บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

ในช่วงต้นทศวรรษ 1950 ประชากรโลกได้เผชิญกับปัญหาการขาดแคลนอาหารประเภทโปรตีน นักวิทยาศาสตร์พยายามศึกษาหาแหล่งอาหารประเภทโปรตีนแหล่งใหม่โดยได้ให้ความสำคัญแก่โปรตีนจากจุลินทรีย์ จึงเริ่มมีการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของจุลินทรีย์และการผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์ได้มีการพัฒนามากยิ่งขึ้น ในปี ค.ศ. 1955 องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จัดตั้งหน่วยงานหนึ่ง เพื่อหาแหล่งโปรตีนใหม่สำหรับมนุษย์ ซึ่งต้องมีความปลอดภัยและเหมาะสมสำหรับเป็นอาหารมนุษย์ (Food) หรือเป็นอาหารสัตว์ (Feed) หน่วยงานนี้คือ Protein Advisory Group ต่อมาในปี ค.ศ. 1966 Massachusetts Institute of Technology โดยศาสตราจารย์วิลสัน (C.L. Wilson) ได้บัญญัติคำว่า โปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) หรือ SCP ขึ้น ซึ่งหมายถึงโปรตีนจากจุลินทรีย์ ได้แก่ สาหร่าย รา ยีสต์และแบคทีเรีย (Goldberg, 1985) ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไป Moo-Young และ Gregory (1986) ได้บัญญัติคำว่า โปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ (microbial biomass protein) หรือ MBP ขึ้น แต่ไม่ได้รับความนิยมเท่ากับ SCP นอกจากนั้น SCP ยังหมายถึง มวลชีวภาพของจุลินทรีย์ซึ่งมีโปรตีน กรดนิวคลีอิค คาร์โบไฮเดรต ไขมันและองค์ประกอบอื่นๆ ของเซลล์เป็นองค์ประกอบ (Senez, 1987) ความต้องการนำมวลชีวภาพของจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์เป็นอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์ ทำให้มีการศึกษาเรื่องการผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์มากยิ่งขึ้น โดยเริ่มมีการใช้กากน้ำตาลสำหรับการผลิตโปรตีนจากยีสต์ในประเทศแถบยุโรปตั้งแต่ต้นศตวรรษที่ 20 และได้มีการผลิตมากขึ้นถึง 15,000 ตันต่อปี ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 1 และ 2 โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศเยอรมันมีการผลิตโปรตีนจากยีสต์เพื่อใช้เป็นอาหารของมนุษย์ประมาณ 16,000 ตันต่อปี หรือ 60

เปอร์เซนต์ของโปรตีนทั้งหมด จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตคือ *Candida utilis* ซึ่งเป็นยีสต์ที่เติบโตได้เร็ว มีปริมาณโปรตีนสูง อุดมด้วยวิตามินบีรวม และเติบโตได้ในวัตถุดิบหลายชนิด (Rose, 1979a) ในประเทศอังกฤษใช้ประโยชน์จากยีสต์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการทำเบียร์เป็นอาหารสัตว์ ประมาณ 30,000 ตันต่อปี ส่วนประเทศไทยเริ่มมีการทดลองใช้ยีสต์เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ เนื่องจากแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ซึ่งได้จากกากถั่วเหลืองและปลาป่นมีราคาสูงและหายากยิ่งขึ้น ดังนั้นการผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์จึงเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่งที่สมควรนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ เพราะมีปริมาณโปรตีนสูงสามารถเลี้ยงได้ในระยะเวลาสั้นจากวัตถุดิบราคาถูก และประหยัดเนื้อที่ในการผลิต (วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2529)

จากการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกอย่างรวดเร็วนำมาสู่ความสำคัญของปัญหาการขาดแคลนอาหารประเภทโปรตีน เป็นที่คาดว่าในปี ค.ศ. 2000 จะมีประชากรโลกถึง 6.5 พันล้านคน ซึ่งประชากรส่วนใหญ่ที่เพิ่มขึ้นอยู่ในประเทศยากจน ทำให้เกิดปัญหาความอดอยากขึ้น ในปี ค.ศ. 1985 องค์การอนามัยโลกรายงานว่าประชากรกว่า 1.1 พันล้านคน อดอยากและขาดแคลนอาหารประเภทโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งประชากรในกลุ่มประเทศโลกที่สาม ปัจจุบันพบว่ามาตรฐานการผลิตอาหารทั่วโลกอยู่ในระดับต่ำควรมีการผลิตเพิ่มขึ้นอีก 1.5 เท่า จึงพอเพียงกับความต้องการอาหารของประชากรทั่วโลก (ตารางที่ 1.1) อย่างไรก็ดีพบว่าผลผลิตมวลรวมทั้งหมดส่วนใหญ่มาจากประเทศกำลังพัฒนา (United Nations, 1977 อ้างถึงใน Senez, 1987)

ตารางที่ 1.1 การคาดหมายความต้องการโปรตีนของประชากรโลก (United Nations, 1977 อ้างถึงใน Senez, 1987)

	ค.ศ. 1980	ค.ศ. 2000	ปัจจัยเพิ่มขึ้น
แนวโน้มจำนวนประชากรโลกทางสถิติ (ล้านคน)	4400	6405	1.46
ผลผลิตมวลรวม (ดอลลาร์สหรัฐ)	1165	2071	1.78
ความต้องการโปรตีน			
สำหรับมนุษย์	48.6	78.4	1.61
สำหรับสัตว์	43.1	106.3	2.47

จากตารางที่ 1.1 ทำให้ทราบว่าแนวโน้มความต้องการอาหารประเภทโปรตีนของประชากรโลกเพิ่มขึ้น ดังนั้นโปรตีนจากจุลินทรีย์จึงมีความสำคัญอย่างมากในการเป็นแหล่งอาหารทดแทนแหล่งอาหารจากพืชและสัตว์ ซึ่งนับวันมีราคาแพงและหายากมากขึ้น ในอนาคตปัญหา

การขาดแคลนอาหารย่อมเป็นปัญหาใหญ่สำหรับมนุษย์ เพราะอัตราการเพิ่มของประชากรโลกสูงมาก ในขณะที่อัตราการเพิ่มของอาหารคงที่และมีแนวโน้มลดลง นอกจากนั้นความต้องการแหล่งอาหารประเภทโปรตีนสำหรับใช้ในการเลี้ยงสัตว์มีมากยิ่งขึ้น ขณะเดียวกันการแก้ปัญหามลภาวะอันเกิดจากน้ำทิ้งก็มีความสำคัญมากเช่นกัน การนำสารอาหารที่มีอยู่ในน้ำทิ้งมาใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์เพื่อนำมาเป็นแหล่งอาหารเสริมโปรตีนในอาหารสัตว์ เนื่องจากเซลล์ยีสต์มีปริมาณโปรตีนสูง มีกรดอะมิโนจำเป็นหลายชนิดเช่น ไลซีน (lysine) เมไธโอนีน (methionine) และทริปโตเฟน (tryptophan) เป็นต้น (Anna, 1990) และยังเป็นการบำบัดน้ำทิ้งไปด้วยในขณะเดียวกัน จึงนับว่าเป็นการแก้ปัญหามลภาวะควบคู่ไปกับการผลิตโปรตีนโดยการใช้สารอาหารราคาถูกด้วย

1.2 ไขมันและกรดไขมัน

1.2.1 ไขมัน (Fat) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอล เกิดจากหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอล เกิดเอสเทอร์กับกรดไขมันหนึ่ง สอง หรือสามหมู่ ถ้าหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอลเกิดเอสเทอร์กับกรดไขมันหนึ่งหมู่เรียกว่าโมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) สองหมู่เรียกว่าไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และสามหมู่เรียกว่าไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ถ้าไดกลีเซอไรด์หรือไตรกลีเซอไรด์ที่เกิดขึ้นประกอบด้วยกรดไขมันต่างชนิดกันเรียกว่า กลีเซอไรด์ผสม (mixed glyceride) ซึ่งไขมันในธรรมชาติทั่วไปมีโครงสร้างประเภทนี้ ไขมันอาจมีลักษณะเป็นของแข็งหรือของเหลวที่อุณหภูมิปกติได้ ขึ้นอยู่กับจุดหลอมเหลวของไขมันนั้นๆ ไขมันที่มีสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิปกติเรียกว่า น้ำมัน (oils) เช่น น้ำมันมะกอก (olive oil) และน้ำมันเมล็ดฝ้าย (cottonseed oil) เป็นต้น (White, 1968) โรงงานทำสบู่ได้จำแนกไขมันออกเป็นสองกลุ่มโดยวัดอุณหภูมิตรงจุดที่ไขมันเริ่มแข็งตัว (re-solidification point) ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 38 องศาเซลเซียส เรียกว่าไขมันสัตว์ (tallow) ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 38 องศาเซลเซียส เรียกว่าไขมันชนิดข้น (grease) ไขมันแต่ละชนิดที่มีจุดหลอมเหลวเท่ากันอาจมีปริมาณกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) สี ความชื้นและสารที่ไม่ทำปฏิกิริยากับด่าง (unsaponifiable) ในปริมาณต่างกัน (พันทิพา พงษ์เพียจันทร์, 2539)

1.2.2 กรดไขมัน (Fatty acid) เป็นส่วนประกอบสำคัญของไขมัน โดยทั่วไปมีจำนวน คาร์บอนเป็นเลขคู่ตั้งแต่ 4-22 อะตอม ไขมันจากสัตว์และพืชประกอบด้วยกรดไขมัน

แตกต่างกัน มีจำนวนคาร์บอนแตกต่างกันหลายชนิด โมเลกุลของกรดไขมันประกอบด้วยสองส่วน คือ ส่วนมีขั้วละลายได้ในน้ำ (hydrophillic group) ได้แก่ หมู่คาร์บอกซิล (-COOH) และส่วนไม่มีขั้ว ไม่ละลายน้ำ (hydrophobic group) ได้แก่ หมู่อัลคิล (-R) ดังนั้นกรดไขมันจึงมีสูตรทั่วไป คือ RCOOH

ลักษณะของกรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบของไขมันในพืชและสัตว์ ได้แก่

1) เป็นกรดไขมันที่มีหมู่คาร์บอกซิล 1 หมู่ (monocarboxylic acid) ส่วนที่เป็นไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon residue) มีโครงสร้างเป็นสายยาว แตกกิ่งหรือเป็นวงแหวน

2) จำนวนคาร์บอนในโมเลกุลของกรดไขมันที่พบในธรรมชาติ ส่วนใหญ่มีคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่

3) เป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว

กรดไขมัน แบ่งออกได้ 2 ประเภทคือ

1) กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) คือกรดไขมันที่มีพันธะระหว่างคาร์บอนเป็นพันธะเดี่ยว ไม่สามารถรับไฮโดรเจนได้อีก กรดไขมันอิ่มตัวมีสูตรทั่วไปคือ $C_nH_{2n}O_2$ เช่น กรดสเตียริก (stearic acid) และกรดปาล์มิติก (palmitic acid) เป็นต้น

2) กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) คือกรดไขมันที่มีพันธะระหว่างคาร์บอนเป็นพันธะคู่ 1 พันธะหรือมากกว่า กรดไขมันประเภทนี้จึงสามารถรับไฮโดรเจนได้อีก และกลายเป็นกรดไขมันอิ่มตัวได้ เช่น กรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic acid) กรดโอเลอิก (oleic acid) และกรดลิโนเลนิก (linolenic acid) เป็นต้น (Potts และ Mukerheide, 1968 ; Edmunds, 1990)

ไขมันประกอบด้วยกรดไขมันหลายชนิดที่มีส่วนประกอบทางเคมีและคุณลักษณะทางฟิสิกส์ต่างกัน กรดไขมันที่ปรากฏตามธรรมชาติส่วนใหญ่ประกอบด้วยจำนวนคาร์บอนอะตอมเลขคู่ ถ้าโมเลกุลใหญ่ขึ้นจากการที่มีสายยาวขึ้น จะทำให้จุดหลอมเหลวสูงขึ้น ตำแหน่งและจำนวนพันธะคู่มีผลต่อจุดหลอมเหลว (Johnson และ Peterson, 1974) ดังตารางที่ 1.2

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.2 ชนิดของกรดไขมันที่ประกอบอยู่ปริมาณมากในไขมันชนิดต่างๆ และจุดหลอมเหลวของแหล่งไขมันนั้น (Johnson และ Peterson, 1974)

จำนวนคาร์บอนอะตอม	กรดไขมัน	จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	แหล่งไขมัน
4	บิวทีริก (butyric)	-5.3	ไขมันนม
6	คาโพรอิก (caproic)	-3.2	ไขมันนม
8	คาพรีอิก (caprylic)	16.5	ไขมันนมและน้ำมันเมล็ดปาล์ม
10	คาพริก (capric)	31.6	น้ำนมแกะและน้ำนมแพะ
12	ลูริก (lauric)	44.8	น้ำมันมะพร้าว
14	มายริสติก (myristic)	54.4	น้ำมันปาล์มและน้ำมันมะพร้าว
16	ปาล์มิติก (palmitic)	62.9	ไขมันสัตว์
18	สเตียริก (stearic)	70.1	ไขมันสัตว์
20	อะแรชชิดิก (arachidic)	76.1	ไขมันสัตว์บางชนิด
22	เบเฮนิก (behenic)	80.0	น้ำมันจากเมล็ดพืช
24	ลิกไนเซอริก (lignoceric)	84.2	น้ำมันจากเมล็ดพืช
26	เซอโรติก (cerotic)	87.8	ไขมันพืช
28	มอนตานิก (montanic)	90.9	ไขมันพืช
30	เมลิสสิก (melissic)	93.6	ไขมันพืช

1.3 การย่อยสลายไขมันและกรดไขมัน

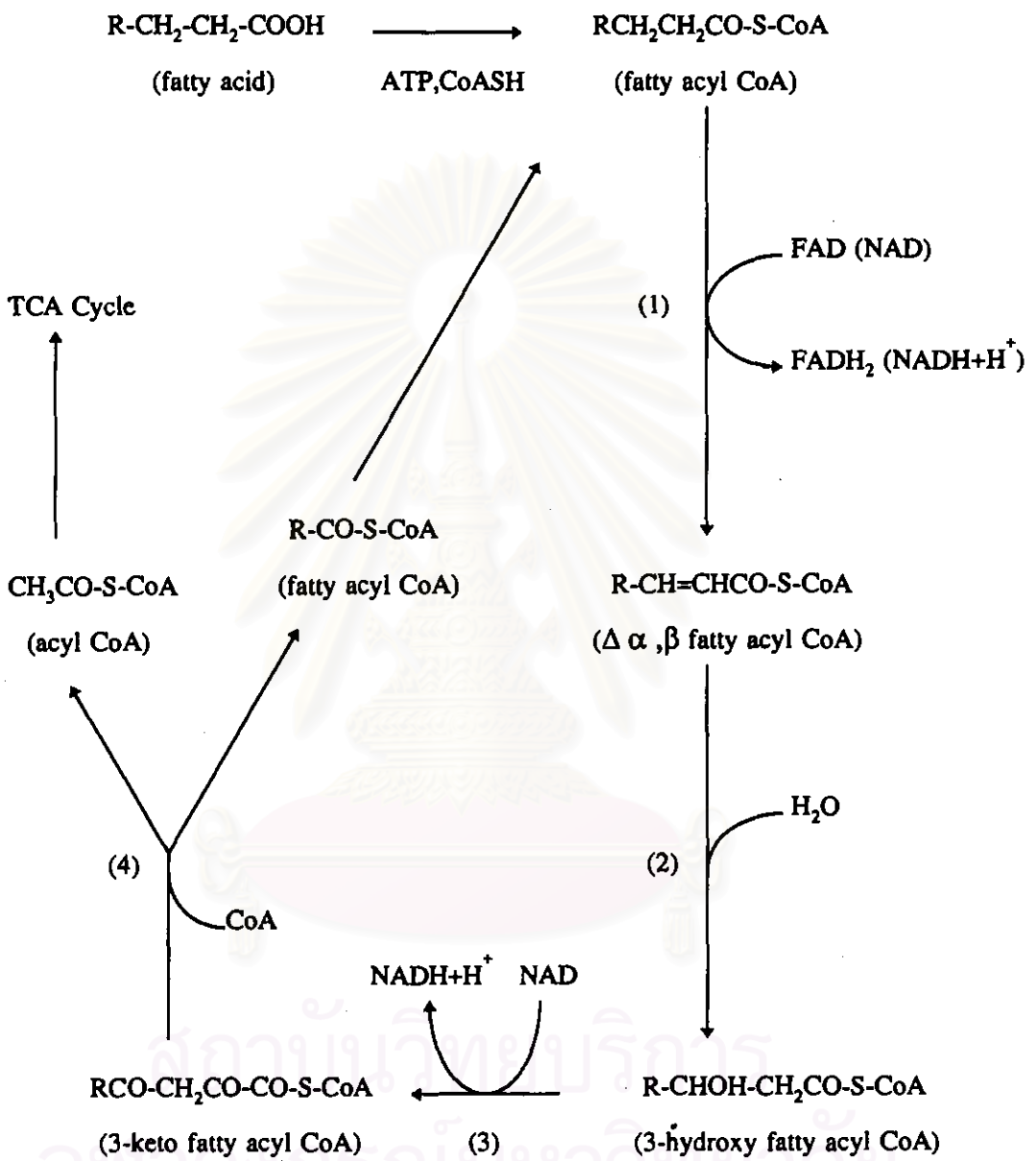
กระบวนการย่อยสลายไขมัน มีสองวิธีคือ การย่อยสลายทางเคมีและทางชีวภาพ โดยกระบวนการย่อยสลายทางเคมีด้วยกรด ต้องอาศัยความดันประมาณ 50 บรรยากาศ ที่อุณหภูมิสูงกว่า 250 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายไขมันได้ 96-99 เปอร์เซนต์ (Potts และ Mukerheide, 1968) แต่กรดไขมันที่ได้มีสีดำคล้ำ การนำมาใช้ประโยชน์ต้องผ่านกระบวนการกลั่นหลายๆ ครั้ง เพื่อดึงสีออกจากกรดไขมันทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง ขณะที่การย่อยสลายทางชีวภาพมีการใช้เอนไซม์ไลเปส (lipase) ในการย่อยสลายไขมัน (Davis และ Reilly, 1980) Anon (1981) รายงานว่าบริษัท Miyoshi Oil and Fat ประเทศญี่ปุ่น นำเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Candida*

cylindracea มาใช้ในการย่อยสลายไขมันในกระบวนการผลิตสบู่ พบว่าต้นทุนในการผลิตต่ำกว่าการย่อยสลายไขมันด้วยกระบวนการทางเคมี

ไขมันที่พบส่วนใหญ่มักอยู่ปะปนในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น โรงงานฆ่าสัตว์ โรงงานแปรรูปอาหาร และโรงงานผลิตน้ำมันพืช เป็นต้น โดยมีกรดไขมันและเอซิลกลีเซอรอล (acylglycerol) ในสัดส่วนสูง ส่วนไขมันสัตว์ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของแข็ง จึงยากต่อการกำจัดและนำมาใช้ประโยชน์ ไขมันจากแหล่งต่างๆ เหล่านี้มีปริมาณมากและสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานสำหรับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ เช่น *Candida Cryptococcus Rhodotorula Torulopsis Yarrowia* และ *Trichosporon* เป็นต้น ยีสต์เหล่านี้สามารถนำกรดไขมันเข้าสู่เซลล์โดย facilitated diffusion เมื่อความเข้มข้นของกรดไขมันต่ำ และนำกรดไขมันเข้าสู่เซลล์โดย simple diffusion เมื่อความเข้มข้นของกรดไขมันสูง (Ratledge และ Evans, 1989)

การย่อยสลายไขมันซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์ (phosphoglyceride) จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ไลเปสและฟอสโฟไลเปส (phospholipase) ตามลำดับ ซึ่งเป็นกระบวนการย่อยสลายไขมันในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ส่วนการย่อยสลายกรดไขมันในเซลล์ยีสต์ สามารถย่อยสลายได้โดยวิถีแอลฟาออกซิเดชัน (α - oxidation pathway) วิถีเบต้าออกซิเดชัน (β - oxidation pathway) และวิถีโอเมกาออกซิเดชัน (ω - oxidation pathway) ยีสต์ส่วนใหญ่ย่อยสลายกรดไขมันผ่านทางวิถีเบต้าออกซิเดชัน (รูปที่ 1.1) ซึ่งเป็นกระบวนการย่อยสลายกรดไขมันในไมโตคอนเดรีย (mitochondria) (Ratledge และ Evans, 1989 ; Ratledge และ Tan, 1989 ; Reed และ Nagodawithana, 1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.1 วิถีเบต้าออกซิเดชันของกรดไขมัน เมื่อ (1) = เอนไซม์ fatty acyl CoA oxidase จับกับ FAD หรือเอนไซม์ fatty acyl CoA dehydrogenase จับกับ NAD^+ (2) = เอนไซม์ enoyl-CoA hydratase (3) = เอนไซม์ L-3- hydroxyacyl - CoA dehydrogenase (4) = เอนไซม์ acetyl-CoA acetyltransferase (Ratledge และ Evans, 1989 ; Ratledge และ Tan, 1989 ; Reed และ Nagodawithana, 1995)

1.4 มวลชีวภาพของจุลินทรีย์

ปัญหาการเพิ่มประชากรอย่างรวดเร็ว เป็นสาเหตุทำให้เกิดการขาดแคลนอาหารโปรตีน ขาดแคลนวัตถุดิบที่ใช้ผลิตโปรตีนและปัญหามลภาวะซึ่งเกิดจากน้ำทิ้ง ดังนั้นการนำสารอาหารที่คงเหลืออยู่ในน้ำทิ้งมาใช้ในการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์จึงเป็นหนทางหนึ่งที่ใช้แก้ปัญหาดังกล่าวได้

Moss และ Smith (1977) เสนอว่าโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์เป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญของโลก เนื่องจาก

1) ราคาถูก เพราะใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก สามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด รวมทั้งวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมและการเกษตร

2) การเลี้ยงจุลินทรีย์ใช้ระยะเวลาสั้น เนื่องจากจุลินทรีย์มีอัตราการเติบโตเร็ว ถ้าพิจารณาจากค่าการแบ่งตัวในแต่ละชั่วรุ่น (generation time) พบว่าแบคทีเรียมีอัตราการเติบโตสูงสุดคือประมาณ 0.3-2.0 ชั่วโมง ยีสต์รองลงมาคือประมาณ 1-3 ชั่วโมง ส่วนราและสาหร่ายใช้เวลาในการเพิ่มมวลชีวภาพเป็น 2 เท่า ประมาณ 4-12 ชั่วโมง และ 2-6 ชั่วโมง ตามลำดับ

3) ประหยัดเนื้อที่ในการผลิตถ้าเปรียบเทียบกับพืชหรือสัตว์พบว่าการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ใช้พื้นที่น้อยกว่ามากในการผลิตเพื่อให้ได้โปรตีนปริมาณเท่ากัน

4) มวลชีวภาพของจุลินทรีย์มีโปรตีนสูงประมาณ 7-12 กรัมโปรตีนไนโตรเจนต่อ 100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีกรดอะมิโนจำเป็นคล้ายกับสัตว์ โปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็น เช่น ไลซีน เมไธโอนีน และ ทริปโตเฟน ซึ่งโปรตีนจากพืชมักไม่มี ประการสำคัญคือการสังเคราะห์โปรตีนโดยจุลินทรีย์เร็วกว่าในพืชและสัตว์

การใช้โปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ เพื่อประโยชน์สองประการคือ การกำจัดของเสียเพื่อแก้ปัญหามลภาวะ และผลตอบแทนจากการใช้ประโยชน์ของวัสดุเหล่านี้ เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ส่วนใหญ่มีส่วนประกอบของสารอินทรีย์สูง เป็นที่ยอมรับของนักเทคโนโลยีชีวภาพว่าการแปรรูปสารอินทรีย์และอื่นๆในวัสดุเหลือใช้ เป็นสารที่มีประโยชน์และมีราคาโดยใช้จุลินทรีย์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแปรรูปเป็นเซลล์จุลินทรีย์ที่มีปริมาณโปรตีนและคุณค่าทางอาหารอื่นๆ สูง เหมาะสำหรับเป็นอาหารสัตว์หรือ อาหารเสริมในสัตว์ (Goldberg, 1985) ปัจจุบันมีบริษัทผู้ผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์จำนวนมากเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในเชิงพาณิชย์และอาหารเสริมในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (ตารางที่ 1.3 และ 1.4)

ตารางที่ 1.3 บริษัทผู้ผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ (Reed และ Nagodawithana, 1995)

ระดับการผลิต	บริษัท	ประเทศผู้ผลิต	วัตถุดิบ	ชนิดของจุลินทรีย์	ขนาดผลิต (ตันต่อปี)
วิจัยและสาธิต	British Petroleum	อังกฤษ	อัลเคน	ยีสต์	4,000
	Chinese Petroleum	ไต้หวัน	อัลเคน	ยีสต์	1,000
	Dianippon	ญี่ปุ่น	อัลเคน	ยีสต์	-
	Imperial Chemical Industries	อังกฤษ	เมธานอล	แบคทีเรีย	1,000
	Kanegafuchi	ญี่ปุ่น	อัลเคน	ยีสต์	5,000
	Kohjin	ญี่ปุ่น	อัลเคน	ยีสต์	1,500
	Kyowa Hakko	ญี่ปุ่น	-	ยีสต์	2,400
	Milbrew	อังกฤษ	หางนม	ยีสต์	5,000
	Shell	เนเธอร์แลนด์	เมธานอล	แบคทีเรีย	1,000
	Svenska-Socker	สวีเดน	แป้งมันฝรั่ง	ยีสต์	2,000
กึ่งการค้า	British Petroleum	อังกฤษ	น้ำมันก๊าซ	ยีสต์	20,000
	Imperial Chemical Industries	อังกฤษ	เมธานอล	แบคทีเรีย	50,000
	United Paper Mills	ฟินแลนด์	น้ำทิ้งโรงงานทำกระดาษ	ยีสต์	10,000
	USSR State	รัสเซีย	-	ยีสต์	20,000
การค้า	British Petroleum	อังกฤษ	อัลเคน	ยีสต์	100,000
	Liquichimica Biosintesi	อิตาลี	อัลเคน	ยีสต์	100,000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.4 ชนิดของจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ในเชิงพาณิชย์ (Waterworth, 1990)

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

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

1) เติบโตได้เร็วในอาหารที่มีราคาถูก เป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น

2) เติบโตได้ดีในอาหารที่มีส่วนประกอบง่ายๆ มีความต้องการวิตามินและสารสำหรับการเติบโต (growth factor) ต่างๆ น้อย หรือไม่ต้องการเลย

3) คงลักษณะทางพันธุกรรมได้ดี ไม่กลายพันธุ์ง่ายเมื่อเลี้ยงติดต่อกันเป็นเวลานาน

4) การแยกและเก็บเกี่ยวเซลล์ทด

5) มีความต้านทานต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

6) ทราบคุณสมบัติทางพันธุกรรม สรีรวิทยาและสามารถปรับปรุงทางด้านพันธุกรรมได้

7) ใช้แหล่งพลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

8) หลังจากผ่านกระบวนการเลี้ยงแล้ว มีวัสดุเหลือทิ้งน้อยหรือไม่มีเลย

9) ไม่เป็นพิษ และทำให้เกิดอาการภูมิแพ้

10) ให้ปริมาณโปรตีนสูง โดยเฉพาะโปรตีนต้องมีกรดอะมิโนที่มีคุณค่า

11) เก็บรักษาได้ง่าย เช่น การทำให้แห้งได้

ถึงแม้ว่าการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ เป็นแหล่งอาหารโปรตีนมีข้อดีหลายประการ แต่การผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ต้องอาศัยเทคโนโลยีในการผลิตสูงมาก รวมทั้งบุคลากรในการผลิตและควบคุม ตลอดจนอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาสูงมาก ดังนั้นในการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ต้องมีการศึกษาในแง่เศรษฐศาสตร์ควบคู่ไปด้วย เช่นเดียวกับการลงทุนอื่นๆ ถ้าพิจารณาถึงผลระยะยาวจะเห็นได้ว่าการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ได้ผลตอบแทนที่คุ้มค่า และสำหรับประเทศกำลังพัฒนาควรพยายามศึกษาหาทางใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสม (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

ในการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ ต้องการเซลล์ที่ประกอบด้วยโปรตีนสูง ส่วนคาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิค ไขมันต้องมีปริมาณต่ำ และสามารถแข่งขันกับโปรตีนจากพืชหรือปลาป่นได้ มีกลิ่นรสดี และที่สำคัญคือมีไลซีน เมไธโอนีนและทริปโตเฟนสูง ซึ่งโปรตีนจากพืชมักไม่มี ส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์นอกจากขึ้นกับชนิดของเชื้อแล้ว โดยทั่วไปขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะการเติบโต ตัวอย่างเช่น สัดส่วนของโปรตีนต่อไขมันเป็นผลจากสัดส่วนของค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีในอาหาร ถ้ามีไนโตรเจนน้อยจะเป็นตัวจำกัดการเติบโต ไขมันจึงสะสมภายในเซลล์ โดยทั่วไปโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์มักขาดกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ แบคทีเรียมีแนวโน้มผลิตเมไธโอนีนได้มากกว่ายีสต์ แต่ยีสต์มีไลซีนมากกว่าโปรตีนในข้าวสาลี จึงมีการเติมกรดอะมิโนจำเป็นบ้างในการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของจุลินทรีย์บางชนิด วิตามินที่ได้จากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มวิตามินบีโดยเฉพาะจากยีสต์ ยกเว้นวิตามินบี 12 ที่ได้จากแบคทีเรีย (Scrimshaw และ Young, 1979)

ตารางที่ 1.5 องค์ประกอบภายในเซลล์ของมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตโปรตีน (Litchfield, 1979)

จุลินทรีย์	วัตถุดิบ	องค์ประกอบภายในเซลล์ (g/100g dry wt)			
		ไนโตรเจน	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
สาหร่าย					
Chlorella regularis	คาร์บอนไดออกไซด์	9.3	58	16	6.7
Chlorella sorokiniana	คาร์บอนไดออกไซด์	9.6	60	8	9
Spirulina maxima	คาร์บอนไดออกไซด์	10.0	62	3	-
แบคทีเรีย					
Acinetobacter cerificans	อัลเคน	11	72	-	-
Cellulomonas sp.	ชานอ้อย	14	87	8	7
Methylomonas clara	เมธานอล	12-13	80-85	8-10	8-12
Methylophilus methylotrophus	เมธานอล	13	83	7	8.6
Thermomonospora fusca	เซลลูโลส	4.8-5.6	30-35	-	-
ยีสต์					
Candida lipolytica	อัลเคน	10	65	8.1	6
	น้ำมันก๊าซ	11	69	1.5	8
Candida utilis	เอธานอล	8.3	52	7	8
	น้ำทิ้งโรงงานทำกระดาษ	9	55	9	8
Hansenula polymorpha	เมธานอล	-	50	-	-
Kluyveromyces fragilis	หางนม	9	54	1	9
Saccharomyces cerevisiae	กากน้ำตาล	8.4	53	6.3	7.3
รา					
Agaricus campestris	กลูโคส	-	36	3	4.5
Aspergillus niger	กากน้ำตาล	7.5	50	-	-
Fusarium graminearum	แป้ง	8.7	54	-	-

ตารางที่ 1.6 กรดอะมิโนภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตโปรตีน เปรียบเทียบกับมาตรฐานของ FAO และแหล่งโปรตีนอื่นๆ (Litchfield, 1979 ; Boze และคณะ, 1992)

แหล่งโปรตีน	วัตถุดิบ	กรดอะมิโน (กรัมต่อ 16 กรัมไนโตรเจน)								
		Cys	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Try	Val
FAO reference	-	2.0	4.2	4.8	4.2	2.2	2.8	2.8	1.0	4.2
ถั่วเหลือง	-	0.7	2.2	3.5	2.8	0.6	2.2	1.9	0.6	2.3
ปลา	-	0.7	3.2	5.0	4.9	1.9	2.9	3.0	0.9	3.7
ไข่	-	2.4	6.7	8.9	6.5	5.1	5.8	5.1	1.6	7.3
สาหร่าย										
Chlorella sorokiniana	คาร์บอนไดออกไซด์	-	3.4	4.0	7.8	1.8	2.7	3.2	1.4	5.1
Spirulina maxima	คาร์บอนไดออกไซด์	0.4	5.8	7.8	4.8	1.5	4.6	4.6	1.3	6.3
แบคทีเรีย										
Cellulomonas alcaligenes	ชานอ้อย	-	5.4	7.4	7.6	2.0	4.7	5.5	-	7.1
Methylophilus methylotrophus	เมธานอล	0.6	4.3	6.8	5.9	2.4	3.4	4.6	0.9	5.2
ยีสต์										
Candida lipolytica	อัลเคน	1.1	4.5	7.0	7.0	1.8	4.4	4.9	1.4	5.4
Candida utilis	เอธานอล	0.4	4.5	7.1	6.6	1.4	4.1	5.5	1.2	5.7
Kluyveromyces fragilis	หางนม	-	4.0	6.1	6.9	1.9	2.8	5.8	1.4	5.4
Saccharomyces cerevisiae	กากน้ำตาล	1.6	5.5	7.9	8.2	2.5	4.5	4.8	1.2	5.5
รา										
Aspergillus niger	กากน้ำตาล	1.1	4.2	5.7	5.9	2.6	3.8	5.0	2.1	5.2
Morchella crassipes	กลูโคส	0.4	2.9	5.6	3.5	1.0	1.9	3.0	1.5	3.0
Paecilomyces variotii	น้ำทิ้งโรงงานทำกระดาษ	1.1	4.3	6.9	6.4	1.5	3.7	4.6	1.2	5.1

1.5 ประเภทของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีน

1.5.1 สาหร่าย มีการดำรงชีวิตโดยใช้พลังงานแสงอาทิตย์เป็นแหล่งของพลังงานในการรีดิวซ์สารอนินทรีย์ให้เป็นสารอินทรีย์ ข้อดีของสาหร่ายคือมีปริมาณโปรตีนสูงประมาณ 55 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นโปรตีนที่มีคุณภาพ อุดมด้วยวิตามินซีและวิตามินบีรวม ข้อเสียของสาหร่ายคือ อัตราการเติบโตต่ำกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่น และถ้าเลี้ยงในถังหมักมีปัญหาการให้คาร์บอนไดออกไซด์และแสงแก่เซลล์สาหร่าย สาหร่ายที่ได้รับความสนใจใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนได้แก่ *Chlorella sp. Scenedesmus sp. Coelastrum sp. Uronema sp.* และ *Dunaliella sp.* โดยเฉพาะ *Spirulina maxima* ชาวพื้นเมืองแอฟริกาและบางส่วนของเม็กซิโกใช้ผสมในอาหาร เนื่องจาก *Spirulina maxima* มีกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบและมีกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์ต่ำ (Reed และ Nagodawithana, 1995)

สำหรับราคาในการผลิต เช่นการผลิตสาหร่าย *Chlorella sp.* มีการศึกษาพบว่า ราคาประมาณ 20-50 เซนต์ต่อปอนด์ ซึ่งเป็นราคาที่สูง แต่ถ้าเลี้ยงในน้ำทิ้งจะมีราคาประมาณ 3-6 เซนต์ต่อปอนด์ (Udall และคณะ, 1984) สำหรับประเทศไทยมีบริษัทสยามแอลจีผลิต *Spirulina sp.* เมื่อผลิตแล้วจึงส่งไปขายยังประเทศญี่ปุ่นจำหน่ายเป็นอาหารบำรุงสุขภาพ และอาหารเสริมในสัตว์ ส่วนการเลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งเป็นการกำจัดน้ำทิ้งโดยได้เซลล์ของสาหร่ายมาเป็นแหล่งอาหารสัตว์ หรือใช้ทำปุ๋ย หรือใช้หมักแก๊สชีวภาพ (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

1.5.2 รา ราที่ใช้เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์มานานคือเห็ด ซึ่งเป็นโปรตีนที่มนุษย์สามารถบริโภคได้โดยตรงเช่น *Agaricus campestris* ถูกใช้เป็นอาหารในแถบยุโรป ส่วนประเทศจีนนิยมบริโภคเห็ด *Cortinellus berkelyanus* ในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ประเทศเยอรมัน ได้เลี้ยงราพวก *Geotrichum candidum* เป็นอาหารเสริมของมนุษย์ (Goldberg, 1985) การใช้ราในการผลิตโปรตีนจำเป็นต้องเสริมด้วยเมไธโอนีน กรดกลูตามิก วิตามินบี 2 และ วิตามินบี 12 ทั้งนี้เพราะรามีกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ มีกรดนิวคลีอิกและวิตามินบีรวมต่ำ ข้อดีของราคือเป็นที่ยอมรับได้ง่ายตลอดจนมีคุณค่าทางอาหารใกล้เคียงกับยีสต์ แต่อัตราการเติบโตต่ำกว่ายีสต์และแบคทีเรีย และมีปัญหาในการเลี้ยงเนื่องจากเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว เส้นใยราจะอยู่ในสภาพเป็นกลุ่มก้อน (pellet) ทำให้เกิดปัญหาในการให้ออกซิเจนแก่เซลล์ (Kihlberg, 1972 อ้างถึงใน ดวงพร คันธโชติ, 2530)

ราที่มีแนวโน้มว่าสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนคือ ราในกลุ่ม Imperfect fungi เพราะว่ามีอัตราการเติบโตและสามารถใช้วัสดุต่างๆ เป็นแหล่งของคาร์บอนได้ เช่น มันฝรั่ง ข้าว-

ข้าวโพด มันสำปะหลัง กากน้ำตาล เยื่อกระดาษ และของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนแหล่งของไนโตรเจนคือ เกลืออนินทรีย์ สำหรับ *Fusarium sp.* และ *Rhizopus sp.* เหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีน เพราะมีซีสตีน และเมไธโอนีนในปริมาณสูง โดยพบว่าโปรตีนในส่วนของเส้นใยรามีปริมาณต่ำกว่าในส่วนของ fruiting body ในประเทศฟินแลนด์ผลิตโปรตีนจากรา *Paecilomyces varioti* โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานทำกระดาษ โดยใช้ถังหมัก 2 ถัง ผลิตเส้นใยแห้งได้ 15-16.5 ตันต่อถังต่อวัน เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการกรองได้ผลผลิตประมาณ 0.55 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมอาหาร มีโปรตีน 52-57 เปอร์เซนต์ เหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ (Singh และคณะ, 1991)

1.5.3 แบคทีเรีย การศึกษาการใช้แบคทีเรียเป็นแหล่งอาหารโปรตีน เป็นที่สนใจมากขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียมีอัตราการเติบโตสูงกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่น คือ 20 - 30 นาที ขณะที่ยีสต์หรือรามีอัตราการเติบโต 2-3 ชั่วโมง และ 4-16 ชั่วโมง ตามลำดับ มีปริมาณโปรตีนสูง โปรตีนในแบคทีเรียแต่ละชนิดมีปริมาณแตกต่างกันตั้งแต่ 47-87 เปอร์เซนต์ ขณะที่โปรตีนจากสาหร่าย รา และยีสต์ มีประมาณ 40, 40 และ 50 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ แบคทีเรียมีกรดอะมิโนจำเป็นคือ เมไธโอนีน ทริปโตเฟนและซิสตีน การปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียทำได้ง่ายเพื่อนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม แต่มีข้อเสียคือมีกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์ค่อนข้างสูงคือ 10-16 เปอร์เซนต์ (ดวงพร คันธโชติ, 2530) แบคทีเรียที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในระดับอุตสาหกรรมที่พบมากใช้เมธานอลเป็นสารอาหาร เช่น บริษัท Imperial Chemical Industries ผลิต *Methylophilus methylotrophus* และให้ชื่อผลิตภัณฑ์ว่าพรูทีน (pruteen) มีโปรตีน 70-72 เปอร์เซนต์ ใช้เป็นอาหารสัตว์ ผลิตแบบต่อเนื่องโดยได้ผลผลิต 30 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร (Reed และ Nagodawithana, 1995)

Han และคณะ (1971) เลี้ยง *Cellulomonas sp.* และ *Alcaligenes faecalis* ย่อยสลายชานอ้อยจากโรงงานน้ำตาลเปลี่ยนเป็นเซลล์จุลินทรีย์ ได้โปรตีน 46.2 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีกรดอะมิโนครบถ้วน Tannenbaum และ Wang (1975) เลี้ยง *Methylomonas methanolica* โดยใช้มีเธนเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลผลิตมากกว่า 0.5 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมเมธานอล อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดในระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องเท่ากับ 0.52 ต่อชั่วโมง มีโปรตีน 81 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีกรดอะมิโนครบถ้วน

1.5.4 ยีสต์ Bhattacharjee (1970) รายงานว่ายีสต์มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดในบรรดาจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีน และใช้กันแพร่หลายมาตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 2

เนื่องจากขาดแคลนอาหารโปรตีน ยีสต์ที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายคือ *Candida utilis* *Rhodotorola gracilis* *Saccharomyces cerevisiae* *S. carlsbergensis* *C. tropicalis* และ *Trichosporon pullulans* โดยทั่วไปเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยโปรตีน 45-50 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง คาร์โบไฮเดรต 22-23 เปอร์เซนต์ ส่วนไขมันในเซลล์ยีสต์โดยทั่วไปมีประมาณ 2-3 เปอร์เซนต์ มีเกลือแร่ประมาณ 6-8 เปอร์เซนต์ ส่วนมากเป็นโปแตสเซียมและฟอสฟอรัส พบแคลเซียม แมกนีเซียม ซิลิคอน เหล็กและตะกั่วบ้างเล็กน้อย (Boze และคณะ, 1992) คุณค่าทางอาหารของยีสต์ยังขึ้นกับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนหลายชนิด และพบว่ากรดอะมิโนในยีสต์แต่ละชนิดแตกต่างกัน (ตารางที่ 1.7) นอกจากนั้นเซลล์ยีสต์ยังประกอบด้วยวิตามินบีชนิดต่างๆ เช่น ไธอะมีน ไรโบเฟลวิน กรดนิโคตินิก กรดแพนโตเธนิก ไพริดอกซิน และไบโอติน ดังตารางที่ 1.8 (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.7 กรดอะมิโนภายในเซลล์ของยีสต์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตโปรตีน เปรียบเทียบกับมาตรฐานของ FAO และแหล่งโปรตีนอื่นๆ

(Litchfield, 1979 ; Boze และคณะ, 1992)

แหล่งโปรตีน	วัตถุดิบ	กรดอะมิโน (กรัมต่อ 16 กรัมไนโตรเจน)																	
		Ala	Arg	Asp	Cys	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Try	Tyr	Val
FAO reference	-	-	-	-	2.0	-	-	-	4.2	4.8	4.2	2.2	2.8	-	-	2.8	1.0	-	4.2
ถั่วเหลือง	-	-	-	-	0.7	-	-	-	2.2	3.5	2.8	0.6	2.2	-	-	1.9	0.6	-	2.3
ปลา	-	-	-	-	0.7	-	-	-	3.2	5.0	4.9	1.9	2.9	-	-	3.0	0.9	-	3.7
ไข่	-	-	-	-	2.4	-	-	-	6.7	8.9	6.5	5.1	5.8	-	-	5.1	1.6	-	7.3
Candida lipolytica	อัลเคน	7.4	4.8	10.2	1.1	11.3	4.8	2.0	4.5	7.0	7.0	1.8	4.4	4.4	4.8	4.9	1.4	3.5	5.4
Candida lipolytica	น้ำมันก๊าซ	5.8	5.0	10.0	0.9	12.1	4.5	2.1	5.3	7.8	1.6	4.8	3.7	5.1	5.4	1.3	4.0	5.8	-
Candida utilis	เอธานอล	5.5	5.4	8.8	0.4	14.6	4.5	2.1	4.5	7.1	6.6	1.4	4.1	3.4	4.7	5.5	1.2	3.3	5.7
Candida utilis	น้ำทิ้งโรงงานทำกระดาษ	5.8	5.4	9.2	-	15.6	3.6	1.2	3.8	7.6	4.8	1.1	8.6	6.0	5.0	5.4	2.4	6.2	3.8
Hansenula polymorpha	เมธานอล	6.1	5.6	10.5	0.7	14.4	5.2	2.4	5.1	8.3	8.1	1.5	5.0	-	-	5.2	-	4.8	6.2
Kluyveromyces fragilis	หางนม	-	-	-	-	-	-	2.1	4.0	6.1	6.9	1.9	2.8	-	-	5.8	1.4	2.4	5.4
Rhodotorula glutinis	น้ำทิ้งชุมชน	5.1	4.5	6.0	-	9.3	3.5	2.2	3.3	5.4	7.1	-	3.2	3.0	3.3	3.1	-	3.1	3.6
Saccharomyces cerevisiae	กากน้ำตาล	-	5.0	-	1.6	-	-	4.0	5.5	7.9	8.2	2.5	4.5	-	-	4.8	1.2	5.0	5.5

ตารางที่ 1.8 ปริมาณวิตามินภายในเซลล์ของยีสต์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตโปรตีน (Shacklady และ Gatumel, 1972 ; Reed และ Nagodawithana, 1995)

ชนิดยีสต์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	วิตามิน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)							
		ไธอะมีน	ไรโบเฟลวิน	กรดนิโคตินิก	กรดแพนโตเธนิก	ไพริดอกซิน	กรดโฟลิก	ไบโอติน	กรดเบนโซอิก
Saccharomyces cerevisiae	-	20-40	60-85	200-700	180-330	-	-	0.6-1.8	-
Saccharomyces cerevisiae	-	80-150	50-65	180-400	130-160	-	-	0.5-1.5	-
Saccharomyces cerevisiae	-	104-250	25-80	300-627	72-86	23-40	19.0-30.0	1.1	15-40
Candida arborea	กากน้ำตาล	32-33	52-70	492-580	-	-	14.8-16.0	-	-
Candida arborea	-	13-33	46-70	301-580	-	-	12.0-26.0	0.24-3.2	11-21
Hansenula sp.	-	9	54	590	180	-	1.7	1.7	16
Mycotorula sp.	น้ำตาลจากไม้	5	59	600	-	-	3.1	1.8	31
Oidium lactis	น้ำตาลจากไม้	12-29	40-55	186-248	-	-	6.0-15.0	1.30-2.1	-
Oidium lactis	-	20-29	40-55	193-248	-	-	5.6-7.8	-	-
Saccharomyces cerevisiae	กากน้ำตาล	28-41	39-62	277-568	-	-	19.0-36.0	0.45-3.6	11-62
Candida lipolytica	อัลเคน	4	180	430	125	25	6.4	-	40
Candida utilis	น้ำทิ้งโรงงานทำกระดาษ	5	43	417	39	33	21.5	2.3	-
Candida utilis	กากน้ำตาล	35-38	54-62	511-600	-	-	10.6-15.2	-	-
Candida utilis	กากน้ำตาล	22	54	440-490	-	-	-	-	-

1.6 วัตถุดิบในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ ควรเป็นแหล่งอาหารและพลังงานที่เหมาะสมต่อการเติบโตของยีสต์ โดยพบว่าวัตถุดิบที่ได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมมีปริมาณมาก ก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานที่สำคัญ เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ส่วนใหญ่มีส่วนประกอบของสารอินทรีย์สูง เป็นที่ยอมรับของนักเทคโนโลยีชีวภาพว่า การแปรรูปสารอินทรีย์และอื่นๆ ในวัสดุเหลือใช้เป็นสารที่มีประโยชน์และมีราคาโดยใช้จุลินทรีย์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแปรรูปเป็นเซลล์จุลินทรีย์ที่มีโปรตีนและคุณค่าทางอาหารอื่นๆ สูง ซึ่งเหมาะสำหรับเป็นอาหารสัตว์หรืออาหารเสริมให้สัตว์ (Goldberg, 1985) สำหรับวัสดุเหลือใช้ทางธรรมชาติมีหลายประเภทที่นำมาใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ ส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบประเภทคาร์โบไฮเดรตสามารถแยกออกเป็นแซคคาไรด์ (saccharide) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ควรมีสารอาหารที่เหมาะสำหรับการเติบโตของยีสต์ โดยอยู่ในสภาพที่ง่ายต่อการนำไปใช้ พบว่าวัตถุดิบเหลือใช้ประเภทโพลีแซคคาไรด์ ต้องผ่านกระบวนการปรับปรุง (pre-treatment) ก่อนนำไปใช้ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง (Hedenskog, 1973) Gaden (1974) แบ่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ ออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ ไฮโดรคาร์บอน และคาร์โบไฮเดรต

1.6.1 ไฮโดรคาร์บอน มีทั้งที่อยู่ในสภาพเป็นของเหลว เช่น เมธานอล เอธานอล และพาราฟิน ส่วนไฮโดรคาร์บอนในสภาพแก๊ซ เช่น มีเธน บิวเธน โพรเพน และอีเธน เป็นต้น จุดเริ่มต้นที่สนใจใช้สารประกอบนี้เป็นวัตถุดิบเริ่มโดยบริษัท British Petroleum (BP) บริษัท Kanegafushi Chemical Industry และบริษัท Dainippon Ink Chemical ต่างสนใจใช้สารประกอบอัลเคนของปิโตรเลียมเป็นวัตถุดิบ เพราะมีปริมาณมาก ราคาถูก และมีความบริสุทธิ์สูง แต่ในช่วงนั้นอยู่ในวิกฤตการณ์น้ำมัน ทำให้ความสนใจในการนำสารพวกนี้มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตมวลชีวภาพเปลี่ยนไป (ดวงพร คันธโชติ, 2530) สำหรับชนิดยีสต์ที่นำมาใช้ในการผลิตมวลชีวภาพโดยใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งอาหาร ได้แก่ *C. utilis C. tropicalis* และ *C. lipolytica* (Peppler, 1970) ขณะที่ Gharsallah (1993) ได้ศึกษาถึงความเป็นพิษของมวลชีวภาพของยีสต์เมื่อใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งอาหาร พบว่าองค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์มีสารพวกโลหะหนัก รวมทั้งสารประกอบโพลีไซคลิก (polycyclic) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง

1.6.2 คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส รวมทั้งของเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรม พบว่านิยมนำกากน้ำตาลและน้ำทิ้งจากโรงงานทำกระดาษ (spent sulfite waste liquor) มาใช้เป็นอาหารสำหรับการเลี้ยงยีสต์ (Snyder, 1970) สำหรับกากน้ำตาลเป็นของเหลือจากโรงงานน้ำตาล เป็นส่วนไม่ตกผลึกของน้ำอ้อยเมื่อนำไปเคี่ยวทำน้ำตาล ในกากน้ำตาลมีน้ำตาลต่างๆ มากมาย เช่น กลูโคส ฟรักโตสและซูโครส กากน้ำตาลที่นิยมใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์มี 2 ประเภทคือ กากน้ำตาลจากอ้อย และกากน้ำตาลจากหัวบีท (Suomalainen และคณะ, 1971) นิยมนำมาเป็นแหล่งอาหารในการเลี้ยงยีสต์ *C. utilis* สำหรับการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของยีสต์ และ *S. cerevisiae* สำหรับใช้เป็นแหล่งอาหารในการผลิตเอธานอลและยีสต์อบขนม (baker's yeast) ส่วนน้ำทิ้งจากโรงงานทำกระดาษมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 15-22 เปอร์เซนต์ ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลเฮกโซส นิยมนำมาใช้เลี้ยงยีสต์ *C. utilis* โดยเฉพาะในยุโรปนิยมเลี้ยงยีสต์ *C. tropicalis* (Peppler, 1968 ; Reed และ Peppler, 1973)

ปัจจุบันได้มีความพยายามศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้ง ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมจำนวนมากมาใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ เนื่องจากในน้ำทิ้งมีสารอินทรีย์และองค์ประกอบที่สามารถนำไปใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ น้ำทิ้งเหล่านี้มีปริมาณมากและเป็นแหล่งวัตถุดิบขนาดใหญ่ หากปล่อยทิ้งในสิ่งแวดล้อมจะก่อให้เกิดปัญหามลภาวะได้ เนื่องจากมีค่าบีโอดีและซีโอดีสูง ดังนั้นควรนำสารอาหารที่เหลือจากน้ำทิ้งมาก่อให้เกิดประโยชน์โดยนำมาใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ เช่น

Anon (1976) ศึกษาการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ จากน้ำทิ้งที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบโดยอาศัยการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพา (symbiosis) ของ *C. utilis* และ *Endomycopsis fibuligera* การผลิตมวลชีวภาพของยีสต์จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์อะไมเลสจาก *C. utilis* เพื่อย่อยสลายแป้งไปเป็นกลูโคส สำหรับน้ำทิ้งที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ มีคาร์โบไฮเดรตประมาณ 1.5 เปอร์เซนต์ ส่วนใหญ่เป็นน้ำทิ้งจากโรงงานที่เกี่ยวกับการแปรรูปมันฝรั่งและธัญญพืช โรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังและเม็ดสาคู พบว่าให้ผลผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในปริมาณสูง และสามารถลดค่าบีโอดีลงได้ระดับหนึ่ง

Forage (1978) ศึกษาการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตลูกกวาด โดยหาความเหมาะสมของภาวะการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *C. utilis* เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ พบว่า *C. utilis* เติบโตได้ในน้ำทิ้ง สามารถผลิตยีสต์ที่มีคุณค่าทางอาหารและแสดงให้เห็นว่าน้ำทิ้งโรงงานผลิตลูกกวาดมีสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตอยู่ในระดับสูง มีค่าบีโอดีมากกว่า 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายีสต์ที่ได้มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 48.35 เปอร์เซนต์ และมีวิตามินซึ่ง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์แทนถั่วเหลือง จึงใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญสำหรับสัตว์เลี้ยงได้

Chareonsak และคณะ (1980) ผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของยีสต์ *C. utilis* จากน้ำทิ้งโรงงานสับปะรดกระป๋อง ศึกษาลักษณะทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำทิ้ง พบว่าเป็นแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของยีสต์ น้ำทิ้งชนิดนี้มีปริมาณน้ำตาลสูง ซึ่งน้ำตาลส่วนใหญ่ได้แก่ กลูโคส ฟรักโตส และซูโครส ทำให้มีค่าซีโอดีสูง แต่มีปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในตัวอย่างน้ำทิ้งน้อยมาก (น้อยกว่า 0.005 เปอร์เซนต์) *C. utilis* สามารถเติบโตได้ดีในน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง ภายใต้อัตราการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5-5.5 และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตมวลชีวภาพเท่ากับ 11.5 กรัมต่อลิตร และลดค่าซีโอดีได้ 91 เปอร์เซนต์ นอกจากนั้นยังพบว่าเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยโปรตีนรวม (Kjeldahl protein) 61 เปอร์เซนต์ โปรตีนจริง (Lowry protein) 46 เปอร์เซนต์ และกรดนิวคลีอิกทั้งหมด 11 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* ได้ผลผลิตมวลชีวภาพต่ำกว่า (3 กรัมต่อลิตร) แสดงว่าน้ำทิ้งโรงงานสับปะรดกระป๋องเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนจากมวลชีวภาพของยีสต์ *C. utilis*

Gharsallah (1993) ศึกษาการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์จากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันมะกอก น้ำทิ้งชนิดนี้มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 16.8 กรัมต่อลิตร และสารอินทรีย์อื่นๆ 10 กรัมต่อลิตร โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei S. chevalierie* และ *S. rouxii* เลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 vvm ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า *S. rouxii* ให้ผลผลิตมวลชีวภาพ 0.45 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ มีโปรตีนภายในเซลล์ 3.35 กรัมต่อลิตร และสามารถลดค่าบีโอดีในน้ำทิ้งได้ 40-50 เปอร์เซนต์

1.7 น้ำทิ้งที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ

น้ำทิ้งที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะเช่นเดียวกับน้ำทิ้งจากแหล่งอื่นๆ ไขมันในน้ำทิ้งก่อให้เกิดปัญหาอย่างมากในโรงงานที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปอาหารและอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์จากพืชและสัตว์ เช่น โรงงานฆ่าสัตว์ โรงงานนมและเนย โรงงานอาหารแช่แข็ง โรงงานอาหารกระป๋อง และโรงงานน้ำมันพืช เป็นต้น ไขมันที่เกิดจากกระบวนการผลิตถูกรวมมายังบ่อรวมน้ำทิ้ง ขณะเดียวกันไขมันส่วนหนึ่งที่ตกค้างจะเกิดการสะสมตามท่อส่ง

น้ำทิ้ง ทำให้ท่อส่งน้ำทิ้งอุดตัน และเป็นปัญหาในกระบวนการบำบัดน้ำทิ้งแบบไม่ใช้อากาศโดยจุลินทรีย์ ปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จำเป็นต้องสร้างบ่อดักไขมันขึ้น เพื่อใช้ดักไขมันจากบ่อรวมน้ำทิ้งก่อนเข้าสู่การบำบัดน้ำทิ้งในระบบ activated sludge บ่อดักไขมันมีระบบแยกไขมันออกจากน้ำทิ้งโดยใช้ระบบน้ำหมุนเวียน ไขมันจึงลอยมาสะสมเป็นแผ่นไขมันบนผิวน้ำและถูกนำไปทิ้ง อย่างไรก็ดีด้วยวิธีการดังกล่าวยังมีประสิทธิภาพต่ำในการแยกไขมันที่แพร่กระจายอยู่ในน้ำทิ้ง ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึงวิธีการทางชีวภาพมาใช้ในการกำจัดไขมันที่แพร่กระจายในน้ำทิ้ง นอกจากนั้นการนำน้ำทิ้งที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์เป็นแนวทางหนึ่งในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีไขมันแพร่กระจายอยู่เป็นปริมาณมาก และเป็นประโยชน์ในการแปรรูปไขมันรวมทั้งสารอินทรีย์อื่นๆในน้ำทิ้ง ให้เป็นสารที่มีประโยชน์โดยใช้จุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแปรรูปเป็นเซลล์จุลินทรีย์ที่มีคุณค่าทางอาหารสูง สามารถใช้เป็นอาหารสัตว์หรืออาหารเสริมให้สัตว์ได้

การผลิตมวลชีวภาพของยีสต์จากน้ำทิ้งที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ จำเป็นต้องอาศัยภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม รวมทั้งลักษณะทางสรีรวิทยาของยีสต์ ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส และลักษณะทางเคมีฟิสิกส์ของระบบการหมัก ไขมันที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อควรอยู่ในรูปของเหลว ทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้ในการเติบโตของยีสต์ ไขมันต้องแพร่กระจายได้ดีในส่วนของเหลว (aqueous phase) ทำให้ยีสต์สัมผัสกับไขมันได้ทั่วถึง หากอยู่ในรูปของแข็งจะยากต่อการย่อยสลายและกำจัด ดังนั้นไขมันที่อยู่ในรูปของแข็งไม่เป็นที่นิยมในการนำมาใช้ผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ (Koh และคณะ, 1983) Hottinger และคณะ (1974) รายงานว่าการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าที่อัตราการเขย่าสูงๆ ทำให้ไขมันแพร่กระจายในน้ำทิ้งได้ดี โดยใช้น้ำทิ้งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับปริมาตรของขวดเขย่าและความเข้มข้นของไขมันที่เหมาะสม การเลี้ยงเชื้ออาจต้องมีการเติมสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ สารลดแรงตึงผิวที่ดีต้องไม่มีผลในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์ยีสต์ และคงสภาพโดยไม่เปลี่ยนเป็นสารอื่นขณะทำการเลี้ยงเชื้อ นอกจากนั้น Tan และ Gill (1985) ศึกษาการเติบโตของ *Saccharomycopsis lipolytica* ที่เลี้ยงแบบ batch ในถังหมักขนาด 3 ลิตร โดยใช้ไขมันสัตว์เป็นแหล่งอาหาร ศึกษาอัตราการกวนและความเข้มข้นของกรดไขมันที่มีผลต่อการเติบโต พบว่าการเพิ่มอัตราการกวนทำให้ไขมันย่อยสลายเร็วขึ้น ที่อัตราการกวน 1,200 รอบต่อนาที ยีสต์มีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.32 ต่อชั่วโมง โดยมีปริมาณไขมันในน้ำทิ้ง 8 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 1,400 รอบต่อนาที หรือเพิ่มความเข้มข้นของไขมันเป็น 20 กรัมต่อลิตร ก็ไม่ทำให้อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณของไขมันและโปรตีน ที่เป็นองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารซึ่งมีปริมาณมาก สามารถนำมาใช้เลี้ยงเซลล์ยีสต์ เซลล์ยีสต์ที่ได้มีปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ ปัจจุบันได้มีความสนใจในการนำไขมันมาใช้สำหรับผลิตมวลชีวภาพของยีสต์มากขึ้น Grant (1980) รายงานว่าน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าสัตว์ และโรงงานแปรรูปปลา มีปริมาณโปรตีนและไขมันสูงมาก ยากต่อการกำจัด และมีค่าบีโอดีสูงกว่าน้ำทิ้งจากบ้านเรือน ซึ่งทำให้เกิดมลภาวะและเป็นปัญหาในการกำจัด น้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าสัตว์ยังมีคอลลาเจน (collagen) เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ซึ่งมีปริมาณของกรดอะมิโนไม่สมดุล กล่าวคือ มีเมไธโอนีนต่ำ และไม่มีทริปโตเฟน ได้มีผู้ทดลองใช้คอลลาเจนเพื่อผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในห้องปฏิบัติการ ส่วนการผลิตเพื่อการค้ายังไม่เป็นที่นิยม Tan และ Gill (1985) รายงานว่าไขมันสัตว์ประกอบด้วยปาล์มิติก สเตียริกและโอลิอิก ซึ่งปัญหาของการนำไขมันสัตว์มาใช้คือการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ แต่ยีสต์บางชนิดสามารถใช้กรดไขมัน ได้แก่ ปาล์มิติกหรือโอลิอิกเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีแหล่งคาร์บอนอื่นได้ โดยพบว่ามีการเติบโตใกล้เคียงกัน ที่ความเข้มข้นของปาล์มิติกสูง (8 กรัมต่อลิตร) ได้ปริมาณเซลล์ต่ำ คือน้อยกว่า 0.5 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร แต่ยีสต์ไม่สามารถเติบโตในอาหารที่มีกรดไขมันสเตียริกเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว Davis และ Reilly (1980) รายงานว่าน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์มมีค่าบีโอดีสูง อันเนื่องมาจากปริมาณไขมันในน้ำทิ้ง การย่อยสลายไขมันทำได้โดยการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ Couillard และคณะ (1989) รายงานว่าจุลินทรีย์ที่สามารถดำรงชีพแบบใช้ออกซิเจนสามารถลดจำนวนไขมัน ค่าบีโอดี และซีโอดีของน้ำทิ้งได้ถึง 90 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ดี การเติมเอนไซม์ไลเปส ยังเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันในน้ำทิ้ง Higgins และ Swartzbaugh (1985) รายงานว่าการเติมเอนไซม์ไลเปสและเซลลูเลสร่วมกับกากตะกอนจากการบำบัดน้ำทิ้งจะช่วยในการย่อยสลายเซลลูโลสและไขมันในน้ำทิ้ง พบว่าสามารถลดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่อยู่ในน้ำทิ้งได้ 64 เปอร์เซนต์

สำหรับการเลี้ยงเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถใช้กรดไขมันเป็นแหล่งอาหาร เช่น *Yarrowia lipolytica* และ *C. tropicalis* สามารถเติบโตได้ดีโดยใช้กรดไขมันเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากมีระบบเพอร์ออกซิโซมอล เบต้าออกซิเดชัน (Peroxisomal β-oxidation) ซึ่งถูกชักนำโดยกรดไขมันหรือสารประกอบพวกอัลเคน (Kunau และคณะ, 1988 ; Tanaka และคณะ, 1989) ส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* เติบโตได้ช้า เมื่อใช้กรดไขมันเป็นแหล่งอาหารและพลังงานเพียงอย่างเดียว การเลี้ยง *Y. lipolytica* ที่ภาวะเหมาะสมโดยใช้ไขมันเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่จำเป็นต้องเลี้ยงกล้าเชื้อเพื่อชักนำกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เมื่อเริ่มการเลี้ยงยีสต์ชนิดนี้สามารถนำกรดไขมันไปใช้ในการเติบโตได้ทันที หากอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ *Y. lipolytica* จะ

ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นอาหารในการเติบโตก่อน เมื่อน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในระดับต่ำหรือหมดลง *Y. lipolytica* จะนำไขมันไปใช้ในการเติบโตต่อไปโดยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ดังนั้นในระยะแรกของการเลี้ยงเชื้อ เอนไซม์ไลเปสจึงไม่ถูกชักนำโดยกรดไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถูกยับยั้งโดยน้ำตาลกลูโคส (Dell' Angelica และคณะ, 1992)

Tan และ Gill (1985) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Y. lipolytica* โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งอาหารภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ถูกย่อยสลายเป็นไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) และกลีเซอรอล ตามลำดับ ขณะที่กรดไขมันอิสระถูกสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อและถูกใช้เป็นแหล่งอาหารต่อไป เช่นเดียวกับการย่อยสลายไขมันสัตว์ นอกจากนั้นกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอล สามารถนำไปใช้ได้ง่าย แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสไม่เป็นปัจจัยจำกัดการเติบโตของ *Y. lipolytica*

ในการเลี้ยง *Y. lipolytica* โดยใช้น้ำทิ้งที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ นอกจากแหล่งคาร์บอนและพลังงานแล้ว ยีสต์ยังต้องการแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและธาตุอาหารอื่นๆ ที่เหมาะสม ยีสต์สามารถเติบโตได้ดีโดยใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นต้น ส่วนฟอสฟอรัสทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เช่น ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต และไดโซเดียมฟอสเฟต ยีสต์สามารถนำโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไปใช้ได้ดีกว่าไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต สารประกอบประเภทเกลือ เช่น โพแทสเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมซัลเฟต มักเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิตามินบี เช่น ไบโอติน อินโนซิทอล และกรดแพนโตเธนิก นอกจากนั้นยังอาจใช้วัตถุดิบเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งมีราคาถูก เช่น กากน้ำตาล เป็นแหล่งอาหารเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับสารอินทรีย์ที่นิยมเติมเป็นแหล่งไนโตรเจน เช่น สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากปลา และ corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนที่หาง่าย สามารถนำมาใช้ในการเติบโตของ *Y. lipolytica* โดยไม่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส (Li และคณะ, 1970 ; Hottinger และคณะ, 1974 ; Koh และคณะ, 1983) Sikuta (1983) รายงานว่าสารสกัดจากยีสต์สามารถใช้เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี เนื่องจากอุดมด้วยกรดอะมิโน วิตามิน และแหล่งธาตุหลายชนิด การศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบของสารสกัดจากยีสต์ พบว่าประกอบด้วยวิตามินชนิดต่างๆ ที่สำคัญ 8 ชนิด ได้แก่ ไธอะมีน ไรโบเฟลวิน กรดนิโคตินิก กรดแพนโตเธนิก ไพริดอกซิน ไบโอติน อินโนซิทอล และโคลีน ซึ่งส่งเสริมการเติบโตของเซลล์ยีสต์ Abou-Zeid และคณะ (1983) รายงานว่าในสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ *C. lipolytica* ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็น 7 ชนิด ได้แก่ วาลีน ลูซีน ธรีโอนีน เมไธโอนีน เฟนิลอะลานีน ไลซีน และอาร์จีนีน

Rydin และคณะ (1990) ศึกษาการเลี้ยงยีสต์ *C. tropicalis* ในไขมันจากน้ำทิ้งเพื่อเป็นการกำจัดไขมัน และการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์สำหรับใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดของ *C. tropicalis* ที่เติบโตในน้ำทิ้งเท่ากับ 0.35 ต่อชั่วโมง พบว่าภายใน 24 ชั่วโมง ปริมาณไขมันในน้ำทิ้งลดลงจาก 8 กรัมต่อลิตร เหลือประมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.36 ต่อชั่วโมง พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3.2-4.0 อุณหภูมิ 30-38 องศาเซลเซียส และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 10 เปอร์เซนต์ เป็นภาวะที่เหมาะสำหรับการเติบโตของ *C. tropicalis* ได้ผลผลิตมวลชีวภาพเท่ากับ 0.7 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมไขมัน และลดค่าซีโอดีในน้ำทิ้งได้ 86 เปอร์เซนต์

1.8 กระบวนการหมักแบบ Batch

กระบวนการหมักแบบ batch เป็นกระบวนการหมักที่ทำโดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด การเลี้ยงเชื้อนิยมทำในขวดเขย่าหรือในถังหมัก โดยใช้สารอาหารที่เหมาะสมต่อการเติบโต สารอาหารที่ใช้ในระบบมีปริมาณจำกัด เพราะไม่มีการเติมสารอาหาร ภาวะภายในระบบมีการเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้จนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก เมื่อใส่จุลินทรีย์ลงในอาหาร ระยะแรกเซลล์ยังไม่มีการเพิ่มจำนวน เรียกระยะนี้ว่า ระยะการพักตัว (lag phase) เนื่องจากเป็นระยะที่เชื้อกำลังปรับตัว ระยะเวลาในช่วงระยะการพักตัวนี้ในกระบวนการหมักระดับอุตสาหกรรมต้องทำให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม หลังจากนั้นจุลินทรีย์จึงมีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้นตามลำดับ จนกระทั่งเข้าสู่ระยะการเติบโตแบบทวีคูณ (log หรือ exponential phase) ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการเติบโตสูงสุดและคงที่ เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นในน้ำหมัก เช่น การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของสารอาหาร และปริมาณสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นจะมีผลทำให้อัตราการเติบโตของจุลินทรีย์หยุดชะงักลง นั่นคือเข้าสู่ระยะการเติบโตแบบคงที่ (stationary phase) และระยะการเติบโตแบบลดลง (decline phase) ซึ่งมีอัตราการตายของจุลินทรีย์มีค่าสูงกว่าอัตราการเติบโต เรียกช่วงระยะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ว่า วัฏจักรการเติบโต (growth cycle) (Aiba, 1973 ; Stanbury และ Whitaker, 1984 ; Scragg, 1991)

การเติบโตของจุลินทรีย์ในระยะ log phase สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

เซลล์ที่สะสม = เซลล์เจริญ - เซลล์ออก - เซลล์ตาย

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

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

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

เมื่อ X_o = ความเข้มข้นของมวลชีวภาพเริ่มต้น

X_t = ความเข้มข้นของมวลชีวภาพหลังการเพาะเชื้อเป็นเวลา t ชั่วโมง

e = ฐานของ natural logarithm

เมื่อใส่ natural logarithm ในสมการ (3) จะได้

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

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

1.9 กระบวนการหมักแบบ Fed batch

กระบวนการหมักแบบ fed batch เป็นกระบวนการหมักแบบเติมสารอาหารที่จำเป็น อย่างต่อเนื่องแล้วหยุด หรือใส่เป็นครั้งคราว และไม่มีการดึงเอาสารผลิตภัณฑ์ออกจากระบบจนกว่าสิ้นสุดการหมัก (Yoshida และคณะ, 1973)

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความเข้มข้นของเซลล์

สำหรับเซลล์ :

เซลล์ที่สะสม = เซลล์ที่เจริญ

ที่ dt ใดๆ :

$$VdX = \mu VX \quad (5)$$

หารด้วย Vdt ตลอด :

$$dX/dt = (\mu - F/V)\ X \quad (6)$$

$$dX/dt = (\mu - D)\,X \qquad (7)$$

เมื่อ F = อัตราการไหลของสารอาหารที่ป้อนเข้ามา (ลิตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตรของน้ำหมักในเครื่องปฏิกรณ์ (ลิตร)

X = ความเข้มข้นของเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ (กรัมต่อลิตร)

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

ณ จุดที่ อัตราการเจือจาง (D) น้อยกว่า μ_{max} สารอาหารที่เติมลงไปถูกใช้จนสมบูรณ์ ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพคงที่ ($dX/dt = 0$) ทำให้ $\mu = D$ แต่เมื่อเวลาผ่านไป ปริมาตรของน้ำหมักจะเพิ่มขึ้น เพราะไม่มีการดึงน้ำหมักออกจากระบบ ทำให้ค่าอัตราการเจือจางลดลง เนื่องจาก $D = F/V$ และเมื่อเวลาผ่านไป $V' = V + Ft$ (Pirt, 1975)

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความเข้มข้นของสารอาหาร

สำหรับสารอาหาร :

สารอาหารที่สะสม = สารอาหารที่เติม - สารอาหารที่ถูกใช้ไป

ที่ dt ใดๆ :

$$VdS = F.S_R - V\mu X/Y_{x/s}\,dt \qquad (8)$$

หารด้วย Vdt ตลอด :

$$dS/dt = F.S_R - \mu X/Y_{x/s} \qquad (9)$$

เมื่อ S = ความเข้มข้นสารอาหารเริ่มต้นในถังหมัก (กรัมต่อลิตร)

S_R = ความเข้มข้นสารอาหารที่เติมลงไป (กรัมต่อลิตร)

$Y_{X/S}$ = สัมประสิทธิ์ผลผลิตมวลชีวภาพเมื่อเทียบกับสารอาหารที่ใช้ (Biomass yield coefficient) (กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมสารอาหารที่ใช้)

เมื่อสารอาหารที่ใช้เติมหมด ($dS/dt = 0$) จะได้

$$F.S_R = \mu X/Y_{x/s} \qquad (10)$$

เรียกภาวะนี้ว่า Quasi-steady state (Whitaker, 1980)

1.10 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous culture)

กระบวนการหมักแบบ batch จุลินทรีย์ที่ใช้มีการเติบโตผ่านช่วงระยะการพักตัวไปสู่ระยะการเติบโตแบบทวีคูณ จนกระทั่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในน้ำหมัก เช่น การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของสารอาหาร และปริมาณสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น

จะมีผลทำให้อัตราการเติบโตของจุลินทรีย์หยุดชะงักลง นั่นคือเข้าสู่ระยะการเติบโตแบบคงที่และระยะการเติบโตแบบลดลง ในช่วงระยะเวลาต่างๆ กัน จุลินทรีย์จะมีอัตราการเติบโต การใช้สารอาหาร การผลิตผลิตภัณฑ์ ตลอดจนอัตราความต้องการออกซิเจนที่แตกต่างกันไป แต่ในระบบการหมักแบบต่อเนื่อง หลังจากที่จุลินทรีย์เติบโตขึ้นถึงระดับหนึ่ง ซึ่งปกติเป็นจุดที่อัตราการเติบโตและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์สูงที่สุด ดังนั้นสามารถจัดให้ปัจจัยสำคัญบางอย่างในน้ำหมัก เช่น ความเข้มข้นของเซลล์ และความเข้มข้นของสารอาหารหลักอยู่ในระดับคงที่ที่เหมาะสม ทั้งนี้สามารถทำได้โดยการป้อนสารอาหารเข้าสู่ถังหมัก พร้อมกับการปล่อยน้ำหมักออกจากถังหมักในอัตราเดียวกัน โดยมีการกวนน้ำหมักอย่างเหมาะสมและอัตราการไหลผ่านของน้ำหมัก ต้องพอเหมาะที่ทำให้อัตราการเพิ่มของเซลล์เนื่องจากการเติบโตของจุลินทรีย์เท่ากับอัตราการไหลออกของเซลล์ อัตราการเติมสารอาหารเข้าสู่ถังหมักเท่ากับอัตราการใช้สารอาหารโดยจุลินทรีย์ในน้ำหมัก และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับอัตราการไหลออกของผลิตภัณฑ์ในน้ำหมัก ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ภายใต้ภาวะแวดล้อมหนึ่งกำหนดให้อัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) คงที่ มีค่าต่ำกว่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ในระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง อัตราการเติบโตจำเพาะมีค่าเท่ากับอัตราการเจือจาง ดังนั้นถ้าอัตราการเจือจางมากกว่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด อัตราการเติบโตจึงมีค่าเป็นลบ ในภาวะเช่นนี้ประชากรจุลินทรีย์ในภาชนะเลี้ยงจึงลดลง ถ้าอัตราการเจือจางน้อยกว่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด อัตราการเติบโตจึงมีค่าเป็นบวกและจำนวนประชากรจุลินทรีย์จึงเพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์จะต่อเนื่องกันจนกว่าอัตราการเติบโตถูกจำกัดโดยความเข้มข้นของสารอาหารที่เข้าไปในภาชนะเลี้ยงเชื้อ ณ จุดนี้ อัตราการเจือจางเท่ากับอัตราการเติบโต ปริมาณจุลินทรีย์ในภาชนะเลี้ยงจึงคงที่ ลักษณะการเลี้ยงเชื้อเช่นนี้เป็นหลักพื้นฐานของการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง อย่างไรก็ดีอัตราการเติบโตในภาชนะเลี้ยงจะไม่สูงถึงอัตราสูงสุดแต่สามารถรักษาให้อยู่ในสภาพที่มีค่าใกล้เคียงค่าสูงสุด หาได้โดยค่าความเข้มข้นสมดุลของสารอาหารจำกัด (steady state concentration of the limiting nutrient) ความเข้มข้นของสารอาหารจำกัดนั้นหาจากอัตราการเจือจาง ถ้าอัตราการไหลเข้าของสารอาหารเพิ่มขึ้น อัตราการเติบโตจะเพิ่มขึ้น ถ้าอัตราการไหลเข้าของสารอาหารลดลง อัตราการเติบโตจะลดลงด้วย จากการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลทำให้สามารถหาอัตราการเติบโตกว้างขึ้นคือ สามารถหาอัตราการเติบโตได้ตั้งแต่ศูนย์ถึงครึ่งหนึ่งของอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด นอกจากนี้ยังสามารถหาเวลาที่ใช้ในการแบ่งตัว (generation time) ดังนั้นที่ภาวะสมดุลประชากรจุลินทรีย์ในภาชนะเลี้ยงจึงเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารอาหารจำกัดการเติบโตในอาหารที่ไหลเข้าสู่ภาชนะเลี้ยง (Stanbury และ Whitaker, 1984 ; Scragg, 1991) ตัวอย่างการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ที่มีการศึกษาในระบบการหมักแบบต่อเนื่องดังตารางที่ 1.9

ตารางที่ 1.9 ตัวอย่างชนิดยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Litchfield, 1979)

ชนิดยีสต์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิ (°ซ)	พีเอช (pH)	μ หรือ D (ต่อชั่วโมง)	dry weight (g/l)	yield (g/g)
Candida ethanothermophilum	เอธานอล	40	3.5	D = 0.20	8.0	0.95
Candida lipolytica	อัลเคน	32	5.5	D = 0.16	23.6	0.88
Candida tropicalis	อัลเคน	30	3.0	μ =0.15-0.24	10-30	1.0-1.1
Candida utilis	น้ำทิ้งโรงงานทำกระดาษ	32	5.0	μ = 0.5	-	0.39
	เอธานอล	30	4.6	μ = 0.3	6-7	-
Hansenula polymorpha	เมธานอล	37-42	4.5-5.5	μ = 0.22 D = 0.13	1.2	0.36
Kluyveromyces fragilis	หางนม	32	5.5	μ = 0.66	14.6	0.55
Rhodotorula glutinis	น้ำทิ้งจากชุมชน	28	7.4	μ = 0.16-0.21	0.08	-
Saccharomyces cerevisiae	โมลาสจากอ้อย	30	4.5-5.0	μ = 0.14	70	-

1.10.1 ทฤษฎีของกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

การหมักแบบต่อเนื่อง เป็นระบบที่การเติบโตของจุลินทรีย์อยู่ในระบบเปิดซึ่งจำนวนจุลินทรีย์ถูกรักษาให้อยู่ในภาวะการเติบโตที่สมดุลอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นภาวะที่มีอัตราการเติบโตและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์สูงสุด พร้อมกับจัดปัจจัยสำคัญในน้ำหมัก เช่น จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ ความเข้มข้นของสารอาหารหลักอยู่ในระดับคงที่ที่เหมาะสม ทั้งนี้สามารถทำได้โดยการป้อนสารอาหารเข้าสู่ถังหมักพร้อมกับการปล่อยน้ำหมักออกจากถังหมักในอัตราเดียวกัน โดยมีการกวนน้ำหมักอย่างดี และอัตราการไหลผ่านของน้ำหมักต้องพอเหมาะที่ทำให้อัตราการเพิ่มของเซลล์เนื่องจากการเติบโตของจุลินทรีย์เท่ากับอัตราการไหลออกของเซลล์ ส่วนอัตราการเพิ่มสารอาหารเข้าสู่ถังหมักเท่ากับอัตราการใช้สารอาหารโดยจุลินทรีย์ในน้ำหมัก และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับอัตราการไหลออกของผลิตภัณฑ์ในน้ำหมัก (Aiba, 1965)

ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง แบ่งออกได้ 2 ชนิดคือ (Scragg, 1991)

1) เคโมสแตท (chemostat) เป็นระบบที่ป้อนสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเติบโตในอัตราคงที่ เป็นผลให้ความหนาแน่นและอัตราการเติบโตของจุลินทรีย์มีการปรับตัวตามสารอาหารที่ป้อนเข้ามา

2) เทอร์บิโดสแตท (turbidostat) เป็นระบบควบคุมให้ความหนาแแน่นของเซลล์จุลินทรีย์คงที่ โดยการป้อนน้ำหมักใหม่ตามต้องการ

ระบบการหมักแบบต่อเนื่องทั้งสองระบบ (รูปที่ 1.2) มีการควบคุมอัตราการเติบโตแตกต่างกันแต่มีความซับซ้อนทั้งคู่ และสามารถอธิบายได้โดยใช้สมการจลน์ศาสตร์ที่คล้ายคลึงกัน

1.10.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความเข้มข้นของเซลล์

คุณสมบัติเฉพาะของเคโมสแตท และการเติบโตที่ภาวะคงที่ แสดงโดยใช้สมการซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของสารอาหารกับอัตราการป้อนสารอาหารหรืออัตราการเจือจาง สมการดังกล่าวได้จากสมดุลมวลสารของเซลล์และสารอาหารในเครื่องปฏิกรณ์ ดังนี้ (Scragg, 1991)

สำหรับเซลล์ :

เซลล์สะสม = เซลล์เข้า - เซลล์ออก + เซลล์เจริญ - เซลล์ตาย

ที่ dt ใดๆ :

$$Vdt = FX_o dt - FXdt + V\mu Xdt - V\alpha Xdt \qquad (11)$$

หารด้วย Vdt ตลอด :

$$dX/dt = FX_o/V - FX/V + \mu X - \alpha X \qquad (12)$$

เมื่อ F = อัตราการไหลของสารอาหารที่ป้อนเข้ามา (ลิตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตรของน้ำหมักในเครื่องปฏิกรณ์ (ลิตร)

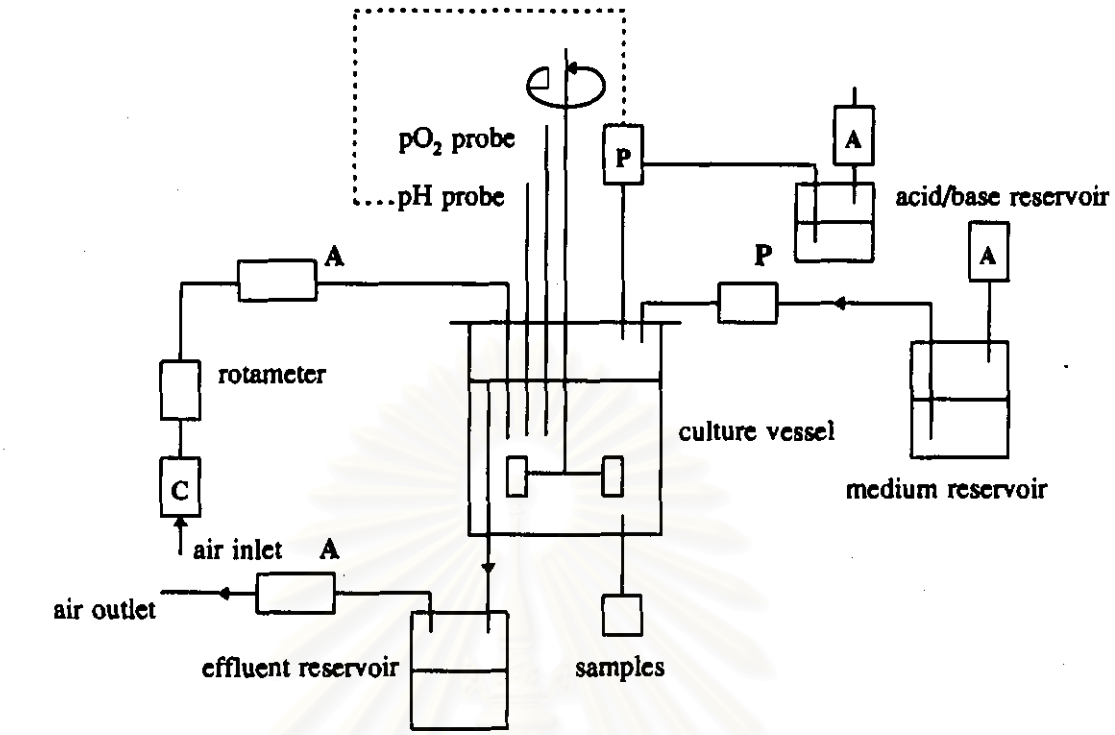
X_o = ความเข้มข้นของเซลล์ในสารอาหารที่ป้อนเข้ามา (กรัมต่อลิตร)

X = ความเข้มข้นของเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ (กรัมต่อลิตร)

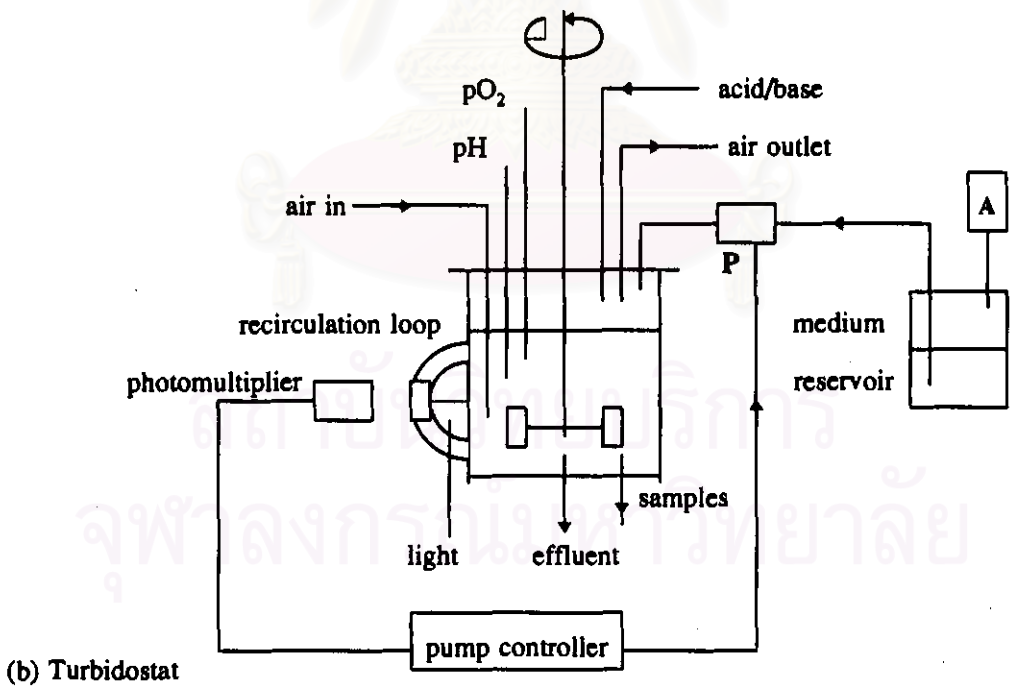
μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

α = อัตราการตายจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

กรณีเคโมสแตทขั้นตอนเดียว สารอาหารที่ป้อนเข้ามามีการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว ดังนั้น $X_o = 0$ และไม่มีการคืนเซลล์กลับมาใช้ ส่วนเซลล์ที่อยู่ในระบบมีอัตราการเติบโตสูง



(a) Chemostat



(b) Turbidostat

รูปที่ 1.2 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (a) Chemostat (b) Turbidostat . A, air filters; P, pumps (Scragg, 1991)

เพราะมีสารอาหารเพียงพอ อัตราการตายของเซลล์ต่ำเมื่อเทียบกับอัตราการเติบโต $\mu >> \alpha$ จึงจัดรูปสมการที่ (12) ได้เป็น

$$dX/dt = \mu X - FX/V \quad (13)$$

ค่า F/V คืออัตราการเจือจาง มีหน่วยต่อชั่วโมง หมายความว่าปริมาตรน้ำหมักที่ไหลผ่านเครื่องปฏิกรณ์ในเวลา 1 ชั่วโมง จากสมการที่ (13) เขียนใหม่ได้ดังนี้

$$dX/dt = \mu X - DX = (\mu - D) X \quad (14)$$

สมการที่ (14) แสดงอัตราการเติบโตมีการเปลี่ยนแปลงตามอัตราการป้อนสารอาหาร ความสัมพันธ์นี้ใช้ได้ในจุดที่ $D < \mu_{max}$ เนื่องจากเมื่อ $D > \mu_{max}$ ภายใต้ภาวะดังกล่าวสารอาหารมีมากเกินพอและเทอม $(\mu - D)$ มีค่าเป็นลบความเข้มข้นของเซลล์จึงลดลงและเกิดการชะล้างออกจากระบบ (wash out) ในทางปฏิบัติอัตราการเจือจางวิกฤต (D_c) มีค่าใกล้เคียงกับ μ_{max}

เมื่อเกิดภาวะสมดุลของการเติบโต ทำให้การไหลออกของเซลล์เท่ากับอัตราการเติบโต ทำให้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของจุลินทรีย์หรือ ค่า $dX/dt = 0$ เมื่อแทนในสมการ (14) จึงได้สมการดังนี้

$$(\mu - D) X = 0 \quad (15)$$

$$\mu = D \quad (16)$$

จะได้ว่า ที่ภาวะความเข้มข้นของเซลล์คงที่ ค่าอัตราการป้อนสารอาหารเท่ากับค่าอัตราการเติบโตของเซลล์

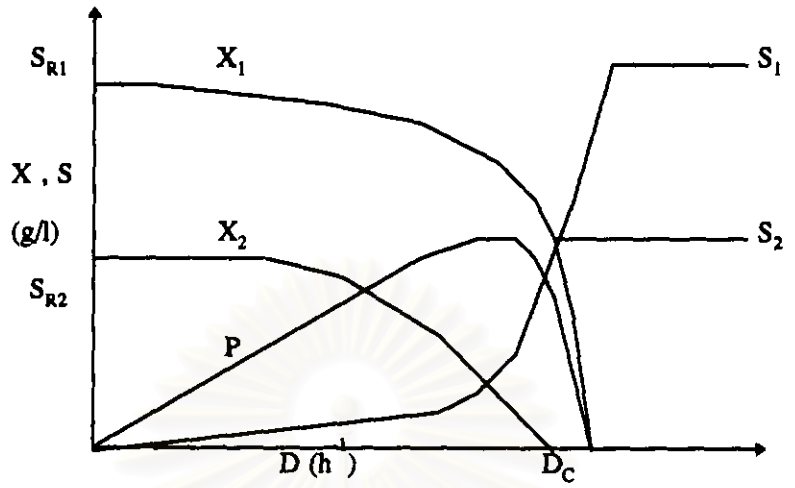
เมื่อให้ค่าอัตราการเจือจางเข้าใกล้อัตราการเจือจางวิกฤต ระบบหมักแบบเคโมสแตทมีความเสถียรลดลง เนื่องจากถ้ามีการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นของเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์อย่างมาก ทำให้เกิดภาวะไม่คงที่จึงเกิดการชะล้างเซลล์ออกนอกระบบอย่างรวดเร็ว ดังนั้นข้อเสียสำคัญของระบบเคโมสแตทคือ ใช้งานได้ดีที่อัตราการเจือจางต่ำ ทำให้การเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นของเซลล์และสับสเตรทมีเพียงเล็กน้อย การเปลี่ยนแปลงค่าอัตราการไหลจึงมีผลเสียเล็กน้อยต่อภาวะคงที่ (รูปที่ 1.3)

1.10.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความเข้มข้นของสารอาหาร

ความสัมพันธ์ดังกล่าวได้จากการทำสมดุลมวลสารรอบระบบเคโมสแตท โดยพิจารณาจากสารอาหาร (The balance for growth-limiting substrate)

สารอาหารที่สะสม = สารอาหารเข้า - สารอาหารออก - สารอาหารที่ถูกใช้ไป - สารอาหารที่ใช้ในการเก็บรักษา - สารที่เกิดขึ้น

ที่ dt ใดๆ :



รูปที่ 1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์ (X) สับสเตรท (S) ผลผลิตมวลเซลล์เมื่อเทียบกับสับสเตรทที่ใช้ (P) กับอัตราการเจือจาง (D) ที่ภาวะคงที่ในการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง (Stanbury, 1984)

ที่ dt ใดๆ :

$$VdS = FS_Rdt - FSdt - V \mu X/Y_{x/s}\, dt - VmXdt - Vq_pX/Y_{p/s}\, dt \qquad (17)$$

หารด้วย Vdt ตลอด :

$$dS/dt = FS_R/V - FS/V - \mu X/Y_{x/s} - mX - q_pX/Y_{p/s} \qquad (18)$$

เมื่อ S_R = ความเข้มข้นของสารอาหารในถังเก็บ (medium reservoir) (กรัมต่อลิตร)

S = ความเข้มข้นของสารอาหารในระบบเคโมสแตท (กรัมต่อลิตร)

$Y_{X/S}$ = สัมประสิทธิ์ของผลผลิตมวลเซลล์ เมื่อเทียบกับสารอาหารที่ใช้ (กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ต่อกรัมสารอาหารที่ใช้)

Yp/s = สัมประสิทธิ์ของผลผลิตผลิตภัณฑ์เมื่อเทียบกับสารอาหารที่ใช้ (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมสารอาหารที่ใช้)

m = ความต้องการพลังงานในการเก็บรักษาหรือเลี้ยงชีพ (maintenance requirement) (กรัมสารอาหารที่ใช้ต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง)

q_p = อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์จำเพาะ (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อลิตรต่อชั่วโมง)

โดยทั่วไปค่า $mX << \mu X/Y_{x/s}$ สามารถตัดทิ้งได้ และเมื่อพิจารณากรณีที่ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ ค่า $q_p = 0$ ดังนั้นจากสมการที่ (18) จะเป็น

$$dS/dt = FS_R/V - F\bar{S}/V - \mu \bar{X}/Y_{x/s} \qquad (19)$$

ที่ภาวะคงที่ F/V = D ; dS/dt = 0 จะเป็น ดังนี้

$$DS_R - D\bar{S} - \mu\bar{X} / Y_{x/s} = 0 \quad (20)$$

$$\mu\bar{X} / Y_{x/s} = D(S_R - \bar{S}) \quad (21)$$

และที่ภาวะคงที่ ค่า μ = D จากสมการที่ (21) จัดรูปใหม่ได้ดังนี้

$$\bar{X} = Y_{x/s}(S_R - \bar{S}) \quad (22)$$

เมื่อ $\bar{S}$ = ความเข้มข้นสารอาหารในระบบเคโมสแตท ที่ภาวะคงที่

X = ความเข้มข้นของเซลล์ในระบบเคโมสแตท ที่ภาวะคงที่

จากสมการที่ (22) มีการตั้งสมมติฐานว่า ค่าสัมประสิทธิ์ผลผลิต (yield coefficient) ไม่ขึ้นกับอัตราการเติบโต ใช้ไม่ได้กับทุกกรณี และค่า $\bar{X}$ ไม่ขึ้นกับสารอาหารอื่นใด ยกเว้นสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเติบโต (Scragg, 1991)

1.10.4 สมการพื้นฐานสำหรับการหมักแบบต่อเนื่อง

จากสมการที่ (21) และที่ (22) เป็นสมการที่ภาวะคงที่ อธิบายระบบการหมักแบบต่อเนื่องของความสัมพันธ์ระหว่าง $\bar{X}$ และ $\bar{S}$ โดยสัมพันธ์กับตัวแปรที่รู้ค่าคือ อัตราการเจือจาง โดยแทนค่าในสมการของ Monod (Monod, 1949)

จาก $$\mu = \mu_{max} S / K_S + S \quad (23)$$

เมื่อ μ_{max} = อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของสารอาหารมีปริมาณไม่จำกัด

K_S = ค่าคงที่ (saturated constant) (กรัมต่อลิตร)

สำหรับระบบที่ภาวะคงที่

ค่า dX/dt = 0 และ dS/dt = 0 ดังนั้นค่า $\bar{X}$ และ $\bar{S}$ จึงเป็นค่าคงที่

จากสมการที่ (23) : $$\bar{S} = \mu K_S / (\mu_{max} - \mu) \quad (24)$$

แทนค่า $\bar{S}$ และ μ = D ลงในสมการที่ (24)

$$S = DK_S / (\mu_{max} - D) \quad (25)$$

ในสมการที่ (25) แสดงว่า $\bar{S}$ เป็นฟังก์ชันกับ D เท่านั้น จากสมการที่ (22) ที่ภาวะคงที่ จะเป็น

$$\bar{X} = Y_{x/s}(S_R - \bar{S}) \quad (26)$$

แทนค่า S จากสมการที่ (25) ลงในสมการที่ (26) จะได้ว่า

$$\bar{X} = Y_{x/s}[S_R - (DK_S / \mu_{max} - D)] \quad (27)$$

ส่วนสมการที่ (27) แสดงให้เห็นว่า $\bar{X}$ เป็นฟังก์ชันกับ D และ S_R (Scragg, 1991)

1.10.5 อัตราการเจือจางวิกฤต (D_C)

อัตราการเจือจางวิกฤตคือ ค่าอัตราการเจือจางต่ำสุดที่ทำให้เกิดการชะล้างเซลล์ออกจากระบบ โดยทั่วไปค่าอัตราการเจือจางวิกฤตมีค่าประมาณใกล้เคียง μ_{max} อย่างไรก็ดี $D_C = \mu$ เมื่อ $\bar{S} = S_R$ เนื่องจากเมื่อเกิดการชะล้างเซลล์ จะไม่มีเซลล์เหลืออยู่ในระบบหมักเคโมสแตท ดังนั้นจึงไม่มีการใช้สารอาหาร (Scragg, 1991) และเขียนสมการได้ว่า

$$D_C = \mu_{max} S_R / K_S + S_R \quad (28)$$

1.10.6 กำลังการผลิต (P_x)

ในการหมักแบบต่อเนื่อง กำลังการผลิตเซลล์ (Biomass productivity), Px (กำลังการผลิตต่อลิตรต่อชั่วโมง) (Scragg, 1991)

$$P_x = DX \quad (29)$$

แทนค่า X ด้วยสมการที่ 27 ดังนี้

$$P_x = DY_{x/s} [S_R - K_S D / (\mu_{max} - D)] \quad (30)$$

นั่นคือกำลังการผลิตเป็นฟังก์ชันกับอัตราการเจือจาง ค่าอัตราการเจือจางที่ทำให้ได้กำลังการผลิตสูงสุด หรือ D_{max} อาจคำนวณได้โดยให้สมการอนุพันธ์อันดับที่ 1 ของสมการที่ (30) เท่ากับ 0 ดังนี้

$$D_m = D_C [1 - (K_S / K_S + S)^{1/2}] \quad (31)$$

1.10.7 การหาค่าผลผลิตมวลชีวภาพของเซลล์และพลังงานที่ใช้ในการเก็บรักษา (m)

ผลผลิตมวลชีวภาพของเซลล์ หาได้ที่ภาวะคงที่ โดยการวัดค่า S และ X ดังนี้

$$Y_{x/s} = \bar{X} / (S_R - \bar{S}) \quad (32)$$

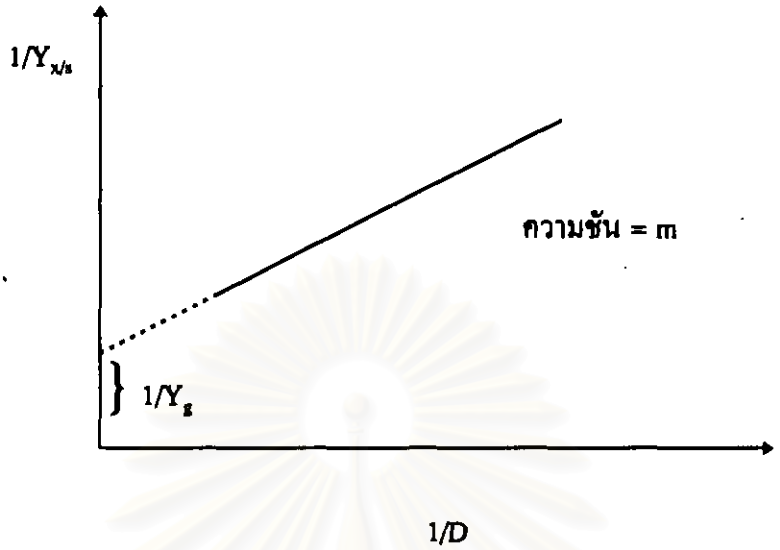
ในระบบการหมักแบบเคโมสแตท ภายในภาวะที่คาร์บอนเป็นสารอาหารจำเป็นสำหรับการเติบโต เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $1/Y_{x/s}$ กับ 1/D ได้สมการเส้นตรง มีความชันเท่ากับ m หรือพลังงานที่ต้องใช้ในการเก็บรักษา (รูปที่ 1.4) ความชันดังกล่าวไม่ได้ผ่านจุดกำเนิด เนื่องจากเซลล์ต้องใช้สารอาหารส่วนหนึ่งในการรักษาเซลล์ให้มีความมั่นคงและอยู่รอดได้ (Pirt, 1975) ดังสมการ

$$1/Y_{x/s} = m / \mu + 1/Y_g \quad (33)$$

ที่ภาวะคงที่ $D = \mu$ ดังนั้น จุดตัดแกน $1/ Y_{x/s}$ มีค่าเท่ากับ $1/Y_g$

เมื่อ Y_g = ผลผลิตมวลชีวภาพของการเติบโตจริง (true growth yield)

จะเห็นได้ว่าค่าต่างๆ เช่น μ_{max} ,K_S และ m สามารถหาได้โดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากการทดลองที่ภาวะคงที่ แต่หาได้ยากในการหมักแบบ batch (Scragg, 1991)



รูปที่ 1.4 การหาผลผลิตมวลชีวภาพของการเติบโตจริง (true growth yield , $1/Y_g$) และพลังงานที่ใช้ในการเก็บรักษาเซลล์ (m) (Scragg, 1991)

กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง มีข้อดีคือ

1) เหมาะสำหรับใช้ในการศึกษาด้านสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ ภายใต้ภาวะแวดล้อมคงที่

2) ตามทฤษฎีให้ผลผลิตและประสิทธิภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูงกว่าในระบบการหมักแบบแบช และแบบเฟดแบช

3) ประหยัดเนื้อที่ในการติดตั้งเครื่องมือและแรงงาน

4) สามารถจัดระบบการควบคุมแบบอัตโนมัติได้

กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง มีข้อเสียคือ

1) ต้องควบคุมทางชีววิทยาและเครื่องมืออย่างละเอียด

2) อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลานาน

3) ต้องควบคุมให้น้ำหมักอยู่ในภาวะปลอดเชื้อตลอดระยะเวลาการหมักนานๆ

1.11 มูลเหตุจูงใจในการวิจัย

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ขยายตัวอย่างรวดเร็วมาก ทำให้ความต้องการแหล่งอาหารสำหรับใช้ในการเลี้ยงสัตว์มีมากยิ่งขึ้น จึงหาได้ยากและมีราคาแพงยิ่งขึ้น ขณะเดียวกันก็มีปัญหาสิ่งแวดล้อมอันเกิดจากน้ำทิ้ง จากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบที่ต้องกำจัด การนำสารอาหารที่คงเหลืออยู่ในน้ำทิ้งมาใช้ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์สามารถนำมาเป็นแหล่งอาหารเสริมโปรตีนในอาหารสัตว์ เนื่องจากเซลล์ยีสต์มีปริมาณโปรตีนสูง มีกรดอะมิโนจำเป็นหลายชนิด เช่น ไลซีน เมไธโอนีน และทริปโตเฟน นอกจากนั้นยังมีวิตามินบีที่จำเป็นหลายชนิด ซึ่งโดยปกติจำเป็นต้องเติมลงไปในอาหารสัตว์ และการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์จากน้ำทิ้งยังสามารถลดมลภาวะที่เกิดจากน้ำทิ้งได้อีกด้วย โดยการเลือกใช้สายพันธุ์ยีสต์และภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม การวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์จากน้ำทิ้งที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบภายใต้ภาวะที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมในอาหารสัตว์ ทดแทนอาหารเสริมที่มีราคาสูง เพื่อเป็นการลดต้นทุนค่าอาหารสัตว์ และเป็นการบำบัดน้ำทิ้งได้อีกทางหนึ่งด้วย

1.12 ความสำคัญหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ปัจจุบันความต้องการแหล่งอาหารสำหรับใช้ในการเลี้ยงสัตว์มีมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะแหล่งอาหารประเภทโปรตีน เนื่องจากการเติบโตของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ ในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ต้องการสายพันธุ์ที่ประกอบด้วยโปรตีนสูง ส่วนคาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก และไขมัน ต้องมีในปริมาณต่ำและมีสมบัติใกล้เคียงกับโปรตีนจากพืชหรือปลาป่น มีกลิ่นรสดี และที่สำคัญคือมี ไลซีน เมไธโอนีน และทริปโตเฟนสูง ซึ่งโปรตีนจากพืชมักไม่มีกรดอะมิโนเหล่านี้ Goldberg (1985) รายงานว่า โปรตีนจากยีสต์ได้รับความสนใจนำไปใช้ เนื่องจากมีการขาดแคลนอาหารโปรตีนและวัตถุดิบที่ใช้ผลิตโปรตีนจากเนื้อสัตว์ รวมทั้งปัญหาการกำจัดของเหลือใช้ ดังนั้นการใช้มวลชีวภาพของยีสต์จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ใช้แก้ปัญหาดังกล่าวได้ การใช้มวลชีวภาพของยีสต์ให้ประโยชน์ 2 ประการ คือ การกำจัดของเสียเพื่อแก้ปัญหามลภาวะและผลตอบแทนจากการใช้ประโยชน์ของวัสดุเหล่านี้ เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ส่วนใหญ่มีส่วนประกอบของสารอินทรีย์อยู่สูง เป็นที่ยอมรับของนักเทคโนโลยีชีวภาพว่าการแปรรูปสารอินทรีย์และอื่นๆ ในวัสดุเหลือใช้เป็นสารที่มีประโยชน์และมีราคาโดยใช้จุลินทรีย์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแปรรูปเป็นเซลล์จุลินทรีย์ที่มีโปรตีนและคุณค่าทางอาหารอื่นๆ สูง เหมาะสำหรับใช้เป็น

อาหารสัตว์หรืออาหารเสริมให้สัตว์ ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตมวลชีวภาพควรเติบโตได้เร็วในอาหารที่มีราคาถูก เช่น สามารถใช้น้ำทิ้งในการผลิตมวลชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยน้ำทิ้งที่เป็นสารอินทรีย์จะเป็นแหล่งอาหารและพลังงานที่ดี การใช้วัตถุดิบในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ดังกล่าวนี้จะช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อม และสามารถนำมวลชีวภาพมาใช้ประโยชน์ในรูปของอาหารสัตว์ (Chavez และ Touchburn, 1991) เมื่อพิจารณาถึงปริมาณของไขมันและโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของน้ำทิ้งที่ได้จากอุตสาหกรรมอาหารซึ่งมีปริมาณสูง สามารถนำมาใช้เลี้ยงเซลล์ยีสต์ซึ่งเซลล์ยีสต์ที่ได้มีปริมาณโปรตีนสูง จะนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ ปัจจุบันได้มีความสนใจในการนำไขมันมาใช้สำหรับผลิตมวลชีวภาพของยีสต์มากขึ้น (Rydin และคณะ, 1990)

จากการค้นคว้าผลงานวิจัยที่ผ่านมา การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์จากน้ำทิ้งที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบยังมีน้อย การวิจัยส่วนใหญ่เป็นการปรับปรุงกระบวนการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์เพื่อศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจากแหล่งอื่นเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมโปรตีนและสารอาหารที่จำเป็นในอาหารสัตว์ ทดแทนอาหารเสริมที่มีราคาสูง ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนค่าอาหารสัตว์ และเป็นการบำบัดน้ำทิ้งได้ระดับหนึ่ง

1.13 ขั้นตอนการวิจัย

1) เก็บตัวอย่างและหาองค์ประกอบของน้ำทิ้งได้แก่ ค่าบีโอดี ซีโอดี ไขมัน โปรตีน และน้ำตาลทั้งหมด

2) การคัดแยกและการรวบรวมสายพันธุ์ยีสต์ที่เติบโตได้ในน้ำทิ้ง เปรียบเทียบสมบัติการเติบโตและองค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ได้แก่ โปรตีนภายในเซลล์ กรดนิวคลีอิก วิตามินและกรดอะมิโน เพื่อให้ได้สายพันธุ์ยีสต์ที่มีสมบัติเหมาะสมสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์

3) ศึกษาภาวะการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าขนาด 250 มล. และในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่เหมาะสมต่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ โดยใช้อาหารที่เตรียมจากน้ำทิ้งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

4) วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำทิ้งภายหลังจากการนำมาใช้เลี้ยงเซลล์ยีสต์

5) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องในถังหมัก