



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3
แบบเซลล์ตรึงโดยใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร

ชื่อบิสิต นางสาว ศศิวิมล รุจิรัตน์ รหัสประจำตัว 5932354723

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึงโดยใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร

ชื่อนิสิต นางสาวศศิวิมล รุจิรัตน์ **เลขประจำตัว** 5932354723

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3
แบบเซลล์ตรึงโดยใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร

โดย

นางสาวศศิวิมล รุจิรัตน์ รหัสนิสิต 5932354723

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

ปีการศึกษา

2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อรทัย ภิญญาคง)

..... กรรมการ

(ดร. สริสา ณ ป้อมเพ็ชร)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3

แบบเซลล์ตรึงโดยใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร

นิสิตในโครงการ

นางสาวศศิวิมล รุจิรัตน์

รหัสนิสิต 5932354723

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก <i>Weissella cibaria</i> สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึงโดยใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร
นิสิตหัวหน้าโครงการ	นางสาวศศิวิมล รุจิรัตน์ รหัสนิสิต 5932354723
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2559	

บทคัดย่อ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactants) คือสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์ซึ่งจัดว่ามีความปลอดภัย ย่อยสลายทางชีวภาพได้ มีความเป็นพิษต่ำ และมีประสิทธิภาพภายใต้พีเอชและอุณหภูมิที่หลากหลาย ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นที่ต้องการมากในตลาดโลก อย่างไรก็ตามการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีข้อจำกัดด้านต้นทุนการผลิตที่สูง งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารมาใช้ทดแทนน้ำตาลกลูโคส และน้ำมันถั่วเหลืองในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียผลิตภัณฑ์แลคติก *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึง โดยในเบื้องต้นได้ใช้หางกะทิเป็นตัวแทนของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยหางกะทิเจือจางให้มีค่าซีโอดีเป็น 1 เท่าและ 3 เท่าของอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลปกติที่เติมน้ำตาลกลูโคส และน้ำมันถั่วเหลือง ผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิที่มีค่าซีโอดี 3 เท่า คือ 239,601 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะแก่การนำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ต่อมานำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร 2 แห่ง มาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและอ้างอิงจากผลของการใช้หางกะทิ ดังนั้นจึงมีการเพิ่มน้ำมันถั่วเหลืองในชุดการทดลองที่มีค่าซีโอดีต่ำ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบประกอบด้วย น้ำอ่อนจากโรงงานผลิตกะทิที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง น้ำเสียชั้นไขมันจากโรงงานผลิตกะทิ และน้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากชนไก่ปนที่ไม่เติมและเติมน้ำมันถั่วเหลืองพบว่าชุดทดลองที่ใช้น้ำอ่อนจากโรงงานผลิตกะทิที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองมีประสิทธิภาพเหมาะแก่การนำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุด โดยผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ปริมาณ 1.49 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำมาหาค่าแรงตึงผิวพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์เมื่อใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.37 กรัมต่อลิตร มีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 38.82 มิลลินิวตันต่อเมตร และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์เมื่อใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.83 กรัมต่อลิตร มีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 34.23 มิลลินิวตันต่อเมตร นอกจากนี้พบว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดค่าซีโอดีในน้ำเสียจาก 44,900 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 16,008 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะช่วยย่นระยะเวลาการบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศต่อไป จึงสรุปได้ว่าสามารถนำน้ำอ่อนจากโรงงานผลิตกะทิมาใช้ลดต้นทุนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าน้ำเสียอีกด้วย

Project title Production of biosurfactants by immobilized *Weissella cibaria* PN3
 using food-industrial wastewater as nutrient source

Investigator Miss Sasivimon Rujirat Student ID 5932354723

Project Advisor Assoc. Prof. Ekawan Luepromchai, Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Biosurfactants are surfactant molecules produced by microorganisms that are biodegradable, low toxicity and effective under a wide range of pH and temperature. According to these properties, there is a high demand of biosurfactants in the global market. However, the production of biosurfactants is limited due to its high cost of production. This research aims to utilize food-industrial wastewater instead of glucose and soybean oil for biosurfactant production by the immobilized *Weissella cibaria* PN3, a lactic acid producing bacteria. Initially, this research used diluted coconut milk as a representative of food-industrial wastewater. The medium was prepared by diluting diluted coconut milk to reach the COD values of 1X and 3X of basal medium with glucose and soybean oil. The results showed that diluted coconut milk with 3X COD (239,601 mg/L) was suitable for biosurfactant production. After that, food-industrial wastewater from 2 factories was used to produce biosurfactant and prepared according to the result of diluted coconut milk. So, soybean oil was added to the experimental set with low COD value. The tested media were consisted of soft water from coconut milk factory with soybean oil, waste coconut oil cake, and wastewater from feather meal factory without and with soybean oil. The results revealed that soft water from coconut milk factory with soybean oil was the most effective for biosurfactant production with 1.49 g/L biosurfactant yield. For the surface tension measurement, extracellular biosurfactant at 0.37 g/L could reduce the surface tension 38.82 mN/m, while cell-bound biosurfactant at 1.83 g/L could reduce the surface tension 34.23 mN/m. Apart from this, it was found that biosurfactant production could reduce COD in the media from 44,900 mg/L to 16,007.5 mg/L which would shorten the time in following wastewater treatment with oxygenation. In conclusion, the soft water from coconut milk factory was suitable for reducing the cost of biosurfactant and could be another approach to increase the value of wastewater.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย ที่ถ่ายทอดความรู้ ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย อีกทั้งยังช่วยตรวจทานแก้ไขโครงการฉบับนี้สมบูรณ์มากขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำในด้านต่าง ๆ รวมถึงการใช้ชีวิตในอนาคต และให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ตลอดการทำโครงการฉบับนี้

ขอขอบพระคุณบริษัท อัมพลฟู๊ดส์ โพรเซสซิง จำกัด และโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากชนไก่ป่น ที่กรุณา มอบน้ำเสียจากมาให้ดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ นางสาวปรีสรินทร์ นววิมาน นางสาวทิพย์สุดา ทรัพย์สงวน นายณัฐวุฒิ ขุนอาวุธ และทุกคนในห้องปฏิบัติการ 1704/14 ที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และการช่วยเหลือต่าง ๆ ระหว่างการทำโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา รุ่นที่ 43 และพี่น้องชาวจุลชีววิทยาทุกคน ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดการดำเนินโครงการนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคนรวมถึงสัตว์เลี้ยงที่น่ารัก ที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ แก้ปัญหาต่าง ๆ ตลอดจนเป็นกำลังใจสำคัญให้ผู้วิจัยเรื่อยมา

ด้วยความเคารพอย่างสูง

ศศิวิมล รุจิรัตน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญสมการ	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	9
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
บทที่ 2 อุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์	10
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	10
2.2 เคมีภัณฑ์	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินงาน	12
3.1 หาความเข้มข้นและชนิดของของน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ	13
3.1.1 การเตรียมน้ำเสีย	13
3.1.1.1 หางกะทิ	13
3.1.1.2 น้ำเสียจากโรงงานผลิตกะทิ	13
3.1.1.3 น้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากขนไก่ปน	15
3.1.2 การเตรียมหัวเชื้อ <i>Weissella cibaria</i> สายพันธุ์ PN3 และตรึงลงบนวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุน	15
3.1.3 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ <i>W. cibaria</i> สายพันธุ์ PN3 โดยใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำ	16
3.1.4 การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เชื้อผลิตได้	17
3.1.4.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์	18
3.1.4.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์	18
3.1.5 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	18
3.1.6 การหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นการผลิต	18
3.1.7 การทดสอบค่าซีไอคือน้ำเสียภายหลังการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	19

3.2 ทดสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	19
3.2.1 การวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension)	19
3.2.2 หาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC)	19
3.2.3 วัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsification index, E24)	20
3.3 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	21
3.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยวิธี Sulfo-Phospho-Vanillin	21
3.3.2 วิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยวิธี Bradford	21
3.3.3 วิเคราะห์องค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยวิธี Phenol-sulfuric acid	21
บทที่ 4 ผลการทดลอง	22
4.1 การทดสอบเบื้องต้นในการใช้หางกะทิเป็นตัวแทนของน้ำเสียในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	22
4.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้หางกะทิเป็นแหล่งอาหาร	22
4.1.2 การเลือกปริมาณหางกะทิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	22
4.1.2.1 เปรียบเทียบปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ <i>W. cibaria</i> สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึงผลิตได้เมื่อใช้หางกะทิเป็นแหล่งอาหาร	22
4.1.2.2 จำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นการทดลองเมื่อใช้หางกะทิเป็นแหล่งอาหาร	24
4.1.2.3 ประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดยใช้หางกะทิ เป็นแหล่งอาหาร	25
4.2 การนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	26
4.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร	26
4.2.2 การเลือกชนิดและสภาวะของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการบำบัดน้ำเสีย	27
4.2.2.1 เปรียบเทียบปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ <i>W. cibaria</i> สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึงผลิตได้เมื่อนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร	27
4.2.2.2 จำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นการทดลองเมื่อนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร เป็นแหล่งอาหาร	29
4.2.2.3 ประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดยใช้น้ำเสียจาก อุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร	30
4.2.2.4 การวัดค่าซีโอดีหลังการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยน้ำเสียจากอุตสาหกรรม เพื่อเป็นแนวทางในการบำบัดน้ำเสีย	32

4.3 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้น้ำอ่อนจากโรงงานผลิตกะทิที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง เป็นแหล่งอาหารและทดสอบคุณสมบัติ รวมถึงวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพที่ผลิตได้	32
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	34
รายการอ้างอิง	38
ภาคผนวก	45
ภาคผนวก ก	46
ภาคผนวก ข	49
ภาคผนวก ค	50

สารบัญรูปรภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	1
รูปที่ 1.2 ตัวอย่างโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิด	3
รูปที่ 1.3 ตัวอย่างโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ : เซอร์แฟกติน	4
รูปที่ 1.4 <i>W. cibaria</i> ย้อมแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	7
รูปที่ 3.1 แผงผังแสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	12
รูปที่ 3.2 หางกะทิจากตลาดวัดพุทธนิ จังหวัดนนทบุรี	13
รูปที่ 3.3 น้ำเสียและบริเวณที่เก็บน้ำเสียโรงงานผลิตกะทิ บริษัทอำพลฟูดส์ โพรเซสซิง จำกัด	14
รูปที่ 3.4 น้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากชนไก่ปน	15
รูปที่ 3.5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>W. cibaria</i> สายพันธุ์ PN3 รหัส MSCU 0840 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด MRS	16
รูปที่ 3.6 วัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนสำหรับตรึงเชื้อจุลินทรีย์ Aquaporous gel	16
รูปที่ 3.7 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยหางกะทิ	17
รูปที่ 3.8 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยน้ำเสียจากโรงงานผลิตกะทิ และโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากชนไก่ปน	17
รูปที่ 3.9 เครื่อง Tensiometer (Kruss, K100)	19
รูปที่ 3.10 วิธีการหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์	20
รูปที่ 4.1 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการผลิตด้วยหางกะทิ	23
รูปที่ 4.2 จำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละรอบการผลิตเมื่อใช้หางกะทิเป็นแหล่งอาหาร	24
รูปที่ 4.3 ค่าแรงตึงผิวของน้ำ SDHS TritonX-100 และของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิต จากหางกะทิทั้งชนิดปล่อยออกนอกเซลล์และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์	26
รูปที่ 4.4 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์และติดอยู่ที่ผิวเซลล์ จากการผลิตด้วยน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร	28
รูปที่ 4.5 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในชุดการทดลองที่ใช้ น้ำเสียชั้นไขมันจากโรงงานผลิตกะทิ เป็นแหล่งอาหาร	29
รูปที่ 4.6 จำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละรอบการผลิตเมื่อใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร	30
รูปที่ 4.7 ค่าแรงตึงผิวของน้ำ SDHS TritonX-100 และของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากน้ำเสีย จากอุตสาหกรรมอาหารทั้งชนิดปล่อยออกนอกเซลล์และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์	31

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างแหล่งอาหารราคาถูกที่นำมาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	2
ตารางที่ 1.2 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	5
ตารางที่ 1.3 ตัวอย่างการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกไปใช้ประโยชน์	6
ตารางที่ 4.1 ค่าซีไอดีเริ่มต้นก่อนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร	27
ตารางที่ 4.2 ค่าซีไอดีภายหลังการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร	32
ตารางที่ ค.1 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์เมื่อใช้ทางกะทิเป็นแหล่งอาหารในแต่ละรอบการผลิต	49
ตารางที่ ค.2 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์เมื่อใช้ทางกะทิเป็นแหล่งอาหารในแต่ละรอบการผลิต	49
ตารางที่ ค.3 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์เมื่อใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร	50
ตารางที่ ค.4 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์เมื่อใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร	51
ตารางที่ ค.5 จำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่ในวัสดุตั้งในแต่ละขั้นการทดลองเมื่อใช้ทางกะทิเป็นแหล่งอาหาร	51
ตารางที่ ค.6 จำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่ในวัสดุตั้งในแต่ละขั้นการทดลองเมื่อใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร	52
ตารางที่ ค.7 ค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวเมื่อใช้ทางกะทิเป็นแหล่งอาหาร	53
ตารางที่ ค.8 ค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร	53

สารบัญสุมการ

หน้า

สมการที่ 3.1 การคำนวณค่า E24

21

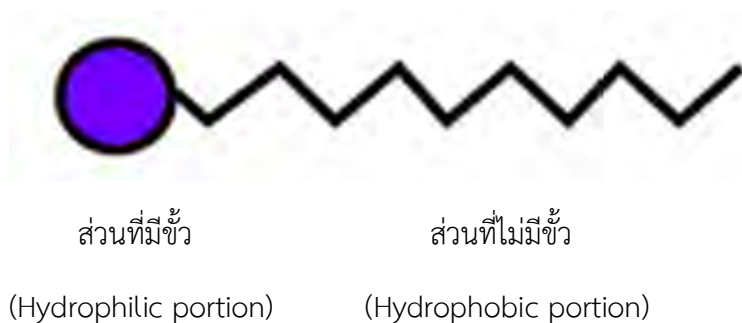
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิฟิลิก (Amphiphilic) มีทั้งส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic portion) ที่ส่วนใหญ่ประกอบด้วยน้ำตาลที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ฟอสเฟต หมู่อะมิโน หมู่ไฮดรอกซิล และโปรตีน และส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic portion) ที่ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Desai และ Banat, 1997) สารลดแรงตึงผิวมักเกิดการรวมตัวระหว่างบริเวณที่มีขั้วต่างกัน เช่น น้ำกับน้ำมัน และน้ำกับอากาศ เป็นต้น (Mouafo และคณะ, 2018) มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิว และก่ออิมัลชัน (Ghasemi และคณะ, 2018) ถูกสังเคราะห์ขึ้นทางเคมีด้วยสารตั้งต้นจากปิโตรเคมีและโอเลโอเคมี แต่ปัจจุบันผู้คนตระหนักถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้นจึงมีการพัฒนาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นสารที่ผลิตได้จากธรรมชาติ ย่อยสลายทางชีวภาพได้ ความเป็นพิษต่ำ และสามารถผลิตจากสารตั้งต้นที่มีราคาถูกลงได้ (Ghasemi และคณะ, 2019) โดยการใช้ประโยชน์หรือของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารและการเกษตร แสดงดังตารางที่ 1.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบ่งออกเป็นสองชนิด คือชนิดที่ปล่อยออกนอกเซลล์ (Extracellular biosurfactant) และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ (Cell-bound biosurfactant) (Merghni และคณะ, 2017) ซึ่งบางสายพันธุ์ก็ผลิตทั้งสองชนิดและบางสายพันธุ์ก็ผลิตเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น *Bacillus subtilis* ที่ผลิตทั้งชนิดที่ปล่อยออกนอกเซลล์และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ (López-Prieto และคณะ, 2019) และ *Lactobacillus pentosus* CECT-4023T ที่ผลิตชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์เพียงชนิดเดียว (Vecino และคณะ, 2018) เป็นต้น



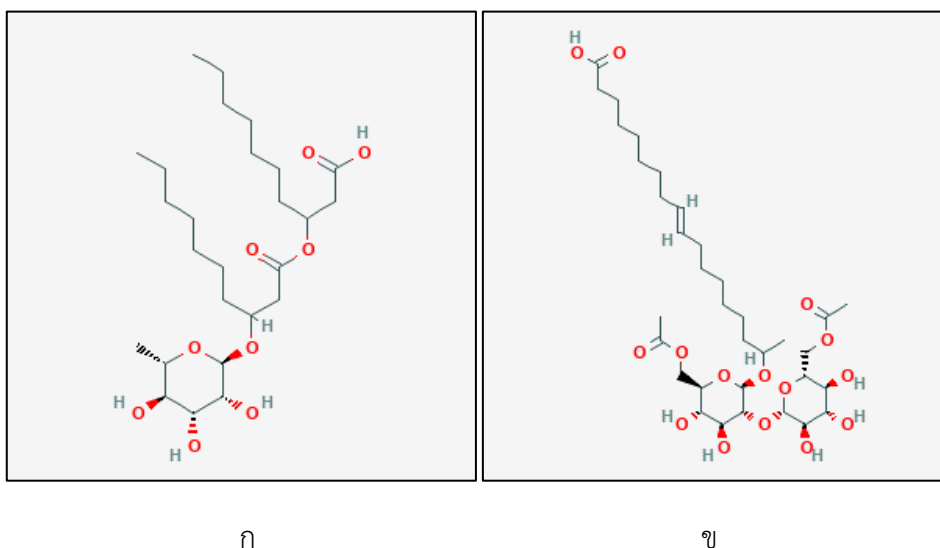
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างแหล่งอาหารราคาถูกรที่นำมาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

แหล่งอาหาร ราคาถูก	จุลินทรีย์	ชนิดของ สารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ	อ้างอิง
ของเสีย น้ำมันคาโนลา	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	แรมโนลิปิด	Perez-Armendariz และคณะ, 2019
เศษไม้จากการ ตัดต้นองุ่น	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> A20	ไกลโคลิโพลีเพปไทด์	Vecino และคณะ, 2017
ของเสียจากโรง กลั่นน้ำมันปาล์ม	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	แรมโนลิปิด	Radzuan และคณะ, 2017
ของเสียจาก ผลิตภัณฑ์นม	<i>Stamerella bombicola</i> MTCC 1910	โซโฟโรลิปิด	Vidhya และคณะ, 2015
ของเสีย น้ำมันทำอาหาร	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	แรมโนลิปิด	Chen และคณะ, 2018
น้ำเชื่อมอินพาล์ม คุณภาพต่ำ	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> PTCC 1637	ไกลโคโพรตีน	Ghasemi และคณะ, 2018
ของเสีย จากเบเกอรี่	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PG1	แรมโนลิปิด	Patowary และคณะ, 2019
ของเสีย น้ำมันทำอาหาร	<i>Pseudozyma aphidis</i> ZJUDM34	แมนโนซิลอิริทริทอล ลิปิด	Niu และคณะ, 2019
ชานอ้อยและ เปลือกมันฝรั่ง	<i>Pseudomonas azotoformans</i> AJ15	ไกลโคลิปิด และ แรมโนลิปิด	Das และคณะ, 2018
ของเสีย จากโรงเบียร์	<i>Bacillus Subtilis</i> N3-1P	สารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ	Moshtagh และคณะ, 2019
เปลือกส้ม	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> MTCC 2297	แรมโนลิปิด	George และ Jayachandran, 2009

ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

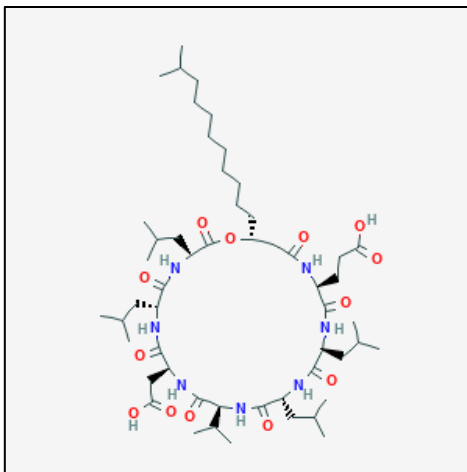
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จุลินทรีย์ผลิตได้มีโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลาย เช่น ไกลโคลิพิด (glycolipids) ลิโปเปปไทด์ (lipopeptides) และฟอสโฟลิพิด (phospholipids) (Merghni และคณะ, 2017) เป็นผลจากการใช้แหล่งอาหารที่ต่างกัน เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสมีโครงสร้างเป็น ไกลโคไลโปโปรตีน (glycolipoprotein) และไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ตามลำดับ (Vecino และคณะ, 2017) นอกจากนี้จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ต่างก็มีองค์ประกอบของเอนไซม์ซึ่งทำให้ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างต่างชนิดกัน (Mouafo และคณะ, 2018) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจัดเป็นสารที่มีประสิทธิภาพที่อุณหภูมิและค่า pH ที่หลากหลาย เหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ (Souza และคณะ, 2017) เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เพื่อเพิ่มความคงตัว รักษาเนื้อสัมผัสและยืดอายุของอาหารจากคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์, อุตสาหกรรมเภสัช โดยใส่ในดินให้พืชสามารถดูดซึมสารอาหารได้เพิ่มขึ้น (Sinumvayo และ Ishimwe, 2015), อุตสาหกรรมยา ในการเคลือบยาเพื่อชะลอการปลดปล่อย (Gawon และคณะ, 2019), อุตสาหกรรมน้ำมัน เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำมัน (Cámara และคณะ, 2019), อุตสาหกรรมสารซักฟอกเพื่อใช้ในการสร้างฟองและกำจัดคราบเปื้อน (Khaje Bafghi และ Fazaelpoor, 2012) และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เนื่องจากไม่ระคายเคืองผิวและเพื่อใช้ก่ออิมัลชัน ลดริ้วรอยและชะลอวัย (Boxley และคณะ, 2015) นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ เช่น การล้างดินที่ปนเปื้อนโลหะหนัก (Jinzhong และคณะ, 2015)



รูปที่ 1.2 ตัวอย่างโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิด ก) แรมโนลิปิด ข) โซโฟโรลิพิด

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/162246>,

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11856871>)



รูปที่ 1.3 ตัวอย่างโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ : เซอร์แฟกติน
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443592#section=Structures>)

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คืออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหาร เนื่องจากมีอิทธิพลต่อจุลินทรีย์ในการริเริ่มกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมคือการใช้ปริมาณของแหล่งคาร์บอนสูงและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนจำกัดเพราะหากมีไนโตรเจนในปริมาณมากจุลินทรีย์จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตมากและไม่เหนียวทำให้เกิดการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ต้องการในอัตราส่วนที่มากนั้นสามารถใช้สารตั้งต้นที่ราคาถูกลงได้ ส่วนแหล่งไนโตรเจนสามารถใช้ได้ทั้งที่เป็นสารประกอบอนินทรีย์ เช่น โซเดียมไนเตรต (NaNO_3) และสารประกอบอินทรีย์ เช่น สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) และยังมีรายงานว่า การใช้สารประกอบทั้ง 2 ชนิดร่วมกันมีประสิทธิภาพดีกว่าใช้ชนิดใดชนิดหนึ่งอีกด้วย นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่น ๆ ที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์และส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ไม่ว่าจะเป็นปัจจัยด้านอุณหภูมิ ค่าพีเอช เวลา ความเร็วในการเขย่า อากาศ และปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Jimoh และ Lin, 2019) อย่างไรก็ตามปัจจัยต่าง ๆ ที่กล่าวข้างต้นต่างก็มีความแตกต่างกันในการใช้กับจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์จึงจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เสมอ

จุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วยแบคทีเรีย รา และ ยีสต์ (Perez-Armendariz และคณะ, 2019) ดังตารางที่ 1.2 แต่ที่มีการศึกษาและผลิตกันเป็นจำนวนมากคือ *Pseudomonas* ssp. และ *Bacillus* ssp. เนื่องจากให้ผลผลิตในปริมาณที่สูง (Alkan และคณะ, 2019) แต่ปัจจุบันมีพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 ทำให้ต้องคำนึงถึงข้อจำกัดทางด้านความปลอดภัยที่เชื้อบางสายพันธุ์อาจก่อโรค (พระราชบัญญัติ, 2558) ดังนั้นการเลือกใช้แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค (Ghasemi และคณะ, 2019)

ตารางที่ 1.2 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ชนิดของ จุลินทรีย์	จุลินทรีย์	ชนิดของ สารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ	อ้างอิง
แบคทีเรีย	<i>Pseudomonas</i> sp. TMB2	แรมโนลิปิด	Haloi และคณะ, 2020
	<i>Bacillus subtilis</i> RSL-2	ลิโปเปปไทด์	Sharma และ Pandey, 2020
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> N2, <i>Lactobacillus cellobiosus</i> TM1, และ <i>Lactobacillus plantarum</i> G88	สารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ	Mouafo และคณะ, 2018
รา	<i>Aspergillus ustus</i> MSF3	ไกลโคไลโฟโปรตีน	Seghal Kirana และคณะ, 2009
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> BWH-1	ไคแรมโนลิปิด	Xu และคณะ, 2019
ยีสต์	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> YK32	สารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ	Sharma และคณะ, 2019
	<i>Candida glabrata</i> UCP 1002	สารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ	Luna และคณะ, 2009
	<i>Pichia anomala</i> PY1	โซโฟโรลิปิด	Thaniyavarn และคณะ, 2008

แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก คือกลุ่มของแบคทีเรียขนาดใหญ่ประกอบด้วยแบคทีเรียหลากหลายสกุล เช่น *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* และ *Leuconostoc* เป็นต้น โดยแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างเป็นแบบกลม (Coccus) หรือแบบแท่ง (Rod) จัดเป็นแบคทีเรียที่มีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) ถูกรับรองโดย FDA (US Food and Drug Administration) โดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตกรดแลคติกเป็นหลัก นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) และ แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) (Souza และคณะ, 2017) ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้มีการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์ดังตารางที่ 1.3

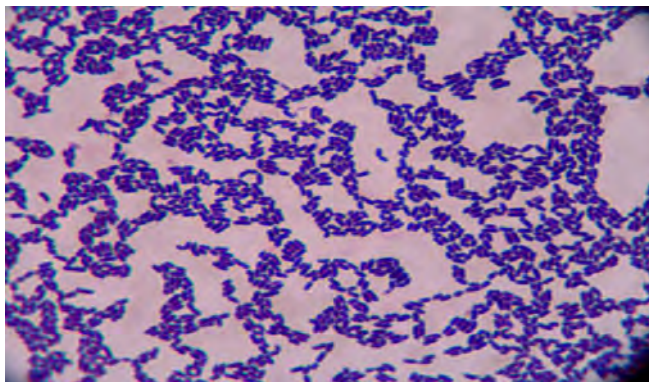
ตารางที่ 1.3 ตัวอย่างการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียผลิตภัณฑ์แลคติกไปใช้ประโยชน์

จุลินทรีย์	ชนิดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	การประยุกต์ใช้	อ้างอิง
<i>Pediococcus acidilactici</i> 27167 และ <i>Lactobacillus plantarum</i> 27172	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	ยับยั้งการเจริญ, ต้านการยึดเกาะ และการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของ <i>Staphylococcus aureus</i> CMCC 26003	Yan และคณะ, 2019
<i>Lactobacillus</i> spp.	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	ยับยั้งการก่อโรคของ <i>Candida albicans</i> ในช่องคลอด	Santos และคณะ, 2019
<i>Weissella cibaria</i>	แบคทีเรียโอซิน	ยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	Abdulkareem Jasim และคณะ, 2010
<i>Lactobacillus reuteri</i> INIA P572	แบคทีเรียโอซิน	ยับยั้งการเจริญของ <i>Clostridium tyrobutyricum</i> ในชีส	Gómez-Torres และคณะ, 2014
<i>Enterococcus faecium</i> และ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	แบคทีเรียโอซิน, วิตามิน บี คอมเพล็กซ์ โฟเลตและไรโบเฟลวิน	ยับยั้งการเจริญของ <i>Salmonella</i> Heidelberg และ <i>Staphylococcus aureus</i> , ใช้เป็นโพรไบโอติกในอาหารสัตว์ปีก	Da Silva Sabo และคณะ, 2020
<i>Lactobacillus fermentum</i>	เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์นม	Ale และคณะ, 2020

แบคทีเรียผลิตภัณฑ์แลคติกสายพันธุ์ *Weissella cibaria*

W. cibaria เป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria, LAB) ที่จัดอยู่ในไฟลัม Firmicutes ชั้น Bacilli อันดับ Lactobacillales วงศ์ Leuconostocaceae สกุล *Weissella* พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น ในดิน พืช ทะเลสาบ น้มนม ช่องปาก ทางเดินอาหาร และ อาหารหมักดอง เป็นต้น โดย *W. cibaria* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างแบบแท่งหรือแบบกลม ไม่สร้างสปอร์ ให้ผลการทดสอบแคตาเลสเป็นลบ ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนประกอบด้วย เปปไทน์ กรดอะมิโน กรดไขมัน กรดนิวคลีอิก น้ำตาล และวิตามิน ในการเจริญเติบโต สามารถหมักน้ำตาลได้หลากหลายชนิดแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (obligately heterofermentative) ซึ่งนอกจากจะผลิตกรดแลคติก ยังผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอลหรือแอซิเตต (Fusco และคณะ, 2015) รวมถึงสามารถผลิตแบคทีริโอซิน (Bacteriocin) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้อีกด้วย (Abdulkareem Jasim และคณะ, 2010) นอกจากนี้ *W. cibaria* ยังเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) และมีรายงานว่า การใช้ความเครียดออกซิเจนที่ละลาย (dissolved oxygen tension) ปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ในการหมักนั้น ให้ผลผลิตมากที่สุดต่อการผลิต weissellin A (Papagianni, 2012) โดยสำหรับงานวิจัยนี้ จะใช้

Weissella cibaria สายพันธุ์ PN3 คัดแยกจากไส้กรอกอีสานในประเทศไทย และพบว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ในการศึกษา (เพ็ญญา บุญจริง, 2015)



รูปที่ 1.4 *W. cibaria* ย้อมแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 1,000 เท่า (Abdulkareem Jasim และคณะ, 2010)

น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร

น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร ประกอบด้วยสารอินทรีย์ในปริมาณสูงเหมาะสำหรับการใช้เป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารต่าง ๆ เช่น กรดอินทรีย์ เอนไซม์ ไบโอฟอลิเมอร์ ไบโอฟูเอล (Lee และคณะ, 2020) รวมถึงสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีรายงานการนำน้ำเสียมาใช้มากมาย เช่น น้ำเสียจากน้ำมันมะกอก (Menesesa และคณะ, 2017) น้ำมันใช้แล้ว และน้ำเสียจากกาแฟ (Yañez-Ocampo และคณะ, 2017) เป็นต้น นอกจากนี้การนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารมาใช้ประโยชน์นี้จัดว่าเป็นการใช้แหล่งอาหารที่มีราคาถูก ช่วยลดต้นทุนการผลิตและเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับน้ำเสีย ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำกะทิและโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากชนไก่ป่นมาใช้เป็นแหล่งอาหารแก่จุลินทรีย์ โดยคาดว่าจะเป็น้ำเสียที่มีประสิทธิภาพต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

กะทิ คือน้ำที่ได้จากการคั้นเนื้อมะพร้าวขาวมีลักษณะเป็นของเหลวสีขาวขุ่น ถูกใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการประกอบอาหารทั้งคาวและหวานนานาชนิด โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการคั้นครั้งแรกเรียกว่า หัวกะทิ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการคั้นครั้งที่ 2 เป็นต้นไป ซึ่งมีความเข้มข้นน้อยกว่าเรียกว่าหางกะทิ ซึ่งในด้านอุตสาหกรรมมีการผลิตเพียงหัวกะทิเท่านั้น ปัจจุบันมีโรงงานอุตสาหกรรมผลิตกะทิหลายแห่งทั่วประเทศและมีกำลังผลิตมากสำหรับการจัดจำหน่ายทั้งภายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ ส่งผลให้มีการปล่อยน้ำเสียปริมาณมาก ทำให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม เช่นเกิดการหมักทำให้เกิดแก๊สชีวภาพส่งกลิ่นเหม็นต่อชุมชนบริเวณรอบข้าง (Karnasuta และคณะ, 2015) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการจัดการหรือลดปริมาณน้ำเสียลง โดยน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำกะทิแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ น้ำเสียจากการล้างเนื้อมะพร้าวขาวด้วยน้ำอ่อนผสมสารฆ่าเชื้อกรดเพอร์ออกซิแอซิดิก ซึ่งเป็นสารฆ่าเชื้อที่สัมผัสกับผิวผลไม้ได้โดยตรงช่วยลดการปนเปื้อนและยืดระยะเวลาเก็บรักษา (จอมขวัญ สุวรรณรักษ์, 2014) โดยน้ำเสียชนิดนี้จะมีสารอาหารน้อยกว่า น้ำเสียชนิดที่ 2 คือน้ำเสียจากขั้นตอนการล้างทำความสะอาดเครื่องจักรทั้งจากการล้างทำความสะอาดเครื่องจักรขณะที่ยังมีน้ำกะทิอยู่ในกระบวนการผลิตและจากการล้างทำความสะอาดเครื่องจักรหลังจากกระบวนการผลิตเสร็จสิ้น (สุภัค โตเจริญทรัพย์, 2014) ซึ่งน้ำเสียชนิดนี้เนื่องจากมีกะทิมสมอยู่จะเกิดการแยกชั้นเป็นชั้นน้ำและชั้นไขมัน

จึงนำชั้นไขมันมาใช้เนื่องจากมีสารอาหารที่มากกว่า โดยในงานวิจัยนี้จะนำน้ำเสียทั้ง 2 ชนิดไปใช้เป็นแหล่งอาหารแก่จุลินทรีย์ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการนำน้ำเสียมาใช้ในการเกิดประโยชน์ เนื่องจากเป็นน้ำเสียที่อุดมด้วยน้ำตาล โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุต่าง ๆ ที่คาดว่าจุลินทรีย์จะสามารถนำไปใช้ได้

ขนไก่ป่น เป็นผลผลิตพลอยได้จากโรงเชือดและชำแหละไก่ มีประโยชน์ในการนำไปทดแทนวัตถุดิบอาหารสัตว์ ประเภทโปรตีนราคาแพง เช่น กากถั่วเหลือง (Sulabo และคณะ, 2013) และปลาป่น ใช้ในการลดต้นทุนการผลิตอาหารสัตว์ แต่เนื่องจากโปรตีนในขนไก่มีคุณภาพต่ำโดยประกอบด้วยเคราตินสูง ซึ่งย่อยได้ยาก และมีกรดอะมิโนจำเป็นปริมาณน้อย จึงต้องใช้ผสมร่วมกับกากถั่วเหลืองหรือปลาป่น ในอัตราส่วนที่ไม่กระทบต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ วิธีการผลิตขนไก่ป่นทำโดยนำขนไก่สดไปย่อยในหม้ออบ ที่อุณหภูมิ 130 ถึง 150 องศาเซลเซียส ความดัน 30 ถึง 50 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 30 ถึง 150 นาที (จิรวัดน์ อรรคไกรสีห์ และจุฑารัตน์ เล้าสุทธิพงษ์, 2019) จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดให้ละเอียด (สุกัญญา จัตตพรพงษ์, 1996) ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากขนไก่ป่น คือ ส่งกลิ่นเหม็นและมีการปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำ ซึ่งน้ำเสียนี้อุดมด้วยโปรตีนและไขมันเป็นองค์ประกอบหลัก โดยน้ำเสียจากโรงงานควรได้รับการจัดการก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำโดยต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดจาก ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรมว่าด้วยเรื่องกำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากโรงงาน ปีพุทธศักราช 2560 ให้มีค่าซีไอดีได้ไม่เกิน 120 มิลลิกรัมต่อลิตร (ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม, 2560)

ภาพรวมของงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารมาใช้ประโยชน์เพื่อลดต้นทุนของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และเป็นแนวทางในการบำบัดน้ำเสียด้วยการใช้ค่าซีไอดีเป็นตัวชี้วัด โดยจะหาความเข้มข้นและชนิดของน้ำเสียในอุตสาหกรรมอาหารซึ่งประกอบด้วยหางกะทิ น้ำเสียจากโรงงานผลิตกะทิ และน้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากขนไก่ป่น ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้ *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 รหัส MSCU 0840 จากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (MSCU Microbial Culture Collection) นอกจากนี้ผู้วิจัยเลือกใช้การตรึงเซลล์บนวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุน (cubic sponges) เป็นที่อยู่ให้กับเซลล์ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ เนื่องจากเป็นรูพรุนและดูดซับน้ำได้ไม่ล้นบนผิวน้ำช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเซลล์กับอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เซลล์ได้รับอาหารอย่างทั่วถึงและเพิ่มอัตราการอยู่รอด นอกจากนี้วัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนสามารถนำมาใช้ผลิตซ้ำได้ และมีราคาต่อหน่วยถูก จึงเป็นการลดต้นทุนในการผลิตลง เมื่อทราบความเข้มข้นและชนิดของน้ำเสียในอุตสาหกรรมอาหารที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้ว นำมาทดสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 3 ประการคือ ค่าแรงตึงผิว ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ และค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน รวมถึงวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวิเคราะห์ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต เพื่อทราบถึงประสิทธิภาพและทำนายชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1.2.1 หาความเข้มข้นและชนิดของน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ
- 1.2.2 ทดสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ
- 1.2.3 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1 สามารถนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารมาใช้เป็นแหล่งอาหารในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อแบคทีเรียเพื่อลดต้นทุนในการผลิต
- 1.3.2 สามารถบำบัดน้ำเสียโดยทำให้มีค่าซีโอดีลดลงได้

บทที่ 2

อุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. วัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุน (Aquaporous gel, Cubic sponges) ของบริษัท GSI Creos, Thailand
2. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX, USA
3. กระจกบอเคนติฟิวจ์ (Centrifuge ware) ของบริษัท Nalgene, USA
4. ขวดแก้วฝาเกลียว (Vial) ของบริษัท Lab System, Thailand
5. ไมโครปิเปต (Micropipette) ของบริษัท Eppendorf, Thailand
6. เครื่องชั่งหยาบ (Laboratory balance) รุ่น PG 2002-S และรุ่น PG 6002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
7. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Analytical balance) และรุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
8. เครื่องคนแม่เหล็ก หรือเครื่องระเหยสาร (Magnetic Stirrer) รุ่น HS10-2 ของบริษัท Torrey pines Scientific, USA
9. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J., USA
10. เครื่องล้างทำความสะอาดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Elmasonic E Ultrasonic Cleaning รุ่น E30H), Germany
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated micro-centrifuge) รุ่น 6500 ของบริษัท Kubota, Japan
12. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific industries, USA
13. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น MP125 ของบริษัท Mettler Toledo Co.,Ltd., Switzerland
14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Scientific, USA
15. เตาย่อยสาร (COD reactor) ของบริษัท HACH, USA
16. เครื่องวัดค่าซีโอดี ของบริษัท Hanna instruments, Italy
17. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ของบริษัท PYREX, USA
18. ตู้ดูดควัน (Fumehood) รุ่น Airone 12009s ของบริษัท Safelab systems, England
19. ตู้ปลอดเชื้อแบบ laminar flow ISSCO รุ่น BV-124 ของบริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand
20. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany
21. ตู้อบแห้ง (Hot air oven) รุ่น Series 5 ของบริษัท Contherm Scientific Ltd., New Zealand
22. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Kogyo Co.,Ltd., Japan และรุ่น HV- ของบริษัท HIRAYAMA, Japan

23. ตู้แช่เย็น (Refrigerated showcase) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รุ่น SPE-0753D11A ของบริษัท Sanden Intercool, Thailand
24. เครื่องวัดแรงตึงผิว (tensiometer) รุ่น K100 บริษัท Kruss, Germany
25. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น R-300 ของบริษัท BUCHI, Switzerland

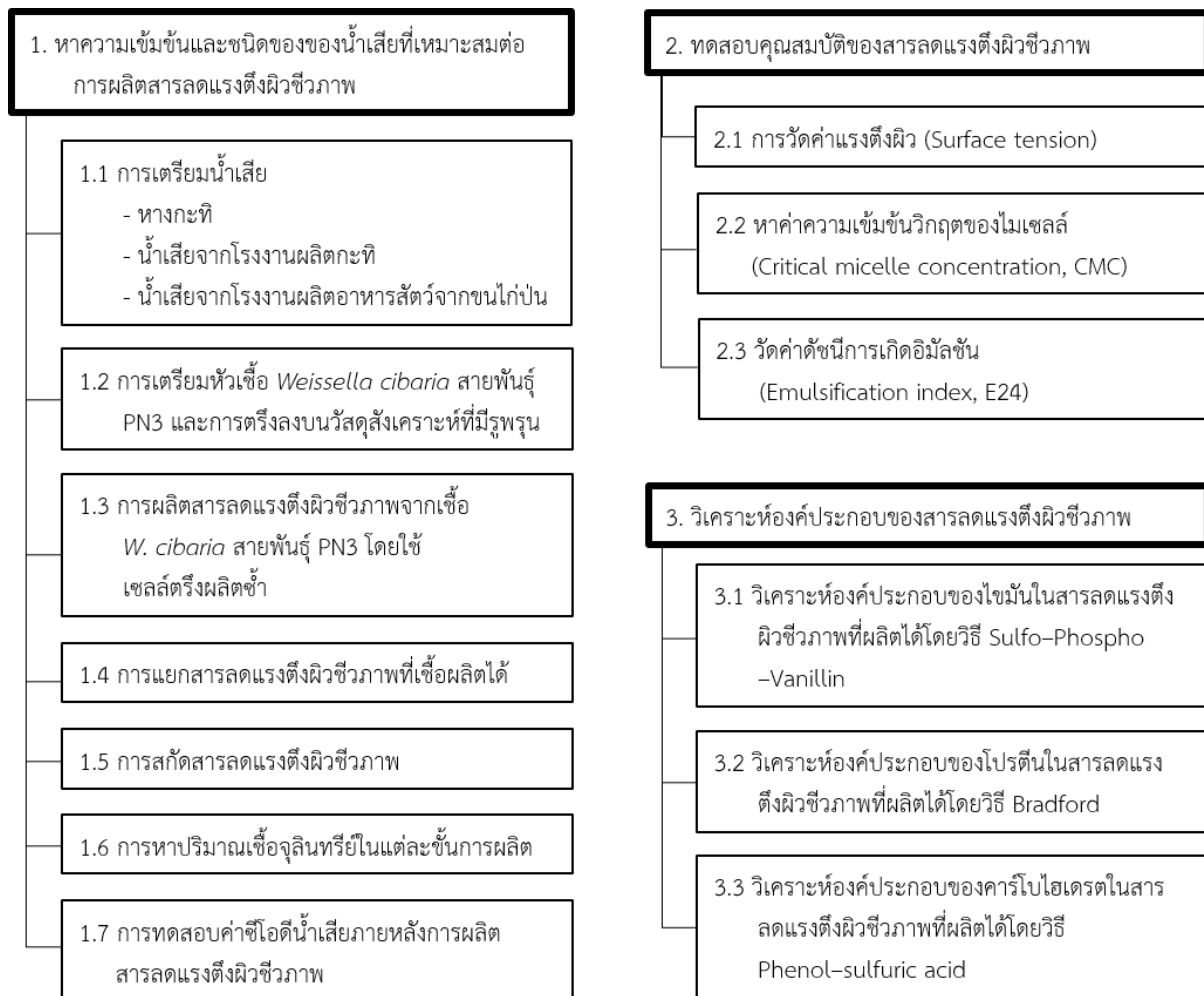
2.2 เคมีภัณฑ์

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (Luria-Bertani) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ของบริษัท Difco Laboratories, USA
4. แบทโตอะการ์ (Bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
5. น้ำมันถั่วเหลือง ตราอรุณ, Thailand
6. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ของบริษัท RCI Labscan, Thailand
7. เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
8. โซเดียมไนเตรท (Sodium nitrate) ของบริษัท VWR chemicals, Belgium
9. โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท VWR chemicals, Belgium
10. ไดโพแทสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
11. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
12. แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck, Germany
13. แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck, Germany
14. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract Powder) ของบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
15. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd., New Zealand
16. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (35% w/w) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
17. กรดฟอสฟอริก ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
18. วานิลลิน (Vanillin) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
19. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
20. Coomassie Brilliant Blue G ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA
21. ชุดทดสอบค่าซีไอดี ของบริษัท Hanna instruments, Italy
22. หางกะทิ จากตลาดวัดพุทธี จังหวัดนนทบุรี, Thailand
23. น้ำเสีย จากโรงงานผลิตกะทิ บริษัทอำพลฟู้ดส์ โพรเซสซิง จำกัด, Thailand
24. น้ำเสีย จากโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากขนไก่ป่น, Thailand

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

งานวิจัยนี้มีแผนผังแสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนผังแสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.1 หาความเข้มข้นและชนิดของของน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

3.1.1 การเตรียมน้ำเสีย

3.1.1.1 หางกะทิ

ในเบื้องต้นใช้หางกะทิเป็นตัวแทนของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร โดยนำหางกะทิที่ประกอบด้วยโปรตีน น้ำมัน น้ำตาล และสารอาหารอื่น ๆ มาทดสอบซีไอทีหรือค่าของปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอินทรีย์ภายในน้ำสูง จากนั้นเจือจางหางกะทิให้มีค่าซีไอทีเป็น 1 และ 3 เท่าของค่าซีไอทีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเบซัลปกติ เพื่อใช้ในการเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อเหลวเบซัลที่ใช้หางกะทิแทนกลูโคสและน้ำมันถั่วเหลืองในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



รูปที่ 3.2 หางกะทิจากตลาดวัดพุฒิจังหวัดนนทบุรี

3.1.1.2 น้ำเสียจากโรงงานผลิตกะทิ

นำน้ำเสียจากโรงงานผลิตกะทิ บริษัทอำพลฟู้ดส์ โพรเซสซิง จำกัด มาทดสอบซีไอทีเพื่อหาปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียแต่ละชนิด จากนั้นออกแบบการทดลองโดยใช้น้ำเสีย 2 ชนิดประกอบด้วยน้ำอ่อนที่ผสมสารฆ่าเชื้อ และน้ำเสียชั้นไขมันจากการล้างทำความสะอาดเครื่องจักร ซึ่งในการเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อเหลวเบซัลด้วยน้ำเสียสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ น้ำเสียชนิดแรกจะมีการเติมน้ำมันถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร ซึ่งเป็นหนึ่งในสารตั้งต้นของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มเติม เนื่องจากเริ่มต้นมีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำ ส่วนน้ำเสียชนิดที่สองจะไม่มีการเติมน้ำมันถั่วเหลืองเพิ่ม เนื่องจากมีปริมาณสารอินทรีย์และน้ำมันในปริมาณมากแล้ว



ก



ข



ค

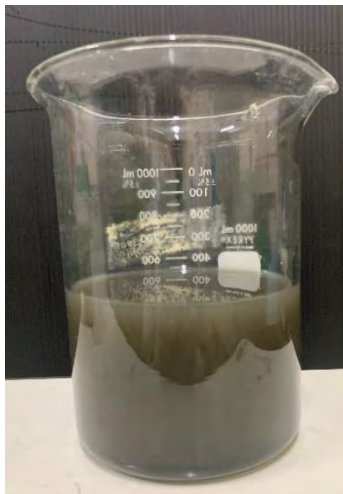


ง

รูปที่ 3.3 น้ำเสียและบริเวณที่เก็บน้ำเสียโรงงานผลิตกะทิ บริษัทอำพลฟู้ดส์ โพรเซสซิง จำกัด
 ก) น้ำอ่อน ข) น้ำเสียที่เป็นชั้นไขมัน
 ค) บริเวณที่เก็บน้ำอ่อน ง) บริเวณบ่อที่เก็บน้ำเสียที่เป็นชั้นไขมัน

3.1.1.3 น้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากขี้ไก่ป่น

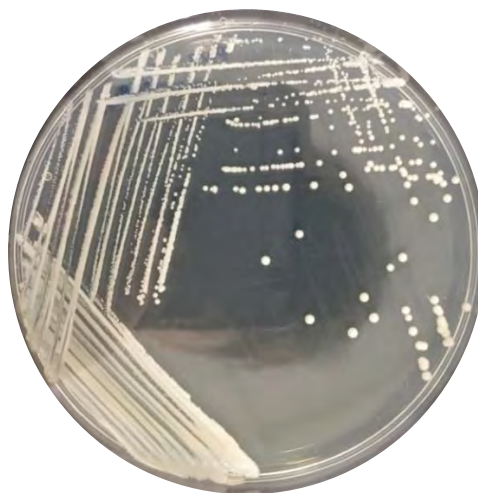
นำน้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากขี้ไก่ป่นมาทดสอบซีไอดี จากนั้นแบ่งการทดลองเป็น 2 สภาวะคือ น้ำเสียโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากขี้ไก่ป่นที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร และที่ไม่เติมน้ำมันถั่วเหลืองเพื่อใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



รูปที่ 3.4 น้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากขี้ไก่ป่น

3.1.2 การเตรียมหัวเชื้อ *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 และตรึงลงบนวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุน

นำเชื้อแบคทีเรีย *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 รหัส MSCU 0840 จากคลังจุลินทรีย์ภาคจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (MSCU Microbial Culture Collection) มาซัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว (Ghasemi และคณะ, 2018) จากนั้นนำเชื้อปริมาณเต็มลูบไปถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ แล้วนำไปบ่มแบบเขย่าบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 จากนั้นนำหัวเชื้อปริมาณ 10 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มีวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนหรือ Aquaporous gel จากบริษัท Nisshinbo 1.8 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปบ่มแบบเขย่าบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (บุญยานุช สุภัทรกุล, 2018)



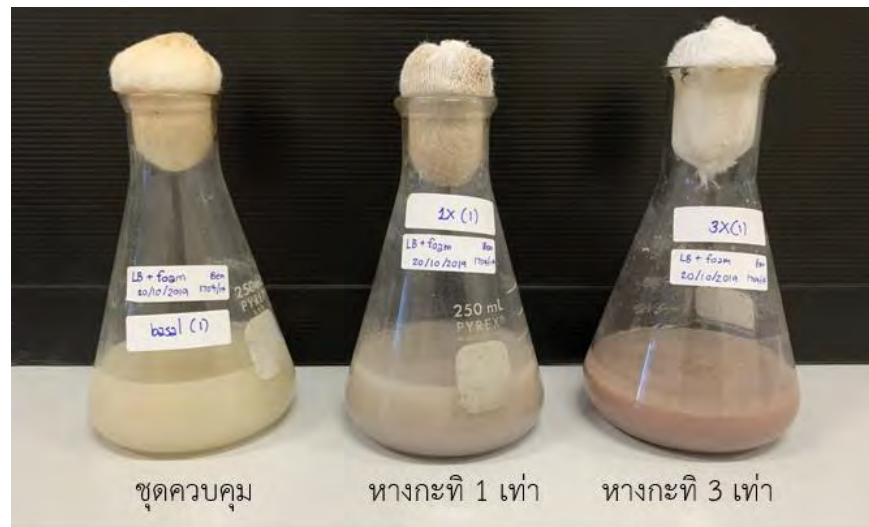
รูปที่ 3.5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *W. cibaria* สายพันธุ์ PN3 รหัส MSCU 0840 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด MRS



รูปที่ 3.6 วัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนสำหรับตรึงเชื้อจุลินทรีย์ Aquaporous gel

3.1.3 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *W. cibaria* สายพันธุ์ PN3 โดยใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำ

ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB จากข้อ 3.1.2 เป็นอาหารที่เตรียมไว้จากข้อ 3.1.1 โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเบซัลที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองปริมาตร 2 มิลลิลิตร และมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นชุดควบคุม จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมไปสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และนำส่วนวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนมาเติมอาหารสภาวะเดิม 100 มิลลิลิตร เพื่อผลิตซ้ำโดยนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (บุญยานุช สุภัทรกุล, 2018) โดยเมื่อครบกำหนดในแต่ละรอบจะเก็บส่วนน้ำเลี้ยงไว้สำหรับการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเก็บวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนสำหรับการหาปริมาณเซลล์



รูปที่ 3.7 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยหางกะทิ



รูปที่ 3.8 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยน้ำเสียจากโรงงานผลิตกะทิ และโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากขนไก่ปน

3.1.4 การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เชื้อผลิตได้

นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ในแต่ละรอบการผลิตมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนน้ำใสที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์และส่วนตะกอนเซลล์ที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ออกจากกัน (Joy และคณะ, 2019)

3.1.4.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ : นำส่วนน้ำใสมาสกัดน้ำมันโดยนำมาใส่ในกรวยแยกสาร (Separatory funnel) แล้วเติมเฮกเซน (Hexane) 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นเก็บส่วนชั้นน้ำด้านล่างมาปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 2 เพื่อตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Gudiña และคณะ, 2010)

3.1.4.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ : นำส่วนตะกอนเซลล์มาแยกสารลดแรงตึงผิวออกโดยเติมสารละลายเมทานอล 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเก็บส่วนน้ำใสไว้ (บุญยานุช สุภัทรกุล, 2018)

3.1.5 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารละลายจากข้อ 3.1.4.1 และ 3.1.4.2 มาเติมสารละลายคลอโรฟอร์มและเมทานอล อัตราส่วน 2:1 ในอัตราส่วน 1:1 (Joy และคณะ, 2017) และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแยกในกรวยแยกสาร ไซส่วนล่างเก็บในขวดรูปชมพู่ขนาด 150 มิลลิลิตร และนำไปประเหยจนแห้งแล้วชะสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพด้วยเมทานอล ลงในกระถางฟอยล์ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (บุญยานุช สุภัทรกุล, 2018) แล้วนำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในแต่ละสภาวะ โดยเลือกสภาวะที่ให้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดไปทดสอบคุณสมบัติและวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในข้อที่ 3.2 และ 3.3 ต่อไป

3.1.6 การหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นการผลิต

นำส่วนวัสดุสังเคราะห์ที่มีรุกรุ่นในขั้นการตรึงเชื้อจุลินทรีย์ในข้อ 3.1.3 และในแต่ละรอบการผลิตในข้อ 3.1.4 อย่างละ 1 ชิ้นมาตัดเป็น 4 ส่วนลงในขวดไวแอล (Vial) จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวด และนำไปใส่เครื่องโซนิเคเตอร์ (Sonicator) เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกมาจากวัสดุสังเคราะห์ที่มีรุกรุ่น

จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) บน 96 well plate โดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมแล้วจึงนำเซลล์แขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมไว้มาเติมลงในแถวแรกตัวอย่างละ 3 ช่อง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเจือจาง 10 เท่าจนถึงหลุมสุดท้าย และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและอ่านผลด้วยตาราง MPN (Oblinger และ Koburger, 1975) นอกจากนี้นำวัสดุสังเคราะห์ที่มีรุกรุ่นใส่ลงในกระถางฟอยล์ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน แล้วนำไปอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด เมื่อทราบน้ำหนักของวัสดุสังเคราะห์ที่มีรุกรุ่นแล้วจึงคำนวณกับค่า MPN ให้เป็นหน่วย ลอการิทึม MPN ต่อกรัม

3.1.7 การทดสอบค่าซีไอดีน้ำเสียภายหลังการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำส่วนน้ำใสหลังจากปั่นเหวี่ยงเซลล์ออกครั้งแรกจากข้อ 3.1.4 มาทดสอบค่าซีไอดีภายหลังการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อศึกษาแนวทางในการบำบัดน้ำเสียนอกจากการใช้เป็นแหล่งอาหารในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์เพียงอย่างเดียว

3.2 ทดสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.2.1 การวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

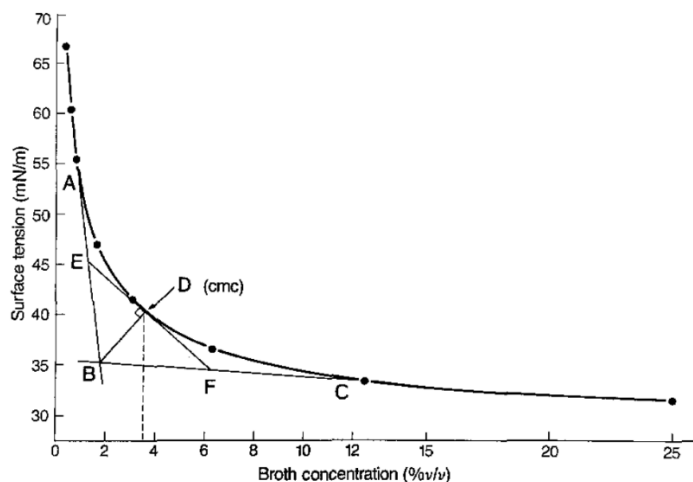
นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสกัดหยาบมาวัดค่าแรงตึงผิว โดยใช้เครื่อง Tensiometer (Kruss, K100) ที่อุณหภูมิห้อง โดยเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น (Rahman และคณะ, 2010)



รูปที่ 3.9 เครื่อง Tensiometer (Kruss, K100)

3.2.2 หาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสกัดหยาบมาทำให้มีความเข้มข้น 0.01 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ จากนั้นวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่อง Tensiometer (Kruss, K100) แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวและค่าลอการิทึมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นวิเคราะห์กราฟโดยการหาจุดตัดเพื่อให้ได้ค่า CMC ซึ่งบ่งบอกถึงความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ำที่สุดในการเกิดไมเซลล์ดังรูปที่ 3.10 (Gudiña และคณะ, 2010)



รูปที่ 3.10 วิธีการหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์

ค่า CMC คำนวณโดยหาเส้นสัมผัส AB และ BC ด้วยสมการถดถอยเชิงเส้นเพื่อหาจุดตัด B

เมื่อกำหนดให้

$$\text{เส้นสัมผัส AB : } y_1 = b_1x_1 + a_1$$

$$\text{เส้นสัมผัส BC : } y_2 = b_2x_2 + a_2$$

เมื่อเกิดจุดตัด B จะได้

$$b_1x_1 + a_1 = b_2x_2 + a_2 \quad \text{เมื่อ } y_1 = y_2$$

$$b_1x_1 - b_2x_2 = a_2 - a_1$$

$$x(b_1 - b_2) = a_2 - a_1 \quad \text{เมื่อ } x_1 = x_2$$

$$x = (a_2 - a_1) / (b_1 - b_2)$$

จุดตัด B จึงเท่ากับ $(a_2 - a_1) / (b_1 - b_2)$

เมื่อลากเส้นตรง BD ผ่านจุด B ให้ตั้งฉากกับเส้นสัมผัส EF ที่จุด D แล้วลากมาตัดแกน X ค่าที่ได้คือค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ และเมื่อลากมาตัดแกน Y ค่าที่ได้คือค่าแรงตึงผิว ณ จุดของการเกิดไมเซลล์ (Sheppard และ Mulligan, 1987)

3.2.3 วัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsification index, E24)

การวัดความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการเกิดอิมัลชันโดยเปรียบเทียบกับน้ำมันมะพร้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันงา น้ำมันหอมระเหย กลิ่นลาเวนเดอร์ และน้ำมันหอมระเหย กลิ่นโรสแมรี่ โดยเติมน้ำมันชนิดต่าง ๆ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดแก้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสกัดหยาบ 500 ไมโครลิตรลงไปและใช้เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ความขุ่นของอิมัลชันโดยคำนวณจากสมการที่ 3.1 (Mouafo และคณะ, 2018) จากนั้นจึงนำค่า E24 มาเปรียบเทียบกับความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการก่ออิมัลชันในน้ำมันแต่ละชนิด

$$E_{24} = \frac{H_{emulsion}}{H_{total}} \times 100$$

สมการที่ 3.1 การคำนวณค่า E24

เมื่อ	E 24	คือ ความเสถียรของอิมัลชัน
	$H_{emulsion}$	คือ ความสูงของชั้นอิมัลชัน
	H_{total}	คือ ความสูงของของเหลวทั้งหมด

3.3 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยวิธี Sulfo-Phospho-Vanillin

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสกัดหยาบ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง และนำน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองอีกหลอด (ชุดควบคุม) จากนั้นนำทั้ง 2 หลอดมาเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และนำไปต้มในอ่างน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 5 นาที ในอ่างน้ำอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมกรดฟอสฟอริก-วานิลลิน (Phosphoric acid-vanillin reagent) 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดทดลองไปตั้งให้เย็นเป็นเวลา 10 นาที ในอ่างน้ำอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร แล้วคำนวณจากกราฟมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณไขมัน (Izard และคณะ, 2003)

3.3.2 วิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยวิธี Bradford

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสกัดหยาบ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Coomassie Brilliant Blue ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (เพ็ญญา บุญจริง, 2015)

3.3.3 วิเคราะห์องค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยวิธี Phenol-sulfuric acid

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสกัดหยาบ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายฟีนอล 25 ไมโครลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร (Zhang และคณะ, 2012)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบเบื้องต้นในการใช้หางกะทิเป็นตัวแทนของน้ำเสียในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้หางกะทิเป็นแหล่งอาหาร

จากการวิเคราะห์ค่าซีโอดีของหางกะทิ พบว่ามีค่าเท่ากับ 305,162 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่มีกลูโคสและน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน (ชุดควบคุม) มีค่าเท่ากับ 79,867 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเมื่อทราบค่าดังกล่าวแล้วนำมาคำนวณเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่ใส่สารอาหารเหมือนกับชุดควบคุมแต่ใช้หางกะทิแทนกลูโคสและน้ำมันถั่วเหลืองในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเจือจางหางกะทิด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าซีโอดีเป็น 1 เท่า และ 3 เท่า ของชุดควบคุมจึงมีค่าซีโอดีเริ่มต้นเท่ากับ 79,867 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 239,601 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

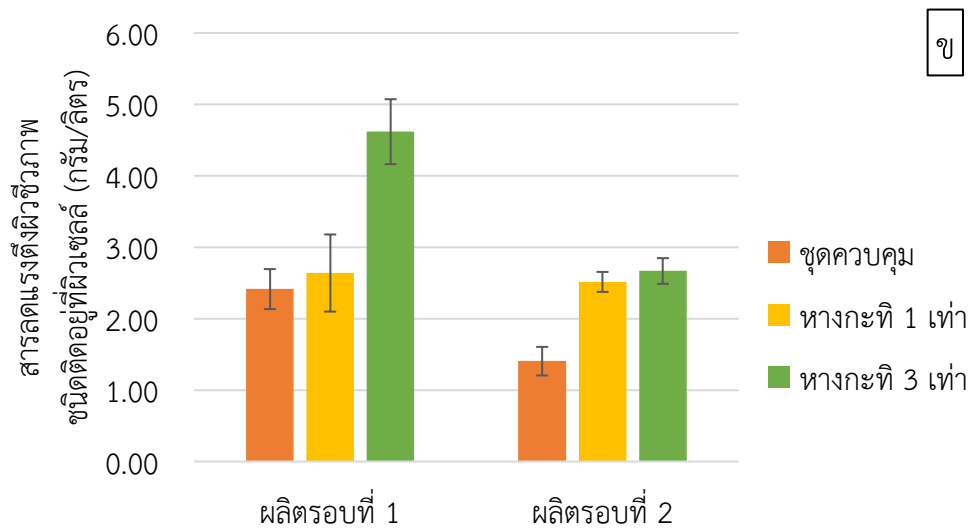
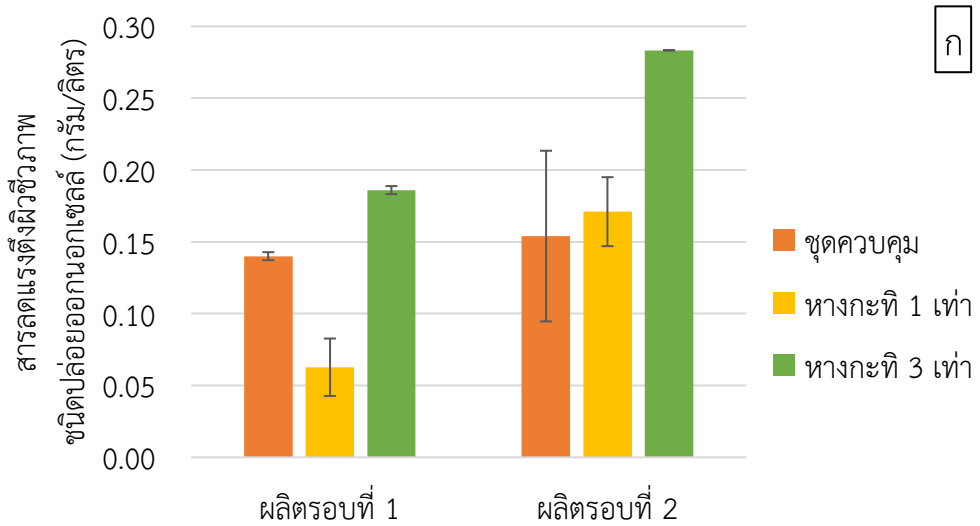
4.1.2 การเลือกปริมาณหางกะทิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การทดลองนี้เลือกปริมาณการใช้หางกะทิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยพิจารณาจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ความสามารถในการใช้เซลล์ตรึงซ้ำ และประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

4.1.2.1 เปรียบเทียบปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ *W. cibaria* สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึงผลิตได้เมื่อใช้หางกะทิเป็นแหล่งอาหาร

เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากข้อที่ 4.1.1 ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *W. cibaria* สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึงบน aquaporous gel พบว่าชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสและน้ำมันถั่วเหลืองทั้งสองชุดการทดลองสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ทั้งสองชนิด คือ ชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ พบว่าชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิ 1 เท่าและ 3 เท่าในรอบการผลิตที่ 1 มีปริมาณ 0.06 กรัมต่อลิตร และ 0.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนในรอบการผลิตที่ 2 มีปริมาณ 0.17 กรัมต่อลิตร และ 0.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อผลิตในรอบที่ 2 (รูปที่ 4.1 ก.) และแสดงถึงประสิทธิภาพของการใช้เซลล์ตรึงซ้ำ ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมพบว่าทั้งชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิ 1 เท่า และ 3 เท่า มีปริมาณที่มากกว่าโดยมีปริมาณ 2.64 กรัมต่อลิตร และ 4.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับในรอบการผลิตที่ 1 และมีปริมาณ 2.51 กรัมต่อลิตร และ 2.67 กรัมต่อลิตร ตามลำดับในรอบการผลิตที่ 2 (รูปที่ 4.1 ข.) โดยจากการเปรียบเทียบปริมาณการใช้หางกะทิต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้ ชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิ 3 เท่าสามารถผลิตได้มากกว่าทั้งชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิ 1 เท่า ดังนั้นจึงจัดว่าที่ค่าซีโอดีของหางกะทิ 3 เท่า มี

ปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพต่อการนำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุด



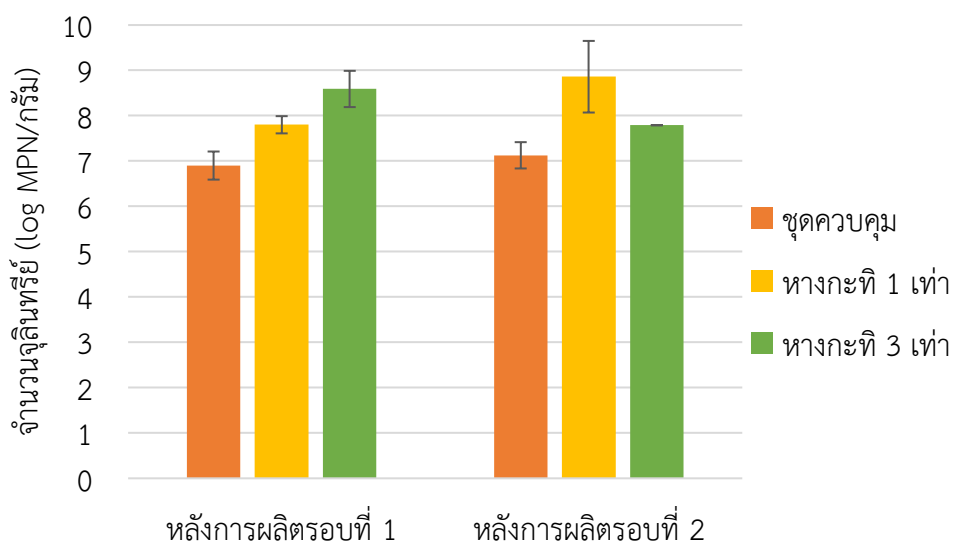
รูปที่ 4.1 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการผลิตด้วยหางกะทิ

ก) ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์

ข) ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์

4.1.2.2 จำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นการทดลองเมื่อใช้หางกะทิเป็นแหล่งอาหาร

จากการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงอยู่ในวัสดุตรึงโดยวิธี MPN ภายหลังการผลิตรอบที่ 1 และรอบที่ 2 พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงอยู่ในวัสดุตรึงของชุดควบคุมมีค่าประมาณ $\log 7$ MPN ต่อกรัม ซึ่งน้อยกว่าในชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิ 1 เท่าและ 3 เท่า (รูปที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่าสารอาหารต่าง ๆ ในหางกะทิสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มากกว่า โดยในชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิ 1 เท่า พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่พบหลังการผลิตรอบที่ 1 มีค่าเท่ากับ $\log 7.8$ MPN ต่อกรัมและเพิ่มขึ้นเป็น $\log 8.86$ MPN ต่อกรัมในรอบการผลิตที่ 2 ในขณะที่ชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิ 3 เท่า พบว่าจำนวนจุลินทรีย์หลังการผลิตรอบที่ 1 มีค่าเท่ากับ $\log 8.59$ MPN ต่อกรัมและลดลงเป็น $\log 7.79$ MPN ต่อกรัมในรอบการผลิตที่ 2 ทั้งนี้อาจเกิดจากความเข้มข้นที่มากขึ้นในชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิ 3 เท่า ทำให้อาหารมีความหนืดและสามารถเข้าไปอุดตันบริเวณรูพรุนของวัสดุตรึง ซึ่งอาจจะส่งผลให้ออกซิเจนในระบบไม่เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในระบบ จำนวนเซลล์จึงมีปริมาณที่ลดลง อย่างไรก็ตามจำนวนจุลินทรีย์ของชุดทดลองที่ใช้หางกะทิเป็นสารอาหารยังคงมีปริมาณที่มากกว่าในชุดควบคุม นอกจากนี้ปริมาณจำนวนเซลล์ดังกล่าวยังสามารถทำให้เกิดการผลิตซ้ำในระบบได้อีกด้วย นอกจากนี้จำนวนจุลินทรีย์ยังมีความสอดคล้องกับปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยในรอบการผลิตที่ 1 จะเห็นได้ว่าให้ผลไปในทางเดียวกัน แต่ในรอบการผลิตที่ 2 กลับให้ผลที่แตกต่างกันเมื่อชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิ 3 เท่ามีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงน้อยกว่าชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิ 1 เท่าแต่กลับให้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่มากกว่า ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้จากการที่จุลินทรีย์หลุดออกจากวัสดุตรึงและผลิตสารลดแรงตึงผิวอยู่ในระบบ ดังนั้นการวัดจำนวนจุลินทรีย์จากวัสดุตรึงจึงมีปริมาณที่ต่ำลง



รูปที่ 4.2 จำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละรอบการผลิตเมื่อใช้หางกะทิเป็นแหล่งอาหาร

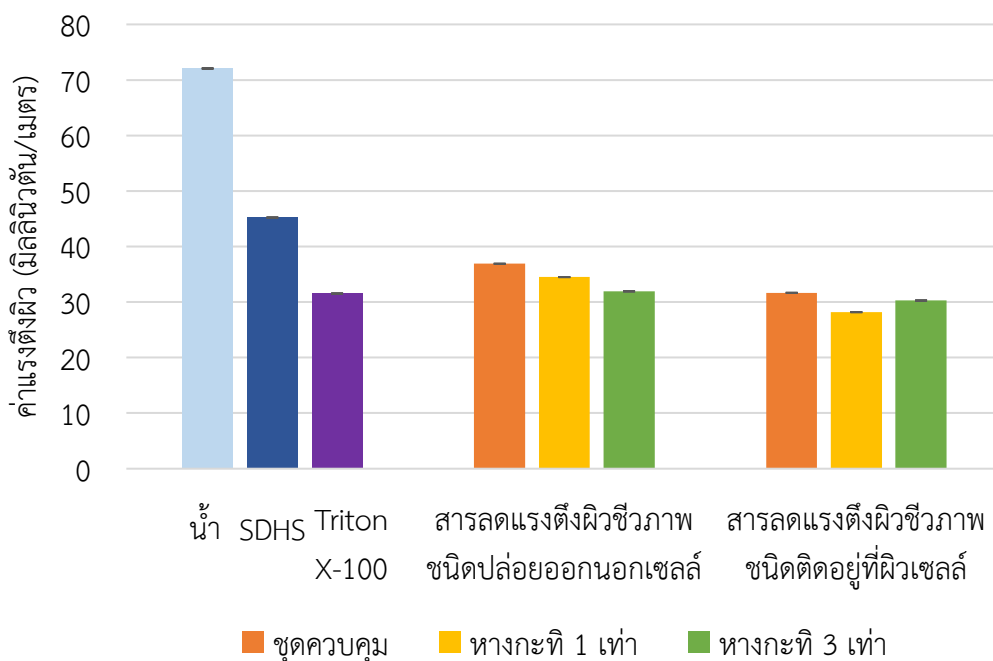
4.1.2.3 ประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดยใช้หางกะทิเป็นแหล่งอาหาร

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเครื่อง Tensiometer เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ได้แก่ sodium dehexyl sulfosuccinate (SDHS) และ TritonX-100 ที่ค่า CMC ของสาร พบว่า SDHS และ TritonX-100 สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำได้เท่ากับ 45.23 มิลลินิวตันต่อเมตร และ 31.54 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ สำหรับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการผลิตโดยใช้หางกะทิเป็นแหล่งอาหาร เนื่องจากการทดสอบในเบื้องต้นซึ่งไม่ได้หาค่า CMC ดังนั้นจึงนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสกัดหยาบที่ผลิตได้มาละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาลินในปริมาณที่แตกต่างกันเพื่อปรับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดให้มีค่าเท่ากันในแต่ละชุดการทดลองของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิด เนื่องจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ของชนิดปล่อยออกนอกเซลล์และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์มีค่าต่างกันอย่างมาก ดังนั้นจึงเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสารแต่ละชนิดแยกกัน

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์เมื่อปรับความเข้มข้นแล้วมีค่าเท่ากับ 0.26 กรัมต่อลิตรนำไปวัดค่าแรงตึงผิว ให้ผลดังที่แสดงในรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิเป็นแหล่งอาหารมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวได้ดีกว่าชุดควบคุม โดยในชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิ 1 เท่า และหางกะทิ 3 เท่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์มี ค่าแรงตึงผิว 36.91 มิลลินิวตันต่อเมตร 34.50 มิลลินิวตันต่อเมตร และ 31.93 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ

ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์เมื่อปรับความเข้มข้นแล้วมีค่าเท่ากับ 5.39 กรัมต่อลิตร ให้ผลในการทำงานเดียวกันคือสามารถลดแรงตึงผิวได้ดีกว่าชุดควบคุม โดยมีค่าแรงตึงผิว 31.67 มิลลินิวตันต่อเมตร 28.18 มิลลินิวตันต่อเมตร และ 30.28 มิลลินิวตันต่อเมตร ในชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิ 1 เท่า และหางกะทิ 3 เท่า ตามลำดับ ซึ่งมีใกล้เคียงกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ TritonX-100 นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะพบว่าแม้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จะลดแรงตึงผิวได้มากกว่าชนิดปล่อยออกนอก แต่ที่ใช้ในปริมาณที่มากกว่ามาก ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ที่ความเข้มข้นเพียง 0.26 กรัมต่อลิตร ก็สามารถลดแรงตึงผิวได้ใกล้เคียงกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ TritonX-100 แล้ว อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้งสองชนิดที่นำมาวัดอาจเป็นความเข้มข้นที่มากกว่าหรือน้อยกว่าค่า CMC จริงของสาร กล่าวคือค่าแรงตึงผิวที่วัดได้อาจมีค่าเป็นดังรูปที่ 4.3 หรือน้อยกว่า และเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ซึ่งคาดว่ามีประสิทธิภาพที่ดีกว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์ลดแรงตึงผิวได้มากที่สุดในการทดลองที่ใช้หางกะทิ 3 เท่าเป็นแหล่งอาหารและเป็นชุดการทดลองที่มีค่าซีไอดีสูง รวมถึงผลจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ก็มีค่ามากที่สุด

และจำนวนเซลล์ในแต่ละรอบการผลิตที่มีปริมาณไม่น้อยเกินไป จึงสรุปผลของการทดสอบเบื้องต้นนี้ได้ว่าชุดการทดลองที่มีค่าซีไอดีสูงมีประสิทธิภาพมากที่สุด และการนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพก็ คาดว่าจะมีประสิทธิภาพที่ไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 4.3 ค่าแรงตึงผิวของน้ำ SDHS TritonX-100 และของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตจากทางกะทิทั้งชนิดปล่อยออกนอกเซลล์และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์

4.2 การนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร

จากการวิเคราะห์ค่าซีไอดีของน้ำเสียจากโรงงานผลิตกะทิ พบว่าน้ำอ่อนที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง มีค่าเท่ากับ 8,765 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำเสียชั้นไขมันมีค่า 183,467 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนค่าซีไอดีของน้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากขนไก่ป่นมีค่า 9,465 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเติมน้ำมันถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตรมีค่า 21,645 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อนำน้ำเสียไปผสมกับสูตรอาหารเบซัลเพื่อใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่ามีค่าซีไอดีเริ่มต้นก่อนผลิตของทั้ง 5 ชุดการทดลอง รวมถึงชุดควบคุมที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่มีกลูโคสและน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าซีไอตีเริ่มต้นก่อนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร

ชุดควบคุม	ค่าซีไอตีก่อนผลิต (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	น้ำเสียโรงงานผลิตกะทิ		น้ำเสียโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากขนไก่ปน	
	น้ำอ่อนที่เติม น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำเสีย ชั้นไขมัน	ไม่เติม น้ำมันถั่วเหลือง	เติม น้ำมันถั่วเหลือง
27,590	44,900	193,050	11,980	28,807.5

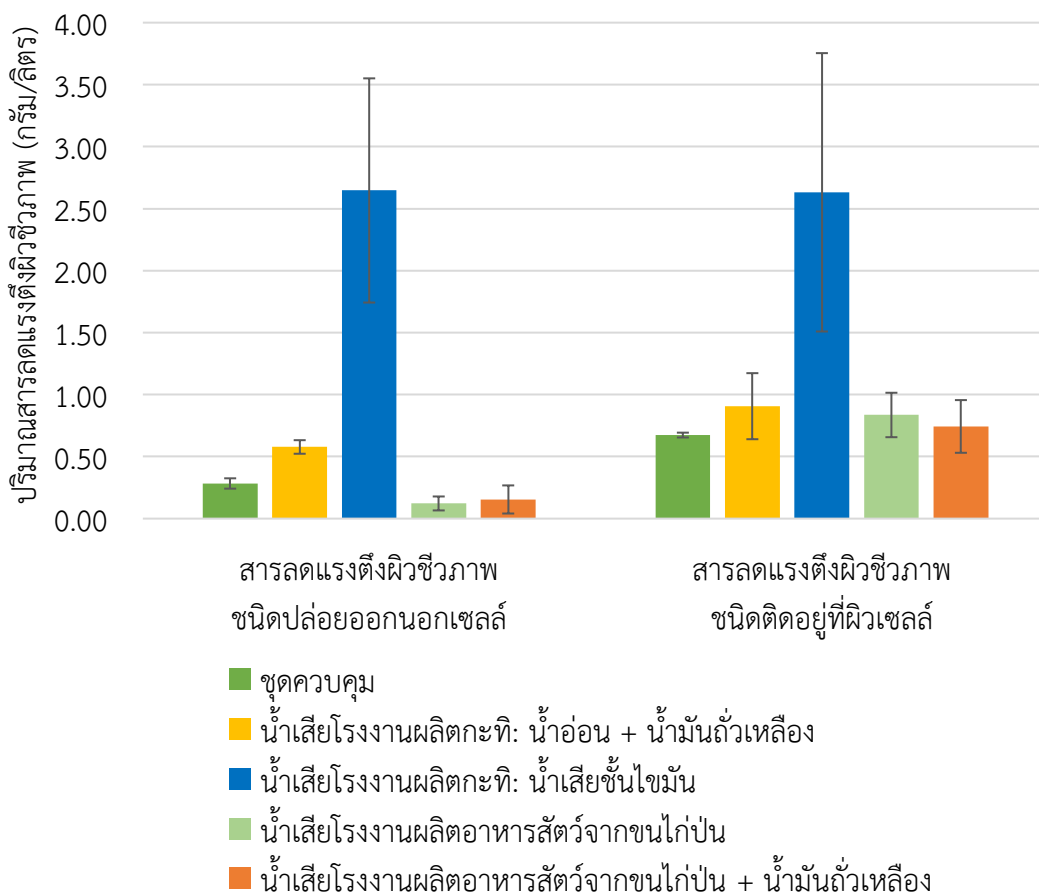
4.2.2 การเลือกชนิดและสถานะของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการบำบัดน้ำเสีย

การเลือกชนิดและสถานะของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้น จะพิจารณาจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ความสามารถในการใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำ และประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับชุดควบคุม รวมถึงพิจารณาค่าซีไอตีสุดท้ายหลังการผลิตเพื่อเป็นแนวทางในการบำบัดน้ำเสีย

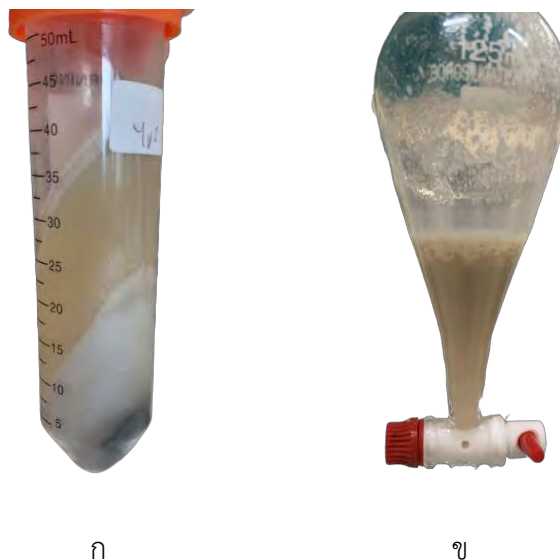
4.2.2.1 เปรียบเทียบปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ *W. cibaria* สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึงผลิตได้เมื่อใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร

เมื่อนำ *W. cibaria* สายพันธุ์ PN3 มาตรึงเซลล์บน aquaporous gel และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมด้วยน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารจากข้อที่ 4.2.1 มาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าสถานะที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้มากที่สุดคือ เมื่อใช้น้ำเสียชั้นไขมันจากโรงงานผลิตกะทิเป็นแหล่งอาหาร โดยผลิตได้มากที่สุดทั้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ มีปริมาณ 2.65 กรัมต่อลิตร และ 2.63 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.4) ซึ่งถึงแม้จะผลิตได้ในปริมาณมากแต่ก็มีค่าคลาดเคลื่อนที่มากด้วยเช่นกัน เนื่องจากไขมันทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความข้นมาก ในขั้นตอนการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงมีความยากลำบาก โดยเมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนน้ำใสที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ และส่วนตะกอนเซลล์ที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์แล้ว ไขมันเกิดการแข็งตัวและปนอยู่ในทั้งสองส่วนดังรูปที่ 4.5 ก. ดังนั้นเมื่อแยกและนำมาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงเกิดการปนเปื้อนมาด้วย ถึงแม้จะสกัดน้ำมัน (รูปที่ 4.5 ข.) และกรองภายหลังการสกัดก่อนนำไปชั่งน้ำหนักแล้วก็ไม่เพียงพอ ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้จึงมีปริมาณมากและค่าไม่คงที่เหมือนกับที่ใช้ใช้น้ำเสียชนิดอื่น ส่วนสถานะที่ผลิตได้รองลงมาคือน้ำอ่อนจากโรงงานผลิตกะทิที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้น้อยกว่าน้ำเสียชั้นไขมัน แต่ก็ยังผลิตได้มากกว่าชุดควบคุมโดยผลิตได้ปริมาณ 0.58 กรัมต่อลิตร และ 0.91 กรัมต่อลิตร ในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ ตามลำดับ ส่วนสถานะที่ใช้ใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากขนไก่ปนทั้งที่เติมและไม่เติมน้ำมันถั่วเหลืองให้ผลที่คล้ายคลึงกัน โดยผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ได้น้อยกว่าชุดควบคุมประมาณครึ่งหนึ่ง และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ผลิตได้มากกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย โดยมีปริมาณ 0.84

กรัมต่อลิตร และ 0.74 กรัมต่อลิตร ในชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์ จากชนไก่ปนที่เต็มและไม่เต็มน้ำมันถั่วเหลือง ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อสังเกตที่ชุดควบคุมของการทดลองนี้เทียบกับชุดควบคุมในข้อที่ 4.1 พบว่ามีปริมาณแตกต่างกันมาก โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นครึ่งหนึ่งจาก 0.14 กรัมต่อลิตรเป็น 0.28 กรัมต่อลิตร และสารลดแรงตึงผิวชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ลดลงจาก 2.41 กรัมต่อลิตรเป็น 0.67 กรัมต่อลิตร โดยเหตุผลที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดขึ้นจากการที่เซลล์ไม่อยู่ในสภาวะที่แอคทีฟเนื่องจากผ่านการต่อเชื้อมาหลายครั้ง หรือเก็บไว้เป็นระยะเวลาานาน และโคโลนีของเชื้อเริ่มต้นที่ใช้มีขนาดเล็กเกินไป ทำให้การทำงานของเซลล์ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีประสิทธิภาพที่เปลี่ยนแปลงไป



รูปที่ 4.4 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์และติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากการผลิตด้วยน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร

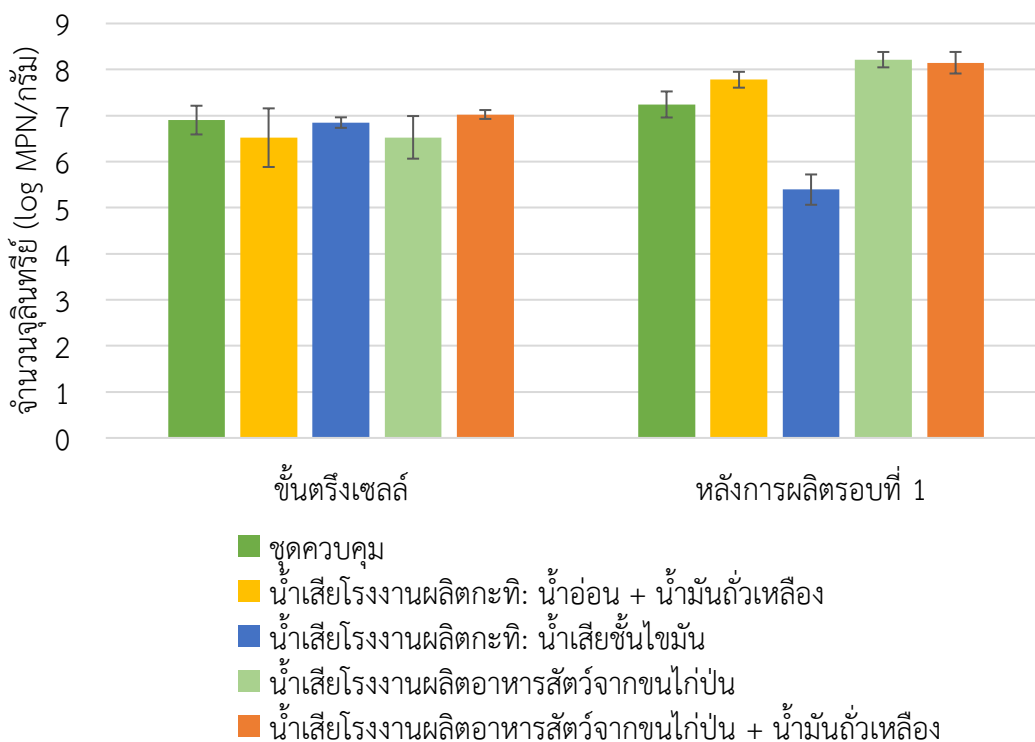


รูปที่ 4.5 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในชุดการทดลองที่ใช้ไขมันชั้นไขมันจาก โรงงานผลิตกะทิเป็นแหล่งอาหาร

ก) การปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ข) การสกัดน้ำมัน

4.2.2.2 จำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละชั้นการทดลองเมื่อใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็น แหล่งอาหาร

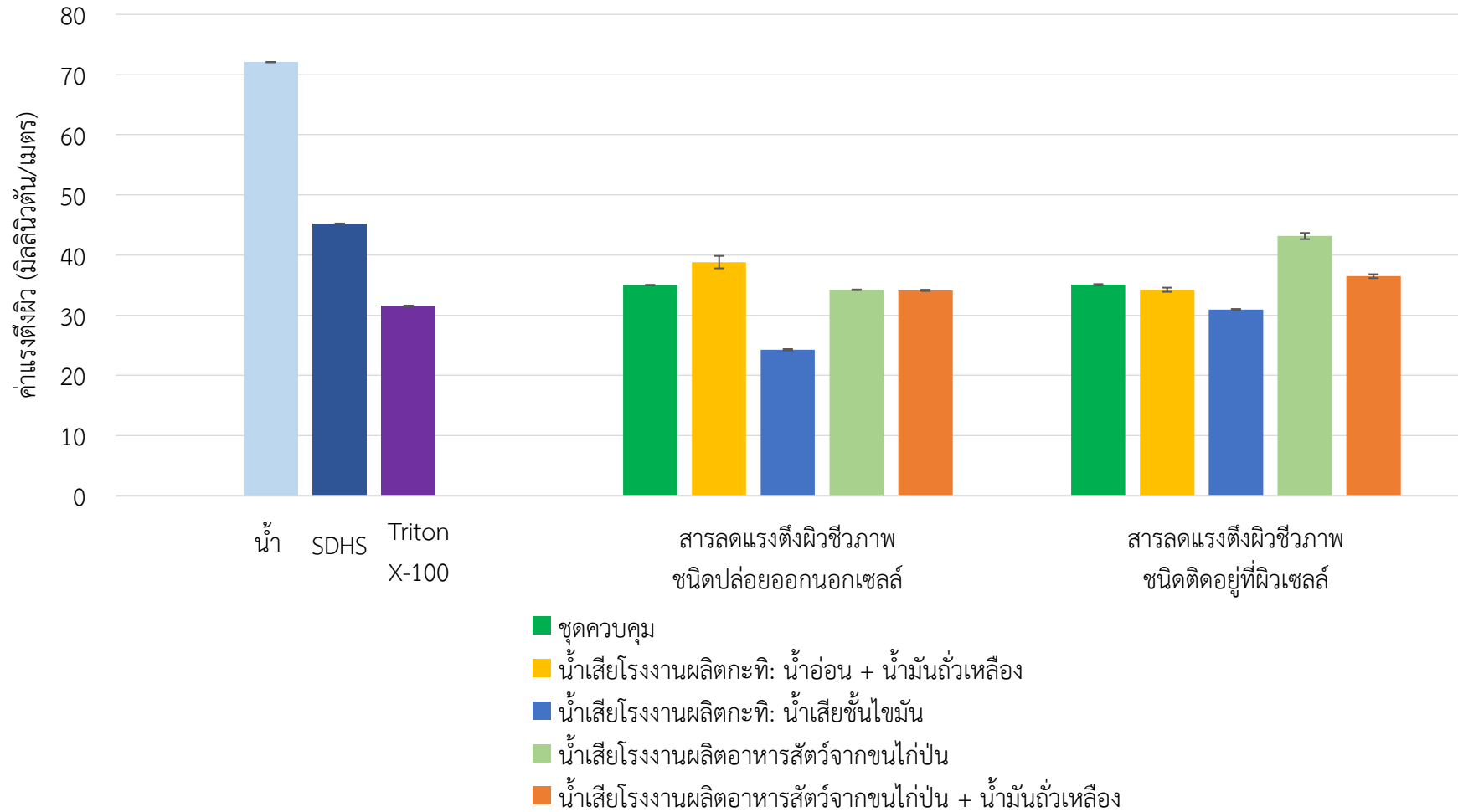
จากการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงอยู่ในวัสดุตั้งโดยวิธี MPN ในชั้นการตรึง เซลล์ก่อนนำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และภายหลังการผลิตรอบที่ 1 พบว่าจำนวน จุลินทรีย์เริ่มต้นของทุกสภาวะมีค่าใกล้เคียงกัน คือประมาณ $\log 6.5$ MPN ต่อกรัม ถึง $\log 7$ MPN ต่อกรัม และหลังจากเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมด้วยน้ำเสียจากอุตสาหกรรม อาหารจากข้อที่ 4.2.1 ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าในทุกสภาวะมีจำนวน จุลินทรีย์เพิ่มขึ้น ยกเว้นสภาวะที่ใช้ไขมันชั้นไขมันจากโรงงานผลิตกะทิเป็นแหล่งอาหารที่ ลดลงมากจนเหลือจำนวนจุลินทรีย์เพียง $\log 5.39$ MPN ต่อกรัม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำ เสียชนิดนี้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากความข้นของไขมันที่มากเกินไปทำ ให้เกิดความหนืดและอาจเข้าไปอุดตันบริเวณรูพรุนของวัสดุตั้ง การเข้าถึงของออกซิเจนจึง ลดลง รวมถึงการที่ชั้นไขมันไม่ได้เป็นของเหลวทั้งหมดและมีความเป็นตะกอนเล็ก ๆ ทั่วทั้ง สารละลายระหว่างการเขย่าอาจเกิดแรงเฉียดต่อเซลล์และทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย สำหรับสภาวะอื่น ๆ พบว่าน้ำอ่อนจากโรงงานผลิตกะทิที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองมีจำนวน จุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น $\log 7.78$ MPN ต่อกรัมและน้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์ จากขนไก่ปนทั้งที่เติมและไม่เติมน้ำมันถั่วเหลืองมีจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นถึง $\log 8.21$ MPN ต่อกรัม และ $\log 8.15$ MPN ต่อกรัม ตามลำดับ (รูปที่ 4.6) และเมื่อเปรียบเทียบจำนวน เซลล์ในรอบการผลิตที่ 1 ในชุดควบคุมของการทดลองนี้และการทดลองจากข้อ 4.1 พบว่ามี ค่าใกล้เคียงกันอยู่ที่ประมาณ $\log 7$ MPN ต่อกรัม



รูปที่ 4.6 จำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละรอบการผลิตเมื่อใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร

4.2.2.3 ประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดยใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสกัดหยาบจากการทดลองในข้อ 4.2.2.1 มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวด้วยเครื่อง tensiometer โดยละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินเพื่อปรับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดให้มีค่าเท่ากับในแต่ละชุดการทดลองของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.37 กรัมต่อลิตร และ 1.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อวัดค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ พบว่าชุดการทดลองที่ใช้น้ำอุ่นจากโรงงานผลิตกะทิที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองมีค่าแรงตึงผิว 38.82 มิลลินิวตันต่อเมตร และชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียชั้นไขมันมีค่า 24.26 มิลลินิวตันต่อเมตร ซึ่งลดแรงตึงผิวได้ต่ำมากและต่ำกว่าในชุดควบคุม เนื่องจากชุดการทดลองนี้มีน้ำมันตกค้างมาจากขั้นตอนการสกัดจึงทำให้แรงตึงผิวนั้นลดลงมากกว่าปกติ และสำหรับชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากขนไก่ปนทั้งที่เติมและไม่เติมน้ำมันถั่วเหลืองนั้นมีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุม และเมื่อวัดค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์ พบว่าชุดการทดลองที่ใช้น้ำอุ่นจากโรงงานผลิตกะทิที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง และชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียชั้นไขมันมีค่าแรงตึงผิวน้อยกว่าชุดควบคุม ในขณะที่ในชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากขนไก่ปนทั้งที่เติมและไม่เติมน้ำมันถั่วเหลืองมีค่าแรงตึงผิวมากกว่าชุดควบคุม (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.7 ค่าแรงตึงผิวของน้ำ SDHS TritonX-100 และของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร ทั้งชนิดปล่อยออกนอกเซลล์และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์

4.2.2.4 การวัดค่าซีไอดีหลังการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยน้ำเสียจากอุตสาหกรรม เพื่อเป็นแนวทางในการบำบัดน้ำเสีย

จากการวัดค่าซีไอดีหลังการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่าซีไอดี ก่อนการผลิตจากตารางที่ 4.1 ค่าซีไอดีหลังการผลิตที่วัดได้ดังตารางที่ 4.2 มีค่าลดลงในทุกชุดการทดลองยกเว้นชุดการทดลองที่ใช้ น้ำเสียชั้นไขมันจากโรงงานผลิตกะทิที่มีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากในการทดลองนี้เป็นการวัดค่าซีไอดีภายหลังจากปั่นเหวี่ยงเพื่อเอาเซลล์ออก ดังนั้นในส่วนนี้จึงมีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์อยู่ด้วย รวมถึงมีปริมาณไขมันส่วนเกินที่ไม่ผ่านการสกัดน้ำมันหรือกรองออกอีกจึงเป็นผลให้มีค่าซีไอดีสูงขึ้น นอกจากนี้ในการวัดค่าซีไอดีตอนเริ่มต้นก่อนการผลิตน้ำเสียชั้นไขมันมีลักษณะเป็นก้อนไขมันเล็ก ๆ ไม่เป็นของเหลวทั้งหมด ดังนั้นการนำมาวัดค่าซีไอดีผ่านการดูดด้วยปิเปตจึงอาจมีส่วนไขมันน้อยกว่าความเป็นจริงทำให้ผลที่วัดได้ต่ำกว่าความเป็นจริง หรือการที่น้ำเสียชั้นไขมันที่เข้าสู่กระบวนการผลิตซึ่งผ่านการเขย่าเป็นเวลา 3 วันจนทำให้สารอินทรีย์ในก้อนไขมันออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้นและมีความเป็นเนื้อเดียวกันจึงอาจเป็นผลให้การวัดค่าซีไอดีหลังการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่าสูงขึ้นกว่าค่าซีไอดีก่อนการผลิต

ตารางที่ 4.2 ค่าซีไอดีภายหลังจากการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร

ชุด	ค่าซีไอดีหลังผลิต (มิลลิกรัมต่อลิตร)				
	น้ำเสียโรงงานผลิตกะทิ		น้ำเสียโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากชนไก่ปน		
	น้ำอ่อนที่เติม น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำเสีย ชั้นไขมัน	ไม่เติม น้ำมันถั่วเหลือง	เติม น้ำมันถั่วเหลือง	
ควบคุม	9794.5	16,007.5	257,175	1,327.5	1,626.5

4.3 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้น้ำอ่อนจากโรงงานผลิตกะทิที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งอาหารและทดสอบคุณสมบัติ รวมถึงวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

จากผลการทดลองในข้อ 4.2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชุดการทดลองที่ใช้ น้ำอ่อนจากโรงงานผลิตกะทิที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองเหมาะแก่การนำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุด เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเสียชั้นไขมันที่แม้จะผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ในปริมาณมากและลดแรงตึงผิวได้ดี แต่เกิดจากน้ำมันที่ปนเปื้อนมาในสารที่สกัดได้รวมถึงผลจากการวัดจำนวนจุลินทรีย์ก็มีค่าต่ำ จึงไม่เหมาะแก่การผลิตซ้ำ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้ น้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากชนไก่ปนทั้งที่เติมและไม่เติมน้ำมันถั่วเหลืองก็พบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากกว่าทั้งชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ ดังนั้นจึงเลือกน้ำอ่อนจากโรงงานผลิตกะทิที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองมาเป็นแหล่งอาหารในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งการนำมาใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเซลล์ตรึง *W. cibaria* สายพันธุ์ PN3 ผลิตซ้ำ 3 ครั้งคาดว่าจะมีประสิทธิภาพที่เหมือนกับการผลิตในข้อที่ 4.2 ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ที่ผลิตได้คาดว่าจะผลิตได้รวม 1.74 กรัมต่อลิตร และ 2.72 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ที่ประมาณ $\log 7$ MPN ต่อกรัม ส่วนการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สกัดหยาบมาทดสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากผลการทดลองที่ทดสอบค่าแรงตึงผิวซึ่งพบว่าเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.37 กรัมต่อลิตรมีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 38.82 มิลลินิวตันต่อเมตร และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.83 กรัมต่อลิตรมีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 34.23 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยคาดว่าที่ความเข้มข้นนี้ยังไม่ถึงจุดที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพฟอร์มไมเซล หรือที่ค่า CMC ดังนั้นผลของค่า CMC จึงคาดว่ามีความเข้มข้นที่มากกว่านี้ และมีค่าแรงตึงผิวที่ลดต่ำลงอีก ส่วนการทดสอบการก่ออิมัลชันกับน้ำมันพืชและน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดคาดว่าจะให้ผลที่แตกต่างกันโดยอาจก่ออิมัลชันได้กับน้ำมันบางชนิดเท่านั้นและการเลือกความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่ค่า 1 CMC อาจไม่เพียงพอต่อการก่ออิมัลชัน จึงอาจทดลองกับความเข้มข้นที่มากขึ้นเป็น 2 หรือ 3 CMC รวมด้วย นอกจากนี้ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพก็อาจให้ผลที่แตกต่างกันเช่นกัน และการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคาดว่าจะเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไกลโคลิพิดเหมือนกับงานวิจัยที่ใช้เชื้อ *W. cibaria* สายพันธุ์ PN3 เช่นเดียวกัน (บุญยานุช สุภัทรกุล, 2018) อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ก็เป็นเพียงการคาดการณ์เท่านั้น ซึ่งหากมีโอกาสได้ทำการทดลองต่อจนเสร็จสมบูรณ์ผลการทดลองที่ได้ อาจแตกต่างจากค่าที่คาดการณ์ในข้างต้น

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารประกอบด้วยสารอินทรีย์ในปริมาณสูง และมักมีค่าซีไอดีเกินกว่าปริมาณที่กฎหมายกำหนดสร้างปัญหาให้กับโรงงานในการบำบัดน้ำเสีย งานวิจัยนี้จึงเลือกนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารมาใช้ประโยชน์ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและหาแนวทางลดค่าซีไอดี ซึ่งการนำน้ำเสียมาใช้นี้จัดว่าเป็นการลดต้นทุนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยนำน้ำเสียมาใช้แทนแทนกลูโคส และ/หรือน้ำมันถั่วเหลืองซึ่งมีราคาสูง จากการนำน้ำเสียมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเชื้อ *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึง พบว่า *W. cibaria* สายพันธุ์ PN3 สามารถเจริญโดยใช้น้ำเสียเป็นแหล่งอาหาร และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 2 ชนิด คือ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์ และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ ซึ่งไม่แตกต่างจากเมื่อใช้อาหารเบซัลที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง

ในเบื้องต้นงานวิจัยนี้ใช้หางกะทิเป็นตัวแทนของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร โดยนำหางกะทิมาเจีจางให้มีค่าซีไอดีเป็น 1 และ 3 เท่าของอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าชุดการทดลองที่ใช้หางกะทิ 3 เท่าที่มีค่าซีไอดี 239,601 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ผลที่ดีกว่า โดยให้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ทั้งชนิดปล่อยออกนอกเซลล์และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์มากกว่าการใช้หางกะทิ 1 เท่าที่มีค่าซีไอดี 79,867 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งมีค่าต่ำกว่า และผลจากการใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำก็พบว่าเมื่อใช้ซ้ำในรอบการผลิตที่ 2 ก็ยังมีปริมาณเซลล์ที่มากถึงเกือบ $\log 8$ MPN ต่อกรัม นอกจากนี้ผลของประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวก็พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวได้ใกล้เคียงกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ TritonX-100 และเมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นที่ใช้พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีกว่า เนื่องจากแม้ใช้ในความเข้มข้นที่ต่ำก็ให้ผลที่ใกล้เคียงกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ที่ใช้ในความเข้มข้นที่มากกว่า ดังนั้นจากผลการทดลองเบื้องต้นที่ใช้หางกะทิเป็นแหล่งอาหารนี้ จึงสรุปผลได้ว่ายิ่งค่าซีไอดีในอาหารที่ใช้สูงยิ่งเหมาะแก่การนำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อทราบค่าซีไอดีที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้ว จึงเริ่มการทดลองผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารซึ่งอุดมไปด้วยสารอินทรีย์ เพื่อคัดเลือกชนิดของน้ำเสียและสภาวะที่เหมาะสมที่สุดไปใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเริ่มต้นนำน้ำเสียแต่ละชนิดมาหาค่าซีไอดีซึ่งคาดว่ามีความสูงกว่าหางกะทิ แต่เมื่อทดสอบแล้วน้ำเสียทุกชนิดกลับมีค่าต่ำกว่าหางกะทิ อาจเป็นเพราะหางกะทิที่ใช้เป็นหางกะทิที่เพิ่งคั้นใหม่จากมะพร้าวทำให้มีสารอินทรีย์ในปริมาณมาก เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารที่เกิดการเจีจางมาในระหว่างขั้นตอนต่าง ๆ เช่น การล้างทำความสะอาดเครื่องจักรหรือกิจกรรมอื่น ๆ ดังนั้นการนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารมาใช้ในการผลิตนี้จึงไม่ทำการเจีจาง และมีการเติมน้ำมันถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร เพิ่มในชุดการทดลองที่มีค่าซีไอดีต่ำเนื่องจากปริมาณแหล่งคาร์บอนในน้ำเสียซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอาจไม่เพียงพอ และจากผลการทดลองพบว่าปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพรวมของทั้งชนิดปล่อยออกนอกเซลล์และชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์มีค่า 0.95 กรัมต่อลิตร 1.49 กรัมต่อลิตร 5.28 กรัมต่อลิตร 0.96 กรัมต่อลิตร และ

0.89 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง (ชุดควบคุม) ชุดการทดลองที่ใช้ใช้อ่อนจากโรงงานผลิตกะทิที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง น้ำเสียชั้นไขมันจากโรงงานผลิตกะทิ และน้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์จากชนไก่ปนที่ไม่เติมและเติมน้ำมันถั่วเหลือง ตามลำดับ ซึ่งผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากงานวิจัยนี้สูงกว่างานวิจัยของ Costa และคณะ (2009) ที่ใช้น้ำเสียแป้งมันสำปะหลังและน้ำมันทำอาหารมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ผลิตได้ 0.66 กรัมต่อลิตร และงานวิจัยที่ใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียของ Sharma และคณะ (2014) ที่ใช้หางนมเป็นสารตั้งต้นแก่เชื้อ *Lactobacillus helveticus* MRTL91 ที่ผลิตได้ 0.80 กรัมต่อลิตร รวมถึงงานวิจัยของ Rivera และคณะ (2007) ซึ่งใช้เชื้อ *Lactobacillus pentosus* ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้กากองุ่นไฮโดรไลซ์เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ผลิตได้เพียง 4.8 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับสมบัติของสารลดแรงตึงผิวการทดสอบเบื้องต้นพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ที่มีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 38.82 มิลลินิวตันต่อเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.37 กรัมต่อลิตร และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์มีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 34.23 มิลลินิวตันต่อเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.83 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามค่าแรงตึงผิวที่วัดได้นั้นเป็นค่าที่วัดจากความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวซึ่งไม่ทราบค่า CMC ดังนั้นความเข้มข้นนี้อาจยังไม่ถึงหรือเกินจุดที่เกิดการฟอร์มไมเซลล์แล้วก็เป็นได้ ซึ่งทำให้ค่าแรงตึงผิวที่ควรวัดได้จริงอาจมีค่าดังนี้หรือลดต่ำลงอีก นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Mouafo และคณะ (2018) ซึ่งผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* G88, *Lactobacillus delbrueckii* N2 และ *Lactobacillus cellobiosus* TM1 พบว่ามีค่าแรงตึงผิว 47.50 มิลลินิวตันต่อเมตร 41.90 มิลลินิวตันต่อเมตร และ 44.20 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ และงานวิจัยของ Gudiña และคณะ (2015) ที่ใช้เชื้อ *Lactobacillus agilis* CCUG31450 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยอาหาร MRS ที่มีค่าแรงตึงผิว 42.50 มิลลินิวตันต่อเมตร แสดงให้เห็นว่าผลของค่าแรงตึงผิวของงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพเหนือกว่างานวิจัยอื่น

ดังนั้นจึงจะเห็นได้ว่าน้ำเสียทุกชนิดในงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แต่หากเลือกชนิดที่เหมาะสมที่สุดจำเป็นต้องดูปัจจัยอื่นนอกจากปริมาณที่ผลิตได้ด้วย โดยถึงแม้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากชุดการทดลองที่ใช้ใช้น้ำเสียชั้นไขมันจากโรงงานผลิตกะทิจะมีปริมาณมากโดดเด่นกว่าชุดการทดลองอื่น แต่เมื่อพิจารณาถึงความบริสุทธิ์ของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ น้ำเสียชั้นไขมันจึงไม่เหมาะแก่การนำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากในขั้นการสกัดนั้นมีน้ำมันปนเปื้อนทำให้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้มีค่าสูงเกินจริง อีกทั้งยังทำให้ค่าแรงตึงผิวที่วัดได้มีค่าที่ผิดเพี้ยนไป ดังนั้นหากต้องการให้มีความบริสุทธิ์อาจจำเป็นต้องสกัดน้ำมันในสารลดแรงตึงผิวทั้งสองชนิด และใช้เฮกเซนในการสกัดน้ำมันในปริมาณที่เพิ่มขึ้นจาก 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตรที่ใช้ปกติ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากจำนวนจุลินทรีย์ในวัสดุตั้งหลังการผลิต พบว่ามีจำนวนที่ต่ำคือ $\log 5.39$ MPN ต่อกรัม จึงไม่เหมาะแก่การนำมาใช้ผลิตซ้ำ และนอกจากนี้เนื่องจากน้ำเสียชั้นไขมันทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความข้นมาก การเปลี่ยนถ่ายอาหารในแต่ละรอบการผลิตจึงทำได้ยากและเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสูง ดังนั้นชุดการทดลองที่ให้ผลผลิตรองลงมาคือใช้อ่อนจากโรงงานผลิตกะทิที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง และมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำจึงมีความเหมาะสมต่อการนำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการใช้เซลล์ตรึงในการผลิตซ้ำเป็นอีกทางหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิต นอกจากการใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารและทำให้การผลิตมีความรวดเร็วขึ้นไม่เสียเวลาในการเตรียมเชื้อบ่อย ๆ รวมถึงการแบ่งการผลิตเป็นรอบ ๆ แทนการผลิตรอบเดียวที่ใส่สารอาหารที่ความเข้มข้นสูงเพื่อให้

เพียงพอต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แทนที่จุลินทรีย์จะนำสารอาหารไปใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ อาจเกิดการกดแคแทบอลิซึม (catabolite repression) หรือ การยับยั้งจากสารตั้งต้น (substrate inhibition) ซึ่งเป็นการที่เชื้อนำไปสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนมากกว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้นการผลิตเป็นรอบ ๆ โดยใช้สารอาหารที่ละน้อยจึงมีส่วนช่วยในการป้องกันการเกิดปัญหาเหล่านี้ (Bustos และคณะ, 2018)

จากสถานการณ์การระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ที่ระบอบไปทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย จึงทำให้มีประกาศสถานการณ์ฉุกเฉินในทุกเขตท้องที่ทั่วราชอาณาจักรให้มีการควบคุมและป้องกันการระบาดเพื่อให้ประชาชนมีความปลอดภัย (ประกาศสถานการณ์ฉุกเฉิน, 2563) รวมถึงประกาศจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยให้จัดการเรียนการสอนทุกรายวิชาในรูปแบบออนไลน์ (ประกาศจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2563) ทำให้งานวิจัยนี้ไม่สามารถทำการทดลองได้ครบตามที่วางแผนไว้ ซึ่งแผนการทดลองถัดไปหลังจากพบว่าน้ำอ่อนจากโรงงานผลิตกะทิที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองมีความเหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้ว คือ การนำน้ำเสียดังกล่าวมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเซลล์ตรึง *W. cibaria* สายพันธุ์ PN3 โดยผลิตซ้ำ 3 รอบการผลิต ซึ่งคาดว่าเซลล์ตรึงจะมีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้งสองชนิดเหมือนกับในการทดลองก่อนหน้านี้ และสอดคล้องกับจำนวนจุลินทรีย์ที่คงที่แม้ในรอบการผลิตที่ 2 และ 3 ในกรณีที่ผลที่ได้ไม่เป็นไปตามที่คาดการณ์ อาจเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น การที่น้ำมันถั่วเหลืองอาจล้อมรอบและปกคลุมบริเวณผิวของวัสดุตรึง และการเกิดการสร้างไบโอฟิล์มที่หนานอกจากนี้งานวิจัยของ Zannini และคณะ (2013) พบว่า *Weissella cibaria* YB-1 สามารถผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ (Exopolysaccharides, EPS) ได้ ดังนั้น EPS อาจไปเคลือบผิวของวัสดุตรึงระหว่างการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพก็เป็นได้เช่นกัน ซึ่งเหตุการณ์ที่อาจเกิดขึ้นเหล่านี้ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่อยู่ภายในมีการเข้าถึงของสารอาหารและอากาศ (bioavailability) ที่ลดลง จึงทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลดต่ำลงไปด้วย หลังจากนั้นผู้วิจัยจะนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดมาทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ โดยจากการวัดค่าแรงตึงผิว ส่วนการทดสอบการก่อกอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับน้ำมันพืชและน้ำมันหอมระเหยชนิดต่าง ๆ คาดว่าจะให้ผลที่แตกต่างกันโดยอาจก่อกอิมัลชันได้กับน้ำมันบางชนิด ซึ่งผลการก่อกอิมัลชันและความเสถียรต่อน้ำมันแต่ละชนิดอาจมีความแตกต่างกันเนื่องจากความหนืดของน้ำมัน ความยาวของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน และความเค็ม เป็นต้น และการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคาดว่าจะ เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไกลโคลิพิด ซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตและไขมันเหมือนกับงานวิจัยของ บุญยานุช สุภทรกุล (2018) ที่ใช้เชื้อ *W. cibaria* สายพันธุ์ PN3 เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ และคาดว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไกลโคลิพิดที่ผลิตได้นั้นอาจเป็นชนิดโซโฟโรลิพิด และแรมโนลิพิด อย่างไรก็ตาม การใช้จุลินทรีย์ชนิดเดียวกันแต่ผลิตจากแหล่งอาหารที่ต่างกันก็อาจให้ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ต่างกันได้ เช่น ในงานวิจัยของ Vecino และคณะ (2017) ซึ่งเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตส สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็น ไกลโคไลโปโปรตีน และไกลโคโปรตีน ตามลำดับ โดยหากต้องการผลที่แม่นยำยิ่งขึ้นอาจตรวจวัดเพิ่มเติมด้วยวิธี Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) (Patowary และคณะ, 2019)

ส่วนแนวทางในการบำบัดน้ำเสียให้มีค่าซีโอดีลดลง พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าซีโอดีก่อนผลิตและหลังผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ค่าซีโอดีมีแนวโน้มลดลงโดยลดจาก 44,900 มิลลิกรัมต่อลิตรเหลือ 16,007.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งถึงแม้ว่าจะยังห่างไกลกว่าที่กฎหมายกำหนดให้น้ำทิ้งจากโรงงานมีค่าซีโอดีไม่เกิน 120 มิลลิกรัมต่อลิตรอยู่มากและยังคงต้องจำเป็นต้องมีการบำบัดน้ำเสียอยู่ แต่ก็จัดว่ามีส่วนช่วยในการลดค่าซีโอดีในน้ำเสียและลดขั้นตอนการบำบัดบางประการในเบื้องต้น เช่น การดักด้วยตะแกรงออกไป อีกทั้งยังช่วยย่นระยะเวลาในการบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจนทำให้กระบวนการบำบัดมีความรวดเร็วขึ้น โรงงานใช้ทรัพยากรในการบำบัดน้อยลงและลดปัญหาน้ำเสียจากบ่อบำบัดเอ่อล้นในช่วงที่มีฝนตกหนักแล้วทำให้น้ำเสียที่ยังมีค่าซีโอดีสูงรั่วไหลสู่สิ่งแวดล้อม

จากงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่าน้ำอ่อนจากโรงงานผลิตกะทิที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองมีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแทนกลูโคสซึ่งมีราคาสูงเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยปัจจุบันกลูโคส (D-(+) Glucose) มีราคาขายอยู่ที่ 1.7 บาทต่อกรัม อ้างอิงจากบริษัท Sigma-aldrich ประเทศสิงคโปร์ และหากต้องการเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้นอาจทดลองโดยการปรับลดสารอาหารต่าง ๆ ในสูตรอาหารเบซัลเพิ่มเติมเนื่องจากสารอาหารที่มีในน้ำเสียบางชนิดอาจเพียงพอต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้วดังนั้นจึงอาจเป็นอีกหนึ่งในแนวทางในการลดต้นทุนการผลิต ส่วนแนวทางในการบำบัดน้ำเสียพบว่า การนำน้ำเสียมาใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้สามารถลดค่าซีโอดีได้ ช่วยย่นระยะเวลาในการบำบัดลง อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับน้ำเสียและเป็นการนำน้ำเสียมาใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

รายการอ้างอิง

- ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากโรงงาน พ.ศ. 2560 (2560, 7 มิถุนายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 134 ตอนพิเศษ 153 ง. หน้า 11-15.
- ประกาศจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเรื่อง ขยายเวลาการปิดที่ทำการเป็นการชั่วคราวเนื่องจากการแพร่ระบาดของเชื้อโรค COVID-19 (ฉบับที่ 2) (2563, 30 เมษายน).
- ประกาศสถานการณ์ฉุกเฉิน ในทุกเขตท้องที่ทั่วราชอาณาจักร (2563, 25 มีนาคม). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 137 ตอนพิเศษ 69 ง. หน้า 1.
- จิรวัดน์ อรรคไกรสีห์, และจุฑารัตน์ เล้าสุทธิพงษ์. (2019). คุณภาพและมาตรฐานขนสัตว์ปีกปนของประเทศ ไทย. กองควบคุมอาหารและยาสัตว์กรมปศุสัตว์
- จอมขวัญ สุวรรณรักษ์, พุดกรอง พันธุ์อุโมงค์, และนิธิยา รัตนานพนธ์. (2014). ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ กรดเพอร์ออกซีแอซิดิกและสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ผิวของผัก และผลไม้สดแกะสลัก. *วารสารวิชาการและวิจัย มทรพระนคร*, 2, 92-106.
- บุญยานุช สุภัทรกุล. (2018). การประยุกต์ใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตจากเชื้อ *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึง. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- เพ็ญนภา บุญจริง. (2015). การคัดแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาการหมักดองพื้นบ้านเพื่อผลิตสารลดแรง ตึงผิวทางชีวภาพ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พระราชบัญญัติ เชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 (2558, 26 สิงหาคม). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 132 ตอน ที่ 80 ก. หน้า 9-31.
- สุกัญญา จัตตุพรพงษ์. (1996). การตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบอาหารสัตว์. ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกร แห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
- สุภัค โตเจริญทรัพย์. (2014). การปรับปรุงกระบวนการทวนสอบด้านประกันคุณภาพการผลิตเพื่อลดปัญหา คุณภาพของผลิตภัณฑ์กะทิ. ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม
- Abdulkareem Jasim, H., Subhi Jawad, H., & Nawfal Hussein A. (2010). Antimicrobial Activity of Bacteriocin Produced by *Weissella cibaria* NRIC0136. *Al-Kufa University Journal for Biology*, 2, 1.
- Ale, E. C., Rojas, M. F., Reinheimer, J. A., & Binetti, A. G. (2020). *Lactobacillus fermentum*: Could EPS production ability be responsible for functional properties?. *Food Microbiology*, 90, 103465.
- Alkan, Z., Erginkaya Z., Konuray, G., & Turhan, U. (2019). Production of biosurfactant by lactic acid bacteria using whey as growth medium. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 43, 676-683.
- Boxley, C. J., Pemberton, J. E., & Maier, R. M. (2015). Rhamnolipids and related-biosurfactants for cosmetics and cosmeceutical markets. *inform*, 26, 4.

- Bustos, G., Arcos, U., Vecino, X., Cruz, J. M., & Moldes, A. B. (2018). Recycled *Lactobacillus pentosus* biomass can regenerate biosurfactants after various fermentative and extractive cycles. *Biochemical Engineering Journal*, 132, 191-195.
- Câmara, J. M. D. A., Sousa, M. A. S. B., Barros Neto, E. L., & Oliveira, M. C. A. (2019). Application of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* in microbial-enhanced oil recovery (MEOR). *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, 9, 2333–2341.
- Chen, C., Sun, N., Li, D., Long, S., Tang, X., Xiao, G., & Wang, L. (2018). Optimization and characterization of biosurfactant production from kitchen waste oil using *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 14934–14943.
- Costa, S. G. V. A. O., Lépine, F., Milot, S., Déziel, E., Nitschke, M., & Contiero, J. (2009). Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 1063–1072.
- Da Silva Sabo, S., Anita Mendes, M., Da Silva Araújo, E., De Almeida Muradian, L. B., Naoto Makiyama E., Guy LeBlanc, J., ... De Souza Oliveira, R. P. (2020). Bioprospecting of probiotics with antimicrobial activities against *Salmonella* Heidelberg and that produce B-complex vitamins as potential supplements in poultry nutrition. *Scientific Reports*, 10, 7235.
- Das, A. J., & Kumar, R. (2018) Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. *Bioresource Technology*, 260, 233–240.
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 47–64.
- Fusco, V., Quero, G. M., Cho, G. S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., ... Franz, C. M. A. P. (2015). The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-22.
- Gawon, Y., Jihwan, S., Jihye, Y. Changhee, P., & Heebeom, K. (2019). Rhamnolipid nanoparticles for *in vivo* drug delivery and photodynamic therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 19,12-21.
- George, S., & Jayachandran K. (2009). Analysis of Rhamnolipid Biosurfactants Produced Through Submerged Fermentation Using Orange Fruit Peelings as Sole Carbon Source. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 158, 694–705.

- Ghasemi, A., Moosavi-Nasab, M., Behzadnia, A., & Rezaei, M. (2018). Enhanced biosurfactant production with low-quality date syrup by *Lactobacillus rhamnosus* using a fed-batch fermentation. *Food Science and Biotechnology*, 27, 1137–1144.
- Ghasemi, A., Moosavi-Nasab, M., Setoodeh, P., Mesbahi, G., & Yousefi, G. (2019). Biosurfactant Production by Lactic Acid Bacterium *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 Grown on Different Carbon Sources: Strain Screening Followed by Product Characterization. *Scientific Reports*, 9, 5287.
- Gómez-Torres, N., Ávila, M., Gaya, P., & Garde, S. (2014). Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct. *Food Microbiology*, 42, 82-88.
- Gudiña, E. J., Fernandes, E. C., Teixeira, J. A. & Rodrigues, L. R. (2015) Antimicrobial and anti-adhesive activities of cell-bound biosurfactant from *Lactobacillus agilis* CCUG31450. *Royal Society of Chemistry*, 5, 90960-90968.
- Gudiña, E. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2010). Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76, 298–304.
- Haloï, S., Sarmah, S., Gogoi, S. B., & Medhi, T. (2020). Characterization of *Pseudomonas* sp. TMB2 produced rhamnolipids for ex-situ microbial enhanced oil recovery. *3 Biotech*, 10, 120.
- Izard, J., & Limberger, R. J. (2003) Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 411-418.
- Jimoh, A. A., & Lin, J. (2019) Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental Sustainability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 184, 109607.
- Joy S., Rahman P. K. S. M., Khare S. K., Soni S. R., & Sharma S. (2019). Statistical and sequential (fill-and-draw) approach to enhance rhamnolipid production using industrial lignocellulosic hydrolysate C6 stream from *Achromobacter* sp. (PS1). *Bioresource Technology*, 288, 121494.
- Joy, S., Rahman, P. K. S. M., & Sharma, S. (2017). Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal*, 317, 232–241.
- Karnasuta, S., Punsuvon, V., & Nokkaew, R. (2015). Biodiesel Production from Waste Coconut Oil in Coconut Milk Manufacturing. *Walailak Journal of Science and Technology*, 12, 291-298.

- Khaje Bafghi, M., & Fazaelpoor, M. H. (2012). Application of Rhamnolipid in the Formulation of a Detergent. *Journal of Surfactants and Detergents*, 15, 679–684.
- Lee, J. K., Patel, S. K. S., Sung, B. H., & Kalia, V. C. (2020). Biomolecules from municipal and food industry wastes: An overview. *Bioresource Technology*, 298, 122346.
- López-Prieto, A., Martínez-Padrón, H., Rodríguez-López, L., Belén Moldes, A., & Manuel Cruz J. (2019). Isolation and characterization of a microorganism that produces biosurfactants in corn steep water. *CyTA - Journal of Food*, 17, 1, 509–516.
- Luna, J. M., Sarubbo, L., & Campos-Takaki, G. M. (2009). A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 4, 785-793.
- Menesesa, D. P., Gudiñab, E. J., Fernandes, F., Gonçalves, L.R. B., Rodrigues, L. R., & Rodrigues, S. (2017). The yeast-like fungus *Aureobasidium thailandense* LB01 produces a new biosurfactant using olive oil mill wastewater as an inducer. *Microbiological Research*, 204, 40–47.
- Merghni, A., Dallel, I., Noumi, E., Kadmi, Y., Hentati, H., Tobji, S., ... Mastouri, M. (2017). Antioxidant and antiproliferative potential of biosurfactants isolated from *Lactobacillus casei* and their anti-biofilm effect in oral *Staphylococcus aureus* strains. *Microbial Pathogenesis*, 104, 84-89.
- Moshtagh, B., Hawboldt, K., & Zhang, B. (2019). Optimization of biosurfactant production by *Bacillus Subtilis* N3-1P using the brewery waste as the carbon source. *Environmental Technology*, 40, 25, 3371–3380.
- Mouafo, T. H., Mbawala, A., & Ndjouenkeu, R. (2018). Effect of Different Carbon Sources on Biosurfactants' Production by Three Strains of *Lactobacillus* spp. *BioMed Research International*, 15 pages.
- Niu, Y., Wu, J., Wang, W., & Chen, Q. (2019). Production and characterization of a new glycolipid, mannosylerythritol lipid, from waste cooking oil biotransformation by *Pseudozyma aphidis* ZJUDM34. *Food Science and Nutrition*. 7, 937–948.
- Oblinger, J. L., & Koburger, J. A. (1975). Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique. *Journal of milk and food technology*. 38, 9, 540-545.
- Papagianni, M. (2012). Effects of dissolved oxygen and pH levels on weissellin A production by *Weissella paramesenteroides* DX in fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35, 1035–1041.
- Patowary, K., Das, M., Patowary, R., Chandra Kalita, M. & Deka, S. (2019). Recycling of Bakery Waste as an Alternative Carbon Source for Rhamnolipid Biosurfactant Production. *Journal of Surfactants and Detergents*, 22, 373–384.

- Perez-Armendariz, B., Cal-y-Mayor-Luna, C., El-Kassis, E. G., & Ortega-Martinez, L. D. (2019). Use of waste canola oil as a low-cost substrate for rhamnolipid production using *Pseudomonas aeruginosa*. *AMB Express*, 9, 61.
- Radzuan, M. N., Banat, I. M., & Winterburn, J. (2017). Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste. *Bioresource Technology*, 225, 99–105.
- Rahman, P. K. S. M., Pasirayi, G., Auger, V., & Ali, Z. (2010). Production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 in a microfluidic bioreactor. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55, 45–52.
- Rivera, O. M. P., Moldes, A. B., Torrado, A. M., & Dominguez, J. M. (2007). Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. *Process Biochemistry*, 42, 1010–1020.
- Santos, C. I. D., França, Y. R., Campos, C. D. L., Bomfim, M. R. Q., Melo, B. O., Holanda, R. A., ... Monteiro-Neto, V. (2019). Antifungal and Antivirulence Activity of Vaginal *Lactobacillus* Spp. Products against *Candida* Vaginal Isolates. *Pathogens*, 8, 150.
- Seghal Kirana, G., Hema, T. A., Gandhimathia, R., Selvina, J., Anto Thomasa, T., Rajeetha Ravji, T., & Natarajaseenivasana, K. (2009). Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73, 250–256.
- Sharma, D., Saharan, B. S., Chauhan, N., Bansal, A., & Procha, S. (2014). Production and Structural Characterization of *Lactobacillus helveticus* Derived Biosurfactant. *The Scientific World Journal*. 2014, 493548.
- Sharma, P., Sangwan, S., & Kaur, H. (2019). Process parameters for biosurfactant production using yeast *Meyerozyma guilliermondii* YK32. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191, 531.
- Sharma, S. & Pandey, L. M. (2020). Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* RSL-2 isolated from sludge and biosurfactant mediated degradation of oil. *Bioresource Technology*, 307, 123261.
- Sheppard, J. D., & Mulligan, C. N. (1987). Production of surfactin by *Bacillus subtilis* grow on peat hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, 110-116.
- Sinumvayo, J. P., & Ishimwe, N. (2015). Agriculture and Food Applications of Rhamnolipids and its Production by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*, 6,2.

- Souza, E. C., Azevedo, P. O. S., Dominguez, J. M., Converti, A., & Oliveira, R. P. S. (2017). Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. *CyTA - Journal of Food*, 15, 525-530.
- Sulabo, R. C., Chiba, L. I., Almeida, F. N., Brotzge, S. D., Payne, R. L., & Stein, H. H. (2013). Amino acid and phosphorus digestibility and concentration of digestible and metabolizable energy in hydrolyzed feather meal fed to growing pigs. *Journal of Animal Science*, 91, 5829–5837.
- Thaniyavarn, J., Chianguthai, T., Sangvanich, P., Roongsawang, N., Washio K., Morikawa, M., & Thaniyavarn, S. (2008). Production of Sophorolipid Biosurfactant by *Pichia anomala*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72, 8, 2061–2068.
- Vecino, X., Rodríguez-López, L., Gudiña, E. J., Cruz, J. M., Moldes, A. B., & Rodrigues, L. R. (2017). Vineyard pruning waste as an alternative carbon source to produce novel biosurfactants by *Lactobacillus paracasei*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 55, 40-49.
- Vidhya V., Vidhya A., Gowri, B. V., & Arunadevi S. (2015). Utilization of Synthetic Dairy Waste Water and Waste Oil for the Production of Sophorolipid from *Starmerella bombicola* MTCC 1910 and Testing its Antimicrobial Activity. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(12), 555-565.
- Wan, J., Meng, D., Long, T., Ying, R., Ye, M., Zhang, S., ... Lin, Y. (2015). Simultaneous Removal of Lindane, Lead and Cadmium from Soils by Rhamnolipids Combined with Citric Acid. *PLOS ONE*, 10, 6.
- Xu, Z., Shi, M., Tian, Y., Zhao, P., Niu, Y., & Liao, M. (2019). Dirhamnolipid Produced by the Pathogenic Fungus *Colletotrichum gloeosporioides* BWH-1 and Its Herbicidal Activity. *Molecules*, 24, 2969.
- Yan, X., Gu, S., Cui, X., Shi, Y., Wen, S., Chen, H., & Ge, J. (2019). Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. *Microbial Pathogenesis*, 127, 12-20.
- Yañez-Ocampo, G., Somoza-Coutiño, G., Blanco-González, C., & Wong-Villarreal, A. (2017). Utilization of agroindustrial waste for biosurfactant production by native bacteria from chiapas. *Open Agriculture*, 2, 341–349.
- Zannini, E., Mauch, A., Galle, S., Ganzle, M., Coffey, A., Arendt, E. K., ... Waters, D. M. (2013). Barley malt wort fermentation by exopolysaccharide forming *Weissella cibaria* MG1 for the production of a novel beverage. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 1379-1387.

Zhang, X., Xu, D., Zhu, C., Lundaa, T., & Scherr, K. E. (2012). Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Chemical Engineering Journal*, 209, 138–146.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีคำนวณปริมาณน้ำเสียที่ใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

อาหารสำเร็จรูป MRS 55.00 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูป 55.00 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งให้ละลายผงวุ้น 18 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตรรวมด้วยก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัล

โซเดียมไนเตรต (NaNO_3)	10.17	กรัม
ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.00	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.50	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.10	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5.00	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)	0.01	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.06	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.10	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.326	กรัม
กลูโคส	5.00	กรัม
สารอาหารอื่นๆ	0.05	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

อาหารสำเร็จรูป LB 25.00 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูป 25.00 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (PBS)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.00	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.20	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na ₂ HPO ₄)	1.44	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	0.24	กรัม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 8.0 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

คำนวณปริมาณทางกะทิ

- ทางกะทิมีค่าซีไอดีเริ่มต้นเท่ากับ 305,162.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลสูตรปกติที่มีกลูโคสและน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าซีไอดีเท่ากับ 79,867 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ใช้สูตรคำนวณความเข้มข้น $C_1V_1=C_2V_2$

เมื่อ C_1 แทน ค่าซีไอดีของทางกะทิเริ่มต้น
 C_2 แทน ค่าซีไอดีของทางกะทิสุดท้าย
 V_1 แทน ปริมาตรของทางกะทิเริ่มต้น
 V_2 แทน ปริมาตรของทางกะทิสุดท้าย

เมื่อต้องการเจือจางให้ได้ค่าซีไอดีเป็น 1 เท่าและ 3 เท่า ของอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลสูตรปกติ ค่าซีไอดี 1 เท่า เท่ากับ 79,867 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

$$\begin{aligned} \text{จาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (305,162.5) * V_1 &= (79,867) *(1,000) \\ V_1 &= 261.72 \text{ มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น นำทางกะทิมา 261.72 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำทางกะทิที่เจือจางแล้วไปละลายสารตามสูตรอาหารเบซัลแต่ไม่เติมกลูโคสและน้ำมันถั่วเหลือง ปรับความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ค่าซีไอดี 3 เท่า เท่ากับ 239,601 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

$$\begin{aligned}
 \text{จาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\
 (305,162.5) * V_1 &= (239,601) *(1,000) \\
 V_1 &= 785.16 \text{ มิลลิลิตร}
 \end{aligned}$$

ดังนั้น นำน้ำทางกะทิมา 785.16 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำทางกะทิที่เจือจางแล้วไปละลายสารตามสูตรอาหารเบซัลแต่ไม่เติมกลูโคสและน้ำมันถั่วเหลือง ปรับความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2:1) โดยปริมาตรต่อปริมาตร

คลอโรฟอร์ม	100	มิลลิลิตร
เมทานอล	50	มิลลิลิตร

สารทดสอบ Phospho-vanilline

Vanilline	0.6	กรัม
สารละลาย vanilline	35	มิลลิลิตร
กรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร	60	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	5	มิลลิลิตร

ละลาย Vanilline ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย vanilline ผสมกับกรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรและน้ำกลั่นให้เข้ากัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในขวดสีชา

สารละลาย Coomassie Brilliant Blue

Coomassie Brilliant Blue G	5	มิลลิกรัม
เมทานอล	5	มิลลิลิตร
กรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร	10	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

ข้อมูลดิบต่าง ๆ สำหรับการเปรียบเทียบสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้
ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบเซลล์ตรึง

ตารางที่ ค.1 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์เมื่อใช้หางกะทิเป็นแหล่งอาหารในแต่ละรอบการผลิต

รอบการผลิต	สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ	ชุดการทดลอง	น้ำหนักพรอยก่อน (กรัม)	น้ำหนักพรอยหลัง (กรัม)	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	
1	ชุดควบคุม	1	0.3536	0.3607	0.142	0.1400±0.0028	
		2	0.3536	0.3605	0.138		
	หางกะทิที่มีค่าซีไอดี 1 เท่า	1	0.3548	0.3579	0.062	0.0627±0.0150	
		2	0.3548	0.3572	0.048		
		3	0.3548	0.3587	0.078		
	หางกะทิที่มีค่าซีไอดี 3 เท่า	1	0.3556	0.3650	0.188	0.1860±0.0028	
		2	0.3556	0.3648	0.184		
	2	ชุดควบคุม	1	0.3550	0.3606	0.112	0.1540±0.0594
			2	0.3550	0.3648	0.196	
หางกะทิที่มีค่าซีไอดี 1 เท่า		1	0.3564	0.3658	0.188	0.1710±0.0240	
		2	0.3564	0.3641	0.154		
หางกะทิที่มีค่าซีไอดี 3 เท่า		1	0.3554	0.3639	0.2833	0.2833±0.0000	

ตารางที่ ค.2 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์เมื่อใช้หางกะทิเป็นแหล่งอาหารในแต่ละรอบการผลิต

รอบการผลิต	สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ	ชุดการทดลอง	น้ำหนักพรอยก่อน (กรัม)	น้ำหนักพรอยหลัง (กรัม)	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
1	ชุดควบคุม	1	0.3541	0.4265	2.413	2.4143±0.2820
		2	0.3544	0.4353	2.697	
		3	0.3542	0.4182	2.133	
	หางกะทิที่มีค่าซีไอดี 1 เท่า	1	0.3493	0.4471	3.260	2.6390±0.5395
		2	0.3514	0.4162	2.160	
		3	0.3544	0.4293	2.497	

1	หางกะทิที่มี	1	0.3532	0.5014	4.940	4.6185±0.4547
	ค่าซีไอดี 3 เท่า	2	0.3555	0.4844	4.297	
2	ชุดควบคุม	1	0.3518	0.3970	1.507	1.4047±0.1975
		2	0.3510	0.3969	1.530	
		3	0.3530	0.3883	1.177	
	หางกะทิที่มี	1	0.3561	0.4268	2.357	2.5147±0.1372
		2	0.3513	0.4287	2.580	
		3	0.3575	0.4357	2.607	
	หางกะทิที่มี	1	0.3546	0.4332	2.620	2.6677±0.1832
		2	0.3511	0.4372	2.870	
		3	0.3548	0.4302	2.513	

ตารางที่ ค.3 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์เมื่อใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร

รอบ การ ผลิต	สภาวะอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ชุดการ ทดลอง	น้ำหนักพรอย ก่อน (กรัม)	น้ำหนักพรอย หลัง (กรัม)	สารลดแรงตึง ผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
1	ชุดควบคุม	1	0.3555	0.363	0.2500	0.2833±0.0416
		2	0.3540	0.3621	0.2700	
		3	0.3544	0.3643	0.3300	
	น้ำอ่อน โรงงานกะทิ + น้ำมันถั่วเหลือง	1	0.3581	0.3773	0.6400	0.5778±0.0548
		2	0.3538	0.3699	0.5367	
		3	0.3561	0.3728	0.5567	
	ชั้นไขมัน โรงงานกะทิ	1	0.3542	0.4253	2.3700	2.6467±0.9040
		2	0.3542	0.4116	1.9133	
		3	0.3526	0.4623	3.6567	
	น้ำเสียโรงงาน ขนไก่ป่น	1	0.3520	0.3576	0.1867	0.1222±0.0562
		2	0.3513	0.3538	0.0833	
		3	0.3512	0.3541	0.0967	
	น้ำเสียโรงงาน ขนไก่ป่น + น้ำมันถั่วเหลือง	1	0.3513	0.3598	0.2833	0.1544±0.1134
		2	0.3532	0.3565	0.1100	
		3	0.3513	0.3534	0.0700	

ตารางที่ ค.4 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์เมื่อใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร

รอบการผลิ	สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ	ชุดการทดลอง	น้ำหนักพรอยก่อน (กรัม)	น้ำหนักพรอยหลัง (กรัม)	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
1	ชุดควบคุม	1	0.3592	0.3635	0.1075	0.6738±0.0194
		2	0.352	0.3784	0.6600	
		3	0.357	0.3845	0.6875	
	น้ำอ่อน โรงงานกะทิ + น้ำมันถั่วเหลือง	1	0.3533	0.3869	0.8400	0.9067±0.2663
		2	0.3531	0.3803	0.6800	
		3	0.3594	0.4074	1.2000	
	ชั้นไขมัน โรงงานกะทิ	1	0.3594	0.4763	2.9225	2.6317±1.1224
		2	0.3576	0.4133	1.3925	
		3	0.3615	0.5047	3.5800	
	น้ำเสียโรงงาน ชนไก่ปน	1	0.3648	0.3988	0.8500	0.8358±0.1792
		2	0.3632	0.4035	1.0075	
		3	0.3624	0.3884	0.6500	
	น้ำเสียโรงงาน ชนไก่ปน + น้ำมันถั่วเหลือง	1	0.3634	0.3891	0.6425	0.7433±0.2125
		2	0.3632	0.3872	0.6000	
		3	0.3635	0.403	0.9875	

ตารางที่ ค.5 จำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่ในวัสดุตั้งในแต่ละขั้นการทดลองเมื่อใช้ทางกะทิเป็นแหล่งอาหาร

ขั้นการทดลอง	สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ	ชุดการทดลอง	ค่า MPN	Dilution factor	น้ำหนักวัสดุตั้ง (กรัม)	จำนวนจุลินทรีย์ (logMPN/กรัม)	ค่าเฉลี่ย (logMPN/กรัม)
ผลิตรอบที่ 1	ชุดควบคุม	1	0.43	10 ⁶	0.10	6.6335	6.8958±0.3133
		2	0.43	10 ⁶	0.10	6.6335	
		3	0.15	10 ⁷	0.10	7.1761	
	ทางกะทิที่มี ค่าซีไอดี 1 เท่า	1	0.43	10 ⁷	0.12	7.5543	7.8035±0.1934
		2	0.93	10 ⁷	0.12	7.8893	
		3	0.93	10 ⁷	0.12	7.8893	
	ทางกะทิที่มี ค่าซีไอดี 3 เท่า	1	0.43	10 ⁸	0.13	8.5195	8.5879±0.3978
		2	0.15	10 ⁸	0.13	8.0621	
		3	0.93	10 ⁷	0.13	8.8545	

ผลิตรอบที่ 2	ชุดควบคุม	1	0.93	10^6	0.04	7.3664	7.1265±0.2902	
		2	0.43	10^6	0.07	6.7884		
		3	0.43	10^6	0.04	7.0314		
	ทางกะทิที่มีค่าซีไอดี 1 เท่า	1	2.4	10^6	0.05	7.6812		8.8619±0.7901
		2	0.073	10^9	0.04	9.2613		
		3	0.93	10^7	0.03	8.4914		
	ทางกะทิที่มีค่าซีไอดี 3 เท่า	1	0.43	10^7	0.07	7.7884		7.7884±0.0000

ตารางที่ ค.6 จำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่ในวัสดุจริงในแต่ละชั้นการทดลองเมื่อใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร

ชั้นการทดลอง	สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ	ชุดการทดลอง	ค่า MPN	Dilution factor	น้ำหนักวัสดุจริง(กรัม)	จำนวนจุลินทรีย์ (logMPN/กรัม)	ค่าเฉลี่ย (logMPN/กรัม)	
จริงเซลล์	ชุดควบคุม	1	0.43	10^6	0.0369	7.0664	6.9018±0.3120	
		2	0.93	10^5	0.0267	6.5420		
		3	0.43	10^6	0.0344	7.0969		
	น้ำอ่อน	1	2.4	10^4	0.0242	5.9964	6.5199±0.6367	
		โรงงานกะทิ + น้ำมันถั่วเหลือง	2	0.43	10^6	0.0254		7.2286
			3	0.43	10^5	0.0199		6.3346
	ชั้นไขมันโรงงานกะทิ	1	0.15	10^6	0.0277	6.7336	6.8477±0.1141	
		2	2.4	10^5	0.0341	6.8475		
		3	2.4	10^5	0.0262	6.9619		
	น้ำเสียโรงงานขนไก่ปน	1	0.43	10^5	0.0332	6.1123	6.5268±0.4627	
		2	0.43	10^6	0.0405	7.0260		
		3	0.93	10^5	0.0336	6.4421		
	น้ำเสียโรงงานขนไก่ปน+น้ำมันถั่วเหลือง	1	2.4	10^5	0.0292	6.9148	7.0234±0.0965	
		2	0.43	10^6	0.0378	7.0560		
		3	0.43	10^6	0.0342	7.0994		
	ผลิตรอบที่ 1	ชุดควบคุม	1	2.4	10^5	0.036	6.8239	7.2415±0.5316
			2	2.4	10^6	0.0347	7.8399	
			3	0.43	10^6	0.0374	7.0606	
น้ำอ่อน		1	0.43	10^6	0.0312	7.1393	7.7784±0.7322	
		โรงงานกะทิ + น้ำมันถั่วเหลือง	2	0.15	10^7	0.0361		7.6186
			3	0.15	10^8	0.0397		8.5773

ผลิต รอบที่ 1	ชั้นไขมัน โรงงานกะทิ	1	0.93	10^5	0.0303	6.4870	5.3920±0.9499
		2	2.4	10^3	0.0303	4.8988	
		3	2.4	10^3	0.0389	4.7903	
	น้ำเสียโรงงาน ขนไก่ป่น	1	2.4	10^7	0.0356	8.8288	8.2145±0.7571
		2	0.93	10^6	0.0398	7.3686	
		3	0.93	10^7	0.0333	8.4460	
	น้ำเสียโรงงาน ขนไก่ป่น + น้ำมันถั่วเหลือง	1	0.93	10^7	0.0602	8.1889	8.1479±0.2736
		2	0.15	10^8	0.0599	8.3987	
		3	0.43	10^7	0.0599	7.8560	

ตารางที่ ค.7 ค่าแรงดึงผิวของสารลดแรงดึงผิวเมื่อใช้ทางกะทิเป็นแหล่งอาหาร

ชนิดสารลดแรง ดึงผิวชีวภาพ	ค่าแรงดึงผิว (มิลลินิวตันต่อเมตร)		
	ชุดควบคุม	ทางกะทิที่มี ค่าซีโอดี 1 เท่า	ทางกะทิที่มี ค่าซีโอดี 3 เท่า
ปล่อยออกนอกเซลล์	36.909±0.028	34.497±0.028	31.931±0.029
ติดอยู่ที่ผิวเซลล์	31.673±0.029	28.182±0.027	30.284±0.028

ตารางที่ ค.8 ค่าแรงดึงผิวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเป็นแหล่งอาหาร

ชนิดสารลดแรง ดึงผิวชีวภาพ	ชุดควบคุม	ค่าแรงดึงผิว (มิลลินิวตันต่อเมตร)			
		น้ำเสียโรงงานผลิตกะทิ		น้ำเสียโรงงานผลิตอาหารสัตว์ จากขนไก่ป่น	
		น้ำอ่อนที่เติม น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำเสีย ชั้นไขมัน	ไม่เติม น้ำมันถั่วเหลือง	เติม น้ำมันถั่วเหลือง
ปล่อยออกนอกเซลล์	35.003±0.052	38.823±1.036	24.260±0.110	34.219±0.056	34.132±0.104
ติดอยู่ที่ผิวเซลล์	35.056±0.097	34.236±0.283	30.934±0.085	43.161±0.421	36.495±0.263