 4.5 จะป้องกันอนุภาคยางมารวมตัวกัน เมื่อมีการสูญเสียน้ำเช่น การเติมแอลกอฮอล์ หรือ กรดอะซิติก อนุภาคยางจะเกิดการรวมตัวกันเป็นก้อนแยกออกจากส่วนของซีรัม โปรตีนบนผิวของอนุภาคยางนี้ มีส่วนประกอบของกำมะถัน (crystine disulphide linkage) อยู่ประมาณร้อยละ 5 ดังนั้นขณะที่น้ำยางเกิดการสูญเสียสภาพ จะเกิดการบูดเน่า โดยโปรตีนส่วนนี้จะสลายตัวให้สารประกอบพวกไฮโดรเจนซัลไฟด์ และสารเมอร์แคปแทน ทำให้มีกลิ่นเหม็น (เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรังสี, 2540)

- ไขมัน

ไขมันซึ่งอยู่ระหว่างผิวของอนุภาคยาง และโปรตีน ส่วนใหญ่เป็นสารจำพวกฟอสโฟไลปิด ชนิดแอลฟาเลซิทิน เชื่อว่าทำหน้าที่ยึดโปรตีนให้เกาะอยู่บนผิวของอนุภาคยาง

น้ำยางในสภาวะที่เป็นด่างเช่น มีแอมโมเนียอยู่ (ประมาณร้อยละ 0.6 ขึ้นไป) ฟอสโฟไลปิดจะถูกไฮโดรไลซ์ เป็นกรดไขมันที่มีโมเลกุลยาว ซึ่งจะรวมตัวกับแอมโมเนียกลายเป็นสบู่ ทำให้น้ำยางมีความเสถียรยิ่งขึ้น แต่กรณีที่มีแอมโมเนียปริมาณน้อย (ประมาณร้อยละ 0.2 ในน้ำยาง) การไฮโดรไลซิสจะเกิดขึ้นน้อย การเพิ่มความเสถียรของน้ำยางจึงจำเป็นต้องเพิ่มสบู่ หรือ สารอื่นที่ช่วยในการเก็บรักษาน้ำยางเพิ่มลงไป

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบของเนื้อยางแห้ง (เสาวณีย์ ก่อวุฒิกุลรังสี, 2540)

ส่วนประกอบ	ร้อยละ
เนื้อยางไฮโดรคาร์บอน	86
น้ำ กระจายอยู่ในเนื้อยาง	10
สารโปรตีน	1
สารพวกไขมัน	3

(2) ส่วนที่ไม่ใช่ยาง

- ส่วนที่เป็นน้ำ หรือซีรัม

ซีรัมของน้ำยาง หรือเรียกว่าส่วน C-serum มีความหนาแน่นประมาณ 1.02 กรัมต่อมิลลิลิตร ประกอบด้วยสารชนิดต่างๆ คือ

- คาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรตเป็นสารพวกแป้ง และน้ำตาลมีอยู่ในน้ำยางประมาณร้อยละ 1 น้ำตาลส่วนใหญ่เป็นชนิดคิวบราซิทอลมีน้ำตาลชนิดกลูโคส ซูโครส ฟรุกโตส ปริมาณเล็กน้อย น้ำตาลเหล่านี้จะถูกแบคทีเรียใช้เป็นอาหาร เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายตัวให้กรดโมเลกุลที่มีขนาดเล็กๆทำให้น้ำยางเกิดการสูญเสียสภาพ และรวมตัวเป็นก้อน กรดเหล่านี้เป็นกรดที่ระเหยได้ง่ายจึงเรียกชื่อว่า VFA (volatile fatty acid) ประกอบด้วย กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และกรดโพรไพโอนิก เป็นต้น ดังนั้น ค่ากรดไขมันระเหยได้จึงเป็นตัวเลขที่บ่งถึงความสามารถในการรักษาสภาพของน้ำยาง โดยน้ำยางที่เก็บรักษาดีจะมีค่ากรดไขมันระเหยได้ต่ำประมาณ 0.01 ถึง 0.02 (ตามมาตรฐานสากลของน้ำยางข้น กำหนดให้มีค่ากรดไขมันระเหยได้ไม่เกิน 0.2 หน่วย)

- โปรตีน และกรดอะมิโน

โปรตีน และกรดอะมิโนเป็นส่วนที่อยู่ในซีรัมของน้ำยาง มีค่าจุดไอโซอิเล็กทริกหลายค่า โปรตีนที่มีค่าจุดไอโซอิเล็กทริกสูงสามารถสลายตัวให้ประจุบวกได้ เป็นสาเหตุให้น้ำยางสูญเสียสภาพ ซึ่งโปรตีนที่พบมากในน้ำยางสดส่วนใหญ่เป็นโปรตีนประเภท

อัลฟากลูโบลีน ซึ่งมีสมบัติของสารตรงผิวของโมเลกุลมีความว่องไว ดังนั้นโดยทั่วไปจะอยู่ระหว่างรอยเชื่อมต่อของน้ำ-อากาศ และน้ำมัน-น้ำ

- ส่วนของลูทอยด์และสารอื่นๆ

- ลูทอยด์

ลูทอยด์ เป็นอนุภาคค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 ถึง 3 ไมโครเมตร หุ้มด้วยเยื่อบางๆภายในเยื่อบางนี้ เรียกส่วนนี้ว่า B-serum จะมีทั้งสารละลายและสารที่แขวนลอยมีค่า pH 5.5 ส่วนใหญ่ประกอบด้วยโปรตีน โดยมีโปรตีนที่ละลายน้ำอยู่ประมาณร้อยละ 3 และมีส่วนของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำอยู่ประมาณร้อยละ 2 นอกจากนี้ยังมีส่วนของสารพวกฟอสโฟไลปิดแขวนลอยประมาณร้อยละ 0.5 และมีน้ำตาลและสารพวกพอลิฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ยางมีสีเหลือง หรือสีคล้ำเมื่อสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ ของเหลวในลูทอยด์มีค่า pH 5.5 โดยประมาณ ลูทอยด์ห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อชั้นเดียวสามารถเกิดการออสโมซิสได้ง่าย ดังนั้นการเติมน้ำยางสด จะทำให้ลูทอยด์บวมและแตกง่าย ขณะที่ลูทอยด์เกิดการพองตัวมีผลทำให้น้ำยางมีความหนืดเพิ่มขึ้น และเมื่อลูทอยด์แตกความหนืดก็จะลดลง

ในสภาพของอากาศร้อน อุณหภูมิสูงขึ้นมีผลทำให้ลูทอยด์แตกได้เช่นกัน โดยของเหลวภายในลูทอยด์จะขยายตัว และแตกออก เมื่อลูทอยด์แตกของเหลวภายในซึ่งเป็นสารแขวนลอยที่มีประจุบวก และอิออนของโลหะเช่น แคลเซียมอิออน และแมกนีเซียมอิออน จะปะปนรวมกันอยู่ภายในซีรัม ทำให้อนุภาคยางเกิดการรวมตัวกัน ก่อให้เกิดการอุดตันท่อน้ำยาง มีผลทำให้น้ำยางหยุดไหลหลังกรีด ส่วนเนื้อเยื่อบางของลูทอยด์ที่แตกออก มีรูปร่างไม่แน่นอนจะเกิดจากการจับตัวกันเองเป็นก้อน ติดอยู่บนผิวนอกของอนุภาคยาง ทำให้ยางมีขนาดโตขึ้น และเกิดการเคลื่อนที่ได้ช้าลง เป็นสาเหตุหนึ่งทำให้น้ำยางเกิดการเสียสภาพได้ หากเติมแอมโมเนียลงไปในน้ำยางสด จะพบว่าส่วนของลูทอยด์ และสารพวกโลหะแมกนีเซียมจะรวมตัวกับแอมโมเนีย เกิดการตกตะกอนเป็นตมสีน้ำตาล และสีม่วง แยกตัวออกจากเนื้อยาง และเกาะรวมกันอยู่ด้านล่างสามารถแยกออกได้

- อนุภาคเฟรย์ – วิสลิ่ง (frey wyssling)

อนุภาคเฟรย์ – วิสลิ่ง เป็นสารไม่ใช่ยางมีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าอนุภาคยาง แต่ความหนาแน่นน้อยกว่า มีรูปร่างค่อนข้างกลม มีผนังล้อมรอบสองชั้น มีปริมาณไม่มากนัก ประกอบด้วยเม็ดสีคาโรตินอยด์ ซึ่งทำให้ยางมีสีเหลืองเข้ม สามารถรวมตัวกับแอมโมเนียและแยกตัวออกจากยางมาอยู่ในส่วนของซีรัม

หากนำน้ำยางสดมาปั่นด้วยความเร็วสูงประมาณ 20,000 รอบต่อนาที จะสามารถแยกน้ำยางออกได้ 4 ส่วน เรียงจากด้านบนถึงด้านล่างของภาชนะดังนี้

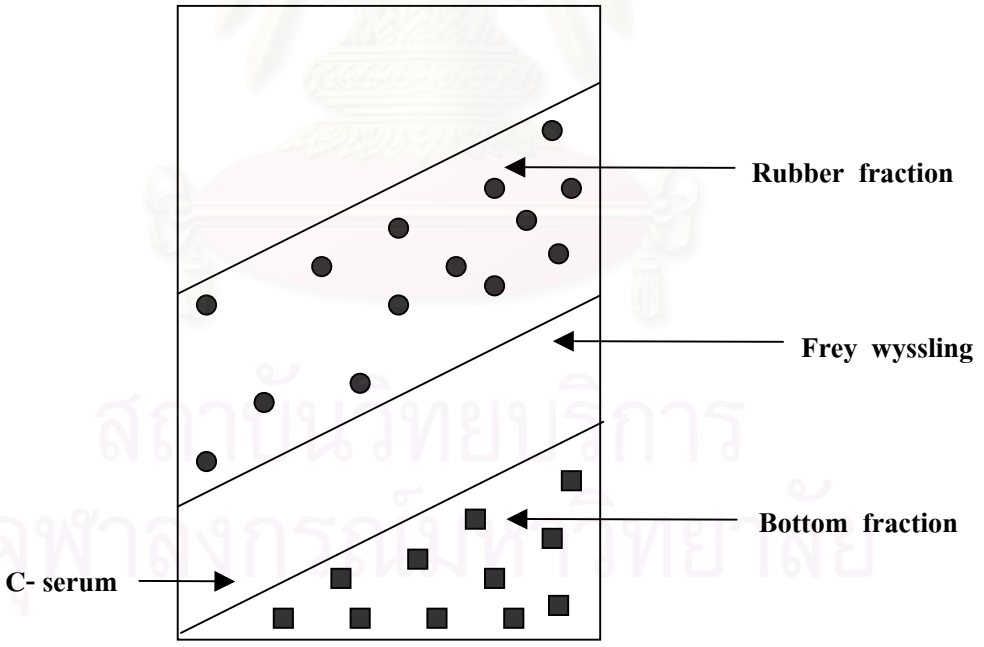
- ส่วนของเนื้อยาง
- อนุภาคเฟรย์ – วิสลิ่ง
- ซีรัม
- ตะกอนสีเหลือง หรือขาว ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารพวกลูทอยด์

ส่วนของเนื้อยางอยู่ด้านบนสุด มีลักษณะเป็นครีมสีขาว เป็นอนุภาคของยาง อาจมีของแข็งอื่น เช่น อนุมูลของโลหะอื่นเจือปนบ้างเล็กน้อย

ส่วนที่อยู่ติดกับเนื้อยางมีลักษณะเป็นอนุภาคเช่นเดียวกับยางแต่มีสีเหลือง เป็นอนุภาคของเฟรย์ – วิสลิ่ง เวลาปั่นมักปนอยู่ในส่วนของซีรัม

ซีรัมจะมีสีใสปนเหลืองเป็นฟองง่าย ส่วนใหญ่ประกอบด้วย โปรตีน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม ทองแดงและแมกนีเซียม

ส่วนที่อยู่ชั้นล่างสุด เป็นตะกอนสีเหลือง น้ำตาลคล้ำ หรือสีขาว ส่วนใหญ่เป็นสารพวกโลหะหนักเช่น แมกนีเซียม ฟอสฟอรัสและขี้เถ้า



รูปที่ 2.3 ส่วนประกอบต่างๆของน้ำยางสดเมื่อหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรังสี, 2540)

2) น้ำยางข้น

น้ำยางข้น หมายถึง น้ำยางสดที่ผ่านการไล่น้ำออกไปบางส่วนเพื่อให้มีปริมาณเนื้อยางแห้งเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 60 ของน้ำหนักน้ำยางทั้งหมด ปัจจุบันความต้องการน้ำยางข้นเพิ่มมากขึ้น จึงได้ปรับปรุงวิธีการผลิตน้ำยางข้นให้มีสมบัติที่ดีขึ้น

น้ำยางสดจากสวน ยังไม่เหมาะจะนำไปใช้ในงานอุตสาหกรรม เนื่องจากมีร้อยละเนื้อยางต่ำ ดังนั้นจึงมีวิธีการผลิตน้ำยางข้นเพื่อแยกส่วนที่ไม่ใช่ยางออกไปทำให้ร้อยละเนื้อยางสูงขึ้น และง่ายต่อการเก็บรักษา

การผลิตน้ำยางข้นในทางการค้าแบ่งออกเป็น 4 วิธีคือ

- วิธีทำให้เกิดครีม
- วิธีใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง
- วิธีทำให้น้ำระเหย
- วิธีการแยกด้วยไฟฟ้า

แต่วิธีที่นิยมมากในปัจจุบันคือวิธีใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง น้ำยางข้นที่ได้สามารถนำไปทำผลิตภัณฑ์ยางสำเร็จรูปได้แทบทุกชนิด เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ใช้เรียกว่า latex separator หรือ latex concentrator เป็นการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกยางซึ่งเบากว่า (ความถ่วงจำเพาะ 0.92) ออกจากของเหลวที่หนักกว่า (ความถ่วงจำเพาะ 1.02)

น้ำยางข้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท

(1) HA latex (High Ammonia latex) ใช้แอมโมเนียสูงถึง 0.7 เปอร์เซ็นต์เพื่อรักษาสภาพน้ำยาง

(2) LA latex (Low Ammonia latex) ใช้แอมโมเนีย 0.2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำยาง และสารเคมีอื่นๆ เช่น boric acid 0.2 เปอร์เซ็นต์ santrobrite 0.2 เปอร์เซ็นต์ อยู่ด้วย เป็นต้น

น้ำยางข้นสามารถนำไปแปรรูปเป็นยางวัตถุดิบขั้นต้น (crude rubber) ได้หลายชนิด ขึ้นอยู่กับว่าจะต้องการนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายประเภทใด น้ำยางข้นก็จัดว่าเป็นยางวัตถุดิบขั้นต้นชนิดหนึ่ง นอกจากน้ำยางข้นแล้วยังมียางประเภทอื่นๆ อีกเช่น ยางแผ่น ยางแผ่นรมควัน ยางแผ่นผึ่งแห้ง ยางเครพและยางแท่ง เป็นต้น

แต่ไม่ว่าการที่นำน้ำยางมาแปรสภาพให้เป็นอะไรต่อไปก็ตาม จะต้องกรองน้ำยางเอาฝุ่นผงและสิ่งสกปรกออกเสียก่อน มิฉะนั้นสิ่งที่ได้จากการแปรสภาพไปนั้นจะไม่อยู่ในมาตรฐาน แม้ว่าจะยังจำหน่ายได้ก็ตาม

3) การจับตัวของน้ำยาง (บุญธรรม นิธิอุทัย, 2530)

น้ำยางสดสามารถจับตัวได้เองตามธรรมชาติโดยไม่ต้องเติมสารเคมี แต่การจับตัวอย่างสมบูรณ์ของน้ำยางธรรมชาตินั้นต้องใช้เวลานานมาก (มากกว่า 36 ชั่วโมง) จึงจะได้ก้อนยางที่พอจับถือเคลื่อนย้ายไปสู่ขั้นตอนการผลิตต่อๆไป ดังนั้นถ้าต้องการน้ำยางสดไปผลิตเป็นยางดิบแห้งชนิดต่างๆ จึงทำให้น้ำยางจับตัวในระยะเวลาที่กำหนดเพื่อเป็นการประหยัดเวลาและเนื้อที่ที่ใช้ในการเก็บรักษา และเพื่อให้ได้ก้อนยางจับตัวที่มีลักษณะตรงกับความต้องการ ทั้งนี้โดยการใช้สารเคมีทำให้น้ำยางจับตัว (coagulant) สารเคมีที่ทำให้น้ำยางจับตัวที่สำคัญ ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เมื่อกรดแตกตัวจะให้อนุมูลไฮโดรเจน (H^+) และอนุมูลนี้จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลลบของคาร์บอกซิเลต ($R.COO^-$) ที่อยู่รอบๆอนุภาคยาง

$$H^+ \quad + \quad R.COO^- \longrightarrow \quad R.COOH \text{ (fatty acid)}$$

เกิดกรดไขมัน (fatty acid) ขึ้นรอบๆอนุภาคยาง กรดนี้ไม่ละลายน้ำ ไม่แตกตัวเป็นน้ำ เมื่อเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวพลังงานรอบๆอนุภาคยางลดลงเป็นศูนย์ ชั้นห่อหุ้มอนุภาคยางแฟบลง ส่วนของโมเลกุลที่เป็นน้ำ (hydration sheath) ที่เคยห่อหุ้มอนุภาคยางอยู่แต่เดิมจะกระจายไปน้ำยางขณะนี้จึงอยู่ในสภาพจับตัวเป็นก้อนโคแอกูลัมอย่างรวดเร็ว

สารเคมีที่ทำให้น้ำยางจับตัวนิยมใช้กรดกำมะถัน เพราะมีราคาถูก แต่ไม่แนะนำในการใช้กรดกำมะถันในการทำยางแท่งและยางแผ่นเพราะจะทำให้ยางมีสีไม่สวย และยังทำให้ยางมีปริมาณผลเถ้าสูงอีกด้วย (บุญธรรม นิธิอุทัย, 2530)

4) การรักษาสภาพของน้ำยาง (วราภรณ์ ขจรไชยกุล, 2534)

น้ำยางสด เป็นสารแขวนลอยที่มีส่วนของอนุภาค (rubber particle) แขวนลอยกระจายอยู่ในตัวกลางที่เรียกว่า serum ในน้ำยางมีส่วนของสารโปรตีน ส่วนหนึ่งของสารโปรตีนนี้จะดูดซับอยู่รอบผิวอนุภาคยาง (hydrated protein envelope) ชั้นห่อหุ้มนี้มีความสำคัญต่อสถานะความคงตัวเป็นของเหลวของน้ำยาง เพราะชั้นโปรตีนนี้ป้องกันไม่ให้อนุภาคยางรวมตัวกัน

นอกจากชั้นโปรตีนจะห่อหุ้ม ทำหน้าที่รักษาสถานะการเป็นของเหลวให้น้ำยางแล้ว ในชั้นโปรตีนนี้ ยังมีอนุมูลลบของคาร์บอกซีเลต (carboxylate $R.COO^-$) ซึ่งก่อให้เกิดการผลักกันระหว่างอนุภาคยาง นั่นคือน้ำยางคงสภาพเป็นของเหลวอยู่ได้ด้วยปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือชั้นโปรตีนที่ห่อหุ้มอนุภาคยาง และอนุมูลประจุลบของคาร์บอกซีเลต

การเสียสภาพจากการเป็นของเหลวของน้ำยาง จะเกิดขึ้นเมื่อมีการทำลายปัจจัยสำคัญทั้งสองดังกล่าวข้างต้น เช่นการสูญเสียน้ำ (dehydrated) ในชั้นโปรตีน การทำลายอนุมูลลบของ

คาร์บอกซีเลต เมื่อสภาพของน้ำยางถูกกระทบกระเทือนดังกล่าวนี้ จะทำให้อนุภาคยางจับตัวกันเป็นก้อน เรียกว่า โคแอกูลัม (coagulum) แยกจากส่วนของ serum

5) โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ (Hasma H., 1992)

(1) ลักษณะของโปรตีนในน้ำยางสด

น้ำยางธรรมชาติประกอบด้วยอนุภาคยางที่แขวนลอยกระจายอยู่ในของเหลวที่เรียกกันว่า serum นอกจากอนุภาคยางแล้วยังมีองค์ประกอบอื่นที่ไม่ใช่ยาง ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และสารอนินทรีย์อื่นๆ เช่น แมกนีเซียม แคลเซียม เหล็ก สังกะสี ทองแดง และแมงกานีส เป็นต้น โดยที่โปรตีนที่เป็นหนึ่งในสารที่ไม่ใช่ยางนี้จะมีอยู่ประมาณ 1.5 % โดยเฉลี่ยหรือคิดเป็น 30-50 มิลลิกรัมต่อกรัมยางแห้ง โปรตีนในน้ำยางนี้จะกระจายอยู่ในส่วนที่เป็นเนื้อยาง 27 % ในส่วน B-serum 25 % และ C- serum 48 % ดังมีรายละเอียดดังนี้

- โปรตีนที่อยู่ในส่วนเนื้อยางจะเกาะอยู่ที่ผิวของอนุภาคยาง ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถถูกสกัดได้โดยสารลดแรงตึงผิว เช่น sodium dodecyl sulphate (SDS) หรือตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ตัวทำละลายผสม chloroform- methanol แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนในส่วนของเนื้อยางบางส่วน (1 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อยางแห้ง) สามารถละลายน้ำได้และสามารถสกัดได้ด้วยแอมโมเนีย โปรตีนส่วนนั้นเป็นโปรตีนที่มีค่า Isoelectric point (pI) ระหว่าง 3.5-6.0 น้ำหนักโมเลกุล 14.0 และ 66.0 กิโลดาลตัน (kD)

- โปรตีนที่อยู่ในส่วน serum เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่อยู่ใน B-serum และ C - serum ประกอบด้วย cationic และ anionic proteins ที่มีค่า pI (ค่า pH ที่ประจุรวมของโปรตีนมีค่าเป็นศูนย์) ตั้งแต่ 3.5-9.5 และมีน้ำหนักโมเลกุล ตั้งแต่น้อยกว่า 14 กิโลดาลตัน เช่น Hevein (5 kD) มีค่า pI 4.7 พบได้ใน B-serum ไปจนถึงมากกว่า 100 kD แต่ส่วนใหญ่เป็น anionic proteins ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 14.0 และ 66.0 kD

(2) ลักษณะของโปรตีนในน้ำยางข้น

น้ำยางข้นเป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์จากน้ำยางชนิดต่างๆ ทำจากน้ำยางสดซึ่งมีปริมาณเนื้อยางแห้งประมาณ 60 % เพื่อให้สะดวกในการนำไปขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ การทำน้ำยางข้นสามารถทำได้ 3 วิธี คือ การใช้เครื่องปั่นแยก การทำให้เป็นครีมและการระเหยน้ำ แต่น้ำยางข้นที่ผลิตในเชิงอุตสาหกรรมจะเป็นน้ำยางข้นที่ได้โดยวิธีการใช้เครื่องปั่นแยก เมื่อน้ำยางสดจากต้นยางผ่านกระบวนการไปเป็นน้ำยางข้น ทำให้โปรตีนในยางบางส่วนสูญเสียไปกับ serum ที่ถูกแยกออกไป และปริมาณโปรตีนสามารถลดลงจาก 30-50 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อยางแห้งไปเป็น 16-26 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อยางแห้ง ซึ่งกระจายอยู่ระหว่างส่วนของเนื้อยางและส่วนของ serum

โปรตีนที่เกาะอยู่ที่อนุภาคยางเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 14.0และ 24.0 kD เช่นเดียวกับในน้ำยางสด แต่เรื่องของปริมาณอาจลดลงเนื่องจากถูกสกัดออกมาจากผิวเม็ดยางโดยแอมโมเนียที่ใช้รักษาสภาพน้ำยาง โปรตีนที่เหลืออยู่ในน้ำยางข้นส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 14.0 kD

(3) โปรตีนกับอาการแพ้ (พญ. สุวิราภร โอภาสวงศ์, 2539)

การแพ้ยางเป็นที่รู้จักในวงการแพทย์มากว่า 60 ปีแล้ว โดยที่ลักษณะการแพ้เป็นแบบผิวหนังอักเสบบริเวณที่สัมผัสยาง ซึ่งอาจเป็นถุงมือยาง รองเท้าแตะยาง ถุงยางอนามัย จากการทดสอบภูมิแพ้ทางผิวหนังพบว่าเกิดจากอาการแพ้สารที่ใช้ในกระบวนการผลิตยาง ได้แก่สารที่ใช้เป็นตัวเร่ง (accelerator) และสารป้องกันออกซิเดชัน (antioxidation) การแพ้ลักษณะนี้ไม่เป็นอันตราย เมื่อหยุดสัมผัสผื่นก็จะหายไป

ต่อมาเมื่อปี พ.ศ. 2522 มีรายงานการแพ้โปรตีนในยางเป็นรายแรกโดยเป็น การแพ้แบบเฉียบพลัน ลักษณะเป็นผื่นลมพิษโดยที่ไม่มีการแพ้สารที่ใช้ในกระบวนการผลิตยางอย่างที่เคยทราบกัน ตั้งแต่นั้นมาแพทย์นานาชาติก็ให้ความสำคัญต่อการแพ้ชนิดนี้ ช่วง 10 ปี หลังจากนี้การการรายงานการแพ้โปรตีนจากยางธรรมชาติเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยรายงานมากกว่า 600 ราย ที่เกิดการแพ้ยางแบบเฉียบพลันและรุนแรง โดยที่ในจำนวนนี้มี 16 ราย มีอาการถึงแก่ชีวิตด้วย

จากการสำรวจประชากรทั่วไปในสหรัฐอเมริกาและฟินแลนด์พบว่าประมาณ 1-2% ของประชากรมีการแพ้ยาง ผู้ที่มีโอกาสแพ้ยางสูง ได้แก่

- บุคลากรทางการแพทย์ มีการศึกษาสถิติพบว่าบุคลากรทางแพทย์มีการแพ้ได้ 4-11 % ขึ้นอยู่กับความบ่อยของการใช้ถุงมือยาง โดยเฉพาะศัลยแพทย์และพยาบาลห้องผ่าตัด ยิ่งในปัจจุบันการใช้ถุงมือยางเพื่อป้องกันการติดเชื้อเอดส์ จึงทำให้มีอัตราการแพ้สูง
- ผู้ที่มีอาชีพสัมผัสกับยางทุกวัน เช่น ผู้ที่ทำงานในโรงงานทำถุงมือยาง ทำเครื่องมือแพทย์จากยาง
- ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางระบบประสาทตั้งแต่กำเนิดที่มีการใส่สายสวนทางเดินปัสสาวะบ่อยๆทำให้มีโอกาสสัมผัสกับยางโดยการสัมผัสทางเนื้อเยื่อ เช่น เยื่อบุทางเดินอาหารทวารหนัก ซึ่งทำให้อัตราการแพ้เพิ่มมากขึ้น
- ผู้ป่วยที่ได้รับการสวนสายเอกซเรย์ทางเดินอาหาร (barium enema) ด้วยสายยางที่มีปลายเป็นยาง

สำหรับอาการของผู้ที่แพ้มีตั้งแต่เล็กน้อยไปจนถึงมากได้ คือ ตั้งแต่อาการแสบๆคันๆ เวลาใส่ถุงมือยางใหม่อาจมีผื่นหรือไม่ก็ได้ ผื่นอาจเป็นแค่ผื่นแดง บวมแบบมีลมพิษ มีอาการน้ำมูก น้ำตาไหล หรือในรายที่เป็นมานานๆจะเกิดผื่นแบบผิวหนังอักเสบได้ ในบางครั้งทำให้เกิดอาการระคายเคือง คัน แสบ ภายหลังจากใส่ถุงมือนานเป็นชั่วโมงหรือน้อยกว่า ในรายที่แพ้มากอาจ

มีอาการทางระบบภายในร่วมด้วย คือ อาการแน่นหน้าอกหายใจไม่ออก ปวดท้อง ท้องเสีย หอบ หืด หรือถึงแก่ความตายได้ อาการอาจค่อยเป็นค่อยไปหรือรุนแรงในครั้งแรกก็ได้

การพิสูจน์การแพ้แบบผิวหนังอักเสบ ทำได้โดยการทดสอบปิดแผ่นหลังโดยวิธีแพทช์เทส (patch test) ส่วนการแพ้แบบเฉียบพลันทำได้โดยการสะกิดผิวหนัง (prick test) เนื่องจากมีรายงานว่าการทดสอบด้วยวิธีนี้อาจทำให้เกิดการแพ้ถึงแก่ชีวิตได้เหมือนกับการทดสอบด้วยยาเพนนิซิลิน จึงแนะนำให้ทดสอบขั้นต้นด้วยการทดสอบโดยการใช้ (use test) ก่อน โดยใช้ถุงมือตัดออกเฉพาะนิ้วนาน 15 นาที ถอดออกแล้วอ่านผล ถ้าไม่เกิดอาการให้ใส่ทิ้งไว้ทั้งมือ 15 นาที หากไม่เกิดอาการจึงทำการทดสอบด้วยวิธีสะกิด โดยใช้ถุงมือของผู้ป่วยและสารมาตรฐาน

การป้องกันการแพ้ยางโดยการหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับยางเป็นสิ่งที่เป็นไปได้ยาก โดยเฉพาะบุคลากรทางแพทย์ หากรู้ว่าแพ้ถุงมือยางให้ใช้ถุงมือที่ทำจากยางสังเคราะห์ เช่น neoprene glove หรือ vinyl glove หรือใส่ถุงมือผ้าไว้ก่อนใส่ถุงมือยาง

ในปัจจุบันปัญหานี้ยังไม่มีรายงานในประเทศไทย แต่เป็นสิ่งที่ไม่ควรประมาทเพราะสามารถทำให้เกิดอันตรายถึงชีวิตได้

น้ำยางผสมสารเคมีจะมีปริมาณโปรตีนที่สกัดได้อยู่ประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อยางแห้ง ซึ่งเป็นผลมาจากการมี KOH และสารลดแรงตึงผิวจึงสามารถทำการละลายโปรตีนได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามการให้ความร้อนกับน้ำยางผสมสารเคมีหรือแผ่นฟิล์มที่ได้จากน้ำยางผสมสารเคมีนั้นทำให้สามารถวัดปริมาณโปรตีนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นถึง 2 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อยางแห้ง หรือมากกว่า และแม้จะทำการชะละลายสารเคมี (leaching) เพื่อลดปริมาณสารตกค้างได้บ้าง (การชะละลายสารเคมีที่ตกค้างเป็นวิธีมาตรฐานในกระบวนการผลิตถุงมือยาง โดยมีจุดประสงค์ที่จะชะละลายสารที่ละลายน้ำได้ออกไป เพื่อลดการเกิดสีขุ่น การเปลี่ยนสีหรือการดูดน้ำของผลิตภัณฑ์) การชะละลายนี้สามารถทำได้ 2 แบบ คือ แบบ dry film leaching หมายถึงเมื่อผ่านการทำให้คงรูปแล้ว จึงผ่านไปในถังชะละลายทำให้แห้งแล้วถอดออกจากพิมพ์ และแบบ wet gel leaching ซึ่งหมายถึงเมื่อจุ่มพิมพ์ลงในถังน้ำยาง ทำให้หมาด แล้วผ่านไปในถังชะละลาย ก่อนทำให้แห้งและทำให้คงรูปตามลำดับ โดยที่การชะละลายเป็นกระบวนการที่ควบคุมโดยการแพร่ของสารเคมีในตัวกลาง 2 แบบ (diffusion controlled process) การทำ wet gel leaching จะมีประสิทธิภาพมากกว่า dry film leaching ในการกำจัดสารที่ละลายน้ำได้ แต่ในขั้นตอนการทำให้แห้ง ก็ทำให้ฟิล์มได้รับความร้อนอีก และจะวัดปริมาณโปรตีนที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้น ด้วยเหตุนี้การทำให้การทำ dry film leaching มีความจำเป็นในกระบวนการผลิตถุงมือยางและถุงยางอนามัย ซึ่งต้องเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณโปรตีนที่สกัดได้น้อย อย่างไรก็ตาม wet gel leaching ก็สามารถกำจัดโปรตีนได้ในระดับหนึ่ง แต่การที่ถุงมือในพิมพ์ต้องผ่านขั้นตอนการทำให้ยางคงรูปซึ่งใช้อุณหภูมิประมาณ 120 องศาเซลเซียสนั้น จะทำให้โปรตีนเคลื่อนย้ายมาอยู่ที่ผิวของถุงมือยาง เมื่อมีการตรวจปริมาณโปรตีนก็

จะได้ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้มากเช่นเดิม ส่วน dry film leaching นั้น หลังการชะละลายควรทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อป้องกันการเคลื่อนย้ายของโปรตีนมาที่ผิวของถุงมือยาง (นุชนาฎ ณ ระนอง และ วราภรณ์ ขจรไชยกุล, 2539)

ในเนื้อยางพบว่ามีโปรตีนปริมาณเล็กน้อย โดยโปรตีนจะเกาะและถูกดูดซับอยู่ที่ผิวของอนุภาคยาง ประกอบด้วยโปรตีนที่มีขั้วหรือชอบน้ำ (hydrophilic) ของโปรตีน เชื่อว่าจะมีผลต่อสมบัติของยางในหลายๆส่วน โปรตีนทำให้เกิดการ crosslink บางส่วนมากเกินไป อีกทั้งทำให้ค่ามอดูลัสเปลี่ยนไปด้วยเพราะมีความไวต่อความชื้น น้ำจะถูกดูดซับด้วยโปรตีนและสารที่ชอบน้ำอื่นๆ ทำให้เพิ่มค่า stress relaxation หรือง่ายต่อการเสียรูปของยางเมื่อรับแรง เป็นผลให้ค่ามอดูลัสลดลง จากปัญหาข้างต้นจะเห็นว่าการผลิตยางที่มีโปรตีนต่ำมากจะช่วยปรับปรุงสมบัติของยางได้ (พรฤดี มุ่งสมานกูล, 2535)

โดยสรุปการกำจัดโปรตีนมี 3 วิธีใหญ่ๆด้วยกันคือ

- การกำจัดทางเคมี โดยแช่ยางในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 24 ชั่วโมง โปรตีนจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยปฏิกิริยาเคมี
- การกำจัดด้วยวิธีชะละลายออกจากผิวยาง เช่นใช้สารลดแรงตึงผิวหรือตัวทำละลาย และมีการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวในการไล่โปรตีนออกจากเม็ดยาง
- การกำจัดทางชีวเคมี โดยใช้เอนไซม์ชนิด proteolytic เช่น papain, trypsin, alcalase เป็นต้น ซึ่งจะไฮโดรไลซ์โปรตีนเป็นเพปไทด์และกรดอะมิโนสายสั้นๆ ทำให้ละลายน้ำได้ต่อไป

H. Y. Yeang และ Faridah Yusof (1993) ศึกษาความแตกต่างระหว่างปริมาณ extractable protein ที่ชะละลายได้จากผิวด้านในและด้านนอกของถุงมือตรวจโรคที่ผลิตจากยางธรรมชาติ พบว่า ปริมาณ extractable protein ที่ถูกชะละลายจากถุงมือยางบริเวณผิวด้านในมีมากกว่าด้านนอก คิดเป็นอัตราส่วนโดยเฉลี่ย 26.7 เท่า และปริมาณ extractable protein ที่ถูกชะละลายออกจากผิวด้านในบริเวณนิ้วของถุงมือยางมีมากกว่าด้านนอก

A. R. Shamsul Bahli, Samsidar Hamzah และ H. Y. Yeang (1993) ได้พิสูจน์ว่า แป้งข้าวโพดและสารช่วยในการจับตัวไม่ใช่สาเหตุที่ทำให้ปริมาณ extractable protein ที่ผิวด้านในถุงมือยางมีมากกว่าผิวด้านนอก เนื่องจากมีข้อสันนิษฐาน 2 ประการ ดังนี้

- ในกระบวนการผลิตนั้น แป้งข้าวโพดจะถูกนำมาใช้เป็นสารหล่อลื่น เพื่อให้

ใส่ถุงมือยางได้สะดวก ดังนั้นก่อนถอดถุงมือยางออกจากพิมพ์ ถุงมือยางจะถูกจุ่มลงแป้งข้าวโพด ดังนั้นแป้งข้าวโพดจะเคลือบอยู่ที่ผิวด้านในของถุงมือยาง เมื่อถอดถุงมือยางออกจากพิมพ์แล้วมีการสันนิษฐานว่า แป้งข้าวโพดอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ปริมาณ extractable protein ที่ผิวด้านในถุงมือยางมีมากกว่าด้านนอก โดยเม็ดแป้งจะให้ extractable protein มาเกาะที่เม็ดแป้ง

- แบบพิมพ์ของถุงมือยางก่อนที่จะจุ่มลงในน้ำยาง จะถูกเคลือบที่ผิวด้วยสารที่ช่วยในการจับตัว สันนิษฐานว่าสารนั้นจะขวางกั้นไม่ให้ extractable protein ถูกชะละลายออกจากผิวได้ จากการทดลองพบว่าแป้งข้าวโพดและสารช่วยในการจับตัวไม่มีผลต่อความแตกต่างของปริมาณ extractable protein ที่สกัดได้จากผิวด้านในและด้านนอกของถุงมือยาง

K.Makuuchi (1997) ได้ศึกษาผลของการวัลคาไนซ์ยางด้วยรังสี โดยใช้ฟิล์มยางที่ได้จากน้ำยางธรรมชาติวัลคาไนซ์ด้วยรังสี (RVNRL) หลังจากนั้นนำไปชะละลายพบว่า ปริมาณ extractable protein ต่ำลงเนื่องจาก โปรตีนดังกล่าวเสื่อมสลายด้วยอนุภาครังสี ทำให้มีโมเลกุลที่เล็กลงสามารถชะละลายออกด้วยน้ำได้ง่ายขึ้น ต่อมามีการศึกษาต่อเพื่อผลิตน้ำยางปราศจากโปรตีนโดยใช้ field latex หรือ HA-latex มาฉายรังสี เมื่อนำมาเจือจางด้วยน้ำแล้วทำการ centrifuge จะได้น้ำยางปราศจากโปรตีน

2.2 โปรตีนเซลล์เดี่ยว

โปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) เขียนย่อๆว่า SCP ก็คือโปรตีนจากจุลินทรีย์ซึ่งได้แก่ ยีสต์ สาหร่าย เชื้อรา และแบคทีเรีย ไม่จำเป็นจะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีเซลล์เดียว (unicellular) ซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และสาหร่ายบางชนิด แต่รวมถึงจุลินทรีย์ที่มีหลายเซลล์ (multicellular) ได้แก่ เชื้อราและสาหร่าย

โปรตีนเซลล์เดี่ยวเริ่มได้รับความสนใจเมื่อองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จัดตั้งหน่วยงานหนึ่ง เพื่อหาแหล่งโปรตีนใหม่สำหรับมนุษย์ ซึ่งจะต้องมีความปลอดภัยและเหมาะสำหรับเป็นอาหารของมนุษย์ (Food) หรือเป็นอาหารสัตว์ (Feed) หน่วยงานนี้คือ Protein Advisory Group โดยจัดตั้งเมื่อปี ค.ศ. 1955

สาเหตุที่โปรตีนเซลล์เดี่ยวเป็นที่สนใจเพราะการขาดแคลนอาหารโปรตีนในขณะที่จำนวนประชากรของโลกมีเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้ต้องหาแหล่งอาหารที่มีโปรตีนสูงมาทดแทนแหล่งโปรตีนเดิมที่มีราคาค่อนข้างแพงและมีปริมาณน้อยเช่น โปรตีนจากถั่วเหลือง โปรตีนจากเนื้อสัตว์ ดังนั้นจึงมุ่งไปที่การหาแหล่งโปรตีนจากจุลินทรีย์ ซึ่งก็คือโปรตีนเซลล์เดี่ยว โดยใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายในท้องถิ่น หรือเป็นวัสดุเหลือใช้ เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ส่วนใหญ่จะมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์อยู่สูง เป็นที่ยอมรับของนักเทคโนโลยีชีวภาพว่าการแปรรูป

สารอินทรีย์และอื่นๆในวัสดุเหลือใช้เป็นสารที่มีประโยชน์และมีราคา โดยใช้จุลินทรีย์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแปรรูปเป็นเซลล์จุลินทรีย์ที่มีโปรตีนและคุณค่าทางอาหารอื่นๆสูง เหมาะสำหรับเป็นอาหารสัตว์หรืออาหารเสริมในสัตว์ (Ravindra, A.P.,2000)

1) การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Moss และ Smith, 1977)

โปรตีนเซลล์เดี่ยวเป็นที่หวังว่าจะเป็นแหล่งอาหารโปรตีนของโลก ที่กำลังขาดแคลนอาหารโดยเฉพาะโปรตีน เพราะ

(1) ราคาถูก เนื่องจากใช้วัตถุดิบราคาถูก สามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด รวมทั้งวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมและการเกษตร

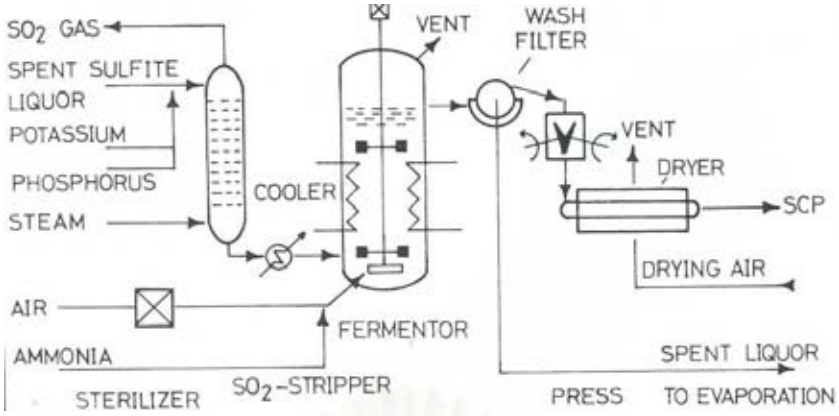
(2) การเลี้ยงใช้ระยะเวลาสั้น เนื่องจากมีอัตราการเจริญเร็ว โดยแบคทีเรียมีอัตราการเจริญสูงสุดคือประมาณ 0.3-2.0 ชั่วโมง ยีสต์รองลงมาคือ 1-3 ชั่วโมง สาหร่ายประมาณ 2-6 ชั่วโมง และเชื้อราประมาณ 4-12 ชั่วโมง

(3) ประหยัดเนื้อที่ในการผลิต ซึ่งถ้าเปรียบเทียบกับพืชหรือสัตว์ จะเห็นว่าการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวใช้พื้นที่น้อยกว่ามาก ในการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนเท่ากัน

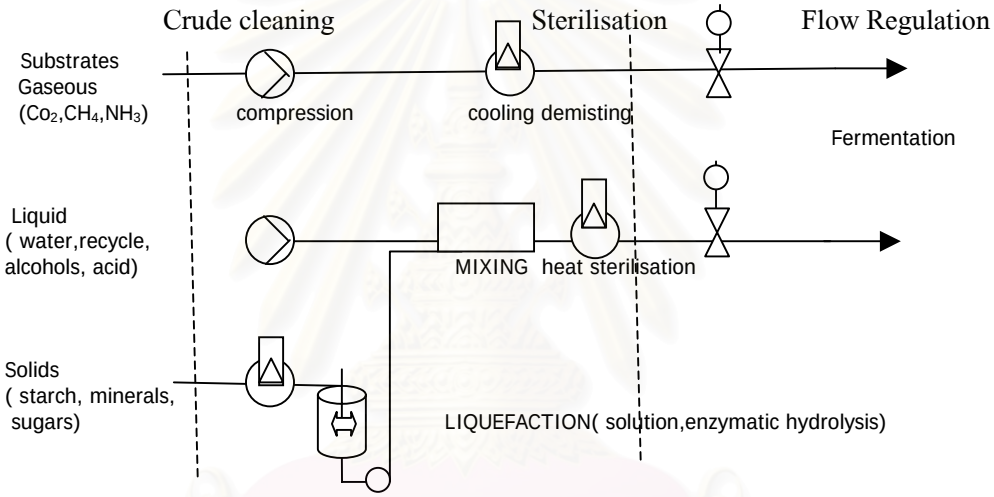
(4) มีโปรตีนสูงประมาณ 7-12 กรัม โปรตีนไนโตรเจน ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง มีกรดอะมิโนจำเป็นคล้ายกับสัตว์ แต่สังเคราะห์ได้เร็วกว่าพืชและสัตว์ ในโปรตีนเซลล์เดี่ยวจะมีไลซิน เมไทโอนินและทริปโตเฟน ซึ่งโปรตีนจากพืชมักจะขาด

ถึงแม้ว่าการใช้โปรตีนเซลล์เดี่ยวเป็นแหล่งอาหารโปรตีนจะมีข้อดีหลายประการดังกล่าว แต่การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวต้องใช้เทคโนโลยีที่สูงมาก รวมทั้งบุคลากรในการผลิตและควบคุมตลอดจนอุปกรณ์ที่ใช้ก็มีราคาสูงมาก จะต้องมีการศึกษาในแง่เศรษฐศาสตร์ควบคู่ไปกับการลงทุนอื่นๆ ซึ่งถ้าพิจารณาถึงผลในระยะยาวจะเห็นได้ว่าการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจะได้ผลตอบแทนที่คุ้มค่า ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวแบบมาตรฐานทั่วๆไป จะมีขั้นตอนต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.4 และรูปที่ 2.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.4 ไดอะแกรมแสดงถึงขั้นตอนการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Reedและ Nagodawithana,1995)



รูปที่ 2.5 การเตรียมวัตถุดิบเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Ravindra,2000)

ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวต้องการเซลล์ที่ประกอบด้วยโปรตีนสูง ส่วนคาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิค ไขมันต้องการปริมาณต่ำ และสามารถแข่งขันกับโปรตีนจากพืชหรือปลาป่นได้ ส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์นอกจากขึ้นกับชนิดของเชื้อแล้ว โดยทั่วไปขึ้นกับอาหารและสภาพการเจริญ ถ้าไนโตรเจนน้อยจะเป็นตัวจำกัดการเจริญเติบโต

2) วัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ ควรเป็นแหล่งอาหารและพลังงานที่เหมาะสมต่อการเติบโตของยีสต์ โดยพบว่าวัตถุดิบที่ได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมมีปริมาณมาก ก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานที่สำคัญ เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ส่วนใหญ่มีส่วนประกอบของสารอินทรีย์สูง เป็นที่ยอมรับ

ของนักเทคโนโลยีชีวภาพว่า การแปรรูปสารอินทรีย์และอื่นๆ ในวัสดุเหลือใช้เป็นสารที่มีประโยชน์และมีราคาโดยจุลินทรีย์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแปรรูปเป็นเซลล์จุลินทรีย์ที่มีโปรตีนที่มีคุณค่าทางอาหารอื่นๆสูง ซึ่งเหมาะสำหรับเป็นอาหารสัตว์หรืออาหารเสริมให้สัตว์ (Goldberg, 1985) สำหรับวัสดุเหลือใช้ทางธรรมชาติมีหลายประเภทที่นำมาใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ ส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบประเภทคาร์โบไฮเดรตสามารถแยกออกเป็นแซ็กคาไรด์ (saccharide) และพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ควรมีสารอาหารที่เหมาะสำหรับการเติบโตของยีสต์ โดยอยู่ในสภาพที่ง่ายต่อการนำไปใช้ พบว่าวัตถุดิบเหลือใช้ประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ ต้องผ่านกระบวนการปรับปรุง (pre-treatment) ก่อนนำไปใช้ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง (Hedenskog, 1973) ในขณะที่ Gaden (1974) แบ่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ ออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ ไฮโดรคาร์บอน และคาร์โบไฮเดรต

(1) ไฮโดรคาร์บอน

ไฮโดรคาร์บอนมีทั้งที่อยู่ในสภาพเป็นของเหลว เช่น เมทานอล เอทานอล และพาราฟิน ส่วนไฮโดรคาร์บอนในสภาพแก๊ส เช่น มีเทน บิวเทน โพรเพน และอีเทน เป็นต้น จุดเริ่มต้นที่สนใจใช้สารประกอบนี้เป็นวัตถุดิบเริ่มโดยบริษัท British Petroleum (BP) บริษัท Kanegafushi Chemical Industry และบริษัท Dianippon Ink Chemical ต่างสนใจใช้สารประกอบแอลเคนของปิโตรเลียมเป็นวัตถุดิบเพราะมีปริมาณมาก ราคาถูก และมีความบริสุทธิ์สูง แต่ในช่วงนั้นอยู่ในวิกฤตการณ์น้ำมัน ทำให้ความสนใจในการนำสารพวกนี้มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตมวลชีวภาพโดยใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งอาหาร ได้แก่ *C. utilis, C. tropicalis* และ *C. lipolytica* (Peppler, 1970) ขณะที่ Gharsallah (1993) ได้ศึกษาถึงความเป็นพิษของมวลชีวภาพของยีสต์เมื่อใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งอาหาร พบว่าองค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์มีสารพวกโลหะหนัก รวมทั้งสารประกอบพอลิไซคลิก (polycyclic) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง

(2) คาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส รวมทั้งของเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรม โดยวัตถุดิบที่เป็นแป้งหรือเซลลูโลสจะต้องผ่านกระบวนการย่อยทางเคมีหรือเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อน โดยเฉพาะมันสำปะหลังมีแป้งเป็นส่วนใหญ่ นิยมใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวเนื่องจากหาง่าย ราคาถูกและมีทุกฤดูกาล นอกจากนี้พบว่านิยมนำกากน้ำตาลและน้ำทิ้งจากโรงงานทำกระดาษ (spent sulfite waste liquor) มาใช้เป็นอาหารสำหรับการเลี้ยงยีสต์ (Snyder, 1970) สำหรับกากน้ำตาลเป็นของเหลือจากโรงงานน้ำตาลเป็นส่วนที่ไม่ตกผลึกของน้ำอ้อยเมื่อนำไปเคี่ยวทำน้ำตาล ในกากน้ำตาลมีน้ำตาลต่างๆมากมาย เช่น กลูโคส ฟรักโตสและซูโครส กากน้ำตาลที่นิยมใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์มี 2 ประเภทคือ

กากน้ำตาลจากอ้อย และกากน้ำตาลจากหัวบีท (Suomalainen และคณะ, 1970) นิยมนำมาเป็นแหล่งอาหารในการเลี้ยงยีสต์ *C. utilis* สำหรับการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของยีสต์ และ *S. cerevisiae* สำหรับใช้เป็นแหล่งอาหารในการผลิตเอธานอลและยีสต์ขนมอบ (baker' s yeast) ส่วนน้ำทิ้งจากโรงงานทำกระดาษมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 15-22 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลเฮกโซส นิยมนำมาใช้เลี้ยงยีสต์ *C. utilis* โดยเฉพาะในยุโรปนิยมเลี้ยงยีสต์ *C. tropicalis* (Peppler, 1968 ; Reed และ Peppler, 1973)

ตารางที่ 2.2 บริษัทผู้ผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ (Reed Nagodawithana, 1995)

ระดับการผลิต	บริษัท	ประเทศผู้ผลิต	วัตถุดิบ	ชนิดของจุลินทรีย์	ขนาดผลิต (ตันต่อปี)
วิจัยและการสาธิต	British petroleum	อังกฤษ	แอลเคน	ยีสต์	4,000
	Chinese Petroleum	ไต้หวัน	แอลเคน	ยีสต์	1,000
	Imperial Chemical Industries	อังกฤษ	เมทานอล	แบคทีเรีย	1,000
	Kanegafuchi	ญี่ปุ่น	แอลเคน	ยีสต์	5,000
	Milbrew	อังกฤษ	หางนม	ยีสต์	5,000
	Shell	เนเธอร์แลนด์	เมทานอล	แบคทีเรีย	1,000
	Svenska- Sockker	สวีเดน	แป้งมันฝรั่ง	ยีสต์	2,000
กึ่งการค้า	British Petroleum	อังกฤษ	น้ำมันก๊าซ	ยีสต์	20,000
	Imperial Chemical Industries	อังกฤษ	เมทานอล	แบคทีเรีย	50,000
	Unite Paper Mills	ฟินแลนด์	น้ำทิ้งโรงงานทำกระดาษ	ยีสต์	10,000
การค้า	British Petroleum	อังกฤษ	แอลเคน	ยีสต์	100,000
	Liquichimica Biosintesi	อิตาลี	แอลเคน	ยีสต์	100,000

Bhatacharjee (1970) รายงานว่าโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ มีทั้งสาหร่าย รา แบคทีเรีย และยีสต์ โดยรวบรวมคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตเป็นโปรตีน (ตารางที่ 1.5- 1.6) ดังนี้

- เติบโตได้เร็วในอาหารที่มีราคาถูก เป็นวัตถุดิบที่หาง่ายในท้องถิ่น
- เติบโตได้ดีในอาหารที่มีส่วนประกอบง่ายๆ มีความต้องการวิตามินและสารอาหารสำหรับการเติบโต (growth factor) ต่างๆน้อยหรือไม่ต้องการเลย
- คงลักษณะทางพันธุกรรมได้ดี ไม่กลายพันธุ์ง่ายเมื่อเลี้ยงติดต่อกันเป็นเวลานาน
- การแยกและเก็บเกี่ยวเซลล์ทำได้ง่ายไม่ยุ่งยาก
- มีความต้านทานต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ
- ทราบคุณสมบัติทางพันธุกรรม สรีรวิทยาและสามารถปรับปรุงทางด้านพันธุกรรมได้
- ใช้แหล่งพลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- หลังจากผ่านกระบวนการเลี้ยงแล้ว มีวัสดุเหลือทิ้งน้อยหรือไม่มีเลย
- ไม่เป็นพิษ และทำให้เกิดอาการภูมิแพ้
- ให้ปริมาณโปรตีนสูง โดยเฉพาะโปรตีนต้องมีกรดอะมิโนที่มีคุณค่า
- เก็บรักษาได้ง่าย เช่น การทำให้แห้งได้

ถึงแม้ว่าการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ เป็นแหล่งอาหารโปรตีนมีข้อดีหลายประการ แต่การผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ต้องอาศัยเทคโนโลยีในการผลิตสูงมาก รวมทั้งบุคลากรในการผลิตและควบคุม ตลอดจนอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาสูงมาก ดังนั้นในการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ต้องมีการศึกษาในแง่เศรษฐศาสตร์ควบคู่ไปด้วย เช่นเดียวกับการลงทุนอื่นๆ ถ้าพิจารณาถึงผลระยะยาวจะเห็นได้ว่าการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ได้ผลตอบแทนที่คุ้มค่า และสำหรับประเทศที่กำลังพัฒนาควรพยายามศึกษาหาทางใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสม (ดวงพร คันธโชติ, 2530 ; Ravindra, 2000)

ในการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ ต้องการเซลล์ที่ประกอบด้วยโปรตีนสูง ส่วนคาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก ไขมันต้องมีปริมาณต่ำ และสามารถแข่งขันกับโปรตีนจากพืชหรือปลาป่นได้ มีกลิ่นรสดี และที่สำคัญคือมีไลซีน เมไธโอนีนและทริปโตแฟนสูง ซึ่งโปรตีนจากพืชมักไม่มี ส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์นอกจากขึ้นกับชนิดของเชื้อแล้ว โดยทั่วไปขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะการเติบโต ตัวอย่างเช่น สัดส่วนของโปรตีนต่อไขมัน เป็นผลจากสัดส่วนของค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีในอาหาร ถ้ามีไนโตรเจนน้อยจะเป็นตัวจำกัดการเติบโต ไขมันจึงสะสมภายในเซลล์ โดยทั่วไปโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์มักขาดกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ แบคทีเรียมีแนวโน้มผลิตเมไธโอนีนได้มากกว่ายีสต์ แต่

ยีสต์มีไลซีนมากกว่าโปรตีนในข้าวสาลี จึงมีการเติมกรดอะมิโนจำเป็นบ้างในการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์บางชนิด วิตามินที่ได้จากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มวิตามินบีโดยเฉพาะจากยีสต์ ยกเว้นวิตามินบี 12 ที่ได้จากแบคทีเรีย (Scrimshaw และ Young, 1979)

3) ประเภทของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีน

(1) สาหร่าย

มีการดำรงชีวิตโดยใช้พลังงานแสงอาทิตย์เป็นแหล่งของพลังงานในการรีดิวซ์สารอนินทรีย์ ให้เป็นสารอินทรีย์ ข้อดีของสาหร่ายคือมีปริมาณโปรตีนสูงประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นโปรตีนที่มีคุณภาพ อุดมด้วยวิตามินซีและวิตามินบีรวม ข้อเสียของสาหร่ายคือ อัตราการเติบโตต่ำกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่น และถ้าเลี้ยงในถังหมักมีปัญหาการให้คาร์บอนไดออกไซด์และแสงแก่เซลล์สาหร่าย สาหร่ายที่ได้รับความสนใจใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีน ได้แก่ *Chlorella sp., Scenedesmus sp., Coelastrum sp., Urenema sp.* และ *Durvillea sp.* โดยเฉพาะ *Spirulina maxima* ชาวพื้นเมืองแอฟริกาและบางส่วนของเม็กซิโกใช้ผสมในอาหาร เนื่องจาก *Spirulina maxima* มีกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบและมีกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์ต่ำ (Reed และ Nagodawithana, 1995 ; Singh, 1998)

สำหรับราคาในการผลิต เช่นการผลิตสาหร่าย *Chlorella sp.* มีการศึกษาพบว่าราคาประมาณ 20 –50 เซนต์ต่อปอนด์ ซึ่งเป็นราคาที่สูง แต่ถ้าเลี้ยงในน้ำทิ้งจะมีราคาประมาณ 3-6 เซนต์ต่อปอนด์ (Udall et.al, 1984) สำหรับประเทศไทยมีบริษัทสยามแอลจีผลิต *Spirulina sp.* เมื่อผลิตแล้วจึงส่งไปขายยังประเทศญี่ปุ่นจำหน่ายเป็นอาหารบำรุงสุขภาพ และอาหารเสริมในสัตว์ ส่วนการเลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งเป็นการกำจัดน้ำทิ้งโดยได้เซลล์ของสาหร่ายมาเป็นแหล่งอาหารสัตว์หรือใช้ทำปุ๋ย หรือใช้หมักก๊าซชีวภาพ (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

(2) รา

ราที่ใช้เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์มานานก็คือเห็ด ซึ่งเป็นโปรตีนที่มนุษย์สามารถบริโภคได้โดยตรง เช่น *Aspergillus niger* (Singh et al, 1991) , *Penicillium cyclopium* (Kim และ Lebeault, 1981), *Agaricus campestris* ถูกใช้เป็นอาหารแถบยุโรป ส่วนประเทศจีนนิยมบริโภคเห็ด Cortinellus berkelyanus ในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ประเทศเยอรมัน ได้เลี้ยงราพวก *Geotrichum candidum* เป็นอาหารเสริมมนุษย์ (Goldberg, 1985) การใช้ราในการผลิตโปรตีนจำเป็นต้องเสริมด้วยเมไธโอนีน กรดกลูตามิก วิตามินบี 2 และวิตามินบี 12 ทั้งนี้เพราะมีกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ มีกรดนิวคลีอิกและวิตามินบีรวมต่ำ ข้อดีของราคือ เป็นที่ยอมรับได้ง่ายตลอดจนมีคุณ ค่าทางอาหารใกล้เคียงกับยีสต์ แต่อัตราการเติบโตต่ำกว่ายีสต์และ

แบคทีเรีย และมีปัญหาในการเลี้ยงเนื่องจากเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว เส้นใยราจะอยู่ในสภาพเป็นกลุ่มก้อน (pellet) ทำให้เกิดปัญหาในการให้ออกซิเจนแก่เซลล์ (Kihlberg, 1972 อ้างถึงใน ดวงพร คันธโชติ , 2530)

ราที่มีแนวโน้มว่าสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนคือ ราในกลุ่ม Imperfect fungi เพราะว่ามีอัตราการเติบโตและสามารถใช้วัสดุต่างๆเป็นแหล่งของคาร์บอนได้ เช่น มันฝรั่ง ข้าว ข้าวโพด มันสำปะหลัง กากน้ำตาล เยื่อกระดาษ และของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนแหล่งของไนโตรเจนคือ เกลืออนินทรีย์ สำหรับ *Fusarium sp.* และ *Rhizopus sp.* เหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีน เพราะมีซิสติน และเมไธโอนีนในปริมาณสูง โดยพบว่าโปรตีนในส่วนของเส้นใยรามีปริมาณต่ำกว่าในส่วนของ fruiting body ในประเทศฟินแลนด์ผลิตโปรตีนจากเชื้อรา *Paecilomyces varioti* โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานทำกระดาษ โดยใช้ถังหมัก 2 ถัง ผลิตเส้นใยแห้งได้ 15- 16.5 ตันต่อถังต่อวัน เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการกรองได้ผลผลิตประมาณ 0.55 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมอาหาร มีโปรตีน 52- 57 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ (Singh และคณะ, 1991)

(3) แบคทีเรีย

การศึกษาการใช้แบคทีเรียเป็นแหล่งอาหารโปรตีน เป็นที่สนใจมากขึ้น เนื่องจาก แบคทีเรียมีอัตราการเติบโตสูงกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่น คือ 20 –30 นาที ขณะที่ยีสต์หรือรามีอัตราการเติบโต 2-3 ชั่วโมง และ 4-16 ชั่วโมง ตามลำดับ มีปริมาณโปรตีนสูง โปรตีนในแบคทีเรียแต่ละชนิดมีปริมาณแตกต่างกันตั้งแต่ 47- 87 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่โปรตีนจากสาหร่าย รา และยีสต์ มีประมาณ 40, 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียมีกรดอะมิโนจำเป็นคือ เมไธโอนีน ทริปโตแฟน และซิสติน การปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียทำได้ง่ายเพื่อนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม แต่มีข้อเสียคือมีกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์ค่อนข้างสูงคือ 10 –16 เปอร์เซ็นต์ (ดวงพร คันธโชติ, 2530) และเซลล์มีขนาดเล็กทำให้เก็บเกี่ยวผลผลิตยาก แบคทีเรียที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนได้แก่ *Pseudomonas oleovarans, Pseudomonas aeruginosa, Corynebacterium sp., Alcaligenes sp.* แบคทีเรียที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในระดับอุตสาหกรรมที่พบมากใช้เมทานอลเป็นสารอาหาร เช่น Imperial Chemical Industries ผลิต *Methylophilus methylotrophus* และให้ชื่อผลิตภัณฑ์ว่าพรูทีน (pruteen) มีโปรตีน 70 –72 เปอร์เซ็นต์ ใช้เป็นอาหารสัตว์ ผลิตแบบต่อเนื่องโดยได้ผลผลิต 30 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร (Reed และ Nagodawithana, 1995)

Han และ คณะ (1971) เลี้ยง *Cellulomonas sp.* และ *Alcaligenes faecalis* ย่อยสลายชานอ้อยจากโรงงานน้ำตาลเปลี่ยนเป็นเซลล์จุลินทรีย์ ได้โปรตีน 46.2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีกรดอะมิโนครบถ้วน Tannenbaum และ Wang (1975) เลี้ยง *Methylomonas methanolica* โดยใช้มีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลผลิตมากกว่า 0.5 กรัม

น้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมเมทานอล อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดในระบบการเลี้ยงเชื้อแบบ ต่อเนื่องเท่ากับ 0.52 ต่อชั่วโมง มีโปรตีน 81 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีกรดอะมิโนครบถ้วน

(4) ยีสต์

มีรายงานว่ายีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดในการใช้เป็นแหล่งโปรตีนและมีการใช้กันแพร่หลายตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่สอง เนื่องจากขาดโปรตีน ยีสต์ที่นิยมใช้กันได้แก่ *Candida utilis* นอกจากนี้ยังมี *R. gracilis, S. cerevisiae, S. carlbergensis* และ *C. tropicalis*

- Food yeast (Dried yeast, Inactive dried yeast) เป็นเซลล์ยีสต์ที่มีคุณค่าทางอาหารและมีการปรับปรุงกลิ่นรสให้เหมาะสำหรับเป็นอาหารมนุษย์
- Feed yeast (fodder yeast) แตกต่างจาก food yeast ในเรื่องของคุณภาพ โดยที่ food yeast จะต้องมีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เชื้อราได้น้อยกว่า แต่ต้องมีวิตามิน โปรตีนสูงกว่า ตลอดจนมีการแต่งกลิ่นสีและรสให้เหมาะสมสำหรับรับประทาน โดยทั่วไปคำว่า fodder yeast มักหมายถึง torula yeast เพราะส่วนใหญ่ของ fodder yeast ได้จาก torula yeast ซึ่งเป็นการเลี้ยง *Candida utilis* (*Torulopsis utilis*) ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ที่ใช้อาหารได้กว้างรวมทั้งน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม เช่น น้ำตาลเพนโตส

(5) ยีสต์ที่นำมาใช้เป็นแหล่งอาหาร

- *Saccharomyces sp.* ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ เป็นพวก brewer's yeast
- Torula yeast (fodder yeast) คือเชื้อ *Candida utilis* ใช้ผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดี่ยวมากที่สุด เพราะเจริญเร็ว เลี้ยงง่าย โปรตีนสูง ใช้อาหารได้หลายชนิด

(6) กระบวนการที่ใช้ในการเลี้ยงยีสต์เพื่อเอาเซลล์

- Swedish Symba Process ใช้เชื้อ *Endomycopsis fibuligera* ซึ่งมีเอนไซม์ α และ β amylase เป็นส่วนใหญ่จะย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อน ส่วนเชื้อ *Candida utilis* จะใช้น้ำตาลในการเจริญโดยเชื้อชนิดหลังใช้เป็นแหล่งโปรตีนหลัก
- Amylo process ใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ *Rhizopus sp.*และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้แป้งเป็นวัตถุดิบซึ่งราจะย่อยแป้งเป็นน้ำตาลซึ่งเป็นอาหารของยีสต์ได้เซลล์ยีสต์เป็นโปรตีนเซลล์เดี่ยว

- Waldhof process ใช้ *Candida utilis* ใน sulfite waste liquor ในถังหมักแบบต่อเนื่อง ได้โปรตีน 55-60 %
- DSM. Oxanene-water process ใช้ *Candida lipolytica* และ *Trichosporon cutaneum* น้ำทิ้งจากการออกซิไดซ์ cyclohexane
- n-paraffin และ gas oil ใช้ *Candida lipolytica* โดยใช้ hydrocarbon เป็น substrate

ตารางที่ 2.3 ชนิดของจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ในเชิงพาณิชย์ (Waterworth, 1990)

จุลินทรีย์	วัตถุดิบ	บริษัทผู้ผลิต	ชื่อทางการค้า
รา			
Ascomycetes sp.	ปาล์ม	Paper Industry	Pekilo
แบคทีเรีย			
Methylophilus methylotrophus	เมทานอล	ICI	Pruteen
Methylophilus Clara	เมทานอล	Hoechst	Probion
Methylophilus Methanica	เมทานอล	Norsk-Hydro	Norprotein
Pseudomonas sp.	เมทานอล	Misubishi	
ยีสต์			
Candida sp.	พาราฟิน	Dainippon	Ronipron
Candida lipolytica	พาราฟิน	British Petroleum	Toprina
Pichia	เมทานอล	Phillips Petroleum	Provesteen
Saccharomyces cerevisiae	มอลโตส	Brewing Industries	Feed yeast
Saccharomyces cerevisiae	หางนม	Bel Industries	Bel yeast
Torulopsis sp.	น้ำทิ้งโรงงานทำกระดาษ	Paper Industries	Torula yeast

Milan Dostalek (1986) ศึกษากระบวนการผลิตไขมันจากแป้งโดยเลี้ยงเชื้อแบบ mixed culture ระหว่าง *Saccharomycopsis fibuliger* และ *Rhodosporidium toruloides* โดยเชื้อตัวแรกมีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ amylase เพื่อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ส่วนเชื้อที่สองมีคุณสมบัติในการสังเคราะห์ไขมันได้จากการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต ซึ่งกระบวนการเพาะเลี้ยงจะควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และปรับ pH ที่ 5.5 พบว่าปริมาณไขมันที่ผลิตได้สูงที่สุดคือ 9.7 g/l และตัวเซลล์ที่ประกอบด้วยไขมันปริมาณมากถึง 36.5% โดยการทดลองจะควบคุมปริมาณแหล่งไนโตรเจนซึ่งที่ความเข้มข้น 0.5 g/l ให้ผลได้ของเซลล์สูงสุด

Endang Sukara (1999) ศึกษากระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว และ เอนไซม์ amyloglucosidase โดยทำการหมักเป็นแบบขั้นตอนเดียว คือใช้เชื้อจุลินทรีย์ตัวเดียวคือ เชื้อรากลุ่ม *Aspergillus sp.* จากกระบวนการผลิตโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ พบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ amyloglucosidase ที่มี active สูงถึง 282 units ซึ่งสามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ และเมื่อแป้งหมด เชื้อตัวเดียวกันนี้ก็สามารถใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยเพื่อเจริญเติบโตและสร้างตัวเซลล์ที่ประกอบโปรตีนที่มีปริมาณสูงถึง 26.48 % ได้

2.3 กระบวนการหมักแบบ Batch

กระบวนการหมักแบบ batch เป็นกระบวนการหมักที่ทำโดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด การเลี้ยงเชื้อนิยมทำในขวดเขย่าหรือในถังหมัก โดยใช้สารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต สารอาหารที่ใช้ในระบบมีปริมาณจำกัด เพราะไม่มีการเติมสารอาหารภาวะภายในระบบมีการเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้จนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก เมื่อใส่จุลินทรีย์ลงในอาหารระยะแรกเซลล์ยังไม่มีการเพิ่มจำนวน เรียกระยะนี้ว่า ระยะการพักตัว (lag phase) เนื่องจากเป็นระยะที่เชื้อกำลังปรับตัว ระยะเวลาในช่วงการพักตัวนี้ในกระบวนการหมักระดับอุตสาหกรรมต้องทำให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม หลังจากนั้นจุลินทรีย์จึงมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามลำดับ จนกระทั่งเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (log หรือ exponential phase) ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดและคงที่ เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นในน้ำหมัก เช่น การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของสารอาหารและปริมาณสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นจะมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หยุดชะงักลง นั่นคือเข้าสู่ระยะการเติบโตแบบคงที่ (stationary phase) และระยะการเจริญเติบโตแบบลดลง (decline phase) ซึ่งอัตราการตายของจุลินทรีย์มีค่าสูงกว่าอัตราการเจริญเติบโต เรียกช่วงระยะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ว่า วัฏจักรการเจริญเติบโต (growth cycle) (Aiba, 1973 ; Stanbury และ Whitaker, 1984 ; Scragg, 1991)

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระยะ log phase สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

เซลล์ที่สะสม = เซลล์เจริญ - เซลล์ออก - เซลล์ตาย

$$dX/dt = mX - aX \quad (1)$$

เซลล์ไม่ถูกนำออกจากระบบการเลี้ยงเชื้อ และ $a >> m$ เขียนสมการ (1) ใหม่ได้คือ

$$dX/dt = \mu X \quad (2)$$

เมื่อ X = ความเข้มข้นของมวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)

t = เวลา (ชั่วโมง)

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate)(ต่อชั่วโมง)

α = อัตราการตายจำเพาะ (specific death rate)(ต่อชั่วโมง)

เมื่อ integrate สมการ (2) จะได้

$$X_t = X_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

เมื่อ X_0 = ความเข้มข้นของมวลชีวภาพเริ่มต้น

X_t = ความเข้มข้นของมวลชีวภาพหลังการเพาะเชื้อเป็นเวลา t ชั่วโมง

e = ฐานของ natural logarithm

เมื่อใส่ natural logarithm ในสมการ (3) จะได้

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu t \quad (4)$$

ดังนั้นเมื่อเป็นความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln (X-X_0)$ ของความเข้มข้นมวลชีวภาพกับเวลา จึงได้กราฟเส้นตรง มีค่าความลาดเอียง (slope) เท่ากับอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ซึ่งแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Wang, 1979 ; Scragg, 1991)

2.4 เอนไซม์โปรตีเอส (Protease)

เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการสลายโปรตีนเป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์สั้นๆ เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร ฟอกหนัง ผงซักฟอก (Ward, 1983) เป็นต้น แหล่งของเอนไซม์โปรตีเอสที่สำคัญในระยะแรกของการศึกษา ได้จากพืชและสัตว์ ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 การใช้เอนไซม์โปรตีเอสจากพืชและสัตว์ (Aunstup, 1983)

Application	Protease	Source
Cheese manufacture	Rennin	animal
Bating	Trypsin	animal
Chill haze prevention	Papain	plant
Meat tenderization	Papain	plant
Brewing	Papain	plant
Protein hydrolysis	Pancreatin	animal
Protein hydrolysis	Pepsin	animal

ในระยะต่อมาได้พัฒนาแหล่งผลิตนอกเหนือจากพืชและสัตว์ โดยใช้จุลชีพซึ่งนับว่าเป็นแหล่งผลิตสำคัญ เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่สร้างและขับออกสู่นอกเซลล์ (extracellular enzyme) จึงง่ายต่อการแยกและสามารถผลิตได้ในปริมาณสูง (Ward, 1983) ได้เอนไซม์โปรตีเอส ที่มีความบริสุทธิ์สูงและต้นทุนการผลิตต่ำกว่า (Aunstrup, 1980) แบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิดสามารถผลิตโปรตีเอสได้แต่มีเพียง 2-3 ชนิดเท่านั้นที่ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ บาซิลลัสและรา Aspergillus เนื่องจากจุลชีพเหล่านี้สามารถขับเอนไซม์โปรตีเอสออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular หรือ Exoenzyme) ในปริมาณที่สูงมีผู้ศึกษาถึงความสามารถในการผลิตของแบคทีเรียในสกุล บาซิลลัส (genus Bacillus) กันอย่างกว้างขวาง ดังในตารางที่ 2 (Priest, 1977) เพราะนอกจากขับเอนไซม์ โปรตีเอสออกมาแล้ว ยังมีเอนไซม์อื่นๆที่มีประโยชน์มากในทางอุตสาหกรรมถูกขับออกมาพร้อมกันอีกด้วย เช่น ใน *Bacillus licheniformis* พบว่านอกจากเอนไซม์โปรตีเอสแล้วจะขับ แอลฟา อะไมเลส (α-amylase) , เพนิซิลินเนส (penicillinase) และ antibiotic bacitracin ออกมาด้วย (Coleman, 1967) จากรายงานการสำรวจปริมาณการใช้เอนไซม์โปรตีเอสจากจุลชีพในปี 1981 ในอุตสาหกรรมต่างๆ พบว่ามีปริมาณการใช้เป็น 40 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเอนไซม์ทั้งหมด

ที่มีการซื้อขายกันในตลาดโลก ซึ่งอุตสาหกรรมที่ใช้โปรตีเอส เช่น อุตสาหกรรมยา ฟอกหนัง เส้นใยทอผ้า กระดาษ และอุตสาหกรรมผลิตผงซักฟอก (Ward, 1983)

1) ประเภทของเอนไซม์โปรตีเอส

โปรตีเอสจากจุลชีพ แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ตามกลไกพื้นฐานการเกิดปฏิกิริยา คือ

(1) แอซิดโปรตีเอส (Acid protease) (EC. 3. 4. 23) จุลชีพที่ผลิตเอนไซม์นี้ส่วนใหญ่เป็นจำพวกราและยีสต์ มีแบคทีเรียบางชนิดที่ผลิตได้ เอนไซม์มีสภาวะการทำงานที่เหมาะสมอยู่ในช่วง pH 3-4 ลักษณะโครงสร้างคล้ายกับเอนไซม์เพปซิน เรนนินถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสารจำพวก diazoketone (Mizobe, 1973) แต่ไม่ถูกยับยั้งโดยสาร ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) และ di- isopropryl fluorophosphate (DFP) น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 30,000-40,000 ดาลตัน สามารถเกิดปฏิกิริยาจำเพาะได้ดีกับกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวง (aromatic amino acid) เชื้อจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์นี้ได้แก่เชื้อรา *Aspergillus sp., Penicillium sp., Rhizopus sp., Mucor sp.* และ *Edothia sp.* การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิต ผลิตภัณฑ์โปรตีนจากถั่วเหลือง เช่น ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบและเนยแข็ง

(2) ไธออล โปรตีเอส (Thiol protease)(EC. 3. 4. 22) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในช่วงที่ pH เป็นกลาง ถูกเร่งปฏิกิริยาได้ดีเมื่อมีสารรีดิวซ์ ได้แก่ HCN หรือกรดอะมิโนซิสเตอีน และถูกยับยั้งปฏิกิริยาโดยสารจำพวก sulhydryl reagent เช่น p-chloromercuribenzoate สำหรับสาร DFP จะมีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น มีมวลโมเลกุลอยู่ระว่าง 30,000-50,000 ดาลตัน เชื้อจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์ได้แก่ *Clostridium sp*. และ *Streptococcus sp.*

(3) เมตัลโล โปรตีเอส (Metallo protease) (EC. 3. 4. 24) เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า neutral protease เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะอยู่ในโครงสร้างซึ่งมักจะเป็นสังกะสี (zinc) สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับกรดอะมิโนไลซีน สามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วยสารจำพวก chelating agent เช่น EDTA (Ward, 1983) มีความสามารถสูงสุดในการย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีนที่สภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ประมาณ 7 แต่มีความเสถียรในช่วง pH 5-10 โมเลกุลของเอนไซม์จะเสถียรขึ้นเมื่อมีแคลเซียมไอออน เชื้อจุลชีพที่สามารถสร้างเอนไซม์นี้ส่วนใหญ่ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus sp.* เช่น *B. subtilis, B. cereus, B. megaterium, B. thermoproteolyticus* และ *B. thuringiensis* เป็นต้น

(4) ซีรินโปรตีเอส (serine protease)(EC. 3. 4. 21. 14) มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 25,000 – 30,000 ดาลตัน โครงสร้างของเอนไซม์เป็นโปรตีนสายเดี่ยวที่มีกรดอะมิโนซีรีน (serine) อยู่ที่บริเวณเร่ง (catalytic site) (Priest, 1977) ดังนั้นการเร่งปฏิกิริยาของมันจึงถูกยับยั้งโดยสารที่เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ซีรีนที่บริเวณเร่งนั้น ไอออนของโลหะไม่มีความจำเป็นต่อความเสถียรและการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ซีรีนโปรตีเอสอาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าอัลคาไลน์โปรตีเอส (alkaline protease) เนื่องจากมีค่า pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ค่า pH 7.0 – 11.0 ซีรินโปรตีเอสผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus sp.* เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *B. licheniformis* และ *B. subtilis* โดยเอนไซม์จะถูกสร้างและปล่อยออกเป็นอิสระในน้ำเลี้ยงเชื้อ และอาจจะรวมกับเอนไซม์โปรตีเอสอื่นด้วย คือ นิวทรัลโปรตีเอส ซีรีนโปรตีเอสจากจุลชีพแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม A เป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรน้อยที่ค่า pH ต่ำกว่า 9.5 และมี esterase activity มากกว่าในกลุ่ม B ได้แก่เอนไซม์จาก *B. licheniformis* คือ subtilisin carlsberg และ *B. pumilus*

เอนไซม์โปรตีเอสที่ถูกขับออกมาโดยสกุลบาซิลลัส ส่วนใหญ่เป็นซีรินโปรตีเอส (ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ, 2532) หรือ เมตัลโปรตีเอส ซึ่งนับว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางการค้ามากที่สุด แบคทีเรียที่เป็นแหล่งของเอนไซม์อาจเป็น neutrophilic หรือ alkalophilic bacilli (Aunstrup, 1979; Horikshi และ Akiba, 1982; Markland, 1971)

2) การสร้างเอนไซม์และความสำคัญ

เอนไซม์โปรตีเอสมีบทบาทที่สำคัญคือ ไฮโดรไลซ์สับสเตรทที่เป็นพอลิเปปไทด์สายใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็กลง ทำให้เซลล์สามารถดูดซึมเพื่อใช้เป็นสารอาหารได้ซึ่งไม่เพียงแต่เฉพาะเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากจุลินทรีย์เท่านั้น แต่ยังรวมถึงเอนไซม์ที่ได้จากสัตว์และพืชด้วย นอกจากนี้โปรตีเอสยังมีความสำคัญอีกมากมาย แต่จะขอกล่าวถึงเฉพาะจุลชีพเท่านั้น โดยเฉพาะ *Bacillus sp.* ซึ่งเป็นจุลชีพที่สำคัญที่สุดในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

การสร้างเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Bacillus sp.* จะเกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อ โดยการสร้างเอนไซม์จะเกิดขึ้นในช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (Exponential phase) หรือในช่วงระยะแรกของการเจริญแบบคงที่ (Stationary phase) ใน complex media (Millet และคณะ, 1969) การสร้างเอนไซม์จะถูกจำกัดโดยปริมาณกรดนิวคลีอิก โดยที่ปริมาณของกรดนิวคลีอิกจะลดน้อยลง ในขณะที่เซลล์มีการเจริญจะมีการนำกรดนิวคลีอิกจำนวนมากไปใช้ในการสังเคราะห์ rRNA เพื่อสังเคราะห์ไรโบโซม และเมื่อเซลล์หยุดการเจริญ การสร้างไรโบโซมจะหยุดลงจึงมีกรดนิวคลีอิกเหลือพอที่จะไปใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ จึงทำให้มีการสร้างเอนไซม์ในปริมาณสูงในช่วง Stationary phase (Coleman, 1967)

การสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus sp.* เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ โดยการสร้างเอนไซม์จะเกิดในระยะแรกของการสร้างสปอร์ซึ่งเป็นช่วงปลายของการเจริญระยะ logarithmic phase

3) ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์

(1) แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนโดยเฉพาะกลูโคส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย กลูโคสในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยให้เซลล์มีการเจริญที่พอเหมาะไม่มากเกินไป การสร้างเอนไซม์ของเชื้อก็จะดำเนินไปตามปกติ (ศุภชัย ใช้เทียมวงศ์, 2537) คือ เมื่อแหล่งอาหารและพลังงานเริ่มน้อยลง การสร้างสปอร์ของเชื้อก็จะเกิดขึ้นพร้อมๆกับการสร้างเอนไซม์ แต่เมื่อมีปริมาณกลูโคสในอาหารมากเกินไป ก็จะทำให้เกิด catabolic repression โดยกลูโคส (Doi, 1973) กดการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ไม่ให้มีการสร้างเอนไซม์ออกมาหรือทำให้สร้างออกมาช้าลง (Bernlohr, 1964) เช่น การผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *B. sutilis* NRRL-B3411 จะลดลงทันทีเมื่อเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Heineken และ Conner, 1972)

(2) แหล่งไนโตรเจน

การสร้างเอนไซม์โปรตีเอสมีความสัมพันธ์กับแหล่งไนโตรเจน โดย Heineken และ Conner (1972) ได้ศึกษาการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสใน *B. sutilis* NRRL-B3411 พบว่า แอมโมเนียมคลอไรด์ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นมีผลต่อมีผลต่อปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสและนิวทรัลโปรตีเอสที่เชื้อสร้างขึ้น ในขณะที่แหล่งคาร์บอนมีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α- amylase)

(3) ฟอสเฟต

ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรม (DNA, RNA) และโปรตีน ในขบวนการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส ฟอสเฟตจะช่วยเพิ่มความเสถียรของ mRNA ด้วยการยับยั้งเอนไซม์ RNAase หรือช่วยให้เอนไซม์โปรตีเอสที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ปล่อยออกนอกเซลล์ได้ดีขึ้น ถ้าปริมาณของฟอสเฟตมีมากเกินไปในการเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ จะมีผลยับยั้งการเจริญและกดดันการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสด้วย (Seung – Hyeon Moon, 1990)

(4) ไอออนโลหะ

ไอออนของโลหะมีส่วนสำคัญในการเจริญและสร้างเอนไซม์ของเชื้อบาซิลลัส เช่น แมกนีเซียมไอออนมีความสำคัญและจำเป็นต่อการเจริญ การแบ่งตัวใน complex media

(5) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

สภาวะแวดล้อมในระหว่างการเลี้ยงเชื้อหรือเริ่มต้น มีผลต่อการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส โดยเฉพาะอัลคาไลน์โปรตีเอสพบว่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณเอนไซม์ที่สร้างขึ้น Roger และ Bernard (1972) ได้เลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* โดยเริ่มต้นที่ pH ต่างๆตั้งแต่ 5- 12 พบว่าที่ pH 7.5-9.5 จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ดีที่สุด

(6) อิทธิพลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์จะต้องเหมาะสม โดยมีรายงานพบว่าอุณหภูมิจะมีอิทธิพลต่อระดับของการแปรรหัสของ mRNA สำหรับสร้างเป็นเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *B. megaterium* (Jaroslav และคณะ, 1991) โดยที่เอนไซม์โปรตีเอสจะเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส

Yang, J.K และคณะ (1999) เลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* ในสูตรอาหารขั้นต่ำที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 ในขวดเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ 20.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสามารถลดโปรตีนในน้ำเสียในอุตสาหกรรมเตรียมไคตินจากเปลือกกุ้ง ปูไ ด้ โดยพบว่าเกลืออนินทรีย์ Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+} และ Co^{2+} เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

Yang, S.S and Wang, J.W (1999) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสได้หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารที่ประกอบด้วยแป้ง น้ำทิ้งจากโรงงานข้าวโพด และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยสามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและอะไมเลส ได้ 26.7 และ 2642.7 หน่วยต่อกรัมแป้งตามลำดับในการเลี้ยงบนอาหารแข็ง และผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและอะไมเลส ได้ 17.4 และ 691.3 หน่วยต่อกรัมแป้งตามลำดับในการเลี้ยงบนอาหารเหลว

Ustariz, F.J และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส โดยเลี้ยงเชื้อ *Serratia marcescens* ในขวดเขย่าโดยที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.6 ในอาหารขั้นต่ำมี bovine serum albumin เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน พบว่าการเจริญเติบโตในช่วง exponential growth phase หรือระหว่าง stationary phase เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ได้สูงที่สุด 200 U/ml

Antczak และคณะ (2004) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ที่สร้างโดย *B. subtilis* ใน PVA Cryogel beads และศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส โดยเลี้ยงในอาหารขั้นต่ำประกอบด้วยแป้ง น้ำตาลแลกโตส เคซีน เป็นส่วนประกอบ พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 8.4 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 29.6 U /ml

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

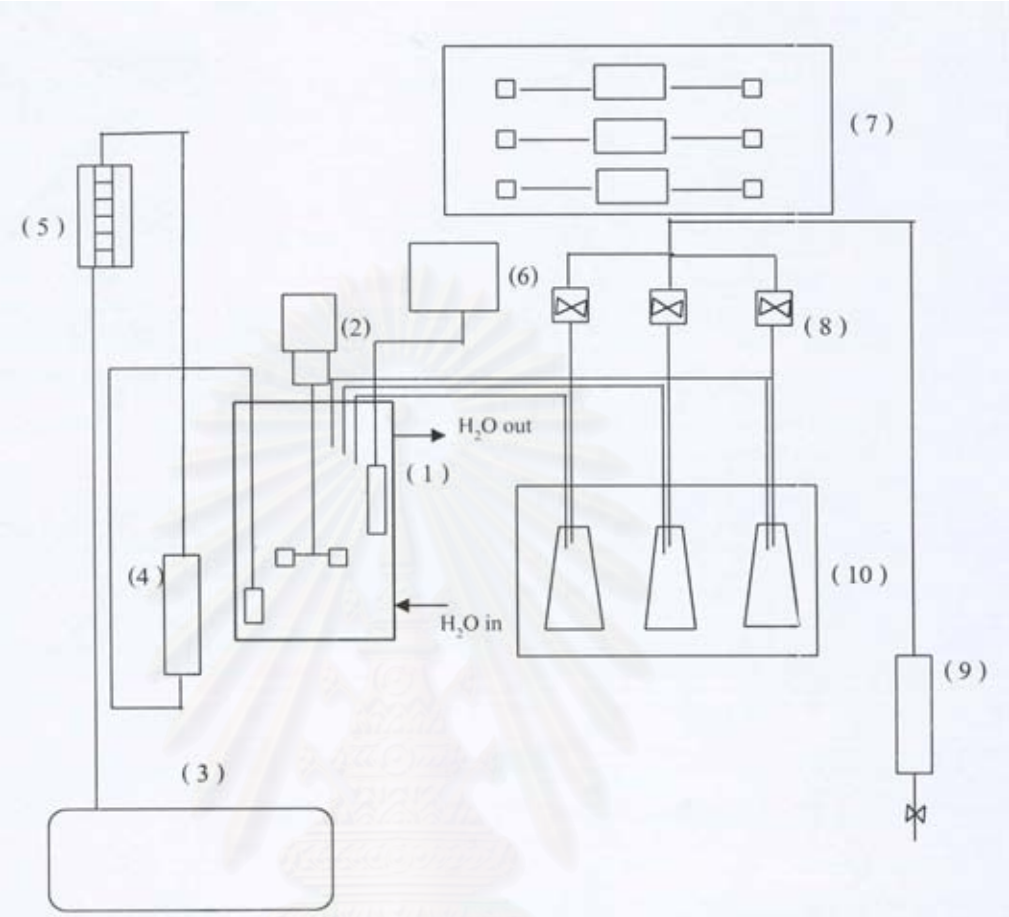
3.1 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และสายพันธุ์จุลินทรีย์

1) อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)	Clements ประเทศออสเตรเลีย
เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ	ALC ประเทศไทย
เครื่องชั่งหยาบ	Sartorius ประเทศเยอรมัน
เครื่องชั่งละเอียด	Sartorius ประเทศเยอรมัน
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer)	Jasco ประเทศอังกฤษ
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)	Schott ประเทศสหรัฐอเมริกา
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow	Asian Chemical & Engineering ประเทศไทย
ตู้อบแห้ง (hot air oven)	Memmert ประเทศเยอรมัน
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)	Isuzu ประเทศญี่ปุ่น
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	Memmert ประเทศเยอรมัน
เครื่องให้ความร้อน (hot plate)	Ikamag ประเทศเยอรมัน
ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator)	Contherm Scientific ประเทศนิวซีแลนด์
กล้องจุลทรรศน์ (microscope)	Novex ประเทศเนเธอร์แลนด์
เครื่องเขย่าสารเคมี (vortex)	Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องเขย่า (rotating shaker)	ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เครื่องรีดยางแบบ 2 ลูกกลิ้ง (two roll mill)	ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตร และชุดควบคุม	ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2) ถังหมักและชุดอุปกรณ์ควบคุม



รูปที่ 3.1 ถังหมักและชุดอุปกรณ์ควบคุมที่ใช้ในงานวิจัย

(1) คือ ถังกวนประกอบด้วยใบกวน, pH probe, sampling port และตัวให้อากาศ

(2) คือ มอเตอร์และเครื่องควบคุมอัตราการกวน

(3) คือ เครื่องให้อากาศ (air pump)

(4) คือ ตัวกรองอากาศ (air filter)

(5) คือ โรตามิเตอร์

(6) คือ เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิ

(7) คือ ชุดอุปกรณ์ควบคุมการเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ

(8) คือ วาล์วปิด-เปิดแบบโซลีนอยด์

(9) คือ กระบอกสุญญากาศ

(10) คือ ขวดเก็บตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3) เคมีภัณฑ์

เคมีภัณฑ์	บริษัทผู้ผลิต
กรดซัลฟูริก (sulfuric acid)	Merck ประเทศเยอรมัน
กรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid)	Merck ประเทศเยอรมัน
กรดฟอร์มิก (formic acid)	Merck ประเทศเยอรมัน
กลูโคส (glucose)	APS ประเทศออสเตรเลีย
คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulphate)	BDH ประเทศอังกฤษ
เคซีน (casein)	Fluka ประเทศสวิทเซอร์แลนด์
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	Fluka ประเทศสวิทเซอร์แลนด์
โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate)	Fluka ประเทศสวิทเซอร์แลนด์
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulphate)	Fluka ประเทศสวิทเซอร์แลนด์
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)	Ajax ประเทศออสเตรเลีย
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-potassium hydrogen phosphate)	M & B ประเทศอังกฤษ
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ (Tris-HCL buffer)	Fisher ประเทศอังกฤษ
ไทโรซีน (tyrosine)	Himedia ประเทศอินเดีย
แบคโต เปปโตน (bacto peptone)	Himedia ประเทศอินเดีย
โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin)	Fluka ประเทศสวิทเซอร์แลนด์
แป้งที่ละลายน้ำได้ (soluble starch)	Fluka ประเทศสวิทเซอร์แลนด์
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium hydrogen phosphate)	M & B ประเทศอังกฤษ
โปตัสเซียม โซเดียม ทาร์เทรท (potassium sodium tartrate)	Fluka ประเทศสวิทเซอร์แลนด์
ฟอลลิน รีเอเจนท์ (folin reagent)	Merck ประเทศเยอรมัน
ฟีนอล (phenol)	Carlo erba ประเทศอิตาลี
แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulphate)	Fluka ประเทศสวิทเซอร์แลนด์
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	Scharlau ประเทศสเปน
สารสกัดจากมอลท์ (malt extract)	Himedia ประเทศอินเดีย
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	Scharlau ประเทศสเปน
แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate)	Ajax ประเทศออสเตรเลีย

4) สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

(1) *Endomycopsis fibuligera* TISTR 5097

(2) *Candida utilis* TISTR 5001

(3) *Bacillus subtilis* TISTR 25

ซึ่งทั้งสามชนิดเป็นเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ของ Culture Collection ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย TISTR (Thailand Institute of Science and Technological Research)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

1) การเก็บรักษาเชื้อ (stock culture)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองคือ ยีสต์ 2 ชนิดได้แก่ *Endomycopsis fibuligera* TISTR 5097 และ *Candida utilis* TISTR 5001 และแบคทีเรียคือ *Bacillus subtilis* TISTR 25 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการทดลองทำโดยถ่ายเชื้อลงในอาหารแข็งเอียงตามชนิดของเชื้อได้แก่ อาหาร yeast starch, yeast malt (YM) และ nutrient broth (NB) ตามลำดับ (ภาคผนวก ก) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ 48 ชั่วโมงสำหรับยีสต์ เททับด้วยกลีเซอรีนที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2) ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์ในขวดทดลอง

2.1) ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Endomycopsis fibuligera* TISTR 5097

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ *E. fibuligera* TISTR 5097 ที่เก็บรักษาไว้บนอาหารแข็ง yeast - starch 1-2 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตรบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล - กรดซัลฟูริก (phenol-sulfuric acid) ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของลอรี (Lowry) และค่าความเป็นกรดด่าง

2.2) ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ *C. utilis* TISTR 5001 ที่เก็บรักษาไว้บนอาหารแข็ง yeast - malt 1-2 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตรบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการหา น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟูริก ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของลอรี และค่าความเป็นกรดด่าง

2.3) ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 ที่เก็บรักษาไว้บนอาหารแข็ง nutrient broth 1-2 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตรบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส และ ค่าความเป็นกรดด่าง

3) การเลี้ยงเชื้อผสมเพื่อหาปริมาณวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวในขวดทดลอง

3.1) การเตรียมเชื้อตั้งต้น

นำเชื้อ *E. fibulegera* TISTR 5097 ที่เลี้ยงไว้ 48 ชั่วโมง ไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนเซลล์มากระจายในน้ำกลั่น (resuspend) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ความขุ่น 0.5 (ถ้าเกินควรเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ)

นำเชื้อ *C. utilis* TISTR 5001 ที่เลี้ยงไว้ 48 ชั่วโมง ไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนเซลล์มากระจายในน้ำกลั่น ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ความขุ่น 0.5 (ถ้าเกินควรเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ)

นำเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 ที่เลี้ยงไว้ 16 ชั่วโมง ไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนเซลล์มากระจายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ความขุ่นประมาณ 0.5 (ถ้าเกินควรเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ)

3.2) การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวในขวดทดลอง

เลี้ยงเชื้อ *E. fibuligera* TISTR 5097 โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 7 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในอาหารเหลวขั้นต่ำ (ภาคผนวก ก) ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.5 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในขวดทดลองที่เขย่า 180 รอบต่อนาที โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมเชื้อ *C. utilis* TISTR 5001 ในชั่วโมงที่ 16 หลังจากการเลี้ยงเชื้อชนิดแรก โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เลี้ยงเชื้อต่อไปที่ภาวะเดิม และเติม *B. subtilis* 25 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ติดตามผลของการเจริญเติบโตของเชื้อผสมโดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง จนครบ 64 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟูริก และปริมาณโปรตีนโดยวิธีของลอรี โดยใช้โบไวน์ซีรัมอัลบูมินเป็นโปรตีนมาตรฐาน

3.3) การหาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวในขวดทดลอง

หาปริมาณของแหล่งคาร์บอนซึ่งคือแป้งมันสำปะหลัง ที่ใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ (ภาคผนวก ก) โดยแปรผันปริมาณดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อในขวดทดลองตามวิธีการในข้อ 3.2) ติดตามการเจริญเติบโตโดยหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโปรตีนของเซลล์และ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เพื่อคัดเลือกปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต และการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว

3.4) การหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวในขวดทดลอง

หาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนซึ่งคือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ (ภาคผนวก ก) โดยแปรผันปริมาณดังนี้ 2, 5, 7 และ 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3) เลี้ยงเชื้อในขวดทดลองตามวิธีการในข้อ 3.2) ติดตามการเจริญเติบโตโดยหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโปรตีนของเซลล์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เพื่อคัดเลือกปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต และการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว

4) การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวในถังหมัก

เลี้ยงเชื้อทั้งสามชนิดในอาหารขั้นต่ำโดยมีวัตถุดิบที่คัดเลือกได้จากข้อ 3) เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยขยายส่วนจากการเลี้ยงในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร เป็นถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 2500 มิลลิลิตร เลี้ยงตามวิธีการเดียวกับข้อ 3.2) โดยมีการควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างในช่วงที่เลี้ยงเชื้อยีสต์สองชนิดแรกที่ 5.5 ส่วนค่าความเป็นกรดด่างที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียควบคุมอยู่ที่ 7.0 โดยมีการให้อากาศและกวนตลอดเวลา เปรียบเทียบหาความเร็วในการกวนและอัตราการให้อากาศที่ให้ผลการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ และปริมาณโปรตีนที่ดีที่สุด

4.1) การหาอัตราเร็วในการกวนที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อตามวิธีการข้อ 4) โดยทำการให้อากาศ 0.5 vvm โดยแปรผันความเร็วในการกวนเป็น 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที เปรียบเทียบหาความเร็วในการกวนที่ให้ผลการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ ปริมาณโปรตีนสูงสุด และปริมาณเอนไซม์โปรตีเอส

4.2) การหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อตามวิธีการข้อ 4) โดยใช้อัตราเร็วในการกวนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.1) และแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm เปรียบเทียบหาอัตราการให้อากาศที่ให้ผลการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ ปริมาณโปรตีนที่ดีที่สุด และปริมาณเอนไซม์โปรตีเอส

5) ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสโดยจุลินทรีย์ในถังหมัก

เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดตามวิธีการและภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4) โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *B. subtilis* เป็น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยควบคุมให้ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 7.0 เลี้ยงเชื้อที่สภาวะเดิม ติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยหาน้ำหนักเซลล์แห้ง โปรตีน น้ำตาลทั้งหมด และโปรตีเอสแอคติวิตีทุกๆ 4 ชั่วโมง จนครบ 64 ชั่วโมง

5.1) เปรียบเทียบการใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* TISTR 25 แบบ washed cell กับ แบบ cell suspension

ใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* TISTR 25 เป็นแบบ washed cell กับ แบบเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเท่ากัน เพื่อเปรียบเทียบลักษณะเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

5.2) การหาปริมาณเชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* TISTR 25 ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

โดยแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* TISTR 25 เป็น 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 72 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส เพื่อศึกษาการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติต่อไป

6) การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ

6.1) การวัดความขุ่นของเซลล์ (*Bacillus subtilis*)

ใช้ปิเปตที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่างมา 5 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แยกเอาส่วนที่เป็นน้ำใสเก็บไว้ ส่วนที่เป็นตัวเซลล์เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

6.2) การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (*Endomycopsis fibuligera* และ *Candida utilis*)

ใช้ปิเปตที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่างมา 5 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แยกเอาส่วนที่เป็นน้ำใสเก็บไว้ ส่วนที่เป็นตัวเซลล์นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

6.3) การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี (Lowry, 1951)

นำน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นแยกส่วนน้ำใสออก เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำสารละลายโปรตีนที่ได้เจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Lowry C (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

6.4) การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำหมักโดยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟูริก

นำตัวอย่างน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เขย่าแรงๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคส และค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

6.5) การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส

เก็บตัวอย่างมาเหวี่ยงตกตะกอนแยกเซลล์ออก นำส่วนใสมาหาแอคติวิตีโดยบ่มตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร กับสารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ 0.9 มิลลิลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำขึ้นจากอ่างน้ำอุ่นและแช่ลงในอ่างน้ำเย็น หยุดปฏิกิริยาทันทีโดยเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์โดยเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์กับกราฟมาตรฐานไทโรซีนที่ความเข้มข้น 0- 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กำหนดให้ 1 ยูนิตเอนไซม์เท่ากับ ปริมาณของไทโรซีน 1 ไมโครโมลที่ได้จากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์ที่สภาวะของการวัดแอคติวิตี ภายในเวลา 1 นาที

ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทุกตัวอย่างจะต้องทำหลอดควบคุมด้วย สำหรับเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์อย่างแท้จริง โดยทำการบ่มสารละลายเคซีนกับบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีก่อนและหยุดปฏิกิริยาด้วย

กรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์จากนั้นจึงค่อยเติมตัวอย่างลงไป นำไปเหวี่ยงตกตะกอนแยกส่วนน้ำใสมาวัดการดูดกลืนแสง ค่าการดูดกลืนแสงของปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสารละลายเคซีนโดยเอนไซม์อย่างแท้จริงหาได้จาก ค่าการดูดกลืนแสงจากตัวอย่างหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงจากหลอดควบคุม แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน

7) ศึกษาการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยอาศัยเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อที่เลี้ยงในถังหมัก

7.1) การหาวิธีการที่เหมาะสมในการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ

หลังจากกระบวนการหมักเสร็จสิ้น หยุดการกวนและให้อากาศและปล่อยให้ตัวเซลล์ยีสต์ที่ผลิตได้ตกตะกอนลงมาที่ด้านล่างของถังหมักเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้นค่อยๆปล่อยน้ำหมักที่มีตัวเซลล์ตกตะกอนปนอยู่ออกมาจากถังหมักเป็นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ก็จะเหลือน้ำหมักที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเอนไซม์โปรตีเอสอยู่เป็นส่วนใหญ่ปริมาตร 2500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำยางสด 35 % DRC ลงไปปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของน้ำหมัก เพื่อศึกษาการลดโปรตีนในน้ำยางสดโดยอาศัยเอนไซม์โปรตีเอสที่มีอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยแปรผันระยะเวลาในการกวนผสมน้ำยางสดเข้ากับน้ำเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ปริมาณสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และอัตราเร็วในการกวนผสม จากนั้นนำน้ำยางสดที่ได้ออกมาจับตัวด้วยกรดฟอร์มิกเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 ± 5 องศาเซลเซียสจนได้เป็นแผ่นยางดิบแห้ง จากนั้นนำยางดิบแห้งที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนเปรียบเทียบกับยางดิบแห้งชุดควบคุม (น้ำยางสด 35 % DRC ที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิก เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 ± 5 องศาเซลเซียสจนได้เป็นแผ่นยางดิบแห้ง) เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการผลิตยางที่มีโปรตีนลดลง

7.2) ศึกษาผลของระยะเวลาในการกวนผสมน้ำยางสดเข้ากับน้ำเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

กวนผสมน้ำยางสด 35 % DRC ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรกับน้ำเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ที่มีการเติม 10% SDS 0.2 phr โดยใช้อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที และแปรผันระยะเวลา ในการกวนผสมเป็น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง เพื่อดูผลที่มีต่อการลดปริมาณไนโตรเจนของยาง

7.3) ศึกษาผลของปริมาณของสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ในการลดโปรตีนของน้ำยาง ในถังหมัก

กวนผสมน้ำยางสด 35% DRC ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรกับน้ำเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ใช้อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที และระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 7.2)โดยแปรผันปริมาณของสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็น 0, 0.2, 0.5, 1.0 และ 1.5 phr เพื่อดูผลที่มีต่อการลดปริมาณไนโตรเจนของน้ำยางสด

7.4) ศึกษาผลของอัตราเร็วในการกวนผสมน้ำยางสดเข้ากับน้ำเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

กวนผสมน้ำยางสด 35% DRC ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรกับน้ำเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีการเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 7.3) โดยแปรผันอัตราการกวนเป็น 0, 50, 70 , 100, 120 และ 150 รอบต่อนาที เพื่อดูผลที่มีต่อการลดปริมาณไนโตรเจนของน้ำยางสด

8) วิเคราะห์สมบัติของน้ำยางสดที่ได้จากกระบวนผลิต

ทดสอบสมบัติต่างๆของยางแผ่นดิบที่ผลิตได้เพื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และมาตรฐานยางดิบแห้งของสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร และมาตรฐานของยางดิบโปรตีนต่ำ ตามสมบัติดังนี้คือ ปริมาณเถ้า ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณสิ่งสกปรก ปริมาณสิ่งระเหย ค่าการอ่อนตัวเริ่มต้น ค่าดัชนีความอ่อนตัว และค่าความหนืดมูนี ดัชนีสี ดังวิธีการต่อไปนี้

8.1) การเตรียมชิ้นตัวอย่างที่มีความสม่ำเสมอ (SMR Bulletin No.7)

นำชิ้นตัวอย่างไปผ่านลูกกลิ้งที่ปรับระยะห่างของช่องว่าง 1.65 มิลลิเมตร จำนวน 6 ครั้ง ยางที่ผ่านลูกกลิ้งออกมาแต่ละครั้ง ม้วนเป็นรูปทรงกระบอก ใส่ปลายข้างหนึ่งเข้าเครื่องในการบดครั้งต่อๆไป ระหว่างบดครั้งที่ 1 - 5 หากมีเศษยางตกอยู่บนภาชนะรองรับใต้ลูกกลิ้งทั้งสอง ให้เก็บนำมารวมกับยางที่จะบดครั้งต่อไปให้หมด ส่วนครั้งที่ 6 รีดยางออกเป็นแผ่น แล้วนำไปตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อนำไปทดสอบสมบัติต่างๆต่อไป

8.2) การหาปริมาณสิ่งสกปรก (dirt content) (ASTM D 1278-91a)

ปริมาณสิ่งสกปรก หมายถึง ปริมาณของสารที่ได้จากการกรองด้วยตัวกรอง ที่มีแผ่นตะแกรงกรอง ขนาดรูตะแกรง 325 เมช ซึ่งสารที่ได้จากการกรองนั้น ประกอบด้วยสารแปลกปลอมอื่นๆ เช่น เปลือกไม้ ดิน ใบไม้ ปริมาณและชนิดของสิ่งสกปรกมีความสำคัญต่อกระบวนการนำยางไปแปรรูปทำผลิตภัณฑ์ยาง ถ้าหากยางมีปริมาณสิ่งสกปรกสูง จะมีผลกระทบต่อกระบวนการแปรรูปและคุณภาพของผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ดังนั้น จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องควบคุมการผลิตยางให้มีปริมาณสิ่งสกปรกน้อยที่สุด

วิธีการทดสอบ

ชั่งตัวอย่างยางหนัก 15 กรัม นำไปผ่านเครื่องบดแบบหล่อเย็น (cold mill) ที่ตั้งระยะห่างของลูกกลิ้งไว้ 0.330 มิลลิเมตร จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำไปตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ระหว่าง 10.0000 – 10.0200 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุน้ำมันสนจำนวน 250 มิลลิลิตร และสารเคมีเร่งการละลายยาง จำนวน 1 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 140 องศาเซลเซียส โดยแกว่งขวดแก้วทุก 30 นาที เพื่อช่วยเร่งการละลายให้เร็วขึ้น จนยางละลายหมด จากนั้นนำสารละลายยางที่ยังร้อนมาเทผ่านตัวแกรงกรองที่สะอาดและแห้ง ซึ่งชั่งน้ำหนักไว้แล้ว ล้างสิ่งสกปรกที่หลงเหลืออยู่ในขวดรูปแก้วด้วยน้ำมันสนร้อน 2 ครั้ง ครั้งละ 30-50 มิลลิลิตร เทน้ำมันสนร้อนผ่านตัวกรอง จากนั้นนำตัวกรองที่มีสิ่งสกปรกเหลืออยู่ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำตัวกรองออกมาวางให้เย็นในหม้อดูดความชื้น และชั่งน้ำหนัก (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ปริมาณสิ่งสกปรกคิดเป็นร้อยละได้ดังสูตร

$$\text{ปริมาณสิ่งสกปรก} = \frac{\text{น้ำหนักสิ่งสกปรก}}{\text{น้ำหนักของชิ้นทดสอบ}} \times 100$$

8.3) การหาปริมาณเถ้า (ASTM D 1278-91a)

เถ้าในยางธรรมชาติ ประกอบด้วยเกลืออนินทรีย์ (inorganic salt) พวกคาร์บอเนตออกไซด์ และฟอสเฟตของโพแทสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม โซเดียมและแร่ธาตุอื่น นอกจากนี้ เถ้าอาจเป็นพวกซิลิกาหรือซิลิเกตที่มีอยู่ในยางเองหรือปะปนมาจากข้างนอก ปริมาณเถ้าจะเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณแร่ธาตุที่มีอยู่ในยางดิบ และช่วยบ่งชี้ว่ามีการเติมสารตัวเติม (filler) ลงไปช่วยเพิ่มน้ำหนักยางหรือไม่

วิธีทดสอบ

นำถ้วยทนความร้อนเปล่าไปเผาที่อุณหภูมิ 550 $\pm$ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องในเดซิเคเตอร์และชั่งน้ำหนักละเอียด 0.0001 กรัม จากนั้นนำยางดิบ 5 กรัม ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนละเอียด 0.0001 กรัม ใส่ลงในถ้วยทนความร้อนแล้วนำไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิสูง ที่อุณหภูมิ 550 $\pm$ 20 องศาเซลเซียส เผาจนกระทั่งคาร์บอนถูกออกซิไดซ์อย่างสมบูรณ์และได้เถ้าออกมา นำถ้วยทนความร้อน และส่วนที่เหลือออกมาทำให้เย็นลงในเดซิเคเตอร์ และชั่งน้ำหนักละเอียดได้ 0.0001 กรัม ปริมาณเถ้าคิดเป็นร้อยละได้ดังนี้

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า} = \frac{A - B}{W} \times 100$$

A = น้ำหนักถ้วยทนความร้อน เปล่า (กรัม)

B = น้ำหนักถ้วยทนความร้อน + เถ้า (กรัม)

W = น้ำหนักชิ้นทดสอบ (กรัม)

8.4) การหาปริมาณสิ่งระเหย (ASTM D 1278-91a)

สิ่งระเหยในยางส่วนใหญ่เป็นความชื้น ถ้ามีปริมาณสูงจะทำให้ยางเกิดราได้ง่าย มีกลิ่นเหม็นและเกิดปัญหาระหว่างกระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ โดยทำให้ยางลื่นบดผสมกับสารเคมีอื่นได้ยาก

วิธีทดสอบ

นำตัวอย่างยางมาชั่งน้ำหนักให้ได้ 10 กรัม และละเอียด 0.001 กรัม นำไปผ่านเครื่องบด ซึ่งมีน้ำเย็นผ่านลูกกลิ้งที่ปรับช่องห่าง 0.51 มิลลิเมตร และนำตัวอย่างยางมาวางในถาดอะลูมิเนียม นำไปอบในตู้อบ อุณหภูมิ 100 ± 3 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำยางออกจากตู้อบ และนำยางแต่ละชิ้นใส่ในถุงพลาสติก พับปากถุง 3 ครั้ง แล้วนำไปหนีบไว้กับที่หนีบ ปล่อยยางในถุงพลาสติกให้เย็น ใช้เวลาประมาณ 30 นาที นำไปชั่งละเอียด 0.001 กรัม ปริมาณสิ่งระเหยคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณสิ่งระเหย} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างยางก่อนอบแห้ง - น้ำหนักยางหลังอบแห้ง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างยางก่อนอบแห้ง}} \times 100$$

8.5) ปริมาณองค์ประกอบไนโตรเจน (ASTM D 3533-90)

ไนโตรเจนในยางดิบ ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของโปรตีน ดังนั้น ปริมาณไนโตรเจนจึงเป็นตัวบ่งชี้ว่าในยางดิบมีโปรตีนอยู่มากน้อยเพียงใด การกำหนดขีดจำกัดไนโตรเจนในยางแท่ง เพื่อป้องกันไม่ให้ผู้ผลิตนำหางน้ำยาง (skim latex) ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนสูงมาผลิตยางแท่ง เพราะมีผลให้ยางเกิดการคงรูปเร็วขึ้น (fast cure)

วิธีทดสอบ

ชั่งยางที่เตรียมให้ได้น้ำหนัก 0.1 กรัม ละเอียด 0.0001 กรัม ใส่ในขวดแก้วสำหรับย่อยสลายแบบ micro-kjedahl เติมส่วนผสมของสารเร่งปฏิกิริยา 0.65 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นให้ความร้อนจนได้สารละลายใสสีเขียวหรือไม่มีสี และจะต้องไม่มีสีเหลืองปน ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วถ่ายสารละลายลงในชุดกลั่นซึ่งเตรียมผ่านไอน้ำให้ร้อนไว้แล้ว เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 67 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในชุดกลั่น จากนั้นนำขวดแก้วรูปชมพู่ที่มีสารละลายกรดบอริกเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายเมทิลเรด 2-3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ มารองรับสิ่งกลั่น โดยผ่าน

ไอน้ำเพื่อทำการกลั่นนานประมาณ 5 นาที ซึ่งสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเขียว นำสารที่ได้จากการกลั่นมาไตเตรททันทีด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.005โมลาร์ ที่จุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง และสำหรับแบลงค์ทำวิธีเดียวกับตัวอย่างแต่ไม่มีการใส่ตัวอย่างยาง

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน} = \frac{(V_1 - V_2)\, M \times 0.028}{W} \times 100\ \%$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรสารละลายกรดซัลฟูริก ที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_2 = ปริมาตรสารละลายกรดซัลฟูริก ที่ใช้ในการไตเตรทแบลงค์ (มิลลิลิตร)

M = ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟูริก (โมลาร์)

W = น้ำหนักชิ้นยางทดสอบ (กรัม)

8.6) ดัชนีความอ่อนตัว (Plasticity Retention Index, PRI) (ASTM D 3194-84)

ดัชนีความอ่อนตัวของยางแสดงถึงความต้านทานของยางดิบต่อการแตกหักของโมเลกุลต่ออุณหภูมิสูง หรือต่อการออกซิเดชัน ยางที่มีดัชนีความอ่อนตัวสูง แสดงว่ามีความต้านทานต่อการแตกหักของโมเลกุลสูง

<u>วิธีการทดสอบ</u>

นำยางตัวอย่าง 20 ± 5 g ผ่านเครื่องบดที่มีน้ำเย็นผ่านลูกกลิ้งที่ปรับช่องห่างให้ได้ความหนา 3.2 –3.6 mm 2 ครั้ง พับครึ่ง รีดผ่านลูกกลิ้งแล้วตัดชิ้นทดสอบจำนวน 6 ชิ้น เป็น 2 ชุดๆละ 3 ชิ้น วางชิ้นทดสอบชุดที่ 1 ระหว่างกระดาษมวนบุหรี่ นำเข้าเครื่องอัดชิ้นทดสอบโดยแป้นโลหะกลมบนและล่างจะกดให้ชิ้นทดสอบหนา 1 มิลลิลิตร และในเวลาเดียวกันทำให้ร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้น แรง 10 ± 0.1 กิโลกรัม จะอัดยางเป็นเวลา 15 วินาที อ่านค่าความอ่อนตัวบนหน้าปัทม์ จะได้ค่าP_0 และนำชิ้นทดสอบชุดที่ 2 เข้าตู้อบซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำชิ้นทดสอบออกมาทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที นำไปหาค่าความอ่อนตัวจะได้ค่า P_{30}

นำค่ามัธยฐาน (median) ของชิ้นทดสอบ มาคำนวณหาค่าดัชนีความอ่อนตัว ดังนี้

$$PRI = \frac{P_{30}}{P_0} \times 100$$

เมื่อ PRI = ดัชนีความอ่อนตัว (Plasticity Retention Index)

P_0 = มัธยฐานค่าความอ่อนตัวของยางชุดที่ไม่อบ

P_{30} = มัธยฐานค่าความอ่อนตัวของยางชุดที่อบแล้ว

8.7) การหาค่าความหนืดมูนี (Mooney viscosity) (ASTM D 1646-94)

วิธีการทดสอบ

ตรวจสอบอุณหภูมิของช่องใส่ยางให้คงที่ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อุ่นโรเตอร์โดยใส่ลงในช่องใส่ยางให้ร้อนเป็นเวลา 1 นาที นำโรเตอร์ออกจากช่องใส่ยาง แบ่งยางที่เตรียมไว้ประมาณ 25 กรัม ออกเป็นสองส่วนเท่าๆกัน โดยแต่ละส่วนมีความหนาประมาณ 6 มิลลิเมตร และมีน้ำหนักประมาณ 12.5 กรัม นำยางประกบด้านบนและล่างของโรเตอร์ ใส่ในช่องใส่ยาง แล้วเดินเครื่อง เครื่องจะอุ่นยางเป็นเวลา 1 นาที และโรเตอร์หมุนวัดความหนืดเป็นเวลา 4 นาที จะรายงานในหน่วยของมูนี , ML (1+4) 100 องศาเซลเซียส ขนาดของโรเตอร์ (L สำหรับชิ้นใหญ่) และและจำนวนนาทีของการวอร์มเครื่อง (1 นาที) จำนวนนาทีของการทดสอบจริง (4 นาที) และอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

การบันทึกผล - ให้บันทึกผลความหนืดที่อ่านได้จากเครื่องพร้อมระบุเงื่อนไขในการทดสอบดังนี้

$$x\text{ML (1+4) } 100\,^{O}\text{C}$$

เมื่อ x = ค่าความหนืดที่อ่านได้จากเครื่อง

M = Mooney Viscosity

L = โรเตอร์ใหญ่ (โรเตอร์เล็กใช้อักษร S)

1 = เวลาที่ใช้ในการอุนยาง หน่วยเป็นนาที

4 = เวลาที่โรเตอร์หมุนวัดความหนืด หน่วยเป็นนาที

$100\,^{O}$C = อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบ

8.8) ดัชนีสี (color index) (ASTM D 3157-84)

วิธีการทดสอบ

นำยางที่เตรียมไว้ 20 $\pm$5 กรัม ผ่านเครื่องบดซึ่งมีน้ำเย็นผ่านลูกกลิ้งที่ปรับช่องห่างไว้แล้ว 2 ครั้ง แล้วพับครึ่ง ตบด้วยมือเบาๆให้ได้ความหนาระหว่าง 3.2-3.6 มิลลิเมตร ตัดตัวอย่างให้ได้ชิ้นทดสอบ จำนวน 2 ชิ้น แล้วนำมาประกบกัน วางชิ้นทดสอบลงในแบบพิมพ์ ประกบแบบพิมพ์ด้วยแผ่นฟิล์มพอลิเอสเตอร์หรือเซลลูโลส แล้วประกบด้วยแผ่นพลาสติกหรืออลูมิเนียม จากนั้นนำเข้าเครื่องอัด ที่ความดัน 500 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 150 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบสีของชิ้นทดสอบกับมาตรฐาน Lovibond

9) การทดสอบสัณฐานวิทยาของยางแผ่นดิบแห้งโดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ทำการตรวจสอบสภาพผิวด้านหน้า และภาคตัดขวางของแผ่นยางดิบแห้ง ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด มีขั้นตอนดังนี้

(1) นำแผ่นยางดิบแห้งที่จะตรวจสอบผิวด้านหน้า มาตัดเป็นวงกลมให้มีขนาดเท่ากับพื้นที่หน้าตัดของแท่งเหล็กขนาดเล็ก ที่เป็นอุปกรณ์ช่วยในการยึดตัวอย่างกับเครื่องตรวจสอบ และติดเทปกาวยึดให้แน่น

(2) สำหรับแผ่นยางที่จะตรวจสอบภาคตัดขวาง นำมาแช่ในไนโตรเจนเหลว แล้วหักให้เป็นลักษณะสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก ให้มีความกว้างเท่ากับเส้นผ่านศูนย์กลางของแท่งเหล็กทรงกระบอก ติดเทปกาวยึดกับอุปกรณ์ช่วยยึดตัวอย่างซึ่งจะมีลักษณะเป็นทรงกระบอกครึ่งซีกขนาดเล็ก โดยหันภาคตัดขวางด้านที่สนใจขึ้นด้านบนให้เลยขอบของแท่งเหล็กเล็กน้อย

(3) ทำสัญลักษณ์สำหรับด้านหน้า และภาคตัดขวางของตัวอย่างที่ใต้แท่งเหล็กตามลำดับตัวเลขหรือตัวอักษร

(4) ทำซ้ำข้อ (1) – (3) จนครบทุกตัวอย่าง

(5) นำตัวอย่างทั้งหมดไปฉาบด้วยทอง

(6) นำตัวอย่างที่ได้จากการฉาบด้วยทอง ประกอบเข้ากับแป้นของเครื่องตรวจสอบ ตามลำดับที่กำหนดไว้

(7) ส่องดูบริเวณพื้นผิวของตัวอย่าง ปรับกำลังขยาย เลือกภาพที่ต้องการและสั่งพิมพ์ภาพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

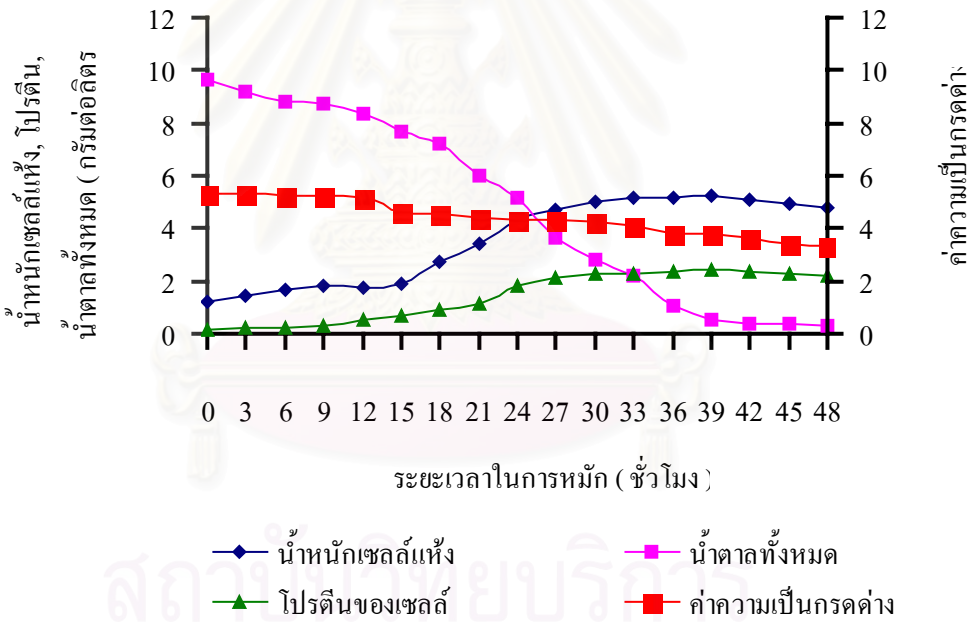
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต

4.1.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Endomycopsis fibuligera* TISTR 5097

เลี้ยงเชื้อ *E. fibuligera* TISTR 5097 ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร yeast starch (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อทุกๆ 3 ชั่วโมง โดยหาปริมาณเซลล์แห้ง ปริมาณโปรตีนจริงของตัวเซลล์ น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไป และค่าความเป็นกรดด่างได้ข้อมูลแสดงในรูปที่ 4.1



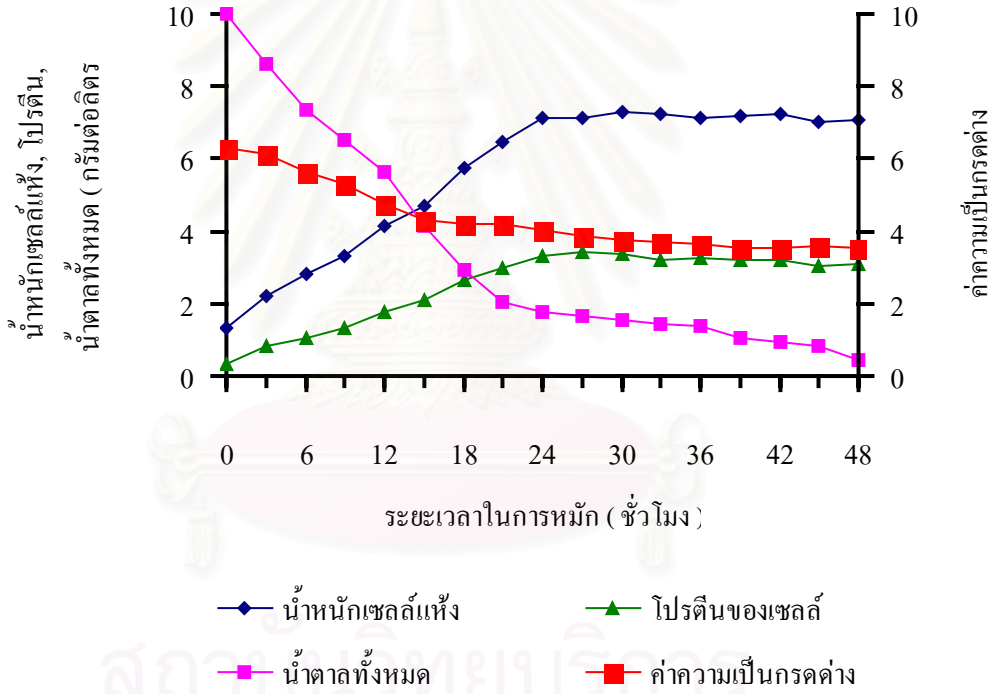
รูปที่ 4.1 รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Endomycopsis fibuligera* TISTR 5097

จากรูปที่ 4.1 เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. fibuligera* TISTR 5097 ที่เลี้ยงในอาหาร yeast starch เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เชื้อมีน้ำหนักเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 39 เท่ากับ 5.26 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทั้งหมดก็มีปริมาณลดลงเนื่องจากเชื้อนำไปใช้ในการเจริญเติบโต รวมถึงค่าความเป็นกรดด่างก็ค่อยๆลดลงในขณะที่เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยค่าอัตราการเจริญเติบโต

จำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.121 ต่อชั่วโมง ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 46.20 เปอร์เซ็นต์ และกรัมเซลล์ต่อสับสเตรทสูงสุดเท่ากับ 0.526

4.1.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001

เลี้ยงเชื้อ *C. utilis* TISTR 5001 ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร yeast malt (YM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อทุกๆ 3 ชั่วโมง โดยหาปริมาณเซลล์แห้ง ปริมาณโปรตีนจริงของตัวเซลล์ น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไป และค่าความเป็นกรดด่าง ได้ข้อมูลแสดงในรูปที่ 4.2

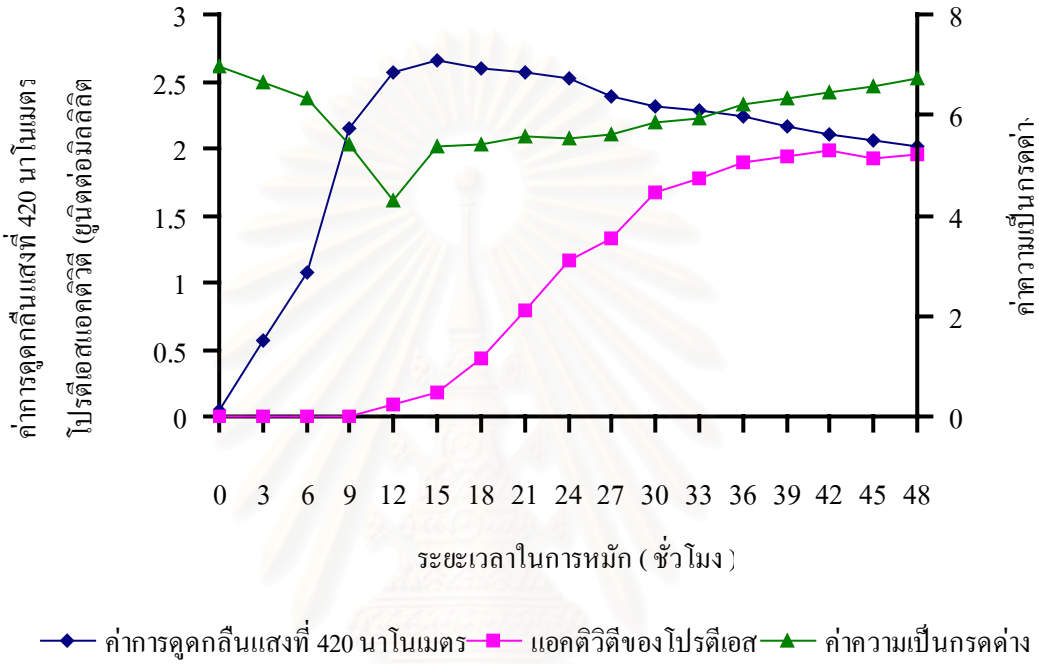


รูปที่ 4.2 รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001

จากรูปที่ 4.2 เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. utilis* TISTR 5001 ที่เลี้ยงในอาหาร yeast malt เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อมีน้ำหนักเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 30 เท่ากับ 7.32 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทั้งหมดก็มีปริมาณลดลงเนื่องจากเชื้อนำไปใช้ในการเจริญเติบโต รวมถึงค่าความเป็นกรดด่างก็ค่อยๆลดลงในขณะที่เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.159 ต่อชั่วโมง โปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 47.76 เปอร์เซ็นต์ และกรัมเซลล์ต่อสับสเตรทสูงสุดเท่ากับ 0.732

4.1.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร nutrient broth (NB) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์โปรตีเอส และวัดค่าความเป็นกรดด่าง ได้ข้อมูลแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25

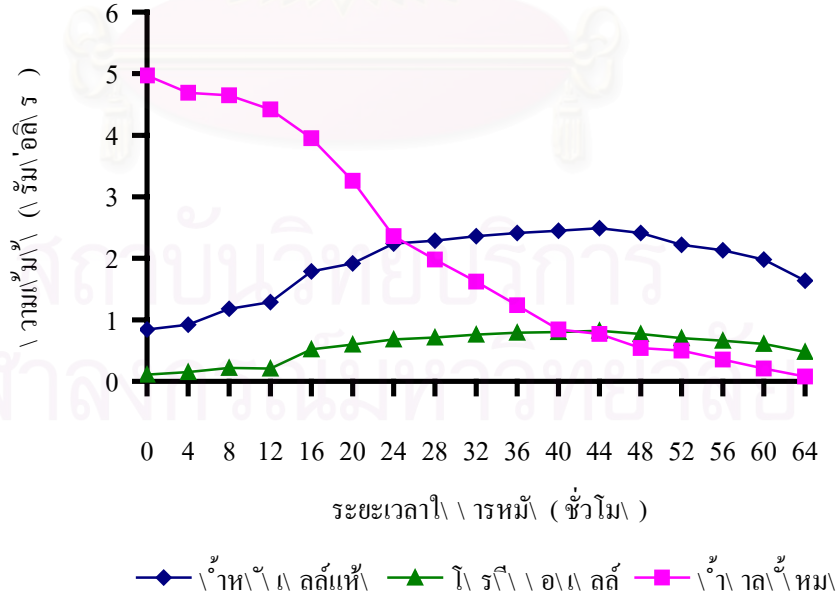
จากรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรสูงสุดเท่ากับ 2.66 โดยพบว่ายังไม่มีการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส จนเชื้อเริ่มมีการเจริญคงที่ในชั่วโมง ที่ 15 จะเป็นช่วงที่เชื้อเริ่มมีการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส โดยเชื้อจะมีการเจริญเติบโตที่คงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 24 และอัตราการเจริญก็จะลดลงคือเริ่มมีการตาย ในขณะที่การผลิตเอนไซม์ยังคงมีอยู่ต่อไป โดยมีโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 1.98 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 42 และเริ่มมีปริมาณคงที่ ส่วนค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นอยู่ 7.0 จะลดลงในช่วงแรกจนถึงชั่วโมงที่ 12 จากนั้นก็จะค่อยๆเพิ่มขึ้นจนอยู่ในระดับใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Seung-Hyeon Moon (1990)

4.2 ปริมาณวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยเลี้ยงเชื้อผสมในขวดเขย่า

โดยเลี้ยงเชื้อ *E. fibuligera* TISTR 5097 ปริมาตร 7 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (น้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 5 กรัมต่อลิตร) เมื่อครบ 16 ชั่วโมงเติม *C. utilis* TISTR 5001 ปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (น้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 7 กรัมต่อลิตร) และเมื่อครบ 40 ชั่วโมงเติมเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (ค่าความขุ่นที่ 420 นาโนเมตรประมาณ 0.5) โดยเลี้ยงเชื้อผสมในขวดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ (ภาคผนวก ก) ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

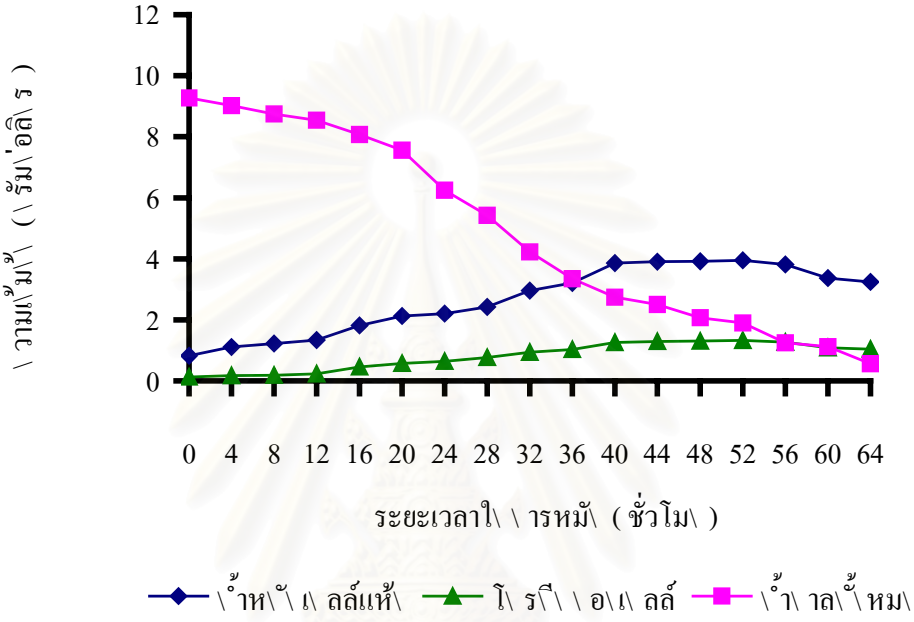
4.2.1 การหาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว

โดยการเลี้ยงเชื้อผสมของ *E. fibuligera* TISTR 5097 และ *C. utilis* TISTR 5001 และ *B. subtilis* TISTR 25 (ตามวิธีในข้อ 4.2) ในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็น 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในขวดทดลอง เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อผสมทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 64 ชั่วโมง โดยหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์ (intracellular protein) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ได้ข้อมูลแสดงในรูปที่ 4.4 - 4.7 ตามลำดับ



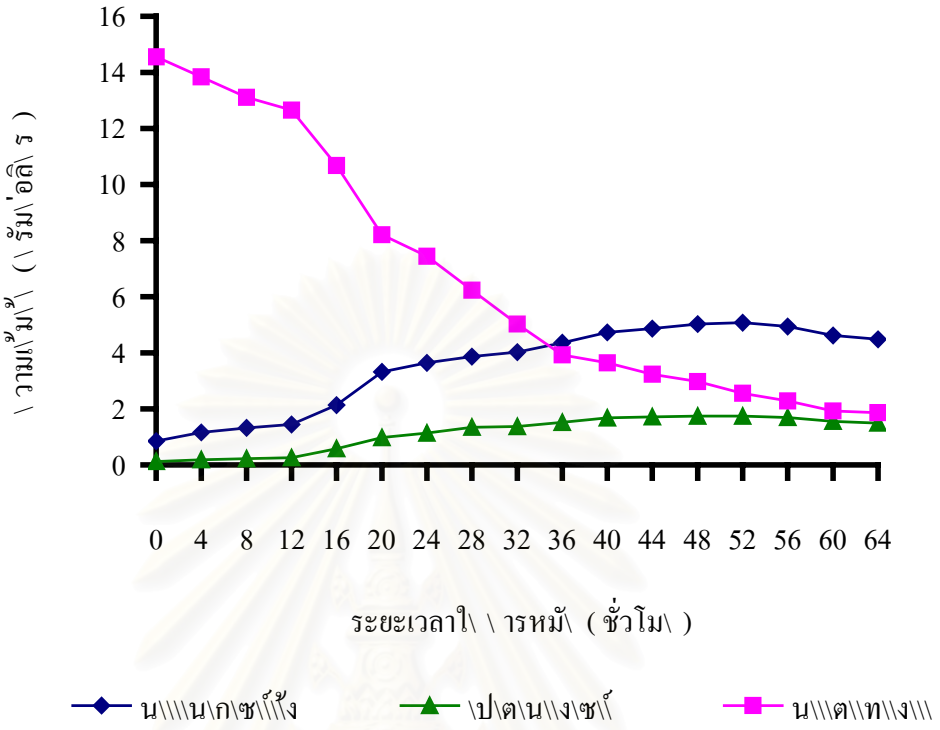
รูปที่ 4.4 รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมที่เลี้ยงในขวดเขย่า ในอาหารขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.4 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.49 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 32.93 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.498



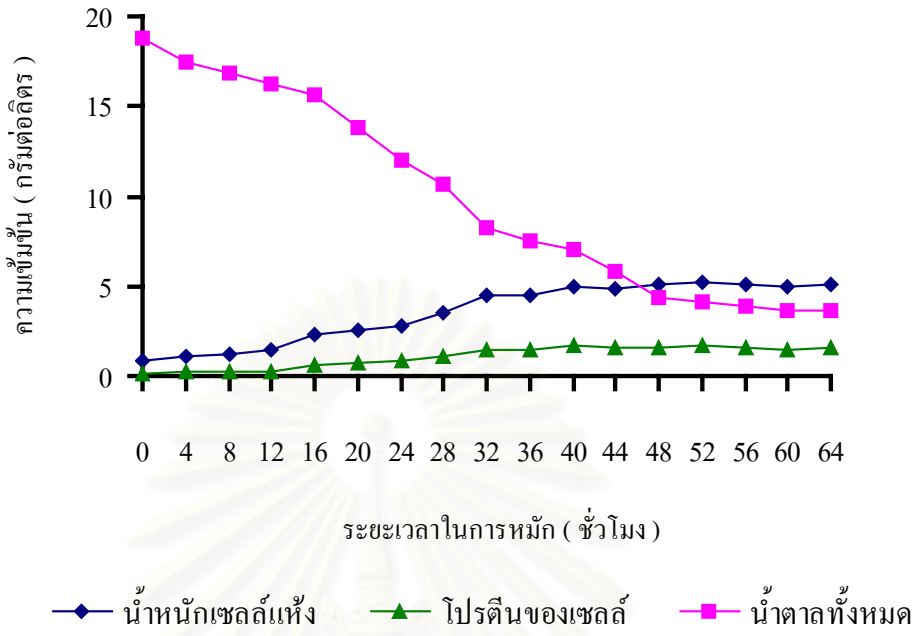
รูปที่ 4.5 รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมที่เลี้ยงในขวดเขย่า ในอาหารขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.5 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.95 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 33.67 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.395



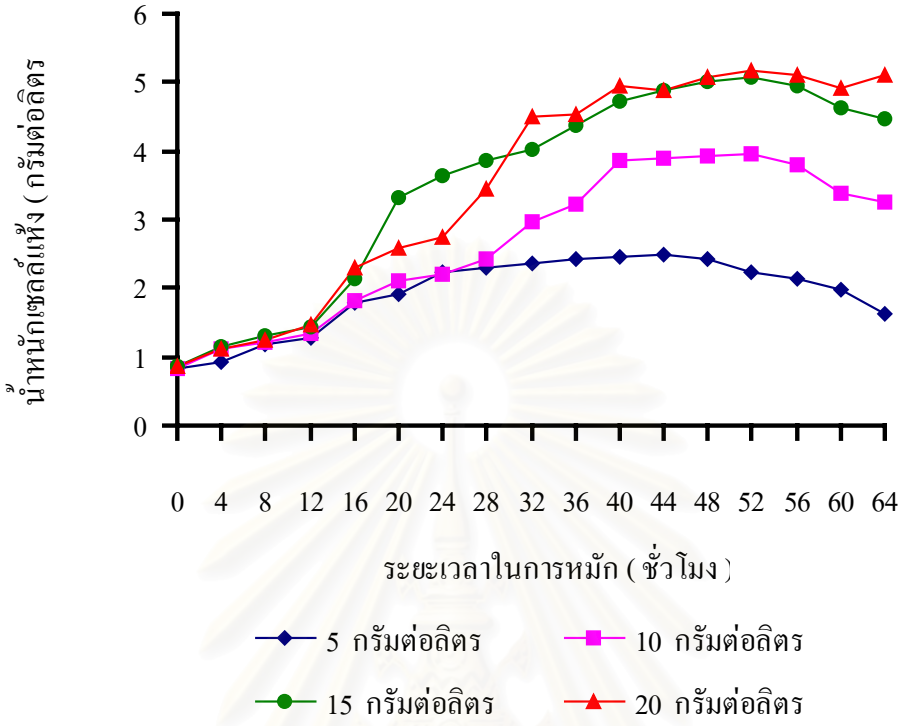
รูปที่ 4.6 รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมที่เลี้ยงในขวดเขย่า ในอาหารขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.6 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.08 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 35.52 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.339



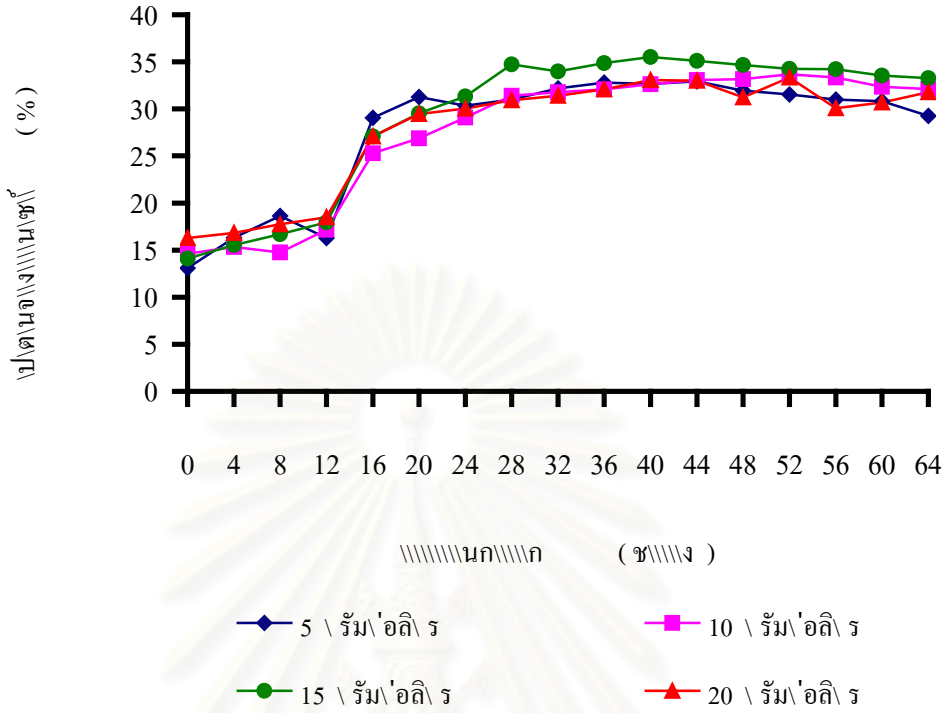
รูปที่ 4.7 รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมที่เลี้ยงในขวดเขย่า ในอาหารขั้นต่ำที่มีแป้งสำปะหลัง 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.7 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.16 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 33.33 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.258



รูปที่ 4.8 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

จากรูปที่ 4.8 เป็นการเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.49, 3.95, 5.08 และ 5.16 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



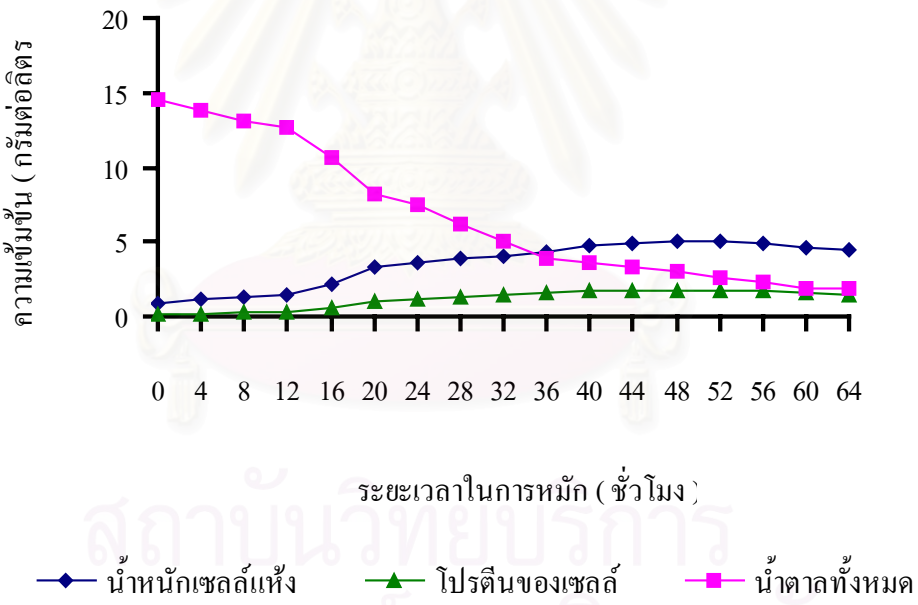
รูปที่ 4.9 การเปรียบเทียบโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.9 เป็นการเปรียบเทียบโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อมีปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 32.93, 33.67, 35.52 และ 33.33 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก

จากรูปที่ 4.8 จะเห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแอมโมเนียม 2 กรัมต่อลิตร และแป้งมันสำปะหลัง 15 และ 20 กรัมต่อลิตร จะให้ผลน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดมากกว่า ที่ 5 และ 10 กรัมต่อลิตรอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์ ในรูปที่ 4.9 จะเห็นได้ว่าแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรจะให้ผลปริมาณโปรตีนภายในเซลล์สูงสุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไป

4.2.2 การหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว

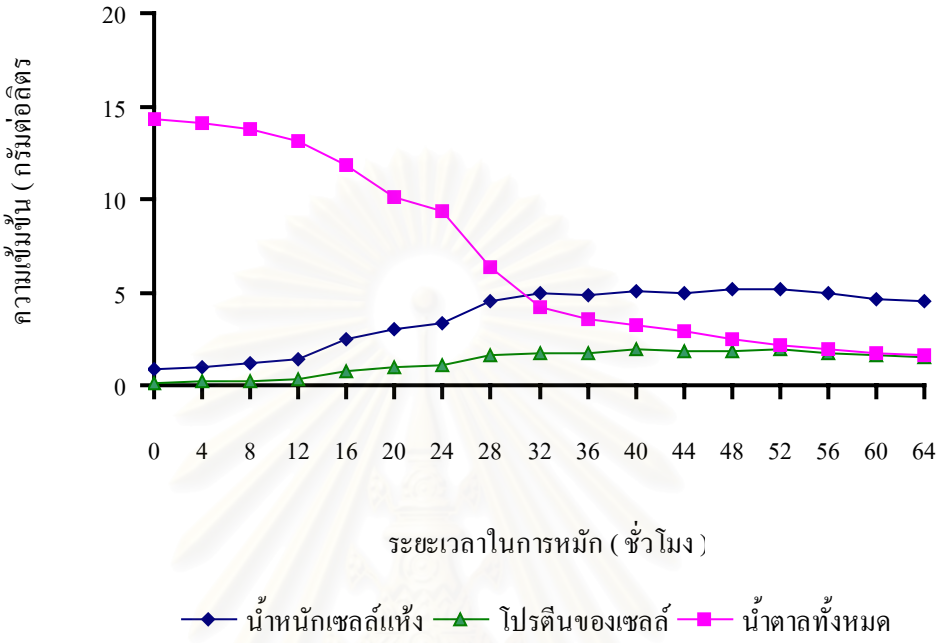
แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นสารที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่หาง่ายและมีราคาถูก จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้เป็นสารอาหารได้ง่าย โดยมีผลต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์โปรตีนเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ (Boze และคณะ, 1992) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโต และการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว โดยการเลี้ยงเชื้อ *E. fibuligera* และ *C. utilis* และ *B. subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ (ภาคผนวก ก) ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.3.1 คือ 15 กรัมต่อลิตร โดยแปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 2, 5, 7 และ 10 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 64 ชั่วโมง ติดตามการเจริญเติบโตโดยหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ได้ข้อมูลแสดงในรูปที่ 4.10 - 4.13



รูปที่ 4.10 รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร

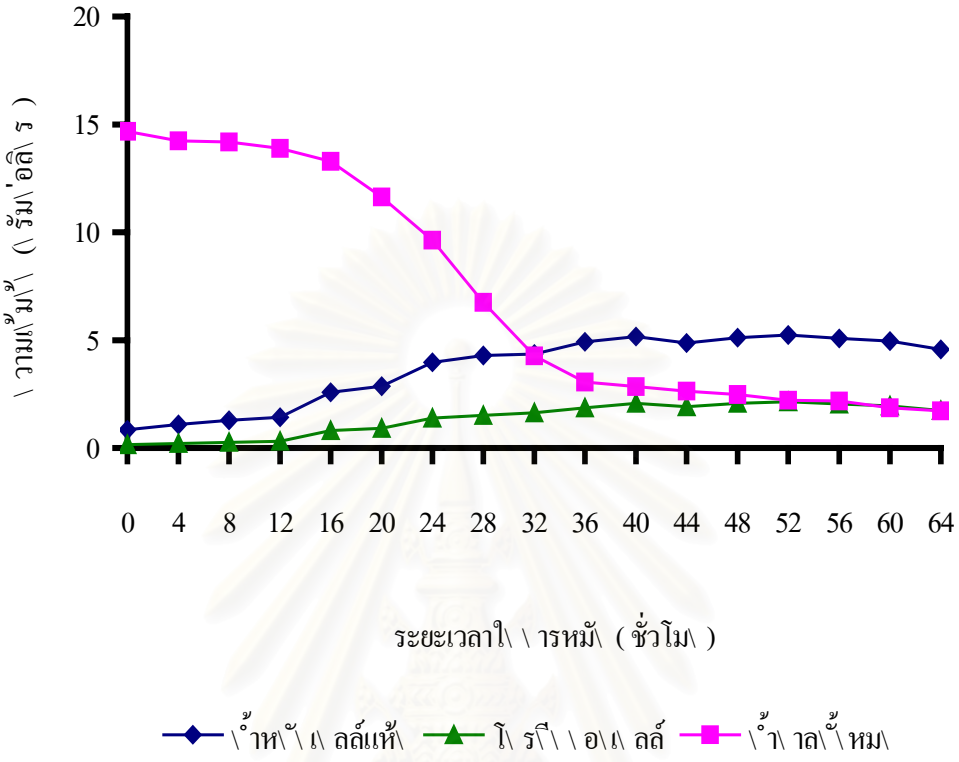
จากรูปที่ 4.10 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อมี

น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.08 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 35.52 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.339



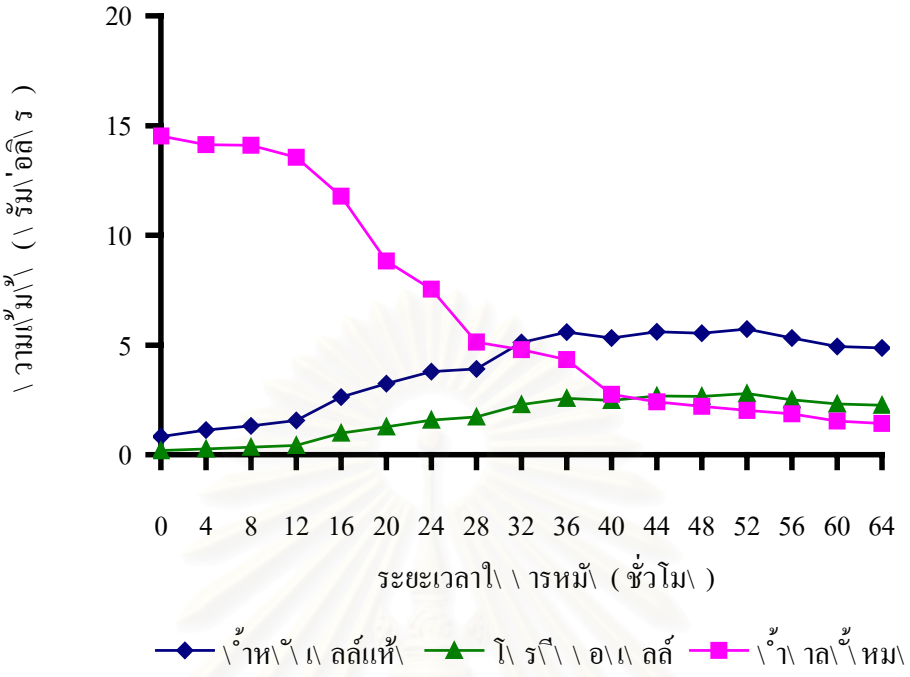
รูปที่ 4.11 รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.11 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.17 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 37.52 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.345



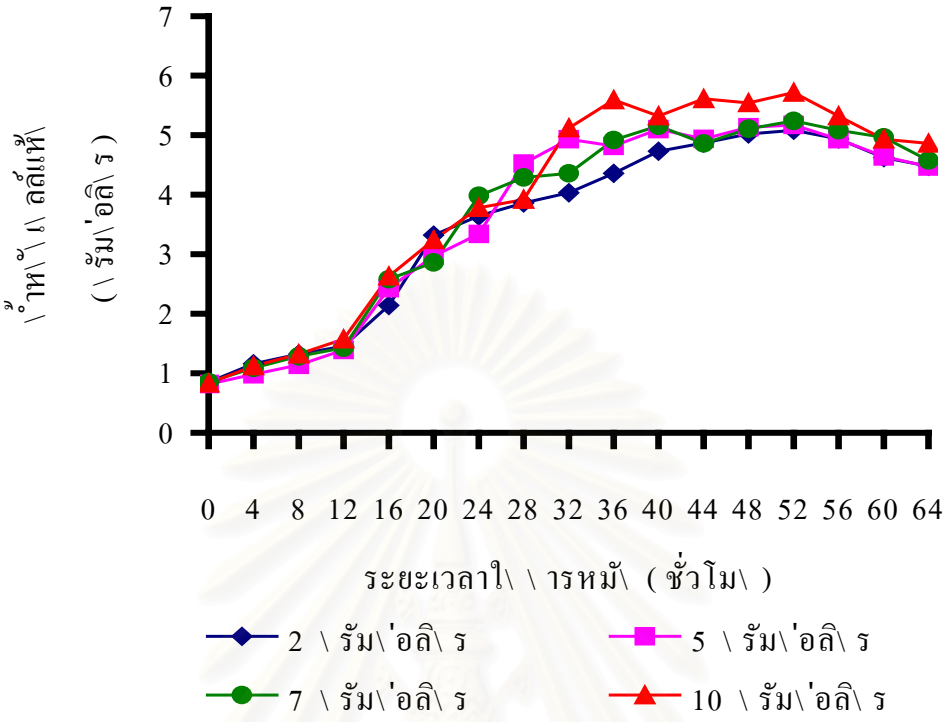
รูปที่ 4.12 รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 7 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.12 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 7 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.24 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 40.84 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.349



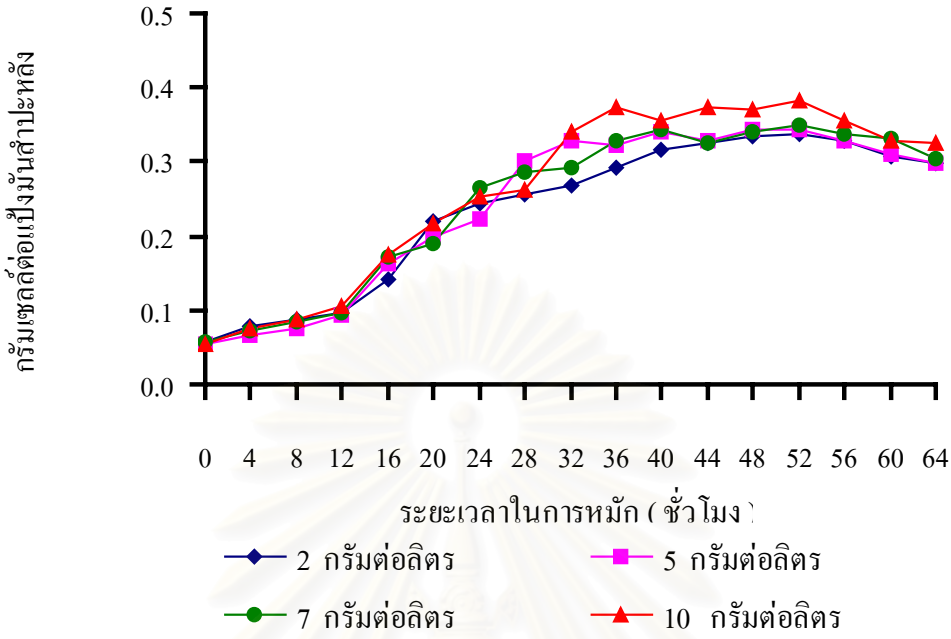
รูปที่ 4.13 รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.13 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.72 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 48.60 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.381



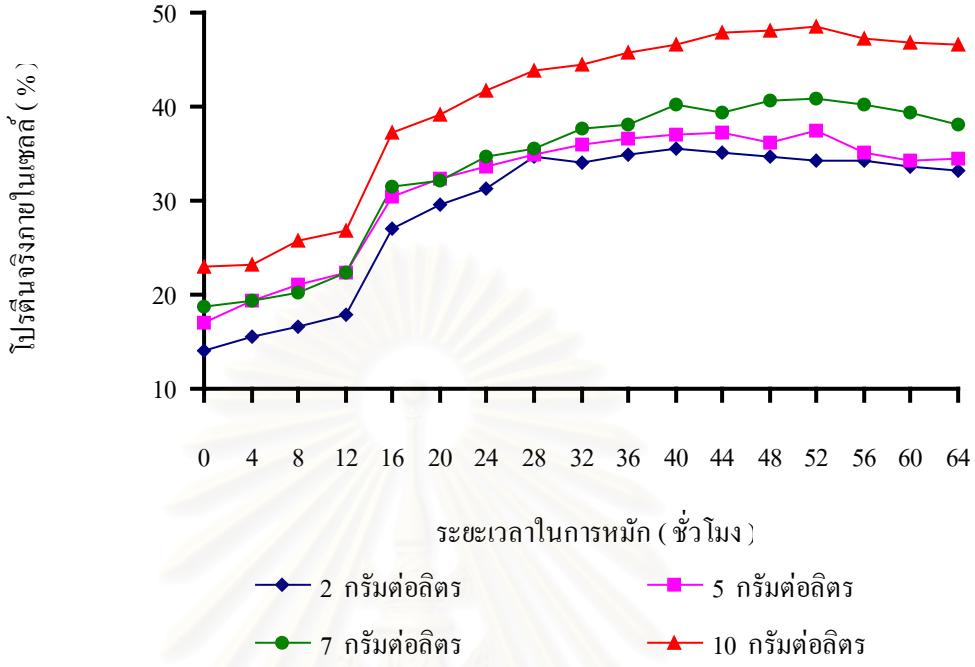
รูปที่ 4.14 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 2, 5, 7 และ 10 กรัมต่อลิตรร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.14 เป็นการเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 2, 5, 7 และ 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ร่วมกับ แป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.08, 5.17, 5.24 และ 5.72 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าผลของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 4.15 การเปรียบเทียบกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มี แอมโมเนียมซัลเฟต 2, 5, 7 และ 10 กรัมต่อลิตรร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.15 เป็นการเปรียบเทียบกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.339, 0.345, 0.349 และ 0.381 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 4.16 การเปรียบเทียบโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 2 , 5, 7 และ 10 กรัมต่อลิตรร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.16 เป็นการเปรียบเทียบโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 35.52, 37.52, 40.84 และ 48.60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจะมีผลให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดแตกต่างกันอย่างชัดเจนโดยยิ่งปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตมากก็ยิ่งทำให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเพิ่มขึ้น โดยจะเห็นได้ว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร ทำให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 48.60 ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน และคาร์บอนที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวในการทดลองต่อไป

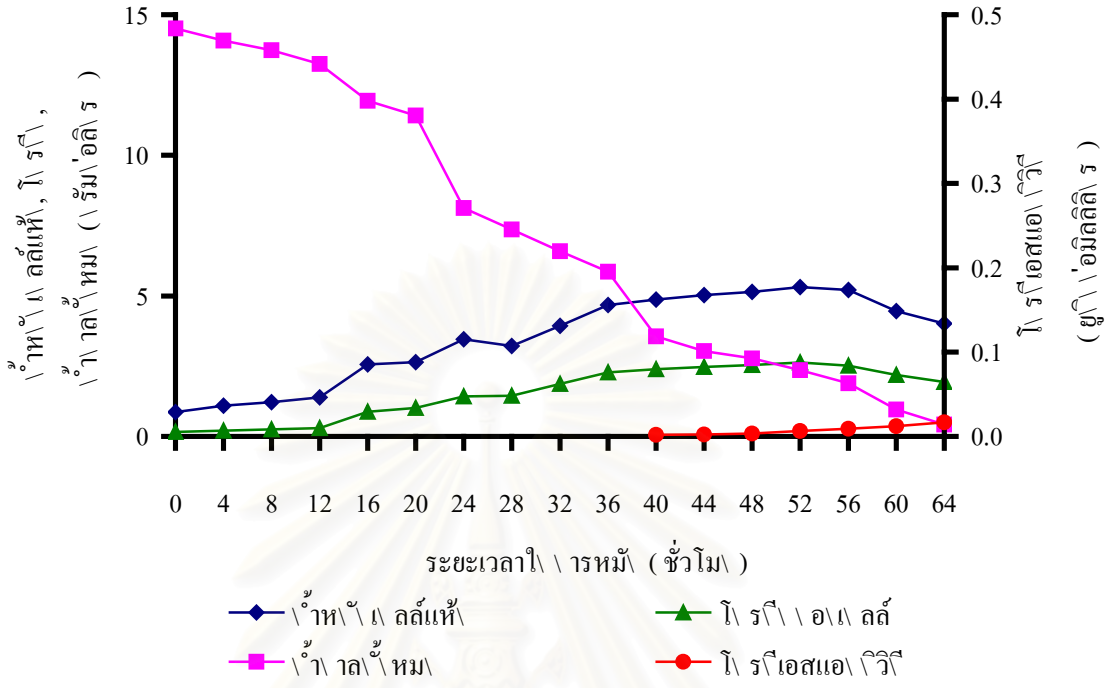
Peppler (1970) รายงานว่าการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวของยีสต์ในเชิงพาณิชย์ ควรมีปริมาณโปรตีนจริงเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ไม่ต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ขณะที่ International Union of Pure and Applied Chemistry กำหนดให้การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากจุลินทรีย์ในเชิงพาณิชย์ ควรมีปริมาณโปรตีนจริงเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ไม่ต่ำกว่า 45 เปอร์เซ็นต์

4.3 การหาภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อผสมในถังหมักเพื่อศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวและเอนไซม์โปรตีเอส

การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีการใช้แป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม มาเลี้ยงเชื้อผสม *E. fibuligera* ในถังหมัก โดยมีการควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสตลอดการเลี้ยง และควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5 โดยเติม *C. utilis* ลงไปในชั่วโมงที่ 16 เลี้ยงเชื้อต่อไปที่ภาวะเดิมเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจนถึงชั่วโมงที่ 40 ปรับค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักเป็น 7.0 พร้อมกับเติมเชื้อ *B. subtilis* และควบคุมค่าความเป็นกรดด่างอยู่ที่ 7.0 เพื่อให้ภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งการศึกษาในถังหมักนี้จะทำการศึกษาผลของอัตราเร็วในการกวนและอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวและเอนไซม์โปรตีเอส

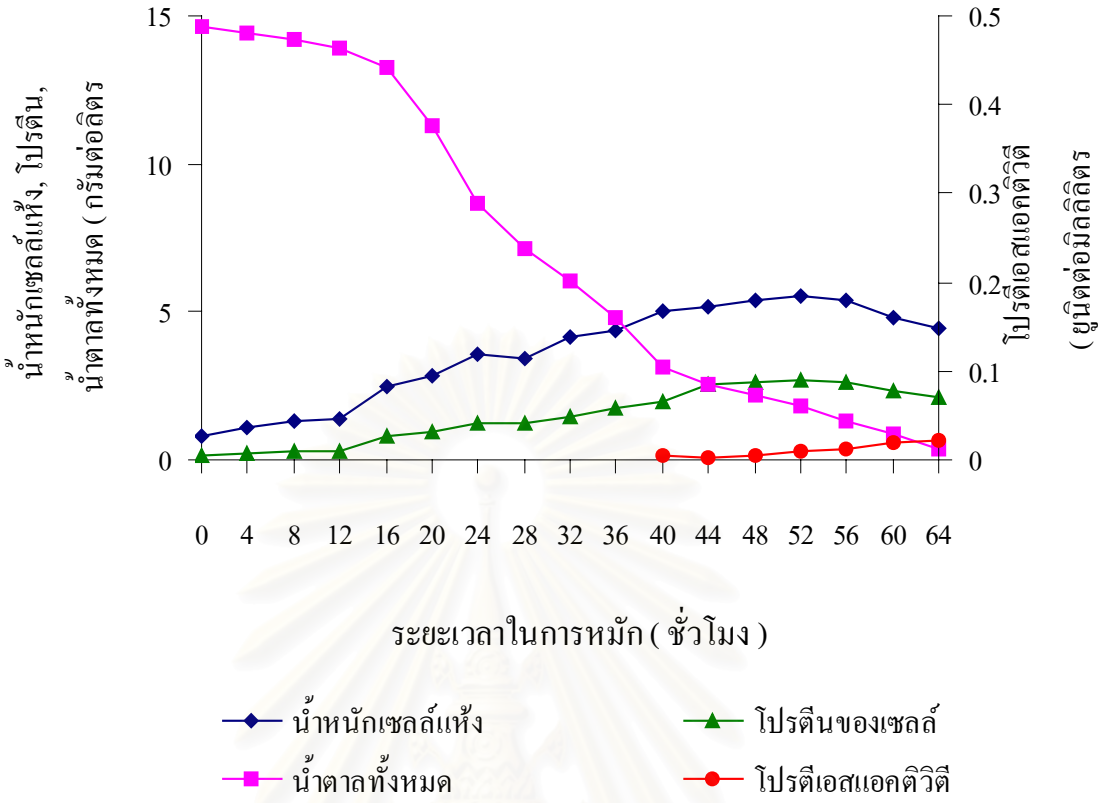
4.3.1 การศึกษาผลของอัตราเร็วในการกวนต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวและเอนไซม์โปรตีเอส

การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีการใช้แป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม มาเลี้ยงเชื้อผสม *E. fibuligera* ในถังหมัก โดยมีการควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสตลอดการเลี้ยง และควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5 โดยเติม *C. utilis* ลงไปในชั่วโมงที่ 16 เลี้ยงเชื้อต่อไปที่ภาวะเดิมจนถึงชั่วโมงที่ 40 ปรับค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักเป็น 7.0 พร้อมกับเติมเชื้อ *B. subtilis* และควบคุมค่าความเป็นกรดด่างอยู่ที่ 7.0 โดยแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที ที่อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm เลี้ยงเชื้อเป็นเวลาทั้งหมด 64 ชั่วโมง ติดตามการเจริญเติบโต การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ทุกๆ 4 ชั่วโมง โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) และโปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.17 – 4.20



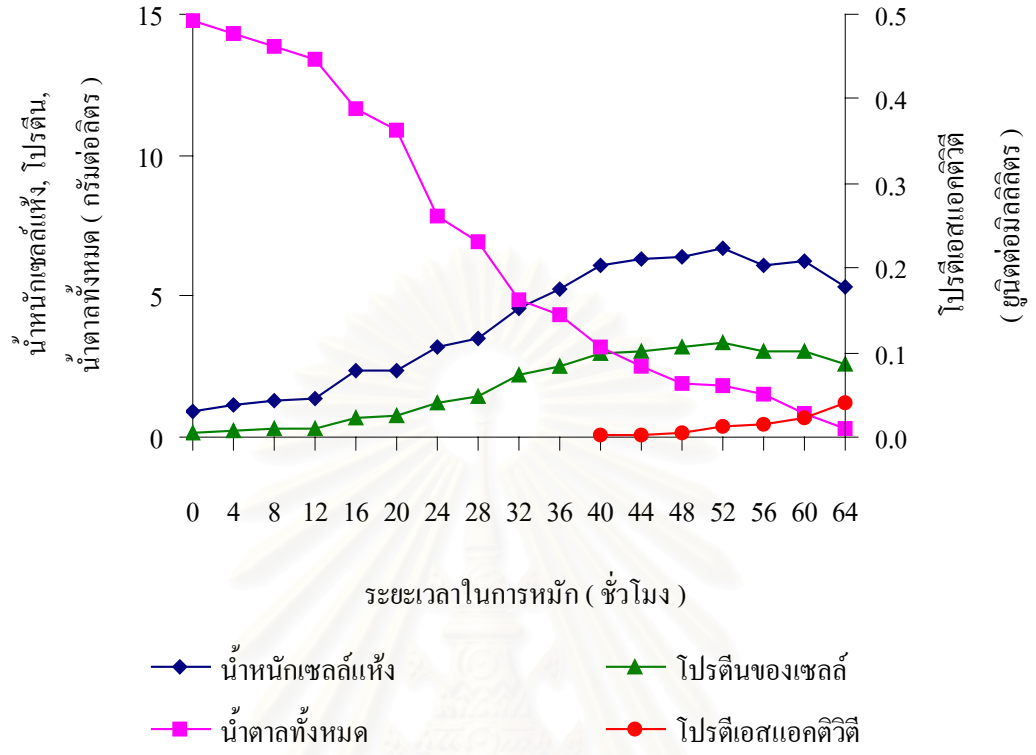
รูปที่ 4.17 รูปแบบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วการกวน 150 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

จากรูปที่ 4.17 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วในการกวน 150 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm พบว่าเชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.32 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 49.44 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.355 และโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดในชั่วโมงที่ 64 เท่ากับ 0.0166 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



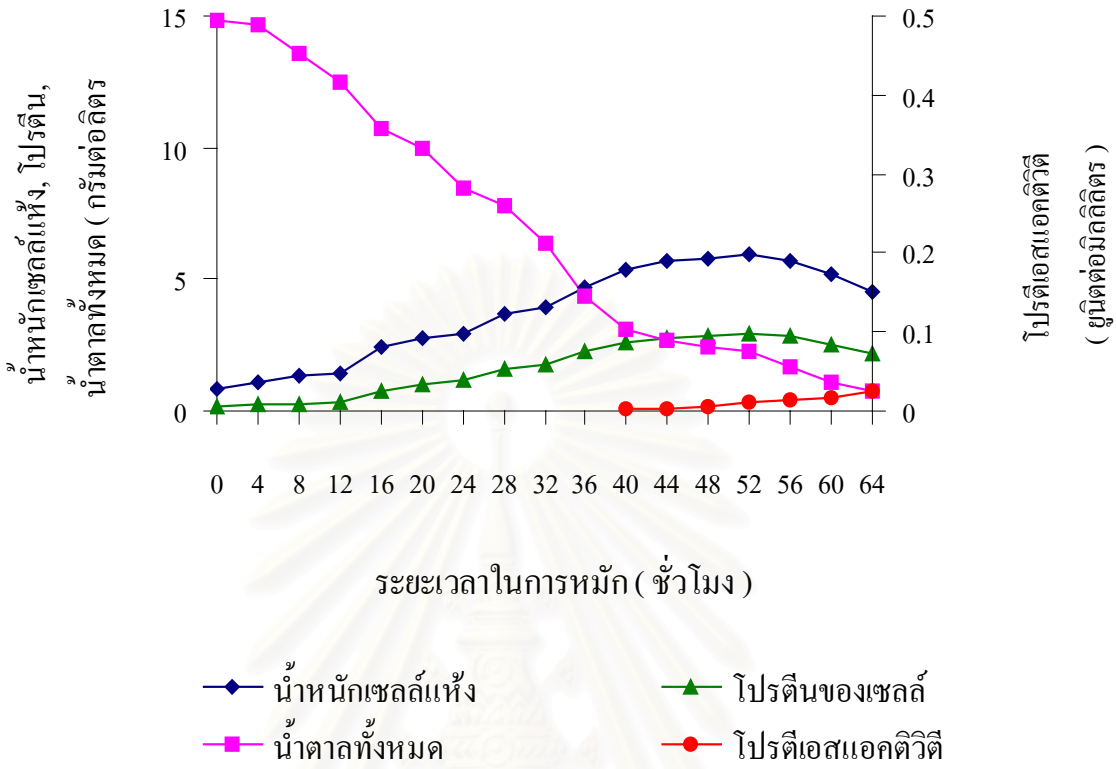
รูปที่ 4.18 รูปแบบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

จากรูปที่ 4.18 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วในการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm พบว่า เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.52 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 49.28 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.368 และ โปรตีเอสแอคติวิติสูงสุดในชั่วโมงที่ 64 เท่ากับ 0.0228 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



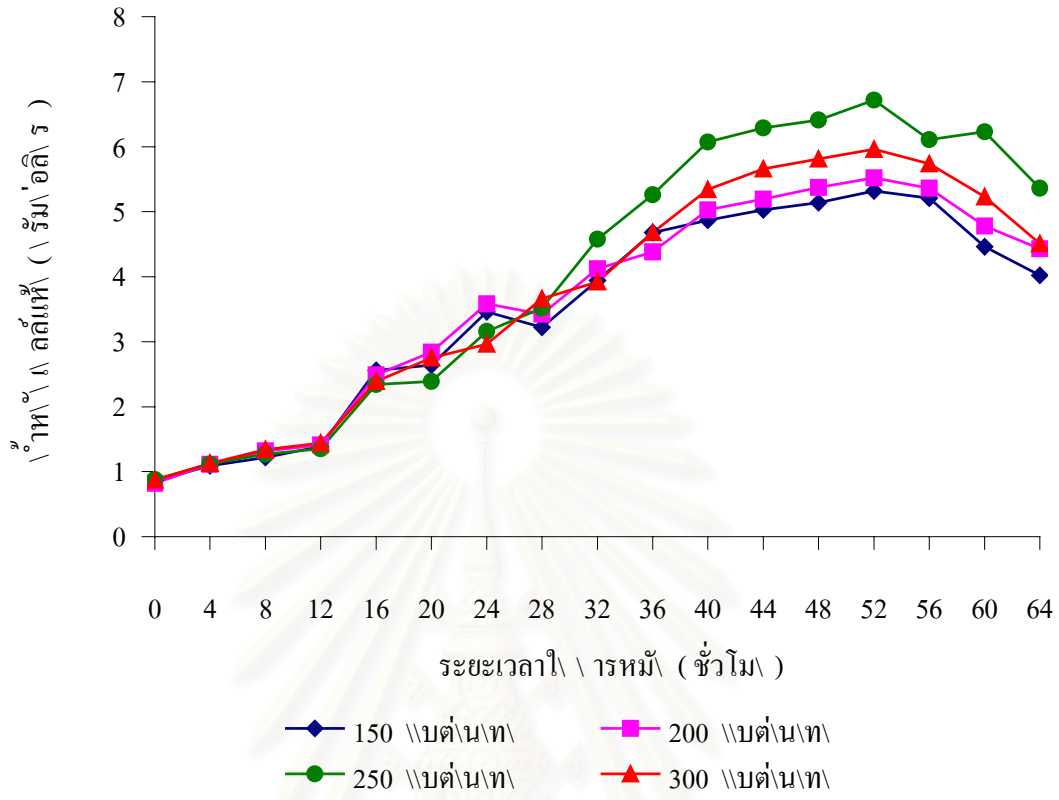
รูปที่ 4.19 รูปแบบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วการกวน 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

จากรูปที่ 4.19 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm พบว่า เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.72 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 49.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.448 และโปรตีเอสแอคติวิติสูงสุดในชั่วโมงที่ 64 เท่ากับ 0.0412 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากงานวิจัยของสนธยา ศรีเมฆ (2533) เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารสูตรปรับต่ำร่วมกับสารต้นตอไนโตรเจนชนิดต่างๆที่ pH 6.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดอยู่ในช่วง 0.02 – 0.08 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.20 รูปแบบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

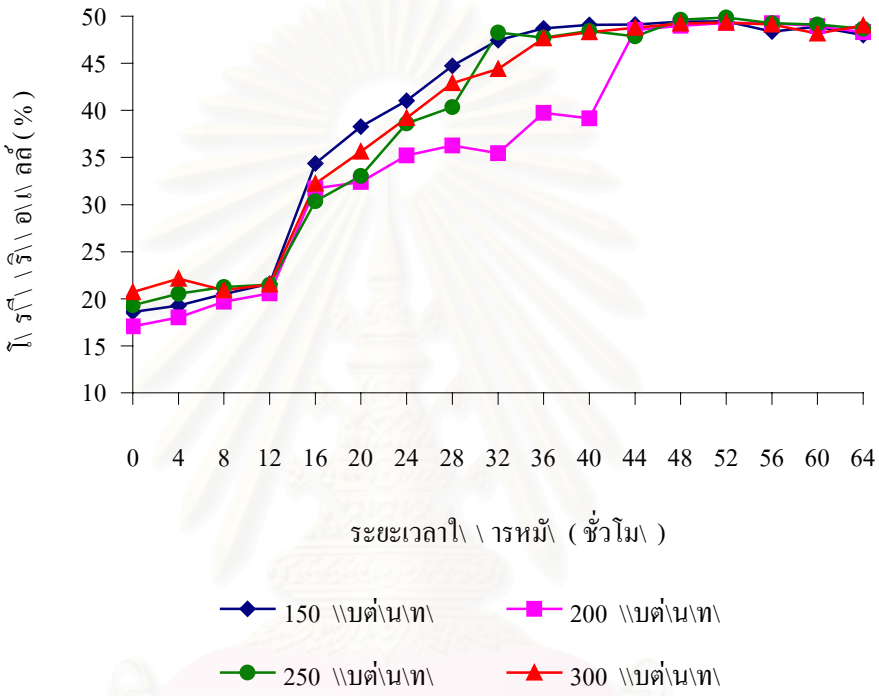
จากรูปที่ 4.20 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm พบว่า เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.96 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 49.33 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.397 และโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดในชั่วโมงที่ 64 เท่ากับ 0.0245 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.21 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราเร็วในการกวน 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ที่มีต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

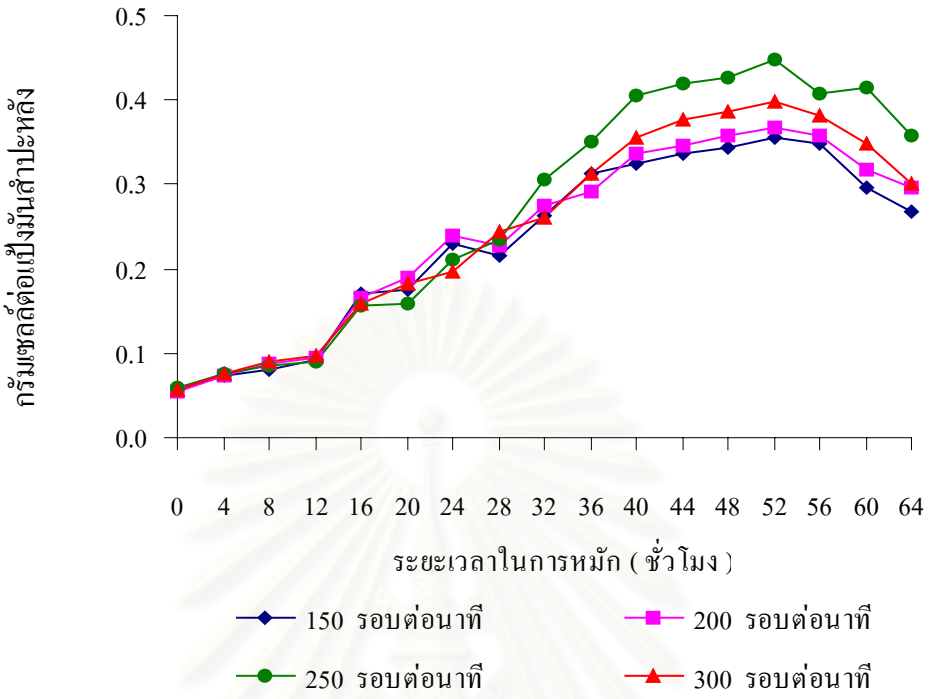
จากรูปที่ 4.21 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราเร็วในการกวนที่มีต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วในการกวน 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm พบว่า เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.32, 5.52, 6.72 และ 5.96 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าที่อัตราเร็วในการกวนเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 150 – 250 รอบต่อนาที เชื้อจะมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเพิ่มขึ้น คือ 5.32, 5.52, 6.72 กรัมต่อลิตร เนื่องจากอัตราเร็วการกวนที่มากขึ้นจะช่วยทำให้อากาศกระจายตัวได้ดีในน้ำหมักเป็นการเพิ่มการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อและช่วยทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวดีทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีโอกาสสัมผัสกับอาหารได้มากขึ้น จึงทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตที่ดี โดยที่อัตราเร็วการกวน 300 รอบต่อนาที เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.96 ซึ่งน้อยกว่าที่

อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที อาจเนื่องมาจากอัตราเร็วในการกวนที่มากเกินไปทำให้ของเหลวในถังหมักมีความปั่นป่วนมากไปซึ่งเป็นสภาพที่ไม่เหมาะในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และอาจเกิด vortex ได้มากจึงเป็นเหตุให้ออกซิเจนละลายไม่ดีในน้ำหมักจึงทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดของเชื้อลดลง



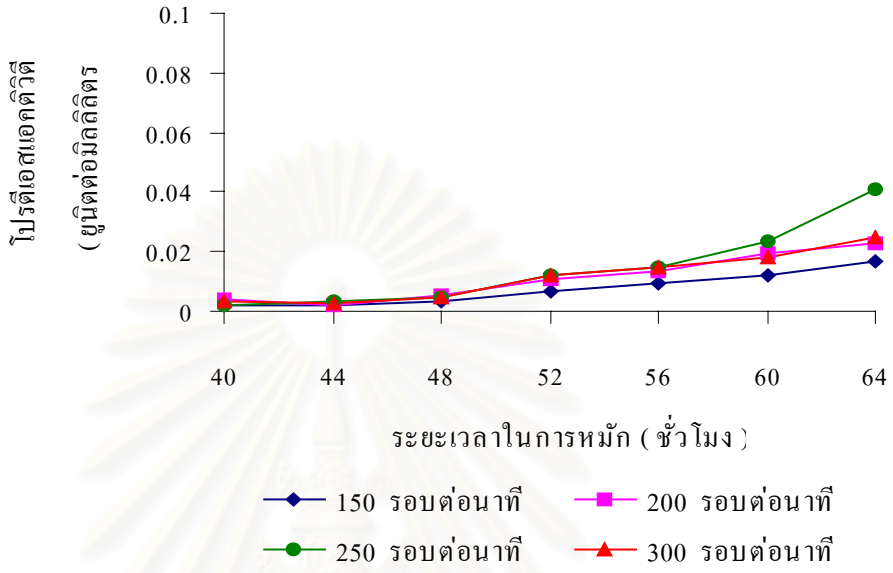
รูปที่ 4.22 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราเร็วในการกวน 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ที่มีต่อปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุด ในการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

จากรูปที่ 4.22 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราเร็วในการกวนที่มีต่อปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุด โดยใช้อัตราเร็วในการกวน 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm พบว่า เชื้อมีปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 49.44, 49.28, 49.85 และ 49.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่อัตราเร็วในการกวนต่างๆกันไม่มีผลให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนภายในตัวเซลล์ของเชื้อมีความแตกต่างกัน



รูปที่ 4.23 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราเร็วในการกวน 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ที่มีต่อกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุด ในการ เลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

จากรูปที่ 4.23 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราเร็วในการกวนที่มีต่อกรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเตรท (แป้งมันสำปะหลัง) สูงสุด โดยใช้อัตราเร็วในการกวน 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm พบว่า เชื้อมีกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.355, 0.368, 0.448 และ 0.397 ตามลำดับ อัตราเร็วในการกวนมีผลต่อ กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเช่นเดียวกับน้ำหนักเซลล์แห้ง คือที่อัตราเร็วการกวน 250 รอบต่อนาที ให้ผลดีที่สุด

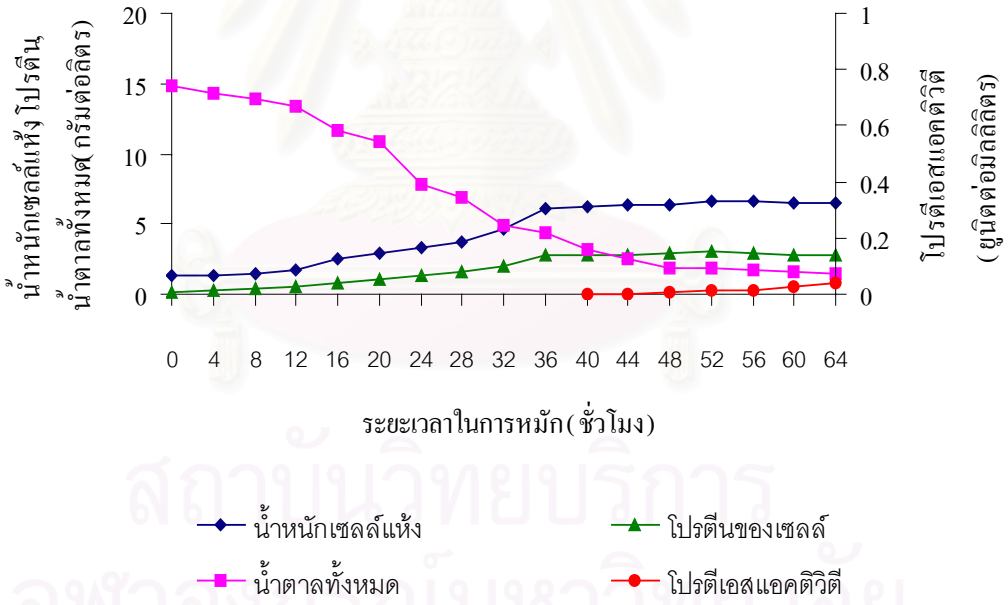


รูปที่ 4.24 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราเร็วในการกวน 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ที่มีต่อโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุด ในการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

จากรูปที่ 4.24 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราเร็วในการกวนที่มีต่อโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุด โดยใช้อัตราเร็วในการกวน 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm พบว่า เชื้อมีโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุด เท่ากับ 0.0166, 0.0228, 0.0412 และ 0.0245 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยที่แต่ละอัตราเร็วการกวนค่าโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 64 จะเห็นได้ว่าอัตราเร็วในการกวนที่เพิ่มขึ้นจะให้ค่าโปรตีเอสแอคติวิตีเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งที่อัตราเร็วในการกวนที่มากเกินไปคือที่ 300 รอบต่อนาที นอกจากเป็นภาวะที่ไม่เหมาะในการเจริญของเชื้อแล้ว ยังเป็นการสิ้นเปลืองพลังงานในการผลิตอีกด้วย ดังนั้นอัตราเร็วการกวนที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นข้อมูลในการทดลองขั้นต่อไป คือ ที่อัตราเร็ว 250 รอบต่อนาที

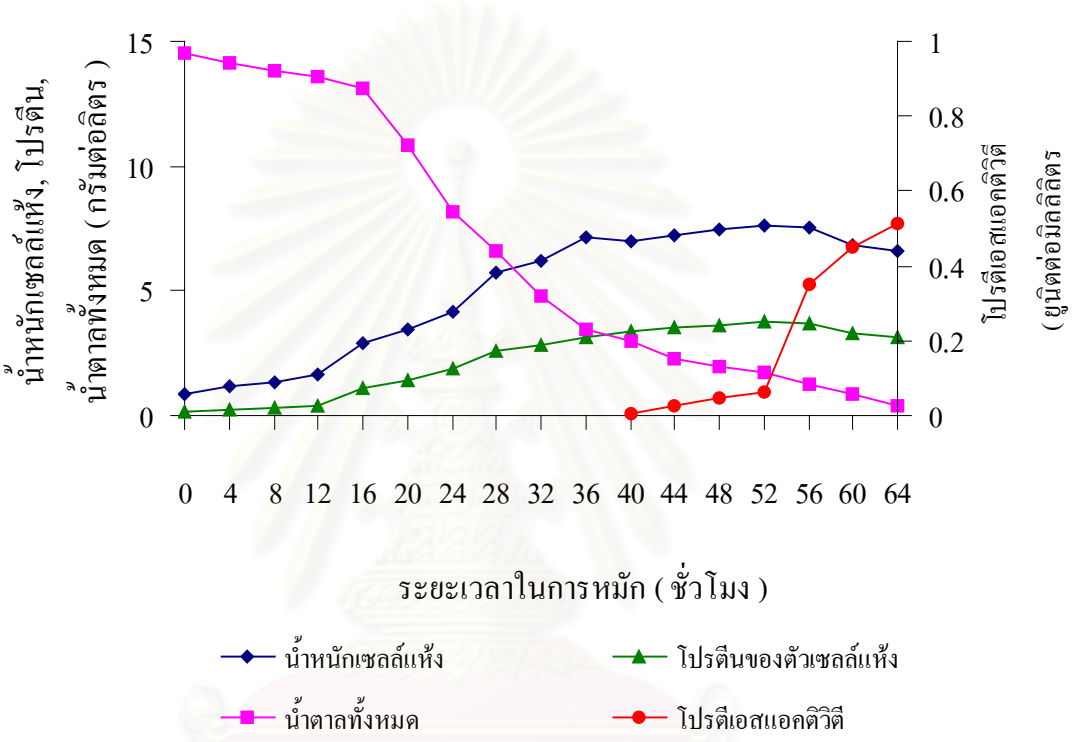
4.3.2 การศึกษาผลของอัตราการให้อากาศต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวและเอนไซม์โปรตีเอส

การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีการใช้แป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม มาเลี้ยงเชื้อผสม *E. fibuligera* ในถังหมัก โดยมีการควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสตลอดการเลี้ยง และควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5 โดยเติม *C. utilis* ลงไปในชั่วโมงที่ 16 เลี้ยงเชื้อต่อไปที่ภาวะเดิมจนถึงชั่วโมงที่ 40 ปรับค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักเป็น 7.0 พร้อมกับเติมเชื้อ *B. subtilis* และควบคุมค่าความเป็นกรดด่างอยู่ที่ 7.0 โดยแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm และใช้อัตราเร็วในการกวนเป็น 250 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อเป็นเวลาทั้งหมด 64 ชั่วโมง ติดตามการเจริญเติบโต การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ทุกๆ 4 ชั่วโมงโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) และโปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.25 – 4.27



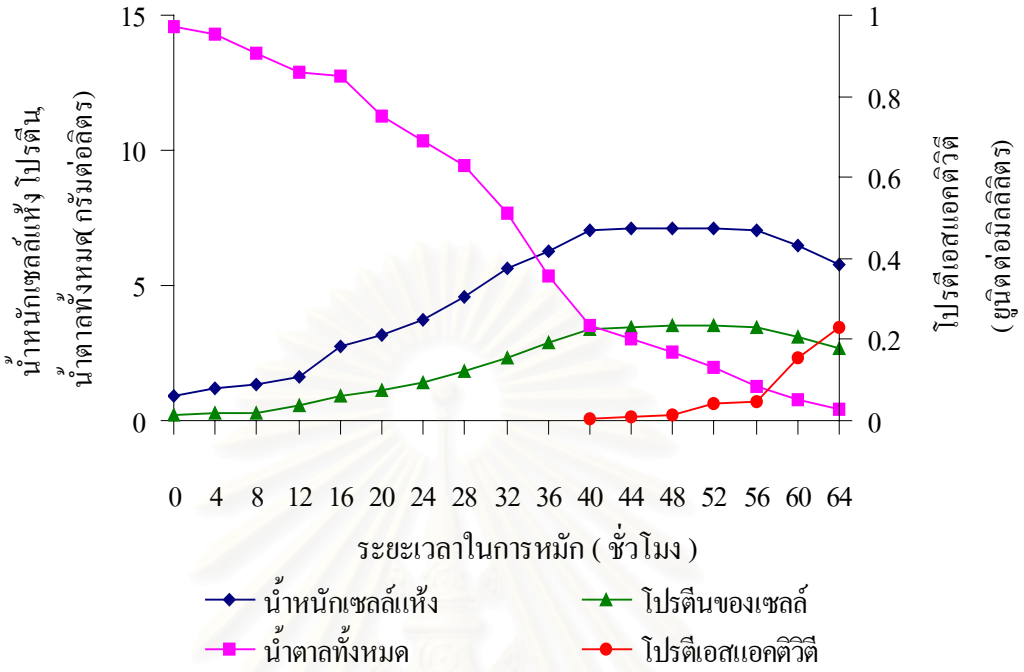
รูปที่ 4.25 รูปแบบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วการกวน 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

จากรูปที่ 4.25 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm พบว่า เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.72 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 49.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.448 และโปรตีเอสแอคติวิติสูงสุดในชั่วโมงที่ 64 เท่ากับ 0.0412 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



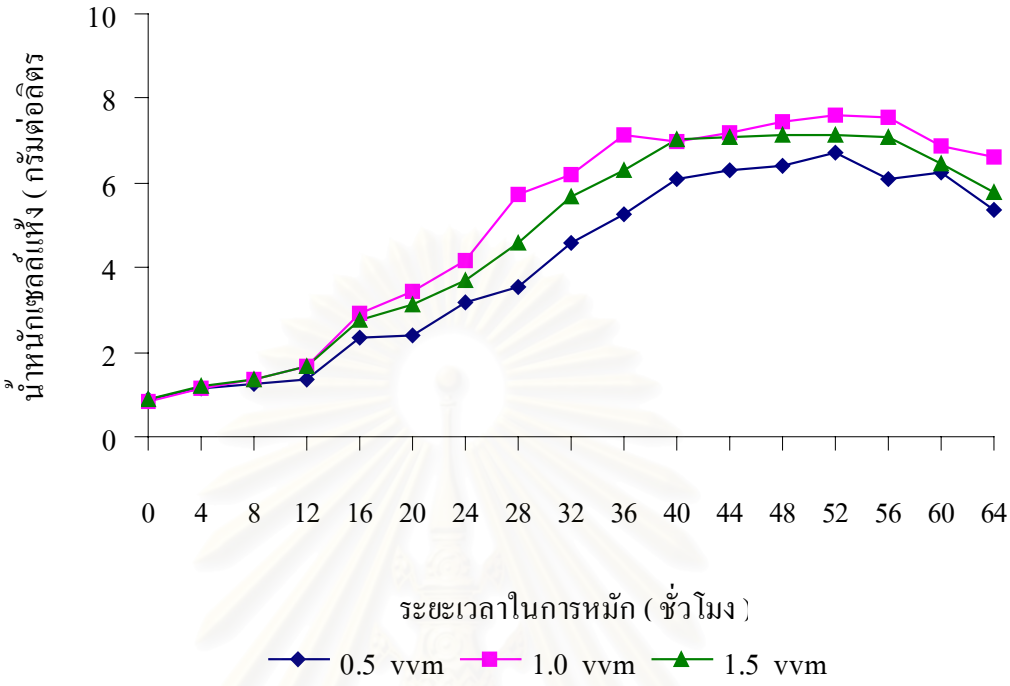
รูปที่ 4.26 รูปแบบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วการกวน 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

จากรูปที่ 4.26 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm พบว่า เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.62 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 49.74 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.508 และโปรตีเอสแอคติวิติสูงสุดในชั่วโมงที่ 64 เท่ากับ 0.512 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



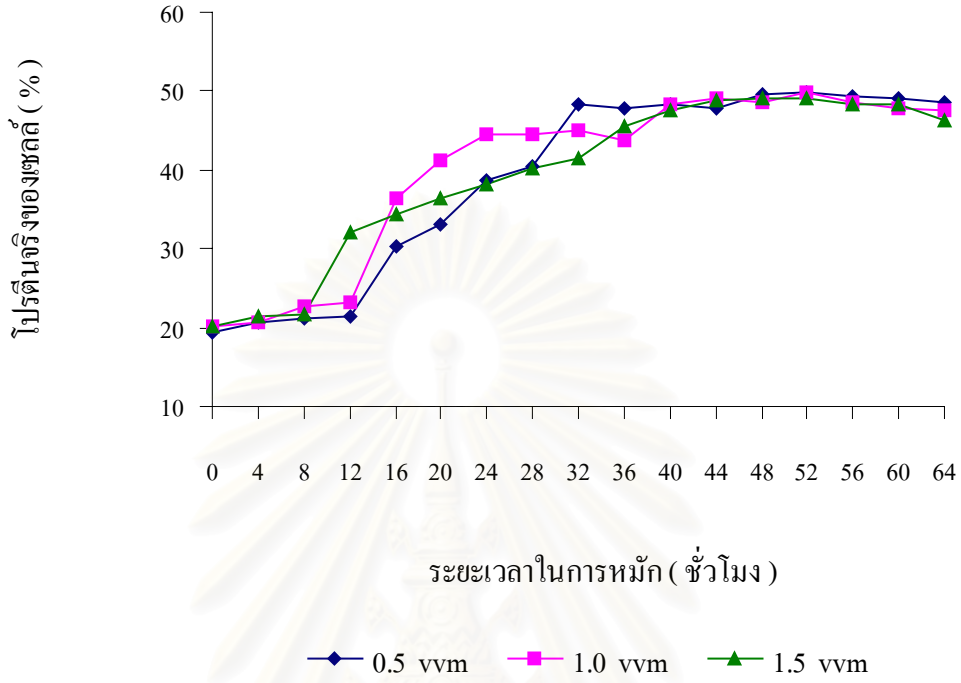
รูปที่ 4.27 รูปแบบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วการกวน 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 vvm

จากรูปที่ 4.27 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 vvm พบว่า เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.14 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 49.16 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.476 และโปรตีเอสแอคติวิติสูงสุดในชั่วโมงที่ 64 เท่ากับ 0.229 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



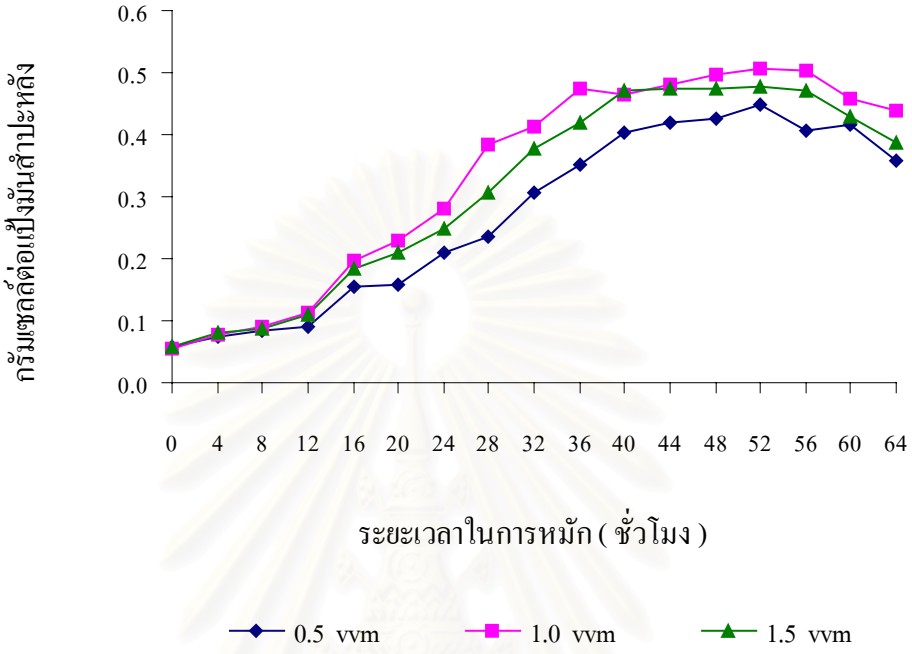
รูปที่ 4.28 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราการให้อากาศ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm และ อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที ที่มีต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในการเลี้ยงเชื้อผสมใน อาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

จากรูปที่ 4.28 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราเร็วการให้อากาศที่มีต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ในถังหมักโดยแปรผันอัตราการให้อากาศ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm โดยใช้อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที และ พบว่า เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.72, 7.62 และ 7.14 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าที่อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อที่สุดคือที่ 1.0 vvm เนื่องจากปริมาณอากาศที่มากพอดีจะทำให้เชื้อมีอากาศเพียงพอที่จะนำไปใช้ ในขณะที่อากาศที่น้อยก็อาจทำให้เชื้อมีอากาศไม่พอ และถ้ามากเกินไปก็อาจทำให้เชื้อนำไปใช้ไม่ทันได้เช่นกัน ดังนั้นอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm จึงเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุด



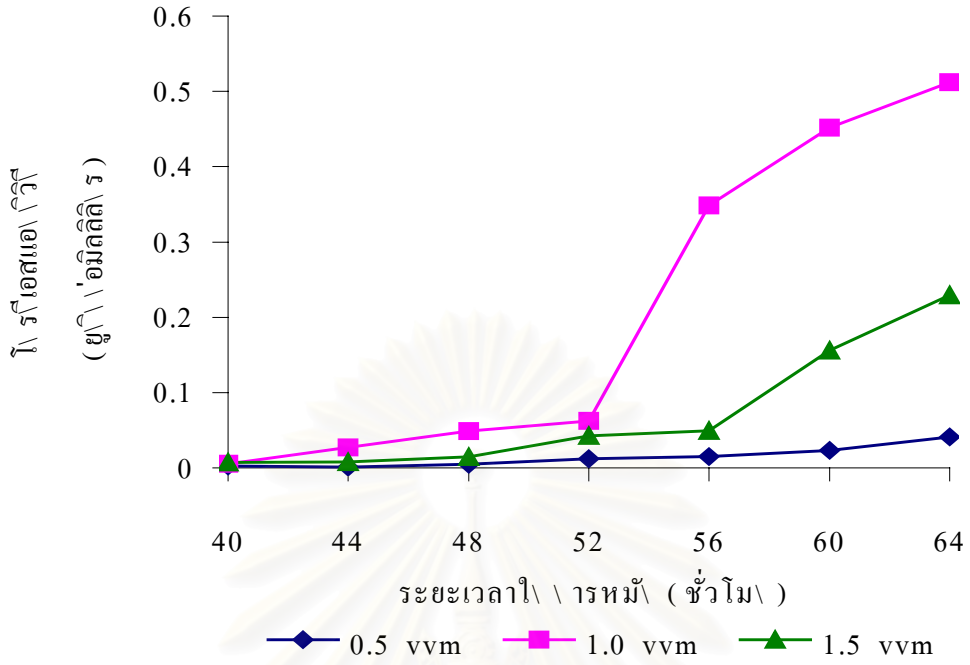
รูปที่ 4.29 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราการให้อากาศ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm และ อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที ที่มีต่อปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุด ในการเลี้ยงเชื้อผสมใน อาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

จากรูปที่ 4.29 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราการให้อากาศที่มีต่อปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุด โดยใช้อัตราการให้อากาศ 0.5 , 1.0 และ 1.5 vvm และอัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที พบว่า เชื้อมีปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 49.85, 49.74 และ 49.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเช่นเดียวกับอัตราเร็วในการกวนก็คือ อัตราการให้อากาศไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนภายในตัวเซลล์ของเชื้อเช่นเดียวกัน



รูปที่ 4.30 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราการให้อากาศ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm และ อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที ที่มีต่อกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดในการเลี้ยงเชื้อผสมใน อาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

จากรูปที่ 4.30 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราการให้อากาศที่มีต่อกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุด โดยใช้อัตราการให้อากาศ 0.5 , 1.0 และ 1.5 vvm และอัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที พบว่า เชื้อมีปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.448, 0.508 และ 0.476 ตามลำดับ อัตราเร็วในการกวนมีผลต่อปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ เช่นเดียวกับน้ำหนักเซลล์แห้ง คือที่อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ให้ผลดีที่สุด



รูปที่ 4.31 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราการให้อากาศ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm และ อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที ที่มีต่อโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุด ในการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

จากรูปที่ 4.31 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราการให้อากาศที่มีต่อโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุด โดยใช้อัตราการให้อากาศ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm และอัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที และ พบว่า เชื้อมีโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุด เท่ากับ 0.0412, 0.0228, 0.512 และ 0.229 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ จะให้ค่าโปรตีเอสแอคติวิตีที่สูงสุด โดยที่แต่ละอัตราการให้อากาศค่าโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 64 ดังนั้นอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นข้อมูลในการทดลองขั้นต่อไป คือ 1.0 vvm

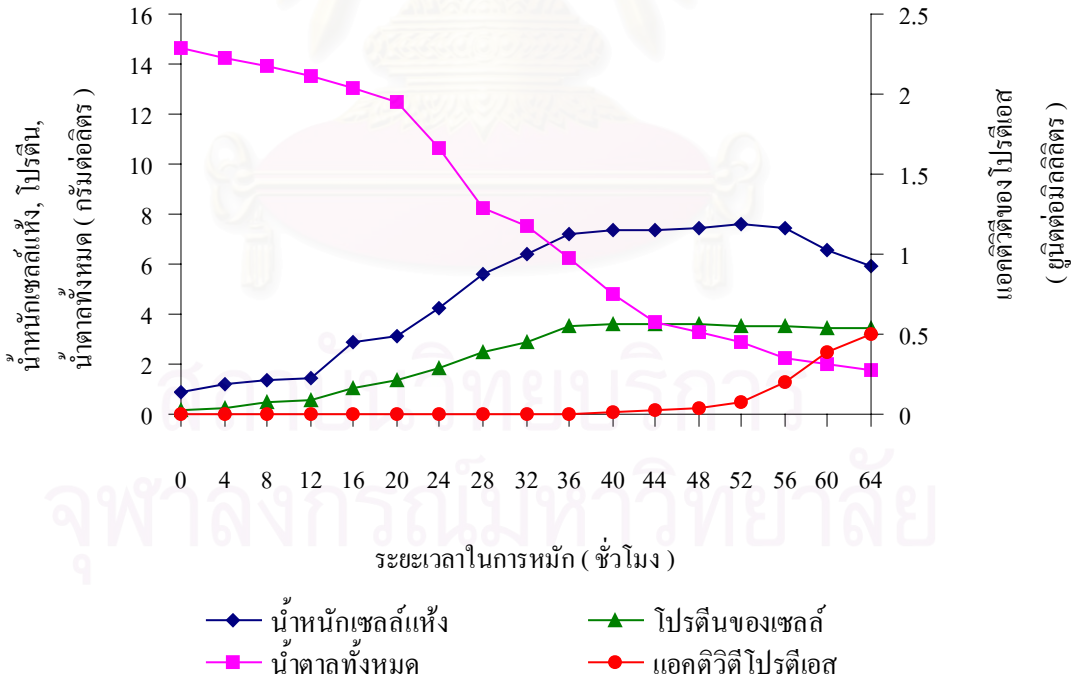
กระบวนการหมักเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเซลล์จุลินทรีย์เป็นการหมักแบบต้องการออกซิเจน ภายใต้ภาวะเช่นนี้เชื้อจุลินทรีย์สามารถออกซิไดส์แหล่งคาร์บอนได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำอย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะทำให้ได้ผลผลิตตัวเซลล์จุลินทรีย์ต่อปริมาณสับสเตรทที่ใช้สูง (Snyder, 1970) ดังนั้นจึงต้องให้ออกซิเจนมากพอในกระบวนการหมัก ปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมจะขึ้นกับสายพันธุ์จุลินทรีย์ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะการเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่ใช้และขนาดของถังหมัก และเพื่อให้มีการกระจายของออกซิเจน จึงต้องมีการกวนพร้อมกับการให้อากาศ ดังนั้นการทดลองนี้จึงแปรผันอัตราเร็วในการกวนที่ 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm ติดตามการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อทุกๆ 4 ชั่วโมง จนครบ 64 ชั่วโมง

Singh และคณะ (1998) รายงานว่าการแปรผันอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศมีอิทธิพลน้อยต่อปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งเห็นได้จากผลการเปรียบเทียบผลของอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศให้ผลของเปอร์เซ็นต์โปรตีนจริงภายในเซลล์ ในรูปที่ 4. 22 และ 4.29

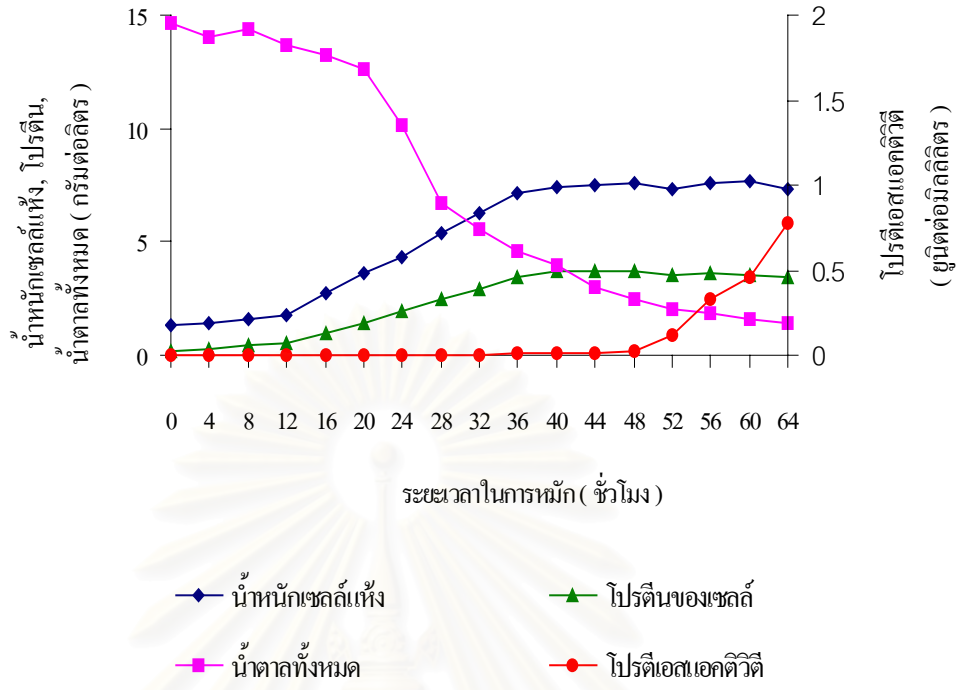
4.4 ศึกษาการผลิตโปรตีเอสของเชื้อผสมในถังหมัก

4.4.1 การเปรียบเทียบการใช้เชื้อตั้งต้นของ *B.subtilis* แบบ washed cell กับแบบ cell suspension

การทดลองนี้ศึกษาการใช้เชื้อตั้งต้นเป็นแบบ washed cell คือใช้เฉพาะตัวเซลล์ที่ล้างเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อน ปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของน้ำหมักขณะนั้น เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อตั้งต้นแบบ cell suspension คือ มีอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นที่เป็น rich medium ปนอยู่ โดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของน้ำหมักขณะนั้นเช่นเดียวกัน การเลี้ยงเชื้อทำในลักษณะเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา เป็นเวลาทั้งหมด 64 ชั่วโมง โดยติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทุกๆ 4 ชั่วโมง โดยหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีนจริงภายในตัวเซลล์ (กรัมต่อลิตร) และการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.32 และ 4.33 ตามลำดับ



รูปที่ 4.32 การใช้เชื้อตั้งต้น ของ *B. subtilis* 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แบบ washed cell ในการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อปริมาณเอนไซม์โปรตีเอสในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักโดยใช้ภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 64 ชั่วโมง



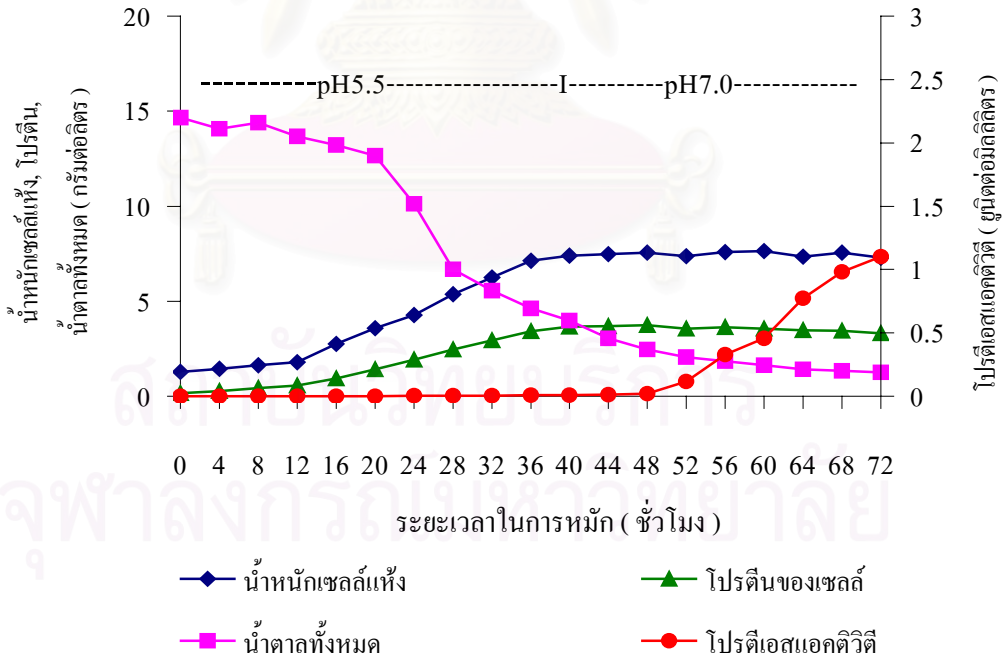
รูปที่ 4.33 การใช้เชื้อตั้งต้น ของ *B. subtilis* 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แบบ cell suspension ในการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อปริมาณเอนไซม์โปรตีเอส โดยเลี้ยงเชื้อในถังหมักเป็นเวลา 64 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.32 เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้เชื้อตั้งต้นแบบ washed cell พบว่าปริมาณโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดในชั่วโมงที่ 64 เท่ากับ 0.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ในรูปที่ 4.33 ใช้เชื้อตั้งต้นแบบ cell suspension พบว่าปริมาณโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดในชั่วโมงที่ 64 เท่ากับ 0.77 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าการใช้เชื้อตั้งต้นแบบ washed cell ซึ่งใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเท่ากัน เนื่องจากการใช้เชื้อตั้งต้น แบบ cell suspension ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมปนอยู่ด้วยนั้น เชื้อสามารถนำสารอาหารที่มีอยู่ซึ่งเป็นพวกเปบโตนและสารสกัดจากเนื้อ ซึ่งมีโปรตีนและกรดอะมิโนสูงนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญในการผลิตโปรตีเอสได้ จึงทำให้ปริมาณโปรตีเอสแอคติวิตีของเชื้อสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Coleman (1967) และ สนธยา ศรีเมฆ (2533) ได้รายงานว่าขณะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุดแล้ว จึงมีการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสขึ้น โดยที่กรดนิวคลิอิกจะจับกับกรดอะมิโนเพื่อสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส แต่เมื่อสับสเตรทมีปริมาณกรดอะมิโนต่ำ การสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสก็จะไม่สมบูรณ์ หรือสังเคราะห์ออกมาได้ปริมาณน้อย แต่ถ้าสับสเตรทมีปริมาณกรดอะมิโนสูงก็สังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสได้ปริมาณที่สูงด้วย

4.4.2 เปรียบเทียบปริมาณเชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* ที่มีผลต่อปริมาณเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตได้

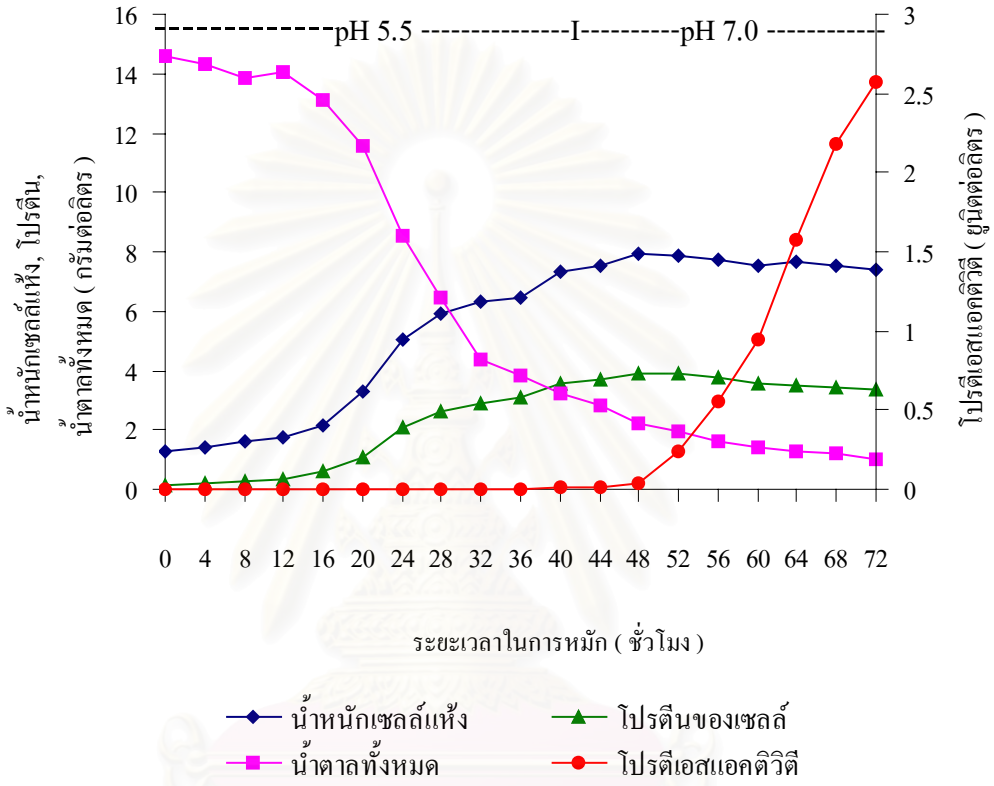
จากการทดลองที่ผ่านมาในข้อ 4.4.1 จะเห็นได้ว่าภาวะที่ทำการทดลอง สามารถทำให้เชื้อ *B. subtilis* ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ แต่มีปริมาณค่อนข้างน้อย คือมีโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดประมาณ 0.77 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในการเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 64 ชั่วโมง (นับตั้งแต่การเลี้ยง *E. fibuligera* และ *C. utilis* จนสิ้นสุดการเจริญของ *B. subtilis*) แต่จากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* บริสุทธิ์ในรูปและตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าเชื้อจะเริ่มผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในชั่วโมงที่ 12 และมีการผลิตเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 40 จึงจะเริ่มคงที่ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีการเพิ่มเวลาในการเลี้ยงเชื้อทั้งหมดเป็น 72 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *B. subtilis* ให้เป็นระยะเวลา 32 ชั่วโมง จากเดิม 24 ชั่วโมง

จากการทดลองข้อ 4.4.1 จะเห็นได้ว่าการใช้เชื้อตั้งต้นแบบ cell suspension ทำให้ปริมาณเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตได้สูงกว่าการใช้เชื้อตั้งต้นแบบ washed cell ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสนธยา ศรีเมฆ (2533) พบว่าการเจริญและโปรตีเอสแอคติวิตีเมื่อใช้เชื้อตั้งต้นแบบ washed cell ต่ำกว่าเมื่อใช้เชื้อตั้งต้นแบบ cell suspension ที่มี rich medium ปนอยู่ ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำการเปรียบเทียบการผลิตโปรตีเอสโดยเลือกใช้เชื้อตั้งต้นแบบ cell suspension ปริมาณต่างๆกันเป็น 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเดิม เป็นระยะเวลา72 ชั่วโมง ติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทุกๆ 4 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.34 –4. 36



รูปที่ 4.34 การเจริญเติบโตของเชื้อผสมและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* ตั้งต้นแบบ cell suspension ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เมื่อเลี้ยงในอาหารขั้นต่ำ ในถังหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

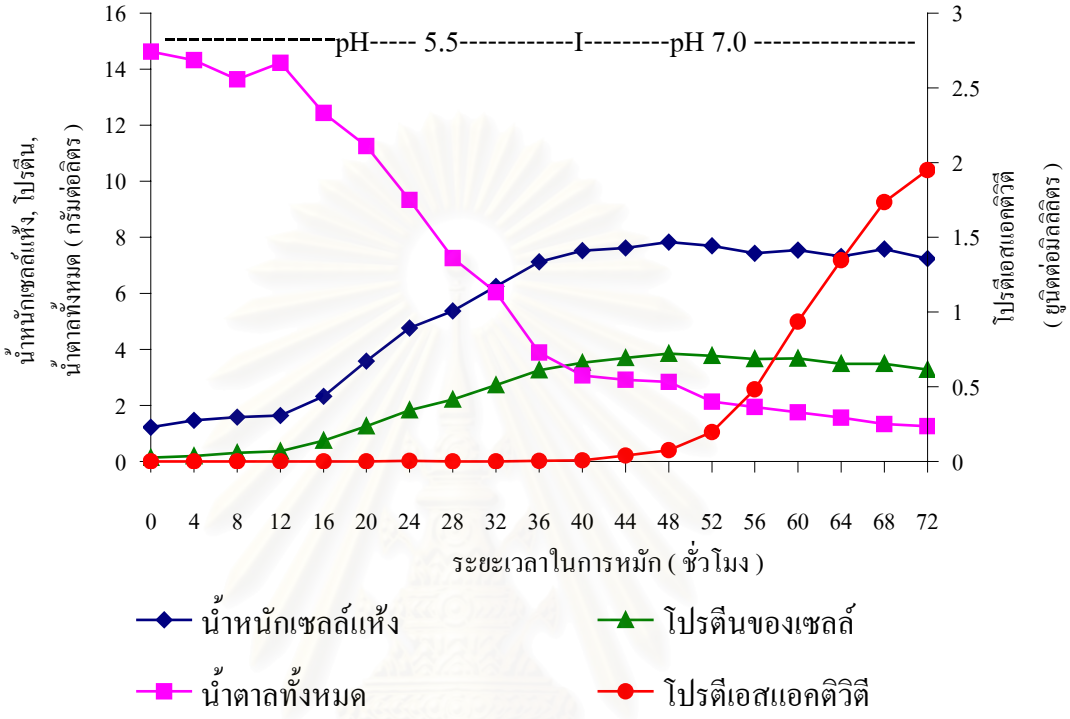
จากรูปที่ 4.34 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำสูตรเดิม และเลี้ยงที่ภาวะเดิม โดยมีการใช้เชื้อตั้งต้นของ *B . subtilis* แบบ cell suspension ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เพื่อศึกษาการปริมาณเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตได้พบว่ามีโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 1.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 72 เนื่องจากเชื้อ *B. subtilis* มีเวลาในการสร้างเอนไซม์ได้มากขึ้น



รูปที่ 4.35 การเจริญเติบโตของเชื้อผสมและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* ตั้งต้นแบบ cell suspension ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เมื่อเลี้ยงในอาหารขั้นต่ำ ในถังหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

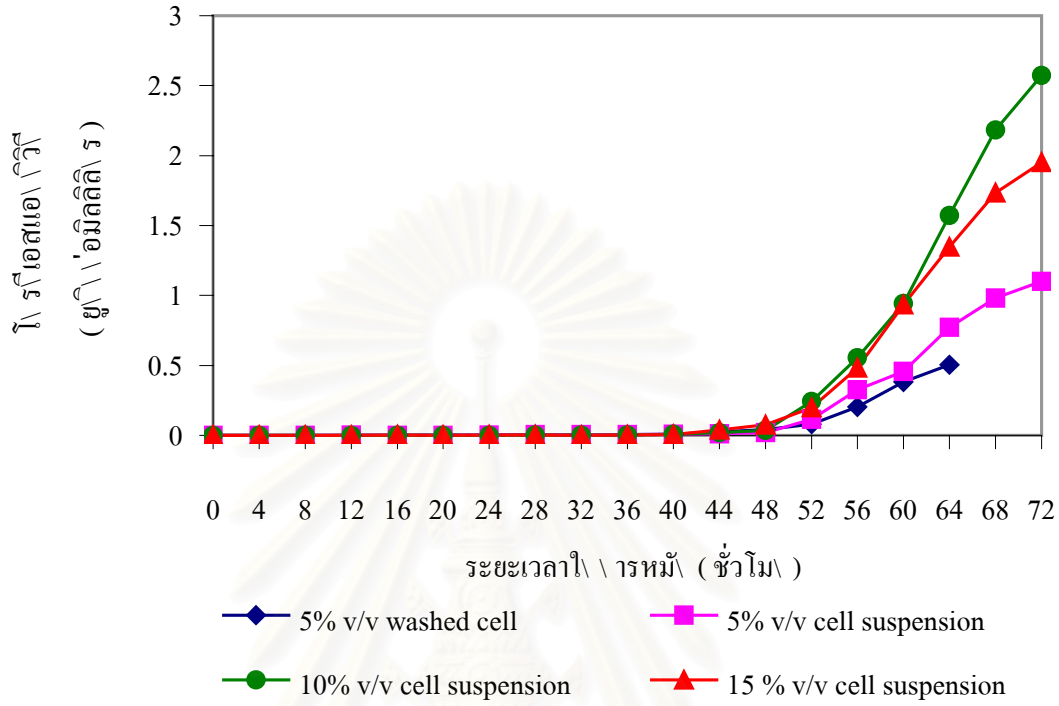
จากรูปที่ 4.35 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำสูตรเดิม และเลี้ยงที่ภาวะเดิม โดยมีการใช้เชื้อตั้งต้นของ *B . subtilis* แบบ cell suspension ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เพื่อศึกษาการปริมาณเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตได้ พบว่ามีโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 2.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 72 จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อตั้งต้นของ *B . subtilis* มากขึ้นก็จะทำให้มีสารอาหารที่สำคัญโดยเฉพาะแหล่งไนโตรเจนที่เป็นกรดอะมิโนที่ได้จากเปบโตนและสารสกัดจากเนื้อที่ช่วยกระตุ้นและเพิ่มการสร้างเอนไซม์ และการที่ใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นมากขึ้นก็เป็น

การเพิ่มปริมาณของตัวเซลล์ของ *B . subtilis* ในน้ำหมักให้มากพอที่จะสร้างเอนไซม์ได้มากขึ้นด้วย และพบว่าน้ำหนักเซลล์สูงสุดเท่ากับ 7.91 กรัมต่อลิตร โปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุด 49.49 เปอร์เซ็นต์ และมวลเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.527



รูปที่ 4.36 การเจริญเติบโตของเชื้อผสมและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* ตั้งต้นแบบ cell suspension ปริมาณ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เมื่อเลี้ยงในในอาหารขั้นต่ำ ในถังหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.36 เป็นการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำสูตรเดิม และเลี้ยงที่ภาวะเดิม โดยมีการใช้เชื้อตั้งต้นของ *B . subtilis* แบบ cell suspension ปริมาณ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เพื่อศึกษาการปริมาณเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตได้พบว่ามีโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 1.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 72 จะเห็นได้ว่าการใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่มากเกินไป อาจทำให้มีตัวเซลล์ที่มากเกินไป อาหารที่มีอยู่อาจไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการเจริญและการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสจึงทำให้ปริมาณโปรตีเอสแอคติวิตีมีค่าน้อยกว่าการใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.82 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 49.19 เปอร์เซ็นต์ และมวลเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.521



รูปที่ 4.37 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตได้ เมื่อใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* แบบ washed cell และแบบ cell suspension ที่ปริมาณต่างๆ

จากการใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* แบบ washed cell 5 เปอร์เซ็นต์ และแบบ cell suspension ที่ปริมาณ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 0.50, 1.10, 2.57 และ 1.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้เชื้อตั้งต้นแบบ cell suspension จะทำให้ได้ปริมาณโปรตีเอสแอคติวิตีสูงกว่าการใช้เชื้อตั้งต้นแบบ washed cell น่าจะมาจากในเชื้อตั้งต้นแบบ cell suspension จะมีอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นอาหารที่มีกรดอะมิโนจากเปปโตน และสารสกัดจากเนื้อซึ่งเป็นตัวเหนี่ยวนำ ที่ทำให้เชื้อสร้างเอนไซม์โปรตีเอสมาย่อยสารอาหารเหล่านั้น และจากการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อตั้งต้น 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ก็พบว่าเชื้อตั้งต้นที่ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ จะให้โปรตีเอสแอคติวิตีสูงกว่าที่ปริมาณอื่นๆ ก็เนื่องจากว่า ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ จะมีตัวเซลล์ของ *B. subtilis* และมีอาหารที่เหลืออยู่ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อตั้งต้นมากพอ ทำให้เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตในอาหารขั้นต่ำที่เหลือจากการเลี้ยง

ยีสต์สองชนิดแรกได้ และการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของ *B. subtilis* ควรมีสับสเตรทหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพวกโปรตีนหรือกรดอะมิโนเพื่อเป็นตัวเหนี่ยวนำ ให้เชื้อสร้างเอนไซม์มาย่อยโปรตีนเหล่านั้น ซึ่ง Heineken และ Connor (1972) รายงานว่า ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดอะมิโนและสารอาหารที่แบคทีเรียต้องการเพื่อเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์ที่จำเพาะกับสับสเตรทนั้น ดังนั้นการใช้เชื้อตั้งต้นแบบ cell suspension ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของเปปโตนและสารสกัดจากเนื้อในปริมาณที่มากพอ จะเป็นตัวช่วยให้เชื้อเจริญและสร้างเอนไซม์ได้มาก ในขณะที่ การใช้เชื้อตั้งต้นที่ปริมาณ 15 เปอร์เซ็นต์อาจมากเกินไป เนื่องจากมีตัวเซลล์อยู่มากทำให้เชื้อใช้อาหารไม่เพียงพอ หรืออาจเกิดจากแหล่งอาหารมีมากไปกว่าที่เชื้อจะใช้ในการเจริญเติบโตหมด และสร้างเอนไซม์ต่ออาจต้องใช้เวลานานไปอีก ซึ่งในชั่วโมงที่ 72 อาจยังสร้างได้น้อย หรืออาจมาจากการที่สับสเตรทมากเกินไปอาจไปกดการสร้างเอนไซม์ของเชื้อที่เรียกว่า catabolite repression ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Doi (1973)และ Bernlohr (1964)

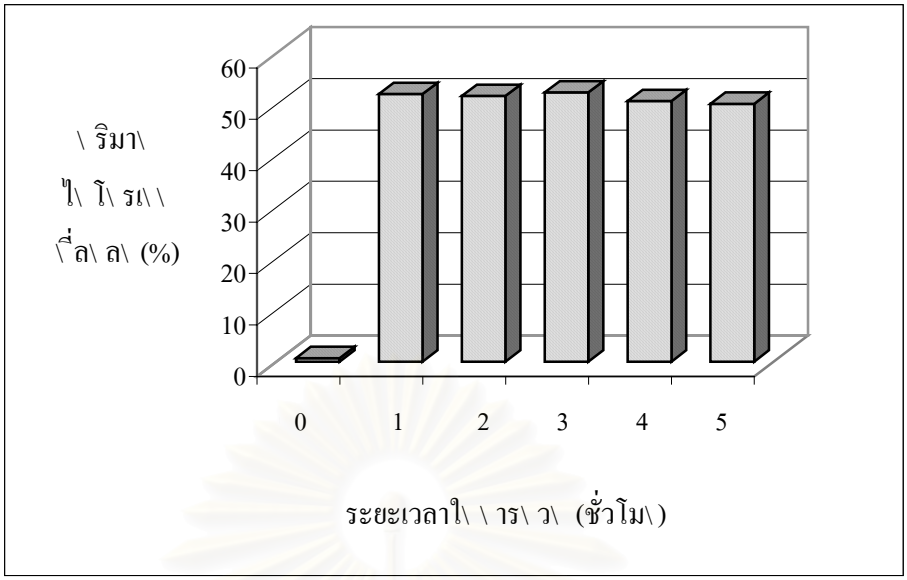
4.5 ศึกษาการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติในถังหมัก

4.5.1 การวิเคราะห์สมบัติของน้ำยางสดที่ใช้ในการผลิต

น้ำยางสดที่ใช้ในการวิจัยเก็บรักษาโดยการเติมแอมโมเนีย น้ำยางสดที่ใช้ในงานวิจัยมีปริมาณของแข็งทั้งหมด 41.60 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเนื้อยางแห้งเท่ากับ 39.30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแอมโมเนีย มีค่าเท่ากับ 0.17 เปอร์เซ็นต์

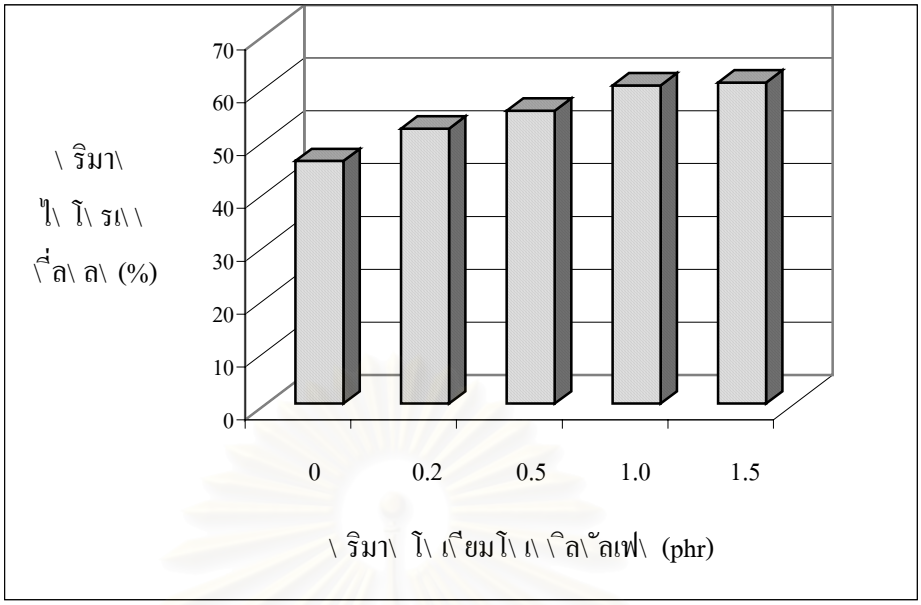
4.5.2 การลดโปรตีนของน้ำยางสดในถังหมัก

หลังจากที่กระบวนการหมักเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวและผลิตโปรตีเอสเสร็จสิ้นครบ 72 ชั่วโมงแล้ว หยุดการกวนและให้อากาศและปล่อยให้ตัวเซลล์ยีสต์ตกตะกอนลงมาประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนตะกอนเซลล์ออก เหลือส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ยังมีเอนไซม์โปรตีเอสอยู่ จากนั้นเติมน้ำยางสด 35% DRC ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของน้ำเลี้ยงเชื้อในถังหมัก และเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีการกวนตลอดเวลาเพื่อศึกษาพารามิเตอร์ที่มีผลต่อการลดปริมาณโปรตีน (ไนโตรเจน) ของยางที่ได้ โดยมีการแปรผันระยะเวลาในการกวนผสมเป็น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ปริมาณโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 0, 0.2, 0.5, 1.0 และ 1.5 phr และอัตราเร็วในการกวนเป็น 0, 50, 70, 100, 120 และ 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำน้ำยางสดที่ผลิตได้มาจับตัวด้วยกรดฟอร์มิก นำเข้าเครื่องรีดให้เป็นแผ่น แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45±5 องศาเซลเซียส จนใสทั้งแผ่น แล้วนำยางดิบที่ได้ไปหาปริมาณไนโตรเจนเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำยางสดที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิก นำเข้าเครื่องรีดให้เป็นแผ่น แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45±5 องศาเซลเซียส จนใสทั้งแผ่น) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.38-4.40



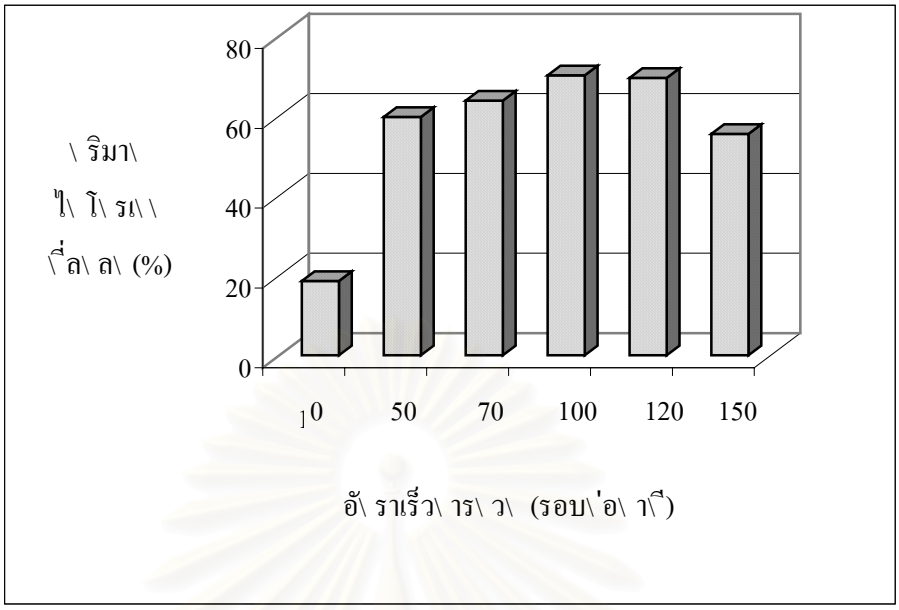
รูปที่ 4.38 ผลของระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ในการกวนผสมน้ำยางสด 35 % DRC ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรกับน้ำเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ที่มีการเติม 10% SDS 0.2 phr อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที ที่มีต่อการลดปริมาณไนโตรเจนของน้ำยางสด

เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะลดปริมาณไนโตรเจนของน้ำยางสดได้มากที่สุด พบว่าระยะเวลาการกวนผสมน้ำยางสด 35 % DRC ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร กับน้ำเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ที่มีการเติม 10% SDS 0.2 phr ใช้ อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง สามารถลดปริมาณไนโตรเจนลงได้เท่ากับ 0.68, 52.05, 51.71, 52.39, 50.68 และ 50.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 4.37) จะเห็นได้ว่าการกวนเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง สามารถลดปริมาณไนโตรเจนได้ 52.05 เปอร์เซ็นต์ โดยการกวน ต่อไปเป็นเวลา 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมงก็ไม่ทำให้ลดปริมาณไนโตรเจนได้มากขึ้น อีกทั้งการกวนนานขึ้นก็ยิ่งเป็นการเสียเวลาและสิ้นเปลืองพลังงาน ดังนั้นจึงเลือกใช้ระยะเวลาในการกวน 1 ชั่วโมงสำหรับการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.39 ผลของปริมาณ 10% SDS ที่ 0, 0.2, 0.5, 1.0 และ 1.5 phr ในการกวนผสมน้ำยางสด 35%DRC ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรกับน้ำเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่มีต่อการลดปริมาณไนโตรเจนของน้ำยางสด

เนื่องจากสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) เป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทแอนไอออนิก และเนื่องจากโปรตีนบางโมเลกุลที่อยู่ในน้ำยางธรรมชาติ เมื่อละลายน้ำจะแตกตัวเป็นสารที่มีประจุ (COO^-) โดย SDS ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทแอนไอออนิก มีผลในการผลักโมเลกุลของโปรตีนและเข้าแทนที่โมเลกุลโปรตีนที่เกาะอยู่ที่อนุภาคยาง นอกจากนั้นหลังจากที่เอนไซม์ย่อยโปรตีนในน้ำยางให้กลายเป็นเปบไทด์สั้นๆ หรือกรดอะมิโน ซึ่งสามารถละลายน้ำได้มากขึ้น SDS จึงเป็นตัวช่วยชะละลายกรดอะมิโนเหล่านั้นออกไปจากอนุภาคยางได้มากขึ้น ดังนั้นเพื่อหาปริมาณ สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่เหมาะสมในการช่วยชะละลายโปรตีนที่ได้จากการย่อยโดยเอนไซม์เพื่อช่วยให้ลดปริมาณไนโตรเจนได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งน้ำยางสดจะถูกเติมด้วยสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 0 , 0.2, 0.5, 1.0 และ 1.5 phr พบว่าสามารถลดปริมาณไนโตรเจนได้เป็น 45.90, 52.05, 55.46, 60.24 และ 60.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 4.38) ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ปริมาณ 1.0 และ 1.5 phr จะช่วยลดปริมาณไนโตรเจนได้มากที่สุด และเป็นปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้ สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ปริมาณ 1.0 phr เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.40 ผลของอัตราเร็ว 0, 50, 70 , 100, 120 และ 150 รอบต่อนาที ในการกวนผสมน้ำยางสด 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรกับน้ำเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ที่มีการเติม 10% SDS 1.0 phr เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่มีต่อการลดปริมาณไนโตรเจนของน้ำยางสด

เพื่อศึกษาผลของอัตราเร็วในการกวนต่อการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติในถังหมัก โดยแปรผันอัตราเร็วเป็น 0, 50, 70, 100, 120 และ 150 รอบต่อนาที ในการกวนผสมน้ำยางสด 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรกับน้ำเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ที่มีการเติม 10% SDS 1.0 phr เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดปริมาณไนโตรเจนได้เท่ากับ 18.60, 59.73, 63.82, 70.14, 69.45 และ 55.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 4.39) ซึ่งจะเห็นได้ว่าอัตราเร็วในการกวนที่เหมาะสมในการลดปริมาณไนโตรเจนได้สูงที่สุดคือ 100 รอบต่อนาที ซึ่งลดได้ 70.14 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการกวนจะทำให้เกิดการไหลและการผสมกันระหว่างน้ำยางสด สารลดแรงตึงผิว และเอนไซม์โปรตีเอสที่มีอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการเพิ่มอัตราเร็วในการกวนก็จึงเป็นการเพิ่ม การกระจายตัวของอนุภาคยางและเอนไซม์ ทำให้การจับกันระหว่างเอนไซม์กับโปรตีนซึ่งเป็นสับสเตรทเกิดได้ดีขึ้น ทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ง่ายขึ้น และ สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตก็จะช่วยชะละลาย กรดอะมิโนและเปบไทด์สายสั้นๆที่ถูกย่อยออกจากอนุภาคยางได้ดีขึ้นด้วย

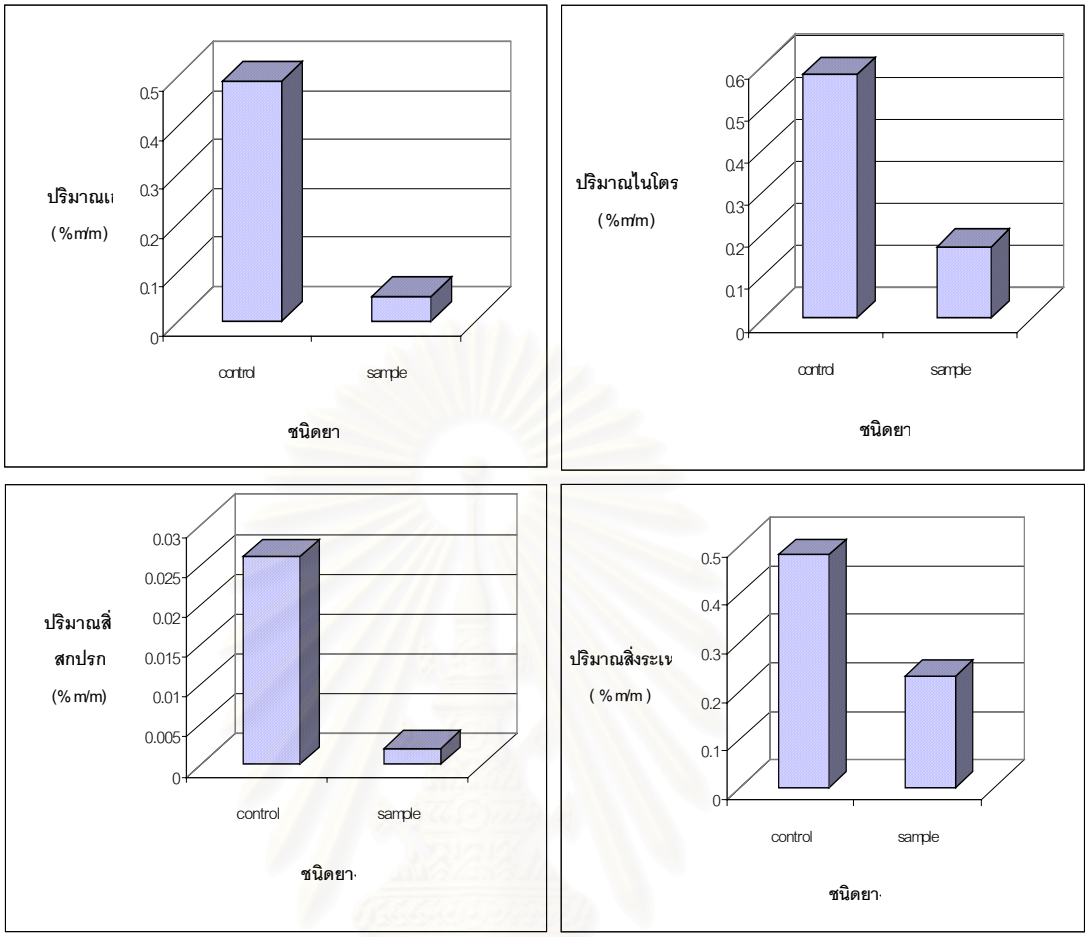
4.5.3 การทดสอบสมบัติทางกายภาพของยางดิบที่ผลิตได้

ทดสอบสมบัติต่างๆของยางแผ่นดิบที่ได้ตามมาตรฐานยางดิบแห้งของสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร และมาตรฐานของยางดิบโปรตีนต่ำของ PRIM ตามสมบัติดังนี้คือ ปริมาณเถ้า ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณสิ่งสกปรก ปริมาณสิ่งระเหย ค่าดัชนีความอ่อนตัว และค่าความหนืดมูนี ดัชนีสี ได้ผลแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบสมบัติของยางแผ่นดิบแห้งที่ผลิตได้ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมและมาตรฐานยางดิบและยางดิบโปรตีนต่ำของ PRIM

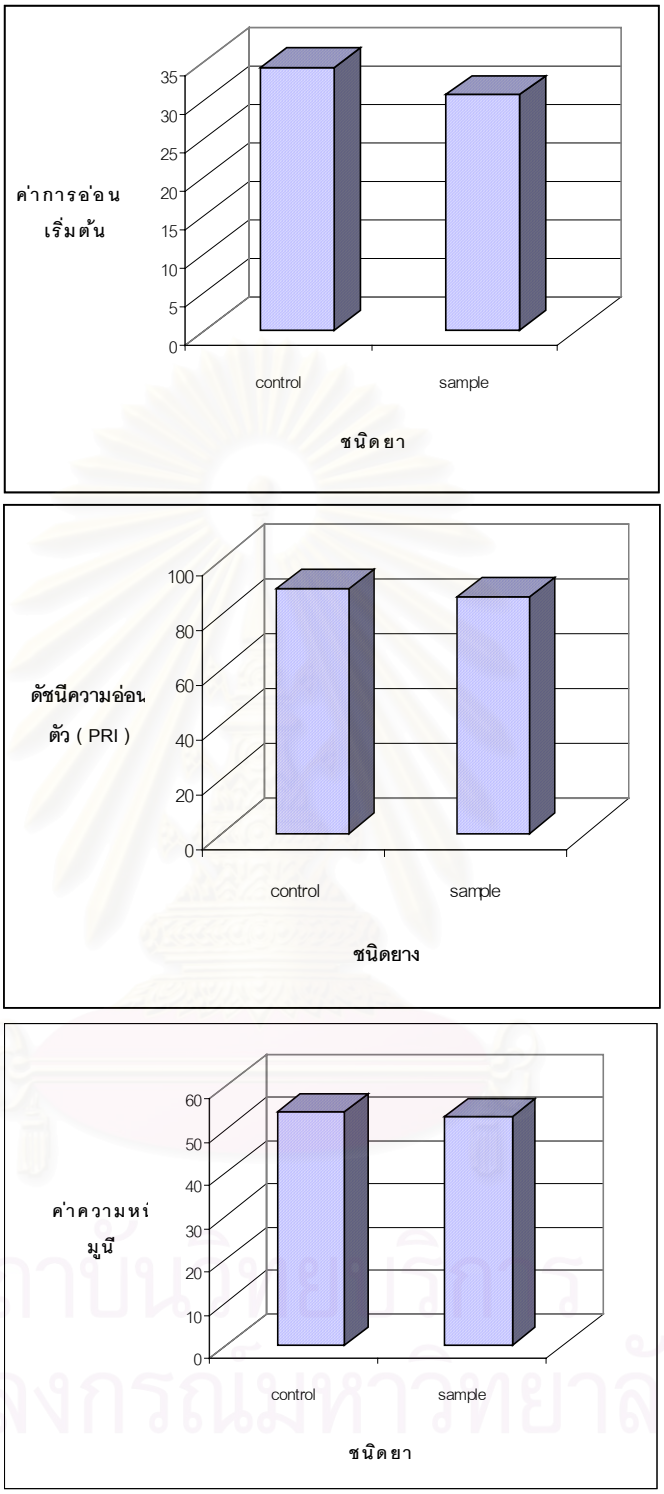
สมบัติ	เกณฑ์มาตรฐานของยางดิบแห้ง	ยางดิบแห้งควบคุม	เกณฑ์มาตรฐานของยางโปรตีนต่ำ	ยางตัวอย่างที่ผลิตได้
ปริมาณเถ้า (โดยน้ำหนัก)	0.60	0.49	0.13	0.05
ปริมาณไนโตรเจน (โดยน้ำหนัก)	0.60	0.58	0.12	0.17
ปริมาณสิ่งสกปรก (โดยน้ำหนัก)	0.50	0.026	0.005	0.002
ปริมาณสิ่งระเหย (โดยน้ำหนัก)	0.80	0.48	0.25	0.23
ค่าความอ่อนตัวเริ่มต้น (P_0)	30.0	34.3	32.0	30.7
ดัชนีความอ่อนตัว(PRI)	66.0	89.5	85.0	86.6
ค่าความหนืดมูนี MS (1+4) 100 ^{o}C	-	54.1	45-65	52.9
ค่าดัชนีสี	-	5	5	5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.41 เปรียบเทียบปริมาณเถ้า ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณสิ่งสกปรก และปริมาณสิ่งระเหยของยางดิบแห้งชุดควบคุม และยางดิบแห้งที่ผลิตได้จากกระบวนการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.42 เปรียบเทียบค่าการอ่อนตัวเริ่มต้น (P_0) , ดัชนีความอ่อนตัว (PRI) และค่าความหนืดมูนี ของยางดิบแห้งชุดควบคุม และยางดิบแห้งที่ผลิตได้จากกระบวนการ

จากผลทดสอบสมบัติยางดิบแห้งที่ผลิตได้จากกระบวนการ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม มาตรฐานยางดิบ และมาตรฐานยางดิบโปรตีนต่ำนั้น พบว่าปริมาณเถ้าจะลดลง เป็น 0.05 ซึ่งผลที่ได้ผ่านเกณฑ์มาตรฐานยางโปรตีนต่ำ (เถ้า $\leq$ 0.13%)

ปริมาณไนโตรเจนจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณโปรตีนที่มีในน้ำยางธรรมชาติ จากกระบวนการที่ผลิตพบว่าเอนไซม์โปรตีเอสสามารถทำลายโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่ๆที่เกาะอยู่ที่อนุภาคยางซีรัมและในลูทอยด์ให้กลายเป็นกรดอะมิโนหรือเปปไทด์สั้นๆ ได้จึงสามารถลดปริมาณไนโตรเจนลงได้จนเหลือ 0.17 เปอร์เซ็นต์ แต่ผลที่ได้ยังเกินค่ามาตรฐานของยางโปรตีนต่ำอยู่เล็กน้อย (ไนโตรเจน $\leq$ 0.12%)

ปริมาณสิ่งสกปรกของยางที่ผลิตได้จากกระบวนนี้พบว่ามีปริมาณน้อยมากโดยมีค่าเท่ากับ 0.002 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลที่ได้ผ่านเกณฑ์มาตรฐานยางโปรตีนต่ำ (สิ่งสกปรก $\leq$ 0.005 %)

ปริมาณสิ่งระเหยซึ่งรวมถึงความชื้นของยางที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.23 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานยางโปรตีนต่ำ (สิ่งระเหย $\leq$ 0.25 %) เนื่องจากโปรตีนเป็นสารมีขั้วและมีลักษณะที่ชอบน้ำ จะเพิ่มการดูดซึมน้ำของยางธรรมชาติ ดังนั้นเมื่อโปรตีนมีปริมาณลดลงจึงทำให้ปริมาณสิ่งระเหยลดลงไปด้วย

ดัชนีความอ่อนตัว เป็นตัวบอกถึงความต้านทานต่อการถูกออกซิไดส์ของยางธรรมชาติ ยิ่งค่าสูงก็จะบอกถึงความต้านทานที่ดี ซึ่งยางที่ได้จากกระบวนการผลิตนี้มีค่า P_0 เท่ากับ 30.7 และมีค่า PRI เท่ากับ 86.6 ซึ่งถือว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานยางโปรตีนต่ำ (PRI $\geq$ 85.0)

ค่าความหนืดมูนี จะแปรผันตามน้ำหนักโมเลกุลของพอลิไอโซพรีน ยางที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงก็จะมีความหนืดมูนีสูงไปด้วย ซึ่งการกำจัดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติจะทำให้การ cross linking ของโมเลกุลที่ไม่ใช่ยางที่มีอยู่ในอนุภาคยางลดลง มีผลให้ค่าความหนืดมูนีลดลงเล็กน้อย ซึ่งยางที่ผลิตได้มีความหนืดมูนีเท่ากับ 52.9 ซึ่งถือว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานยางโปรตีนต่ำ (ความหนืดมูนี = 45 - 65)

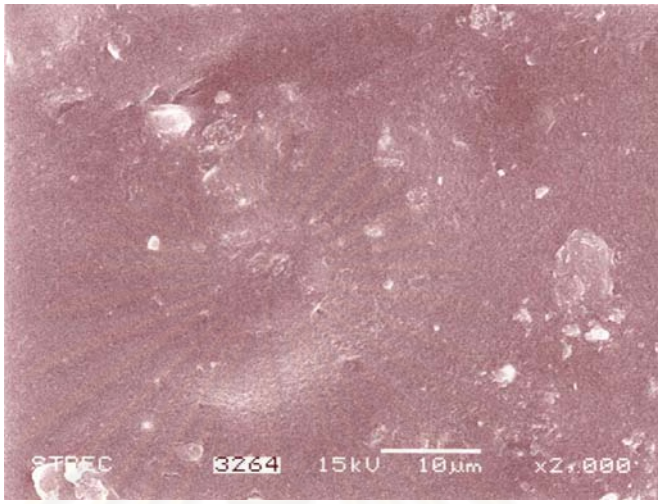
ค่าดัชนีสีของยางที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 5 ซึ่งถือว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานยางโปรตีนต่ำเช่นกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 การตรวจดูลักษณะพื้นผิวและภาคตัดขวางของยางที่ได้จากกระบวนการผลิตโดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

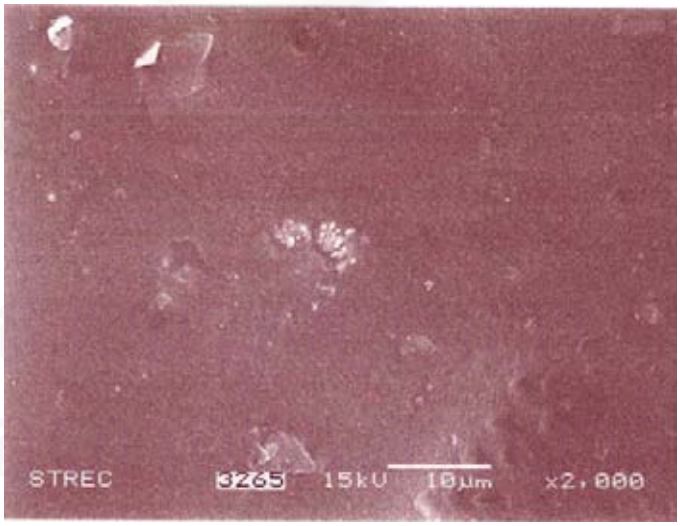
4.6.1 ลักษณะพื้นผิวของยางดิบแห้งที่ได้จากน้ำยางสด

1) พื้นผิวของยางดิบแห้งที่ได้จากน้ำยางสดที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิก (ชุดควบคุม)



รูปที่ 4.43 พื้นผิวของยางดิบแห้งที่ได้จากน้ำยางสดที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิก

2) พื้นผิวของยางดิบแห้งที่ได้จากน้ำยางสดที่ผลิตในถังหมักที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์

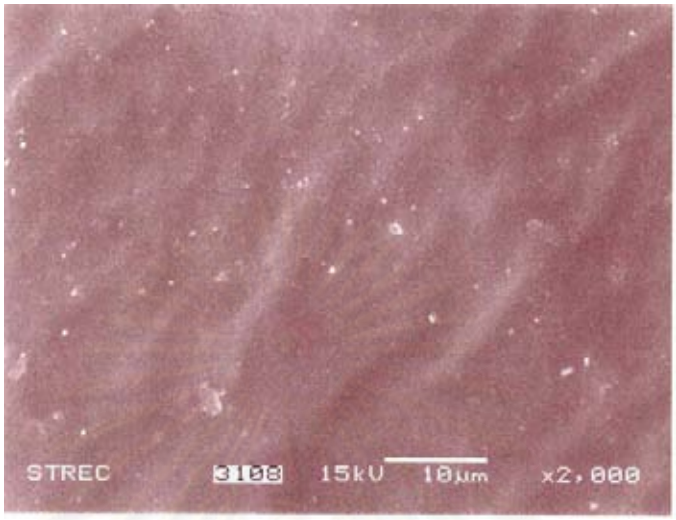


รูปที่ 4.44 พื้นผิวของยางดิบแห้งที่ได้จากน้ำยางสดที่ผลิตในถังหมักที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์

จากรูปที่ 4.43 และ 4.44 จะเห็นว่าพื้นผิวของยางทั้งสองรูปไม่แตกต่างกัน แสดงว่ากระบวนการที่ใช้ผลิตยาง ไม่ทำให้ลักษณะพื้นผิวของยางที่ได้เสียหรือต่างจากยางชุดควบคุมแต่อย่างใด

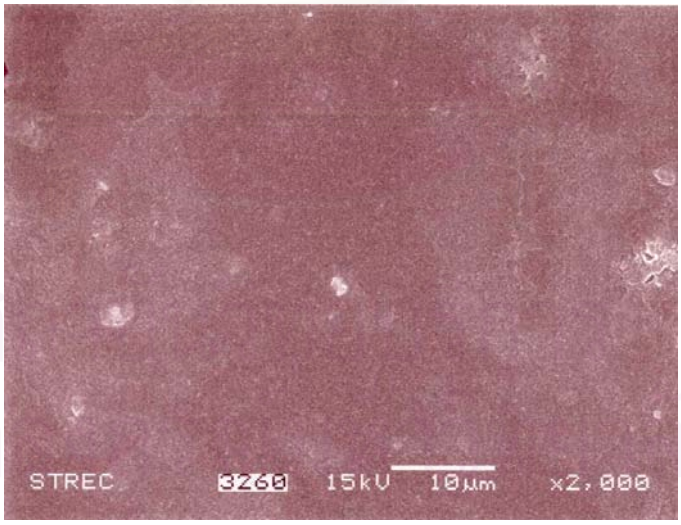
4.6.2 ลักษณะภาคตัดขวางของยางดิบที่ได้จากน้ำยางสด

1) ภาคตัดขวางของยางดิบแห้งที่ได้จากน้ำยางสดที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิก (ชุดควบคุม)



รูปที่ 4.45 ภาคตัดขวางของยางดิบแห้งที่ได้จากน้ำยางสดที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิก

2) ภาคตัดขวางของยางดิบแห้งที่ได้จากน้ำยางสดที่ผลิตในถังหมักที่มีการเติมจุลินทรีย์



รูปที่ 4.46 ภาคตัดขวางของยางดิบแห้งที่ได้จากน้ำยางสดที่ผลิตในถังหมักที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์

จากรูปที่ 4.45 และ 4.46 จะเห็นว่าภาคตัดขวางของยางทั้งสองรูปไม่แตกต่างกัน แสดงว่ากระบวนการที่ใช้ผลิตยาง ไม่ทำให้ลักษณะภาคตัดขวางของยางที่ได้เสียหรือต่างจากยางชุดควบคุมแต่อย่างใด รวมทั้งไม่มีตัวเซลล์จุลินทรีย์หลงเหลืออยู่ภายในของเนื้อยางด้วย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อ *E. fibuligera* TISTR 5097 ที่เลี้ยงในอาหาร yeast starch เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เชื้อมีน้ำหนักเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 39 เท่ากับ 5.26 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทั้งหมดก็มีปริมาณลดลงเนื่องจากเชื้อนำไปใช้ในการเจริญเติบโต รวมถึงค่าความเป็นกรดด่างก็ค่อยๆลดลง ในขณะที่เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.121 ต่อชั่วโมง ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 46.20 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.526

2. การเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อ *C. utilis* TISTR 5001 ที่เลี้ยงในอาหาร yeast malt เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อมีน้ำหนักเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 30 เท่ากับ 7.32 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทั้งหมดก็มีปริมาณลดลงเนื่องจากเชื้อนำไปใช้ในการเจริญเติบโต รวมถึงค่าความเป็นกรดด่างก็ค่อยๆลดลงในขณะที่เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.159 ต่อชั่วโมง โปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 47.76 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.732

3. การเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรสูงสุดเท่ากับ 2.66 โดยพบว่ายังไม่มีการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส จนเชื้อเริ่มมีการเจริญคงที่ในชั่วโมง ที่ 15 จะเป็นช่วงที่เชื้อเริ่มมีการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส โดยเชื้อจะมีการเจริญเติบโตที่คงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 24 และอัตราการเจริญก็จะลดลงคือเริ่มมีการตาย ในขณะที่การผลิตเอนไซม์ยังคงมีอยู่ต่อไป โดยมีโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 1.98 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 42 และเริ่มมีปริมาณคงที่ ส่วนค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นอยู่ 7.0 จะลดลงในช่วงแรกจนถึงชั่วโมงที่ 12 จากนั้นก็จะค่อยๆเพิ่มขึ้นจนอยู่ในระดับใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น

4. เลี้ยงเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* TISTR 5097 และ *Candida utilis* TISTR 5001 ร่วมกับการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ในขวดทดลอง พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ผสมเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร

และแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.72 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 48.60 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.381

5. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวในถังหมัก ได้แก่ เลี้ยงเชื้อตั้งต้นของยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* TISTR 5097 ปริมาณ 7 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตั้งแต่ชั่วโมงแรก โดยควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 และเติมเชื้อตั้งต้นของยีสต์ *Candida utilis* TISTR 5001 ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในชั่วโมงที่ 16 เลี้ยงต่อไปที่ภาวะเดิม จนครบชั่วโมงที่ 40 เติมเชื้อตั้งต้นของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เลี้ยงเชื้อที่ภาวะเดิม และควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.0 พบว่าเชื้อผสมมีการเจริญและสร้างโปรตีนดีที่สุดเมื่อใช้อัตราเร็วในการกวนคือ 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.62 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 49.74 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.508 และมีโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 0.512 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

6. การเลี้ยงเชื้อผสมเพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ทำโดยเลี้ยงเชื้อผสมในถังหมักโดยใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และภาวะที่เหมาะสม โดยใช้เชื้อตั้งต้นของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เป็นแบบ cell suspension ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และเพิ่มระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อรวมเป็น 72 ชั่วโมง พบว่ามีโปรตีเอสสูงสุดเท่ากับ 2.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าโปรตีนเซลล์เดี่ยวมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.91 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 49.49 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังสูงสุดเท่ากับ 0.527

7. การใช้น้ำยางสด 35 % DRC ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ ร่วมกับการเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 1.0 phr และกวนผสมกับน้ำหมักในถังหมักที่อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดปริมาณไนโตรเจนซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ พบว่าสามารถลดปริมาณไนโตรเจนของน้ำยางสดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมได้ 70.14 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จนเหลือปริมาณไนโตรเจน 0.17 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

8. ยางดิบแห้งที่ผลิตได้มีสมบัติดังนี้ ปริมาณเถ้าเท่ากับ 0.05 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.17 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณสิ่งสกปรกเท่ากับ 0.002 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณสิ่งระเหยเท่ากับ 0.23 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ค่าการอ่อนตัวเริ่มต้นเท่ากับ 30.7 ค่าดัชนีการอ่อนตัวเท่ากับ 86.6 ค่าความหนืดมูนีเท่ากับ 52.9 และค่าดัชนีสีเท่ากับ 5 ซึ่งสมบัติทั้งหมดผ่านเกณฑ์มาตรฐานของยางโปรตีนต่ำของ ASTM ยกเว้นปริมาณไนโตรเจนที่ยังสูงกว่ามาตรฐานอยู่เล็กน้อย

9. ผลการตรวจดูพื้นผิวและภาคตัดขวางของยางแผ่นดิบที่ผลิตได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เปรียบเทียบกับยางแผ่นชุดควบคุมพบว่าไม่มีความแตกต่างกันแสดงว่ายางดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตข้างต้นทำให้ลักษณะและองค์ประกอบของยางไม่แตกต่างจากยางดิบที่ผลิตโดยวิธีการจับตัวด้วยกรดดังวิธีการทั่วไป

ข้อเสนอแนะ

1. หาสารเคมีหรือตัวกลางที่สามารถตกตะกอนตัวเซลล์ยีสต์ได้เร็วขึ้น เพื่อเป็นการประหยัดเวลาในการแยกตัวเซลล์ยีสต์ออกจากน้ำหมัก
2. ควรทำการหมักแบบต่อเนื่องเพื่อให้ปริมาณโปรตีนเซลล์เดี่ยวมากขึ้น และได้ปริมาณเอนไซม์โปรตีเอสมากขึ้นด้วย เพื่อให้สามารถลดปริมาณไนโตรเจนได้มากขึ้นและผ่านเกณฑ์มาตรฐานยางโปรตีนต่ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ดวงพร คันธโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม: ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

บุญธรรม นิธิอุทัย. 2530. ยางธรรมชาติ ยางสังเคราะห์ และคุณสมบัติ. ภาควิชาเทคโนโลยีการยาง. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.

ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ.2532. การแยกให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรฤดี มุ่งสมานกูล. 2535. การชะละลายเม็ดยางธรรมชาติด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเคมีเทคนิค บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นุชนาฎ ณ ระนอง และวราภรณ์ ขจรไชยกุล .2539. เอกสารประกอบการสัมมนา . ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาง สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร.

สนธยา ศรีเมฆ. 2533.ผลของสารต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการผลิตโปรตีเอสและเอนไซม์ในไนโตรเจนเมแทบอลิซึมของบาซิลลัส สับติลิส TISTR 25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพะไชย์ จินดาวุฒิกุล. 2540. ผลของการขยายผิวของถุงมือยางต่อการชะล้างโปรตีน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเคมีเทคนิค บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุวิราภร โอภาสวงศ์. 2539. โปรตีนกับอาการแพ้. เอกสารประกอบการสัมมนา. สถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรังษี. 2540. ยางธรรมชาติเบื้องต้น. ภาควิชาเทคโนโลยียางและพอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ภาษาอังกฤษ

Aiba. S., Humphrey, A.E. and Millis, N.F. 1973a. Aeration and agitation. In Reed, G. and Nagodawithana, T.W. (eds.). Enzymes, Biomass, food and feed. New York: VCH. Publisher. 167-221.

Alenius, H., Palosua, T., Kelly, K., Kurup, V. and Reunala, T. 1993. IgE reactivity to 14-kD and 27-kD natural rubber proteins in latex allergic children with spina bifida and other congenital anomalies. International Archive Allergy Immunology 102 : 61-66.

American Society for Testing and Materials. 1980. Standards Rubber, Natural and Synthetic General Test Methods; Carbon Black. Annual Book of ASTM 37.

Antczak, M.S., Antczak, T. and Bielecki, S. 2004. Stability of extracellular proteinase productivity by *Bacillus subtilis* cells immobilized in PVA- cryogel . Enzyme and Microbial Technology 34 : 168-176.

Aprem, A. S. and Pal, S. N. 2002. Latex allergy and recent developments in deproteinisation of natural rubber latex. Journal of Rubber Research 5(2) : 94-134.

Archer, B. L. and Sekhar, B. C. 1955. The proteins of *Hevea brasilliensis* latex: protein constituents of fresh latex serum. Biochemistry Journal 61: 503-508.

Aunstrup, K.1979. Production, isolation and economic of extracellular enzymes. Applied Biochemical Bioengineering 2 : 27-68.

Azizah, M. R., Shahnaz, M., Hasma, H. and Mok, K. L.1997. Latex protein allergy: A prevalence study of factory workers. Journal of natural Rubber Research 11(4) : 240-246.

Bernlohr, R.W. Maddox, M.K. and Goldberg, N.D.1974. Cyclic Guanosine 3', 5'-Monophosphate in *Escherichia Coli* and *Bacillus Licheniformis*. Journal of Molecular Chemistry 249:4329-4331.

Bhattacharjee, J.K. 1970. Advanced in Applied Microbiology 13 : 134-159.

Breitender, H. and Scheiner, O. 1998. Molecular and Immunological characteristics of latex allergens. International Archive Allergy Immunology 116 : 83-92.

Chanda, S. and Chakrabarti, S. 1996. Plant origin liquid waste a resource for single cell protein production by yeast . Bioresource Technology 57 : 51-54.

Chareonsak, C., Chareonsiiri, K. and Vananvat, P. 1980. Protein production by *Candida utili*s from pineapple wastewater. Journal of National Research Council of Thailand 12(1) :1-24.

Choi, M.H. ,Ji, G.E. and Park, Y.H. 2002. Use of waste Chinese cabbage as a substrate for yeast biomass production .Bioresource Technology 83 : 251-253.

Coleman, G.1967. Studies on the regulation of extracellular enzyme Synthesis by *Bacillus subtilis* . Journal of General Microbiology 49 : 421-431.

Dalrymple, S. J. and Audley, B. G. 1992. Allergenic proteins in dipped products: factors influencing extractable protein levels. Rubber Development 45 : 51-60.

Del, G, Giacomo,G. and Spera, L. 2003. Integrated approach in the biotreatment of starch waste by *Rhizopus oligosporus*: kinetic analysis. Desalination 156 : 389-396.

Dostalek, M. 1986. Production of lipid from starch by a nitrogen-controlled mixed culture of *S. fibuligera* and *Rhodosporidium toruloides*. Applied Microbiology Biotechnology 24 : 19-23.

Dubios, M., Gilles K.A. and Hammiton, J.K. 1956. Analytical Chemistry 28 : 350-356.

Endang, S. and Horst, W. 1989. A one step process for the production of protein and amyloglucosidase. Applied Microbiology Biotechnology 30 : 135-140.

Ferrer, J., Paez, G., Ramones, E., Garcia, H. and Forster, C.F. 1996. Acid Hydrolysis of Shrimp-shell waste and the production of Single cell Protein from the hydrolysate. Bioresource. Technology 57 : 55-60.

Gaden, E.L. 1974. Single Cell Protein. New York :Academic Press. 46-60.

Ghaly, A.E. and Kamal, M.A. 2004. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. Water Research 38: 631-644.

Gharsallah, N.1993. Production of single cell protein from olive mill wastewater by yeasts. Environmental Technology 14 : 391-395.

Grima,E., Belarbi, E. and Fernandez,F. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology Advances 20 : 491-515.

Han,Y.W., Dunlap, C.E. and Callihan,C.D. 1971. Single cell protein from cellulosic wastes. Food Technology 25 : 32-35.

Hanlon, G.W. 1981b.Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of *Bacillus licheniformis* on poorly utilize carbon and nitrogen sources. Journal of Bacteriology 147 : 427-431.

Hasma, H. 1992. Proteins of natural rubber latex concentrate. Journal of natural Rubber Research 7(2) : 102-112.

Hasma, H. and Hashim, M. Y. 1997. Changes to NR latex proteins on processing the latex to its products. Journal of natural Rubber Research 12(1) : 21-32.

Hedenskog, G. and Mogren, H. 1973. Some methods for processing of single cell protein. Biotechnology and Bioengineering 15 : 129-142.

Heineken, F.G. and Connor, R.J. 1972. Continous culture studies on the biosynthesis of Alkaline Protease and amylase by *Bacillus subtilis* NRRL- B3411. Journal General Microbiology 73 : 35-44.

Jarl, K.1969. Symba yeast process. Food Technology 23 : 1009-1012

Jin, B., Leeuwen, H.J., Patel, B. and Yu, Q. 1998. Utilisation of starch processing waste water for Production of Microbial biomass protein and Fungal α- amylase by *Aspergillus oryzae*. Bioresource Technology 66 : 201-206.

Kekwich, R. G. 1997. Proteins eluted from natural rubber crumb. Journal of natural Rubber Research 12(4) : 232-236.

Khan, M.Y. and Dahot, M.U. 1992. Singe cell protein production by *Penicillium javanicum* from pretreated rice husk. Journal of Islamic Academy of Sciences 5(1) : 39-43.

Kim, J. H. and Lebeault, J. M. 1981. Protein production from whey using *Penicillium cyclopum* : growth parameters and cellular composition. European Journal of Applied Microbiology Biotechnology 13 :151-154.

Klinklai, W., Kawahava, S., Tangpakdee, J. and Mizumo, T. 2003. Depolymerization and ionic conductivity of enzymatically deproteinized natural rubber having epoxy group. European Polymer Journal 39 : 1707-1712.

Lemmel, S. A., Heimsch, R. C. and Edwards, L. 1979. Optimizing the continuous production of *C. utilis* and *S. fibuligera* on potato processing wastewater. Applied in Environmental and Microbiology 37 : 227-232.

Levisohn, S. and A. L. Aronson .1967. Regulation of extracellular protease production by *Bacillus cereus*. Journal of Bacteriology 93 : 1023-1030.

Lipinsky, E.S. and Litchfield, J.H. 1974. Single Cell Protein In Perspective. Food Technology 16-24.

Liu, Y., Liu, D. and Su, Q. 2003. Effect of phosphorus and nitrogen limitations on continuous production of Glycerol in a multistage cascade bioreactor by *Candida krusei*. Biochemical Engineering Journal 15 : 101-106.

Lowty, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. Journal of Biology Chemistry 193. 265-275.

Lynferd, J. W., Lewis, B. L., Pettijohn, O. G.and George, E. W. 1944. Starch hydrolysis and fermentation by the yeast *E. fibuligera*. Journal of Bacteriology 48 : 413-427.

May, G.K. and W.H. Elliott.1968. Characteristic of extracellular protease formation by *Bacillus Subtilis* and its control by amino acid repression. Biochemistry Biophy Acta 157 : 607-615.

Millet, J.1970. Characterization of Proteinases excreted by *Bacillus subtilis* Marburg strain During Sporulation . Journal of Applied Bacteriology 33 : 207-219.

Moss, M.O. and Smith, J.E. 1977. Industrial Application of Microbiology. London:Surney University Press 105-149.

Priest, F.G. 1977.Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriology Review 41 : 711-753.

Ravindra, A.P. 2000. Value- added food : Single cell protein . Biotechnology Advances 18 : 459-479.

Reed, G. and Nagodawithana,T.W. 1995. Enzymes, Biomass, food and feed. Biotechnology. New York: VCH Publishers. 9: 167-221.

Rubber Research Institute of Malaya. 1970. RRIM. Test method for Standard Malaysian rubbers. SMR Bulletin No. 7 : 1-37.

Scragg, A.H. 1991. Biorectors in Biotechnology. London : Ellis Horwood 26-85.

Shipman, R.H., Kao, I.C. and Fan, L.T. 1975. Single cell protein production by photosynthetic bacteria cultivation in agricultural byproducts. Biotechnology Bioengineering 17 : 1561-1570.

Sunderasan, E. and Yeang, H.Y. 1993. Latex allergy studies : B- serum from the latex bottom fraction as a major source of immunogenic glove protein. Journal of natural Rubber Research 101(1) : 46-62.

Tan, K. H., Ferguson, B. and Carlton, C.1984. Conversion of Cassava starch to biomass carbohydrates acids by *Aspergillus niger*. Journal of Applied Biochemistry 6 : 80-90.

Tangpakdee, J. and Tanaka, Y. 1997. Purification of natural rubber. Journal of natural Rubber Research 12 (2) : 112-119.

Tomazic, V., Withrow, T. J., Fisher, R. and Dillard, S. F. 1992. Latex associated allergies and anaphylatic reactions. Clinical Immunological Immunopathology 64(2) : 89-97.

Trien, L. H. and Pienpak, T.1994. Production of single cell protein from cassava by mixed culture of *E. fibuligera* and *C. utilis*. A thesis for the degree of master of science. Chulalongkorn university. Thailand.

Ustariz, F.J., Leca, A., Garcia, L.A. and Diaz, M. 2004. Fermentation of individual proteins for protease production by *Serratia marcescens*. Biochemical Engineering Journal 19: 147-153.

Varghese, S., Katsumura, Y., Makuuchi, K. and Yoshii, F. 2000. Production of soluble protein free latex by radiation process. Rubber Chemical Technology 73 : 80-88.

Visessanguan, W. 1992. Optimization of Natural Rubber Latex Deprotenization by Enzymes. Master' s Thesis. Chulalongkorn University.

Yang, J.K., Shih, I.L., Tzeng, Y.M. and Wang, S.L. 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinized crustacean waste. Enzyme and Microbial Technology 26 : 406-413.

Yang, S. and Wang, J. 1999. Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivations. Botanical Bulletin Academic 40 : 259-265.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

1. สูตรและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงและเก็บรักษาเชื้อ *E. fibuligera* TISTR 5097 (Yeast starch)

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *E. fibuligera* คืออาหารแข็ง yeast starch agar ประกอบด้วย สารสกัดจากยีสต์ 2 กรัม, แป้งที่สามารถละลายน้ำได้ (soluble starch) 10 กรัมและวุ้นผง 1.5 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้เท่ากับ 5.5 และอาหารเหลว yeast starch media มีสูตรอาหารเหมือนกับสูตรอาหารชนิดแข็ง แต่ไม่มีส่วนประกอบของวุ้นผง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน (autoclave)ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.2 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงและเก็บรักษาเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001 (YM)

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *C. utilis* คืออาหารแข็ง YM agar ประกอบด้วย กลูโคส 10 กรัม เปปโตน 5 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 3 กรัม สารสกัดจากมอลต์ 3 กรัม และวุ้นผง 2.0 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น 1 ลิตร และอาหารเหลว YM media มีสูตรอาหารเหมือนกับสูตรอาหารชนิดแข็ง แต่ไม่มีส่วนประกอบของวุ้นผง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.3 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงและเก็บรักษาเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (NB)

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* คืออาหารแข็ง Nutrient agar (NA) ประกอบด้วย แบคโตเปปโตน 5 กรัม, สารสกัดจากเนื้อ 3 กรัมและวุ้นผง 2.0 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น 1 ลิตร และอาหารเหลว nutrient broth มีสูตรอาหารเหมือนกับสูตรอาหารชนิดแข็ง แต่ไม่มีส่วนประกอบของวุ้นผง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่ใช้ในการทดลอง (Minimal media)

อาหารเหลวซึ่งมีสูตรอาหารประกอบด้วย โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัม, ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต1.0 กรัม , แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตรและปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 5.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.1 สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน โดยวิธีของลอรี (Lowry และคณะ, 1951)

สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ ประกอบด้วยสารละลาย A สารละลาย B และสารละลาย C

สารละลาย A ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัม นำไปละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B ชั่งคอปเปอร์ (II) ซัลเฟต 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย C ชั่งโพแตสเซียมทาร์เทรต 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A 100 มิลลิลิตร สารละลาย B 1 มิลลิลิตรและสารละลาย C 1 มิลลิลิตร ก่อนที่จะนำมาใช้

สารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ (Phenol reagent)

ผสมโซเดียมทังสเตท 50 กรัม โซเดียมโมลิบเดท 12.5 กรัม น้ำกลั่น 550 มิลลิลิตร กรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์ 25 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มิลลิลิตร กลั่น (reflux) ด้วยความร้อนต่ำ 10 ชั่วโมง และเติมลิเธียมซัลเฟต 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และโบรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มีมากเกินพอเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาในตู้เย็นก่อนที่จะนำมาใช้ควรเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (standard protein solution)

ละลาย Bovine serum albumin (BSA) เกรด V จำนวน 10 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร ครบ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

2.2 สารละลายสำหรับหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธีฟีนอล – กรดซัลฟูริก

สารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ชั่งฟีนอลคริสตัล 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

2.3 สารละลายสำหรับหาโปรตีเอสแอคติวิตี

สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ pH7.6

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล) – อะมิโนมีเธน (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane) 12.12 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 7.6 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

สารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ pH 10.5

ชั่งเคซีนฮาร์มมาสเตน 0.5 กรัม ละลายในสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 จำนวน 100 มิลลิลิตร คนจนกระทั่งเคซีนละลายหมด เก็บรักษาในตู้เย็น

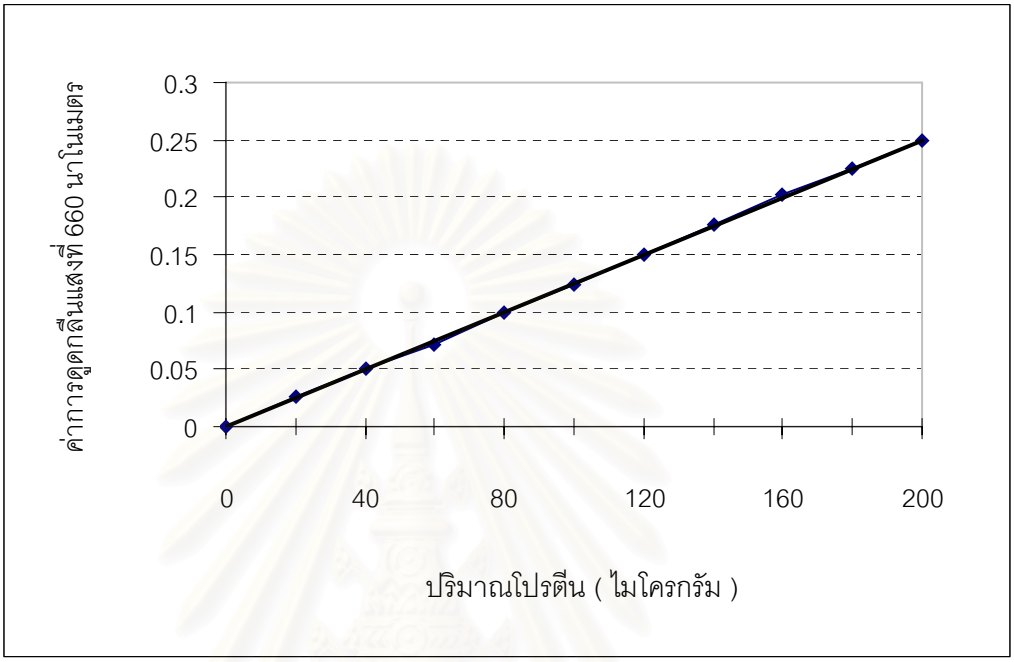
สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์

ชั่งกรดไตรคลอโรอะซิติก 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาในตู้เย็นก่อนนำมาใช้

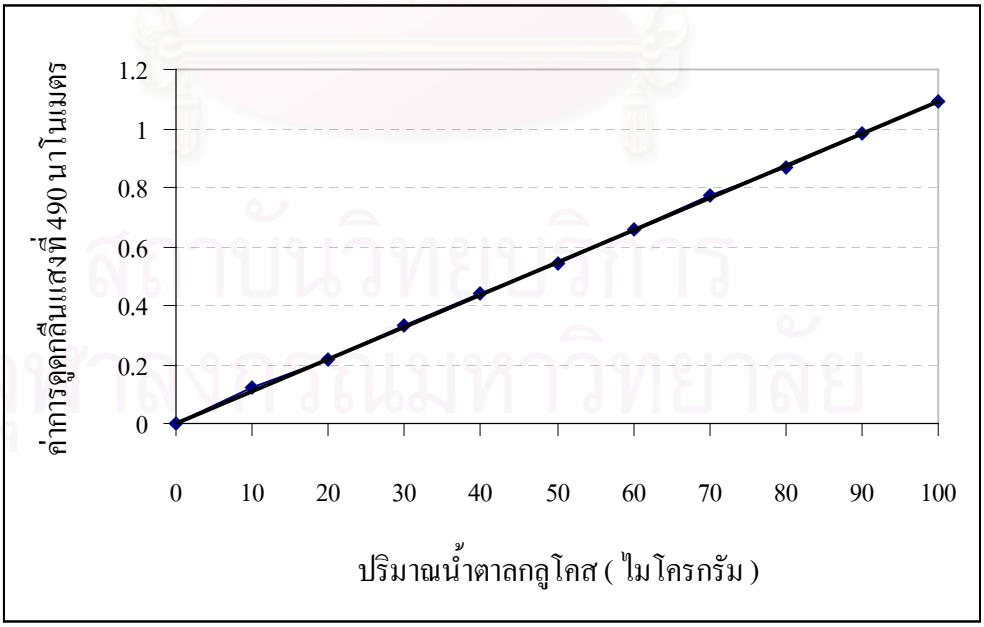
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

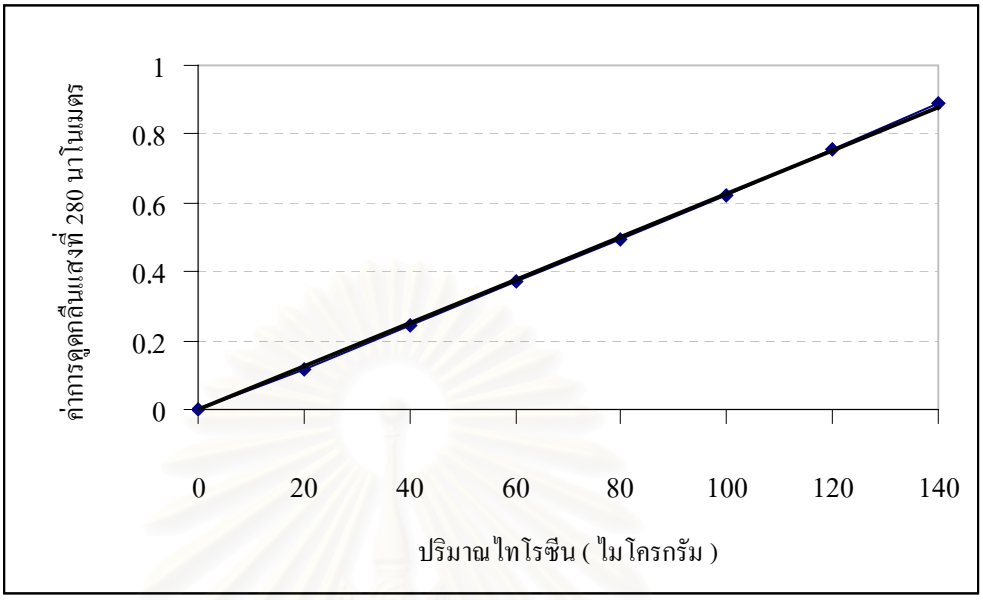
กราฟมาตรฐานต่างๆสำหรับใช้ในการวิเคราะห์



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (1951)



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี ฟีนอล- กรดซัลฟูริก



รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีเอสแอคติวิตี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การเจริญเติบโตของเชื้อในการศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ และการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ

ตารางที่ ค.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Endomycopsis fibuligera* TISTR 5097 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast starch ในขวดเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	ค่าความเป็นกรดด่าง
0	0.88	0.12	9.67	13.64	5.34
3	1.42	0.19	9.21	13.57	5.28
6	1.66	0.21	8.84	12.46	5.25
9	1.86	0.34	8.75	18.28	5.21
12	1.74	0.56	8.36	32.18	5.16
15	1.92	0.72	7.68	37.50	4.64
18	2.76	0.90	7.25	32.61	4.58
21	3.42	1.14	6.01	33.33	4.42
24	4.32	1.85	5.13	42.80	4.36
27	4.68	2.14	3.62	45.73	4.30
30	5.04	2.30	2.84	45.66	4.24
33	5.13	2.31	2.18	45.03	4.12
36	5.20	2.32	1.09	44.62	3.80
39	**5.26**	2.43	0.56	**46.20**	3.76
42	5.08	2.32	0.36	45.67	3.63
45	4.94	2.26	0.34	45.75	3.45
48	4.8	2.18	0.29	45.42	3.34

ตารางที่ ค.2 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast malt ในขวดเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	ค่าความเป็นกรดด่าง
0	1.30	0.32	9.98	24.62	6.32
3	2.23	0.85	8.64	38.12	6.12
6	2.81	1.04	7.32	37.01	5.64
9	3.34	1.32	6.54	39.52	5.32
12	4.12	1.78	5.65	43.20	4.76
15	4.68	2.11	4.13	45.09	4.33
18	5.72	2.63	2.93	45.98	4.21
21	6.44	2.99	2.06	46.43	4.19
24	7.11	3.32	1.75	46.69	4.06
27	7.14	3.41	1.64	**47.76**	3.88
30	**7.32**	3.38	1.55	46.17	3.76
33	7.26	3.21	1.42	44.21	3.68
36	7.13	3.25	1.36	45.58	3.62
39	7.18	3.18	1.04	44.29	3.55
42	7.23	3.20	0.92	44.26	3.54
45	7.04	3.04	0.84	43.18	3.57
48	7.08	3.11	0.45	43.93	3.56

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค.3 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB) ในขวดเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่นที่ 420 นาโนเมตร	โปรติเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ค่าความเป็นกรดด่าง
0	0.042	0.0004	6.97
3	0.56	0.0008	6.31
6	1.08	0.0014	5.82
9	2.15	0.0028	5.43
12	**2.66**	0.088	5.21
15	2.56	0.185	5.36
18	2.6	0.43	6.18
21	2.57	0.79	6.33
24	2.52	1.16	6.52
27	2.39	1.33	6.49
30	2.32	1.67	6.53
33	2.28	1.78	6.51
36	2.24	1.89	6.74
39	2.17	1.94	6.87
42	2.11	**1.98**	6.81
45	2.06	1.92	6.83
48	2.02	1.95	6.85

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค.4 การเจริญเติบโตของเชื้อผสมที่เลี้ยงในขวดเขย่า ในอาหารขั้นต่ำที่มีแป้งสำปะหลัง 5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง
0	0.84	0.11	4.97	13.10	0.168
4	0.92	0.15	4.69	16.30	0.184
8	1.18	0.22	4.65	18.64	0.236
12	1.29	0.21	4.42	16.28	0.258
16	1.79	0.52	3.95	29.05	0.358
20	1.92	0.60	3.26	31.25	0.384
24	2.24	0.68	2.36	30.36	0.448
28	2.29	0.71	1.98	31.00	0.458
32	2.36	0.76	1.62	32.20	0.472
36	2.41	0.79	1.24	32.78	0.482
40	2.45	0.80	0.84	32.65	0.490
44	**2.49**	0.82	0.77	**32.93**	**0.498**
48	2.41	0.77	0.54	31.95	0.482
52	2.22	0.70	0.50	31.53	0.444
56	2.13	0.66	0.36	30.99	0.426
60	1.98	0.61	0.21	30.81	0.396
64	1.64	0.48	0.08	29.27	0.328

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค.5 การเจริญเติบโตของเชื้อผสมที่เลี้ยงในขวดเขย่า ในอาหารขั้นต่ำที่มีแป้งสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง
0	0.82	0.12	9.27	14.63	0.082
4	1.11	0.17	9.02	15.32	0.111
8	1.22	0.18	8.75	14.75	0.122
12	1.34	0.23	8.54	17.16	0.134
16	1.82	0.46	8.07	25.27	0.182
20	2.12	0.57	7.56	26.89	0.212
24	2.2	0.64	6.24	29.09	0.22
28	2.42	0.76	5.42	31.40	0.242
32	2.96	0.94	4.23	31.76	0.296
36	3.21	1.03	3.34	32.09	0.321
40	3.86	1.26	2.74	32.64	0.386
44	3.9	1.29	2.50	33.08	0.39
48	3.92	1.30	2.07	33.16	0.392
52	**3.95**	1.33	1.89	**33.67**	**0.395**
56	3.81	1.27	1.24	33.33	0.381
60	3.37	1.09	1.12	32.34	0.337
64	3.24	1.04	0.56	32.10	0.324

ตารางที่ ค.6 การเจริญเติบโตของเชื้อผสมที่เลี้ยงในขวดเขย่า ในอาหารขั้นต่ำที่มีแป้งสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง
0	0.85	0.12	14.56	14.12	0.057
4	1.16	0.18	13.84	15.52	0.077
8	1.32	0.22	13.11	16.67	0.088
12	1.45	0.26	12.65	17.93	0.097
16	2.14	0.58	10.68	27.10	0.143
20	3.32	0.98	8.21	29.52	0.221
24	3.64	1.14	7.44	31.32	0.243
28	3.86	1.34	6.23	34.72	0.257
32	4.03	1.37	5.02	34.00	0.269
36	4.36	1.52	4.66	34.86	0.291
40	4.73	1.68	4.18	**35.52**	0.315
44	4.87	1.71	3.82	35.11	0.325
48	5.02	1.74	3.49	34.66	0.335
52	**5.08**	1.74	3.14	34.25	**0.339**
56	4.94	1.69	2.46	34.21	0.329
60	4.62	1.55	1.93	33.55	0.308
64	4.48	1.49	1.86	33.26	0.299

ตารางที่ ค.7 การเจริญเติบโตของเชื้อผสมที่เลี้ยงในขวดเขย่า ในอาหารขั้นต่ำที่มีแป้งสำปะหลัง 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง
0	0.86	0.14	18.76	16.28	0.043
4	1.13	0.19	17.48	16.81	0.057
8	1.24	0.22	16.87	17.74	0.062
12	1.46	0.27	16.22	18.49	0.073
16	2.29	0.62	15.69	27.07	0.115
20	2.58	0.76	13.86	29.46	0.129
24	2.73	0.82	11.98	30.04	0.137
28	3.46	1.07	10.68	30.92	0.173
32	4.49	1.41	8.24	31.40	0.225
36	4.52	1.45	7.56	32.08	0.226
40	4.96	1.64	6.97	33.06	0.248
44	4.88	1.61	5.82	32.99	0.244
48	5.09	1.59	4.42	31.24	0.255
52	**5.16**	1.72	4.08	**33.33**	**0.258**
56	5.12	1.54	3.87	30.08	0.256
60	4.92	1.51	3.62	30.69	0.246
64	5.10	1.62	3.60	31.76	0.255

ตารางที่ ค.8 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

แอมโมเนียมซัลเฟต 2.0 กรัมต่อลิตร				
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง (กรัมต่อลิตร)			
	5.0	10.0	15.0	20.0
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.84	0.82	0.85	0.86
4	0.92	1.11	1.16	1.13
8	1.18	1.22	1.32	1.24
12	1.29	1.34	1.45	1.46
16	1.79	1.82	2.14	2.29
20	1.92	2.12	3.32	2.58
24	2.24	2.2	3.64	2.73
28	2.29	2.42	3.86	3.46
32	2.36	2.96	4.03	4.49
36	2.41	3.21	4.36	4.52
40	2.45	3.86	4.73	4.96
44	**2.49**	3.9	4.87	4.88
48	2.41	3.92	5.02	5.09
52	2.22	**3.95**	**5.08**	**5.16**
56	2.13	3.81	4.94	5.12
60	1.98	3.37	4.62	4.92
64	1.64	3.24	4.48	5.10

ตารางที่ ค.9 กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเตรท (แป้งมันสำปะหลัง) สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตรร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร

แอมโมเนียมซัลเฟต 2.0 กรัมต่อลิตร				
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง (กรัมต่อลิตร)			
	5.0	10.0	15.0	20.0
	เปอร์เซ็นต์โปรตีนภายในเซลล์	เปอร์เซ็นต์โปรตีนภายในเซลล์	เปอร์เซ็นต์โปรตีนภายในเซลล์	เปอร์เซ็นต์โปรตีนภายในเซลล์
0	13.10	14.63	14.12	16.28
4	16.30	15.32	15.52	16.81
8	18.64	14.75	16.67	17.74
12	16.28	17.16	17.93	18.49
16	29.05	25.27	27.10	27.07
20	31.25	26.89	29.52	29.46
24	30.36	29.09	31.32	30.04
28	31.00	31.40	34.72	30.92
32	32.20	31.76	34.00	31.40
36	32.78	32.09	34.86	32.08
40	32.65	32.64	**35.52**	33.06
44	**32.93**	33.08	35.11	32.99
48	31.95	33.16	34.66	31.24
52	31.53	**33.67**	34.25	**33.33**
56	30.99	33.33	34.21	30.08
60	30.81	32.34	33.55	30.69
64	29.27	32.10	33.26	31.76

ตารางที่ ค.10 การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)
0	0.85	0.12	14.56	14.12
4	1.16	0.18	13.84	15.52
8	1.32	0.22	13.11	16.67
12	1.45	0.26	12.65	17.93
16	2.14	0.58	10.68	27.10
20	3.32	0.98	8.21	29.52
24	3.64	1.14	7.44	31.32
28	3.86	1.34	6.23	34.72
32	4.03	1.37	5.02	34.00
36	4.36	1.52	4.66	34.86
40	4.73	1.68	4.18	**35.52**
44	4.87	1.71	3.82	35.11
48	5.02	1.74	3.49	34.66
52	**5.08**	1.74	3.14	34.25
56	4.94	1.69	2.46	34.21
60	4.62	1.55	1.93	33.55
64	4.48	1.49	1.86	33.26

ตารางที่ ค.11 การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)
0	0.82	0.14	14.32	17.07
4	0.98	0.19	14.08	19.39
8	1.14	0.24	13.79	21.05
12	1.39	0.31	13.14	22.30
16	2.43	0.74	11.78	30.45
20	2.97	0.96	10.13	32.32
24	3.34	1.12	9.36	33.53
28	4.52	1.58	6.32	34.96
32	4.93	1.77	4.24	35.90
36	4.82	1.76	3.55	36.51
40	5.10	1.89	3.21	37.06
44	4.94	1.84	2.86	37.25
48	5.13	1.86	2.43	36.26
52	**5.17**	1.94	2.15	**37.52**
56	4.93	1.73	1.89	35.09
60	4.64	1.59	1.74	34.27
64	4.47	1.54	1.64	34.45

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค.12 การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 7 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)
0	0.85	0.16	14.67	18.82
4	1.09	0.21	14.23	19.27
8	1.28	0.26	14.18	20.31
12	1.43	0.32	13.88	22.38
16	2.58	0.81	13.28	31.40
20	2.86	0.92	11.64	32.17
24	3.98	1.38	9.63	34.67
28	4.29	1.52	6.74	35.43
32	4.36	1.64	4.27	37.61
36	4.92	1.87	3.06	38.01
40	5.16	2.08	2.84	40.31
44	4.86	1.91	2.63	39.30
48	5.11	2.08	2.47	40.70
52	**5.24**	2.14	2.22	**40.84**
56	5.08	2.04	2.18	40.16
60	4.96	1.95	1.86	39.31
64	4.57	1.74	1.72	38.07

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค.13 การเจริญเติบโตของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)
0	0.83	0.19	14.53	22.89
4	1.12	0.26	14.13	23.21
8	1.32	0.34	14.1	25.76
12	1.57	0.42	13.56	26.75
16	2.63	0.98	11.78	37.26
20	3.24	1.27	8.82	39.20
24	3.78	1.58	7.54	41.80
28	3.92	1.72	5.13	43.88
32	5.12	2.28	4.79	44.53
36	5.59	2.56	4.33	45.80
40	5.32	2.48	2.76	46.62
44	5.61	2.68	2.41	47.77
48	5.54	2.66	2.2	48.01
52	**5.72**	2.78	2.02	**48.60**
56	5.32	2.51	1.87	47.18
60	4.93	2.31	1.54	46.86
64	4.86	2.26	1.42	46.50

ตารางที่ ค.14 การเปรียบเทียบผลได้การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 2, 5, 7 และ 10 กรัมต่อลิตรร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร

แป้งมันสำปะหลัง 15.0 กรัมต่อลิตร				
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)			
	2.0	5.0	7.0	10.0
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.85	0.82	0.85	0.83
4	1.16	0.98	1.09	1.12
8	1.32	1.14	1.28	1.32
12	1.45	1.39	1.43	1.57
16	2.14	2.43	2.58	2.63
20	3.32	2.97	2.86	3.24
24	3.64	3.34	3.98	3.78
28	3.86	4.52	4.29	3.92
32	4.03	4.93	4.36	5.12
36	4.36	4.82	4.92	5.59
40	4.73	5.10	5.16	5.32
44	4.87	4.94	4.86	5.61
48	5.02	5.13	5.11	5.54
52	**5.08**	**5.17**	**5.24**	**5.72**
56	4.94	4.93	5.08	5.32
60	4.62	4.64	4.96	4.93
64	4.48	4.47	4.57	4.86

ตารางที่ ค.15 กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเตรท (แป้งมันสำปะหลัง) สูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 2, 5, 7 และ 10 กรัมต่อลิตรร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร

แป้งมันสำปะหลัง 15.0 กรัมต่อลิตร				
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)			
	2.0	5.0	7.0	10.0
	กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง	กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง	กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง	กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง
0	0.057	0.055	0.057	0.055
4	0.077	0.065	0.073	0.075
8	0.088	0.076	0.085	0.088
12	0.097	0.093	0.095	0.105
16	0.143	0.162	0.172	0.175
20	0.221	0.198	0.191	0.216
24	0.243	0.223	0.265	0.252
28	0.257	0.301	0.286	0.261
32	0.269	0.329	0.291	0.341
36	0.291	0.321	0.328	0.373
40	0.315	0.340	0.344	0.355
44	0.325	0.329	0.324	0.374
48	0.335	0.342	0.341	0.369
52	0.339	0.345	0.349	0.381
56	0.329	0.329	0.339	0.355
60	0.308	0.309	0.331	0.329
64	0.299	0.298	0.305	0.324

ตารางที่ ค.16 การเปรียบเทียบโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 2 , 5, 7 และ 10 กรัมต่อลิตรร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 15 กรัมต่อลิตร

แป้งมันสำปะหลัง 15.0 กรัมต่อลิตร				
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)			
	2.0	5.0	7.0	10.0
	โปรตีนจริงของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีนจริงของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีนจริงของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีนจริงของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)
0	14.12	17.07	18.82	22.89
4	15.52	19.39	19.27	23.21
8	16.67	21.05	20.31	25.76
12	17.93	22.30	22.38	26.75
16	27.10	30.45	31.40	37.26
20	29.52	32.32	32.17	39.20
24	31.32	33.53	34.67	41.80
28	34.72	34.96	35.43	43.88
32	34.00	35.90	37.61	44.53
36	34.86	36.51	38.01	45.80
40	**35.52**	37.06	40.31	46.62
44	35.11	37.25	39.30	47.77
48	34.66	36.26	40.70	48.01
52	34.25	**37.52**	**40.84**	**48.60**
56	34.21	35.09	40.16	47.18
60	33.55	34.27	39.31	46.86
64	33.26	34.45	38.07	46.50

ตารางที่ ค.17 การเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วการกวน 150 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	0.86	0.16	14.51	18.60	ND
4	1.09	0.21	14.08	19.27	ND
8	1.22	0.25	13.74	20.49	ND
12	1.39	0.30	13.25	21.58	ND
16	2.56	0.88	11.94	34.38	ND
20	2.64	1.01	11.42	38.26	ND
24	3.46	1.42	8.13	41.04	ND
28	3.22	1.44	7.36	44.72	ND
32	3.94	1.87	6.59	47.46	ND
36	4.68	2.28	5.86	48.72	ND
40	4.87	2.39	3.56	49.08	0.0018
44	5.03	2.47	3.04	49.11	0.0022
48	5.14	2.54	2.78	49.42	0.0035
52	**5.32**	2.63	2.36	**49.44**	0.0066
56	5.21	2.52	1.89	48.37	0.0092
60	4.46	2.18	0.96	48.88	0.0123
64	4.02	1.93	0.42	48.01	**0.0166**

ND หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่ยังไม่ได้เติมเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอส

ตารางที่ ค.18 การเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	0.82	0.14	14.66	17.07	ND
4	1.11	0.20	14.42	18.02	ND
8	1.32	0.26	14.17	19.70	ND
12	1.41	0.29	13.88	20.57	ND
16	2.49	0.79	13.24	31.73	ND
20	2.84	0.92	11.26	32.39	ND
24	3.58	1.26	8.68	35.20	ND
28	3.42	1.24	7.14	36.26	ND
32	4.12	1.46	6.08	35.44	ND
36	4.38	1.74	4.77	39.73	ND
40	5.03	1.97	3.12	39.17	0.0039
44	5.19	2.52	2.56	48.55	0.0018
48	5.37	2.63	2.15	48.98	0.0057
52	**5.52**	2.72	1.84	**49.28**	0.0105
56	5.36	2.64	1.32	49.25	0.0131
60	4.78	2.34	0.84	48.95	0.0193
64	4.43	2.14	0.38	48.31	**0.0228**

ND หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่ยังไม่ได้เติมเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอส

ตารางที่ 4.19 การเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วการกวน 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	0.88	0.17	14.78	19.32	ND
4	1.12	0.23	14.32	20.54	ND
8	1.27	0.27	13.85	21.26	ND
12	1.35	0.29	13.37	21.48	ND
16	2.34	0.71	11.65	30.34	ND
20	2.39	0.79	10.87	33.05	ND
24	3.16	1.22	7.82	38.61	ND
28	3.52	1.42	6.92	40.34	ND
32	4.58	2.21	4.84	48.25	ND
36	5.26	2.51	4.32	47.72	ND
40	6.07	2.94	3.22	48.43	0.0022
44	6.29	3.01	2.55	47.85	0.0031
48	6.41	3.18	1.92	49.61	0.0048
52	**6.72**	3.35	1.81	**49.85**	0.0123
56	6.11	3.01	1.53	49.26	0.0149
60	6.23	3.06	0.84	49.12	0.0232
64	5.36	2.61	0.32	48.69	**0.0412**

ND หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่ยังไม่ได้เติมเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอส

ตารางที่ ค.20 การเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	0.87	0.18	14.81	20.69	ND
4	1.13	0.25	14.67	22.12	ND
8	1.34	0.28	13.58	20.90	ND
12	1.44	0.31	12.45	21.53	ND
16	2.39	0.77	10.74	32.22	ND
20	2.75	0.98	9.98	35.64	ND
24	2.96	1.16	8.43	39.19	ND
28	3.66	1.57	7.79	42.90	ND
32	3.92	1.74	6.38	44.39	ND
36	4.68	2.23	4.35	47.65	ND
40	5.34	2.58	3.14	48.31	0.0035
44	5.66	2.76	2.67	48.76	0.0026
48	5.81	2.86	2.39	49.23	0.0044
52	**5.96**	2.94	2.24	**49.33**	0.0118
56	5.74	2.82	1.67	49.13	0.0145
60	5.23	2.52	1.12	48.18	0.0180
64	4.51	2.21	0.79	49.00	**0.0245**

ND หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่ยังไม่ได้เติมเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอส

ตารางที่ ค.21 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราเร็วในการกวน 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ที่มีต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm				
เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการกวน (รอบต่อนาที)			
	150	200	250	300
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.86	0.82	0.88	0.87
4	1.09	1.11	1.12	1.13
8	1.22	1.32	1.27	1.34
12	1.39	1.41	1.35	1.44
16	2.56	2.49	2.34	2.39
20	2.64	2.84	2.39	2.75
24	3.46	3.58	3.16	2.96
28	3.22	3.42	3.52	3.66
32	3.94	4.12	4.58	3.92
36	4.68	4.38	5.26	4.68
40	4.87	5.03	6.07	5.34
44	5.03	5.19	6.29	5.66
48	5.14	5.37	6.41	5.81
52	**5.32**	**5.52**	**6.72**	**5.96**
56	5.21	5.36	6.11	5.74
60	4.46	4.78	6.23	5.23
64	4.02	4.43	5.36	4.51

ตารางที่ ค.22 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราเร็วในการกวน 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ที่มีต่อปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุดในการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm				
เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการกวน (รอบต่อนาที)			
	150	200	250	300
	โปรตีนจริงของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีนจริงของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีนจริงของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีนจริงของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)
0	18.60	17.07	19.32	20.69
4	19.27	18.02	20.54	22.12
8	20.49	19.70	21.26	20.90
12	21.58	20.57	21.48	21.53
16	34.38	31.73	30.34	32.22
20	38.26	32.39	33.05	35.64
24	41.04	35.20	38.61	39.19
28	44.72	36.26	40.34	42.90
32	47.46	35.44	48.25	44.39
36	48.72	39.73	47.72	47.65
40	49.08	39.17	48.43	48.31
44	49.11	49.33	47.85	48.76
48	49.42	48.98	49.61	49.23
52	**49.44**	**49.28**	**49.85**	**49.33**
56	48.37	49.25	49.26	49.13
60	48.88	48.95	49.12	48.18
64	48.01	48.31	48.69	49.00

ตารางที่ ค.23 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราเร็วในการกวน 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ที่มีต่อกรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเตรท (แป้งมันสำปะหลัง) สูงสุดในการ เลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm				
เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการกวน (รอบต่อนาที)			
	150	200	250	300
	กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง	กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง	กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง	กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง
0	0.057	0.055	0.059	0.058
4	0.073	0.074	0.075	0.075
8	0.081	0.088	0.085	0.089
12	0.093	0.094	0.090	0.096
16	0.171	0.166	0.156	0.159
20	0.176	0.189	0.159	0.183
24	0.231	0.239	0.211	0.197
28	0.215	0.228	0.235	0.244
32	0.263	0.275	0.305	0.261
36	0.312	0.292	0.351	0.312
40	0.325	0.335	0.405	0.356
44	0.335	0.346	0.419	0.377
48	0.343	0.358	0.427	0.387
52	**0.355**	**0.368**	**0.448**	**0.397**
56	0.347	0.357	0.407	0.383
60	0.297	0.319	0.415	0.349
64	0.268	0.295	0.357	0.301

ตารางที่ ค.24 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราเร็วในการกวน 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ที่มีต่อโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุด ในการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm				
เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการกวน (รอบต่อนาที)			
	150	200	250	300
	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND
16	ND	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND
24	ND	ND	ND	ND
28	ND	ND	ND	ND
32	ND	ND	ND	ND
36	ND	ND	ND	ND
40	0.0018	0.0039	0.0022	0.0035
44	0.0022	0.0018	0.0031	0.0026
48	0.0035	0.0057	0.0048	0.0044
52	0.0066	0.0105	0.0123	0.0118
56	0.0092	0.0131	0.0149	0.0145
60	0.0123	0.0193	0.0232	0.0180
64	**0.0166**	**0.0228**	**0.0412**	**0.0245**

ND หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่ยังไม่ได้เติมเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอส

ตารางที่ ค.25 การเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วการกวน 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	0.88	0.17	14.78	19.32	ND
4	1.12	0.23	14.32	20.54	ND
8	1.27	0.27	13.85	21.26	ND
12	1.35	0.29	13.37	21.48	ND
16	2.34	0.71	11.65	30.34	ND
20	2.39	0.79	10.87	33.05	ND
24	3.16	1.22	7.82	38.61	ND
28	3.52	1.42	6.92	40.34	ND
32	4.58	2.21	4.84	48.25	ND
36	5.26	2.51	4.32	47.72	ND
40	6.07	2.94	3.22	48.43	0.0022
44	6.29	3.01	2.55	47.85	0.0009
48	6.41	3.18	1.92	49.61	0.0048
52	**6.72**	3.35	1.81	**49.85**	0.0123
56	6.11	3.01	1.53	49.26	0.0149
60	6.23	3.06	0.84	49.12	0.0232
64	5.36	2.61	0.32	48.69	**0.0412**

ND หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่ยังไม่ได้เติมเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอส

ตารางที่ ค.26 การเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วการกวน 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	0.84	0.17	14.54	20.24	ND
4	1.16	0.24	14.12	20.69	ND
8	1.37	0.31	13.84	22.63	ND
12	1.68	0.39	13.62	23.21	ND
16	2.94	1.07	13.10	36.39	ND
20	3.44	1.42	10.84	41.28	ND
24	4.19	1.87	8.14	44.63	ND
28	5.74	2.56	6.58	44.60	ND
32	6.18	2.79	4.77	45.15	ND
36	7.12	3.12	3.45	43.82	ND
40	6.98	3.38	2.97	48.42	0.0053
44	7.2	3.53	2.31	49.03	0.0272
48	7.46	3.63	1.96	48.66	0.0486
52	**7.62**	3.79	1.74	**49.74**	0.0622
56	7.55	3.66	1.23	48.48	0.3487
60	6.87	3.28	0.84	47.74	0.4520
64	6.59	3.14	0.42	47.65	**0.5120**

ND หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่ยังไม่ได้เติมเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอส

ตารางที่ ค.27 การเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ ในถังหมักโดยใช้อัตราเร็วการกวน 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	0.89	0.18	14.61	20.22	ND
4	1.21	0.26	14.29	21.49	ND
8	1.33	0.29	13.56	21.80	ND
12	1.65	0.53	12.89	32.12	ND
16	2.74	0.94	12.78	34.31	ND
20	3.15	1.15	11.28	36.51	ND
24	3.72	1.42	10.36	38.17	ND
28	4.58	1.84	9.42	40.17	ND
32	5.66	2.35	7.66	41.52	ND
36	6.29	2.86	5.38	45.47	ND
40	7.05	3.35	3.54	47.52	0.0070
44	7.09	3.46	3.02	48.80	0.0079
48	7.11	3.49	2.56	49.09	0.0145
52	**7.14**	3.51	1.97	**49.16**	0.0425
56	7.07	3.42	1.24	48.37	0.0491
60	6.45	3.11	0.79	48.22	0.1559
64	5.79	2.68	0.44	46.29	0.2291

ND หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่ยังไม่ได้เติมเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอส

ตารางที่ ค.28 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราการให้อากาศ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm และ อัตราเร็วใน การกวน 250 รอบต่อนาที ที่มีต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในการเลี้ยงเชื้อผสมใน อาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที			
เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการให้อากาศ (vvm)		
	0.5	1.0	1.5
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.88	0.84	0.89
4	1.12	1.16	1.21
8	1.27	1.37	1.33
12	1.35	1.68	1.65
16	2.34	2.94	2.74
20	2.39	3.44	3.15
24	3.16	4.19	3.72
28	3.52	5.74	4.58
32	4.58	6.18	5.66
36	5.26	7.12	6.29
40	6.07	6.98	7.05
44	6.29	7.2	7.09
48	6.41	7.46	7.11
52	**6.72**	**7.62**	**7.14**
56	6.11	7.55	7.07
60	6.23	6.87	6.45
64	5.36	6.59	5.79

ตารางที่ ค.29 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราการให้อากาศ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm และ อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที ที่มีต่อปริมาณโปรตีนจริงภายในเซลล์สูงสุด ในการเลี้ยงเชื้อผสมใน อาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที			
เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการให้อากาศ (vvm)		
	0.5	1.0	1.5
	โปรตีนจริงของตัวเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีนจริงของตัวเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีนจริงของตัวเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)
0	19.32	20.24	20.22
4	20.54	20.69	21.49
8	21.23	22.63	21.8
12	21.48	23.21	32.12
16	30.34	36.39	34.31
20	33.05	41.28	36.51
24	38.61	44.63	38.17
28	40.34	44.6	40.17
32	48.28	45.15	41.52
36	47.72	43.82	45.47
40	48.43	48.42	47.52
44	47.85	49.03	48.8
48	49.61	48.66	49.09
52	**49.85**	**49.74**	**49.16**
56	49.26	48.48	48.37
60	49.12	47.74	48.22
64	48.69	47.65	46.29

ตารางที่ ค.30 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราการให้อากาศ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm และ อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที ที่มีต่อกรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเตรท (แป้งมันสำปะหลัง) สูงสุดในการเลี้ยงเชื้อผสมใน อาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที			
เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการให้อากาศ (vvm)		
	0.5	1.0	1.5
	กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง	กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง	กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง
0	0.059	0.056	0.059
4	0.075	0.077	0.081
8	0.085	0.091	0.089
12	0.090	0.112	0.110
16	0.156	0.196	0.183
20	0.159	0.229	0.210
24	0.211	0.279	0.248
28	0.235	0.383	0.305
32	0.305	0.412	0.377
36	0.351	0.475	0.419
40	0.405	0.465	0.470
44	0.419	0.480	0.473
48	0.427	0.497	0.474
52	**0.448**	**0.508**	**0.476**
56	0.407	0.503	0.471
60	0.415	0.458	0.430
64	0.357	0.439	0.386

ตารางที่ ค.31 เป็นการเปรียบเทียบผลของอัตราการให้อากาศ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm และ อัตราเร็วใน การกวน 250 รอบต่อนาที ที่มีต่อโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุด ในการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที			
เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการให้อากาศ (vvm)		
	0.5	1.0	1.5
	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
16	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND
24	ND	ND	ND
28	ND	ND	ND
32	ND	ND	ND
36	ND	ND	ND
40	0.0022	0.0053	0.0070
44	0.0009	0.0272	0.0079
48	0.0048	0.0486	0.0145
52	0.0123	0.0622	0.0425
56	0.0149	0.3487	0.0491
60	0.0232	0.4520	0.1559
64	**0.0412**	**0.5120**	**0.2291**

ND หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่ยังไม่ได้เติมเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอส

ตารางที่ ค.32 การใช้เชื้อตั้งต้นของ B. subtilis ปริมาณ 5 % v/v แบบ washed cell เวลาในการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อปริมาณเอนไซม์โปรตีเอสในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักโดยใช้ภาวะที่เหมาะสม

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)
0	1.24	0.16	14.63	0.0004	12.90
4	1.38	0.24	14.25	0.0009	17.39
8	1.58	0.45	13.91	0.0009	28.48
12	1.69	0.59	13.52	0.0013	34.91
16	2.88	1.02	13.08	0.0018	35.42
20	3.12	1.33	12.46	0.0022	42.63
24	4.28	1.84	10.67	0.0031	42.99
28	5.64	2.46	8.26	0.0061	43.62
32	6.42	2.85	7.55	0.0035	44.39
36	7.23	3.49	6.21	0.0057	48.27
40	7.36	3.62	4.83	0.0074	49.18
44	7.39	3.64	3.72	0.0237	49.25
48	7.46	3.61	3.29	0.0425	48.39
52	7.58	3.49	2.86	0.0802	46.04
56	7.53	3.52	2.24	0.2041	46.75
60	7.47	3.46	1.98	0.3828	46.32
64	7.39	3.41	1.77	**0.5055**	46.14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค.33 การเจริญเติบโตของเชื้อผสมและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* ตั้งต้นแบบ cell suspension ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เมื่อเลี้ยงในในอาหารขั้นต่ำ ในถังหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)
0	1.28	0.15	14.66	0.0005	11.72
4	1.43	0.26	14.07	0.0011	18.18
8	1.62	0.42	14.39	0.0008	25.93
12	1.79	0.57	13.68	0.0015	31.84
16	2.74	0.94	13.22	0.0007	34.31
20	3.58	1.41	12.65	0.0013	39.39
24	4.28	1.92	10.12	0.0028	44.86
28	5.38	2.45	6.67	0.0044	45.54
32	6.24	2.94	5.56	0.0051	47.12
36	7.12	3.43	4.62	0.0067	48.17
40	7.40	3.67	3.97	0.0082	49.59
44	7.47	3.69	3.04	0.0115	49.40
48	7.55	3.74	2.46	0.0197	49.54
52	7.36	3.56	2.06	0.115	48.37
56	7.59	3.62	1.85	0.327	47.69
60	7.65	3.55	1.63	0.456	46.41
64	7.33	3.48	1.42	0.773	47.48
68	7.57	3.44	1.34	0.982	45.44
72	7.28	3.31	1.26	**1.102**	45.47

ตารางที่ ค.34 การเจริญเติบโตของเชื้อผสมและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* ตั้งต้นแบบ cell suspension ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เมื่อเลี้ยงในในอาหารขั้นต่ำ ในถังหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)
0	1.26	0.13	14.56	0.0002	10.32
4	1.41	0.21	14.34	0.0005	14.89
8	1.59	0.26	13.82	0.0001	16.35
12	1.72	0.33	14.04	0.0008	19.19
16	2.18	0.58	13.12	0.0003	26.61
20	3.28	1.06	11.54	0.0011	32.32
24	5.07	2.08	8.57	0.0009	41.03
28	5.94	2.59	6.44	0.0018	43.60
32	6.34	2.92	4.36	0.0034	46.06
36	6.45	3.1	3.8	0.0026	48.06
40	7.32	3.56	3.24	0.0078	48.63
44	7.56	3.69	2.83	0.01886	48.81
48	7.91	3.9	2.19	0.0359	49.30
52	7.84	3.88	1.95	0.2427	49.49
56	7.73	3.79	1.62	0.5537	49.03
60	7.53	3.58	1.42	0.943	47.54
64	7.64	3.48	1.28	1.5722	45.55
68	7.55	3.43	1.18	2.183	45.43
72	7.42	3.34	0.98	2.573	45.01

ตารางที่ ค.35 การเจริญเติบโตของเชื้อผสมและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* ตั้งต้นแบบ cell suspension ปริมาณ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เมื่อเลี้ยงในในอาหารขั้นต่ำ ในถังหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	โปรตีนจริงภายในเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนของเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)
0	1.22	0.13	14.63	0.0006	10.66
4	1.46	0.19	14.32	0.0002	13.01
8	1.59	0.31	13.64	0.0004	19.50
12	1.64	0.36	14.23	0.0009	21.95
16	2.32	0.74	12.44	0.0014	31.90
20	3.58	1.26	11.25	0.0007	35.20
24	4.76	1.83	9.34	0.0026	38.45
28	5.38	2.21	7.26	0.0017	41.08
32	6.24	2.73	6.04	0.0011	43.75
36	7.12	3.26	3.88	0.0021	45.79
40	7.52	3.52	3.06	0.0056	46.81
44	7.61	3.69	2.91	0.0403	48.49
48	7.82	3.84	2.84	0.0764	49.10
52	7.70	3.77	2.13	0.198	48.96
56	7.42	3.65	1.94	0.483	49.19
60	7.55	3.67	1.76	0.934	48.61
64	7.31	3.48	1.56	1.348	47.61
68	7.59	3.49	1.34	1.734	45.98
72	7.24	3.28	1.26	**1.951**	45.30

ตารางที่ ค.36 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตได้ เมื่อใช้เชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis* แบบ washed cell และแบบ cell suspension ที่ปริมาณต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ชนิดและปริมาณเชื้อตั้งต้นของ *B. subtilis*			
	5 % v/v Washed cell	4 % v/v Cell suspension	10 % v/v Cell suspension	15% v/v Cell suspension
	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	0.0004	0.0005	0.0002	0.0006
4	0.0009	0.0011	0.0005	0.0002
8	0.0009	0.0008	0.0001	0.0004
12	0.0013	0.0015	0.0008	0.0009
16	0.0018	0.0007	0.0003	0.0014
20	0.0022	0.0013	0.0011	0.0007
24	0.0031	0.0028	0.0009	0.0026
28	0.0061	0.0044	0.0018	0.0017
32	0.0035	0.0051	0.0034	0.0011
36	0.0057	0.0067	0.0026	0.0021
40	0.0074	0.0082	0.0078	0.0056
44	0.0237	0.0115	0.01886	0.0403
48	0.0425	0.0197	0.0359	0.0764
52	0.0802	0.115	0.2427	0.198
56	0.2041	0.327	0.5537	0.483
60	0.3828	0.456	0.943	0.934
64	**0.5055**	0.773	1.5722	1.348
68	-	0.982	2.183	1.734
72	-	**1.102**	**2.573**	**1.951**

- หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เนื่องจากใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อ 64 ชั่วโมง

ตารางที่ ค.37 ผลของระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ในการกวนผสมน้ำยางสด 35 % DRC ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรกับน้ำเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ที่มีการเติม 10% SDS 0.2 phr อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที ที่มีต่อการลดปริมาณไนโตรเจนของน้ำยางสด

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณไนโตรเจนยางดิบแห้งชุดควบคุม (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	ปริมาณไนโตรเจนยางดิบแห้งตัวอย่าง (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	ปริมาณไนโตรเจนยางดิบแห้งตัวอย่างเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	ปริมาณไนโตรเจนที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)
0	0.586	0.582 0.579 0.585	0.582	0.68
1	0.586	0.284 0.278 0.281	0.281	52.05
2	0.586	0.289 0.285 0.276	0.283	51.71
3	0.586	0.285 0.272 0.280	0.279	52.39
4	0.586	0.299 0.283 0.286	0.289	50.68
5	0.586	0.292 0.287 0.296	0.292	50.17

ตารางที่ ค.38 ผลของปริมาณ 10% SDS ที่ 0, 0.2, 0.5, 1.0 และ 1.5 phr ในการกวนผสมน้ำยางสด 35%DRC ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรกับน้ำเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 50 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่มีต่อการลดปริมาณไนโตรเจนของน้ำยางสด

10% SDS (phr)	ปริมาณไนโตรเจนยางดิบแห้งควบคุม (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	ปริมาณไนโตรเจนยางดิบแห้งตัวอย่าง (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	ปริมาณไนโตรเจนยางดิบแห้งตัวอย่าง เฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	ปริมาณไนโตรเจนที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)
0	0.586	0.312 0.321 0.319	0.317	45.90
0.2	0.586	0.276 0.281 0.285	0.281	52.05
0.5	0.586	0.257 0.262 0.264	0.261	55.46
1.0	0.586	0.232 0.235 0.231	0.233	**60.24**
1.5	0.586	0.234 0.229 0.227	0.230	**60.75**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค.39 ผลของอัตราเร็ว 0, 50, 70 , 100, 120 และ 150 rpm ในการกวนผสมน้ำยางสด 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรกับน้ำเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ที่มีการเติม 10% SDS 1.0 phr เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่มีต่อการลดปริมาณไนโตรเจนของน้ำยางสด

อัตราเร็วในการกวน (rpm)	ปริมาณไนโตรเจนยางดิบแห้งควบคุม (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	ปริมาณไนโตรเจนยางดิบแห้งตัวอย่าง (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	ปริมาณไนโตรเจนยางดิบแห้งตัวอย่าง เฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	ปริมาณไนโตรเจนที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)
0	0.586	0.467 0.490 0.473	0.477	18.60
50	0.586	0.242 0.238 0.229	0.236	59.73
70	0.586	0.213 0.215 0.209	0.212	63.82
100	0.586	0.180 0.174 0.172	0.175	**70.14**
120	0.586	0.173 0.183 0.180	0.179	69.45
150	0.586	0.264 0.259 0.261	0.261	55.46

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุทธิ์กมล สุทธิกุล เกิดวันที่ 24 สิงหาคม พ.ศ. 2521 สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2543 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย