การหมักแบบต่อเนื่องเพื่อพัฒนาอัตราการเจริญจำเพาะในการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

นางสาวอังสุมาริน อุนบูรณะวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-331-990-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTINUOUS FERMENTATION TO IMPROVE SPECIFIC GROWTH RATE OF *Saccharomyces cerevisiae* CULTIVATION

Miss Aungsumarin Aunburanawon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-331-990-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหมักแบบต่อเนื่องเพื่อพัฒนาอัตราการเจริญจำเพาะในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*
โดย	นางสาวอังสุมาริน อุนบูรณะวรรณ
สาขาวิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล และรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อังสุมาริน อุนบูรณะวรรณ : การหมักแบบต่อเนื่องเพื่อพัฒนาอัตราการเจริญจำเพาะในการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* (CONTINUOUS FERMENTATION TO IMPROVE SPECIFIC GROWTH RATE OF *Saccharomyces cerevisiae* CULTIVATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. นลิน นิลอุบล และรศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 118 หน้า. ISBN. 974-331-990-5

งานวิจัยนี้ได้ทำการหาสูตรอาหารและภาวะในการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ SG1 ด้วยระบบต่อเนื่อง เพื่อให้ได้อัตราการเจริญจำเพาะสูงโดยที่มีผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูง และสามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะนั้นไว้ได้นาน ๆ โดยหัวเชื้อที่เหมาะสำหรับใช้ในการหมักมีอายุ 8 ชั่วโมง เนื่องจากที่เวลานี้หัวเชื้อมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ในการทดลองหาความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ด้วยการหมักแบบขวดเขย่า พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ให้อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์สูงที่สุดคือ 20 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ได้จากการหมักแบบขวดเขย่า การหมักแบบแบช และการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตรเช่นเดียวกัน ผลปรากฏว่าการหมักแบบต่อเนื่อง ให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดคือ 0.250 ต่อชั่วโมง ในขณะที่การหมักแบบขวดเขย่า และการหมักแบบแบชในถังหมักขนาด 5 ลิตร ให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.160 ต่อชั่วโมง และ 0.210 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ด้วยระบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์เพียง 5.32 กรัม (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ต่อลิตรหรือคิดเป็น 2.00 กรัม (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ต่อชั่วโมง นอกจากนี้ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ยังมีค่าเพียง 0.66 เท่านั้น ดังนั้นจึงได้ทำการพัฒนาสูตรอาหารและภาวะของการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมประกอบด้วยกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 50 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 8.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.4 กรัมต่อลิตร ในขณะที่สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเติมเข้าสู่ระบบมีองค์ประกอบเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น แต่ลดความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเป็น 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งเริ่มเติมที่ชั่วโมงที่ 3 ของการหมัก โดยไม่มีการเติมเฟอริคคลอไรด์ คอปเปอร์ซัลเฟต และซิงค์คลอไรด์ลงในสูตรอาหารทั้งสอง สำหรับภาวะของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม คือ อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที, อัตราการให้อากาศ 3 vvm, ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 และควบคุมอุณหภูมิที่ 33 องศาเซลเซียส ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยสูตรอาหารและภาวะที่ปรับปรุงแล้วนี้ในการหมักแบบต่อเนื่องถึงแม้จะไม่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อให้สูงกว่า 0.250 ต่อชั่วโมง แต่สามารถเพิ่มความเข้มข้นเซลล์ไปได้เป็นประมาณ 24.00 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 9.00 กรัมต่อชั่วโมง และผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปยังสูงถึง 0.72 ซึ่งสามารถรักษาภาวะที่ได้ถึง 117 ชั่วโมง ส่วนการศึกษาการนำน้ำหมักที่ผ่านการแยกเซลล์ออกแล้วกลับมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเติมกลับเข้าสู่ระบบพบว่า สามารถนำน้ำหมักกลับมาใช้ได้อีกเพียง 1 รอบเท่านั้น

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา .....หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา .....2541..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C827011 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: CONTINUOUS FERMENTATION/SPECIFIC GROWTH RATE/ *Saccharomyces cerevisiae*

AUNGSUMARIN AUNBORANAWON : CONTINUOUS FERMENTATION TO IMPROVE SPECIFIC GROWTH RATE OF *Saccharomyces cerevisiae* CULTIVATION. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. SURAPONG NAVANKASATTUSAS, Ph.D. THESIS CO. ADVISOR ; ASSO. PROF. NALINE NILUBOL. Ph.D. AND ASSO. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 118 pp. ISBN. 974-331-990-5

This research is to establish composition of production medium and growth condition in continuous fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* strain SG1 for yeast cell cultivation, to attain high and stable specific growth rate and high cell mass yield. The suitable age of innoculum, which had maximum specific growth rate, was 8 hours. In shaked flask cultivation, concentration of initial total sugar in molasses that obtained maximum specific growth rate was 20 g/l. The comparison between shaked flask fermentation, batch fermentation and continuous fermentation in 5 liters with 20 g/l of initial total sugar in medium showed that the maximum specific growth rate from continuous fermentation was the highest (0.250 h^{-1}), while those from shaked flask fermentation and batch fermentation were 0.160, and 0.210 h^{-1} respectively. However, cell concentration of continuous fermentation in this condition (20 g/l of initial total sugar, 0.250 h^{-1} of dilution rate) was only 5.32 g. of dry weight/l or 2.00 g. of dry weight/hr with only 0.66 of cell mass yield. Composition of production medium and condition of cultivation for continuous fermentation had been further developed. The suitable initial production medium was composed of molasses with 50 g/l of total sugar, 8.5 g/l of ammonium sulfate and 2.4 g/l of ammonium hydrogen phosphate. While the composition of the suitable production medium for continuous addition was similar to that of the initial production medium, but solution of molasses with total sugar of 40 g/l should be added to the system at the third hour of the initial fermentation. The suitable production media did not require additional ferric chloride, copper sulfate and zinc chloride. The suitable condition of cultivation for continuous fermentation consisted of 700 rpm of stirring rate, 3 vvm of air flow, at pH 4.5 and 33 °c. Although the developed production medium and condition could not obtain higher specific growth rate, but it obtain 24.00 g. of dry weight/l or 9.00 g of dry weight/hr of cell productivity and 0.72 of cell mass yield with respect to fermentable sugar consumed. This condition could be maintained for 117 hours. The spent medium of the cell culture was able to recycle only 1 cycle.

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล และรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รวมทั้งอาจารย์วาสนา โตเลี้ยง ซึ่งท่านเหล่านี้ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัยมาด้วยดีตลอด นอกจากนี้ผู้วิจัยยังขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการสั่งซื้อและจัดหาสารเคมี รวมทั้งช่วยเหลือในการซ่อมบำรุงอุปกรณ์ที่ใช้ในวิทยานิพนธ์ และจากความช่วยเหลือรวมทั้งกำลังใจจากเพื่อน พี่ และน้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งนางสาวสรัญญา ดิลกภัลยากุล วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี สำหรับทุนการวิจัยครั้งนี้บางส่วนได้รับมาจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยมา ณ ที่นี้ด้วย ท้ายที่สุดผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ซึ่งสนับสนุนในด้านการเงินและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญรูป	ณ
คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ	ถ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*	1
1.1.1 ลักษณะทางชีววิทยาของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*	1
1.1.2 องค์ประกอบของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*	2
1.1.3 การขยายพันธุ์และวงจรชีวิตของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*	4
1.2 ปัจจัยในการเจริญของเซลล์ยีสต์	6
1.2.1 แหล่งคาร์บอน	6
1.2.2 แหล่งไนโตรเจน	10
1.2.3 ฟอสฟอรัส	11
1.2.4 ซัลเฟอร์	11
1.2.5 วิตามิน	11
1.2.6 ธาตุอาหารอื่น ๆ	12
1.2.7 ออกซิเจน	12
1.2.8 อุณหภูมิ	12
1.2.9 ค่าความเป็นกรดด่าง	13
1.3 อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)	13
1.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์	14
1.4.1 ถังหมัก	14

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

1.4.2 ระบบควบคุมการหมัก..... 14

1.4.2.1 การให้อากาศ..... 14

1.4.2.2 การกวน..... 15

1.4.2.3 การควบคุมอุณหภูมิ..... 15

1.4.2.4 การควบคุมความเป็นกรดด่าง..... 16

1.4.2.5 การกำจัดฟอง..... 16

1.4.3 ระบบการหมัก..... 16

1.4.3.1 ระบบปิด..... 17

1.4.3.2 ระบบเปิด..... 18

1.5 ทฤษฎีการหมักแบบต่อเนื่อง..... 18

1.6 การนำน้ำหมักกลับมาใช้ใหม่..... 22

1.7 มูลเหตุจูงใจ..... 22

1.8 วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์..... 23

1.9 ขั้นตอนของงานวิจัย..... 23

บทที่ 2 วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 24

2.1.1 อุปกรณ์..... 24

2.1.2 สารเคมี..... 25

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 26

2.3 การเก็บรักษาเชื้อ..... 26

2.4 การเลี้ยงเชื้อ..... 26

2.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ..... 26

2.4.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลล์ในการหมักแบบขวดเขย่า..... 26

2.4.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลล์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบช..... 27

2.4.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลล์ในถังหมักแบบต่อเนื่อง..... 27

2.5 วิธีวิเคราะห์..... 27

2.5.1 การวิเคราะห์การเจริญของยีสต์..... 27

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำหมัก..... 28

2.5.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยกรด 3,5 ไดโนโตรซาลิไซลิก... 28

2.5.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)..... 28

2.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen)โดยวิธี Kjeldahl..... 28

บทที่ 3 ผลการทดลอง

3.1 การเจริญของยีสต์ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ..... 30

3.2 ผลของเฟอริคคลอไรด์ คอปเปอร์ซัลเฟต และซิงค์คลอไรด์ ต่ออัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์..... 30

3.3 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในการหมักแบบขวดเขย่า..... 35

3.4 การเจริญของยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง..... 39

3.5 ผลของอัตราการเจือจางต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่องที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร..... 39

3.6 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ใช้เติมเข้าสู่ระบบการหมักแบบต่อเนื่องต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง..... 42

3.7 ผลของอัตราการเจือจางต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่องที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร..... 46

3.8 ผลของอัตราการกวนต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง..... 50

3.9 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง..... 54

3.10 ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง..... 61

3.11 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง..... 61

3.12 ผลของไนโตรเจนต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง..... 69

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.13 ผลของทั้งความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล และความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ใช้เติมต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง... 73

3.14 ผลของอัตราการเจือจางต่อการเจริญของยีสต์ในภาวะและสูตรอาหารที่ปรับปรุงแล้วในการหมักแบบต่อเนื่อง..... 77

3.15 ระยะเวลาที่สามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะไว้ได้..... 81

3.16 ผลของการนำน้ำหมักที่วิเคราะห์และเติมสารอาหารให้เท่ากับสูตรอาหารกลับมาเลี้ยงเชื้อใหม่. 81

3.17 ผลของการนำน้ำหมักที่เติมสารอาหารตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้วโดยไม่คำนึงถึงสารอาหารที่เหลืออยู่ในน้ำหมักกลับมาใช้เลี้ยงเชื้อใหม่..... 88

บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 93

รายการอ้างอิง..... 99

ภาคผนวก

ก. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย..... 103

ข. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย..... 106

ค. กราฟมาตรฐาน..... 107

ง. การคำนวณที่ใช้ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้..... 111

ประวัติผู้เขียน..... 118

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ส่วนประกอบของยีสต์แห้ง	3
1.2	แสดงปริมาณวิตามินของยีสต์ขนมปัง	4
1.3	องค์ประกอบของกากน้ำตาล	9
3.1	การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ	31
3.2.1	การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมเฟอริคคลอไรด์ คอปเปอร์ซัลเฟต และซิงค์คลอไรด์	33
3.2.2	การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเฟอริคคลอไรด์ คอปเปอร์ซัลเฟต และซิงค์คลอไรด์	33
3.3.1	การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ) เป็น10 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบขวดเขย่า	36
3.3.2	การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ) เป็น 20 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบขวดเขย่า	36
3.3.3	การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ) เป็น 30 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบขวดเขย่า	37
3.4	การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ) เป็น 20 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบแบช ในถังหมักขนาด 5 ลิตร	40
3.5.1	การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตรโดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.195, 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง	43
3.5.2	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบต่อเนื่อง โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.195, 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง	45
3.6.1	การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อแปรการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 10, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง	47

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3.6.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อแปรการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 10, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง..... 49

3.7.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.250และ 0.290 ต่อชั่วโมง..... 51

3.7.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบต่อเนื่อง โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง..... 53

3.8.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอัตราการกวน เป็น 800, 600 และ 700 รอบต่อนาที่..... 55

3.8.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอัตรากวนเป็น 800, 600 และ 700 รอบต่อนาที..... 57

3.9.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอัตราการให้อากาศเป็น 3 และ 2 vvm..... 58

3.9.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอัตราการให้อากาศเป็น 3 และ 2 vvm..... 60

3.10.1 การเจริญของยีสต์ SG1 และการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.5, 4.0 และ 5.0..... 62

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3.10.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 และการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.5, 4.0 และ 5.0..... 65

3.11.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอุณหภูมิเป็น 30, 33 และ 35 องศาเซลเซียส..... 66

3.11.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอุณหภูมิเป็น 30, 33 และ 35 องศาเซลเซียส..... 68

3.12.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจน เป็น 1.71, 2.27, 2.38 และ 2.16 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง..... 70

3.12.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร และแปรปริมาณไนโตรเจนเป็น 1.71, 2.27, 2.38 และ 2.16 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง..... 72

3.13.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลและปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ โดยให้อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลและปริมาณไนโตรเจนคงที่ ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง 74

3.13.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลและปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง..... 76

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3.14.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (สูตร 1 จากข้อ 3.13; ภาคผนวก ก. 2.3) โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง..... 78

3.14.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก. 2.3) โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง..... 80

3.15.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก. 2.3) ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง..... 82

3.15.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก. 2.3) ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง ในแต่ละวัน..... 84

3.16.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก 2.3) และนำน้ำหมักที่วิเคราะห์และเติมสารอาหารให้เท่ากับสูตรอาหารแล้วกลับมาเลี้ยงเชื้อใหม่ ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง..... 85

3.16.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก. 2.3) และนำน้ำหมักที่วิเคราะห์และเติมสารอาหารให้เท่ากับสูตรอาหารแล้วกลับมาเลี้ยงเชื้อใหม่ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง..... 87

3.17.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก. 2.3) และนำน้ำหมักมาเติมสารอาหารตามสูตรอาหาร (โดยไม่คำนึงถึงสารอาหารที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก) แล้วกลับมาเลี้ยงเชื้อใหม่ ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง..... 89

3.17.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก. 2.3) และนำน้ำหมักมาเติมสารอาหารตามสูตรอาหาร (โดยไม่คำนึงถึงสารอาหารที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก) แล้วกลับมาเลี้ยงเชื้อใหม่ ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง..... 91

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ค. 1 การเจริญของยีสต์ SG1 เมื่อวัดโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร..... 108

ค. 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร..... 109

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1.1 ลักษณะของเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 2

1.2 วงจรชีวิตของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 5

1.3 วิถีไกลโคไลซิส 7

1.4 วัฏจักรเครบส์ หรือวัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิก 8

1.5 แบบร่างของถังหมักที่มีการกวน 15

1.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง S_1 กับ D และ X_1 กับ D (จากการคำนวณ) 21

3.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ 32

3.2 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ไม่เติม (แบบที่ 1) และเติม (แบบที่ 2) เฟอริคคลอไรด์ คอปเปอร์ซัลเฟต และซิงค์คลอไรด์ 34

3.3 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีการแปรความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร 38

3.4 การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ) เป็น 20 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบแบช ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 41

3.5 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.195, 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง 44

3.6 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อแปรการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 10, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง 48

3.7 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง 52

3.8 การเจริญของยีสต์ SG1ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอัตราการกวนเป็น 800, 600 และ 700 รอบต่อนาที 56

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.9 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรการให้อากาศเป็น 3 และ 2 vvm..... 59

3.10 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.5, 4.0 และ 5.0..... 64

3.11 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอุณหภูมิเป็น 30, 33 และ 35 องศาเซลเซียส..... 67

3.12 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร และแปรปริมาณไนโตรเจนเป็น 1.71, 2.27, 2.38 และ 2.16 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง 71

3.13 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลและปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง..... 75

3.14 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก. 2.3) โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง..... 79

3.15 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก 2.3) ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง..... 83

3.16 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก 2.3) และนำน้ำหมักที่วิเคราะห์และเติมสารอาหารให้เท่ากับสูตรอาหารแล้วกลับมาเลี้ยงเชื้อใหม่ ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง..... 86

3.17 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก 2.3) และนำน้ำหมักมาเติมสารอาหารตามสูตรอาหาร (โดยไม่คำนึงถึงสารอาหารที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก) แล้วกลับมาเลี้ยงเชื้อใหม่ ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง..... 90

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
ค. 1	กราฟมาตรฐานสำหรับหาน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์	108
ค. 2	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส	110

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

vvm	คือ	ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักภายในถังหมักต่อนาที
%	คือ	เปอร์เซ็นต์