



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้งโรงงานมันฝรั่งทอดกรอบ
Production of Mould Culture Medium from Potato Chip Effluent

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2554
จำนวน 253,300 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวมยุรา ศรีกัถยานุถ
ผู้ร่วมโครงการ นายฐปน ชื่นบาล
นางศิริภรณ์ ชื่นบาล
นายไพโรจน์ วงศ์ทุทธิสิน

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

28 ธันวาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้งโรงงานมันฝรั่งทอดกรอบ (Production of mould culture medium from potato chips effluent) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2554 ผู้วิจัยขอขอบคุณ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์เรื่องสถานที่ และอุปกรณ์บางอย่างที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยให้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณสถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ (IQS) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์การใช้งานเครื่อง Mini spray dryer ขนาด Lab scale คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์การใช้งานเครื่อง Spray dryer ขนาด Pilot scale ขอขอบพระคุณ บริษัทเป๊ปซี่-โคล่า (ไทย) เทรดดิ้ง จำกัด ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำทิ้งและแป้งมันฝรั่งจากกระบวนการผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ ขอขอบพระคุณผู้มีส่วนเกี่ยวข้องในการสนับสนุนการศึกษาจนทำให้การดำเนินงานประสบผลตามที่ตั้งไว้ และหากว่าผลการวิจัยครั้งนี้พอจะมีคุณค่าและได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาและส่งเสริมการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ขอมอบความดีนี้แก่ผู้ที่เกี่ยวข้องข้างต้นทุกท่าน

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ง
สารบัญตารางภาคผนวก	ช
สารบัญภาพภาคผนวก	ญ
บทคัดย่อ	1
Abstract	4
คำนำ	6
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
การตรวจเอกสาร	9
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	59
ผลและการวิจารณ์ผลการวิจัย	71
สรุปผลการวิจัย	108
เอกสารอ้างอิง	110
ภาคผนวก	116
ภาคผนวก ก อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์และรา	117
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำค้าง และผงน้ำค้างมันฝรั่ง	120
ภาคผนวก ค การหาปริมาณน้ำหนักแห้ง (Cell dry weight) ของเชื้อรา	151
ภาคผนวก ง การนับจำนวนเซลล์ยีสต์ และการนับจำนวนสปอร์เชื้อราด้วย Haemocytometer	153
ภาคผนวก จ ข้อมูลการวิจัย	157

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพ เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของอาหาร เลี้ยงเชื้อPDAหลังจากการบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ โดยสังเกต การเจริญเติบโตตั้งแต่ 18- 24 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยง	32
ตารางที่ 2 คุณค่าทางอาหารของหัวมันฝรั่ง	34
ตารางที่ 3 สมบัติของเสียจากโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ	37
ตารางที่ 4 สารอาหารที่หลงเหลือในเสียโรงงานแปรรูปมันฝรั่ง	39
ตารางที่ 5 ตำแหน่งการทดลอง และระดับค่า $\alpha=2^{k-1}$ สำหรับการทดลองแบบ CCD	46
ตารางที่ 6 จุดหรือสิ่งทดลองของการออกแบบการทดลอง แบบ rotatable design ที่มี 2 ตัวแปร	49
ตารางที่ 7 การทดลองและผลการทดลองที่สมมุติจากการใช้แผนการทดลอง แบบ pentagon	52
ตารางที่ 8 ระดับของตัวแปรอิสระที่ใช้ในการทดลอง	67
ตารางที่ 9 จุดหรือสิ่งทดลองสำหรับแผนการทดลอง 2 ตัวแปรชนิดกำลังสอง แบบหมุน (rotatable design) แบบ pentagon	68
ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติ น้ำล้างมันฝรั่งและน้ำเสียของโรงงาน มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ	72
ตารางที่ 11 ปริมาณ โปรตีนและค่าความชื้นของผงน้ำล้างมันฝรั่ง	80
ตารางที่ 12 การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดลองด้วยแผนการทดลองแบบ CCD รูปแบบ pentagon ที่มีตัวแปรอิสระ 2 ตัวแปร	83
ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ค่า effect และค่า regression coefficients สำหรับ การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	84
ตารางที่ 14 อัตราการเจริญของโคโลนีเชื้อราเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง และอาหารแข็งชุดควบคุม	87
ตารางที่ 15 จำนวนสปอร์ของเชื้อรา <i>R. oligosporus</i> และ <i>A. oryzae</i> จากการทดลองด้วย แผนการทดลองแบบ CCD รูปแบบ pentagon ที่มีตัวแปรอิสระ 2 ตัวแปร	90

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ค่า effect และค่า regression coefficients สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อรา <i>R. oligosporus</i>	91
ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ค่า effect และค่า regression coefficients สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อรา <i>A. oryzae</i>	92
ตารางที่ 18 ผลการทดลอง (experimental) และค่าการทำนาย (predicted) ของจำนวนโคโลนีเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่งสูตร optimum medium	96
ตารางที่ 19 ผลการทดลอง (experimental) และค่าการทำนาย (predicted) ของจำนวนสปอร์ของเชื้อราที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่งสูตร optimum medium	99
ตารางที่ 20 น้ำหนักแห้งของเชื้อรา <i>R. oligosporus</i> และ <i>A. oryzae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม	100
ตารางที่ 21 อัตราการเจริญของโคโลนีเชื้อรา <i>R. oligosporus</i> และ <i>A. oryzae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม	103

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	รูปร่างของราบางชนิด	10
ภาพที่ 2	สัณฐานวิทยาของราที่สำคัญ	11
ภาพที่ 3	วงจรชีวิตของราจีนัส <i>Mucor</i> spp.	13
ภาพที่ 4	ลักษณะการเพิ่มจำนวนของยีสต์	24
ภาพที่ 5	กราฟการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในระบบปิด	26
ภาพที่ 6	กระบวนการผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ และน้ำเสียที่เกิดขึ้นในระบบ	36
ภาพที่ 7	ผลการทดลองที่สมมุติจาก one-variable-at-a-time ของการทดลองชุดที่ 1-5 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และเวลาในเกิดโด (dough) ในผลิตภัณฑ์ขนมปังที่กำหนดอุณหภูมิคงที่ที่ 25 °C	41
ภาพที่ 8	ผลการทดลองที่สมมุติจาก one-variable-at-a-time ของการทดลองชุดที่ 6-10 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และเวลาในเกิดโด (dough) ในผลิตภัณฑ์ขนมปังที่กำหนดเวลาให้คงที่ที่ 120 นาที	42
ภาพที่ 9	พื้นที่การตอบสนองจริงที่เป็นไปได้ของค่า specific volume ที่เกิดขึ้นจากการทดลองเวลาที่ใช้ในการเกิด โดและอุณหภูมิ กับจุดต่างๆ ที่แสดงผลจากการทดลอง one-variable-at-a-time	42
ภาพที่ 10	กราฟ 3 มิติของพื้นที่ผิวดตอบสนอง	45
ภาพที่ 11	ส่วนประกอบทั้ง 3 ส่วนของ CCD และจุดของการออกแบบ 9 สิ่งทดลอง สำหรับ 2 ปัจจัย	45
ภาพที่ 12	จุดของการออกแบบ 15 สิ่งทดลองใน composite design ที่มี 3 ปัจจัย	46
ภาพที่ 13	การออกแบบแบบหมุนของ 2 ตัวแปร ใน 3 รูปแบบ	48
ภาพที่ 14	การคำนวณระดับโดยละเอียดสำหรับแผนแบบ Pentagon	48
ภาพที่ 15	ขั้นตอนในการศึกษาวิจัย	62
ภาพที่ 16	การเจริญของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเหลว สูตร PDB ชนิดต่างๆ	73
ภาพที่ 17	ลักษณะ โคลนินของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเหลว สูตร PDB ชนิดต่างๆ	74
ภาพที่ 18	การเจริญของเชื้อรา <i>A. oryzae</i> ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ	75

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 19	การเจริญของเชื้อรา <i>R. oligosporus</i> ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเหลว สูตร PDB ชนิดต่างๆ	77
ภาพที่ 20	(ก) อาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ, (ข) ลักษณะ mycelium ของเชื้อ <i>A. oryzae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 2 วัน, (ค) ลักษณะ mycelium ของเชื้อ <i>R. oligosporus</i> ที่เลี้ยงด้วย อาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง	78
ภาพที่ 21	การเจริญของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียม จากผงน้ำตาลมันฝรั่ง และอาหารเหลวซดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	82
ภาพที่ 22	ความสัมพันธ์ของระดับตัวแปรอิสระ ที่ได้แก่ ผงน้ำตาลมันฝรั่ง ($X_1 = 91-212$ g/l) และน้ำตาลเดกซ์โทรส ($X_2 = 10-30$ g/l) กับจำนวน โคโลนีของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> (Y) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง ทั้งหมด 9 สูตร	85
ภาพที่ 23	การเจริญของเชื้อรา <i>R. oligosporus</i> และ <i>A. oryzae</i> เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลว สูตร PDB และอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง และอาหารซดควบคุม	89
ภาพที่ 24	ความสัมพันธ์ของระดับตัวแปรอิสระ ที่ได้แก่ ผงน้ำตาลมันฝรั่ง ($X_1 = 91-212$ g/l) และน้ำตาลเดกซ์โทรส ($X_2 = 10-30$ g/l) กับจำนวนสปอร์ ของเชื้อ <i>R. oligosporus</i> (Y) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง ด้วย อาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่งทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง	93
ภาพที่ 25	ความสัมพันธ์ของระดับตัวแปรอิสระ ที่ได้แก่ ผงน้ำตาลมันฝรั่ง ($X_1 = 91-212$ g/l) และน้ำตาลเดกซ์โทรส ($X_2 = 10-30$ g/l) กับจำนวนสปอร์ ของเชื้อ <i>A. oryzae</i> (Y) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง ด้วยอาหารแข็ง สูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่งทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง	94
ภาพที่ 26	การเจริญของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจาก ผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวซดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	97

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 27	ลักษณะของเชื้อยีสต์ <i>S.cerevisiae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม	98
ภาพที่ 28	ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา <i>R. oligosporus</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม	101
ภาพที่ 29	ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา <i>A. oryzae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม	102
ภาพที่ 30	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา <i>R. oligosporus</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม (a, b และ c)	104
ภาพที่ 31	ลักษณะ โคโลนีของเชื้อรา <i>A. oryzae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม (a, b และ c)	105
ภาพที่ 32	ลักษณะของเชื้อรา <i>R. oligosporus</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม (a, b และ c)	106
ภาพที่ 33	ลักษณะของเชื้อรา <i>A. oryzae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม (a, b และ c)	107

สารบัญตารางภาคผนวก

		หน้า
ตารางภาคผนวกที่ 1	การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method	212
ตารางภาคผนวกที่ 2	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี DNS method ที่ความยาวคลื่น 520 nm	122
ตารางภาคผนวกที่ 3	การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric	123
ตารางภาคผนวกที่ 4	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Phenol sulfuric ที่ความยาวคลื่น 490 nm	124
ตารางภาคผนวกที่ 5	การเตรียมสารละลายมาตรฐานโลหะ	131
ตารางภาคผนวกที่ 6	ปริมาณการเติมสารละลายมาตรฐานเพื่อหา % Recovery	132
ตารางภาคผนวกที่ 7	ปริมาตรของสารละลาย LaCl_3 , CsCl	132
ตารางภาคผนวกที่ 8	การวัด FAAS และการปรับความยาวคลื่น	133
ตารางภาคผนวกที่ 9	การเจือจางและชนิดตัวอย่างน้ำ (Dilution and Type of Sample)	145
ตารางภาคผนวกที่ 10	บีโอดีที่วัดได้กับอัตราการเจือจางต่างๆ	145
ตารางภาคผนวกที่ 11	ชนิดของแหล่งน้ำต่อค่าบีโอดี	147
ตารางภาคผนวกที่ 12	จำนวนโคโลนีของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ	158
ตารางภาคผนวกที่ 13	น้ำหนักแห้งของเชื้อรา <i>A. oryzae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ	158
ตารางภาคผนวกที่ 14	น้ำหนักแห้งของเชื้อรา <i>R. oligosporus</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ	159
ตารางภาคผนวกที่ 15	จำนวนโคโลนีของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง และอาหารเหลวชุดควบคุมทั้งหมด เป็นเวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมง	159
ตารางภาคผนวกที่ 16	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง และอาหารเหลวชุดควบคุมทั้งหมด เป็นเวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมง	160

สารบัญตารางภาคผนวก (ต่อ)

	หน้า
ตารางภาคผนวกที่ 17 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา <i>R. oligosporus</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง และอาหารแข็งชุดควบคุม	160
ตารางภาคผนวกที่ 18 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา <i>A. oryzae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง และอาหารแข็งชุดควบคุม	161
ตารางภาคผนวกที่ 19 น้ำหนักแห้งของเชื้อรา <i>R. oligosporus</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง และอาหารเหลวชุดควบคุม	161
ตารางภาคผนวกที่ 20 น้ำหนักแห้งของเชื้อรา <i>A. oryzae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง และอาหารเหลวชุดควบคุม	162
ตารางภาคผนวกที่ 21 จำนวนสปอร์ของเชื้อรา <i>R. oligosporus</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง และอาหารแข็งชุดควบคุม	162
ตารางภาคผนวกที่ 22 จำนวนสปอร์ของเชื้อรา <i>A. oryzae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง และอาหารแข็งชุดควบคุม	163
ตารางภาคผนวกที่ 23 จำนวนโคโลนีของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	163
ตารางภาคผนวกที่ 24 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	164
ตารางภาคผนวกที่ 25 จำนวนสปอร์ของเชื้อรา <i>R. oligosporus</i> และ <i>A. oryzae</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม	164
ตารางภาคผนวกที่ 26 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา <i>R. oligosporus</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม	165

สารบัญตารางภาคผนวก (ต่อ)

หน้า

ตารางภาคผนวกที่ 27 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วย
อาหารแข็งPDA ที่เตรียมจากผงน้ำถั่วเหลืองสูตร optimum
medium และอาหารแข็งชุดควบคุม

165

สารบัญภาพภาคผนวก

	หน้า
ภาพภาคผนวกที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส ด้วยวิธี DNS method ที่ความยาวคลื่น 520 nm	122
ภาพภาคผนวกที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส ด้วยวิธี Phenol sulfuric ที่ความยาวคลื่น 490 nm	124
ภาพภาคผนวกที่ 3 Flow chart การเก็บรักษาตัวอย่าง	139
ภาพภาคผนวกที่ 4 Flow chart วิธีการโดยตรง (ไม่ต้องเจือจางตัวอย่าง)	143
ภาพภาคผนวกที่ 5 Hemocytometer และสเกลใน Hemocytometer	155

การผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้งโรงงานมันฝรั่งทอดกรอบ

Production of Mould Culture Medium from Potato Chip Effluent

มยุรา ศรีกัณยานุกุล ฐปน ชื่นบาล ศิราภรณ์ ชื่นบาล และไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน

Mayura Srikanlayanukul, Tapana Cheunbarn, Siraporn Cheunbarn
and Pairote Wongputtisinn

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบของน้ำทิ้ง ซึ่งเป็นน้ำเสียที่ได้รับจากกระบวนการล้างแผ่นมันฝรั่งของโรงงานผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ และตรวจสอบความเป็นไปได้ของการใช้น้ำทิ้งผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์และรา โดยพบว่าน้ำจากกระบวนการล้างแผ่นมันฝรั่งประกอบไปด้วย น้ำตาลทั้งหมด 408 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลรีดิวซ์ 24 มิลลิกรัมต่อลิตร และโปรตีน 0.13% ไม่พบอัลฟาท็อกซินและสารเคมีตกค้าง จากการศึกษาดังกล่าวทำให้พบว่าน้ำทิ้งยังคงมีสารอาหารที่หลงเหลืออยู่ ทำให้มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ และรา จึงได้ใช้น้ำทิ้งเป็นวัตถุดิบสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA และหรือ Potato Dextrose Broth (PDB) เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5020) และเชื้อรา (*Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus*) เมื่อศึกษาความเหมาะสมและความเป็นไปได้ของการใช้น้ำทิ้งเพื่อเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB พบว่าเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำทิ้ง (PDB prepared from potato chip effluent) กับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ชุดควบคุม อันได้แก่ PDB สำเร็จรูปทางการค้า (commercial PDB) และ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (PDB prepared from potatoes) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลที่ได้จากการตรวจนับโคโลนีที่มีชีวิตทั้งหมดด้วยวิธี standard plate count คือ เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5020 สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำทิ้งเทียบเท่ากับการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง โดยมีการเจริญเติบโตเท่ากับ 7.54 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (log CFU/ml) แม้ว่าจะมีการเจริญที่ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จทางการค้า ซึ่งมี

การเจริญอยู่ที่ 7.65 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิกรัม ในส่วนของเชื้อราพบว่า เชื้อ *A. oryzae* เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยง PDB สำเร็จรูปทางการค้าได้ดีกว่า เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ PDB ที่เตรียมจากน้ำทิ้ง โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน เท่ากับ 7.58 กรัมต่อลิตร, 7.22 กรัมต่อลิตร และ 5.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อรา *R. oligosporus* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากมันฝรั่ง รองลงมา คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำทิ้ง โดยมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง อยู่ที่ 4.59 กรัมต่อลิตร, 2.64 กรัมต่อลิตร และ 1.46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อใช้ผงแห้งของน้ำทิ้ง (potato chip effluent powder) ที่ได้จากการอบแห้งน้ำทิ้งความเข้มข้นของมอลโตเดกซ์ทริน 5% ด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยระดับ pilot scale ที่อุณหภูมิเข้า 175-215 °C และอุณหภูมิออกที่ 75-90 °C เตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และหรือ PDA ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM) การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design; CCD) เพื่อศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากผงน้ำทิ้ง โดยมีตัวแปรอิสระที่ศึกษา คือ ผงน้ำทิ้ง (X_1 , 91-212 กรัมต่อลิตร) และน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2 , 10-30 กรัมต่อลิตร) มีผลต่อค่าตอบสนองหรือตัวแปรตาม คือ อัตราการเจริญของเชื้อยีสต์และรา (Y) ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว จากการศึกษพบว่า การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB โดยใช้ผงน้ำทิ้ง 170 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลเดกซ์โทรส 22 กรัมต่อลิตร เป็นสูตรให้ค่าการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ได้สูงสุดที่ 7.056 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิกรัม ในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการเลี้ยงเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และหรือ PDA สูตรที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ คือ ผงน้ำทิ้ง 212 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลเดกซ์โทรส 32 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *R. oligosporus* สามารถสร้างสปอร์ได้เท่ากับ 6.18 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิกรัม ในชั่วโมงที่ 84 ของการเพาะเลี้ยง และเชื้อ *A. oryzae* ได้เท่ากับ 7.33 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิกรัม ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และจากการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ด้วยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ชุดควบคุม อันได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้าทางการค้า, อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น กับ การเลี้ยงเชื้อดังกล่าวด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้งจากสูตรที่เหมาะสม (PDB optimum medium) พบว่า เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* สามารถที่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้งด้วยอัตราที่ใกล้เคียงกับการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้าทางการค้า และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง โดยมีอัตราการเจริญที่ดีกว่า

เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้แสดงให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ที่จะใช้น้ำทิ้งเพื่อผลิตและพัฒนาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีความคงที่ที่แน่นอนต่อไปได้

คำสำคัญ: น้ำทิ้งโรงงานมันฝรั่งทอดกรอบ



Abstract

The research was conducted to study composition of potato chip effluent obtained from potato slices washing process in potato chips factory and investigate the feasibility of using the potato chip effluent as a PDA medium for yeast and mold cultivation. Results showed potato chip effluent sample contained total sugar 408 mg/l, reducing sugar 24 mg/l and 0.13% of protein. No alpha-toxin and pesticide residues were found. The results of these studies indicated that potato chip effluent remain contained nutrients, making them suitable for support the growth of yeast and mold. The potato chip effluent was used as the substrates for prepared the culture medium, PDA and/ or Potato Dextrose Broth (PDB) used for cultivating yeast (*Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5020) and molds (*Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oligosporus*). On the study the feasibility and possibility of using the potato chip effluent prepared as a PDB culture medium, it was found that compared the growth of yeast *S. cerevisiae* TISTR 5020 was cultivated in PDB prepared from potato chip effluent with control PDB medium, contained commercial PDB and PDB prepared from potatoes at 72 hours. Results showed viable colony count by standard plate count method, *S. cerevisiae* TISTR 5020 was able to grow in PDB prepared from potato chip effluent equate with cultivated in PDB prepared from potatoes, there is growing 7.54 log CFU/ml although less than in commercial PDB (7.65 log CFU/ml). Molds, *A. oryzae* was able to grow in commercial PDB better than in PDB prepared from potatoes and PDB prepared from potato chip effluent, cell dry weight harvested at 7 day after inoculation was 7.58 g/l, 7.22 g/l and 5.36 g/l for, respectively. While *R. oligosporus* was able to grow in PDB prepared from potatoes better than in commercial PDB and PDB prepared from potato chip effluent, the result was 4.59 g/l, 2.64 g/l and 1.46 g/l of dry weight, respectively at 84 hours cultivation.

The potato chip effluent containing 5% maltodextrin was spray dried using a pilot scale spray dryer, inlet temperature at 175- 215 °C and outlet temperature at 75-90 °C. The potato chip effluent powder produced used as a medium culture, PDA and/or PDB by Response Surface methodology (RSM), a Central Composite Design (CCD) was applied to optimize culture medium prepared from potato chip effluent powder. The two independent variables investigated in this experiment were potato chip effluent powder (X_1 91-212 g/l) and dextrose (X_2 10-30 g/l). Dependent variable was growth of yeast and molds (Y). A combination of the spray dried powder

170 g/l, and dextrose 22 g/l was optimum for maximum growth of *S. cerevisiae* TISTR 5020 (7.056 log CFU/ml) at 24 h after incubation. is also study by means of using commercial PDB and the PDB medium prepared from potatoes by the standard formula in comparison. *S. cerevisiae* TISTR 5020 was able to grow at a similar rate in all three of the PDB. The current study indicates that it is possible to use potato chip effluent as a PDA medium due to the similar growth rate of yeast in PDB from the spray dried powder when compared with commercial PDB and PDB prepared from potatoes by the standard formula.

Key words: Potato chip effluent

คำนำ

อุตสาหกรรมผลิตมันฝรั่งทอดกรอบ เป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมอาหารว่างประเภทขนมขบเคี้ยว ที่ได้รับความนิยมบริโภคอย่างแพร่หลายในประเทศไทย และมีความต้องการมันฝรั่งเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตประมาณ ปีละ 124,100 ตัน ทั้งนี้พบว่าภายหลังกระบวนการผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบในแต่ละวัน ได้สร้างน้ำทิ้งจากขั้นตอนต่างๆ ของการผลิตเป็นจำนวนมาก ซึ่งน้ำทิ้งเหล่านี้จะถูกส่งไปบำบัดยังระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงาน จนกระทั่งมีระดับสารอินทรีย์ในช่วงตามที่มาตรฐานกำหนดก่อนจะระบายสู่สิ่งแวดล้อม ในส่วนของกระบวนการบำบัดน้ำเสียนี้ทำให้โรงงานมีค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนหนึ่งในการดำเนินการอีกเช่นกัน จากรายงานที่มีการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะของน้ำทิ้งดังกล่าวพบว่า ประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ที่มีปริมาณความเข้มข้นสูง รวมทั้งสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต แป้ง โปรตีน วิตามิน เพคติน และน้ำตาล จึงส่งผลให้น้ำทิ้งมีค่าซีไอดี บีไอดี และปริมาณสารแขวนลอยสูงตามไปด้วย ก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นเป็นมลพิษทางสิ่งแวดล้อม ดังนั้นที่ผ่านมาจึงได้มีความพยายามพัฒนาระบบบำบัดให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นควบคู่ไปกับการใช้ประโยชน์จากน้ำเสียกันอย่างกว้างขวางเป็นเวลานาน ในงานวิจัยนี้ได้มีความสนใจที่จะลดปริมาณน้ำทิ้งที่จะเข้าสู่ระบบบำบัดของโรงงาน โดยได้มุ่งความสนใจไปที่น้ำทิ้งที่เกิดจากการล้างแป้งและน้ำตาลออกจากแผ่นมันฝรั่งดิบในขั้นตอนการหั่นมันฝรั่งให้เป็นแผ่น มาใช้ในการศึกษา เนื่องจากน้ำทิ้งที่มาจากขั้นตอนนี้ไม่มีเศษหินและดินปะปน และคาดว่าจะอาจไม่มีสารเคมีปนเปื้อน เพราะก่อนที่มันฝรั่งจะเข้าสู่ขั้นตอนหั่นให้เป็นแผ่น มันฝรั่งจะถูกล้างทำความสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ออกก่อน จึงทำให้น้ำที่ผ่านการใช้งานในขั้นตอนดังกล่าว มีลักษณะความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ประโยชน์ด้วยการทำเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งยังจะเป็นการช่วยลดปริมาณน้ำเสียที่จะเข้าสู่ระบบบำบัดได้อีกทางหนึ่งด้วย

โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการในสถาบันวิจัย หรือห้องปฏิบัติการของบางมหาวิทยาลัย จะใช้อาหารสำเร็จรูปสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) มาเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อราและยีสต์ เนื่องจากมีมาตรฐานและความคงที่ที่แน่นอนแต่มีราคาค่อนข้างสูง เพราะต้องนำเข้าจากต่างประเทศ โดยราคาของอาหาร PDA สำเร็จรูปนี้จะอยู่ระหว่าง 1,800-3,000 บาท เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการเรียนการสอนให้กับนักศึกษา จึงต้องมีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากหัวมันฝรั่งขึ้นมาใช้เอง ซึ่งมีราคาถูกแต่ต้องใช้เวลาในการเตรียมพอสมควร ทั้งยังพบว่ามีปัญหาการขาดแคลนมันฝรั่งในช่วงนอกฤดูการเก็บเกี่ยว และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมได้ในแต่ละครั้งอาจมีสารอาหารไม่คงที่ จึงอาจไม่เหมาะหากจะใช้งานวิจัยระดับสูง ดังนั้นจึงได้พิจารณาความเป็นไปได้ของการนำน้ำทิ้งจากขั้นตอนการล้างแผ่นมันฝรั่งมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA

และเพื่อเพิ่มความสะดวกในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากน้ำทิ้ง รวมถึงเพื่อเป็นการป้องกันการเสื่อมเสียคุณภาพของน้ำทิ้งระหว่างการเก็บรักษา จึงได้ใช้เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมแก่การแปรรูปของเหลวให้เป็นผง มาใช้ในการอบแห้งน้ำทิ้งให้อยู่ในรูปของผงแห้ง โดยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer)

ในงานวิจัยนี้จะนำผงน้ำทิ้งที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอย ไปใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยหลักการของพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology: RSM) โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design: CCD) เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยสำคัญสองปัจจัยที่เกี่ยวข้อง อันได้แก่ ปริมาณผงน้ำทิ้ง และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส เพื่อเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งนอกจากการศึกษาด้วยวิธี CCD จะช่วยให้สามารถหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมได้แล้ว ยังสามารถแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของผลเมื่อระดับของปัจจัยเปลี่ยนแปลงได้ จึงทำให้ข้อมูลที่ได้มาจากการใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD นี้ อาจถูกนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้งที่มีคุณภาพทัดเทียมกับผลิตภัณฑ์นำเข้าต่อไปได้ในอนาคต สามารถใช้ในการเรียนการสอนและงานวิจัย เพิ่มความสะดวกแก่นักศึกษาและนักวิจัยได้ ไม่เพียงเท่านั้นยังสามารถพัฒนาต่อยอดไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่จัดจำหน่ายให้กับสถาบันต่างๆ โดยเป็นการสร้างรายได้ให้กับองค์กรอีกทางหนึ่ง การศึกษาการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบครั้งนี้ก็จะเกิดผลดีต่อหลายๆ ภาคส่วน ไม่ว่าจะเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียของโรงงาน การลดปัญหาสิ่งแวดล้อมในชุมชนโดยรอบโรงงาน การลดค่าใช้จ่ายของห้องปฏิบัติการในการสั่งซื้ออาหารสำเร็จรูปจากต่างประเทศ และยังเป็นการสร้างรายได้ให้กับองค์กรหากมีการต่อยอดทำในเชิงธุรกิจ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. วิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทิ้งจากโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ
2. ศึกษาความเหมาะสมและความเป็นไปได้ของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมจากน้ำทิ้งของโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ
3. พัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมจากผงบี้ น้ำทิ้งด้วยการออกแบบการทดลองแบบ CCD และเปรียบเทียบคุณภาพของอาหารที่ได้กับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมจากน้ำทิ้งให้อยู่ในรูปที่สะดวกต่อการใช้งาน และการเก็บรักษา โดยมีคุณภาพเทียบเท่าหรือใกล้เคียงกับที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป รวมถึงได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์จากการใช้แบบการทดลอง CCD ในการวิเคราะห์ผลเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของปัจจัย เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากน้ำทิ้งให้สามารถใช้ทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDA ต่อไปได้ในอนาคต รวมไปถึงสามารถช่วยลดปัญหาของเสียจากกระบวนการผลิตมันฝรั่งทอดให้น้อยลงได้

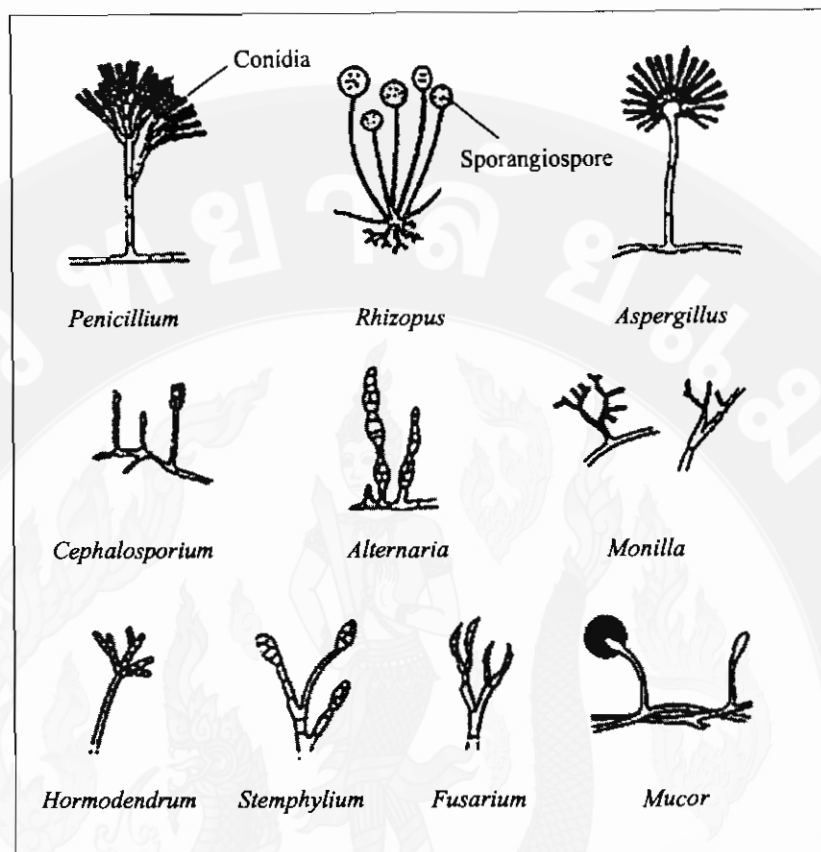
การตรวจเอกสาร

ฟังไจ (Fungi)

ฟังไจเป็นสิ่งมีชีวิต หรือ จุลินทรีย์ จำพวกยูคาริโอต (eukaryote) ไม่มีคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) จึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงและสร้างอาหารเองได้ จัดเป็นพวกที่ได้อาหารจากสารอินทรีย์ (heterotrophy) เพื่อการเติบโต เมื่อกล่าวถึงจุลินทรีย์ในอาณาจักรฟังไจจะหมายถึง เชื้อรา (mold) เชื้อยีสต์ (yeast) และเห็ด (mushroom)

1. รา (Mold)

รามีลักษณะทั่วไปแตกต่างจากยีสต์ โดยรามีลักษณะเป็นเส้นใยมากกว่ายีสต์ เส้นใยราเกิดจากเซลล์หลายเซลล์ต่อกัน หรืออาจติดต่อกันตลอดเป็นเซลล์เดียวขนาดยาวมากก็ได้ (อโณทัย, 2535: 8) เชื้อราได้รับสารอาหารโดยการปล่อยเอนไซม์ (extracellular enzyme) ออกมาเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ให้เป็นมอโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) และย่อยโปรตีน (protein) ให้เป็นกรดอะมิโน (amino acid) แล้วจึงดูดซึมเข้าสู่เซลล์หรือเส้นใย ราส่วนใหญ่ดำรงชีพแบบทั้งที่เป็นอิสระ หรือเป็นผู้ย่อยสลายซากอินทรีย์ (saprophyte) บางชนิดเป็นปรสิต (parasite) และบางชนิดสามารถดำรงชีวิตโดยเป็นได้ทั้ง parasite และ saprophyte (สมจิตร, 2552: 1) ราเติบโตในภาวะที่มีอากาศเท่านั้น (obligate arobe) จึงพบเจริญเติบโตบริเวณผิวหนังหรืออาหาร รวมไปถึงเจริญบนสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น ซากพืช ซากสัตว์ หรือพืช และสัตว์ที่ยังมีชีวิตอยู่ หากพืชหรือสัตว์ที่ยังมีชีวิตอยู่ถูกรักษาเป็นอาหารก็จะเป็นโรคพืช โรคสัตว์ชนิดต่างๆ แต่ราบางชนิดให้ประโยชน์ในการผลิตสารเคมีหลายชนิดที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและการแพทย์ (อโณทัย, 2535: 8) นอกจากนี้ร่ายังถูกนำมาเพื่อใช้เป็นอาหารได้โดยตรง เช่น เห็ด (mushroom) ชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นราพวกที่มีขนาดใหญ่ ลักษณะเป็นเส้นใยและสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เกิดจากเส้นใยของรามารวมกันและอัดแน่นเป็นดอกเห็ด (ดวงพร, 2545: 3) ตัวอย่างของราเช่น *Rhizopus* spp. *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. และเห็ด เช่น เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) ตัวอย่างรูปร่างของรา ดังแสดงในภาพที่ 1



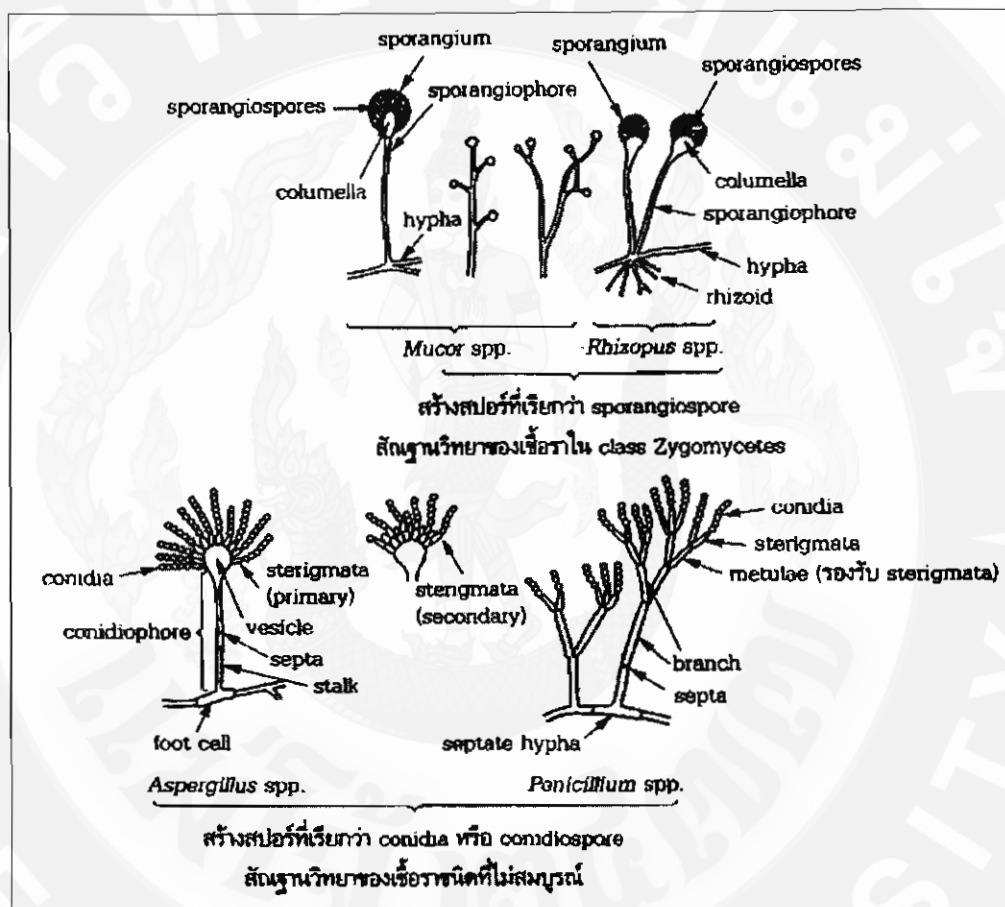
ภาพที่ 1 รูปร่างของราบางชนิด

ที่มา: ควงพร (2545: 3)

1.1 สันฐานวิทยาของรา

รามีโครงสร้างเรียงตัวกันเป็นเส้นใย (multicellular filamentous fungi) เส้นใยราแต่ละเส้นนั้นจะเรียกว่า ไฮฟา (hypha) เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-10 ไมโครเมตร (micrometer; μm) อาจแตกแขนงได้มากมาย เมื่อรวมกลุ่มจำนวนมากจนมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจะเรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) (บุษกร, 2545) เส้นใยรา หรือไฮฟา จะมีลักษณะเป็นเซลล์ติดต่อกันหลายเซลล์มีผนังกัน หรืออาจมีลักษณะคล้ายท่อยาวตลอดไม่มีผนังกัน ภายในประกอบด้วยส่วนประกอบของเซลล์ โดยเส้นใยมีลักษณะแตกต่างกัน 3 ลักษณะ คือ เส้นใยไม่มีผนังกัน (nonseptate hypha) เส้นใยมีผนังกัน (septate hypha) แบ่งเซลล์เป็นห้องๆ มีหนึ่งนิวเคลียส (uninucleate) และเส้นใยมีผนังกันแต่มีหลายนิวเคลียส (multinucleate) กลุ่มของเส้นใยอาจมีลักษณะหลวมๆ หรือแน่นมากๆ ก็ได้ ส่วนปลายของเส้นใยจะมีการเจริญที่ทำให้เกิดการยืดยาวออกไป (โอโธทัย, 2535ข: 125-126; สมจิตร, 2552: 2) สามารถแบ่งหน้าที่ของเส้นใยราออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนสืบพันธุ์ (fertile hypha) กับ

ส่วนเวเจเตติฟ (vegetative part) ส่วนสืบพันธุ์สามารถสร้างสปอร์ซึ่งตามปกติสปอร์จะชูขึ้นไปในอากาศเกิดจากกลุ่มไฮราซึ่งเป็นส่วนเวเจเตติฟ ส่วนเวเจเตติฟนี้อาจอยู่บนผิวอาหารหรือแทงลงไป ในอาหารก็ได้ เพื่อดูดสารอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของรา (อโณทัย, 2535: 126) ในการศึกษาเกี่ยวกับราจำเป็นต้องรู้จักชื่อและลักษณะโครงสร้างที่สำคัญ ซึ่งแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ลักษณะโครงสร้างที่สำคัญ

ที่มา: สุวิมล (2546: 64)

นิวเคลียส (nucleus) ของรามีย่อยหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) ประกอบด้วยเยื่อ 2 ชั้น ภายในนิวเคลียสมี 1 นิวคลีโอลัส (nucleolus) ที่ล้อมด้วยไซโทพลาสซึม (cytoplasm) เชื้อราส่วนใหญ่มีโครโมโซม (chromosome) เพียงชุดเดียว (haploid) แต่บางชนิดมีวงจรชีวิตที่มีนิวเคลียสเป็นแบบสลับระหว่าง แฮพลอยด์ (haploid) และดิพลอยด์ (diploid) จำนวนนิวเคลียสภายในแต่ละเซลล์มีจำนวนที่หลากหลายขึ้นกับชนิดของรา บางชนิดมีหนึ่งนิวเคลียส บางชนิดมีหลายนิวเคลียส

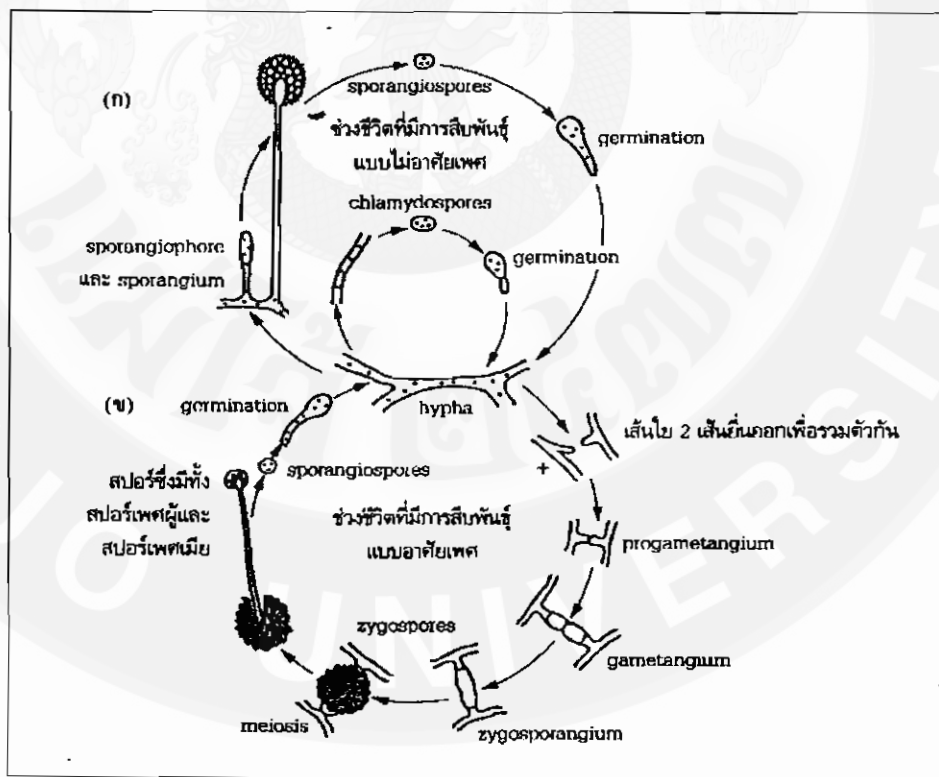
และจำนวนโครโมโซมของเชื้อราในแฮพลอยด์เซลล์ (haploid cell) มีจำนวนแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของเชื้อรา ผนังเซลล์ (cell wall) ของราประกอบด้วยสารโพลีแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) ที่สำคัญคือ ไคติน (chitin), กลูแคน (glucan), เซลลูโลส (cellulose) และแมนแนน (mannan) นอกจากนี้ยังมีโปรตีนและไขมัน โดยโปรตีนที่พบมักเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ซึ่งโปรตีนบางชนิดสามารถทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ได้ (สมจิตร, 2552: 9)

ตามปกติราสืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ หรือใช้เส้นใยรากี้ได้ ราวส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่แต่บางชนิดมีเซลล์สืบพันธุ์เคลื่อนที่ได้ การสร้างสปอร์ทำได้สองแบบคือ แบบอาศัยเพศ (non-asexual spore) และแบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) สปอร์แบบอาศัยเพศที่สร้างโดยรา ได้แก่ โอสปอร์ (oospore), ไชโกสปอร์ (zygospore), แอสโคสปอร์ (ascospore) และ เบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ในการสืบพันธุ์แบบนี้ จะมีการผสมกันระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ (sex cell) และนิวเคลียส จึงมีระยะที่นิวเคลียสมีลักษณะเป็นดิพลอยด์ ($2N$) และในขั้นสุดท้ายนิวเคลียส ($2N$) มีการแบ่งแบบไมโอซิส (meiosis) จำนวนโครโมโซมจาก $2N$ เป็น N ทำให้ได้สปอร์ที่มีลักษณะเป็นแฮพลอยด์ ส่วนสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่สร้างโดยรา ได้แก่ สปอร์แรงจิโอสปอร์ (sporangiospore), โคนิเดีย (conidia) หรือ โคนิดิโอสปอร์ (conidiospore), คลามิโดสปอร์ (clamydospore) และอาร์โทรสปอร์ (arthrospore) เป็นต้น สร้างขึ้นโดยการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยที่เติบโตเต็มที่หลุดออกเป็นท่อนๆ ซึ่งไม่เกิดการรวมนิวเคลียสหรือการแบ่งนิวเคลียสแต่อย่างใด และมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส (mitosis) ได้เพียงอย่างเดียว (บุษกร, 2545; วิจัย, 2551: 9-11) ราในจีนัส *Mucor* spp. และจีนัส *Rhizopus* spp. เป็นตัวอย่างของราที่มีการสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศที่เรียกว่า ไชโกสปอร์ ราจีนัส *Mucor* spp. มีวงจรชีวิตดังแสดงในภาพที่ 2 ในช่วงชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (ภาพที่ 3 ก) ราจีนัส *Mucor* spp. จะสร้างไชโกสปอร์ ไชโกสปอร์จะมีเยื่อ (membrane) หนาสีน้ำตาลเข้มหุ้มล้อมรอบโดยที่ผิวสปอร์จะนูนเป็นปุ่มๆ ภายในสปอร์จะมีสารอาหารสะสมไว้อย่างสมบูรณ์ จึงทนต่อความแห้งแล้งได้เป็นเวลานาน เมื่อแก่เต็มที่ เยื่อด้านนอกจะแตกและงอกออกมากลายเป็นเส้นใย ซึ่งจะเจริญเข้าสู่วงจรแบบไม่อาศัยเพศ และสร้างสปอร์ที่เรียกว่า สปอร์แรงจิโอสปอร์ ดังแสดงในภาพที่ 3 (ข) การสร้างสปอร์ประเภทนี้พบในราจีนัส *Mucor* spp. และ จีนัส *Rhizopus* spp.

1.2 ลักษณะการเจริญของรา

การเติบโตของรา เป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น ราที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous fungi หรือ mold) การเจริญเติบโตจะทำให้เส้นใยมีความยาวและมีการแตกแขนงมากขึ้น อาจวัดการเจริญจากขนาดของโคโลนี (colony) หรือน้ำหนักแห้ง (biomass) ของเส้นใย การเจริญเติบโตของราชั้นอยู่กับสารอาหารและปัจจัยอื่นๆ ของสภาพแวดล้อม การเพาะเลี้ยงราจึงสามารถทำได้โดยตัดส่วนของเส้นใยไปเพาะเลี้ยงในสารอาหารใหม่ ราสามารถแบ่งเซลล์เจริญยื

ยาวออกจากส่วนปลายทุกด้านของเส้นใย เชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารวุ้น จะมีการยืดยาวของเส้นใยออกไปจากจุดที่เพาะเชื้อ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีอายุน้อยกว่าเซลล์ที่อยู่ด้านในของโคโลนี (สมจิตร, 2552: 33-35) เมื่อเราเคาะโบนอาหารอาจเห็นกลุ่มใยมีลักษณะคล้ายกับสำลี มีสีต่างๆ สีของราอาจขึ้นอยู่กับชนิดของรานั้นๆ หรือขึ้นอยู่กับอายุของรา หรือขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่ราเติบโต ราเป็นพวกเคาะโคโนที่มีมือออกซิเจน จึงพบที่ผิวหน้าของอาหารซึ่งมีออกซิเจนมากกว่าภายในเนื้อของอาหาร แต่ใยบางส่วนจะแทงลงไปเนื้อของอาหารเพื่อนำไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ราบางชนิดกลุ่มใยรา มีลักษณะฟูแต่บางชนิดอัดตัวกันแน่น ลักษณะราด้านบนที่ปรากฏอาจคล้ายกำมะหยี่ หรือมีลักษณะแห้งและเป็นผง ในขณะที่ราบางชนิดอาจมีลักษณะเปียกหรือคล้ายวุ้น ราบางชนิดมีลักษณะการเจริญจำกัด ในขณะที่บางชนิดลักษณะการเจริญไม่จำกัด สารสีในใยซึ่งมีสีแดง ม่วง เหลือง น้ำตาล เทาและดำ เป็นลักษณะค่อนข้างเฉพาะ เช่นเดียวกับสารสีในสปอร์แบบไม้อาศัยเพศ ซึ่งอาจมีสีเขียว น้ำเงิน-เขียว เหลือง ส้ม ชมพู น้ำตาล เทาและดำ ลักษณะโคโลนีด้านบนจะแตกต่างจากด้านล่าง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของรา (อโณทัย, 2535ก: 39-41)



ภาพที่ 3 วงจรชีวิตของราชนิด *Mucor* spp.

ที่มา: สุวิมล (2546: 66)

1.3 สภาพแวดล้อมสำหรับการเจริญเติบโตของรา

ราสามารถทนอยู่ได้และเติบโตในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าจุลินทรีย์ประเภทอื่นๆ ราสามารถเติบโตในอาหารที่มีน้ำตาลอยู่มากกว่าแบคทีเรีย เนื่องจากราทนทานต่อแรงดันออสโมซิส (osmotic pressure) ได้ดีกว่า ราทนอยู่ได้และเติบโตในอาหารที่มีช่วงความเป็นกรด-เบส กว้างกว่าแบคทีเรียโดยเฉพาะความเป็นกรดจะทนได้มากกว่า คือ อยู่ในช่วงระหว่าง 2-9 ในขณะที่แบคทีเรียมีช่วงอยู่ระหว่าง 4-9 เท่านั้น ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมของราส่วนมาก คือ 5.6 แต่แบคทีเรียส่วนมาก คือ 7.0 ราสามารถทนและเติบโตในอาหาร หรือวัตถุที่มีความชื้นต่ำกว่าแบคทีเรีย (ยกเว้นสปอร์แบคทีเรีย) เมื่อมีความชื้นจำกัดจะสร้างสปอร์ หรือระยะพักตัวชนิดอื่นๆ ราส่วนมากต้องการออกซิเจนในการเติบโต ต้องการช่วงอุณหภูมิค่อนข้างกว้าง คือ ตั้งแต่ 0-62 องศาเซลเซียส (°C) แต่ช่วงที่เหมาะสม คือ 22-23 องศาเซลเซียส ดังนั้นอาหารที่เก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำ เช่น ในตู้เย็นอาจเสื่อมเสียได้เนื่องจากการเติบโตของรา ราบางชนิดเติบโตได้ดีในอุณหภูมิสูง 62 องศาเซลเซียส ราบางชนิดสร้าง สเคลอโรเตีย (sclerotia) ซึ่งแข็งและแห้ง สามารถทนต่อความร้อนสูงได้ (โอโธทัย, 2535ข: 131)

แสงในช่วงที่ตามองเห็นได้ (visible) ไม่ค่อยมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ หรือเส้นใยของรา แต่แสงช่วงนี้มักมีผลต่อการสร้างสปอร์ แต่อาจพบเชื้อราบางชนิดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น ที่มีลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยที่ตอบสนองต่อแสง มีการแตกกิ่งของเส้นใยที่แตกต่างกันตามความสว่างและความมืดในรอบวัน (สมจิตร, 2552: 41)

ราส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการหายใจอาจแบ่งราเป็นกลุ่มต่างๆ ตามความต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ดังนี้ obligate aerobic fungi เชื้อรากลุ่มนี้จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตหรือตาย ถ้ามีออกซิเจนไม่เพียงพอหรือขาดออกซิเจน facultative aerobic fungi เป็นพวกที่สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในที่ที่มีและไม่มีออกซิเจน obligate fermentative fungi สามารถเจริญได้ดีทั้งในที่ที่มีและไม่มีออกซิเจน แต่จะได้พลังงานส่วนใหญ่จากกระบวนการหมัก (fermentation) และ obligate anaerobic fungi ต้องการสภาพแวดล้อมที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณมาก รากลุ่มนี้ไม่สามารถดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนได้ (สมจิตร, 2552: 47-48) ราเติบโตช้ากว่าแบคทีเรีย หากสภาวะแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทุกชนิดแล้ว รามักจะต้องพ่ายแพ้ในการแข่งขันการเจริญ แต่ถ้าราเจริญได้แล้วจะเจริญได้อย่างรวดเร็วมาก ดังนั้น อาหารเลี้ยงเชื้อราจึงอาจมีแบคทีเรียเติบโตและแย่งอาหารได้ เมื่อต้องการเลี้ยงราอย่างเดียวจึงควรปรับสภาพอาหารให้มีความเป็น กรด-เบส ที่ 5.6 และมีน้ำตาลประกอบอยู่มากประมาณ ร้อยละ 4 จะยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียต่างๆ ไปได้ (โอโธทัย, 2535ข: 132; สุมาลี, 2541)

1.4 สารอาหารของรา

อาหารของรามีหลายชนิด กลูโคส (glucose) เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon source) และพลังงานที่ดีสำหรับราทุกชนิด น้ำตาลชนิดอื่นๆ เช่น ซูโครส (sucrose) และมอลโทส (maltose) รวมทั้งสารประกอบคาร์บอนอินทรีย์อื่นๆ เช่น สตาร์ท (starch) และเซลลูโลส (cellulose) นั้นมีราหลายชนิดสามารถใช้ได้ ไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) อยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียม (ammonium salt) หรือ ไนเตรท (nitrate) ราบางชนิดสามารถใช้ได้ แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen) เช่น เพปโตน (peptone) แร่ธาตุต่างๆ ซึ่งจำเป็นต่อการเติบโตและมีราบางชนิดที่ต้องการวิตามิน (vitamin) ด้วย (อโณทัย, 2535ก: 131-132) เมื่อแบ่งกลุ่มธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของราตามปริมาณความต้องการสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณมาก (macronutrient elements) ได้แก่ คาร์บอน (carbon) ไฮโดรเจน (hydrogen) ออกซิเจน (oxygen) ไนโตรเจน (nitrogen) ฟอสฟอรัส (phosphorus) โพแทสเซียม (potassium) ซัลเฟอร์ (sulfur) แมกนีเซียม (magnesium) และแคลเซียม (calcium) ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณน้อย (micronutrient elements) แต่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต ได้แก่ ธาตุเหล็ก (iron) ทองแดง (copper) แมงกานีส (manganese) สังกะสี (zinc) และ โมลิบดีนัม (molybdenum) (สมจิตร, 2552: 49)

1.4.1 แหล่งคาร์บอน อาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ราได้รับเข้าสู่เซลล์ จะถูกนำไปใช้ในสองกระบวนการหลักที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต ได้แก่ นำไปสร้างเป็นสารประกอบต่างๆ เพื่อการเจริญเติบโต เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก เป็นต้น ซึ่งสารประกอบเหล่านี้เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของรา และถูกนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน เพื่อใช้ในการทำหน้าที่ต่างๆ ในการดำรงชีวิตของรา ในธรรมชาติมีสารอินทรีย์หลายชนิดที่ราสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานของเซลล์ สารอินทรีย์ที่รานำไปใช้ประโยชน์ได้มีทั้งที่เป็นสารประกอบโมเลกุลเล็ก ไปจนถึงสารประกอบโมเลกุลใหญ่ แหล่งคาร์บอนที่สำคัญของรา ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นสารประกอบที่มี ธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นส่วนประกอบหลัก ได้แก่ น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) เป็นต้น (สมจิตร, 2552: 52)

1.4.2 แหล่งไนโตรเจน เชื้อราต้องการแหล่งไนโตรเจนจากสารอาหาร เพื่อใช้ในการสร้างส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ ได้แก่ กรดอะมิโน ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของโปรตีนต่างๆ ที่จำเป็นในกิจกรรมของเซลล์เพื่อการเติบโต ไนโตรเจนยังเป็นองค์ประกอบของ พิวรีน (purine), ไพริมิดีน (pyrimidine) วิตามินหลายชนิดและกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ไนโตรเจนยังเป็นส่วนประกอบของไคติน ซึ่งเป็นองค์ประกอบผนังเซลล์ของราหลายชนิด สารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของรา ควรมีความสมดุลของธาตุอาหารต่างๆ ที่

จำเป็นต่อการเจริญ โดยทั่วไปสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา อยู่ในช่วงประมาณ 10: 1 เชื้อราได้รับสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนได้หลายรูปแบบ ได้แก่ ไนเตรท (NO_3^-) ไนไตรท์ (NO_2^-) แอมโมเนียม (NH_4^+) กรดอะมิโน หรือเปปไทด์ (peptide) และโปรตีน (สมจิตร, 2552: 60-61)

1.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อราในห้องปฏิบัติการทั่วไป

อาหารที่ใช้เลี้ยงราอาจเป็นอาหารจากธรรมชาติ เช่น ผลไม้บด ผักบด เมล็ดธัญพืช หรือเนื้อสัตว์ แต่ไม่นิยมใช้กัน อาหารสังเคราะห์เป็นที่นิยมใช้กันมากกว่า ซึ่งมีส่วนประกอบของไขมันฝรั่งบด หรือคัมสุกผสมกับวุ้นและกลูโคส หรืออาจมีสูตรอื่นๆ อีกที่ประกอบด้วย เปปโทน คาร์โบไฮเดรต และวุ้น แต่สำหรับราที่เป็นปรสิต หรือเชื้อโรคต้องใส่สารอื่นๆ อีกมาก (อโณทัย, 2535ก: 132) เชื้อราส่วนมากสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบจากธรรมชาติ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เป็นอาหารที่มีส่วนประกอบของ น้ำสกัดจากมันฝรั่งคัม และน้ำตาลกลูโคส 2% อาหารเลี้ยงเชื้อ Meat Extract Agar (MEA) ประกอบด้วย malt extract 2% และ Corn Meal Agar (CMA) ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ เหล่านี้ ใช้สำหรับการศึกษาเพื่อดูพัฒนาการของเชื้อรา นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการเจริญของเชื้อรานั้นควรเป็นกรด pH 5-6 และมีส่วนประกอบที่เป็นสารอินทรีย์จำพวกไนโตรเจนมาก อย่างไรก็ตาม ในการเจริญของเชื้อราบางชนิดอาจต้องการปริมาณธาตุอาหารน้อย แต่เชื้อราส่วนใหญ่ก็สามารถเจริญในอาหารเหลวที่มีเกลือและกลูโคสน้อยได้ แต่เชื้อราบางชนิดต้องการวิตามิน 1 ชนิด หรือมากกว่าในการเจริญ เช่น thiamine (vitamin B_1) หรือ biotin (vitamin B_7) หรือทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้ราบางชนิดก็ไม่สามารถใช้ในเตรท หรือแอมโมเนียม เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ แต่ราบางชนิดก็ต้องการสารพวกสเตอรอยด์สำหรับการเจริญ เช่น *Phytophthora infestans* หรือ *Lapromitis lacteus* ซึ่งต้องการซัลเฟอร์สำหรับเป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโน เช่น คริสทีอิน (cysteine) ได้ (วิไลลักษณ์, 2549: 8-9) อาหารเลี้ยงราไม่ว่าจะเป็นอาหารเหลว หรืออาหารแข็ง จะประกอบไปด้วยธาตุอาหารที่จำเป็น และความแตกต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถจำแนกเป็น

1.5.1 undefined media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสารอาหารที่ได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยทั่วไปจะให้สารอาหารจากธรรมชาติ ประกอบด้วย malt extract yeast extract และ corn meal ซึ่งสารอาหารที่ได้จากธรรมชาตินี้จะประกอบไปด้วย น้ำตาล โปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ ที่สามารถย่อยสลายและดูดซึมไปใช้ได้ง่าย และรวดเร็ว อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบจากธรรมชาตินั้นจะมีความสำคัญมากสำหรับการเพาะเลี้ยงฟังไจส่วนมากเพราะราคาถูก และที่สำคัญฟังไจส่วนมากสามารถเจริญได้ดี แต่อย่างไรก็ตามจะมีข้อเสีย คือองค์ประกอบทางเคมีมักมีการเปลี่ยนแปลง ไม่แน่นอน และทำให้ผลการทดลองได้ผลไม่เหมือนเดิมทุกครั้ง

1.5.2 defined media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทราบองค์ประกอบทางเคมีของอาหารที่แน่นอน และในการทราบองค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอนนี้เหมาะสำหรับการศึกษาทางด้านสรีรวิทยาของเชื้อ (Moor-Landecker, 1996)

การเพาะเลี้ยงราในแต่ละสปีชีส์เพื่อการจัดจำแนก จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและสร้างสปอร์ อาหารที่เหมาะสมกับราส่วนใหญ่ คือ MEA หรือ Oatmeal Agar (OA) ซึ่ง Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht (CBS), An institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Science นิยมใช้ MEA ที่เติมน้ำตาลซูโครสลงไปอีก 20 หรือ 40% นอกจากนี้ยังมีร่าบางสปีชีส์ที่ต้องการอาหารพิเศษ เช่น Potato Carrot Agar (PCA), Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA) Carnation Leaf Agar (CLA) และสำหรับ *Penicillium* ในบางสปีชีส์ใช้อาหาร Creatine Agar (CREA) อีกด้วย การบ่มเชื้อราให้บ่มในที่มืดแสงสว่าง หรือที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5-10 วัน ร่าบางชนิดสร้างสปอร์ในที่สว่าง เช่น *Fusarium*, *Trichoderma* และ *Epicoccum* ส่วน *Phoma* ควรบ่มในที่มืดก่อนแล้วตามด้วยบ่มสลับกันในที่มืดและสว่าง สำหรับการสร้างสปอร์สามารถกระตุ้นได้โดยรังสีที่มีความยาวคลื่นแสงใกล้เคียงกับรังสีอัลตราไวโอเลต (black light) (เสาวนิตย์, 2550)

1.6 การได้รับสารอาหารของรา

รามีการดูดซึมสารอาหารผ่าน plasmalemma ซึ่งสารประกอบที่จะผ่านได้นั้นจะต้องมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและละลายน้ำได้ เพราะถ้าเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ และไม่สามารถละลายน้ำได้ เชื้อราจะมีการปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์เพื่อทำการย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลใหญ่ ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายจะมีคุณสมบัติที่จำเพาะกับ โมเลกุลนั้นๆ (Griffin, 1994)

1.6.1 การย่อยสลายสารอาหารภายนอกเซลล์ สารที่มีโมเลกุลเล็กๆ เช่น น้ำตาล และ กรดอะมิโน เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ แล้วเส้นใยของราสามารถดูดซึมไปไว้ใช้ได้ ส่วนสารที่มีโมเลกุลใหญ่จะเป็นพอลิเมอร์ (polymer) ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น เซลลูโลส แป้ง และ โปรตีน ส่วนมากมักถูกย่อยสลายก่อนที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยกระบวนการปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์เพื่อทำการตัดสารที่มีโมเลกุลใหญ่ ซึ่งภายในจะประกอบด้วยสารประกอบต่างๆ ที่ซับซ้อนและในการย่อยของเอนไซมนั้นจะมีความจำเพาะสูง และสามารถควบคุมการย่อยสลายของโมเลกุลสารที่จำเพาะเท่านั้น ดังนั้น กระบวนการย่อยสลายของสารประกอบที่มีโมเลกุลใหญ่จะสมบูรณ์ได้ต้องมีกระบวนการที่เป็นขั้นตอน โดยจะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่แตกต่างกันจนกระทั่งได้สารที่มีโมเลกุลไม่ซับซ้อนและละลายน้ำได้ เชื้อราจึงสามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้จากนั้นสารโมเลกุลเล็กๆ นี้จะถูกย่อยสลายต่อโดยเอนไซม์ภายในเซลล์อีกครั้งหนึ่ง ความสามารถในการใช้ประโยชน์จากสารโมเลกุลใหญ่นั้นจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการย่อยของรา แล้วจะ

ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสับสเตรท (substrate) ที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ (Moor-Landecker, 1996)

1.6.2 การเคลื่อนย้ายธาตุอาหารเข้าสู่เซลล์ ไอออนทั้งหมด และโมเลกุลของสารอาหารผ่านเข้าไปในเซลล์ของเราได้โดยผ่านทั้งผนัง และ plasmalemma ซึ่งในตัวของผนังเซลล์เองจะมีรูพรุนที่ยอมให้ไอออน หรือโมเลกุลของสารผ่านได้ ส่วน plasmalemma มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่านที่สามารถควบคุมการเคลื่อนที่ของสารภายในเซลล์และสารที่เป็น nonelectrolyte ในสารละลายจะสามารถผ่าน plasmalemma ได้โดยตอบสนอง gradient ของความเข้มข้น ซึ่งจะเคลื่อนที่จาก gradient ที่มีความเข้มข้นน้อย แล้วไอออนที่อยู่ในสารละลายก็จะข้ามผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จาก gradient ที่มีความเข้มข้นต่ำ แต่ในการเคลื่อนที่นั้นจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของแรงใน electrochemical potential active transport ซึ่งกลไกนี้จะเกี่ยวข้องกับการจับกันของสารละลายกับตัวขนส่งโมเลกุลที่อยู่ใน plasmalemma ทำหน้าที่ขนส่งและลำเลียงสารละลายข้าม plasmalemma แล้วปลดปล่อยโมเลกุลของสารอาหารเข้าสู่เซลล์ ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับระบบการขนส่งนี้จะต้องการพลังงานในรูปของ ATP ส่วนอีกวิธีหนึ่ง คือ facilitated diffusion ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการขนส่งสารแต่ละชนิดจะไม่เหมือนกับกระบวนการ active transport โดยสารละลายจะมีการเคลื่อนที่ตรงข้ามกับ gradient และสารละลายจะถูกลำเลียงข้าม plasmalemma จาก gradient ที่มีความเข้มข้นสูงไปยัง gradient ความเข้มข้นต่ำ (Moor-Landecker, 1996)

ไอออนที่มีความสำคัญที่เข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ active transport ประกอบด้วย ไอออนที่มีประจุบวก เช่น โพแทสเซียม (K^+), แมกนีเซียม (Mg^{2+}), แมงกานีส (Mn^{2+}), เหล็ก (Fe^{+}) และแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ส่วนไอออนที่มีประจุลบที่สำคัญ เช่น ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) และ ซัลเฟต (SO_4^{2-}) ในการนำโพแทสเซียมไอออน เข้าสู่เซลล์นั้นจะเกิดจาก gradient ที่มีความเข้มข้นสูงประมาณ 500: 1 และต้องใช้พลังงานจากกระบวนการหายใจ และในการนำโพแทสเซียมไอออนเข้าสู่เซลล์จะมีกลไกที่ตรงข้ามกับการลำเลียงไฮโดรเจนไอออน (H^+) เข้าสู่เซลล์ ซึ่งในบางครั้งการลำเลียงไอออนชนิดหนึ่งเข้าสู่เซลล์ อาจจะต้องได้รับอิทธิพลจากการลำเลียงไอออนตัวอื่นเข้าสู่เซลล์ด้วย เช่น การลำเลียง Mg^{2+} , แคลเซียม (calcium; Ca^{2+}), และ Mn^{2+} เกิดขึ้นเมื่อมีการลำเลียงฟอสเฟต โดยมีโพแทสเซียมไอออนเป็นตัวกระตุ้น เช่นเดียวกับการลำเลียงฟอสเฟตทั้งหมด (Griffin, 1994)

ในการลำเลียงน้ำตาลชนิดต่างๆ จะเกิดขึ้นโดยกระบวนการที่เรียกว่า active transport หรือ facilitated diffusion ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของราแต่ละชนิด ซึ่งการลำเลียงกรดอะมิโนเกิดขึ้นโดยกระบวนการที่เรียกว่า active transport และการลำเลียงสารอินทรีย์ที่เป็นกรดเกิดได้ทั้งกระบวนการ specialized transport และ passive diffusion โดยโมเลกุลที่ทำหน้าที่ในการขนส่งจะ

ถูกสร้างขึ้นมาเฉพาะสำหรับการขนส่งสารอาหารแต่ละชนิด ส่วนมากจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น pH อุณหภูมิ และองค์ประกอบของอาหาร หรือสภาวะแวดล้อมของเชื้อราที่จะมีผลต่อการลำเลียงอาหาร ส่วนการดูดซึมสารอาหารเข้าสู่เซลล์ขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งการย่อยของเอนไซม์นั้นจะตอบสนองสำหรับการทำให้สารที่มีโมเลกุลใหญ่ในอาหารเล็กลงเพื่อให้เกิดการแตกตัว ซึ่งเซลล์จะไม่ได้มีการสร้างเอนไซม์อยู่ตลอดเวลา แต่การสังเคราะห์เอนไซม์นั้นจะถูกสร้างขึ้นเมื่อมีส่วนประกอบของอาหารที่จำเป็นกับเอนไซม์ แล้วเอนไซม์ส่วนมากไม่จำเป็นต้องมีเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยแป้งอยู่ แต่ถ้ามีการลำเลียงอาหารที่ประกอบด้วยแป้งจึงจะมีการสร้างเอนไซม์ขึ้นมาเพื่อทำการย่อยแป้งนั้น (Moor-Landecker, 1996)

1.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ของรา

สปอร์ทำหน้าที่ที่สำคัญ 2 ประการ คือ เป็นหน่วยแพร่กระจาย และเพื่อการอยู่รอด ราแต่ละชนิดส่วนใหญ่สร้างสปอร์ได้มากกว่า 1 แบบ ลักษณะของสปอร์เพื่อการแพร่กระจาย ต้องแยกออกจากเส้นใยแม่ได้ง่ายและมักจะมียกลไกพิเศษในการแยกตัว มีการสร้างเป็นจำนวนมากแต่มีขนาดเล็ก มีชีวิตอยู่ได้ไม่นาน สามารถงอกได้ทันทีเมื่อตกลงในที่ที่มีอาหาร และรูปร่างหลากหลาย ส่วนลักษณะของสปอร์เพื่อการอยู่รอดมักติดแน่นอยู่กับเส้นใยแม่ มีการสร้างจำนวนไม่มากแต่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ สามารถอยู่รอดได้ดี ผนังค่อนข้างหนา มีรูปร่างหลากหลาย ราดูดกินอาหารเพื่อการเจริญเติบโต และหยุดการเจริญเติบโตเมื่ออาหารเหลือน้อยลง เพื่อการอยู่รอดราต้องสามารถแพร่กระจายไปยังที่ใหม่ที่มีอาหารมากกว่า หรือสามารถอยู่รอดไปจนกว่าจะมีอาหารใหม่มาทดแทน ดังนั้นปริมาณอาหารที่น้อยลงจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่กระตุ้นให้ราสร้างสปอร์ สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตมักจะไม่เหมือนกับสภาพที่ราจะสร้างสปอร์ สภาพแวดล้อมมีผลอย่างมากในการสร้างสปอร์ของรา ราหลายชนิดสร้างสปอร์หลายแบบ แต่ละแบบตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมเฉพาะ โดยปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ของราที่สำคัญมี ดังนี้

1.7.1 ระบบอาหาร เมื่อเลี้ยงเชื้อบนผิวหน้าของอาหารแข็ง เชื้อจะเจริญเป็นวงกลมเป็นรัศมี มีบริเวณรอบนอก หรือขอบ (extension zone) แล้วสร้างสปอร์ หรือฟรุติงบอดี้ (fruiting bodies) วิธีการนี้ไม่สะท้อนความสัมพันธ์ระหว่างความต้องการอาหารกับการสร้างสปอร์ ส่วนการเลี้ยงราในอาหารเหลว ส่วนใหญ่ราทั่วไปเจริญอยู่เฉพาะที่ผิวหน้าอาหารของอาหารเหลวที่ไม่มีการกวน เหมาะในการศึกษากระบวนการสร้างสปอร์ ส่วนอาหารเหลวที่มีการกวนเชื้อจะเจริญงอกอยู่ในอาหาร ราบางชนิดอาจสร้างสปอร์ได้ เหมาะในการศึกษาที่เกี่ยวกับสรีรวิทยาและทางชีวเคมีของรา

1.7.2 ระดับอาหาร มีผลต่อการสร้างสปอร์ที่ 3 ระยะใหญ่ด้วยกัน คือ ระยะเจริญเติบโต (vegetative growth) ระยะเหนี่ยวนำให้สร้างสปอร์ (induction of sporulation) และระยะสร้างสปอร์ได้สมบูรณ์ (completion of sporulation)

ที่ระยะการเจริญเติบโตราหลายชนิดสร้างสปอร์เมื่อมีการเจริญเติบโตจำกัด ราวางชนิดที่มีฟรุติติงบอดิขนาดใหญ่ต้องการเส้นใยจำนวนมาก จึงต้องการอาหารในช่วงแรกมากกว่าปกติ กระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ที่เกิดขึ้นระหว่างที่รากำลังเจริญอาจส่งผลให้เกิดการสะสมอนุพลกรด หรืออนุพลเกลือแล้วไปมีผลเป็นพิษกับตัวเอง ทำให้สภาพไม่เหมาะสมในการสร้างสปอร์ อาหารที่มีความเข้มข้นน้อยหรืออาหารที่ย่อยยาก เช่น แป้ง อาจกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ได้ อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการสะสมอาหาร เช่น ไกลโคเจน (glycogen) กระตุ้นให้ราสร้างสปอร์ได้ ในระยะหนึ่งย่นำให้สร้างสปอร์ในราเกือบทุกชนิด เมื่อไนโตรเจนในอาหารเหลือน้อยลงเป็นปัจจัยสำคัญที่เป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้างสปอร์ แต่ถ้าขาดธาตุคาร์บอนด้วย รางจะย่อยสลายตัวเอง และที่ระยะสร้างสปอร์ได้สมบูรณ์ ระหว่างที่มีการสร้างสปอร์จะมีการเปลี่ยนแปลงสารสังเคราะห์ภายในรา เนื่องจากสปอร์แตกต่างจากเส้นใยทั้งในแง่รูปร่างและองค์ประกอบ ราวส่วนใหญ่มีการสะสมสารไบโอติน (biotin) ระหว่างที่มีการสร้างสปอร์

1.7.3 แสงกับการสร้างสปอร์ ราหลายชนิดต้องการแสงในการสร้างสปอร์ ซึ่งส่วนใหญ่ต้องการแสงที่มองเห็นได้ (visible light) แต่บางชนิดต้องการแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) ราที่ต้องการแสงส่วนใหญ่ต้องการความมืดสลัว เช่น *Pilobolus* ที่แรกๆ ต้องการแสงเพื่อสร้าง trophocysts แล้วต้องการความมืดเพื่อสร้างก้านชูสปอร์ และต้องการแสงอีกครั้งเพื่อปล่อยสปอร์ (นิวตัน, 2543: 117-121)

1.8 ลักษณะทั่วไปของราที่ใช้ในการศึกษาและวิจัย

1.8.1 *Rhizopus oligosporus* จัดอยู่ใน Kingdom Mycota, Division Eumycota, Subdivision Zygomycotina, Class Zygomycetes, Order Mucorales, Family Mucoraceae, Genus *Rhizopus* (Rao et al., 2011: 31) เชื้อราใน Genus *Rhizopus* เป็นราพวกที่ไม่มีผนังกันเส้นใย โคลนีที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว มีสโตลอน (stolon) มีรงควัตถุที่ไรซอยด์ (rhizoid) และในช่วงวงจรที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะมีสปอร์แรงจิโอฟอร์ (sporangiophore) สปอร์แรงจิโอฟอร์มีลักษณะเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม โดยส่วนใหญ่ไม่แตกแขนง ภายในสปอร์แรงเจียม (sporangium) มีสปอร์ที่มีขนาดใหญ่มาก เมื่อมีอายุยังน้อยมีสีขาว เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมดำ คอลัมเมลลา (columella) มีสีน้ำตาล รูปร่างกลมหรือครึ่งวงกลมและมี อะโปไฟซิส (apophysis) สปอร์มีรูปร่างแบบรูปไข่กลมสั้นๆ มุมไม่สม่ำเสมอ มักมีร่องเล็กๆ บนผิวสปอร์ (บางครั้งไม่มีร่องหากพบสปอร์ในน้ำ)

เชื้อรา Species *R. oligosporus* ช่วงแรกโคลนีมีสีขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเทาอมน้ำตาลเมื่อมีอายุมากขึ้น มีความสูงถึง 10 มิลลิเมตร (millimeter; ml) มีสโตลอนผนังเรียบหรือขรุขระเล็กน้อย เกือบไม่มีสีถึงสีน้ำตาลอมเหลือง มีไรซอยด์สีน้ำตาลที่ตำแหน่งตรงกับบริเวณที่

สร้างสปอร์แรงจิโอฟอร์ หรือพบสปอร์แรงจิโอฟอร์สร้างขึ้นโดยตรงจากสโตลตอนบริเวณไม่มีไรซอยด์ สปอร์แรงจิโอฟอร์มีลักษณะเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่มๆ ละ 5 อัน บางครั้งมีลักษณะคล้ายส้อมหรือง่าม ผนังเรียบ มีความยาวถึง 150-2,000 ไมโครเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-14 ไมโครเมตร สปอร์แรงจิโอเจียมีรูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลมและผนังมีหนามแหลม เมื่ออายุมากขึ้นมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีน้ำตาลอมดำ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-200 ไมโครเมตร คอลัมเมลา มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30-120 ไมโครเมตร ผนังเรียบหรือขรุขระเล็กน้อย

สปอร์แรงจิโอสปอร์มีรูปร่างกลม รูปไข่ หรือรูปร่างไม่แน่นอน มักพบรูปร่างมีหลายเหลี่ยม ผนังมีร่องเล็กๆ คลาไมโดสปอร์มีรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-35 ไมครอน และยังพบรูปร่างรีหรือทรงกระบอก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-13 × 16-24 ไมโครเมตร

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต คือ 30-35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่เจริญเติบโตได้ คือ 5-7 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญเติบโตได้ คือ 44 (ถึง 49) องศาเซลเซียส (เสาวนิตย์, 2550)

1.8.2 *Aspergillus oryzae* จัดอยู่ใน Kingdom Mycota, Division Eumycota, Subdivision Deuteromycotina, Class Hyphomycetes, Order Moniliales. Family Moniliaceae. Genus *Aspergillus* (Rao et al., 2011: 33) เชื้อราใน Genus *Aspergillus* เป็นราพวกมีผนังกันเส้นใย โคลนที่เจริญอย่างรวดเร็ว ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ที่ชูตั้งตรง โคนิดิโอฟอร์ไม่มีผนังกัน ไม่แตกแขนงและโป่งพองที่ปลายเรียกว่า เวสซิเคิลเฟียไลด์ (vesicle phialide) กำเนิดขึ้นโดยตรงจากเวสซิเคิล หรืออาจกำเนิดบนเมดูเล (metulae) โดยโครงสร้างทั้งหมดที่ประกอบด้วยเวสซิเคิลเฟียไลด์ เมดูเล (ถ้ามี) และโคนิดิอัม รวมเรียกว่า หัวโคนิดิอัม (conidia head) โคนิดิอัมเป็นชนิดแห้งค่อยาวเป็นสายโซ่อัดกันแน่นอยู่ในลักษณะลำ หรือคอลัมน์ เรียกว่า คอลัมนา (columnar) หรือสายโซ่ของโคนิดิอัมมีการกระจายเรียงตัวในแนวรัศมี เรียกว่า เรดิเอท (radiate) โคนิดิอัมเป็นเซลล์เดี่ยวผิวเรียบหรือไม่เรียบมีการประดับประดา (ornamented) ใส ไม่มีสีหรือมีรงควัตถุ บางสปีชีส์สร้างเซลล์พิเศษที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวหรือสายโซ่ ผนังหนา และผิวเรียบ เรียกว่า สุลลิเซลล์ หรือสร้างสเคลอโรเดีย (sclerotia) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของกลุ่มเส้นใยและอัดแน่นหนาและแข็ง โดยปกติมีรูปร่างกลม *Aspergillus* เป็นราที่ปนเปื้อนทั่วไปบนวัสดุต่างๆ ในเขตกึ่งร้อนและเขตร้อน ซึ่งบางสปีชีส์ก่อให้เกิดโรคกับคนและสัตว์ได้ เนื่องจากสามารถผลิตสารพิษได้ บางสปีชีส์มีความสำคัญในการทำอาหารหมักของชาวตะวันออก หรือบางชนิดใช้ผลิตกรดอินทรีย์หรือเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม

เชื้อรา Species *A. oryzae* มักพบในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก หรือในบริเวณโรงงานอาหารหมัก เมื่อเลี้ยงบนอาหาร Czapek Agar จะมีโคลนบนอาหารขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-5

เซนติเมตร (centimeter; cm) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ประกอบด้วย โคนิไดโอฟอร์ที่ยาว และมักปนอยู่กับเส้นใยอากาศ หัวโคนิเดียมีลักษณะแบบเรติเคท มีสีเหลืองเขียวอ่อน ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลสว่างจนถึงน้ำตาลมัวๆ โคนิไดโอฟอร์ใสไม่มีสี มีความยาวถึง 4-5 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่ผนังขรุขระ เวสซิเคิลมีรูปร่างค่อนข้างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40-80 ไมโครเมตร เพียไลด์มักเกิดขึ้นโดยตรงจากเวสซิเคิล หรือเมตูละ มีขนาด $3-5 \times 10-15$ ไมโครเมตร เมตูละ มีขนาด $4-5 \times 8-12$ ไมโครเมตร โคนิเดียเป็นรูปไข่กลมในขณะที่ยังอ่อน เมื่อแก่มีรูปร่างกลมถึงค่อนข้างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5-8 ไมโครเมตร สีเขียว ผนังเรียบถึงขรุขระเล็กน้อย โคลินีนบนอาหาร MEA เจริญได้เร็วกว่า ส่วนบนอาหาร Czapek Agar ค่อนข้างบางกว่า และเจริญได้น้อยบนอาหาร CREA ด้านใต้โคลินีนบนอาหาร Aspergillus Differentiation Agar (AFPA) มีสีครีม (เสาวนิษฐ์, 2550)

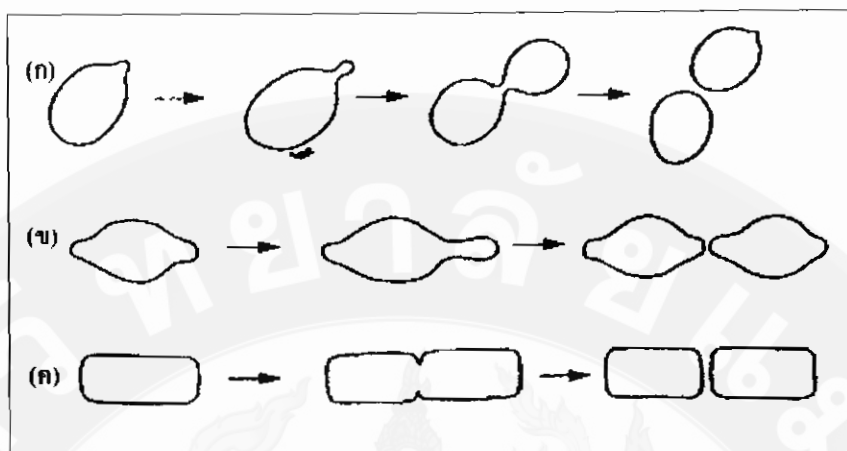
2. ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ยูคาริโอตเช่นเดียวกับรา เซลล์ปกติมักเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular fungi) มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม ทรงรี สามเหลี่ยม รูปร่างคล้ายผลมะนาวแถบประเทศตะวันตก (lemon) หรือรูปร่างยาว เป็นต้น ยีสต์จะมีการสืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีแตกหน่อ (budding) หรือแบบอาศัยเพศ โดยวิธีการสร้างสปอร์ชนิดแอสโคสปอร์ หรือเบสิดิโอสปอร์ ยีสต์ส่วนใหญ่จะมีการใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอน มนุษย์รู้จักนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในแง่ของกระบวนการหมัก โดยเซลล์ยีสต์จะมีการเจริญเติบโตและแพร่ขยายจำนวนภายใต้สภาวะต่างๆ เช่น อาหาร อุณหภูมิ และปัจจัยแวดล้อมในกระบวนการหมักที่เหมาะสมด้วยการเปลี่ยนแปลงน้ำตาล (สารอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน) เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ เซลล์ยีสต์สามารถพบได้มากมายตามธรรมชาติ เช่น ในน้ำ ดิน พืช หรือแม้กระทั่งในอากาศ นอกจากนี้ ยังพบว่ายีสต์บางชนิดจะอยู่ร่วมกับแมลง หรือในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แหล่งที่มักจะพบเชื้อยีสต์เจริญปะปนอยู่บ่อยๆ คือ แหล่งที่มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลสูงๆ เช่น น้ำผลไม้ น้ำผึ้ง และผลไม้ที่มีรสหวาน นอกจากนี้ ยังสามารถพบยีสต์เจริญได้ในเมล็ดธัญพืช หญ้าฟาง หรือแม้กระทั่งอาหารสัตว์ การปนเปื้อนของยีสต์ในอาหารเหล่านี้ อาจก่อให้เกิดเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหารอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตาม มียีสต์หลายสายพันธุ์ที่ได้ทำการพิสูจน์และศึกษาค้นคว้าวิจัยว่ามีประโยชน์ต่อมนุษย์ และมีการนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมอาหารหลายๆ อย่างมานานแล้ว

2.1 ลักษณะวิทยาของยีสต์

เซลล์ยีสต์จะมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว ซึ่งมีรูปร่างเป็นไข่ค่อนข้างกลม ไม่มีสี ทั้งนี้ หากอายุของเซลล์ยีสต์ยังไม่มากจะพบเซลล์ที่กำลังแตกหน่อ โดยจะมีความกว้างของเซลล์ประมาณ 2.5-10.5 ไมโครเมตร ซึ่งเซลล์ยีสต์ 1 เซลล์ จะมีปริมาตรประมาณ 40 ลูกบาศก์ไมโครเมตร (micrometer cubed; μm^3) และมีน้ำหนักแห้งประมาณ 1×10^{-10} กรัม (gram; g) โดยเฉลี่ย อย่างไรก็ตามขนาดเซลล์ยีสต์ขึ้นกับการเจริญเติบโต โดยทั่วไปสามารถแบ่งส่วนประกอบของเซลล์ยีสต์ออกได้เป็นสองส่วนหลักๆ ได้แก่ ส่วนของผนังเซลล์ (cell wall) ที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มและเป็นโครงสร้างเซลล์ กับส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ คือ นิวเคลียสและไซโตพลาสซึม ที่ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน วิตามิน แร่ธาตุ ชนิดต่างๆ และกรดนิวคลีอิก เป็นองค์ประกอบ ผนังเซลล์ของยีสต์ สามารถแบ่งย่อยได้เป็นสองส่วนหลักๆ ได้แก่ ผนังเซลล์ และเซลล์เมมเบรน (cell membrane) ผนังเซลล์มีโครงสร้างเป็นตาข่าย (sieve like structure) ของสารพอลิแซ็กคาไรด์ ได้แก่ กลูแคน แมนแนน และไคติน อาจพบสารพวพอลิแซ็กคาไรด์ จับอยู่กับสารประกอบอื่นๆ เช่น ไขมัน และโปรตีนซึ่งจะอยู่ในรูปสารประกอบไกลโคโปรตีน (glycoprotein) และไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ส่วนเซลล์เมมเบรนเป็นส่วนที่ล้อมรอบเซลล์ยีสต์โดยอยู่ถัดจากผนังเซลล์ชั้นนอกเข้ามา มีหน้าที่หลักคือ ช่วยรักษาสมดุลของเซลล์ยีสต์ (osmotic structure) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) และป้องกันผิวหน้าของเซลล์ (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2549: 7-11)

ส่วนใหญ่ยีสต์จะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ ซึ่งการแตกหน่ออาจจะเกิดขึ้นได้ที่ทุกส่วนของเซลล์ เรียกว่า multipolar (multilateral) budding ยีสต์ที่มีการแตกหน่อแบบนี้ เช่น *Saccharomyces*, *Pichia* และ *Hansenula* หรือเกิดได้เฉพาะที่ขั้วของเซลล์เท่านั้น (polar budding) ซึ่งมีสองแบบ คือ monopolar (unipolar) budding (ภาพที่ 4 ก) และ biopolar budding (ภาพที่ 4 ข) monopolar budding เกิดเฉพาะปลายด้านเดียวและเกิดซ้ำๆ กันที่ปลายด้านหนึ่ง ยีสต์ที่พบมีการแตกหน่อแบบนี้ เช่น *Pityrosporum* ส่วน biopolar budding เป็นการแตกหน่อที่เกิดขึ้นที่ปลายทั้งสองข้างของเซลล์ยีสต์ที่มีการแตกหน่อแบบนี้ เช่น *Kloeckera* และ *Saccharomycodes* กระบวนการเกิดขึ้นโดยโปรโทพลาสซึม (protoplasm) จะดันผนังเซลล์ให้โป่งออกไปกลายเป็นหน่อซึ่งจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ จนมีขนาดเท่าเซลล์แม่ ในยีสต์บางชนิด เช่น ฟิล์มยีสต์ (film yeast) หน่อจะมีลักษณะคล้ายท่อยื่นออกมาจากเซลล์แม่ มีการเพิ่มจำนวนนิวเคลียสแล้วแบ่งกันในเซลล์แม่และลูก มียีสต์ไม่กี่สปีชีส์ที่สืบพันธุ์โดยวิธีฟิชชัน (fission) ดังภาพที่ 4 (ค) และวิธีฟิชชันผสมกับการแตกหน่อ (bud fission) (Walker, 1998)



ภาพที่ 4 ลักษณะการเพิ่มจำนวนของยีสต์

ที่มา: สุวิมล (2546: 74)

ยีสต์แท้ (true yeasts, ascomycotina) จะมีการสร้างแอสโคสปอร์แบบอาศัยเพศ โดยเซลล์ของยีสต์เปรียบเสมือนแอสกัส (ascus) การเกิดแอสโคสปอร์ของยีสต์แท้ ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นภายหลังการเกิดคอนจูเกชัน (conjugation) ของเซลล์ 2 เซลล์ แต่ในยีสต์บางชนิดอาจเกิดแอสโคสปอร์ได้โดยไม่ต้องมีการคอนจูเกชัน หลังจากนั้นก็จะมีการคอนจูเกชันของแอสโคสปอร์ จำนวนของแอสโคสปอร์ในแอสกัส และลักษณะของแอสโคสปอร์จะเป็นตัวบ่งชี้ชนิดของยีสต์ สีผิว และรูปร่างของแอสโคสปอร์จะแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของยีสต์ ส่วนยีสต์เทียม (false yeasts) เป็นยีสต์ที่ไม่สร้างแอสโคสปอร์ หรือไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จัดเป็นพวกฟังไจไม่สมบูรณ์ ยีสต์พวกนี้มักจะสร้างคลาไมโดสปอร์ (สุมาลี, 2541)

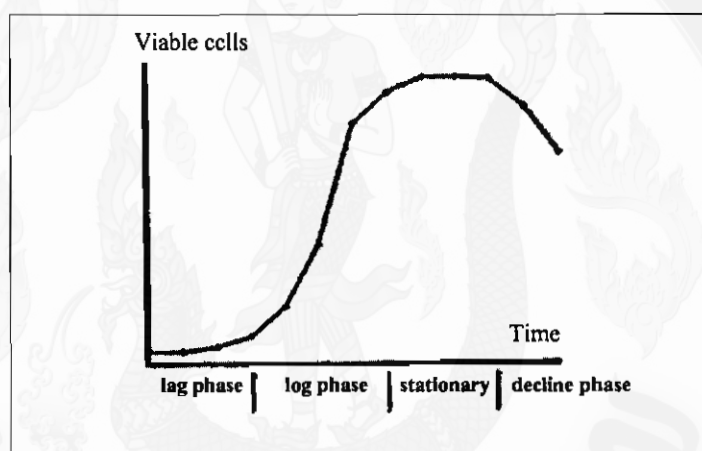
2.2 ลักษณะการเจริญของยีสต์

การเจริญของเชื้อยีสต์เกิดขึ้นโดยการเพิ่มขนาด เมื่อขนาดเพิ่มจนถึงจุดหนึ่ง เซลล์จะมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน ในระหว่างที่มีการแบ่งเซลล์ นิวเคลียสจะมีการแบ่งแบบไมโทซิส และการสังเคราะห์ไขมันโพลีแซคคาไรด์ก็เกิดขึ้น สำหรับการแบ่งเซลล์ของยีสต์ที่เป็นการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศนั้น พบว่ายีสต์ส่วนใหญ่จะมีการแตกหน่อ พบจำนวนน้อยที่จะเกิดจากการแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสองโดยวิธีฟิชชัน (fission) และมีบางพวกที่เพิ่มจำนวนโดยวิธีอื่นๆ เช่น การสร้างโคนิเดีย (conidia) ปกติการเพิ่มจำนวนจะเกิดในสภาวะที่เหมาะสมเท่านั้นในกรณีของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ถ้าเชื้อเจริญอยู่ในอาหารเพียงพอก็จะเพิ่มจำนวนได้เป็นสองเท่าภายในเวลาสั้นๆ แต่ถ้าอาหารหมดลงยีสต์นั้นจะเข้าสู่ระยะที่ไม่มีการแตกหน่อ (unbudded phase) แต่เซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่ และเมื่อกลับมาที่มีอาหารขึ้นอีก เซลล์จะสามารถเจริญได้ต่อไป (สาวิตรี, 2549)

ถ้าเลี้ยงยีสต์ในสภาพแวดล้อมที่เป็นระบบปิด มีการใส่อาหารเพียงครั้งเดียวตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (batch culture) การเจริญเติบโตที่มีการเพาะเลี้ยงในระบบปิดจะเป็นในลักษณะเดียวกับจุลินทรีย์เซลล์เดี่ยวกลุ่มอื่นๆ โดยกราฟการเติบโต (growth curve) เป็นแบบ sigmoid curve (ภาพที่ 5) ซึ่งมีระยะการเจริญเติบโตแบ่งแบบกว้างๆ ได้เป็น 4 ระยะ ได้แก่ lag phase ซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นของการเจริญ โดยจุลินทรีย์จะมีการปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ และเตรียมพร้อมในการแบ่งเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีการแบ่งเซลล์ได้เซลล์เป็นจำนวนมาก เนื่องจากในช่วงนี้มีสารอาหารที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต เรียกระยะการเจริญเติบโตในช่วงนี้ว่า log phase (exponential phase) อัตราการเติบโต (growth rate) อาจวัดจากจำนวนเซลล์หรือมวลชีวภาพ (biomass) ต่อหนึ่งหน่วยเวลา ซึ่งอาจมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ สารอาหาร และสภาพแวดล้อม ต่อมาเข้าสู่ stationary phase ในระยะนี้สารอาหารเริ่มมีปริมาณจำกัด สภาพแวดล้อมเริ่มไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เช่น ปริมาณออกซิเจนลดน้อยลง pH เปลี่ยนแปลง มีของเสียหรือสารเคมีพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึมมากขึ้น ทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตลดลง ในระยะนี้จะพบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ ต่อมาระยะสุดท้ายเรียกว่า decline phase ในระยะนี้สารอาหารขาดแคลน และสภาพแวดล้อมต่างๆ ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ทำให้อัตราการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้น (สมจิตร, 2552: 33-34) ดังภาพที่ 5

วงจรเซลล์ของ *S. cerevisiae* จะเกิดขึ้นได้เมื่อเซลล์นั้นเจริญถึงขนาดที่เรียกว่า ขนาดวิกฤต (critical size) อัตราการเพิ่มมวลเซลล์จะเป็นตัวกำหนดการเข้าถึงสัญญาณเริ่มต้น ซึ่งเป็นสัญญาณที่จำเป็นต่อการไหลออกมาของหน่อ การสังเคราะห์ DNA และการเข้าวงจรเซลล์ระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มมวลเซลล์จนถึงขนาดวิกฤตนั้นขึ้นอยู่กับธาตุอาหาร ก่อนที่เซลล์จะเริ่มมีสัญญาณเริ่มต้น ข้อมูลเกี่ยวกับสถานะของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ เมตาบอลิกสเตต (metabolic state) ของเซลล์จะถูกวิเคราะห์โดยกลไกการควบคุมหลายอย่าง ซึ่งกลไกเหล่านี้เป็นวิธีการที่เซลล์จะจำกัดการเพิ่มมวลของเซลล์ เมื่อเซลล์เข้าสู่วงจรเซลล์สัญญาณเริ่มต้นก็จะเริ่มขึ้น โดยจะเกิดควบคู่ไปกับการเพิ่มจำนวนของสปินเดิลโพลบอดี (spindle pole body) หรือ สปินเดิลพลาต (spindle plaque) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีรูปร่างคล้ายจานฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มนิวเคลียส จากนั้นจะเกิดหน่อบริเวณสปินเดิลพลาตนี้ เมื่อมีการเพิ่มจำนวนสปินเดิลพลาตเป็นสองและแยกจากกัน กลุ่มของไมโครทิวบูล (microtubule) หรือ สปินเดิลที่เกิดจากพลาต จะขยายผ่านไซโตพลาสซึมไปยังผนังเซลล์ที่มีวงแหวนไคตินอยู่นอกจากนี้ยังมีไมโครทิวบูล หรือสปินเดิลที่ขึ้นผ่านเข้าไปในนิวเคลียสจนในที่สุดก็มีการเชื่อมกัน โครงสร้างที่มีรูปร่างคล้ายจานฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มนิวเคลียส จากนั้นจะเกิดหน่อบริเวณสปินเดิลพลาตนี้ เมื่อมีการเพิ่มจำนวนสปินเดิลพลาตเป็นสองและแยกจากกัน กลุ่มของไมโครทิวบูล (microtubule)

หรือ สปินเดิลที่เกิดจากพลัค จะขยายผ่านไซโทพลาสซึมไปยังผนังเซลล์ที่มีวงแหวนไคตินอยู่นอกจากนี้ยังมีไมโครทิวบูล หรือสปินเดิลที่ขึ้นผ่านเข้าไปในนิวเคลียสจนในที่สุดก็มีการเชื่อมกันระหว่างไมโครทิวบูลจากพลัคทั้งสองเป็นอินทรานิวเคลียร์ไมโครทิวบูล (intranuclear microtubule) ตัวยาว ซึ่งจะสร้างอย่างรวดเร็วในช่วงต้นของวงจรเซลล์ จากนั้นเมื่อเซลล์เกิดการบีบยาวออกก็จะมี การเคลื่อนที่ไปยังบริเวณระหว่างเซลล์แม่กับหน่อแล้ว ไมโครทิวบูลจะบีบยาวออก และเกิดการแบ่ง นิวเคลียส เมื่อผนังกันระหว่างเซลล์เกิดขึ้นนั้นเชือกหุ้มนิวเคลียสก็จะถูกแบ่งออกเป็นสอง แล้วเกิด การแยกเซลล์ทั้งสองออกอย่างรวดเร็ว และวงแหวนไคตินจะถูกทิ้งไว้บนรอยแผลที่เกิดจากการแตก หน่อที่เซลล์แม่ (สวาติรี, 2539)



ภาพที่ 5 กราฟการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในระบบปิด
ที่มา: สมจิตร (2552: 34)

ลักษณะการเจริญของโคโลนียีสต์บนอาหารที่ปรากฏ หากเป็น โคโลนีอายุน้อยจะขึ้นมาก หรือเป็นเมือก ส่วนใหญ่จะมีสีขาว คริมและชมพู บางโคโลนีเมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีการเปลี่ยนแปลง ไปเล็กน้อย ในขณะที่บางโคโลนีจะเริ่มแห้งและย่น ยีสต์เป็นทั้งพวกออกซิเดทีฟ (oxidative yeast) และเฟอร์เมนเททีฟ (fermentative yeast) หรือทั้ง 2 อย่าง พวกออกซิเดทีฟจะเจริญเฉพาะที่ผิว ของอาหารเหลวจึงเรียกว่า ฟิล์มยีสต์ แต่พวกเฟอร์เมนเททีฟจะเจริญอยู่ในทุกส่วนของอาหาร (สุมาลี, 2541) ลักษณะการเจริญที่ปรากฏเป็นการยากที่จะแยกโคโลนีของยีสต์ออกจากแบคทีเรียที่ อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะมีลักษณะใกล้เคียงกันมาก วิธีที่แน่นอน คือ การใช้กล้องจุลทรรศน์ดู ลักษณะเซลล์ว่าเป็นยีสต์หรือแบคทีเรีย ในการตรวจสอบรูปร่างของเซลล์ยีสต์สามารถทำได้จาก การศึกษาเซลล์ยีสต์ที่เจริญในอาหารเหลว ซึ่งการศึกษาพื้นฐานวิทยาของเซลล์ในอาหารเหลวส่วน

ใหญ่นิยมใช้อาหาร Yeast Malt (YM), Yeast Peptone Dextrose Broth (YPDB) หรือ Malt Extract Broth (MEB) ตรวจสอบโดยพิจารณารูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ โดยพิจารณาว่าการเจริญในอาหารเหลวมีลักษณะการเจริญที่ผิวหน้าของอาหารเหลวว่าเป็นแบบใด การตรวจสอบพื้นฐานวิทยาของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งเป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่ใช้ในการพิสูจน์เพื่อระบุเชื้อยีสต์ อาหารทดสอบที่ใช้ส่วนใหญ่จะใช้ Yeast Malt Agar (YMA), Yeast Peptone Dextrose Agar (YPDA), MEA และ Morphology Agar โดยศึกษาพื้นฐานวิทยาของโคโลนี เช่น ลักษณะเนื้อโคโลนี (colony texture) สีของโคโลนี (colony color) ผิวหน้าโคโลนี (colony surface) ความนูนของโคโลนี (colony elevation) และขอบของโคโลนี (colony margin) (ธวัชชัย, 2549)

2.3 สภาพแวดล้อมสำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์

ยีสต์ต่างๆ ไปจะเจริญได้ดีในที่มีความชื้นเพียงพอแต่เนื่องจากยีสต์หลายชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูงได้มากกว่าแบคทีเรีย ซึ่งอาจสรุปได้ว่ายีสต์มีความต้องการความชื้นน้อยกว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ แต่อย่างไรก็ตามยีสต์ต้องการความชื้นมากกว่ารา สามารถจำแนกยีสต์ได้เป็น 2 พวกตามความต้องการความชื้นของยีสต์ ได้แก่ พวกยีสต์ทั่วไป กับพวกออสโมฟิลิก (osmophilic yeast) พวกยีสต์ทั่วไปต้องการความชื้นสูง พบว่ามี วอเตอร์แอคทีวิตี (water activity; a_w) ขึ้นต่ำอยู่ระหว่าง 0.88 ถึง 0.94 เช่น ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์ (beer yeast) ยีสต์จากนมข้นหวาน และยีสต์ที่ใช้ในการทำเบเกอรี่ (baker's yeast) จะต้องการ a_w ขึ้นต่ำ 0.94, 0.90 และ 0.905 ตามลำดับ ในขณะที่ออสโมฟิลิกยีสต์เจริญอย่างช้าๆ ในน้ำเชื่อมที่มีค่า a_w 0.78 ยีสต์แต่ละชนิดจะมี a_w เหมาะสมเฉพาะตัว และค่า a_w ที่ยีสต์เจริญได้อาจเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม เช่น pH ชนิดของอาหาร อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน และสารยับยั้งการเจริญ

ยีสต์เจริญในช่วงอุณหภูมิเดียวกันกับรา ช่วงที่เหมาะสมอยู่ที่ 25-35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิขั้นสูงที่เจริญได้ คือ 35-47 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า ยีสต์เจริญได้ดีที่ pH 4-4.5 และเจริญได้ไม่ดีในอาหารที่เป็นด่าง การเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนจะเป็นไปได้ดีมาก ในขณะที่พวกเฟอร์เมนเททีฟจะเจริญช้าๆ ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (สุมาลี, 2541)

2.4 สารอาหารของยีสต์

ตามปกติน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานที่ดีที่สุดของยีสต์ แม้ว่าพวกออกซิเดทีฟ เช่น ฟิล์มยีสต์จะออกซิไดซ์ (oxidize) กรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์ได้พลังงานออกมาใช้ คาร์บอนไดออกไซด์ที่ทำให้ขนมปังฟูและนุ่มเป็นผลผลิตจากยีสต์ขนมปัง และแอลกอฮอล์ในอุตสาหกรรมเหล้าไวน์ เบียร์ แอลกอฮอล์ ก็ได้จากกิจกรรมของเฟอร์เมนเททีฟยีสต์ นอกจากนี้ยีสต์ยังช่วยทำให้กลิ่นและรสชาติของไวน์ดีขึ้นด้วย ยีสต์ใช้อาหารที่มีไนโตรเจนเป็นแหล่งของไนโตรเจนได้หลายอย่าง เช่น แอมโมเนีย

ยูเรีย (urea) กรดอะมิโน จนถึงโพลีเปปไทด์ นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการสารช่วยในการเจริญ บางอย่างด้วย (สุมาลี, 2541) ยีสต์หลายชนิดสามารถใช้สารแตกต่างกัน เช่น อาจใช้เพนโตส (pentose) บางชนิดอาจใช้พอลิแซ็กคาไรด์ (สตาร์ช) น้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น แมนนิทอล (mannitol) ซอร์บิทอล (sorbitol) เป็นต้น กรดอินทรีย์ เช่น กรดแล็กติก (lactic acid), กรดแอซิดิก (acetic acid), กรดซิตริก (citric acid), และกรดอื่นๆ นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการกำมะถันในรูปของซัลเฟต แต่บางชนิดต้องการกำมะถันอินทรีย์ เช่น คริสทีนีน หรือ เมไทโอนีน (methionine) แร่ธาตุต่างๆ ที่ยีสต์ต้องการ เช่น โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียม และแร่ธาตุที่ต้องการน้อยมากแต่ขาดไม่ได้ เช่น โบรอน (boron) ทองแดง สังกะสี เหล็ก ไอโอดีน (iodine) โมลิบดีนัม แมงกานีส เพื่อการเติบโตที่ดี (อโณทัย, 2535ก: 121-122) ยีสต์ โดยเฉพาะพวกยีสต์แท้ อาจมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาได้ โดยวิธีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศซึ่งนำไปสู่การผ่าเหล่า ยีสต์อาจสามารถพัฒนาตัวเองให้สามารถเจริญในอาหารบางอย่างได้ สปีชีส์ที่มีการนำไปใช้ประโยชน์มากที่สุด เพราะมีลักษณะทางสรีรวิทยาแตกต่างกันมาก ได้แก่ *S. cerevisiae* ซึ่งจำแนกได้หลายสายพันธุ์ เช่น สายพันธุ์ที่ใช้ในการทำขนมปัง สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์ เป็นต้น (สุมาลี, 2541) อาหารเลี้ยงยีสต์ในห้องปฏิบัติการนั้นอาจใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Agar (MA) ซึ่งใช้ในการแยกเฉพาะยีสต์ หรืออาจใช้อาหารของวิกเกอร์แฮม (Wicker's medium) ก็ได้ หรืออาจใช้อาหารจากแหล่งธรรมชาติ เช่น ผลไม้และผักเพื่อเลี้ยงยีสต์ก็ได้ อาหารบางชนิดช่วยให้ยีสต์สร้างสปอร์ได้ดีขึ้น เช่น อาหารสร้างสปอร์ (sporulation medium) เป็นต้น (อโณทัย, 2553ก: 122)

2.4.1 แหล่งคาร์บอนและพลังงาน ยีสต์ทุกชนิดสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ นอกจากนี้ยีสต์บางชนิดก็ยังสามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) ชนิดอื่นๆ เช่น แมนโนส (mannose) กาแลคโตส (galactose) และราฟฟิโนส (raffinose) ได้เช่นกัน จึงทำให้ความสามารถในการใช้น้ำตาลเป็นลักษณะหนึ่งที่มีความสำคัญในการจัดหมวดหมู่ของยีสต์ ส่วนน้ำตาลเพนโตส มียีสต์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้ประโยชน์ได้ เนื่องจากน้ำตาลเพนโตส โดยเฉพาะดีไซโลส (D-xylose) เป็นน้ำตาลที่พบมากในเฮมิเซลลูโลส ซึ่งพบได้ในพืช ส่วนน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) นั้นมีหลายชนิดที่ยีสต์บางชนิดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น น้ำตาลซูโครส, แลคโตส (lactose) และเซลโลไบโอส (cellobiose) เป็นต้น สำหรับพวกสารโพลีแซ็กคาไรด์ พบว่ามียีสต์สามารถใช้ประโยชน์ได้ โดยสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเอทานอล (ethanol) ได้ แต่การใช้แป้งนี้เกิดไม่สมบูรณ์ เพราะไม่มีเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งการย่อยสลายตรงส่วนที่เป็นแขนงของแป้งได้ (สาวตรี, 2539) ยีสต์มีความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรต ซึ่งมีความแตกต่างกันขึ้นกับสปีชีส์ของยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักกลูโคส อาจมีความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นๆ ได้ด้วย ทั้งนี้ขึ้นกับสปีชีส์ของยีสต์ แต่ถ้ายีสต์ใด

ขาดความสามารถในการหมักกลูโคส มักจะขาดความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น เช่นเดียวกัน (ธวัชชัย, 2549)

2.4.2 แหล่งในโครเจน ได้แก่ สารอินทรีย์ในโครเจน เช่น แอมโมเนีย คือสารที่ยีสต์ทุกชนิดสามารถใช้เป็นแหล่งในโครเจนได้ แต่ยีสต์บางชนิดสามารถใช้ในเครดได้ ในขณะที่ยีสต์บางชนิดไม่สามารถใช้ในเครดได้ เช่น *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces* และ *Candida* บางสายพันธุ์ โดยปกติยีสต์ชนิดใดที่ใช้ในเครดได้ก็จะสามารถใช้ในไตรที่ได้ด้วยเสมอ นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถใช้สารอินทรีย์ในโครเจนเป็นแหล่งในโครเจนได้ เช่น กรดอะมิโนเปปไทด์ โปรตีน และเอมีน (amine) เป็นต้น โดยที่กรดอะมิโนมีใช้เป็นแหล่งในโครเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น จะอยู่ในรูปของกรดอะมิโนหลายๆ ชนิดผสมกันเพื่อเพียงพอต่อความต้องการของเชื้อยีสต์ มียีสต์น้อยชนิดมากที่สามารถย่อยสลายโปรตีนภายนอกเซลล์ได้ (สาวิตรี, 2539)

2.5 การได้รับสารอาหารของยีสต์

2.5.1 การขนส่งน้ำตาล (sugar transport) ยีสต์สามารถนำน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ไปใช้ประโยชน์ได้โดยเริ่มจากน้ำตาลจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในเซลล์ หรือโดยการย่อยสลายน้ำตาลภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์ก่อน แล้วผลผลิตที่ได้จึงผ่านเข้าสู่เซลล์ภายหลัง ซึ่งเชื้อ *S. cerevisiae* มีความสามารถในการนำน้ำตาลเฮกโซสหลายชนิดเข้าสู่เซลล์โดยวิธี carrier mediated diffusion system ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส แมนโนส และฟรุคโตส (fructose) โดยมีระบบการขนส่งแบบคอนสติติวทิฟ (constitutive) ซึ่งจะมีเอนไซม์ constitutive permease เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ส่วนระบบการขนส่งน้ำตาลกาแลคโตส และน้ำตาลมอลโทส เป็นแบบอินดิวซิเบิล (inducible) ส่วนการขนส่งน้ำตาลซูโครสจะเกิดขึ้นโดยที่น้ำตาลซูโครสจะถูกย่อยสลายภายนอกเซลล์ก่อน ด้วยเอนไซม์อินเวอร์เตส (invertase) ที่อยู่ภายนอกเซลล์ได้เป็นกลูโคสและฟรุคโตส จึงจะสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ การสังเคราะห์เอนไซม์อินเวอร์เตส ไม่ได้ถูกเหนี่ยวนำโดยสับสเตรท เช่น น้ำตาลซูโครส หรือราฟฟิโนส แต่จะถูกควบคุมโดยความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสภายในเซลล์ (สาวิตรี, 2539)

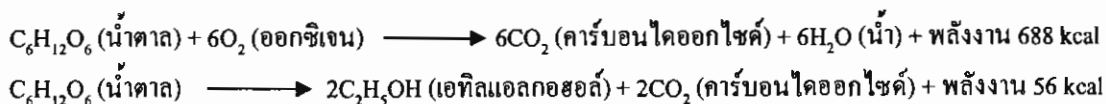
เมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* ในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลกาแลคโตส เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) ที่ผนังของเซลล์ยีสต์จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาย่อยน้ำตาลกาแลคโตสได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส ในระยะแรกเชื้อ *S. cerevisiae* จะใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยก่อนและเจริญอย่างรวดเร็ว ในขณะที่น้ำตาลกาแลคโตสยังคงมีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จนกระทั่งน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ทำให้เชื้อมีการเจริญลดลงด้วย และต่อมาเมื่อ galactose carrier protein ถูกสังเคราะห์ขึ้นและลำเลียงไปยังเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ ทำให้เชื้อสามารถนำน้ำตาลกาแลคโตสเข้าสู่เซลล์และเจริญต่อไปได้ ทำให้กราฟของการเจริญเป็นลักษณะที่เรียกว่า

diauxic growth curve ซึ่งพบว่ามี lag phase เป็น 2 ช่วง เนื่องจาก glucose carrier protein มีอยู่ในเซลล์ตลอดเวลา พร้อมทั้งจะนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้ทันที ส่วน galactose carrier protein ต้องถูกเหนี่ยวนำ (induced) ด้วยน้ำตาลกาแลกโตสในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อน จึงจะมีการสร้าง galactose carrier protein เพื่อนำน้ำตาลกาแลกโตสเข้าสู่เซลล์ได้ (สมจิตร, 2552: 53)

2.5.2 การขนส่งกรดอะมิโน และเปปไทด์ (amino acid and peptide transport) การขนส่งกรดอะมิโนเข้าสู่เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* จะมีกลไกในการขนส่ง 2 แบบ คือ อะมิโนแอซิดเปอร์มิเอส (amino acid permease; GAP) ซึ่งใช้สำหรับการขนส่งกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์เป็นด่าง และกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์เป็นกลางทุกชนิด ยกเว้น โพรลีน (proline) และระบบการขนส่งที่จำเพาะซึ่งมีถึง 11 ระบบ โดยที่แต่ละระบบจะจำเพาะกับกรดอะมิโนเพียง 1 ชนิด หรือ 2-3 ชนิด ส่วนการขนส่งเปปไทด์จะเป็นแบบ non-inducible ซึ่งในการขนส่งมีระบบการขนส่งเพียงระบบเดียวที่ใช้ร่วมกัน และแอมโมเนียทำให้เกิดการคาบอไลต์รีเพรสชัน (catabolite repression) คอเอนไซม์ที่ใช้ในระบบ ดังนั้นถ้ามีแอมโมเนียจะไม่มีการขนส่งเปปไทด์ (สาวิตรี, 2539)

2.6 ลักษณะทั่วไปของยีสต์ที่ใช้ในการศึกษาและวิจัย

Saccharomyces cerevisiae จัดอยู่ใน Division Eumycota, Subdivision Ascomycotina, Class Hemiascomycetes, Family Saccharomycetaceae และ genus *Saccharomyces* เป็นยีสต์แท้ (hemiascomycetes) เซลล์ของยีสต์ในจินตน์จะเป็นรูปกลม รูปไข่ หรือค่อนข้างยาว อาจมีการสร้างไมซีเลียม เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนด้วยการแตกหน่อ ชนิดแบบที่เกิดได้ที่ขั้วของเซลล์ และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้างแอสโคสปอร์ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังจากคอนจูเกชัน (conjugation) หรืออาจพัฒนาจากเซลล์ดิพลอย ที่อยู่ในระยะเวเจเตทีฟ แอสโคสปอร์มักมีรูปกลมหรือไข่ มีจำนวน 1 ถึง 4 ต่อแอสคัส สปอร์มีลักษณะกลมถึงรี ผิวสปอร์เรียบ ยีสต์ในจินตน์สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ แต่ใช้เกลือไนเตรดไม่ได้ ยีสต์ในจินตน์เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารต่างๆ เช่น ผลไม้ น้ำผลไม้ น้ำเชื่อม น้ำผึ้ง อาหารหมัก เกิดการเน่าเสีย ในขณะที่ยีสต์ในจินตน์บางชนิดก็เป็นเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ได้สูง จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเหล้า เบียร์ ตลอดจนใช้เพื่อการผลิตอาหารต่างๆ มากมาย เช่น แฉ่เจี้ยวญี่ปุ่น ซิอิฉูญี่ปุ่น ยีสต์ *S. cerevisiae* มีบทบาทในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น ขนมนึ่ง ไวน์ กลีเซอรอล (glycerol) และอินเวอร์เตส (invertase) สามารถหมักน้ำตาลในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) ทำให้ได้แอลกอฮอล์ แต่ในสภาวะมีออกซิเจน ยีสต์ชนิดนี้จะสลายน้ำตาลให้กลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ (สุมาลี, 2541; สุวิมล, 2546: 76) ดังนี้



อาหารเลี้ยงเชื้อฟังไจ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงฟังไจมีมากมายหลายชนิด ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้จะมีผลต่อการเจริญของฟังไจโดยที่ฟังไจแต่ละชนิดจะมีความต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน ดังนั้น ในการเพาะเลี้ยงฟังไจจึงควรที่จะต้องเลือกชนิดของอาหารให้เหมาะสม ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงฟังไจทั่วไป PDA เป็นหลัก ซึ่งจะมีปริมาณของสารอาหารค่อนข้างสูง (วิไลลักษณ์, 2549: 22) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงฟังไจสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ กลุ่มอาหารที่เป็น non-synthetic media หรือ complete media คือ อาหารที่ไม่ทราบองค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอน เช่น อาจมีส่วนผสมบางอย่างที่ได้จากธรรมชาติจากพืชหรือสัตว์ เช่น yeast extract, beef extract หรือ corn meal ผสมอยู่ ได้แก่อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, Corn meal, CMA และอีกกลุ่มหนึ่ง คือ อาหารที่เป็น synthetic media หรืออาหารสังเคราะห์ หมายถึงอาหารที่ทราบส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอน เช่น Czapek's medium, กรั้มlucose medium เป็นต้น

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

ในการเลี้ยง หรือแยกเชื้อราส่วนใหญ่มักใช้อาหารแข็งสูตร PDA เป็นหลักเพราะสามารถกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์และรงควัตถุ (pigment) ได้ดี นอกจากนี้ PDA ยังถูกใช้ในการตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนของยีสต์และราในอาหาร ผลิตภัณฑ์จากนม (dairy products) และเครื่องสำอาง (cosmetics) ด้วยเทคนิคการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะบนจานอาหาร (plate count method) การใช้งานทั่วไปสามารถเติมกรด (acid) หรือยาปฏิชีวนะ (antibiotics) เพิ่มลงในอาหารเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สามารถเตรียมได้เองจากการนำน้ำสกัดของมันฝรั่งที่ได้จากการต้ม (potato infusion) และกรองเอาเศษมันฝรั่งออก มาเติมน้ำตาลเดกซ์โทรส (dextrose) กับวุ้น (agar) ลงไป (อาหารเหลวสูตร PDB คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แต่ไม่มีการเติมวุ้นลงไป) หรือเตรียมได้จากอาหาร PDA สำเร็จรูปทางการค้า วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สองวิธีดังกล่าว เป็นวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ซึ่งจะได้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรต คือ น้ำตาลเดกซ์โทรส เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานแก่ฟังไจ สารอาหารอื่นๆ จากน้ำสกัดของมันฝรั่งที่อุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการ ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของฟังไจ และวุ้นที่เติมลงไปเพื่อให้

อาหารแข็งตัว โดยยีสต์และราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้จะสามารถพัฒนาลักษณะทางด้านโครงสร้าง หรือรูปร่าง (morphology) ได้ดี ใช้เวลาในการเจริญประมาณ 5-7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส การเจริญของยีสต์บนอาหารจะมีลักษณะเป็นโคโลนีสีขาวครีม ส่วนราจะสร้างโคโลนีที่มีลักษณะเป็นเส้นใยฟูคล้ายขุยสำลี หรือเป็นแผ่นคล้ายพรมกำมะหยี่หลากหลายสี ในการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อการตรวจนับจำนวนของยีสต์และรา เพื่อความแม่นยำควรมีการปรับค่า pH ของอาหารให้ต่ำลงอยู่ที่ประมาณ 3.5 เพื่อยับยั้งการเจริญของพวกแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาด้วย เช่น การเติมสารละลายกรดทาร์ทาริก (tartaric acid) ปราศจากเชื้อ ความเข้มข้น 10% ลงไปในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterilized medium) รอให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิอยู่ที่ 45 – 50 องศาเซลเซียส และเมื่อเติมกรดลงในอาหารแล้วไม่ควรให้อาหารถูกความร้อนอีก เพราะจะทำให้เกิดการไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) อาหารจะไม่แข็งตัว (European Pharmacopoeia, 2007 cited by RCI Labscan Limited, 2007)

2. การควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปทางจุลชีววิทยา

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปทางการค้าต่างๆ ทุกชนิดต้องมีการควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนที่จะนำออกสู่ตลาด ซึ่งการทดสอบคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อทางจุลชีววิทยากับฟังไจมาตรฐานต่างๆ ผลการทดสอบประสิทธิภาพดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพ เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังจากการบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส โดยสังเกตการเจริญเติบโตตั้งแต่ 18- 24 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยง

microorganisms	growth
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	good
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	good
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	good

ที่มา: RCI Labscan Limited (2007)

มันฝรั่ง (Potato)

มันฝรั่ง เป็นพืชหัวใต้ดินที่ให้คุณค่าทางอาหารประเภทแป้งสูง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Solanum tuberosum* L. มีชื่อเรียกอย่างอื่นว่า irish potato หรือ white potato สำหรับประเทศไทยนั้น เกษตรกรทางภาคเหนือเรียกว่า มันอาลู หรือ มันอะลู มันฝรั่งจัดอยู่ใน Family Solanaceae ส่วนของมันฝรั่งที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ คือ หัวที่สะสมอาหาร (tuber) อยู่ใต้ผิวดิน มาเป็นอาหารของมนุษย์ และสัตว์ ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์ รวมทั้งใช้แป้งมันฝรั่งมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรีย (บุญธรรม, 2547: 1) มันฝรั่งจัดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกชนิดหนึ่ง รองลงมาจากธัญพืช มีผลผลิตทั่วโลกประมาณ 300 ล้านตันต่อปี (ศิริพร, 2544) และในปัจจุบันมันฝรั่งได้กลายเป็นพืชเศรษฐกิจในทางภาคเหนือ ที่ทำรายได้สูงมากแก่เกษตรกรเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ จากการขยายตัวของกระแสการบริโภคมันฝรั่งภายในประเทศและต่างประเทศ จึงทำให้เกิดการขยายตัวในด้านการผลิตและอุตสาหกรรมการแปรรูปมันฝรั่งภายในประเทศ ซึ่งมีบริษัทผู้ผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ (potato chip) ประมาณ 7-8 บริษัท หลังจากการแปรรูปเสร็จแล้วก็จำหน่ายทั้งตลาดภายในประเทศและต่างประเทศ

1. คุณค่าทางอาหารของมันฝรั่ง

มันฝรั่งเป็นพืชชนิดหัวใต้ดินที่ใช้เป็นอาหารของมนุษย์มายาวนาน สามารถให้ผลเร็ว ทนต่อสภาพดินฟ้าอากาศได้ทั้งร้อนและหนาว นักโภชนาการกล่าวว่า โปรตีนที่ได้จากมันฝรั่งมีคุณภาพดีกว่าโปรตีนที่ได้จากพืชอื่นๆ เช่น ถั่วลิสง มันฝรั่ง 100 กรัม ให้พลังงาน 85 แคลอรี (caloric; Cal) และ 99.9 % ของผลผลิตไม่มีไขมัน นอกจากนี้มันฝรั่งยังมีธาตุแคลเซียม โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก ไอโอดีน แมกนีเซียม กรดโฟลิก (folie acid) และวิตามิน C, B₁ และ B₂ เมื่อวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของมันฝรั่งจะพบว่า หัวมันฝรั่งประกอบไปด้วยธาตุอาหารในปริมาณต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 (บุญธรรม, 2547: 6-7)

ตารางที่ 2 แสดงคุณค่าทางอาหารของหัวมันฝรั่ง (ปริมาณต่อ 100 กรัม)

รายการ	ปริมาณต่อ 100 กรัม
1. Water (%)	77.8
2. Food energy (Cal)	83.0
3. Protein (g)	2.0
4. Fat (g)	0.1
5. Carbohydrate - total (g)	19.1
- fiber (g)	0.4
- sugar (g)	1.0
- other (g)	15.0
6. Ash (g)	1.0
7. Ca (mg)	19.0
8. Mg (mg)	20.0
9. P (mg)	56.0
10. K (mg)	370.0
11. Na (mg)	9.0
12. Vitamin A (IU)	20.0
13. Thiamin (mg)	0.11
14. Riboflavin (mg)	0.04
15. Niacin (mg)	1.2
16. Ascorbic acid (mg)	38.0

ที่มา: บุญธรรม (2547: 7)

2. มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ และน้ำเสียจากโรงงานมันฝรั่งทอดกรอบ

จากแนวโน้มการบริโภคมันฝรั่งที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การแปรรูปผลิตภัณฑ์จากมันฝรั่งมากขึ้นตามไปด้วย เช่น มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ (potato chips) และมันฝรั่งเส้น (french fries) ทั้งในรูปแบบแช่แข็งและทอด (หทัยชนก และ เพ็ญศิริ, 2547: 1) อุตสาหกรรมผลิตมันฝรั่งทอดกรอบ เป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมผลิตอาหารว่างประเภทขนมขบเคี้ยว ที่ได้รับความนิยมบริโภคอย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยทั่วไปกระบวนการผลิตมันฝรั่งทอดกรอบมี 4 ขั้นตอน คือ การทำความสะอาด การหั่น การทอด และการบรรจุ (จันทร์จิรา, 2553: 9-10) ดังนี้

1. การทำความสะอาด เริ่มต้นจากหัวมันฝรั่งดิบถูกปล่อยออกมาจากเครื่องป้อนมันฝรั่งลงสู่สายพานลำเลียง ที่มีเครื่องฉีดน้ำทำการล้างเศษดินออกจากเปลือกหัวมันฝรั่งและถูกขัดให้เปลือกหลุดออกด้วยเครื่องขัดผิวมันฝรั่ง จากนั้นหัวมันฝรั่งจะถูกส่งตามสายพานลำเลียง ซึ่งจะมีผู้ทำการตรวจสอบ คอยตรวจสอบตำหนิและคัดแต่งหัวมันฝรั่งโดยใช้มีดเฉือนส่วนที่มีตำหนิออกหรือส่วนเกินให้ได้ขนาดตามต้องการ

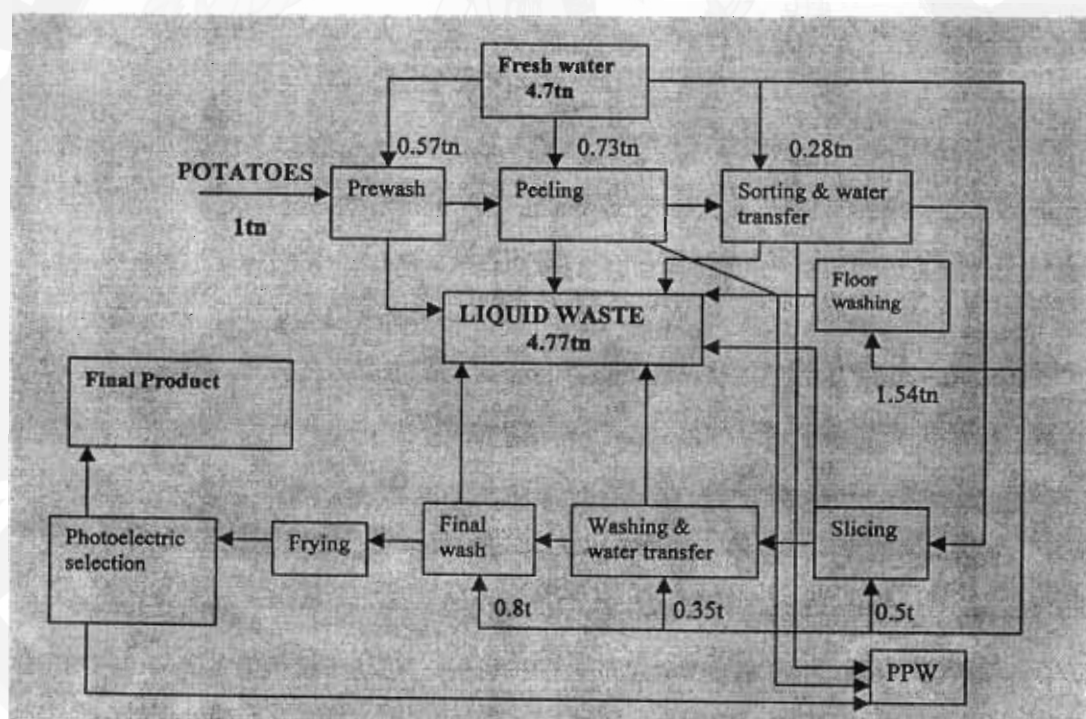
2. การหั่น เริ่มต้นจากหัวมันฝรั่งที่ผ่านการตรวจสอบและตกแต่งเรียบร้อยแล้วเลื่อนเข้าสู่เครื่องหั่นหัวมันฝรั่ง ซึ่งจะทำการหั่นหัวมันฝรั่งดิบให้เป็นแผ่นที่มีความหนา 0.6-0.7 มิลลิเมตร จากนั้นมันฝรั่งแผ่นจะเคลื่อนตามสายพานลำเลียง โดยผ่านน้ำเพื่อล้างน้ำแป้งที่เกิดจากการหั่นหัวมันฝรั่งซึ่งติดกับแผ่นมันฝรั่งออก

3. การทอด เริ่มต้นจากมันฝรั่งแผ่นที่ผ่านการล้างเอาแป้งออกเรียบร้อยแล้ว ถูกลำเลียงเข้าสู่เครื่องทอดซึ่งเป็นแบบระบบปิด โดยมีความร้อนภายในเครื่องทอดประมาณ 185 องศาเซลเซียส และใช้ระยะเวลาทอด 15-20 วินาที ความร้อนจากเครื่องทอดจะถูกระบายด้วยเครื่องดูดอากาศออกสู่บรรยากาศภายนอก จากนั้นแผ่นมันฝรั่งทอดกรอบจะถูกเลื่อนไปตามสายพานลำเลียง ซึ่งจะผ่านเครื่องตรวจสอบและคัดแยกมันฝรั่งทอดกรอบที่มีรอยดำทึบ และมันฝรั่งทอดกรอบจะเคลื่อนมายังผู้ตรวจสอบเพื่อทำการตรวจสอบคุณภาพ โดยผู้ตรวจสอบจะต้องสวมถุงมือในการหยิบแผ่นมันฝรั่งที่ไม่ได้คุณภาพทิ้ง เช่น แผ่นมันฝรั่งที่มีรอยดำและไม่ได้ขนาดตามมาตรฐาน เมื่อแผ่นมันฝรั่งผ่านการตรวจสอบแล้ว จะถูกป้อนด้วยเครื่องป้อนตามความต้องการ

4. การบรรจุ เริ่มจากแผ่นมันฝรั่งทอดกรอบที่ผ่านการป้อนเลื่อนตามสายพานลำเลียงไปยังห้องบรรจุ ซึ่งเครื่องบรรจุพร้อมปิดผนึกจะทำการชั่งน้ำหนักมันฝรั่งทอดกรอบให้ได้ตามกำหนดและทำการปิดผนึกอัตโนมัติ จากนั้นของมันฝรั่งทอดกรอบที่บรรจุแล้วจะเลื่อนไปตามสายพานลำเลียง

ในกระบวนการผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ มีการใช้น้ำปริมาณมาก เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการล้างหัวมันฝรั่งก่อนเข้าระบบเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน ไปจนถึงขั้นตอนต่างๆ ในการล้างมันฝรั่งก่อน

เข้าเตาทอดเพื่อจำกัดแป้งและน้ำตาลในมันฝรั่งออกไป ซึ่งจะทำให้ได้มันฝรั่งที่ทอดออกมาไม่เป็นสีน้ำตาล หรือมีรสเค็ม โดยมีสัดส่วนของแป้งที่ถูกล้างออกมาประมาณ 1-2% ของน้ำหนักมันฝรั่งที่เป็นวัตถุดิบ (Gelinas and Barrette, 2007) ลักษณะของน้ำเสียจากโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบจึงมีค่า Biological Oxygen Demand (BOD), Chemical Oxygen Demand (COD), Total Dissolved Solids (TDS), Total Suspended Solid (TSS) และ Total Organic Carbon (TOC) ในปริมาณสูง ซึ่งส่งผลให้เกิดกลิ่นเหม็นจากระบบบำบัดน้ำเสีย เกิดปัญหามลภาวะทางกลิ่นกระจายไปยังโรงงานและบ้านเรือนประชาชนที่อยู่ใกล้เคียง (Azab, 2008) เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำเสียที่มาจากโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ Haldiram marketing Ltd., New Delhi จะพบว่ามีสมบัติดังแสดงในตารางที่ 3



ภาพที่ 6 กระบวนการผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ และน้ำเสียที่เกิดขึ้นในระบบ
ที่มา: Arapoglou et al. (2010: 1899)

ตารางที่ 3 สมบัติของน้ำเสียจากโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
Total suspended solids (TSS)	0.64 g/l
Total carbohydrates	19.47 g/l
Reducing sugars	0.04 g/l
Total protein	2.88 g/l
Nitrogen	0.46 g/l
Phosphorus	0.22 g/l
Potassium	0.15 g/l
Biological oxygen demand (BOD)	1,950 g/l
Chemical oxygen demand (COD)	8,122 g/l
pH	7.5

ที่มา: Mishra et al. (2004: 10)

พบว่า ในกระบวนการแปรรูปมันฝรั่งนั้นจะมีส่วนที่เหลือทิ้งเป็นจำนวนมากประมาณ 20-50 % ของวัตถุดิบที่เข้าสู่กระบวนการผลิต โดยส่วนที่ทิ้งนั้นได้มาจากกระบวนการปอกเปลือก (peeling) ตัดแต่ง (trimming) การฝาน (slicing) และการล้าง (cleaning) (Mahmood et al., 1998) ซึ่งอาจจะเรียกโดยรวมว่า ของเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปมันฝรั่ง (potato processing wastes) ทั้งนี้ ของเหลือทิ้งดังกล่าวได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวางมาเป็นเวลานาน เช่น ส่วนของเปลือกที่เกิดจากกระบวนการขูด (caustic peel waste) ก็ได้มีการนำไปเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus foetidus* NRRL337 เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส (amylase) และสามารถต่อยอดไปถึงการผลิตเป็นเอทานอล (Bloch et al., 1973) ไม่เพียงเท่านั้น เปลือกมันฝรั่งก็สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ เช่น จากงานวิจัยของ Onwubuehmel และคณะ (1985) ที่มีการนำเศษมันฝรั่งมาเลี้ยงโคนม ร่วมกับอาหารหลักคือข้าวโพด ซึ่งก็พบว่าไม่ได้ทำให้ปริมาณน้ำนมที่ได้และองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำนมไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมที่เลี้ยงด้วยข้าวโพดเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเลี้ยงด้วยเศษมันฝรั่งในสัดส่วน 20% ของอาหารจะช่วยลดไขมันในน้ำนมและเกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของอะซิเตท กับ โพรพิโอเนท (acetate: propionate) ซึ่งเป็น กรดไขมันที่ระเหยง่าย (Volatile Fatty Acid; VFA) ในกระเพาะรูเมนด้วย ในปี 1998 Mahmood และคณะ ก็ได้

นำเปลือกมันฝรั่งมาปั่นผสมกับกากสับในอัตราส่วนต่างๆ และใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* เพื่อผลิตเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส (alpha-amylase) โปรติเอส (protease) และโพลิกลแลกโตนเนส ไลเอส (polygalacturonate lyase) ในประเทศไทยก็มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์จากเปลือกมันฝรั่งเช่นกัน โดยใช้เปลือกมันฝรั่งผสมกับรำข้าวเจ้าในสัดส่วน 7: 3 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger*, *Rhizopus oligosporus* เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และอะไมโลกลูโคซิเดส (amylglucosidase) (ภูวนัฐ, 2538) แม้กระทั่งสารกันหืนธรรมชาติในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ก็มีการสกัดได้จากเปลือกมันฝรั่งที่เหลือจากกระบวนการแปรรูป สารที่สกัดได้มีหลายชนิดและที่มีปริมาณมากที่สุดคือ กรดแกลลิก (gallic acid) รองลงมาคือ กรดแอฟเฟอิก (caffic acid) กรดคลอโรจีนิก (chlorogenic acid) กรดโพรโตแคเทอจิก (protocatechuic acid) และวานิลลิน (vanillin) ตามลำดับ (ณัฐฐินี, 2546)

ในส่วนของการนำเสียจากกระบวนการแปรรูปมันฝรั่งพบว่า ยังคงมีสารอาหารอยู่เป็นจำนวนมาก ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งเป็นตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงาน Kellogg-Salada Foods ดังนั้น จึงมีรายงานการใช้ประโยชน์ในการใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) สำหรับเสริมในอาหารสัตว์ เช่น การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวของเชื้อรา *Cephalosporium eichhorniae* จากน้ำเสียโรงงานแปรรูปมันฝรั่ง แต่ก็ต้องมีการเสริมแอมโมเนียมฟอสเฟต (ammonium phosphate) 0.506 กรัมต่อลิตร และธาตุเหล็ก 0.1 กรัมต่อลิตร ผลที่ได้ก็คือ สามารถผลิตมวลเซลล์ 0.61 กรัม น้ำหนักแห้ง (gram cell dry weight) ต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตของสับสเตรท ซึ่งมวลเซลล์ที่ได้ประกอบด้วยโปรตีน 0.3 กรัม (Stevens and Gregory, 1987) Yeast; *Torula utilis* ก็มีการเพาะเลี้ยงจากน้ำเสียฯ เช่นกัน เพื่อใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียว พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์ที่มีโปรตีนสูงถึง 50% จากสับสเตรทนี้ ต้นทุนการผลิตก็เพียง 5 % ต่อน้ำหนักปอนด์ จึงมีศักยภาพที่จะใช้ทดแทนปลาป่นในอาหารสัตว์ได้ (Reiser, 1954) ในประเทศไทย ดวงใจ และ มาริสา (2541) ก็ได้นำน้ำล้างแผ่นมันฝรั่งจากบริษัทอาหารขอดคุณ จำกัด มาศึกษาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Candida tropicalis* TISTR5136 เพื่อผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว พบว่ายีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะ 0.47 ต่อชั่วโมง ให้ปริมาณมวลเซลล์สูงสุด 1.212 กรัมต่อลิตรของน้ำเสีย เซลล์ยีสต์ที่ได้ประกอบด้วยโปรตีนและไขมันร้อยละ 32.19 และ 0.454 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 สารอาหารที่หลงเหลือในน้ำเสียโรงงานแปรรูปมันฝรั่ง

องค์ประกอบ	ปริมาณ (% น้ำหนักแห้ง)	
	น้ำเสียที่ไม่ผ่านการกรอง	น้ำเสียที่ผ่านการกรอง
Dry matter (%w/v)	10.3-13.7	8.1-9.8
Total carbohydrate	44.1-59.2	39.7-47.3
Reducing sugar	3.6-6.7	4.3-5.8
Crude protein	12.1-15.5	13.0-15.5
Calcium	0.10-0.19	0.09-0.17
Phosphorus	0.22-0.30	0.26-0.38
Magnesium	0.09-0.10	0.09-0.15
Potassium	1.6-2.5	2.1-3.7
Manganese	0.0022-0.0051	0.0022-0.0063
Copper	0.0007-0.0016	0.0014-0.0034
Zinc	0.0025-0.0052	0.027-0.095

ที่มา: Stevens and Gregory (1987: 285)

Meister และ Thompson (1976) ได้เสนอวิธีการทางเคมีร่วมกับกายภาพในการเก็บเกี่ยวโปรตีนจากน้ำเสียของโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ พบว่า สามารถเก็บเกี่ยวโปรตีนได้ถึง 170 กิโลกรัม (kilogram; kg) จากหัวมันฝรั่งที่เข้าสู่กระบวนการผลิตทั้งสิ้น 31 ตัน การให้ความร้อนที่ 80-90 องศาเซลเซียส และปรับ pH ให้เป็น 4-4.5 พบว่า เป็นวิธีที่ทำให้ได้โปรตีนมากที่สุด ต่อมาในปี 1980 Strolle และคณะก็ได้เสนอวิธีการเก็บเกี่ยวสารอาหารต่างๆ ในน้ำเสียนี้โดยการระเหย (evaporation) และการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) ซึ่งสิ่งที่ได้มาสามารถนำไปเลี้ยงสัตว์และจุลินทรีย์ได้

วิธีการและการออกแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methods and Designs)

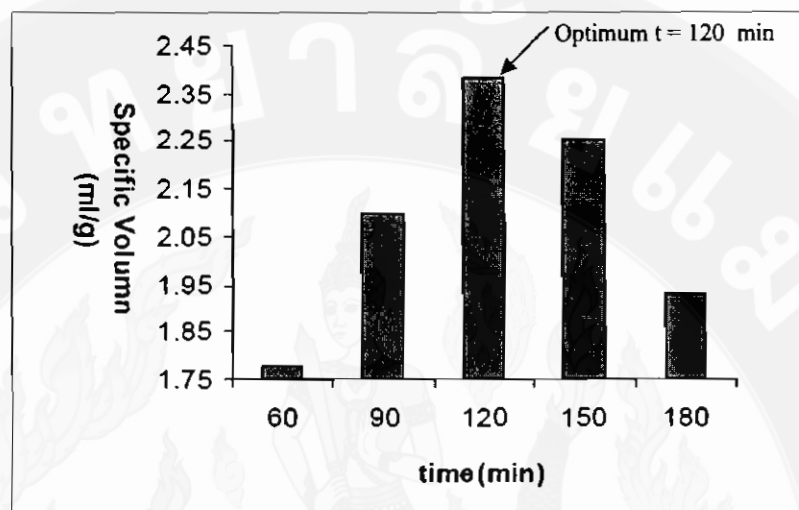
เนื่องด้วยทรัพยากรมีจำนวนจำกัด ดังนั้นการทดลองแต่ละครั้งจะต้องให้สาระข้อมูลที่สำคัญที่สุด ซึ่งการทดลองที่มีการวางแผนที่ดีจะทำให้ได้สาระข้อมูลที่สำคัญและมีคุณภาพมากกว่า การทดลองที่เกิดขึ้นจากงานที่ไม่ได้รับการวางแผนมาก่อน และโดยเฉพาะการทดลองตามแผนที่วางไว้จะสามารถวิเคราะห์เกี่ยวกับอิทธิพลของปัจจัยที่ต้องการศึกษาได้ดีกว่าด้วย

1. จุดอ่อนของการทดลองทีละปัจจัย (One-variable-at-a-time)

การวางแผนการทดลองแบบดั้งเดิมที่ใช้กันโดยทั่วไปที่เรียกว่า one-variable-at-a-time หรือการทดลองทีละปัจจัย เป็นรูปแบบของการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาผลของปัจจัยเพียงสถานะหนึ่งเท่านั้น แต่เมื่อต้องทำการพิจารณาผลรวมของปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งหมดในกระบวนการ อาจทำให้ผลที่ได้มีความคลาดเคลื่อน (Heck, 2006) เนื่องจากรูปแบบการทดลองจะทำการศึกษาทีละปัจจัย หรือทีละตัวแปร โดยจะแบ่งปัจจัยหรือตัวแปรออกเป็นค่าหลายระดับ และทำการทดลองในแต่ละระดับเพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุด ทำเช่นนี้กับการศึกษาตัวแปรอื่นๆ ที่เหลือโดย จนได้ค่าที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัย จึงเป็นวิธีที่ต้องใช้เวลานานเพื่อให้ได้ผล และผลที่ได้อาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนที่เรียกว่า Trial & Error Method (นงเยาว์ (2554: 3)

ยกตัวอย่าง การศึกษากระบวนการผลิตขนมปังชนิดหนึ่ง ที่ใช้วิธีทดลองแบบ one-variable-at-a-time โดยมีปัจจัยที่ศึกษาคือ อุณหภูมิ และเวลาในการเกิดโด (dough) ในผลิตภัณฑ์ขนมปัง อุณหภูมิที่ศึกษาอยู่ระหว่าง 20-40 องศาเซลเซียส และเวลาอยู่ระหว่าง 60-180 นาที แบ่งการทดลองออกเป็น 10 การทดลอง ซึ่งการทดลองที่ 1-5 จะศึกษาผลของเวลา (time; t) ให้การทดลองที่ 1 ศึกษาที่เวลา 60 นาที การทดลองที่ 2, 3, 4 และ 5 ศึกษาที่เวลา 90, 120, 150 และ 180 นาที ตามลำดับ โดยกำหนดให้ใช้อุณหภูมิคงที่ที่ 25 องศาเซลเซียส ผลการทดลองที่ได้ ดังแสดงในภาพ 7 ส่วนการทดลองที่ 6-10 ศึกษาผลของอุณหภูมิ (temperature; T) โดยกำหนดให้ใช้เวลาคงที่ 120 นาที การทดลองที่ 6 ศึกษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส การทดลองที่ 7, 8, 9 และ 10 ศึกษา 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ผลการทดลองดังแสดงในภาพ 8 ซึ่งการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า เมื่อพิจารณาจากค่าการตอบสนองต่อปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งได้จากการวัดค่า specific volume (ปริมาตรจำเพาะ) สถานะที่เหมาะสมในการเกิดโดในผลิตภัณฑ์ขนมปัง คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 120 นาที จากการสรุปผลนี้แสดงให้เห็นว่า ถ้าเวลาในการเกิดโด หรืออุณหภูมิ อย่างใดอย่างหนึ่งมีการเพิ่มขึ้น หรือลดลงจากสภาวะดังกล่าว การลดลงของค่า specific volume จะเกิดขึ้น ดังนั้นอะไรก็เกิดขึ้นเมื่อตัวแปรนี้มีการเปลี่ยนแปลงพร้อมกัน เนื่องจากในความ

เป็นจริง การทดลองนี้ไม่ได้ศึกษาปฏิริยาสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลา ซึ่งสถานะที่เหมาะสม อาจจะเป็นอีกสถานะหนึ่งก็ได้ ดังภาพที่ 9

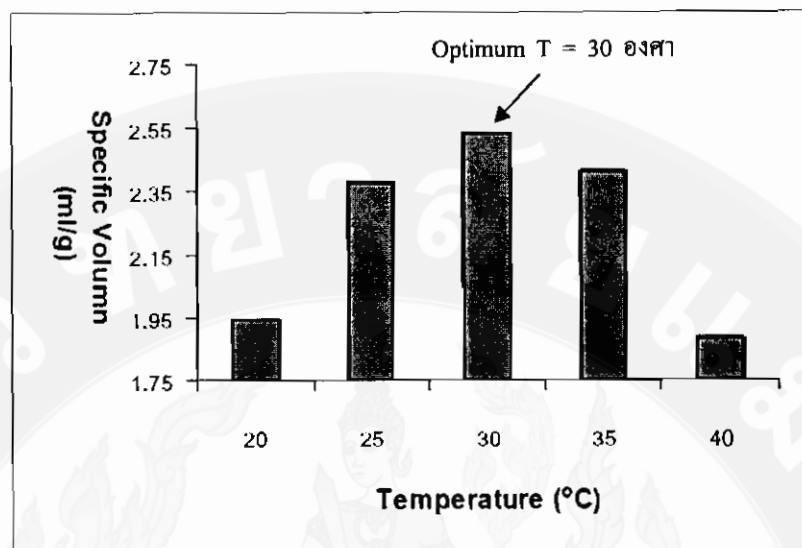


ภาพที่ 7 ผลการทดลองที่สมมุติจาก one-variable-at-a-time ของการทดลองชุดที่ 1-5 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และเวลาในเกิดโด (dough) ในผลิตภัณฑ์ขนมปังที่กำหนดอุณหภูมิคงที่ที่ 25 องศาเซลเซียส

ที่มา: นางเยาว์ (2554: 3)

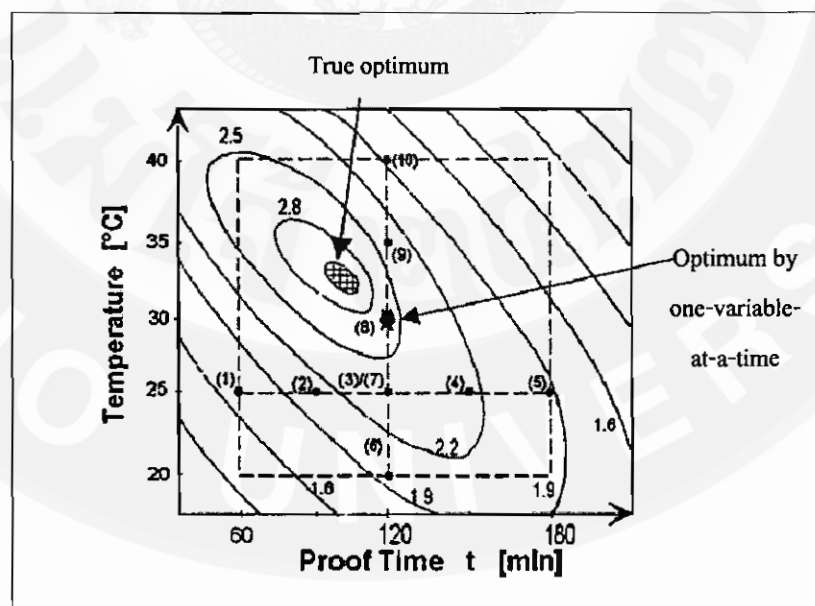
2. วิธีการของพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM)

ปัจจุบันมีความสนใจในการออกแบบเพื่อหาความสอดคล้องกับพื้นที่ของการตอบสนอง และประเมินความเหมาะสมในสถานะของการทดลอง วิธีการและการออกแบบพื้นผิวตอบสนอง หรือที่เรียกว่า Response Surface Method and Designs และการวิเคราะห์ ได้ถูกนำมาใช้เพื่อค้นหาคำตอบของการทดลองที่ประกอบด้วยจำนวนปัจจัยร่วมการทดลองหลายปัจจัย ซึ่งจะนำทางสู่การค้นพบการตอบสนองที่เหมาะสมในที่สุด (maximum) หรือ การตอบสนองต่ำสุด (minimum) ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของการทดลอง (ไพโรจน์, 2544: 1)



ภาพที่ 8 ผลการทดลองที่สมมุติจาก one-variable-at-a-time ของการทดลองชุดที่ 6-10 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และเวลาในเกิดโด (dough) ในผลิตภัณฑ์ขนมปังที่กำหนดเวลาให้คงที่ที่ 120 นาที

ที่มา: นางเยาว์ (2554: 3)



ภาพที่ 9 พื้นที่การตอบสนองจริงที่เป็นไปได้ของค่า specific volume ที่เกิดขึ้นจากการทดลองเวลาที่ใช้ในการเกิดโดและอุณหภูมิ กับจุดต่างๆ ที่แสดงผลจากการทดลอง one-variable-at-a-time

ที่มา: นางเยาว์ (2554: 4)

วิธีการของพื้นผิวตอบสนอง เป็นการรวบรวมเอาเทคนิคทั้งทางคณิตศาสตร์และสถิติที่เป็นประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหา โดยที่ผลตอบสนองที่สนใจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย และสามารถหาจุดที่เหมาะสม (optimization) จากความสัมพันธ์ของปัจจัยเหล่านั้นได้ (Bradley, 2007: 1) เช่น การอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้น (input variable) หรือปัจจัยเชิงปริมาณ กับค่าการตอบสนอง (response variable) เป็นคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ นอกจากนี้ยังสามารถแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของผลตอบสนอง เมื่อระดับของปัจจัยเชิงปริมาณเปลี่ยนแปลง และการหาระดับของปัจจัยเชิงปริมาณที่เหมาะสม (optimum value) ที่จะทำให้เกิดผลตอบสนองที่ดีที่สุด หรือสามารถเลือกจุดที่เหมาะสมได้จาก ผลตอบสนองหลายๆ ค่าได้ (นงเยาว์, 2554: 5) โดยรวมแล้วเทคนิคดังกล่าวนี้ ได้ใช้เพื่อให้คำตอบต่างๆ เช่น ค่าตอบสนองได้รับผลกระทบจากชุดสิ่งทดลองบนพื้นที่เฉพาะที่น่าสนใจบางอย่างได้อย่างไร ถ้าจำเป็น ชุดของสิ่งทดลองอะไรที่จะให้ผลิตภัณฑ์หนึ่งเป็นที่น่าสนใจตรงตามข้อกำหนดจำเพาะพร้อมๆ กัน และค่าอะไรของสิ่งทดลองที่จะให้ผลผลิตในจุดที่สูงสุดของพื้นที่เฉพาะหนึ่งๆ และพื้นที่การตอบสนองอะไรที่ใกล้กับค่าสูงสุดนี้ได้ (ไพโรจน์, 2544: 2)

หลักการที่สำคัญของการทำพื้นผิวตอบสนองเพื่อนำเสนอผลการวิจัย คือ การที่จะนำเสนอแบบพื้นผิวตอบสนอง ต้องมีแผนการทดลองที่เหมาะสม อย่างน้อยต้องมีปัจจัย หรือตัวแปรอิสระ 2 ตัวขึ้นไป และต้องเป็นตัวแปรเชิงปริมาณ ต้องมีตัวแปรตามอย่างน้อย 1 ตัวขึ้นไปและต้องเป็นตัวแปรเชิงปริมาณด้วย ดังนั้นแผนการทดลองที่จะสามารถสร้างพื้นผิวตอบสนองได้ คือ Factorial Design, Mixture Design, Central Composite Design (CCD) และ Plackett & Burman Design นอกจากนี้ระดับของตัวแปรอิสระที่ต้องผันแปรไปนั้น จะเป็นต้องครอบคลุมพื้นที่ที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำข้อมูลของตัวแปรอิสระแต่ละตัว (X_i) ที่สัมพันธ์กับข้อมูลของตัวแปรตาม (Y_i) สร้างเป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (model) (กัลยาณี 2554) และนำแบบจำลองนี้ไปใช้ในการคาดคะเน (prediction) หรือปรับกระบวนการให้เหมาะสม (process optimization) ซึ่งโดยทั่วไปตัวแปรตามแต่ละตัวแปรหรือค่าตอบสนอง (response) จะขึ้นกับตัวแปรอิสระ ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรเหล่านี้ สามารถอธิบายโดยแบบหุ่นทางคณิตศาสตร์ที่เรียกว่า สมการรีเกรสชัน (สมการถดถอย; regression equation) เมื่อพิจารณาสมการ (Bradley, 2007: 1)

$$Y = f(X_1, X_2) + \varepsilon$$

โดยกำหนดให้ปัจจัยนั้นแทนค่าด้วย X และ ε คือ ค่าความผิดพลาดที่เกิดขึ้นในค่าสังเกต Y ที่เป็นผลมาจากการทดลอง ถ้ากำหนดว่า $E(Y) = f(X_1, X_2) = \eta$ ดังนั้น สามารถเขียนสมการของพื้นผิวดตอบสนองได้ คือ

$$\eta = f(X_1, X_2)$$

ซึ่งจะเรียกว่า พื้นผิวดตอบสนอง (response surface) โดยส่วนใหญ่จะแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิวในรูปของกราฟิก โดยที่ η จะถูกพล็อตกับระดับของ X_1 และ X_2 เพื่อที่จะช่วยให้มองรูปร่างของพื้นผิวผลตอบสนองได้ดียิ่งขึ้น ดังภาพที่ 10 อย่างไรก็ตามในการศึกษาโดยใช้วิธีการแสดงผลพื้นผิวดตอบสนองนั้น จำเป็นต้องค้นหาฟังก์ชันที่แท้จริงระหว่างตัวแปรตามค่าตอบสนองต่อตัวแปรอิสระต่างๆ เป็นลำดับแรก การค้นหาฟังก์ชันต่างๆ เหล่านี้มักใช้ความสัมพันธ์แบบโพลิโนเมียล (polynomial) ลำดับคี่ๆ เช่น ลำดับหนึ่งหรือกำลังหนึ่ง (first order) ลำดับสองหรือกำลังสอง (second order) เป็นต้น โดยทั่วไปฟังก์ชันซึ่งประมาณความสัมพันธ์แบบหนึ่ง มีแบบหุนดังนี้ (Bradley, 2007: 2)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon$$

สำหรับระบบมีลักษณะความสัมพันธ์แบบเส้นโค้ง (quadratic regression relationship) ต้องใช้โพลิโนเมียลที่มีลำดับสูงขึ้น เช่น ลำดับสองหรือกำลังสอง ซึ่งมีแบบหุนดังนี้ (Montgomery, 1991 อ้างโดย อิศรพงษ์, 2550: 124)

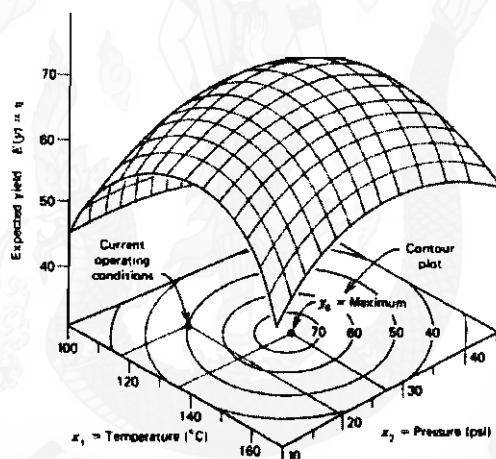
$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_i \sum_{j \leq i}^k \beta_{ji} X_i X_j + \varepsilon$$

3. การออกแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design; CCD)

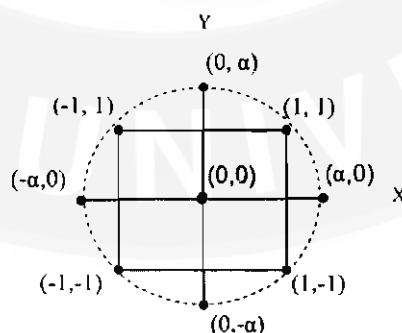
ปัญหาเกี่ยวกับพื้นผิวดตอบสนองส่วนมากจะใช้แบบจำลองกำลังหนึ่ง หรือแบบจำลองกำลังสองในการหาพื้นผิวดตอบสนอง แต่แบบจำลองทั้งสองชนิดไม่สามารถใช้ประมาณความสัมพันธ์ตลอดพื้นผิวทั้งหมดของตัวแปรอิสระ ถ้าพื้นผิวที่เราสนใจอยู่มีขนาดใหญ่ การออกแบบพื้นผิวดตอบสนองมีวิธีการที่นำมาใช้ในการหาค่าที่ดีที่สุดของผลตอบอยู่หลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ วิธีการกำลังสองน้อยสุด (least square) การป้อนด้วยทางชัน การออกแบบสำหรับพิตแบบจำลองอันดับที่หนึ่ง (first-order model) และการออกแบบสำหรับพิตแบบจำลองอันดับที่สอง (second -order model) ซึ่งการออกแบบสำหรับพิตแบบจำลองอันดับที่สองนี้เป็นการเน้นไปที่การ

สร้างแบบจำลอง quadratic ของผลตอบ มีวิธีการที่น่าสนใจอยู่ 2 วิธีด้วยกัน คือ การออกแบบส่วนประสมกลาง และการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken Design)

การออกแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design; CCD) เป็นหนึ่งในวิธีการหาพื้นผิวตอบสนองที่นิยมใช้เพื่อหากระบวนการที่เหมาะสม โดยทั่วไป CCD จะประกอบด้วย 3 ส่วน ค่อยไปนี้ (ก) ตำแหน่งการทดลองของ 2^k factorial (ถ้า k ในที่นี้คือ ตัวแปรอิสระหรือปัจจัย 2 ตัว ดังนั้น 2^2 จะมีตำแหน่งการทดลองทั้งหมด 4 ตำแหน่ง $(-1, -1)$ $(+1, -1)$ $(+1, +1)$ $(-1, +1)$ (ข) ตำแหน่งการทดลองที่เพิ่มขึ้นมาอีก 4 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่เป็นแนว $+\alpha$ หรือ $-\alpha$ ในแนวแกนที่เรียกว่า star point $(+\alpha, 0)$ $(-\alpha, 0)$ $(0, +\alpha)$ $(0, -\alpha)$ และ (ค) ตำแหน่งตรงกลางของพื้นที่การทดลองอีก 1 ตำแหน่ง ที่เรียกว่า central point (ตำแหน่ง $0,0$) (ภาพที่ 11)

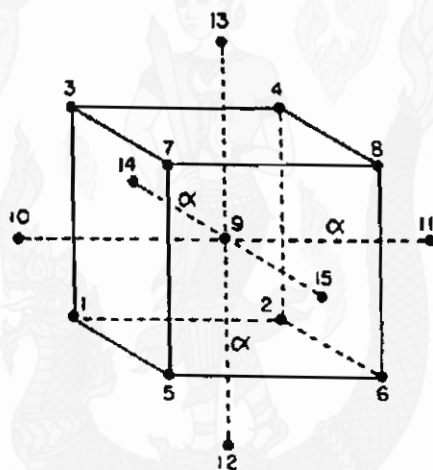


ภาพที่ 10 กราฟ 3 มิติของพื้นผิวตอบสนอง
ที่มา: อิศรพงษ์ (2550: 124)



ภาพที่ 11 ส่วนประกอบทั้ง 3 ส่วนของ CCD และจุดของการออกแบบ 9 สิ่งทดลองสำหรับ 2 ปัจจัย
ที่มา: เสาวนีย์ (2551: 20)

เพราะฉะนั้นการทดลองแบบ CCD ในกรณีที่มีตัวแปรอิสระ 2 ตัว จะมีตำแหน่งเพิ่มขึ้น จาก 2^k factorial design อีก 5 ตำแหน่ง $(2k+1)$ คือ $(+\alpha, 0)$ $(-\alpha, 0)$ $(0, +\alpha)$ $(0, -\alpha)$ และ $(0, 0)$ เพื่อให้จุดหนึ่งของการเพิ่มเป็นจุดกึ่งกลาง และจุดที่เหลือ $2k$ เป็นจุดห่าง α รวมทั้งหมดเป็น 9 สิ่งทดลอง (ภาพ 11) สำหรับจำนวนตัวแปรอิสระ 3 ตัว ($k = 3$) จะทำให้การออกแบบ 2^k factorial designs + $(2k+1)$ มี 15 สิ่งทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 12 ทำให้การทดลองแบบนี้จึงสามารถครอบคลุมพื้นที่ที่ต้องการ (กัลยาณี, 2544: 4) สำหรับการทดลอง แบบ CCD นั้น สามารถกำหนดตำแหน่งของการทดลองได้ดังตารางที่ 5



ภาพที่ 12 จุดของการออกแบบ 15 สิ่งทดลองใน composite design ที่มี 3 ปัจจัย
ที่มา: ไพโรจน์ (2544: 46)

ตารางที่ 5 ตำแหน่งการทดลองและระดับค่า $\alpha = 2^{k/4}$ สำหรับการทดลองแบบ CCD

จำนวนปัจจัย (X_i) = k	2	3	4	5
จำนวนตำแหน่งการทดลองทั้งหมดใน CCD	9	15	25	43
ระดับของ ค่า $\alpha = 2^{k/4}$	1.4142	1.6818	2	2.3784

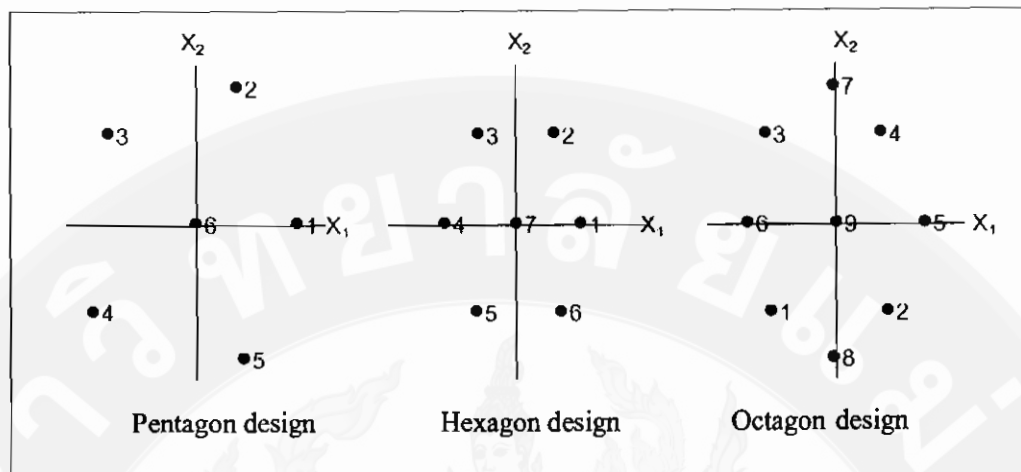
ที่มา: กัลยาณี (2544: 4)

จากตารางที่ 5 จะเห็นว่าในการออกแบบ composite design จุดของการออกแบบการทดลองจะเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อ k ถูกเพิ่ม ตัวอย่างเช่น สำหรับ $k = 4$ และ 5 แล้ว composite design

จะมีจำนวนตำแหน่งการทดลองทั้งหมดเท่ากับ 25 และ 43 จุดการทดลอง ตามลำดับ ดังนั้นการออกแบบ composite design ที่ต้องการ คือ 2^k factorial design ที่ถูกแทนที่ด้วย fractional ที่ทำซ้ำของ 2^k เพื่อเป็นไปตามจุดมุ่งหมายของ composite design การทำ fraction replication ควรจะถูกออกแบบเพื่อให้เกิดการประมาณค่าทั้งหมดของผลเชิงเส้นตรง และผลเชิงเส้นโค้ง และผลของปฏิริยาสัมพันธ์บางส่วนในรูปแบบหุ่นลำดับสอง เพื่อให้บรรลุความสำเร็จนี้การทำ fraction replication composite design โดยปกติจะมีความเป็นไปได้ในการประมาณค่า β_0 และผลในเชิงเส้นตรงทั้งหมด (β_1) และผลในเชิงเส้นโค้งทั้งหมด (β_{11}) และผลเพียงหนึ่งอย่างของผลปฏิริยาสัมพันธ์ที่เลือกจากแต่ละอันของชุด alias นั้นๆ (ไพโรจน์ 2544: 54)

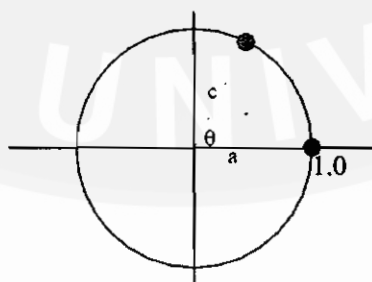
การคาดคะเนของรูปแบบหุ่นการตอบสนองที่ทำให้ข้อมูลสอดคล้องที่ตำแหน่งจุดต่างๆ ในพื้นที่ของการทดลองขึ้นอยู่กับวิธีการออกแบบที่กำลังใช้นั้นๆ การออกแบบดังกล่าวเรียกว่า rotatable designs การออกแบบหมุนลำดับที่สองอย่างง่ายที่สุดสำหรับประมาณรูปแบบหุ่นลำดับที่สองที่มี 2 ปัจจัย ได้แสดงโดยมีจุดมารวมกันของรูปแบบ แบบ 5 เหลี่ยม (pentagon) 6 เหลี่ยม (hexagon) และ 8 เหลี่ยม (octagon; แบบมาตรฐาน) ซึ่งแต่ละอย่างจะมี 1 จุดกึ่งกลาง ซึ่งแบบ 5 และ 6 เหลี่ยม จะสามารถลดสิ่งทดลองให้มีจำนวนน้อยลง (ไพโรจน์ 2544: 58) ดังภาพที่ 13

เพื่อให้การคาดคะเนที่ดีในส่วนจุดกึ่งกลางของการออกแบบ จุดกึ่งกลางควรถูกทำซ้ำมากกว่าจุดที่อยู่รอบนอก ดังตาราง 5 ที่แสดงจุดร่วมสำหรับการออกแบบรูปแบบ แบบ 5 เหลี่ยม 6 เหลี่ยม และ 8 เหลี่ยม ในการแสดงดังกล่าวจุดรอบนอกมีระยะห่างเท่ากันจากการออกแบบจุดกึ่งกลางเพื่อให้การหมุนเป็นที่น่าพอใจ และสังเกตได้ว่าจำนวนระดับของปัจจัยเชิงปริมาณจะถูกกำหนดโดยการออกแบบ ตัวอย่างเช่นการออกแบบรูปแบบ แบบ 6 เหลี่ยมที่ต้องการระดับ 5 ระดับของตัวแปร X_1 และ 3 ระดับของตัวแปร X_2 ประโยชน์ของการออกแบบนี้อยู่บนพื้นฐานความจริงที่ว่า การออกแบบนี้จะมีจำนวนของการทดลองที่น้อย ซึ่งเปิดโอกาสให้สามารถสร้างรูปแบบลำดับที่สองที่ทำให้ข้อมูลสอดคล้อง และรวมทั้งสามารถวัดค่าความคลาดเคลื่อนของการทดลองได้ (ไพโรจน์ 2544: 58)



ภาพที่ 13 การออกแบบแบบหมุนของ 2 ตัวแปร ใน 3 รูปแบบ
ที่มา: ไพโรจน์ (2544: 59)

ซึ่งระดับแต่ละจุดโดยละเอียด คำนวณได้โดยกำหนดจุดเริ่มต้นเป็นจุด (1, 0) จำนวนจุดทั้งหมด (บนเส้นรอบวงรัศมี 1 หน่วย; ไม่รวมจุดกึ่งกลาง) มี 5 จุด (5 เหลี่ยม) แต่ละจุดจึงห่างกันเท่ากับ $360/5 = 72$ องศา จากภาพที่ 14 พบว่า ความยาวของ a คือ ระดับของ X_1 และความยาวของ b คือ ระดับของ X_2 ส่วน c คือ รัศมีของวงกลมเท่ากับ 1 เนื่องจาก $\cos \theta = a/c$ ดังนั้น $\cos 72 = a/1$; a เท่ากับ $\cos 72 \times 1 = 0.30902$ ส่วน b คำนวณจาก $\sin \theta = b/c$ ดังนั้น $\sin 72 = b/1$; b เท่ากับ $\sin 72 \times 1 = 0.95106$ เป็นต้น จึงสรุปได้ว่า ระดับที่จุดต่างๆ ของ X_{1i} , $X_{2i} = \cos(\theta \times i)$, $\sin(\theta \times i)$ โดยที่ θ คือ 72 และ i คือ 1, 2, ..., 5 สำหรับ Pentagon โดยที่ θ คือ 60 และ i คือ 1, 2, ..., 6 สำหรับ Hexagon (อิสรพงษ์, 2550: 98)

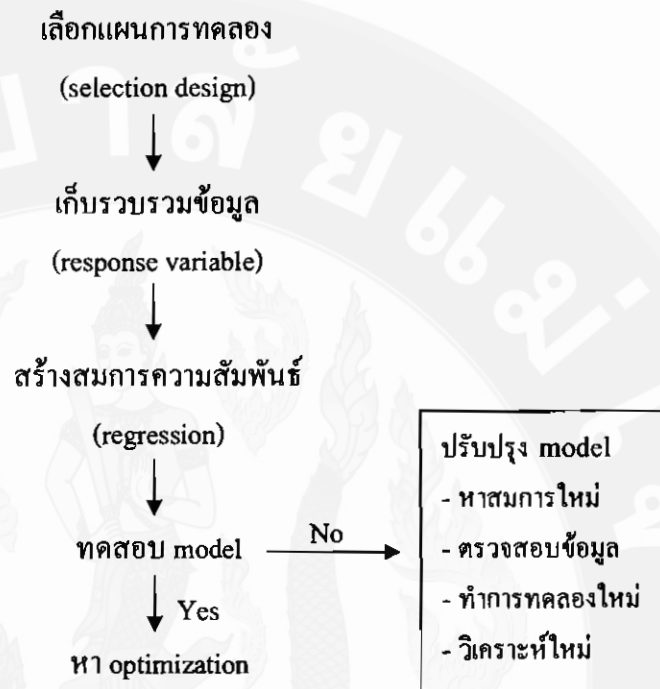


ภาพที่ 14 การคำนวณระดับโดยละเอียดสำหรับแผนแบบ Pentagon
ที่มา: อิสรพงษ์ (2550: 99)

ตารางที่ 6 จุดหรือสิ่งทดลองของการออกแบบการทดลองแบบ rotatable design ที่มี 2 ตัวแปร

จุดหรือสิ่งทดลอง	X_1	X_2	หมายเหตุ
Pentagon design			แต่ละตัวแปร มี 5 ระดับ
1	1.000	0	
2	0.309	0.951	
3	-0.809	0.588	
4	-0.809	-0.588	
5	0.309	-0.951	
6	0	0	
Hexagon design			ตัวแปร X_1 มี 5 ระดับ ตัวแปร X_2 มี 3 ระดับ
1	1.000	0	
2	0.500	0.866	
3	-0.500	0.866	
4	-1.000	0	
5	-0.500	-0.866	
6	0.500	-0.866	
7	0	0	
Octagon design			แต่ละตัวแปรมี 5 ระดับ
1-1	-1	-1	
21	1	-1	
3-1	-1	1	
41	1	1	
5	1.4142	0	
6	-1.4142	0	
7	0	1.4142	
8	0	-1.4142	
9	0	0	

สรุปโดยรวมแล้วขั้นตอนการทำ RSM จะประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ (นงเยาว์, 2554: 7)



1. กำหนดแผนการทดลองที่จะใช้และการเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบตัวอย่างที่เหมาะสมที่สามารถให้ข้อมูลเพียงพอในการสร้าง contour plot โดยกำหนดปัจจัยที่สำคัญ 2 หรือ 3 ปัจจัย กำหนดระดับปัจจัยที่จะศึกษา (RSM จะใช้ 3 ระดับขึ้นไป)

2. เก็บรวบรวมข้อมูลและนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ regression ที่ดีที่สุด โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ทางสถิติ เช่น SAS , SPSS และ Statistix เป็นต้น

ยกตัวอย่างในการศึกษาถึงผลของผลผลิตที่ได้ yield โดยศึกษา 2 ปัจจัย คือ ปริมาณสารตั้งต้น (X_1) และระยะเวลา (X_2) ในการผลิตโดยช่วงของปริมาณสารตั้งต้นที่สนใจศึกษาคือ 91-212 กรัมต่อลิตร และระยะเวลา คือ 10-30 ชั่วโมง ใช้แผนการทดลองแบบ pentagon สามารถกำหนดจุดในการทดลองและคำนวณหาค่าจริงที่จะใช้ในการทดลองได้ดังนี้

การคำนวณ

1. หาค่าจริงของระดับกึ่งกลาง (Avg.) = $(\text{ระดับสูง} + \text{ระดับต่ำ})/2$
2. หาค่าช่วงกลางของระดับ (Mid.) = $(\text{ระดับสูง} - \text{ระดับต่ำ})/2$
3. ค่าจริงของปัจจัยหาโดยการการเทียบบัญญัติไตรยางค์ ได้สูตร ดังนี้

$$\text{ค่าจริง} = (\text{Code level} \times \text{Mid.}) + \text{Avg.}$$

การคำนวณหาค่าจริง

แกน X_1

ค่าจริง	91	151.5		212	กรัม
ค่า Code	-0.809	0	0.309	1.0	

แกน X_2

ค่าจริง	10		20		30	ชั่วโมง
ค่า Code	-0.951	-0.588	0	0.588	0.951	

เมื่อกำหนดแผนการทดลองแล้ว จึงทำการเก็บรวบรวมข้อมูล โดยหาระดับของรหัส (code) ต่างๆ ด้วยเทียบบัญญัติไตรยางศ์ ในกรณีของระยะเวลา (X_2) อยู่ในช่วง 10-30 ชั่วโมง ให้ระดับต่ำ คือ (-1) และระดับสูง คือ (+1) ทั้ง -0.951 และ 0.951 ห่างจากจุดกึ่งกลาง (0) ไป 0.951 หน่วย โดยที่ค่าจริงของระดับกึ่งกลาง = (ระดับต่ำ+ระดับสูง)/2 = (10+30)/2 = 20 ชั่วโมง

เนื่องจาก 1 หน่วยชั่วโมง เท่ากับ 1 หน่วย code ดังนั้น 0.951 หน่วย coded จึงเท่ากับ 0.951 ชั่วโมง นำ 0.951 ไปบวกกับจุดกึ่งกลาง จะเท่ากับ 20.951 ของค่าจริง ซึ่งเท่ากับ 0.951 หน่วย coded ส่วนที่ระดับต่ำ นำ 0.951 ลบกับจุดกึ่งกลาง เท่ากับ 20-0.951 = 19.049 ชั่วโมง หรือ -0.866 หน่วย coded การทดลองนี้ทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลางจำนวน 4 ครั้ง ในตารางที่ 7 แสดงถึงแผนการทดลองที่จะใช้ในการเก็บรวบรวมข้อมูล และแสดงผลการทดลอง (สมมุติ) ที่ได้จากการดำเนินการทดลองดังกล่าว ซึ่งผลที่ได้นี้จะถูกนำไปวิเคราะห์หาค่า regression ที่ดีที่สุด

3. สร้าง contour plot จากวิเคราะห์ regression ที่ได้โดยใช้โปรแกรม Sufer, MathCad, Statistica หรือ Sigma plot

4. ตรวจสอบ model

5. Verification โดยการทำการ independent run ภายใต้ขอบเขตของตัวแปรแต่ละตัว และตรวจหา optimization

ตารางที่ 7 การทดลองและผลการทดลองที่สมมุติจากการใช้แผนการทดลองแบบ pentagon

Run	Code level		ค่าจริง		Response (Y)
	ปริมาณสารตั้งต้น (X_1)	เวลา (X_2)	ปริมาณสารตั้งต้น (X_1)	เวลา (X_2)	
1	1.0	0	212.00	20.00	96.0
2	0.309	0.951	170.19	29.51	78.7
3	-0.809	0.588	102.56	25.88	76.7
4	-0.809	-0.588	102.56	14.12	54.6
5	0.309	-0.951	170.19	10.49	64.8
6	0	0	151.50	20.00	78.9
7	0	0	151.50	20.00	97.4
8	0	0	151.50	20.00	90.5
9	0	0	151.50	20.00	93.0

ที่มา: คัดแปลงจาก อิศรพงษ์ (2550: 99-100)

การอบแห้งแบบพ่นฝอย (Spray Drying)

เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) เป็นวิธีการที่นิยมใช้สำหรับการทำแห้งสารละลายอินทรีย์ สารประเภทอิมัลชัน (emulsion) และของเหลวชนิดต่าง ๆ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะอยู่ในรูปของผงแห้ง มักใช้วิธีนี้ในอุตสาหกรรมทางเคมีและอาหาร ผลิตภัณฑ์ส่วนหนึ่งที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอยที่มีวางขายในปัจจุบันได้แก่ นมผง อาหารเด็กยา และสีย้อม การอบแห้งด้วยวิธีนี้ นอกจากจะใช้สำหรับทำแห้งอย่างรวดเร็วแล้ว ยังเป็นวิธีการที่มีประโยชน์มากในการลดขนาดและปริมาตรของของเหลวอีกด้วย และจากการวิจัยและพัฒนาที่ต่อเนื่องกันมาทำให้วิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอยกลายเป็นวิธีการอบแห้งที่มีประสิทธิภาพและนิยมนำมาใช้อบแห้งให้กับผลิตภัณฑ์หลายชนิดในปัจจุบัน

1. หลักการของระบบการอบแห้งแบบพ่นฝอย

การทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อระเหยนํ้าออกจากของเหลว อย่างรวดเร็วโดยอาศัยหลักการพาความร้อนของอากาศ ซึ่งเป็นวิธีการทำแห้งที่มีอัตราการถ่ายเทความร้อน

ร้อนสูงทำให้น้ำระเหยออกจากอาหารได้อย่างรวดเร็ว เวลาที่ใช้ในการทำแห้งสั้น กระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นประกอบไปด้วยการพ่นของเหลว (feed) ออกมาจนเป็นละอองขนาดเล็กเข้าผสมกับอากาศร้อนที่ไหลผ่านอย่างรวดเร็ว ทำให้น้ำที่อยู่ในละอองของเหลวระเหยไปทั้งหมด และได้ผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของผงแห้ง ช่วยลดน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ลง ทำให้ง่ายต่อการขนส่งและการเก็บรักษา สำหรับกระบวนการทำแห้งให้กับผลิตภัณฑ์นั้น จะเริ่มทำตั้งแต่ใส่ของเหลวลงในเครื่อง แล้วรอนของเหลวมีความชื้นในระดับที่เหมาะสมต่อการฉีดให้ออกมาเป็นละออง จากนั้นจึงแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำแห้งออกมา ตัวอย่างของเหลวที่นำมาทำแห้งนั้นสามารถใช้ได้ทั้งที่เป็น ตัวทำละลาย สารประเภทอิมัลชัน หรือสารแขวนลอยก็ได้ ส่วนเครื่องมือที่ใช้สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย คือ เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) กระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยนี้สามารถทำการผลิตได้คราวละมากๆ และกระบวนการผลิตเป็นแบบต่อเนื่อง ซึ่งอัตราการป้อนวัตถุดิบจะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 2-3 กิโลกรัมต่อชั่วโมง หรือมากกว่า 100 ตันต่อชั่วโมงต่อเครื่อง (Patel et al., 2009; อนุสรฯ, 2552: 11)

2. ทฤษฎีการอบแห้งแบบพ่นฝอย และการทำงานของเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย

การอบแห้งแบบพ่นฝอยเป็นกระบวนการอบแห้งที่ประยุกต์ใช้กับการแปรรูปอาหารได้ทุกประเภทซึ่งอาหารที่ต้องการอบแห้ง อาจอยู่ในสภาพของสารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกันหรือสารละลายที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ที่อยู่ในรูปของสารละลายของผสมระหว่างของแข็งและของเหลว (slurry) หรือของเหลวกับของเหลว (emulsion) ที่มีลักษณะไม่ข้นหนืดมาก หลักการทำแห้งจะดำเนินการโดยอากาศจะถูกดูดผ่านเครื่องกรองและผ่านเครื่องให้ความร้อน จากนั้นจึงเข้าสู่ห้องอบแห้ง (drying chamber) ส่วนของเหลวจะถูกดูดโดยปั๊มผ่านอุปกรณ์ที่ทำให้เกิดละอองฝอย คือ atomizer ทำให้องของเหลวแตกตัวเป็นละอองหรือหยดเล็กๆ เมื่อละอองของของเหลวสัมผัสกับอากาศร้อนภายในห้องอบซึ่งมีอากาศร้อนไหลผ่าน ในขณะเดียวกันเนื่องจากหยดของเหลวมีขนาดเล็กมากประมาณ 100-200 ไมโครเมตร ทำให้มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมากขึ้นเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการถ่ายโอนมวลและความร้อน การระเหยจึงเกิดขึ้นบนพื้นที่ผิวของหยดของเหลวอนุภาคเล็กๆ อย่างรวดเร็ว ทำให้ได้ผงของผลิตภัณฑ์ตกลงสู่ด้านล่างของห้องอบ ผงบางส่วนที่หลุดออกมากับอากาศจะถูกแยกโดยใช้ cyclone ซึ่งจะรวมเข้าเป็นผลิตภัณฑ์ผงในที่สุด ซึ่งกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

1. การทำของเหลวให้มีอนุภาคขนาดเล็กหรือหยดของเหลว (atomization) การทำของเหลวให้มีอนุภาคขนาดเล็กๆ หรือหยดของเหลวเป็นหัวใจหลักของการอบแห้งแบบพ่นฝอย เพราะจะเป็นตัวทำให้เกิดพื้นที่ผิวในการระเหยเพิ่มมากขึ้นซึ่งถ้ามีพื้นที่ผิวสูงก็จะสามารถระเหยน้ำ

ออกจากอาหารได้รวดเร็ว และเป็นตัวทำให้เกิดอนุภาคเล็กๆ ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพเฉพาะทั้งขนาด รูปร่างตลอดจนความหนาแน่น เมื่อของเหลวมีขนาดเล็กลงจะเพิ่มพื้นที่ผิวในการถ่ายโอนความร้อนได้มาก ทำให้เกิดการถ่ายโอนความร้อนและการถ่ายโอนมวลเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

2. การทำให้ของเหลวกระจายตัวเป็นละออง (atomization of feed) กระบวนการนี้เป็นการทำให้ของเหลวพ่นฝอยกระจายตัวกลายเป็นละอองโดยใช้หัวฉีด ซึ่งถือว่าเป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดของ spray dryer ซึ่งมี 3 ชนิด คือ หัวฉีดแบบหมุน (Rotary Atomizer) หัวฉีดแบบแรงดัน (pressure nozzles Atomizer) และหัวฉีดแบบสองของไหล (two-fluid nozzle atomizer, pneumatic nozzle atomizer) โดยที่หัวฉีดแบบหมุนเป็นอุปกรณ์พ่นฝอยที่ของเหลวจะไหลลงบนจานหมุนใกล้กับจุดศูนย์กลาง โดยจานหมุนจะมีความเร็วรอบประมาณ 5,000-10,000 รอบต่อนาที ของเหลวที่ตกลงบนจานหมุนจะถูกเหวี่ยงออกด้านข้างกระจายเป็นละอองขนาดอนุภาคเฉลี่ยประมาณ 30-120 ไมโครเมตร ส่วนหัวฉีดแบบแรงดัน อุปกรณ์พ่นฝอยชนิดนี้ของเหลวจะไหลผ่านช่องของหัวฉีดภายใต้ความดันสูง ทำให้ของเหลวที่ออกมาจากหัวฉีดกระจายเป็นละอองฝอยได้โดยไม่ต้องใช้อากาศ อนุภาคที่ได้จะมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 120-250 ไมโครเมตร โดยขนาดอนุภาคจะแปรผันตรงกับอัตราการใช้ของ feed และความหนืด แต่จะแปรผกผันกับความดันและสุดท้าย หัวฉีดแบบสองของไหล อุปกรณ์พ่นฝอยชนิดนี้ของเหลวและอากาศจะไหลผ่านหัวของหัวฉีด (nozzle) ซึ่งจะทำให้ของเหลวแตกเป็นละอองฝอยเนื่องจากการไหลผ่านของอากาศด้วยความเร็วสูงภายในหัวฉีดการปรับอัตราการใช้ของอากาศจะช่วยให้การกระจายเป็นละอองของของเหลววิธีนี้นิยมใช้กับของเหลวที่มีความหนืดสูงแต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีค่าดำเนินการที่สูงแต่ให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ

3. การสัมผัสระหว่างละอองหยดของเหลวกับอากาศร้อน ในขั้นตอนนี้อุณหภูมิของอาหารจะสัมผัสกับอากาศร้อนเพื่อให้น้ำในอาหารเหลวรับความร้อนจากอากาศร้อนทำให้เกิดการระเหยน้ำออกไปการกำหนดทิศทางของการเคลื่อนที่ของอากาศร้อนเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงมากถ้าทิศทางของอากาศเหมาะสมก็จะทำให้การถ่ายโอนความร้อนเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วทั้งนี้ก็ต้องขึ้นกับจุดประสงค์ของการอบแห้ง ลักษณะของอาหารที่ต้องการอบแห้งคุณภาพ และลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ การสัมผัสระหว่างอนุภาคอาหารกับอากาศร้อนแบ่งได้ 3 แบบ คือ การไหลไปในทิศทางเดียวกัน (co-current flow) อาหารเหลวจะถูกพ่นออกไปในทิศทางเดียวกันกับอากาศร้อนที่ไหลเข้าวิธีนี้เหมาะสำหรับสารละลายอาหารที่ไม่ทนต่อความร้อนเนื่องจากการระเหยของน้ำเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วในเวลาอันสั้นมากอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์จะต่ำกว่าอุณหภูมิของอากาศร้อนขาออกผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความหนาแน่นต่ำ การไหลสวนทางกัน (counter-current flow) อาหารเหลวที่ถูกพ่นและอากาศร้อนไหลในทิศทางตรงกันข้ามเริ่มจากอุณหภูมิของอาหารที่มีอุณหภูมิต่ำเมื่อได้รับความร้อนจะมีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆจนกระทั่งเท่ากับอุณหภูมิของอากาศ

ร้อน ลักษณะนี้จะมีการถ่ายโอนความร้อนอย่างมีประสิทธิภาพเหมาะสำหรับอาหารที่ทนต่อความร้อนสูงและต้องการความร้อนมาก และการไหลแบบผสมกัน (mixed-flow) สารละลายและอากาศร้อนจะไหลไปในทางเดียวกันและสวนทางกันพร้อมๆ กัน

4. การแยกผลิตภัณฑ์แห้งจากกระแสลมร้อน โดยนิยมใช้ไซโคลนทำให้ได้ผลิตภัณฑ์แห้งที่มีลักษณะแห้งออกมา (Patel et al., 2009; อนุสรฯ, 2552: 12)

3. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการอบแห้งแบบพ่นฝอย

ปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดประสิทธิภาพของการผลิต ผลิตภัณฑ์ผง ด้วยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย ได้แก่

1. ความหนืดของเหลวที่มีความหนืดสูง (อาจเกิดอุณหภูมิของของเหลวที่ลดลง) เมื่อนำไปอบแห้งแบบพ่นฝอยจะทำให้ได้ละอองที่มีขนาดใหญ่ขึ้นที่สภาวะการพ่นฝอยเดียวกัน และหากมีความหนืดสูงมากจะทำให้ของเหลวที่ฉีดออกมามีลักษณะคล้ายเส้นด้าย ทำให้ตัวอย่างไม่แห้งตามต้องการ ดังนั้นจึงไม่ควรใส่ของเหลวที่มีความหนืดสูงเกินไป

2. อัตราการไหลของของเหลวถ้าอัตราการไหลของของเหลวสูงขึ้นจะทำให้ได้ละอองที่หยาบขึ้น และตัวอย่างแห้งจะมีความชื้นสูง เพราะใช้เวลาที่สัมผัสกับลมร้อนน้อยเกินไป จึงควรควบคุมอัตราการไหลของของเหลวให้เหมาะสม

3. อัตราการไหลของอากาศหากอัตราการไหลของอากาศลดลงจะทำให้เวลาที่ละอองอยู่ในห้องอบนานขึ้น ซึ่งจะทำให้ละอองสัมผัสกับอากาศร้อนนานขึ้น และเป็นผลให้ลดความชื้นได้ดีขึ้น แต่หากอัตราการไหลของของเหลวสูงและอัตราการไหลของอากาศต่ำเกินไป เมื่ออุณหภูมิไม่สูงเพียงพอก็อาจทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความชื้นสูงและเกาะติดอยู่กับผนังของห้องอบได้

4. อุณหภูมิอากาศเข้าการเพิ่มอุณหภูมิของอากาศเข้าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการระเหยได้ แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นกับการไหลของอากาศด้วย

4. สารมอลโตเดกซ์ทริน

มอลโตเดกซ์ทริน (matodextrin) มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ประมาณ 900-9,000 ซึ่งมีสูตร คือ $(C_6H_{12}O_6)_nH_2O$ ประกอบด้วยหน่วยของ D-glucose หลายๆ หน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1 →6) และมีค่าสมมูลเดกซ์โทรส (dextrose equivalent; DE) ต่ำกว่า 20 มอลโตเดกซ์ทรินได้จากแป้งมันสำปะหลังโดยการไฮโดรไลซิส ด้วยกรดไฮโดรคลอริกและหรือโคเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส มอลโตเดกซ์ทรินมีลักษณะเป็นผงหรือเม็ด (granule) สีขาว มีความหวานเล็กน้อย หรือไม่หวานเลย ขึ้นอยู่กับค่า DE มีความชื้นประมาณร้อยละ 3-5 มีความหนาแน่นรวม (bulk density) อยู่ในช่วง

0.31-0.61กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร สามารถใช้มอลโตเดกซ์ตรินได้ในปริมาณที่เหมาะสมกับชนิดอาหาร และหน้าที่ของมอลโตเดกซ์ตรินในอาหารนั้นๆ มอลโตเดกซ์ตรินสามารถละลายได้ในน้ำที่อุณหภูมิห้อง สารละลายที่ได้อาจใสหรือขุ่นขึ้นอยู่กับชนิดของมอลโตเดกซ์ตรินที่นำมาใช้ สารละลายที่ได้มีคุณสมบัติด้านความเป็นเนื้อ (body) และมีความหนืดที่สม่ำเสมอ เนื้อสัมผัสเรียบเนียน มีความสามารถในการดูดความชื้นต่ำ (low hygroscopicity) โดยเฉพาะพวกที่มีค่า DE ต่ำๆ มีจุดเยือกแข็งคงที่ และสามารถควบคุมการเกิดสีน้ำตาลได้เป็นอย่างดี ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดสีน้ำตาลน้อยมาก นอกจากนั้นยังสามารถละลายได้ในของเหลวอื่นๆ เช่น ชุป นม น้ำผลไม้ เป็นต้น โดยอาจเติมในลักษณะผงโดยตรงหรือนำมาละลายในน้ำก่อน มอลโตเดกซ์ตรินสามารถนำมาใช้เพิ่มปริมาณของแข็งให้กับวัตถุดิบก่อนที่จะนำเข้าเครื่องทำแห้ง และยังช่วยลดความชื้นกลับในผลิตภัณฑ์ซึ่งมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบชั้นสูง เช่น น้ำผลไม้ผง และยังช่วยลดการจับตัวเป็นก้อน (caking) ของผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บ เป็นต้น มีการแนะนำให้ใช้มอลโตเดกซ์ตริน ที่มีค่า DE 9-12 เป็นตัวพาในการทำแห้งแบบพ่นฝอย

สารตัวพา (carrier) คือ ตัวพาที่ใช้ในกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย หมายถึงสารเคมีที่ทำหน้าที่เป็นวัตถุเจือปนในตัวอย่าง ทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งและกระจายสารเคมีบางอย่างในตัวอย่าง ซึ่งถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน หรือเป็นสารที่ระเหยง่าย เช่น สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของกลิ่น รส สี วิตามิน หรือสารอาหารอื่นๆ ในตัวอย่าง โดยสารตัวพาทำหน้าที่ดักจับและกักเก็บสารเหล่านั้นไว้แทน ทำให้ถูกทำลายด้วยความร้อนหรือระเหยได้น้อยลง และเมื่อนำตัวอย่างผงที่ได้ไปละลายโดยผสมน้ำ สีหรือกลิ่นของอาหารจะถูกปลดปล่อยออกมา ทำให้ สี กลิ่น รส ของตัวอย่างหลังการคั่ว มีลักษณะคล้ายวัตถุดิบสดก่อนนำมาทำแห้ง นอกจากนั้นตัวพายังทำหน้าที่เพิ่มปริมาณของแข็งให้กับตัวอย่างก่อนเข้าเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย เพื่อประหยัดเวลาในการทำแห้งในส่วน of ตัวอย่างของเหลวที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบสูง หากทำให้แห้งจนเป็นผงแล้วน้ำตาลเหล่านี้จะมีความเข้มข้นสูงขึ้นมากและดูดความชื้นกลับได้อย่างรวดเร็ว เหนียวติดภาชนะ หรือไม่สามารทำให้เป็นผงได้ เนื่องจากมีการเกาะติดบริเวณผนังห้องทำแห้งและดูดความชื้นกลับจนเหนียวแข็ง ดังนั้นหากมีตัวพาอยู่ด้วย ตัวพาจะไปทำหน้าที่เจือจางปริมาณน้ำตาลในผงให้มีความเข้มข้นลดลง (เขาวลิต, 2552. 16-18)

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการแปรรูปมันฝรั่งได้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการศึกษา และหาวิธีการที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำเสียดังกล่าว เช่น ในปี ค.ศ. 2009 Amal และคณะ ได้ทำการบำบัดน้ำเสียของโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบเพื่อลดปริมาณอินทรีย์สาร โดยใช้เชื้อราผสม (mixed culture of fungi) โดยสามารถลดค่า BOD ของน้ำเสียจากเดิม คือ 1,740 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เหลือ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า COD จาก 8,100 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 1,047 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า TSS จาก 1.94 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 0.82 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่า TOC จาก 930 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 622 มิลลิกรัมต่อลิตร

นอกจากความพยายามในบำบัดน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมันฝรั่งแล้ว ยังมีรายงานการนำของเหลือทิ้งจากขั้นตอนการแปรรูปมันฝรั่งไปใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน รวมไปถึงการเพิ่มมูลค่าให้กับของเหลือทิ้งที่เกิดขึ้นด้วย เช่น ในปี ค.ศ. 2007 Gelinass และ Barrette ได้ใช้แป้งมันฝรั่งที่ได้จากน้ำเสียที่เกิดจากขั้นตอนการผลิตมันฝรั่งทอด มาทำการเพิ่มปริมาณโปรตีนโดยการใช้ยีสต์ในการหมักแป้งดังกล่าว เพื่อนำไปใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับแป้งซึ่งเป็นของเหลือทิ้ง และนอกจากนี้ยังมีการนำน้ำที่ใช้แล้ว จากขั้นตอนการล้างแผ่นมันฝรั่งที่ผ่านการหั่น ซึ่งมีปริมาณแป้งแขวนลอยอยู่เป็นส่วนประกอบประมาณ 1% โดยน้ำหนัก และมีสารอินทรีย์ชนิดอื่นปะปนอยู่ด้วย เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางกลิ่น จึงได้มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยแป้งเพื่อให้เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่นที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังช่วยลดปริมาณแป้งในน้ำได้ด้วย ในปี ค.ศ. 1998 Jin และคณะ ได้ทำการพัฒนาระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตแป้ง ร่วมกับการผลิต fungal protein และเอนไซม์กลูโคสไมเลส ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากการใช้เชื้อ *Rhizopus oligosporus* มาทำการบำบัดน้ำเสียที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ พบว่าได้ปริมาณ fungal biomass ประมาณ 4.5-5.2 กรัมต่อน้ำเสียดังกล่าว 1 ลิตร ซึ่งผลผลิตที่ได้นี้มีความปลอดภัยในการบริโภคของคนและสัตว์ และในปี ค.ศ. Jin และคณะ ยังได้ทำการผลิต biomass protein และ fungal -amylase จากการใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae* เติบโตลงในระบบบำบัดน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการแปรรูปมันฝรั่ง ผลที่ได้คือ *Aspergillus oryzae* สามารถลดค่า COD ได้ถึง 95% ลดค่า BOD ได้ 93% และลดปริมาณของแข็งแขวนลอยได้ 98% นอกจากนี้ยังให้ผลผลิตเป็น biomass protein 6.1 กรัมต่อน้ำเสีย 1 ลิตร จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เชื้อจุลินทรีย์สามารถเติบโตและเพิ่มปริมาณ ในน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการแปรรูปแป้งมันฝรั่งได้ โดยการใช้แป้งเป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโต ซึ่งวิเคราะห์ได้จากปริมาณแป้งที่ลดลงหลังจากการเติมเชื้อจุลินทรีย์ลงไป และในปี พ.ศ. 2547 เพ็ญศิริ และหทัยชนก ได้ใช้แป้งที่เป็นของเหลือจากการผลิตมันฝรั่งแผ่นทอด

มาใช้ทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เปรียบเทียบกับ PDA สำเร็จรูป แล้วศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Penicillium sp.* โดยพบว่า *Penicillium sp.* สามารถเจริญและสร้างสีได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจาก แป้งมันฝรั่งที่มีการเติมน้ำลดลงไป 1%



อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์เครื่องมือ

1. ตู้อบลมร้อน (Binder, Germany)
2. เครื่องฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Hirayama รุ่น HVE-50, Japan)
3. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Gallenkamp, U.K.)
4. เครื่องเขย่าสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (Benchmark Scientific, U.S.A.)
5. ตู้ปลอดเชื้อ (Clyde Apac, Australia)
6. ตู้ดูดควัน (Pro Lab, U.S.A.)
7. เครื่องเขย่าสาร (Scientific Industries, U.S.A.)
8. อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (M lab, Thailand)
9. เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย mini spray dryer (Buchi รุ่น B-290, Japan)
10. เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย spray dryer (J.C. Machinery and civil work Co., Ltd. รุ่น SDE5, Germany)
11. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)
12. เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง (Genesys, U.S.A.)
13. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, Japan)
14. เครื่องวัดค่าพีเอช (Sartorius, Germany)
15. เครื่องให้ความร้อน hot plate (Scilution Co.,Ltd. Thailand)
16. ชุดวิเคราะห์โปรตีนด้วย Kjeldahl
 - เครื่องย่อย (Buchi รุ่น CH9230, Switzerland)
 - ชุดกำจัดไอน้ำกรด (Buchi รุ่น B414, Switzerland)
 - ชุดเครื่องกลั่น (FOSS รุ่น Kjeltac 2200, Denmark)
 - เตาเผา (Carbolite รุ่น CFW 1200, U.K.)
17. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ
 - จานเพาะเชื้อ (petri dish)
 - กระบอกตวง (cylinder)
 - ขวดปริมาตร (volumetric flask)
 - หลอดทดลอง (test tube)

- บีกเกอร์ (beaker)
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- บิวเรต (buret)
- โถดูดความชื้น (desiccator)
- ฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer)
- ปิเปต (pipette)
- ไมโครปิเปต (micropipette) พร้อมกับ ไมโครทิป (microtip)
- ผ้าขาวบาง
- สำลี
- ถุงมือยาง
- อลูมิเนียมฟอยล์

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปทางการค้า (ภาคผนวก ก)
 - อาหารแข็งสูตร PDA (ACI Labscan, Thailand)
 - อาหารเหลวสูตร PDB (ACI Labscan, Thailand)
 - อาหารแข็งสูตร YPDA
2. อาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (ภาคผนวก ก)
3. อาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (ภาคผนวก ก)
4. สารละลาย/ สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้ง
 - Dextrose
 - Agar
5. สารละลาย/ สารเคมี ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทิ้ง และผงน้ำทิ้ง (ภาคผนวก ข)
6. สารละลาย/ สารเคมี ที่ใช้ในการอบแห้งน้ำทิ้ง ด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย
 - Maltodextrin DE 10-13

เชื้อมาตรฐาน

1. ยีสต์: *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5020 ได้รับมาจาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
2. รา: *Aspergillus oryzae* และ *Rhizopus oligosporus* ได้รับมาจาก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โปรแกรมคอมพิวเตอร์

1. Statistix 7.0 software (Analytical Software, U.S.A.)
2. Statistica 8 software (StatSoft. Inc., U.S.A.)

น้ำทิ้งที่ใช้ในการศึกษา

น้ำทิ้งที่ใช้ในการศึกษา เป็นน้ำเสียที่ได้จากขั้นตอนการล้างแผ่นมันฝรั่ง ของโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ ตำบลบ้านกลาง อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน 51000

แนวทางในการดำเนินงานวิจัย

ในการทดลองเป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาและผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA จาก น้ำทิ้งที่มีลักษณะสะดวกต่อการใช้งานและการเก็บรักษา โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบส่วน ประสมกลาง (CCD) เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปริมาณปัจจัยที่ใช้ในการเตรียมอาหารดังกล่าว โดยมีขั้นตอนในการศึกษาวิจัย ดังแสดงในภาพ 15



ภาพที่ 15 ขั้นตอนในการศึกษาวิจัย

จากภาพขั้นตอนในการศึกษาวิจัย (ภาพที่ 15) สามารถอธิบายขั้นตอนในการวิจัยโดยละเอียด ดังนี้

1. การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทิ้ง

เก็บตัวอย่างน้ำ 2 ประเภทจากโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ ได้แก่ น้ำเสีย และน้ำทิ้ง โดยน้ำเสียที่เก็บ คือน้ำที่ผ่านการใช้ในกระบวนการแปรรูปมันฝรั่งทั้งหมดแล้วถูกนำมารวมกัน ซึ่งน้ำเสียนี้จะถูกแยกของแข็งหรือกากตะกอนรวมถึงแป้งออกแล้ว ส่วนตัวอย่างน้ำทิ้ง คือน้ำที่ผ่านขั้นตอนการใช้เพื่อล้างแผ่นมันฝรั่งดิบเท่านั้น โดยตัวอย่างน้ำทิ้งทั้งหมดจะถูกนำกลับมายังห้องปฏิบัติการภายในเวลา 2 ชั่วโมง เก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกระทั่งนำไปใช้ ตัวอย่างน้ำจะถูกนำไปวิเคราะห์สมบัติต่างๆ เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาความเป็นไปได้ในการนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ต่อไป ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ตามรายการต่างๆ (ภาคผนวก ข) ดังนี้ คือ วิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำล้างแผ่นมันฝรั่งดังรายการในข้อ 1- 5 และวิเคราะห์คุณสมบัติน้ำเสียดังรายการในข้อ 4-10

1. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยวิธี DNS Method (Miller, 1959)
2. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) โดยวิธี Phenol Sulfuric (Dubois, 1956)
3. ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total Kjeldahl Nitrogen) ด้วยวิธี Kjeldahl ใช้วิธีวิเคราะห์ตาม Association of Official Agricultural Chemists (A.O.A.C, 1990)
4. ค่า pH
5. ปริมาณ Biological Oxygen Demand (BOD) โดยวิธีวิเคราะห์ตาม APHA-AWWA and WEF (2005)
6. ปริมาณ Chemical Oxygen Demand (COD) โดยวิธีวิเคราะห์ตาม APHA-AWWA (2005)
7. ปริมาณแมกนีเซียม (magnesium) และปริมาณโพแทสเซียม (potassium) โดยใช้เครื่อง Flame ASS ใช้วิธีวิเคราะห์ตาม AWWA and WEF (2005)
8. ปริมาณฟอสฟอรัส (phosphorus) โดยวิธี Colorimetric Method ใช้วิธีวิเคราะห์ตาม APHA-AWWA and WEF (2005)
9. ปริมาณวิตามินซี วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 ใช้วิธีวิเคราะห์ตาม A.O.A.C (1996)
10. ปริมาณสารตกค้างยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต และกลุ่มคาร์บาเมต โดยใช้ชุด GT Pesticide Test Kit

2. ศึกษาความเหมาะสมและความเป็นไปได้ของน้ำทิ้ง ในการนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB

2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB

อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่ใช้ในการศึกษาแบ่งเป็น 2 ชุด ชุดแรก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ชุดควบคุม (control) ได้แก่ PDB สำเร็จรูปทางการค้า (commercial PDB) และ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (PDB prepared from potato) ซึ่งอาหารเหลวสูตร PDB ทั้งสองแบบนี้ เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อฟังไจกันโดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการ (วิธีเตรียมในภาคภาคผนวก ข) ชุดที่สอง คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ชุดทดลอง ได้แก่ PDB ที่เตรียมจากน้ำทิ้ง (PDB prepared from potato chip effluent) อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ทั้งสองชุดนี้จะถูกใช้ในการศึกษาความเหมาะสมและความเป็นไปได้ของน้ำทิ้งต่อการนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ต่อไป

ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB จากน้ำทิ้ง สามารถเตรียมได้โดยนำน้ำทิ้งมากรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 จากนั้นนำไปผสมกับน้ำตาลเดกซ์โทรสปริมาณ 20 กรัม ปรับ pH ให้ประมาณ 5.6 ± 0.2 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2. ศึกษาและเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ

2.2.1. เตรียมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยเทคนิค streak plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีของเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว (single colony) เช็กลงในอาหารเหลวสูตร PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที (revolutions per minute; rpm) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.2 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ชนิดต่างๆ โดยการตรวจนับโคโลนีที่มีชีวิตทั้งหมด ด้วยวิธี standard plate count เริ่มจากการปิเปตเชื้อยีสต์ที่ได้จากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร PDB ชุดควบคุม และ PDB ที่เตรียมจากน้ำทิ้ง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที วัดการเจริญเติบโตของเชื้อทุกๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง ด้วยการนำเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB ทั้งหมด มาทำ 10 folds-serial dilution ทำการเจือจางเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อที่ระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{-6} ใน 0.85% NaOH ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเลือกปิเปตเอา dilution 10^{-4} – 10^{-6} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาทำการ spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPGA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ใน

สูตรอาหาร PDB แต่ละชนิด บันทึกและเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว PDB ชนิดต่างๆ ด้วยการนับจำนวนโคโลนียีสต์ที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าอาหาร โดยนับเฉพาะในงานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีของเชื้ออยู่ระหว่าง 30 – 300 โคโลนี

2.3 ศึกษาและเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ รา *A. oryzae* และ *R. olidosporus* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ

2.3.1 เตรียมเชื้อรา *A. oryzae* และ *R. olidosporus* ในรูปของ spore suspension โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เชื้อราจะสร้างสปอร์ที่เป็นสีเขียวดำเต็มผิวหน้าอาหาร ทำการเก็บ spore suspension โดยใช้ 2% tween 20 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อชุบไปมาบนผิวหน้าอาหารเบาๆ เพื่อให้สปอร์หลุดออก แล้วจึงดูดสปอร์ที่ได้ไปกรองผ่านสำลีที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ในขวดใสที่ปราศจากเชื้อ

2.3.2 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ชนิดต่างๆ ด้วยการหยด spore suspension ที่มีความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร PDB ชุดควบคุม และ PDB ผรั่งที่เตรียมจากน้ำทิ้ง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นจึงทำการเก็บผลการทดลองด้วยการหาปริมาณน้ำหนักแห้ง (cell dry weight) ของเส้นใยรา (ภาคผนวก ค) บันทึกผลและเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB แต่ละชนิด โดยที่เชื้อรา *A. oryzae* จะเก็บผลทุกๆ วัน จนครบ 7 วัน ส่วนเชื้อรา *R. olidosporus* ที่มีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วจะถูกเก็บผลทุกๆ 12 ชั่วโมง จนถึง 84 ชั่วโมงโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

3. การแปรรูปน้ำทิ้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย

3.1 การเตรียมน้ำทิ้ง

เตรียมน้ำทิ้งก่อนการอบแห้งโดยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray drier) ด้วยการนำน้ำทิ้งมากรองผ่านสำลีสะอาดเพื่อแยกตะกอนปนเปื้อน จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ตาม APHA-AWWA and WEF ปี 1998 (ภาคผนวก ข) แล้วนำผลที่ได้ไปเพื่อกำหนดปริมาณของมอลโตเดกซ์ตริน (ค่าสมมูลย์เดกซ์โทรส 10-13) ที่จะผสมลงในน้ำทิ้งเพื่อช่วยในการอบแห้ง

3.2 การอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray drier)

ทำการอบแห้งน้ำทิ้งที่เตรียม ด้วยด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยสองขนาด คือ เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยขนาด lab scale และเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยขนาด pilot scale เพื่อเพิ่มอัตราการผลิตผงน้ำทิ้งให้สูงขึ้นในเวลาที่รวดเร็ว โดยใช้สภาวะการอบแห้งที่หาได้จากการใช้เครื่องขนาด lab scale (modified: Grabowski et al., 2006; Grabowski et al., 2008)

3.2.1 การอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยขนาด lab scale ด้วยเครื่อง Mini spray dryer (Buchi รุ่น B-290, Japan) ซึ่งเป็นหัวฉีดแบบหัวฉีดแบบสองของไหล (Two-fluid Nozzle Atomizer) ทิศทางการไหลของตัวอย่างกับอากาศร้อนเป็นแบบการไหลไปในทิศทางเดียวกัน (co-current flow)

3.2.2 การอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยขนาด pilot scale ด้วยเครื่อง Spray Dryer Model : SDE50 (J.C. Machinery and civil work Co., Ltd, Germany) ซึ่งเป็นหัวฉีดแบบแรงดัน (Pressure Nozzles Atomizer) ทิศทางการไหลของตัวอย่างกับอากาศร้อนเป็นแบบการไหลสวนทางกัน (counter-current flow)

จากนั้นนำผงน้ำทิ้งที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณ โปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl (A.O.A.C, 1990) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า และน้ำต้มมันฝรั่ง (potato infusion) หาค่าความชื้น (moisture content) ของผงน้ำทิ้งเปรียบเทียบกับผงแห้งของอาหาร PDA สำเร็จรูปทางการค้า โดยใช้วิธีวิเคราะห์ตาม AOAC ปี 1990 (ภาคผนวก ข)

4. ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากผงน้ำทิ้ง

การออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีทางสถิติ แบบ CCD ถูกนำมาใช้เพื่อการศึกษาหาอัตราส่วนหรือปริมาณที่เหมาะสมของปัจจัยในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ อันได้แก่ ปริมาณผงน้ำทิ้ง และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส ที่มีผลต่อค่าตอบสนองหรือตัวแปรตามซึ่งก็คือ อัตราการเจริญของเชื้อยีสต์ และรา ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว เพื่อนำค่าการตอบสนองที่ได้ไปใช้ทำนายอัตราการเจริญของเชื้อยีสต์และราเมื่อถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนที่เหมาะสมและให้ค่า Regression coefficient ที่สูง ($R^2 = 0.90$) โดยผลการตอบสนองที่ได้จะถูกแสดงด้วยกราฟ 3 มิติ ของพื้นผิวตอบสนอง(Response Surface Methodology ; RSM) ซึ่งมีรายละเอียดในการศึกษา ดังนี้

4.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากผงน้ำทิ้ง โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หรือ PDB จากผงน้ำทิ้ง โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD รูปแบบ pentagon เพื่อกำหนดปริมาณตัวแปรอิสระอื่นได้แก่ ผงน้ำทิ้ง (X_1) และน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรนี้ ในการศึกษาได้กำหนดค่ากลางของตัวแปรอิสระทั้ง 2 ดังกล่าวขึ้นมา และกำหนดค่าระดับอื่นๆ ของแต่ละตัวแปรให้มีค่าต่ำกว่าค่ากลาง 1 ระดับ และต่ำกว่าค่ากลาง 1 โดยให้มีความแตกต่างของค่าในแต่ละระดับที่เท่ากัน ในการกำหนดค่ากลางผงน้ำทิ้ง จะพิจารณาจากการเปรียบเทียบปริมาณร้อยละของโปรตีนที่มีอยู่ในผงน้ำทิ้ง กับอาหารสูตร PDA สำเร็จรูปทางการค้า ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl (A.O.A.C, 1990) ร้อยละของโปรตีนในอาหารสูตร PDA สำเร็จรูปทางการค้าที่วิเคราะห์ได้จะถูกใช้เป็นค่ากลาง เพื่อกำหนดปริมาณผงน้ำทิ้งที่จะใช้โดยคิดเป็น กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส ซึ่งปกติที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 1 ลิตร จะใช้ปริมาณ 20 กรัม ดังนั้นจึงกำหนดให้ค่ากลางของน้ำตาลเดกซ์โทรสอยู่ที่ 20 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 8 ที่แสดงค่าระดับต่ำสุด ค่าระดับกึ่งกลาง และค่าสูงสุดของตัวแปรอิสระที่ใช้ โดยกำหนดให้ (1) คือ ค่าระดับต่ำสุด (0) คือ ค่าของระดับกึ่งกลาง และ (1) คือ ค่าระดับสูงสุด ของตัวแปรอิสระทั้ง 2

ตารางที่ 8 ระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

Variables	1 (g/l)	0 (g/l)	-1 (g/l)
PWPW powder (X_1)	212	151.5	91
Dextrose (X_2)	30	20	10

CCD เป็นวิธีการออกแบบการทดลองทุกระดับของแต่ละตัวแปร และมีการทำซ้ำที่จุดกลาง เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดของตัวแปรอิสระที่เลือก โดยระดับของตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาตามแผนการทดลอง 2 ตัวแปรอิสระชนิดกำลังสองแบบหมุน รูปแบบ pentagon ดังแสดงในตารางที่ 9 ที่แสดงให้เห็นถึงรูปแบบของการวางแผนการทดลองแบบ CCD และการกำหนดระดับของตัวแปรอิสระที่ใช้ในการศึกษา ซึ่งมีแผนการทดลองทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง (run)

ตารางที่ 9 จุดหรือสิ่งทดลองสำหรับแผนการทดลอง 2 ตัวแปรอิสระ ชนิดกำลังสองแบบหมุน (rotatable design) แบบ pentagon

Run	X_1	X_2
1	1.0	0
2	0.309	0.951
3	-0.809	0.588
4	-0.809	-0.588
5	0.309	-0.951
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0

4.2 ศึกษาและหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD

ในการศึกษานี้ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแบ่งเป็น 2 ชุด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อชุดการทดลอง ประกอบด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง มีทั้งหมด 9 สูตรที่เตรียมตามแผนการทดลองแบบ CCD รูปแบบ pentagon และอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุมมี 3 สูตร อันได้แก่ (a) คือ อาหารเหลวสูตร PDB สำเร็จรูปทางการค้า, (b) คือ อาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ (c) คือ อาหารเหลวที่ประกอบด้วยน้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น

การศึกษาเริ่มจาก เลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ครบ 24 ชั่วโมง โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เปิดเชื้อที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดการทดลองและอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บผลทุกๆ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-48 ด้วยวิธี standard plate count เพื่อตรวจนับโคโลนียีสต์ที่มีชีวิตทั้งหมด และจำนวนเซลล์เป็น-เซลล์ตาย ด้วย hemacytometer นำผลที่ได้จากการนับจำนวนโคโลนีไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร กับค่าตอบสนองด้วยโปรแกรม Statistix 7.0 (Analytical Software, U.S.A.) จากนั้นวิเคราะห์สมการถดถอยเพื่อหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ซึ่งจะแสดง

ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรแต่ละตัวแปรที่ได้ด้วยกราฟ 3 มิติของพื้นผิวตอบสนอง จากโปรแกรม Statistica 8 (StatSoft. Inc., U.S.A.)

4.3 ศึกษาและหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB และเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาล โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD

ในการศึกษานี้ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแบ่งเป็น 2 ชุด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อชุดการทดลองและอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม เช่นเดียวกับการศึกษาในหัวข้อที่ 4.2 เพื่อใช้ศึกษาการเจริญของเชื้อราในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ที่เตรียมขึ้น และนอกจากนี้ยังได้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวให้ในรูปแบบของอาหารแข็งโดยการเติมผงวุ้นลงไป 1.5% (ภาคผนวก ก) เพื่อใช้ศึกษาเจริญของโคโลนี และการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ด้วย ซึ่งมีรายละเอียดและขั้นตอนในการศึกษาดังนี้

4.3.1 การเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว

เตรียม spore suspension ของเชื้อราให้มีความเข้มข้นอยู่ที่ 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ใช้สปอร์ที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดการทดลอง และอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นจึงทำการเก็บผลการทดลอง ด้วยการหาปริมาณน้ำหนักแห้ง (cell dry weight) ของเส้นใยรา บันทึกผลและเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB แต่ละชนิด โดยที่เชื้อรา *R. oligosporus* จะถูกเก็บผล ณ ชั่วโมงที่ 12 ชั่วโมง และชั่วโมงที่ 84 หลังการเพาะเลี้ยง ส่วนเชื้อรา *A. oryzae* จะเก็บผล ณ วันที่ 3 และวันที่ 7 หลังการเพาะเลี้ยง

4.3.2 การเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง

ใช้ชิ้นวุ้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ของเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ที่ถูกเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 5 วัน วางลงบนกึ่งกลางจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลองโดยตรวจสอบการเจริญของเชื้อราจากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *R. oligosporus* ทุกๆ 6 ชั่วโมง และเชื้อรา *A. oryzae* ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งโคโลนีเต็มจานเพาะเชื้อ โดยจะทำการเก็บสปอร์ และนับจำนวนสปอร์ของเชื้อทั้งสองด้วย hemacytometer สปอร์ของเชื้อ *R. oligosporus* จะถูกเก็บที่ 12 ชั่วโมง และที่ 84 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยง ส่วนเชื้อรา *A. oryzae* จะเก็บสปอร์ที่ 3 วัน และ 7 หลังการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้จากการนับสปอร์นี้ จะถูกไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Statistix7 และ Statistica 8 นำผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติไป

เปรียบเทียบกับ การตรวจสอบความหนาแน่นของเส้นใยบนผิวหน้าอาหารแข็งแต่ละชนิด และปริมาณน้ำหนักรวมที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลวในข้อ 4.3.1

4.4 ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์และราที่เลี้ยงด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อจากผงน้ำทิ้งที่ให้ค่าการตอบสนองที่เหมาะสม

จากแผนการทดลองแบบ CCD จำนวน 9 ชุดการทดลอง เมื่อนำข้อมูลที่ได้ในข้อ 4.2 และ 4.3 ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่จากผงน้ำทิ้งทั้ง 9 สูตร โดยวิเคราะห์การถดถอย แบบ linear regression analysis ด้วยโปรแกรม Statistix 7.0 ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ ทิศทางความสัมพันธ์ ลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร และสามารถพยากรณ์ค่าของอีกตัวแปรหนึ่ง จากการอาศัยค่าที่ทราบ จากตัวแปรหนึ่ง ว่ามีความแปรผันในสัดส่วนเท่าใดหรือในระดับใดได้ เมื่อใช้โปรแกรม Statistica 8 เพื่อสร้างกราฟ 3 มิติ และแสดงสมการกำลังสอง ที่มีลักษณะความสัมพันธ์แบบเส้น โค้ง (quadratic regression relationship) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา คือ ผงน้ำทิ้ง (X_1) และน้ำตาลเคซีสโตรส (X_2) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์และรา (Y) เพื่อหาค่าสูงสุดจากการทดลอง ด้วยสมการที่ได้ ดังนี้

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

เมื่อ β_0 = ค่าคงที่

β_n = ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย

X_n = ตัวแปรอิสระ

Y_n = ค่าตอบสนองที่เกิดจากการแปรค่าตัวแปร

นำสมการจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้ดังกล่าว ไปใช้ในการคาดคะเนหรือปรับสูตรอาหารให้เหมาะสม โดยคัดเลือกปริมาณของปัจจัยทั้งสองที่เหมาะสมต่อการผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA หรือ PDB ที่ให้อัตราการเจริญของเชื้อที่ถูกเลี้ยงได้สูงที่สุด ไปเลี้ยงเชื้ออีกครั้งด้วยสภาวะการเลี้ยงเดิม เพื่อตรวจสอบผลการทดลองที่ทำนายได้ (validation) จากสมการ และเพื่อยืนยันว่าสมการการประมาณค่าที่ได้ มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ได้มากหรือน้อยเพียงใด

ผลและการวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทิ้ง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งและน้ำเสีย ของโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ ตำบลบ้านกลาง อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน 51000 (ตารางที่ 10) พบว่าน้ำเสียจากกระบวนการแปรรูปมันฝรั่ง มีฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และโพแทสเซียม หลงเหลืออยู่ที่ 19.96, 7.43 และ 149.58 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบอัลฟาทอกซิน หรือยาฆ่าแมลงตกค้างในตัวอย่าง และเมื่อนำน้ำทิ้งมาทำการตรวจสอบคุณสมบัติ พบว่าประกอบไปด้วยโปรตีน 0.13% คาร์โบไฮเดรต ที่อยู่ในรูปของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 408 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลรีดิวซ์ 24 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้น้ำทิ้งในการเตรียมเป็นการอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ต่อไป เนื่องจากประกอบไปด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และอาจมีแร่ธาตุที่เชื้อจุลินทรีย์ต้องการสำหรับการเจริญเติบโตหลงเหลืออยู่ เมื่อพิจารณาในส่วนของค่าบีโอดี และซีโอดี พบว่า น้ำทิ้งมีค่าบีโอดี เท่ากับ 4,125 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับค่าบีโอดีของน้ำเสียจากกระบวนการทั้งหมดรวมกัน ซึ่งเป็นน้ำเสียที่ผ่านเป็นการแยกของแข็งหรือกากตะกอน รวมถึงแป้งออกแล้ว พบว่ามีค่าบีโอดีและซีโอดี อยู่ที่ 1,600 และ 3,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 10) จากการเปรียบเทียบค่าบีโอดีของน้ำเสียดังกล่าว กับน้ำล้างจากขั้นตอนล้างแผ่นฝรั่งจะพบว่า ค่าบีโอดีของน้ำล้างแผ่นมันฝรั่งมีค่าสูงกว่าถึง 84.48%

ขั้นตอนต่างๆ ของกระบวนการในการแปรรูปมันฝรั่ง เช่น การล้าง การปอกเปลือก การตัดแต่งหัวมันฝรั่ง และการล้างแผ่นมันฝรั่งดิบ ทำให้น้ำที่ผ่านกระบวนการเหล่านี้ของโรงงานมีค่าบีโอดี ที่สูงมากถึง 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทางโรงงานจึงจำเป็นต้องมีการแยกของแข็งกากตะกอนออกแล้วก่อน เพื่อลดค่าบีโอดีในระดับหนึ่งและเพื่อลดภาระของระบบบำบัด (Peters, 1972) ซึ่งในส่วนนี้ทำให้โรงงานมีค่าใช้จ่ายในการดูแลและจัดการ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าของเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปมันฝรั่งไม่มีสารประกอบที่เป็นพิษปนเปื้อน เหมาะแก่การนำกลับมาใช้ประโยชน์ หรือนำบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ (Peters, 1972) ในส่วนของน้ำที่ผ่านขั้นตอนการล้างแผ่นมันฝรั่งดิบซึ่งมีค่าบีโอดีที่สูง ทั้งนี้เป็นเพราะประกอบไปด้วย น้ำตาล และแป้งในปริมาณหนึ่ง โดยเฉพาะแป้งซึ่งเป็นสารแขวนลอยที่มีคุณสมบัติในการพองตัวเมื่อได้รับความร้อนและน้ำพร้อมกัน ได้ก่อให้เกิดอุปสรรคในการบำบัด และสร้างกลิ่นเหม็นตามมา ดังนั้นเมื่อพิจารณาคุณค่าสารอาหารที่หลงเหลืออยู่ในน้ำทิ้งดังกล่าวข้างต้น ร่วมกับการลดปัญหาค่าใช้จ่ายในการบำบัด จึงควรมีการนำน้ำล้างในส่วนนี้กลับมาใช้ประโยชน์ต่อไป

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติน้ำทิ้งและน้ำเสียของโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ

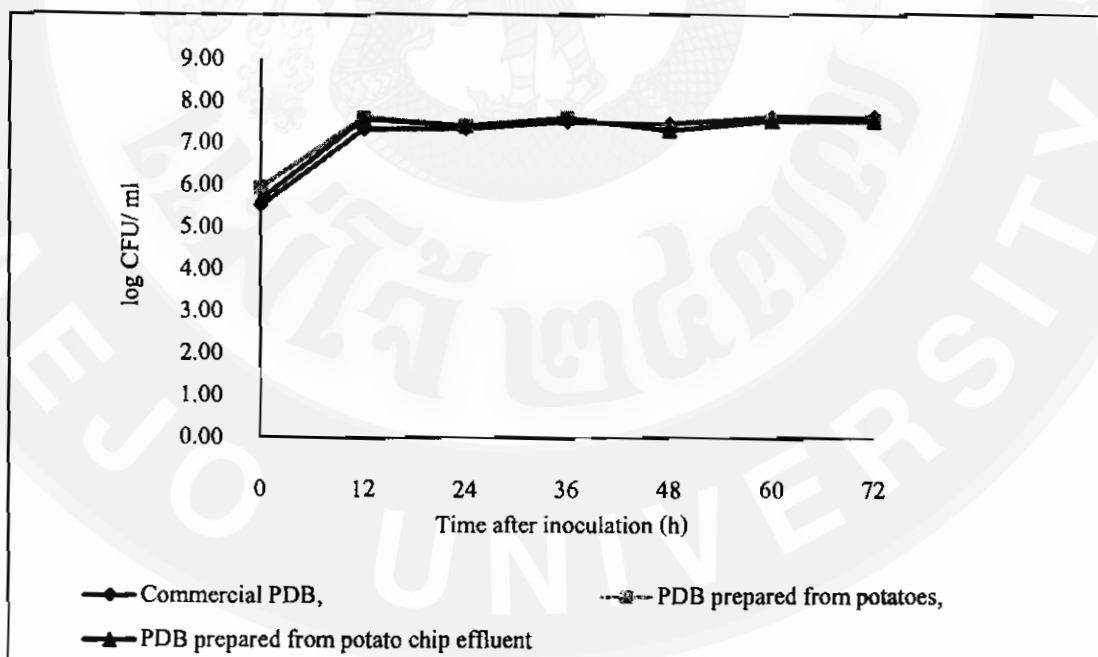
Test item	Test results
1. Reducing sugar	24 mg/l
2. Total sugar	408 mg/l
3. Protein	0.13%
4. pH	6-6.5
5. BOD	1,600 mg/l
6. COD	3,500 mg/l
7. Magnesium	7.43 mg/l
8. Potassium	149.58 mg/l
9. Phosphorus	19.96 mg/l
10. C:N ratio	6:1
11. Vitamin C	Not detected
12. Vitamin B1	Not detected
13. Vitamin B2	Not detected
14. Total aflatoxin	Not detected
15. pesticide residues	Not detected

หมายเหตุคุณสมบัติน้ำทิ้งทดสอบในรายการที่ 1-5 และคุณสมบัติน้ำเสียทดสอบในรายการที่ 4-15

ศึกษาความเหมาะสมและความเป็นไปได้ของน้ำทิ้ง ในการนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB หรือ PDA

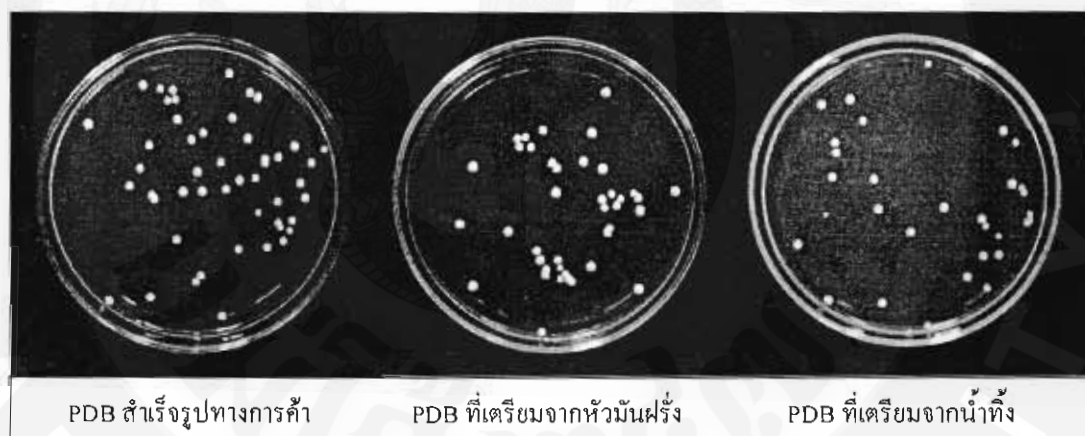
1. ผลการศึกษาและเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ

จากการศึกษาและเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อยีสต์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ชนิดต่างๆ ได้แก่ PDB ชุดควบคุม (PDB สำเร็จรูปทางการค้า (commercial PDB) และ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (PDB prepared from potatoes) และ PDB ที่เตรียมจากน้ำทิ้ง (PDB prepared from potato chip effluent) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มด้วยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อทุกๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี standard plate count บันทึกผลการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ชนิดต่างๆ โดยนับเฉพาะในจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีของเชื้ออยู่ระหว่าง 30 – 300 โคโลนี ผลที่ได้จึงแสดงในภาพที่ 16 และในตารางภาคผนวกที่ 12



ภาพที่ 16 การเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ

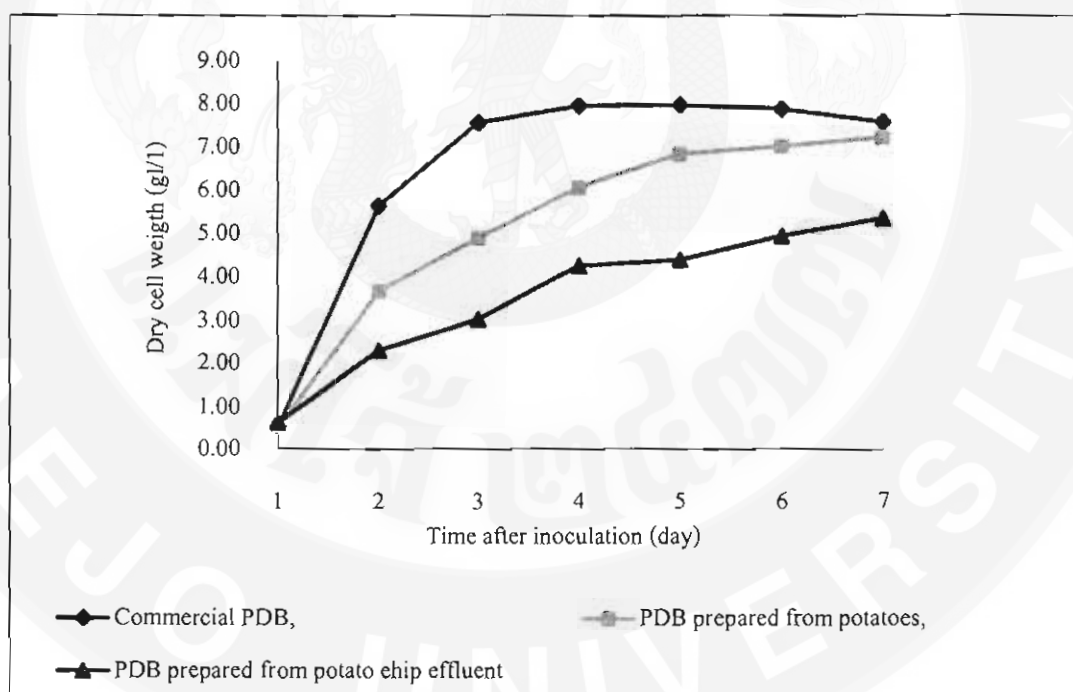
จากภาพที่ 16 แสดงให้เห็นว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำทิ้งได้ โดยมีอัตราการเจริญที่ไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB ชุดควบคุม ซึ่งพิจารณาจากจำนวนโคโลนีของยีสต์ที่เติบโตบนผิวหน้าอาหารแข็ง YPGA ที่มีปริมาณใกล้เคียงกัน (ตารางภาคผนวกที่ 12) ยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้ดี ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า, PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ PDB ที่เตรียมจากน้ำทิ้ง และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของเชื้อยีสต์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ชนิดต่างๆ โดยดูจากขนาดและลักษณะของโคโลนีที่เติบโตบนอาหารแข็ง YPAD พบว่ายีสต์ที่ถูกเลี้ยงโดยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำทิ้งมีขนาดของโคโลนีไม่แตกต่างจากยีสต์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ชุดควบคุม โดยโคโลนีที่เกิดขึ้นมีลักษณะที่เหมือนกัน คือ เป็นสีขาว ครึ้ม ผิวหน้าเรียบ แบน ชื่น ทึบแสง (ภาพที่ 17) ซึ่งเป็นลักษณะของโคโลนีเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (สุมาลี, 2541)



ภาพที่ 17 ลักษณะโคโลนีของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ

2. ศึกษาและเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา *A. oryzae* และ *R. olidosporus* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ

ผลการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบความเป็นไปได้ และความเหมาะสมของการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้ง โดยได้ใช้ spore suspension ของเชื้อรา สองชนิด คือ *A. oryzae* และ *R. olidosporus* เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB ชุดควบคุม (PDB สำเร็จรูปทางการค้า และ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง) และ PDB ฝรั่งที่เตรียมจากน้ำทิ้ง บ่มที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อรา ทั้งสองที่เลี้ยงในอาหาร PDB ชนิดต่างๆ ด้วยการหาปริมาณน้ำหนักแห้งของเส้นใยรา โดยที่เชื้อรา *A. oryzae* จะเก็บผลทุกๆ วัน จนครบ 7 วัน ส่วนเชื้อรา *R. olidosporus* จะถูกเก็บผลทุกๆ 12 ชั่วโมง จนถึง 84 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB แต่ละชนิด ผลที่ได้จากการศึกษา ดังแสดงในภาพที่ 18, 19 และ ตารางภาคผนวกที่ 13 และ 14

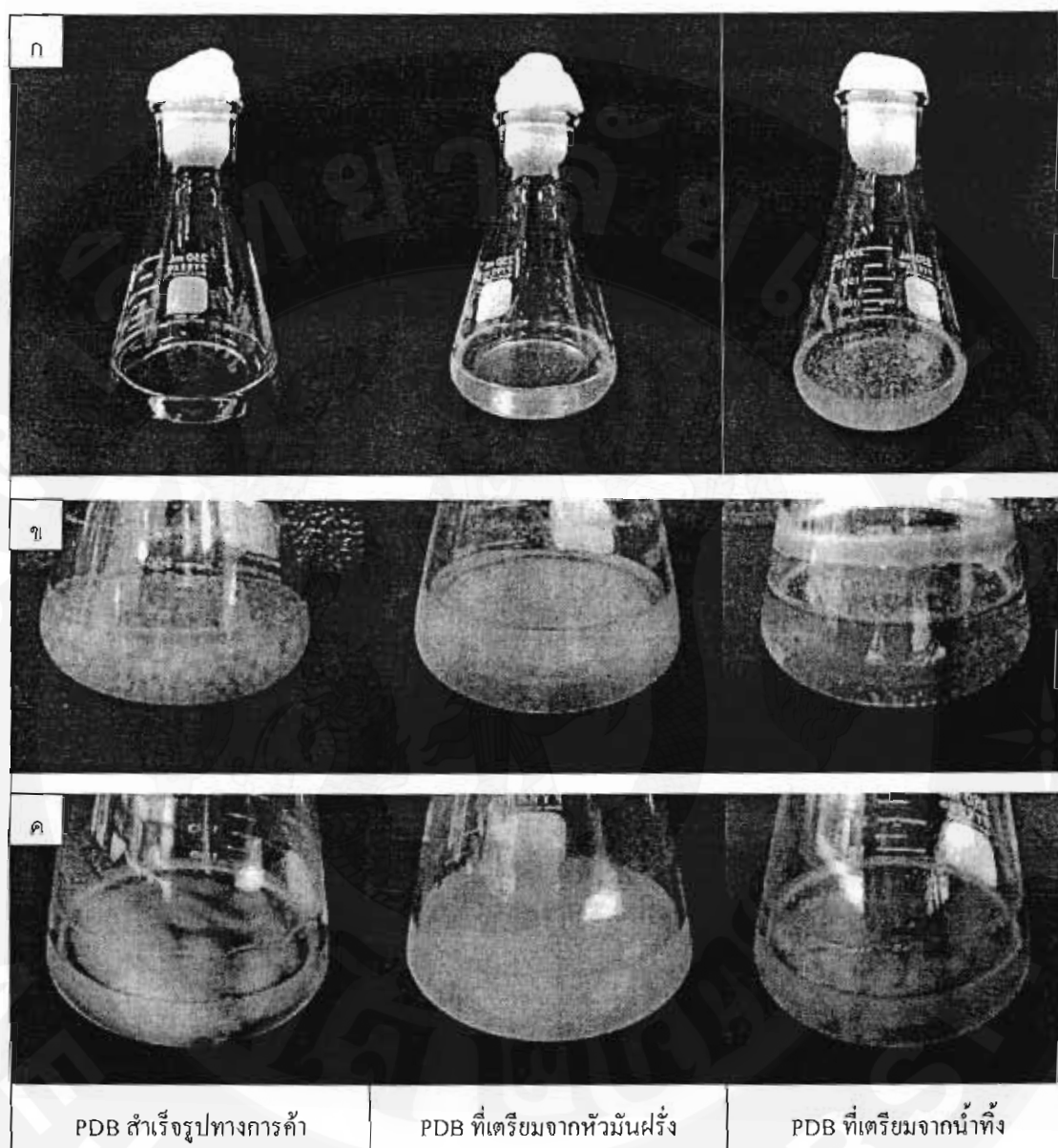


ภาพที่ 18 การเจริญของเชื้อรา *A. oryzae* ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ

จากภาพที่ 18 แสดงการเจริญของเชื้อรา *A. oryzae* ในอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อรา *A. oryzae* สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำทิ้งได้ แม้จะมีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB

ชุดควบคุม แต่ก็พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อ *A. oryzae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำหึ่งนั้นมีแนวโน้มของการเจริญที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ หลังการเพาะเลี้ยง (ตารางภาคผนวก 13) จากการวัดการเจริญของเชื้อราด้วยการหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยที่ถูกสร้างขึ้น พบว่าเชื้อ *A. oryzae* สามารถเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว PDB สำเร็จรูปทางการค้า รองลงมาเป็นอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากน้ำหึ่ง ผลของน้ำหนักแห้งที่วัดได้ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง คือ 7.58, 7.23 และ 5.37 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก 13) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของเชื้อรา *A. oryzae* ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ชนิดต่างๆ (ภาพที่ 20 ก) โดยดูจากลักษณะของเส้นใย พบว่า ลักษณะเส้นใยของเชื้อ *A. oryzae* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ จะเจริญอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ที่เรียกว่า mycelium pellet หลวมๆ เป็นเม็ดกลม ซึ่งพบว่า mycelium pellet ของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากน้ำหึ่ง และ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง มีขนาดใกล้เคียงกัน เมื่อเทียบกับอาหารเหลวสูตร PDB สำเร็จรูปทางการค้าที่มีขนาดของ mycelium pellet ที่ใหญ่กว่า นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *A. oryzae* ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากน้ำหึ่ง เริ่มมีการสร้างสปอร์บริเวณผิวหน้าอาหารตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงดังแสดงในภาพที่ 20 ข

ส่วนการเจริญของเชื้อรา *R. oligosporus* ในอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 84 ชั่วโมงพบว่า เชื้อรา *R. oligosporus* สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากน้ำหึ่งเช่นกัน แม้ว่าจะมีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ชุดควบคุม โดยพบว่าเชื้อรา *R. oligosporus* สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง รองลงมา คือ อาหารเหลวสูตร PDB สำเร็จรูปทางการค้า และอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากน้ำหึ่ง (ภาพที่ 19) ซึ่งผลของน้ำหนักแห้งที่วัดได้ในชั่วโมง 84 ของการเพาะเลี้ยง คือ 4.59, 2.64 และ 1.46 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 14) ซึ่งพบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *R. oligosporus* ที่เจริญในอาหารเหลวสูตร PDB แต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกัน โดยเส้นใยของเชื้อ *R. oligosporus* ที่เจริญในอาหาร PDB สำเร็จรูปทางการค้าจะก่อตัวกันแบบหลวมๆ เห็นเป็นรูปร่าง (form) มีลักษณะคล้ายสำลี ส่วนการเจริญของเส้นใยในอาหาร PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่งจะมีลักษณะอยู่แบบกระจาย (dispersed filaments) และในอาหาร PDB ที่เตรียมจากน้ำหึ่ง เส้นใยจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อนของ pellet ที่ติดกันแบบหลวมๆ ดังแสดงในภาพที่ 20 ค



ภาพที่ 20 (ก) อาหารเห็ดรา PDB ชนิดต่างๆ, (ข) ลักษณะ mycelium ของเชื้อ *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเห็ดรา PDB ชนิดต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน, (ค) ลักษณะ mycelium ของเชื้อ *R. oligosporus* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเห็ดรา PDB ชนิดต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ผลการแปรรูปน้ำทิ้งให้อยู่ในรูปผงแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย

เมื่อนำน้ำทิ้งมารองผ่านลำไส้สะอาดเพื่อแยกตะกอนปนเปื้อน แล้วนำไปหาปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ตาม APHA-AWWA and WEF (1998) พบว่าในน้ำทิ้งมีปริมาณของแข็งทั้งหมดเท่ากับ 410 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเติมผงมอลโตเดกซ์ตริน (ค่าสมมูลย์เดกซ์โทรส 10-13) ลงไปในน้ำทิ้งที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นการเพิ่มปริมาณของแข็งให้กับน้ำทิ้งก่อนเข้าเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย เพื่อช่วยให้ประหยัดเวลาในการทำแห้ง และช่วยรักษาค่าทางอาหารของน้ำทิ้งให้ถูกทำลายด้วยความร้อนหรือระเหยได้น้อยลง (Grabowski et al., 2006; Grabowski et al., 2008)

จากการอบแห้งน้ำทิ้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยสองขนาด คือ ขนาด lab scale และขนาด pilot scale โดยการศึกษาสภาวะการอบแห้งด้วยเครื่องขนาด lab scale ได้ใช้สภาวะในการอบแห้งที่ดัดแปลงมาจากการงานของ Grabowski และคณะในปี 2006 และปี 2008 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการอบแห้ง คือ อุณหภูมิลมร้อนขาเข้า (inlet temperature) อยู่ในช่วง 150-160 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้ได้อุณหภูมิลมร้อนขาออก (outlet temperature) ที่อยู่ในช่วง 80-85 องศาเซลเซียส (modified: Grabowski et al., 2006; Grabowski et al., 2008) โดยในสภาวะการอบแห้งนี้ได้อัตราการระเหยแห้งของน้ำทิ้งอยู่ที่ประมาณ 500 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งค่อนข้างใช้เวลานานในการผลิตผงตัวอย่าง เนื่องจากอัตราการระเหยแห้งของเครื่องก้ำจัดอยู่ที่ 1 ลิตรต่อชั่วโมง ประกอบกับการที่ตัวอย่างมีปริมาณของแข็งน้อย จึงทำให้อัตราการระเหยแห้งและกำลังการผลิตลดต่ำลงกว่าเดิม เมื่อนำสภาวะที่ได้ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้กับเครื่องขนาด pilot scale เพื่อช่วยเพิ่มอัตราการผลิตผงน้ำทิ้งให้สูงขึ้นในเวลาที่รวดเร็วกว่าเดิม พบว่าการควบคุมอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าให้อยู่ในช่วง 175-215 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้อุณหภูมิลมร้อนขาออกอยู่ในช่วง 75-90 องศาเซลเซียส เนื่องจากเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยขนาด lab scale มีขนาดห้องอบแห้ง หรือ chamber ที่ใหญ่ขึ้น จึงทำให้ต้องใช้อุณหภูมิลมร้อนขาเข้าในการอบแห้งที่สูงขึ้นเพื่อกระจายความร้อนให้ทั่วบริเวณ

เมื่อนำผงน้ำทิ้งที่ได้มาหาปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า และน้ำต้มมันฝรั่ง (potato infusion) หาค่าความชื้น (moisture content) ของผงน้ำทิ้งกับผงแห้งของอาหาร PDA สำเร็จรูปทางการค้า ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ปริมาณโปรตีนและค่าความชื้นของผงน้ำทิ้ง

Test item	Sample		
	PWPW powder	Commercial PDA powder	Potato infusion
% Protein	3.25	12.53	1.8
% moisture	4	13	-

จากตารางที่ 11 พบว่าผงน้ำทิ้ง ผงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า และในน้ำต้มมันฝรั่งมีปริมาณโปรตีนเป็นส่วนประกอบอยู่ที่ 3.25, 12.53 และ 1.8% ตามลำดับ ส่วนค่าความชื้นของผงน้ำทิ้งที่วัดได้ อยู่ที่ 4% ซึ่งจัดว่ามีค่าความชื้นที่ต่ำ ปฏิริยาเคมีต่างๆ ไม่สามารถเกิดได้ เช่น ออกซิเดชัน และปฏิริยาการเกิดสีน้ำตาล (mail lard rection) เป็นช่วงที่จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้

ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวแปรอิสระที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากผงน้ำทิ้ง

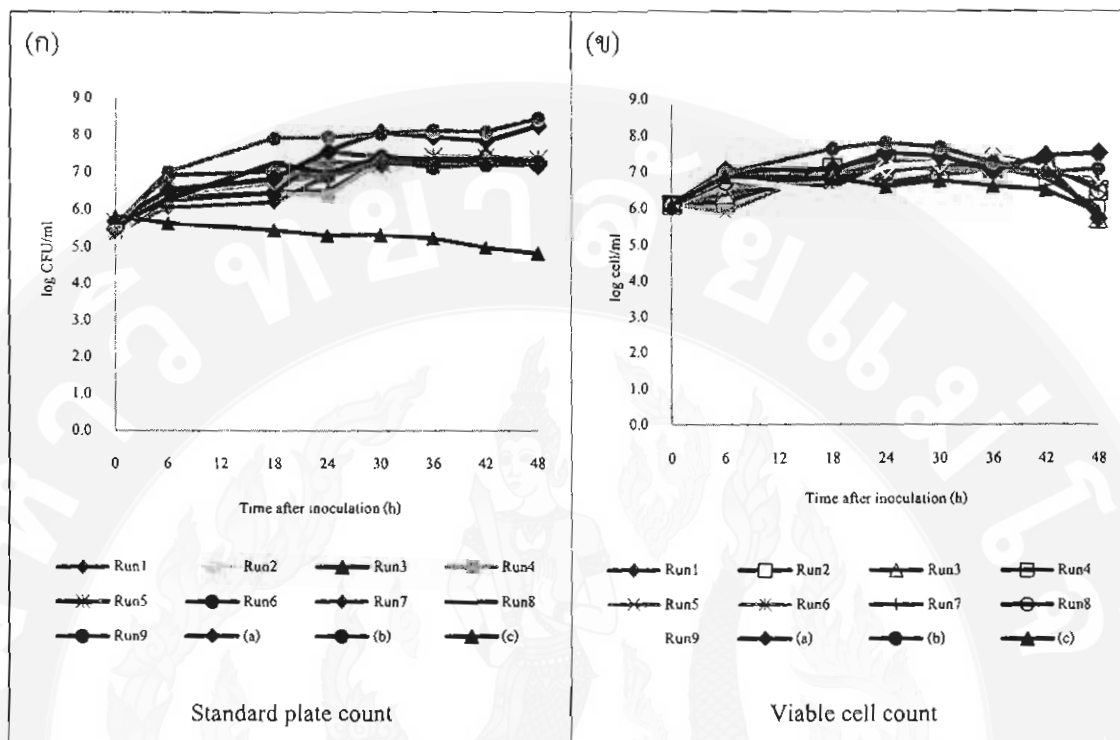
จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผงน้ำทิ้ง ผงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า และในน้ำต้มมันฝรั่ง พบว่าโปรตีนในแต่ละตัวอย่างมีปริมาณที่แตกต่างกัน จึงต้องมีการศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของส่วนประกอบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากผงน้ำทิ้ง โดยการใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ แบบ CCD ช่วยหาอัตราส่วนหรือปริมาณที่เหมาะสมของปัจจัยในการเตรียม โดยปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษานี้ประกอบไปด้วยตัวแปรอิสระ 2 ตัวแปร คือ ปริมาณผงน้ำทิ้ง และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส ส่วนตัวแปรตามหรือค่าการตอบสนองที่มีต่อตัวแปรทั้งสองนี้ คือ อัตราการเจริญของเชื้อยีสต์ และรา ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว ซึ่งได้กำหนดปริมาณต่ำสุดและสูงสุดของตัวแปรอิสระทั้ง 2 ที่จะศึกษาดังนี้ คือ ผงน้ำทิ้ง 91-212 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลเดกซ์โทรส 10-30 กรัมต่อลิตร ดังที่แสดงในตารางที่ 8

ในการกำหนดปริมาณผงน้ำทิ้งได้เปรียบเทียบจากปริมาณร้อยละของโปรตีนในตัวอย่างผงน้ำทิ้งกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า จากการพิจารณาผงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า พบว่ามีปริมาณโปรตีน 12.53% ส่วนผงน้ำทิ้ง มีปริมาณโปรตีน 3.25% ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 1 ลิตร ใช้ผงอาหาร PDA 39 กรัม คิดเป็นปริมาณโปรตีนเท่ากับ 4.9% ดังนั้นจึงได้กำหนดช่วงปริมาณโปรตีนในผงน้ำทิ้งที่ใช้ในการศึกษา คือ 2.9-6.9% ซึ่งครอบคลุมอยู่ในช่วงของโปรตีนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และเมื่อเทียบเป็นปริมาณผงน้ำทิ้งที่จะใช้จริง จึงได้

ค่าต่ำสุดของผงน้ำทิ้งที่จะใช้ คือ 90 กรัมต่อลิตร และค่าสูงสุด คือ 212 กรัมต่อลิตร ดังที่ได้กล่าวข้างต้น ผลการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หรือ PDB ด้วยวิธี CCD แผนการทดลอง 2 ตัวแปรอิสระ ชนิดกำลังสองแบบหมุน รูปแบบ pentagon ทำให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หรือ PDB ทั้งหมด 9 ชุด การทดลอง (run) หรือ 9 สูตร ที่มีระดับของตัวแปรอิสระแตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 12

1. ศึกษาและหาปริมาณของตัวแปรอิสระที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD

เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเหลวสูตร PDB ชุดการทดลอง ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง ทั้งหมด 9 สูตร (run1-run9) เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุม อันได้แก่ (a) อาหารเหลวสูตร PDB สำเร็จรูปทางการค้า, (b) อาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ (c) อาหารเหลวที่ประกอบด้วยน้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บันทึกผลการเจริญของเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-48 โดยการตรวจนับโคโลนีที่มีชีวิตด้วยวิธี standard plate count และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) ด้วย hemacytometer ผลที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 21



ภาพที่ 21 การเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากภาพที่ 21 แสดงให้เห็นการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชุดทดลองและชุดควบคุม พบว่ากราฟการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่งทั้งหมด 9 สูตร มีลักษณะการเจริญที่ไม่แตกต่างกันในแต่ละสูตร นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชุดทดลอง มีอัตราการเจริญที่ใกล้เคียงกันกับการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม อันได้แก่ อาหารเหลวสูตร PDB สำเร็จรูปทางการค้า และอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง แต่พบว่าการเจริญที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุมที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว ที่มีแนวโน้มการเจริญเติบโตลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (ตารางภาคผนวกที่ 15 และ 16) แสดงให้เห็นว่าผงน้ำตาลมันฝรั่งช่วยในการเจริญของยีสต์นอกเหนือจากน้ำตาลเดกซ์โทรสที่เติมลงไปและมีอยู่ในปริมาณที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต ทำให้เชื้อยีสต์สามารถเพิ่มจำนวนได้ โดยมีรูปแบบการเจริญในลักษณะเดียวกับการเจริญของยีสต์ทั่วไป ซึ่งมีระยะการเจริญเติบโตแบ่งแบบกว้างๆ ได้เป็น 4 ระยะ คือ lag phase, log phase, deceleration phase และ stationary phase (Asaduzzaman, 2007: 2; Held, 2010: 1)

ในการหาปริมาณของผงน้ำทิ้ง (X_1) และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) เพื่อผลิตอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้ออกแบบการทดลองแบบ CCD แผนการทดลอง 2 ตัวแปรอิสระชนิดกำลังสองแบบหมุน รูปแบบ pentagon ทำให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ทั้งหมด 9 สูตร ที่มีระดับของตัวแปรอิสระแตกต่างกัน ผลการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* จากการทดลองดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดลองด้วยแผนการทดลองแบบ CCD รูปแบบ pentagon ที่มีตัวแปรอิสระ 2 ตัวแปร

Run	Code levels		Actual levels		Standard plate count (log CFU/ml)
	X_1	X_2	X_1 (g/l)	X_2 (g/l)	
1	1	0	212.00	20.00	6.89
2	0.309	0.951	170.19	29.51	8.38
3	-0.809	0.588	102.56	25.88	6.48
4	-0.809	-0.588	102.56	14.12	6.36
5	0.309	-0.951	170.19	10.49	6.90
6	0	0	151.50	20.00	8.08
7	0	0	151.50	20.00	7.26
8	0	0	151.50	20.00	6.95
9	0	0	151.50	20.00	6.86

หมายเหตุ code levels X_1 , X_2 คือ รหัสแทนการใช้ค่าที่แปรผันของระดับตัวแปรอิสระ อันได้แก่ ผงน้ำทิ้ง (X_1), น้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) และ actual levels X_1 , X_2 คือ ปริมาณที่ใช้จริงของ ผงน้ำทิ้ง (X_1) และปริมาณที่ใช้จริงของน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) เพื่อเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA หรือ PDB

จากตารางที่ 12 ผลการทดลองที่ได้นำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้งทั้ง 9 สูตร โดยการวิเคราะห์ค่าสถิติและวิเคราะห์การถดถอย แบบ linear regression analysis ด้วยโปรแกรม Statistix 7.0 ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 3

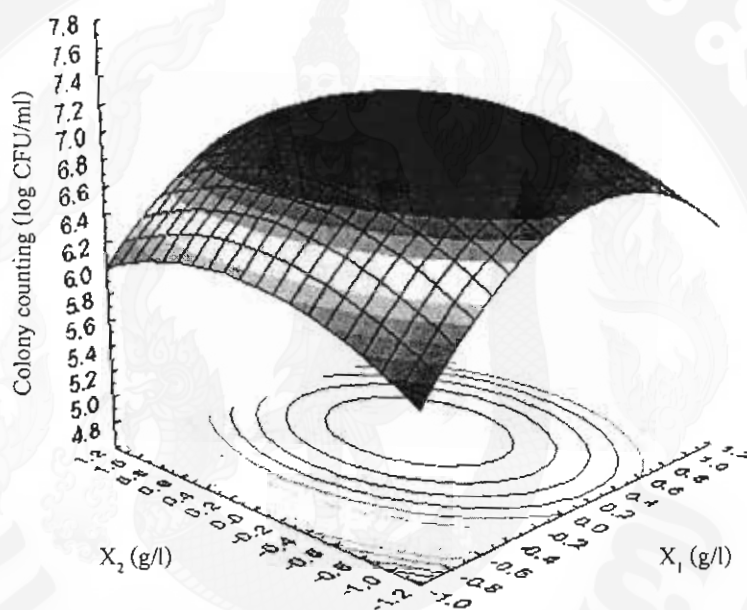
ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ค่า effect และค่า regression coefficients สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*

VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	VIF
CONSTANT	7.14750	0.15085	47.38	0.0000*	
X_2	0.08146	0.19080	0.43	0.6982	1.0
X_2^2	-0.24598	0.27829	-0.88	0.4418	1.0
X_1	0.32398	0.19082	1.70	0.1881	1.0
X_1^2	-0.58148	0.27821	-2.09	0.1278	1.0
$X_1 X_2$	-0.02542	0.38132	-0.07	0.9510	1.0
R-SQUARED	0.7277	RESID. MEAN SQUARE (MSE)		0.09102	
ADJUSTED R-SQUARED	0.2739	STANDARD DEVIATION		0.30170	
SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	5	0.72988	0.14598	1.60	0.3701
RESIDUAL	3	0.27307	0.09102		
TOTAL	8	1.00296			
CASES INCLUDED 9 MISSING CASES 0					

หมายเหตุ *แสดงค่านัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติหาความสัมพันธ์ของตัวแปรที่ศึกษา กับค่าการตอบสนองต่อเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* แสดงด้วยจำนวนโคโลนีที่มีชีวิตทั้งหมด ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่า regression coefficients (R^2) เท่ากับ 0.7277 โดยค่า R^2 แสดงถึงความสามารถของสมการในการอธิบายผลการทดลองได้ใกล้เคียงค่าจริงในค่าการตอบสนองต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ได้ 72.77% จากผลการวิเคราะห์การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ให้สังเกตจากตาราง ANOVA) พบว่าค่า P มากกว่า 0.05 นั่นคือ แบบหุ่นที่กำหนดไว้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติกับข้อมูลดังกล่าว นั่นคือ ปริมาณผงน้ำทิ้ง และปริมาณน้ำตาลเคกซ์โทรส ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*

เมื่อนำแบบจำลองคณิตศาสตร์ของการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* มาสร้างกราฟ 3 มิติ และแสดงสมการกำลังสอง โดยมีลักษณะความสัมพันธ์แบบเส้นโค้ง (quadratic regression relationship) ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา คือ ผงน้ำทิ้ง (X_1) และน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ (Y) ด้วยโปรแกรม Statistica รุ่น 8 เพื่อหาค่าสูงสุดของการทดลองด้วยสมการ และกราฟ ที่แสดงดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 ความสัมพันธ์ของระดับตัวแปรอิสระ ที่ได้แก่ ผงน้ำทิ้ง ($X_1 = 91-212$ g/l) และน้ำตาลเดกซ์โทรส ($X_2 = 10-30$ g/l) กับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *S. cerevisiae* (Y) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง ทั้งหมด 9 สูตร

จากภาพที่ 22 แสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระที่สนใจศึกษา และค่าการตอบสนอง (การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*) ในรูปสมการกำลังสอง ที่แสดงค่าที่สำคัญในแต่ละตัวแปรและระหว่างตัวแปร โดยค่าการตอบสนองการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (Y) ดังแสดงในสมการ (ซึ่งในเทอมของค่ารหัส กำหนดให้ X_1 แทน ผงน้ำทิ้ง และ X_2 แทน น้ำตาลเดกซ์โทรส)

$$Y = 7.1482 + 0.3233X_1 + 0.0792X_2 - 0.585X_1X_1 - 0.0234X_1X_2 - 0.244X_2X_2$$

เมื่อนำสมการที่ได้มาทำนายค่าการตอบสนอง โดยประมวลผลด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง จากแผนการทดลองแบบ CCD พบว่าสามารถหาจุดที่เหมาะสมของปริมาณปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อสูงที่สุดได้ โดยกราฟแสดงจุดตอบสนองสูงสุด (maximum point) จากกราฟในภาพที่ 22 สามารถหาจุดตอบสนองสูงสุดของปริมาณผงน้ำทิ้ง และน้ำตาลเดกซ์โทรส ที่ส่งผลให้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* มีการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อใช้ค่ารหัส (code value) อยู่ในระดับ ดังนี้

$$\begin{aligned}\text{ผงน้ำทิ้ง (X}_1\text{)} &= 0.3 \\ \text{น้ำตาลเดกซ์โทรส (X}_2\text{)} &= 0.2\end{aligned}$$

ซึ่งจะส่งผลให้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* มีค่าการเจริญอยู่ที่ 7.20 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เมื่อแทนรหัสของทั้งสองตัวแปรด้วยค่าจริง เพื่อใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ให้ค่า ดังนี้

$$\begin{aligned}\text{ผงน้ำทิ้ง} &= 170 \text{ กรัมต่อลิตร} \\ \text{น้ำตาลเดกซ์โทรส} &= 22 \text{ กรัมต่อลิตร}\end{aligned}$$

จากผลการทดลองเพื่อศึกษาและหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง โดยการใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD พบว่า แม้สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติจะให้ค่า R^2 เพียง 0.7277 นั่นคือ ผลของการเจริญเติบโตของเชื้อที่ได้ เป็นผลหรืออิทธิพลจากตัวแปรอิสระที่ศึกษา 72.78% ส่วนที่เหลืออีก 27.22 เป็นผลจากตัวแปรที่ไม่ทราบได้ และพบว่าการวางแผนการทดลองนี้มีค่า p-value มากกว่า 0.05 ($P > 0.05$) นั่นคือ แบบหุ้มนที่กำหนดไว้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติกับข้อมูลดังกล่าว แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าการตอบสนอง (จำนวนโคโลนีของยีสต์ *S. cerevisiae* = 7.20 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) ที่ทำนายได้จากการสมการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ กับจำนวนโคโลนีของยีสต์เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม อันได้แก่ อาหารเหลวสูตร PDB สำเร็จรูปทางการค้า (7.52 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) และอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (7.80 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง (ข้อมูลดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 16) พบว่าการเจริญของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารชุดควบคุมดังกล่าว มีค่าที่ใกล้เคียงกันกับค่าที่ได้จากการทำนายของสมการ

2. ศึกษาและหาปริมาณของตัวแปรอิสระที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB และเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ในอาหารชุดการทดลองและอาหารชุดควบคุม อันได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อชุดทดลองประกอบด้วย อาหารเหลวสูตร PDB และหรืออาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง ทั้งหมด 9 สูตร (run1-run9) (ตารางที่ 15) และอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม 3 สูตร ได้แก่ (a) คือ PDB และหรือ PDA สำเร็จรูปทางการค้า, (b) คือ PDB และหรือ PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง, (c) คือ อาหารเหลวและหรืออาหารแข็งที่ประกอบด้วยน้ำตาลเตกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น โดยได้ทำตรวจสอบการเจริญของเชื้อราทั้งสองจากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหารแข็งและนับจำนวนสปอร์ รวมทั้งหาปริมาณน้ำหนักแห้ง (cell dry weight) ของเส้นใยราที่เลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 14 และภาพที่ 23

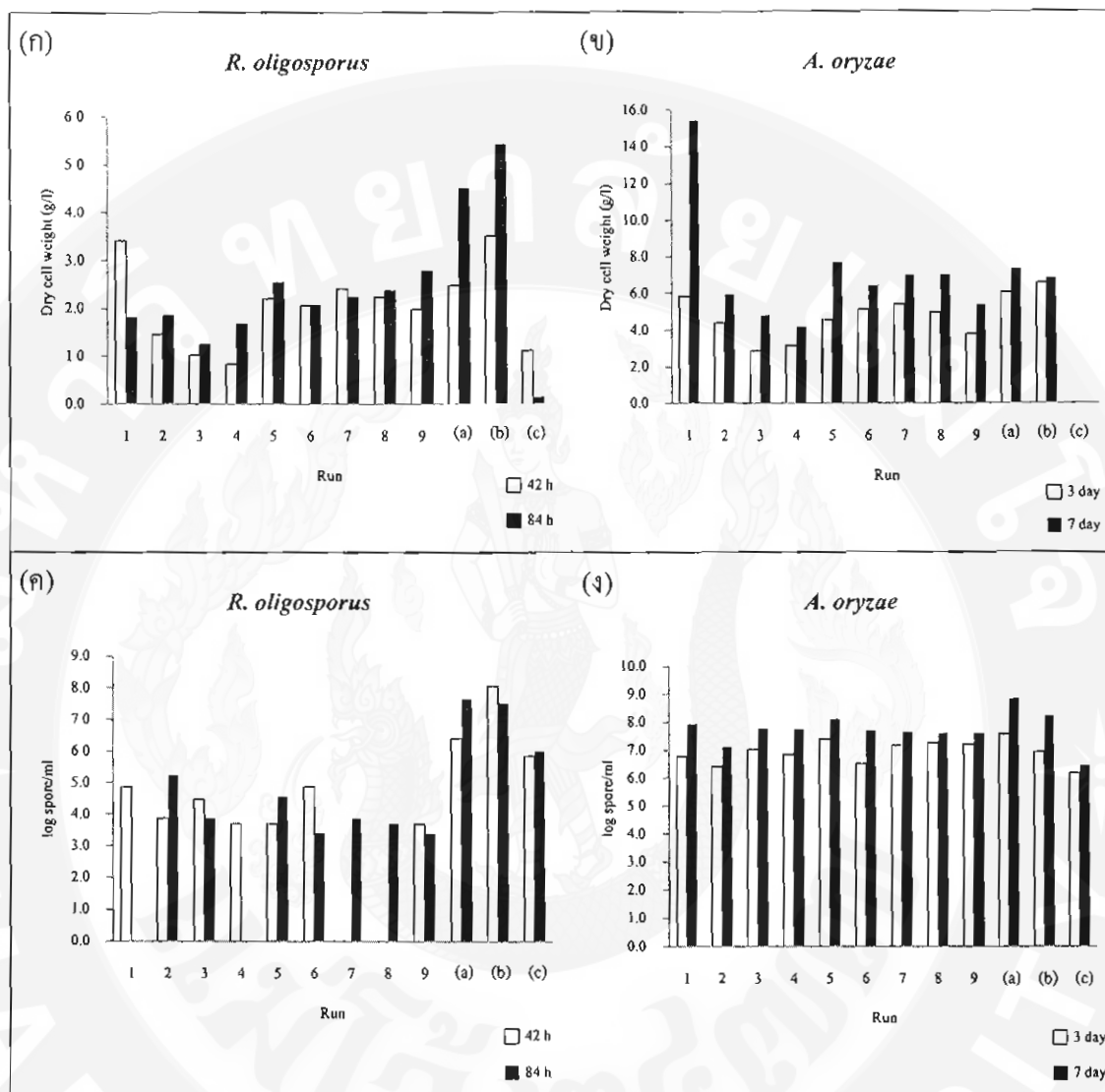
ตารางที่ 14 อัตราการเจริญของโคโลนีเชื้อราเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง และอาหารแข็งชุดควบคุม

Mold	Growth rate of colonies											
	ชุดการทดลอง									ชุดควบคุม		
	run1	run2	run3	run4	run5	run6	run7	run8	run9	(a)	(b)	(c)
<i>R. oligosporus</i> (cm/h)	0.42	0.43	0.42	0.38	0.40	0.38	0.37	0.40	0.39	0.28	0.30	0.14
<i>A. oryzae</i> (cm/day)	1.56	1.60	1.50	1.30	1.43	1.50	1.39	1.36	1.47	1.27	1.39	0.63

จากตารางที่ 14 แสดงผลการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *R. oligosporus* ทุกๆ 6 ชั่วโมง และเชื้อรา *A. oryzae* ทุก 24 ชั่วโมง จนกระทั่งโคโลนีของเชื้อเต็มจานเพาะเลี้ยง พบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดสามารถเจริญบนอาหารแข็ง PDA ชุดการทดลองทั้งหมด 9 สูตร ได้ดีกว่าอาหารแข็งชุดควบคุม (c) โดยเชื้อรา *R. oligosporus* มีอัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ระหว่าง 0.37-0.42 เซนติเมตรต่อชั่วโมง เปรียบเทียบกับอัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม (a) และ (b) ซึ่งมีอัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 0.28 และ 0.30 ตามลำดับ พบว่าการเลี้ยงเชื้อรา *R. oligosporus* บนอาหารชุดทดลอง และชุดควบคุมมีอัตราการเจริญของโคโลนีที่ใกล้เคียงกัน ส่วนอัตราการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *A. oryzae* บนอาหารชุดทดลองทั้ง 9 สูตร อยู่ระหว่าง 1.30-1.60 เซนติเมตรต่อวัน พบว่ามีอัตราการเจริญที่ใกล้เคียงกันเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุม (a) และ (b)

ซึ่งมีอัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 1.27 และ 1.39 ตามลำดับ (ตารางผนวก 17 และ 18) และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชุดทดลอง และชุดควบคุม พบว่าลักษณะความหนาแน่นของเส้นใยมีความแตกต่างกัน โดยพบว่าเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* มีปริมาณความหนาแน่นของเส้นใยที่เจริญบนอาหารชุดทดลองน้อยกว่า เมื่อเทียบกับการเจริญบนอาหารชุดควบคุม (a) และ (b) แต่มีปริมาณความหนาแน่นของเส้นใยที่มากกว่าเมื่อเทียบกับการเจริญบนอาหารชุดควบคุม (c)

เมื่อทำการหาปริมาณน้ำหนักแห้งของเส้นใยราของเชื้อ *R. oligosporus* และเชื้อ *A. oryzae* ด้วยการเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ชุดทดลอง และอาหารเหลวชุดควบคุม เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ ผลที่ได้คือ น้ำหนักแห้งของเชื้อราทั้งสองชนิดที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดทดลองแต่ละสูตร และชุดควบคุม มีปริมาณที่แตกต่างกันดังภาพที่ 23 เมื่อเทียบน้ำหนักแห้งของเส้นใยราทั้งสองชนิด ที่เลี้ยงในอาหารชุดทดลองกับอาหารชุดควบคุม พบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดสามารถเจริญในอาหารชุดทดลองทั้ง 9 สูตร แม้น้ำหนักแห้งของเชื้อรา ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดทดลองบางสูตรจะมีปริมาณที่ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (a) และ (b) แต่พบว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (c) (ตารางภาคผนวกที่ 19 และ 20) ส่วนปริมาณน้ำหนักแห้งที่ลดลงเมื่อเวลาการเพาะเลี้ยงผ่านไปถึง 84 ชั่วโมง เกิดจากการสลายของเส้นใยรา ซึ่งมีปัจจัยต่างที่เกี่ยวข้อง เช่น อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ประเภทของแหล่งคาร์บอน หรือไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Graham et al., 1976)



ภาพที่ 23 การเจริญของเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB และอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง และอาหารชุดควบคุม

หมายเหตุ ภาพที่ 23 (ก) คือ น้ำหนักแห้งของเชื้อ *R. oligosporus*, ภาพที่ 23 (ข) คือ น้ำหนักแห้งของเชื้อ *A. oryzae*, ภาพที่ 23 (ค) คือ จำนวนสปอร์ของเชื้อ *R. oligosporus* และภาพที่ 23 (ง) คือ จำนวนสปอร์ของเชื้อ *A. oryzae*

เมื่อทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *R. oligosporus* และเชื้อรา *A. oryzae* ด้วยเก็บสปอร์ของเชื้อราทั้งสองชนิดที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA ชุดทดลองทั้งหมด และอาหารแข็งชุดควบคุม เพื่อหาปริมาณของผงน้ำทิ้ง (X_1) และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) สำหรับผลิตอาหารสูตร PDB และหรือ PDA ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *R. oligosporus* และเชื้อรา *A. oryzae* โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD แผนการทดลอง 2 ตัวแปรอิสระ ชนิดกำลังสองแบบหมุน รูปแบบ pentagon ผลการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *R. oligosporus* ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง และเชื้อรา *A. oryzae* ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน บนอาหารแข็งชุดทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 จำนวนสปอร์ของเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* จากการทดลองด้วยแผนการทดลองแบบ CCD รูปแบบ pentagon ที่มีตัวแปรอิสระ 2 ตัวแปร

Run	Code levels		Actual levels		Spore count (log spore/ml)	
	X_1	X_2	X_1 (g/l)	X_2 (g/l)	<i>R. oligosporus</i>	<i>A. oryzae</i>
1	1	0	212.00	20.00	0.00	7.96
2	0.309	0.951	170.19	29.51	5.24	7.12
3	-0.809	0.588	102.56	25.88	3.88	7.78
4	-0.809	-0.588	102.56	14.12	0.00	7.78
5	0.309	-0.951	170.19	10.49	4.57	8.12
6	0	0	151.50	20.00	3.40	7.72
7	0	0	151.50	20.00	3.88	7.66
8	0	0	151.50	20.00	3.70	7.62
9	0	0	151.50	20.00	3.40	7.61

หมายเหตุ code levels X_1 , X_2 คือ รหัสแทนการใช้ค่าที่แปรผันของระดับตัวแปรอิสระ อันได้แก่ ผงน้ำทิ้ง (X_1), น้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) และ actual levels X_1 , X_2 คือ ปริมาณที่ใช้จริงของ ผงน้ำทิ้ง (X_1) และปริมาณที่ใช้จริงของน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) เพื่อเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA หรือ PDB

จากตารางที่ 15 ผลการทดลองที่ได้นำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา เมื่อถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้งทั้ง 9 สูตร โดยการวิเคราะห์ค่าสถิติและวิเคราะห์การถดถอย แบบ linear regression analysis ด้วยโปรแกรม Statistix 7.0 ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 16 และ 17

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ค่า effect และค่า regression coefficients สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. oligosporus*

VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	VIF
CONSTANT	3.59500	0.11843	30.36	0.0001	
X_2	1.16669	0.14979	7.79	0.0044	1.0
X_2^2	1.83672	0.21848	8.41	0.0035	1.0
X_1	-0.04144	0.14980	-0.28	0.8000	1.0
X_1^2	-3.55356	0.21841	-16.27	0.0005	1.0
$X_1 X_2$	-2.63443	0.29935	-8.80	0.0031	1.0
R-SQUARED	0.9939	RESID. MEAN SQUARE (MSE) 0.05610			
ADJUSTED R-SQUARED	0.9838	STANDARD DEVIATION 0.23685			
SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	5	27.5458	5.50916	98.20	0.0016
RESIDUAL	3	0.16830	0.05610		
TOTAL	8	27.7141			
CASES INCLUDED 9 MISSING CASES 0					

หมายเหตุ *แสดงค่านัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$)

จากตารางที่ 16 การวิเคราะห์ผลทางสถิติหาความสัมพันธ์ของตัวแปรที่ศึกษา กับค่าการตอบสนองต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. oligosporus* แสดงด้วยจำนวนสปอร์ที่เชื้อราสร้าง ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9939 โดยค่า R^2 แสดงถึงความสามารถของสมการในการอธิบายผลการทดลองได้ใกล้เคียงค่าจริงในค่าการตอบสนองต่อการเจริญของเชื้อรา *R. oligosporus* ได้ 99.39% จากผลการวิเคราะห์การวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่าค่า P น้อยกว่า 0.05 นั่นคือแบบหุ่นที่กำหนดไว้มีนัยสำคัญทางสถิติกับข้อมูลดังกล่าว หมายความว่าปริมาณผงน้ำทิ้ง และปริมาณ

น้ำตาลเดกซ์โทรส ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีความสัมพันธ์กับการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *R. oligosporus*

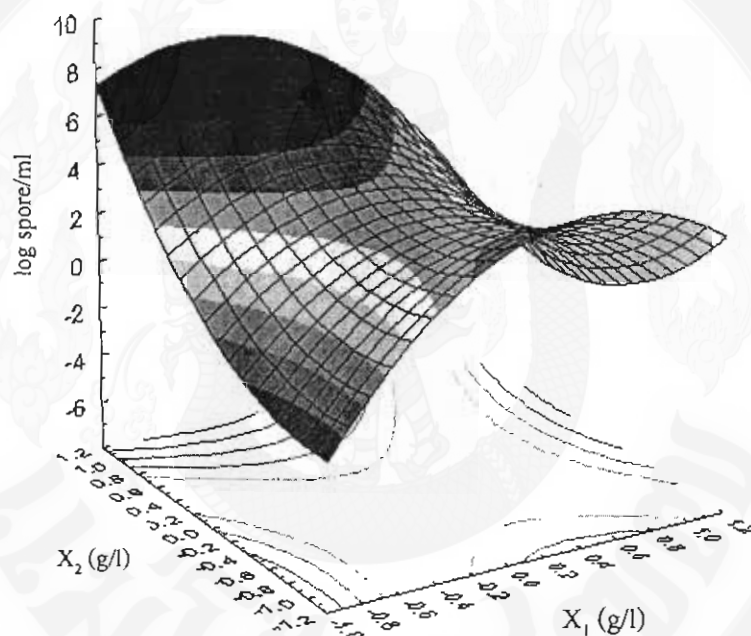
ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ค่า effect และค่า regression coefficients สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. oryzae*

VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	VIF
CONSTANT	7.65250	0.02496	306.61	0.0000	
X_2	-0.38047	0.03157	-12.05	0.0012	1.0
X_2^2	-0.07593	0.04604	-1.65	0.1977	1.0
X_1	0.03235	0.03157	1.02	0.30809	1.0
X_1^2	0.27515	0.04603	5.98	0.0094	1.0
$X_1 X_2$	-0.46999	0.06309	-7.45	0.0050	1.0
R-SQUARED	0.9877	RESID. MEAN SQUARE (MSE)		0.00249	
ADJUSTED R-SQUARED	0.9673	STANDARD DEVIATION		0.04992	
SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	5	0.60168	0.12034	48.30	0.0046
RESIDUAL	3	0.00747	0.00249		
TOTAL	8	0.60916			
CASES INCLUDED 9 MISSING CASES 0					

หมายเหตุ *แสดงค่าที่สำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติหาความสัมพันธ์ของตัวแปร กับค่าการตอบสนองต่อของเชื้อรา *A. oryzae* ที่มีต่อจำนวนสปอร์ที่เชื้อราสร้าง ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9877 (98.77%) จากผลการวิเคราะห์การวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่าค่า P น้อยกว่า 0.05 นั่นคือ แบบหุ้नที่กำหนดไว้มีนัยสำคัญทางสถิติกับข้อมูลดังกล่าว แปลว่าปริมาณผงน้ำทั้ง และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีความสัมพันธ์กับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae*

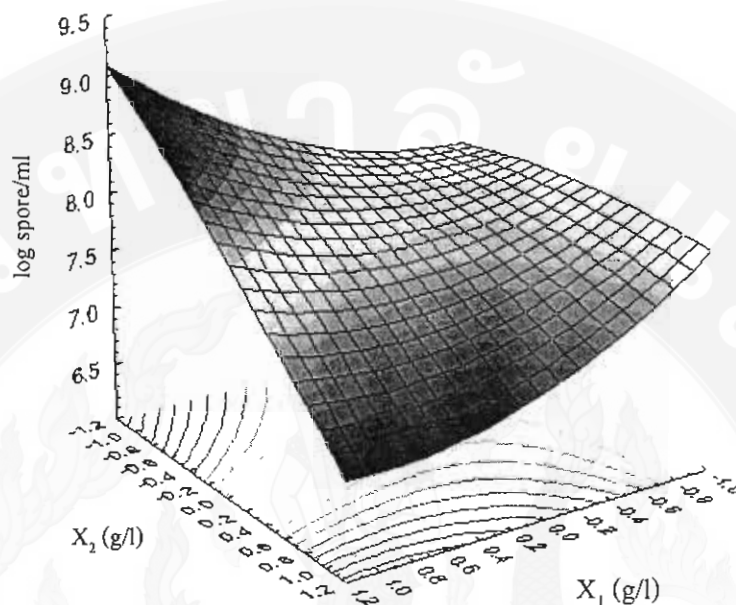
เมื่อนำแบบจำลองคณิตศาสตร์จากการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* มาสร้างกราฟ 3 มิติ และแสดงสมการกำลังสอง โดยมีลักษณะความสัมพันธ์แบบเส้นโค้ง (quadratic regression relationship) ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา คือ ผงน้ำทิ้ง (X_1) และ น้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) ต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อรา (Y) ด้วยโปรแกรม Statistica รุ่น 8 เพื่อหาค่าสูงสุดของการทดลองด้วยสมการและกราฟ ที่แสดงดังภาพที่ 24-25



ภาพที่ 24 ความสัมพันธ์ของระดับตัวแปรอิสระ ที่ได้แก่ ผงน้ำทิ้ง ($X_1 = 91-212$ g/l) และน้ำตาลเดกซ์โทรส ($X_2 = 10-30$ g/l) กับจำนวนสปอร์ของเชื้อ *R. oligosporus* (Y) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง ด้วยอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้งทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง

จากกราฟในภาพที่ 24 สมการที่ได้คือ

$$Y = 3.595 - 0.0426X_1 + 1.1668X_2 - 3.5524X_1X_1 - 2.636X_1X_2 + 1.8381X_2X_2$$



ภาพที่ 25 ความสัมพันธ์ของระดับตัวแปรอิสระ ที่ได้แก่ ผงน้ำทิ้ง ($X_1 = 91-212$ g/l) และน้ำตาลเดกซ์โทรส ($X_2 = 10-30$ g/l) กับจำนวนสปอร์ของเชื้อ *A. oyrzae* (Y) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง ด้วยอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้งทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง

จากกราฟในภาพที่ 24 สมการที่ได้คือ

$$Y = 7.6552 + 0.0322X_1 - 0.38X_2 + 0.268X_1X_2 - 0.4697X_1^2 - 0.0765X_2^2$$

เมื่อนำสมการที่ได้มาทำนายค่าการตอบสนอง โดยประมวลผลด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง จากแผนการทดลองแบบ CCD พบว่าสามารถหาจุดที่เหมาะสมของปริมาณปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อสูงที่สุดได้ โดยได้เลือกกราฟแสดงจุดตอบสนองสูงสุด (maximum point) จากกราฟในภาพที่ 24 ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับจำนวนสปอร์เชื้อรา *R. oligosporus* เนื่องจากมีค่า R^2 ที่สูงกว่า สมการที่ได้จากกราฟในภาพที่ 25 สามารถหาจุดตอบสนองสูงสุดของปริมาณผงน้ำทิ้ง และน้ำตาลเดกซ์โทรส ที่ส่งผลให้เชื้อรามีการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อใช้ค่ารหัส (code value) อยู่ในระดับ ดังนี้

$$\text{ผงน้ำทิ้ง (X}_1\text{)} = -0.5$$

$$\text{น้ำตาลเดกซ์โทรส (X}_2\text{)} = 1.2$$

ซึ่งจะส่งผลให้จำนวนสปอร์ของเชื้อรา มีค่าเท่ากับ 8.36 ล็อกสปอร์ยูต่อมิลลิลิตร เมื่อแทนรหัสของทั้งสองตัวแปรด้วยค่าจริง เพื่อใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้ค่า ดังนี้

$$\text{ผงน้ำทิ้ง} = 212 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

$$\text{น้ำตาลเดกซ์โทรส} = 32 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์และราที่เลี้ยงด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อจากผงน้ำทิ้งที่ให้ค่าการตอบสนองที่เหมาะสม

1. ผลการเลือกค่าที่ดีที่สุดของตัวแปรอิสระไปทดลองเพื่อยืนยันผลด้วยการศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้งที่ได้

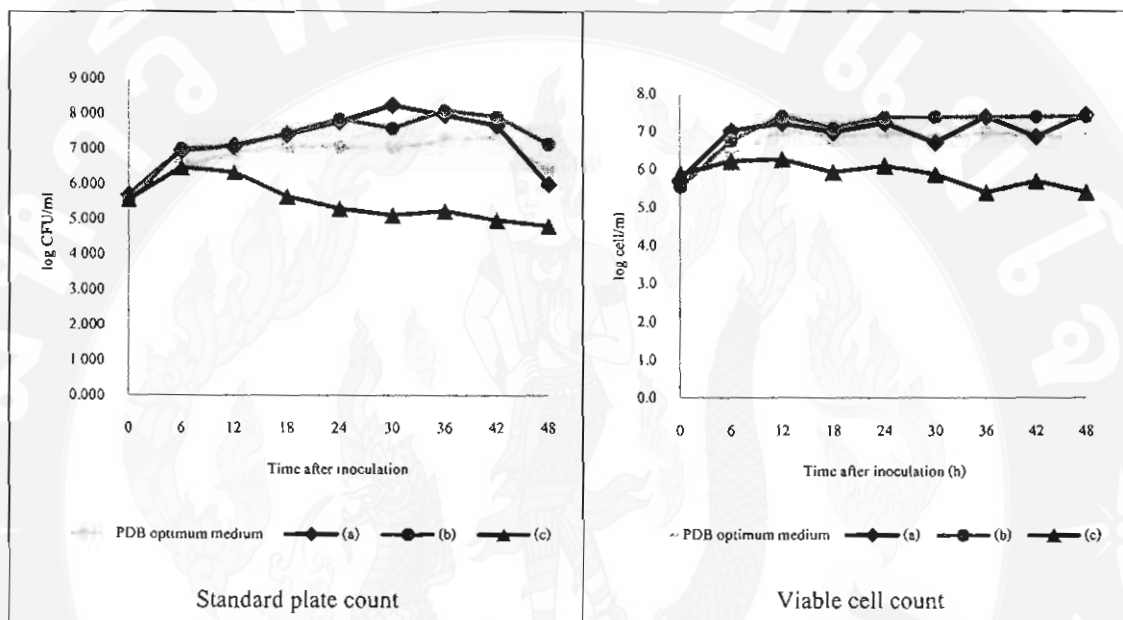
เมื่อทำการเลือกปริมาณของตัวแปรอิสระทั้งสองที่เหมาะสมต่อการผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่ให้อัตราการเจริญของเชื้อที่ถูกเลี้ยงได้สูงสุดได้แล้ว (จากการหาค่า การศึกษาและหาปริมาณของตัวแปรอิสระที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD) จึงได้เตรียมอาหารเหลว PDB สูตรที่มีความเหมาะสม (PDB optimum medium) ดังกล่าวที่ประกอบด้วยผงน้ำทิ้ง และน้ำตาลเดกซ์โทรส เท่ากับ 170 กรัมต่อลิตร และ 22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* อีกครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลอง แม้ว่าค่า R^2 ของสมการการประมาณค่าจะมีค่าต่ำ แต่เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญของเชื้อยีสต์ที่ใกล้เคียงกันเมื่อเลี้ยงในอาหารชุดทดลองกับชุดควบคุม ร่วมกับวัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้ ที่ต้องการเปรียบเทียบคุณภาพของอาหารที่ได้จากการใช้ผงน้ำทิ้งเป็นวัตถุดิบ กับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป จึงได้ทำการเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์มากที่สุด จากการทำนายที่ได้ มาทดลองเลี้ยงเชื้อยีสต์และเปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตด้วยอาหารชุดควบคุมอีกครั้ง ด้วยสถานะเดิมผลที่ได้แสดงในตารางที่ 18, ภาพที่ 26-27 และตารางภาคผนวกที่ 23-24

ตารางที่ 18 ผลการทดลอง (experimental) และค่าการทำนาย (predicted) ของจำนวนโคโลนีเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง สูตร optimum medium

ผงน้ำทิ้ง (g/l)	น้ำตาลเดกซ์โทรส (g/l)	Standard plate count (log CFU/ml)	
		Predicted	Experimental
170	22	7.200 (100%)	7.056 (96.63%)

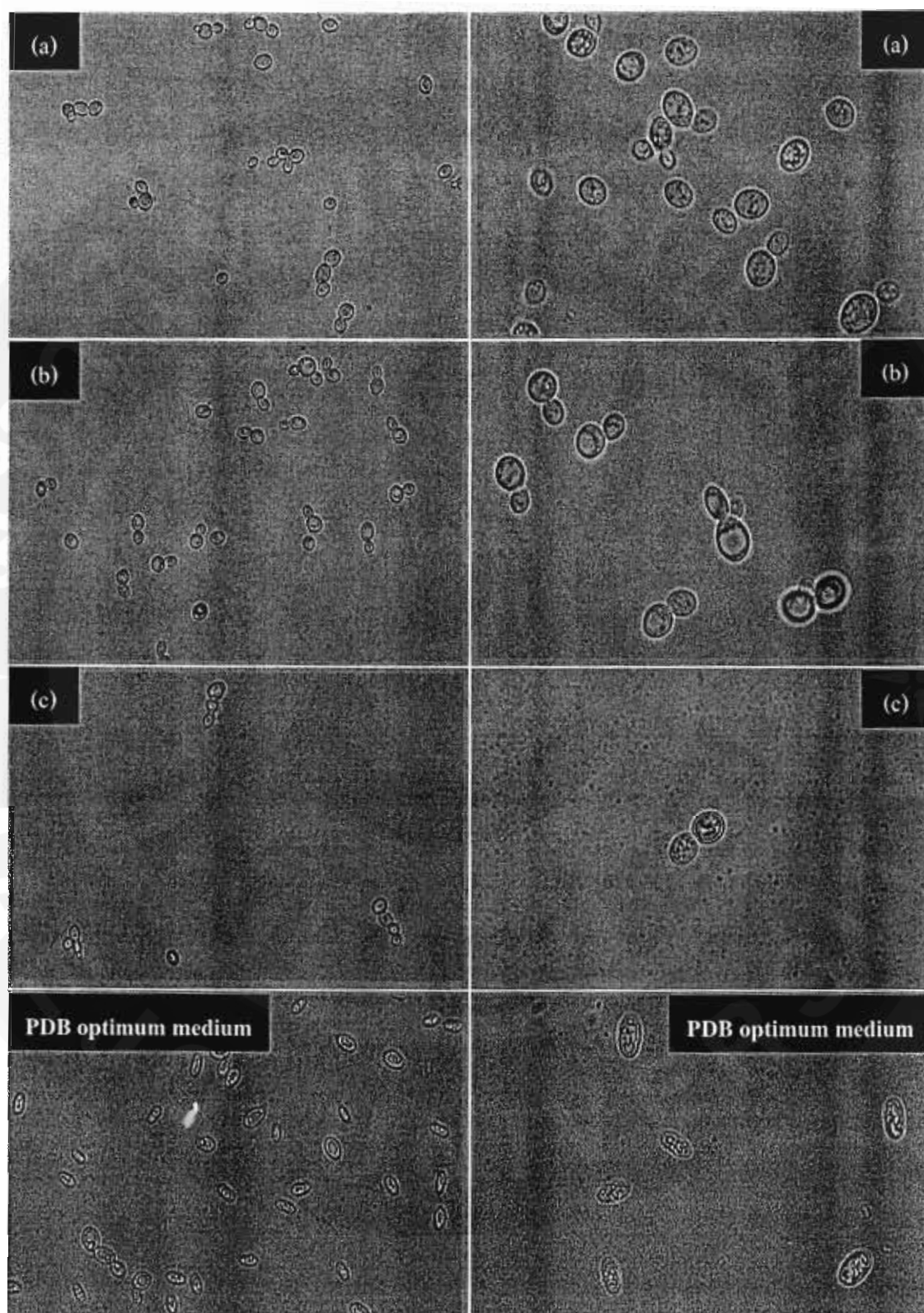
จากตารางที่ 18 เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง สูตร optimum medium พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหาร PDB optimum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีอัตราเจริญของเชื้ออยู่ที่ 7.056 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 96.63% ของผลที่ได้จากการทำนาย (ตารางที่ 18) สำหรับอัตราการเจริญที่ได้จากการทำนายของ

สมการมีค่า 7.2 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (100%) ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่ได้จากการทดลองเล็กน้อย โดยอัตราการเจริญสูงสุดของเชื้อ *S. cerevisiae* อยู่ที่ 7.302 log ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 42 ชั่วโมง (ตารางภาคผนวกที่ 23) เมื่อนำผลที่ได้จากการทดลองเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อดูลักษณะการเจริญเติบโต ดังแสดงในภาพที่ 26



ภาพที่ 26 การเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลือ PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลสูตร optimum medium และอาหารเหลือชุดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อตรวจสอบลักษณะพื้นฐานของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลือ PDB optimum medium และอาหารเหลือชุดควบคุม [(a), (b), (c)] ได้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุมจะมีรูปร่างเซลล์ค่อนข้างกลมบางเซลล์มีการแตกหน่อ (budding) ส่วนยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB optimum medium พบว่ามีการสร้างแอสโคสปอร์ที่มีรูปกลมหรือไข่ มีจำนวน 1 ถึง 4 ต่อแอสคัส ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ที่จะเกิดขึ้นเมื่อสภาวะในการเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสม (Bagyaraj and Arpana, 2006)



ภาพที่ 27 ลักษณะของเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลสูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม

2. ผลการเลือกค่าที่ดีที่สุดของตัวแปรอิสระไปทดลองเพื่อยืนยันผลด้วยการศึกษาการเจริญของเชื้อราเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และหรือ PDA ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้งที่ได้

เมื่อทำการเลือกปริมาณของตัวแปรอิสระทั้งสองที่เหมาะสมต่อการผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่ให้อัตราการเจริญของเชื้อที่ถูกเลี้ยงได้สูงสุดได้แล้ว (จากหัวข้อการศึกษาและหาปริมาณของตัวแปรอิสระที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB และเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง โดยใช้ออกแบบการทดลองแบบ CCD) จึงได้เตรียมอาหารเหลว PDB และอาหารแข็ง PDA สูตรที่มีความเหมาะสม ดังกล่าวที่ประกอบด้วยผงน้ำทิ้ง และน้ำตาลเดกซ์โทรส เท่ากับ 212 กรัมต่อลิตร และ 32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อราอีกครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้การประมาณค่าของสมการ โดยได้ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อราที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB และอาหารแข็ง PDA สูตร optimum medium ด้วยการนับจำนวนสปอร์ที่เชื้อราสร้างบนอาหารแข็ง หาน้ำแข็งของเชื้อราที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และตรวจสอบลักษณะพื้นฐานของราได้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมผลที่ได้แสดงในตารางที่ 28-33 ภาพที่ 26-27 และตารางภาคผนวกที่ 25-27

ตารางที่ 19 ผลการทดลอง (experimental) และค่าการทำนาย (predicted) ของจำนวนสปอร์ของเชื้อราที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง สูตร optimum medium

ผงน้ำทิ้ง (g/l)	น้ำตาลเดกซ์โทรส (g/l)	Spore count (log spore/ml)	
		Predicted	Experimental
121	32	8.36 (100%)	6.18 (73.92%)

หมายเหตุ ข้อมูลวิจัยดังตารางภาคผนวก 25

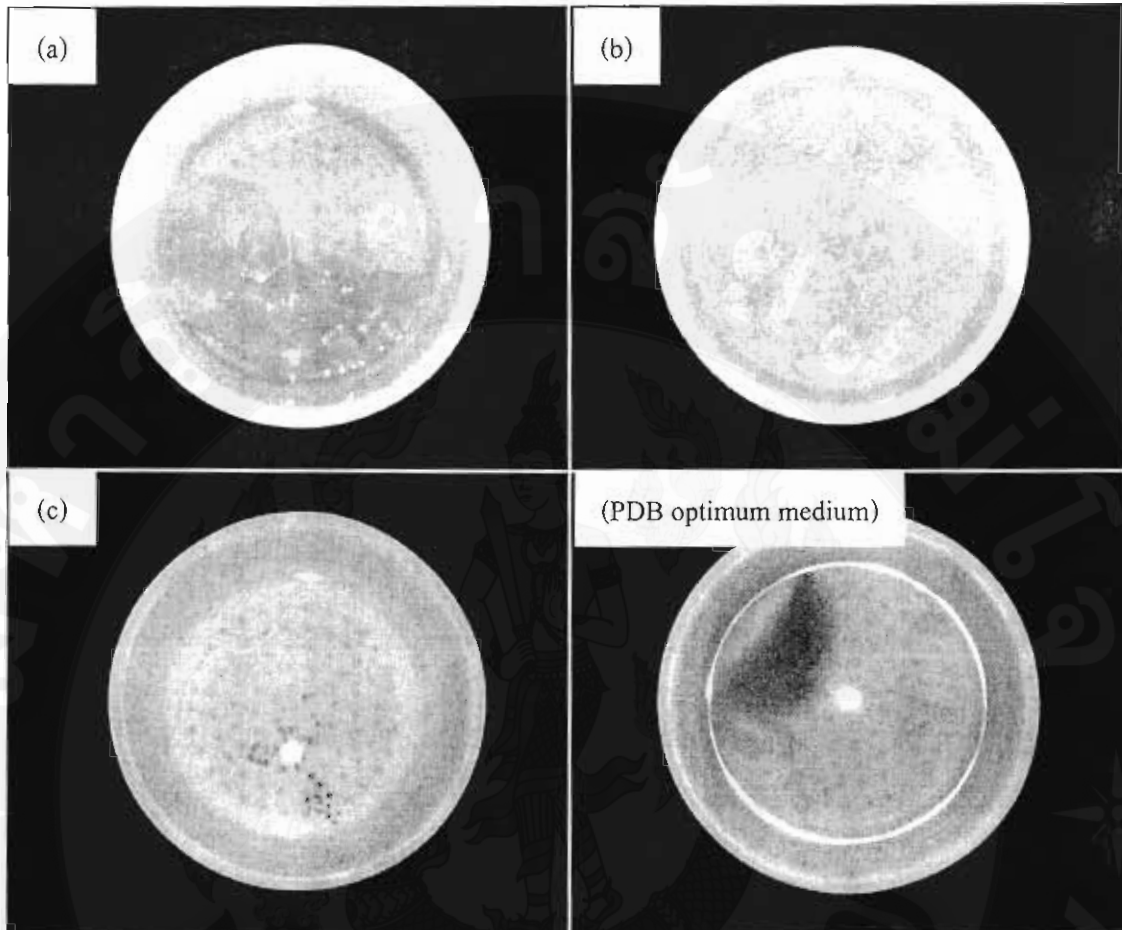
จากตารางที่ 19 เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อรา *R. oligosporus* ในบนอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง สูตร optimum medium พบว่า เชื้อรา *R. oligosporus* ที่ถูกเลี้ยงบนอาหาร PDA optimum medium เป็นเวลา 84 ชั่วโมง มีจำนวนสปอร์ที่เชื้อสร้างขึ้นเท่ากับ 6.18 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 73.92% ของผลที่ได้จากการทำนาย (ตารางที่ 19) สำหรับอัตราการเจริญที่ได้จากการทำนายของสมการมีค่า 8.36 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร (100%) ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่ได้จากการทดลอง นอกจากนี้เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อรา *A. oryzae* ด้วยอาหาร PDA optimum medium ก็พบว่า เชื้อรา

A. oryzae สามารถสร้างสปอร์ได้เท่ากับ 7.33 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (ตารางภาคผนวกที่ 25) เมื่อทำการเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของเชื้อราทั้งสองชนิด ด้วยการเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำหึ่ง สูตร optimum medium ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 20 และภาพที่ 28

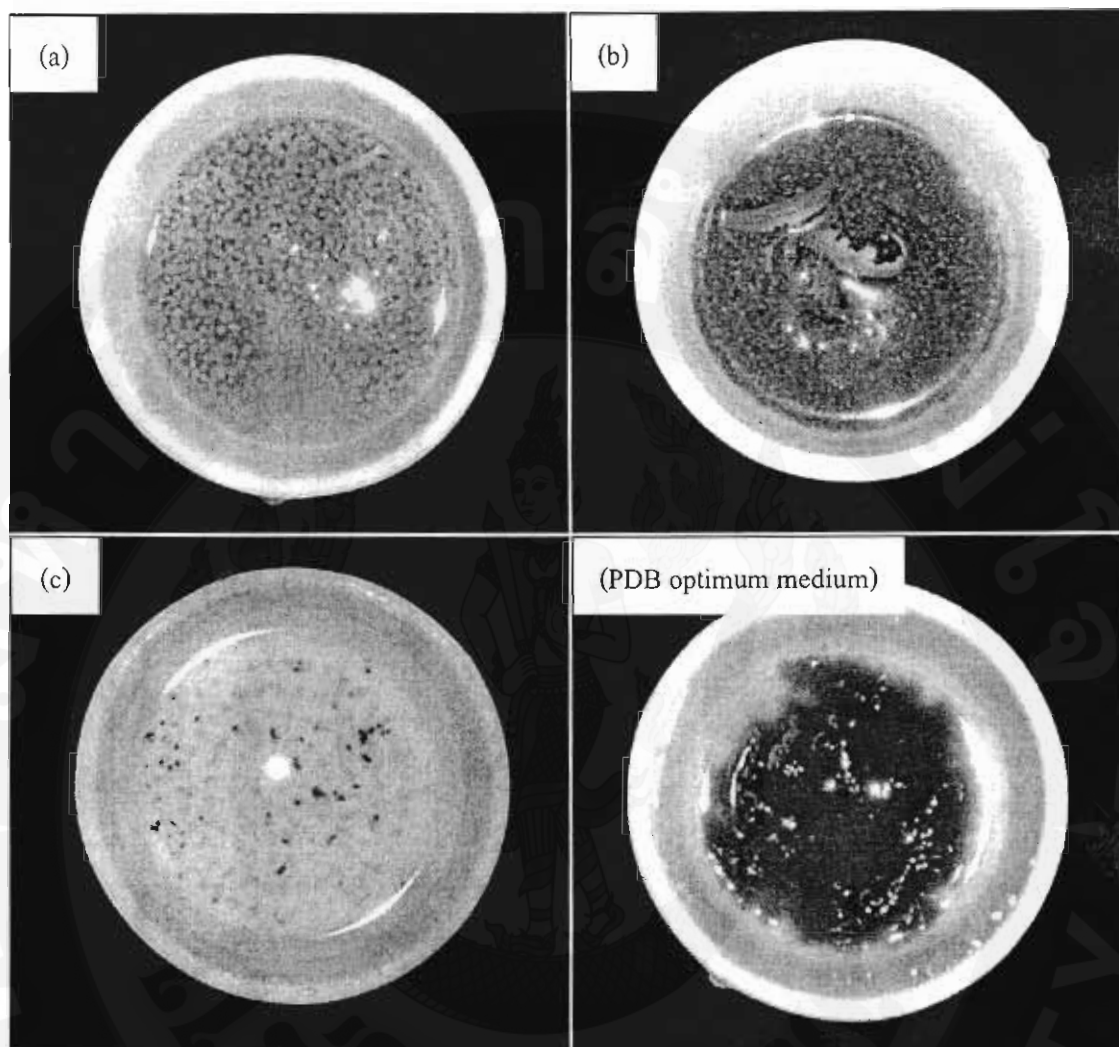
ตารางที่ 20 น้ำหนักแห้งของเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำหึ่ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม

Medium	Cell dry weight (g/l)			
	<i>R. oligosporus</i>		<i>A. oryzae</i>	
	42 h	84 h	3 day	7 day
(a) PDB สำเร็จรูปทางการค้า	2.22	2.58	7.09	7.57
(b) PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง	3.43	4.47	7.65	8.59
(c) น้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น	0.20	0.21	0.08	0.13
PDB optimum medium	0.79	1.19	5.27	6.99

หมายเหตุ (a), (b), และ (c) คือ อาหารเหลวชุดควบคุม



ภาพที่ 28 ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *R. oligosporus* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำ
 ห้าง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม
 หมายถึง (a), (b), และ (c) คือ อาหารเหลวชุดควบคุม

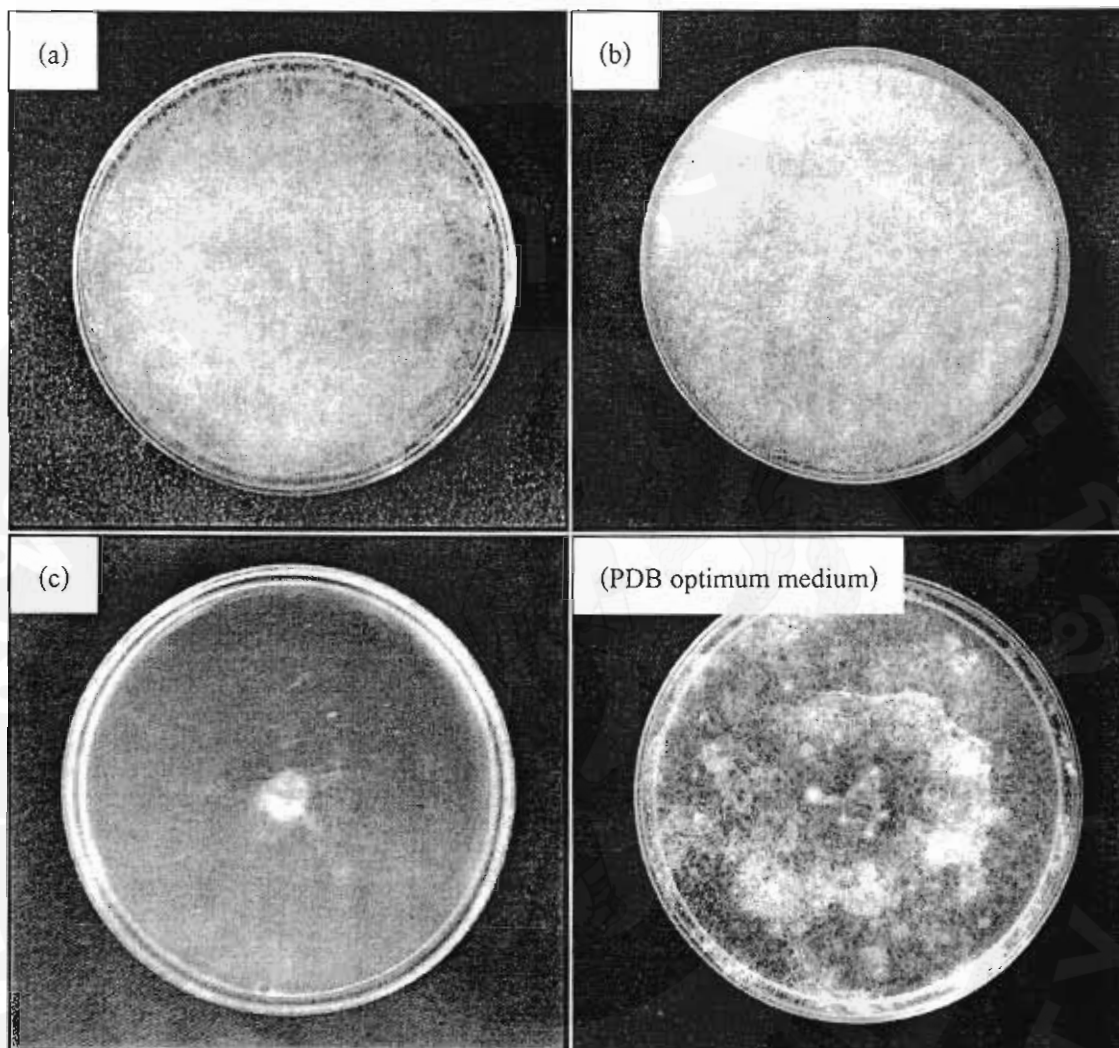


ภาพที่ 29 ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม
หมายเหตุ (a), (b), และ (c) คือ อาหารเหลวชุดควบคุม

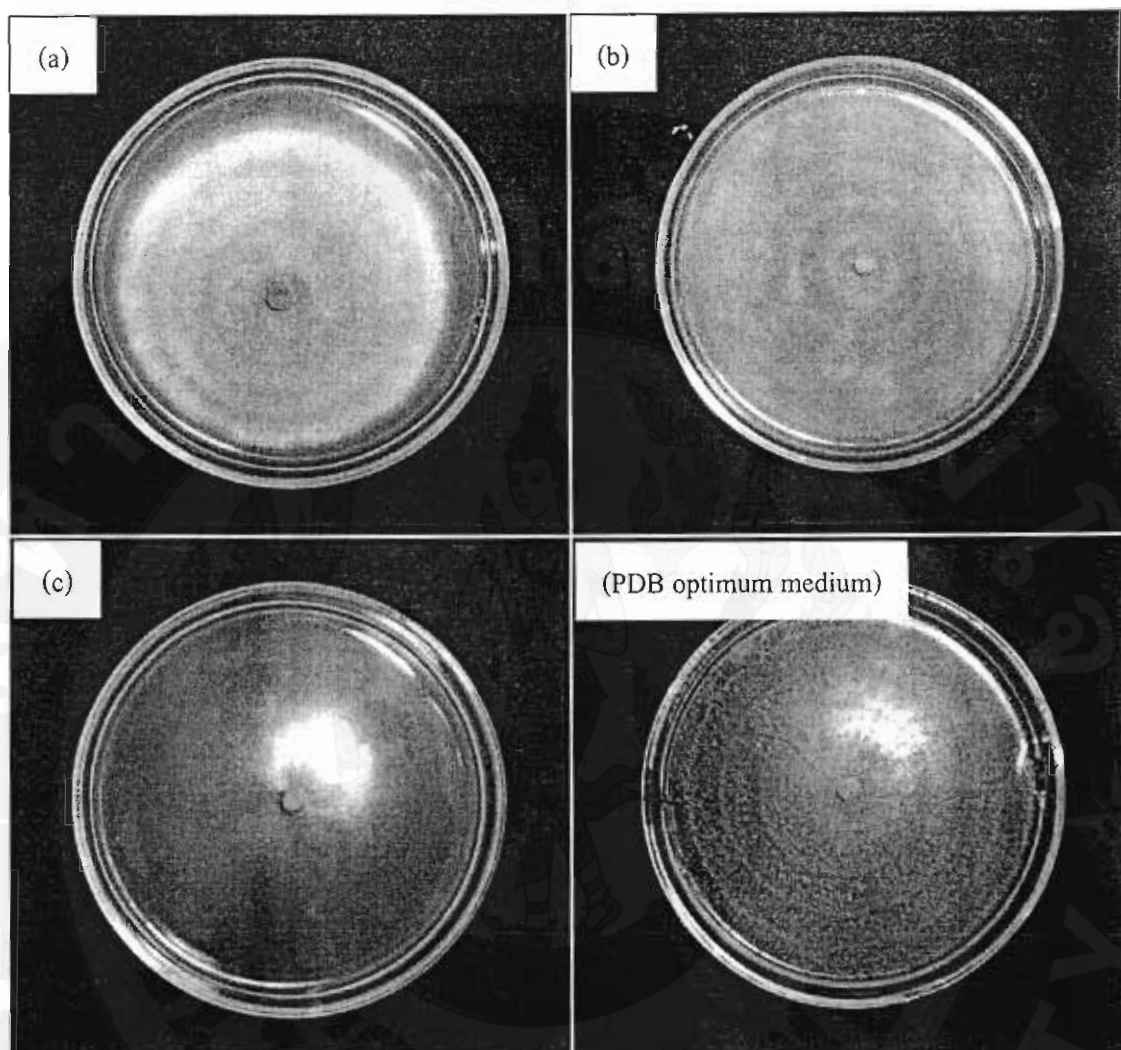
ตารางที่ 21 อัตราการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมจากผงน้ำทั้ง สูตร optimum medium และอาหารเห็ดชุดควบคุม

medium	Growth rate of colonies	
	<i>R. oligosporus</i> (cm/h)	<i>A. oryzae</i> (cm/day)
(a) PDB สำเร็จรูปทางการค้า	0.29	1.42
(b) PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง	0.31	1.45
(c) น้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น	0.19	0.84
PDB optimum medium	0.35	1.70

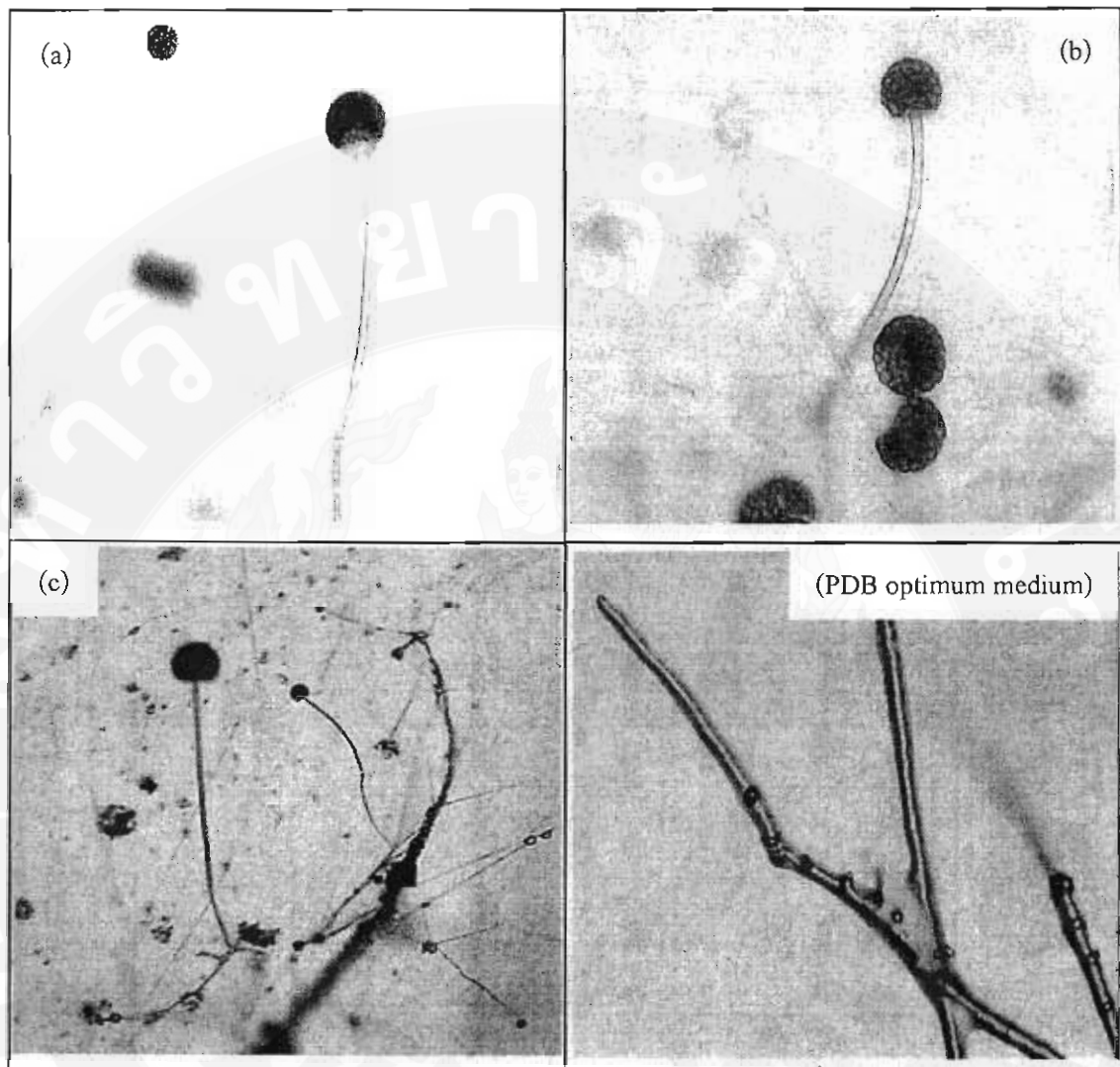
หมายเหตุ (a), (b), และ (c) คือ อาหารแข็งชุดควบคุม



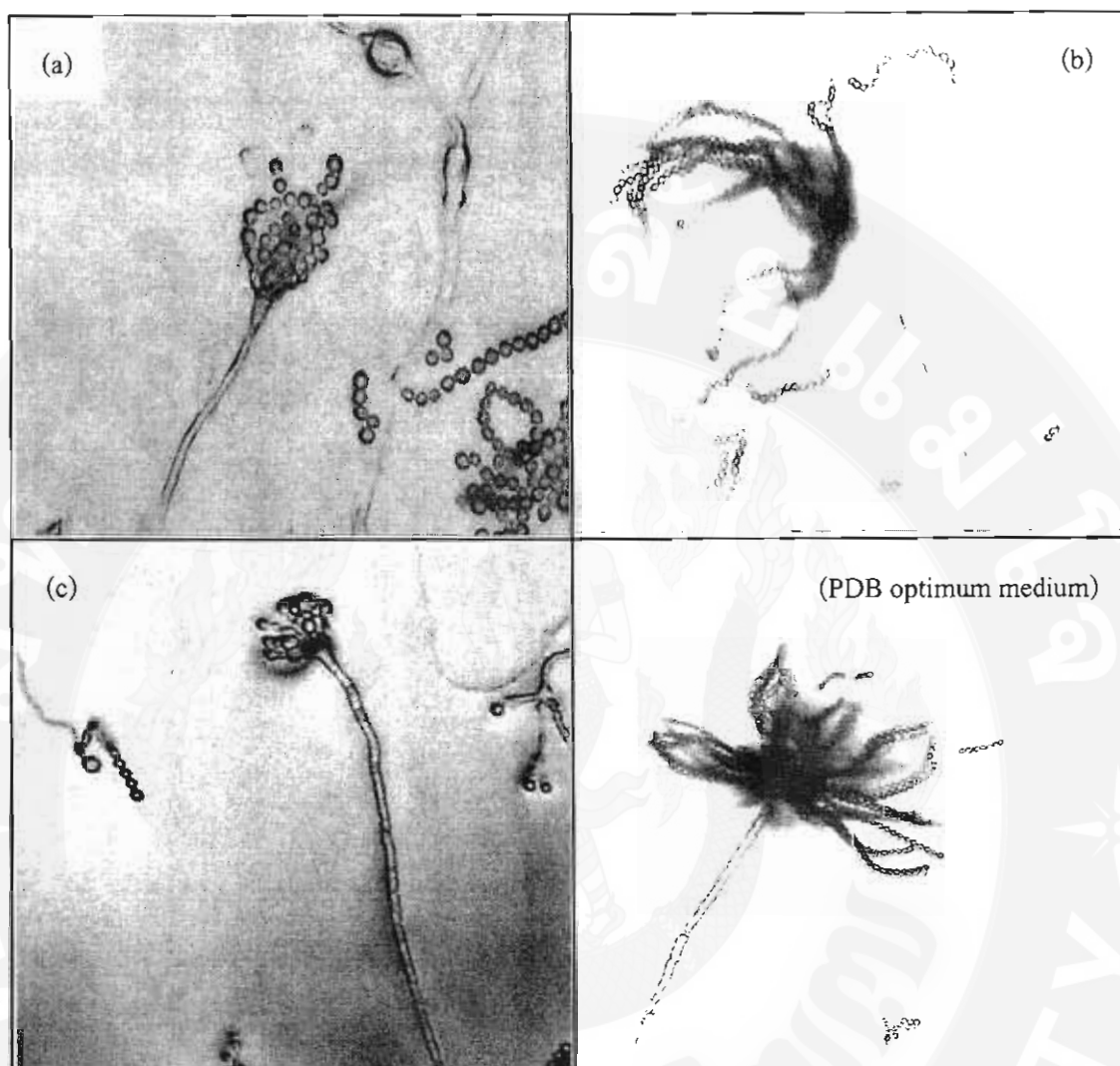
ภาพที่ 30 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *R. oligosporus* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำ
ทิ้ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม (a, b และ c)



ภาพที่ 31 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม (a, b และ c)



ภาพที่ 32 ลักษณะของเชื้อรา *R. oligosporus* ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตึง สูตร optimum medium และอาหารเห็ดขูดควมคุม (a, b และ c)



ภาพที่ 33 ลักษณะของเชื้อรา *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตึง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม (a, b และ c)

สรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำล้างมันจากโรงงานมันฝรั่งทอดกรอบ พบว่า ใน น้ำล้างมีน้ำตาล (408 มิลลิกรัม/ลิตร) และน้ำตาลรีคิวัช (24 มิลลิกรัม/ ลิตร) ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญของฟังไจ นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยโปรตีน (196.71 มิลลิกรัม/ ลิตร) ฟอสฟอรัส แมกเนเซียม และโพแทสเซียมหลงเหลืออยู่ และไม่พบอัลฟาทอกซินและยามาแมลง คดค้าง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราเพื่อเป็น การนำของเสียกลับมาใช้ให้เกิดประโยชน์และสามารถสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับของเสียได้

การศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้งจากโรงงานมันฝรั่งทอดกรอบมาเตรียมเป็น อาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) สำหรับเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยเปรียบเทียบกับอาหาร PDB ทางการค้าและ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง พบว่าเชื้อยีสต์สามารถเจริญได้ในอัตราที่ ใกล้เคียงกันในอาหาร PDB ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำทิ้งจากโรงงานมันฝรั่งทอดกรอบ สามารถนำมาใช้เตรียมเป็นอาหาร PDB สำหรับเลี้ยงเชื้อยีสต์ได้ดี เนื่องจากให้ผลการเจริญของเชื้อ ไม่แตกต่างกับอาหาร PDB ทางการค้าหรือ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง สามารถลดต้นทุนในการ เลี้ยงเชื้อยีสต์ได้อีกทางหนึ่ง ส่วนการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำล้างมันฝรั่งจากโรงงานมัน ฝรั่งทอดกรอบมาเตรียมเป็นอาหาร PDB สำหรับเลี้ยงเชื้อรา ในการวิจัยนี้ได้เลือกเชื้อ *A. oryzae* และเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* เนื่องจากเป็นเชื้อราที่นิยมใช้ในการผลิตอาหารหมักหลายชนิด และเป็นเชื้อที่ไม่สร้างสารพิษ นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อที่สถาบันการศึกษาหลายแห่งใช้สำหรับการ เรียนการสอนให้นักศึกษา จากการวิจัยพบว่า เชื้อราสายพันธุ์สองสายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโต ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ทางการค้าและ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่งได้ดีกว่าอาหาร เลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำทิ้ง โดยในการวิจัยนี้วัดอัตราการเจริญของเชื้อโดยการหาปริมาณ น้ำหนักแห้ง (dry cell weight) ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก แต่อาจจะให้ผลการทดลองที่คลาดเคลื่อน ได้ง่าย ดังนั้นจึงควรที่จะหาวิธีการวัดอัตราการเจริญของเชื้อราที่ให้ผลแม่นยำมีความคลาดเคลื่อน น้อยที่สุด

เมื่อใช้ผงแห้งของน้ำทิ้ง (potato chip effluent powder) ที่ได้จากการอบแห้งน้ำทิ้งความ เข้มข้นของมอลโตเดกซ์ตริน 5% ด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยระดับ pilot scale เตรียมเป็นอาหาร เลี้ยงเชื้อ PDB และหรือ PDA ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสม กลาง เพื่อศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากผงน้ำทิ้ง โดยมีตัวแปรอิสระ ที่ศึกษา คือ ผงน้ำทิ้ง และน้ำตาลเดกซ์โทรส มีผลต่อค่าตอบสนองหรือตัวแปรตาม คือ อัตราการ เจริญของเชื้อยีสต์และรา ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว จากการศึกษาพบว่าการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

PDB โดยใช้ผงน้ำทิ้ง 170 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลเดกซ์โทรส 22 กรัมต่อลิตร เป็นสูตรให้ค่าการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ได้สูงสุดที่ 7.056 ลีอกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ในช่วงเวลาที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการเลี้ยงเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และ หรือ PDA สูตรที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ คือ ผงน้ำทิ้ง 212 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลเดกซ์โทรส 32 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *R. oligosporus* สามารถสร้างสปอร์ได้เท่ากับ 6.18 ลีอกสปอร์ต่อมิลลิลิตร ในช่วงเวลาที่ 84 ของการเพาะเลี้ยง และเชื้อ *A. oryzae* ได้เท่ากับ 7.33 ลีอกสปอร์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และจากการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ด้วยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ชุดควบคุม อันได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้าทางการค้า อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น กับ การเลี้ยงเชื้อดังกล่าวด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้งจากสูตรที่เหมาะสม (PDB optimum medium) พบว่า เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* สามารถที่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากผงน้ำทิ้งด้วยอัตราที่ใกล้เคียงกับการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้าทางการค้า และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง โดยมีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น แต่เมื่อศึกษาถึงลักษณะพื้นฐานของเชื้อยีสต์ และราเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากผงน้ำทิ้ง พบว่าลักษณะการเจริญของเชื้อยีสต์และราที่เลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว มีความแตกต่างจากการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปทางการค้า และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง แสดงให้เห็นว่าความเหมาะสมและปริมาณของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง อาจยังมีความเหมาะสมไม่มากพอ ซึ่งอาจต้องมีการศึกษาและพัฒนาสูตรต่อไป เนื่องจากการที่เชื้อยีสต์และราสามารถเจริญได้เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว แม้จะไม่เทียบเท่ากับอาหารสูตรมาตรฐานที่ใช้ทั่วไป แต่ก็แสดงให้เห็นว่าในน้ำทิ้งยังคงมีสารอาหารที่หลงเหลือพอที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะเป็นการลดปริมาณน้ำเสียในส่วน of น้ำที่มาจากกระบวนการล้างแผ่นมันฝรั่ง ซึ่งมีแป้งแขวนลอยอยู่เป็นปริมาณมาก และน้ำในส่วนนี้อาจจะส่งผลให้เกิดปัญหากับระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงาน เนื่องจากแป้งมีคุณสมบัติการพองตัวเมื่อได้รับความร้อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้แสดงให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ที่จะใช้น้ำทิ้งเพื่อผลิตและพัฒนาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีความคงที่ที่แน่นอนต่อไปได้ ซึ่งอาจจะต้องมีการปรับปรุงสูตรเพื่อให้มีความเหมาะสมมากยิ่งขึ้นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กัลยาณี เต็งพงศธร. 2554. เอกสารประกอบการสอนวิชาการวางแผนการตลาดทางอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 15 น.
- จันทร์จิรา ยารวง. 2553. ปัจจัยทำนaylorการใช้อุปกรณ์ป้องกันเสียงในคนงานโรงงานผลิตมันฝรั่งทอดกรอบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 123 น.
- เชาวลิต อุปฐาก. 2552. การศึกษากกรรมวิธีการผลิตเครื่องปรุงผงก้วยเตี่ยวผัดไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร. 125 น.
- ณัฐินี ใจสอาด. 2546. วัตถุดิบห็นธรรมชาติจากเปลือกมันฝรั่ง: การสกัดและการใช้ประโยชน์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 116 น.
- ดวงพร คันทโชติ. 2545. นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์. กรุงเทพมหานคร: โอ. เอส. พรินต์ติ้ง เฮาส์. 206 น.
- ดวงใจ โอชัยกุล และ มาริสา จาคูพรพิพัฒน์. 2541. การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปมันฝรั่ง โดย *Candida tropicalis* TISTR 5136. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น 26: 181-185.
- ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ์. 2549. การพิสูจน์เพื่อระบุเชื้อยีสต์ที่แยกจากดิน. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร คณะแพทยศาสตร์. 66 น.
- นงเยาว์ ชูสุข. 2554. เทคนิคในการพัฒนาผลิตภัณฑ์. ปราจีนบุรี: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ คณะอุตสาหกรรมเกษตร. 37 น.
- นิวัณ เสนาะเมือง. 2543. เรื่องนารู้เกี่ยวกับรา. ขอนแก่น: พระธรรมจันต์. 203 น.
- บุญธรรม บุญเลา. 2547. คู่มือการปฏิบัติงาน เรื่อง การปลูกมันฝรั่ง (Potato). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร. 49 น.
- บุษกร อุดรภิกขิต. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. หาดใหญ่: มหาวิทยาลัยทักษิณ. 245 น.
- ไพโรจน์ วิริยจารี. 2544. การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง Response Surface Design. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร. 137 น.
- ภูวนัฐ โพธิ์งาม. 2538. การผลิตอะไมโดกลูโคซิเดสและเซลลูเลสจากเปลือกมันฝรั่งโดยเชื้อราบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 121 น.
- วิชัย รักวิทยาศาสตร์. 2551. ราวิทยาเบื้องต้น (Introductory Mycology). กรุงเทพมหานคร: จามจุรีโปรดักท์. 351 น.

- วิไลลักษณ์ โคมพันธุ์. 2549. การคัดเลือกพืชผลทางการเกษตรที่เหมาะสมเพื่อผลิตเป็นอาหารเลี้ยง
 พังไจ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยนเรศวร. 173 น.
- ศิริพร พงศ์สุกสมิทธิ์. 2544. การผลิตมันฝรั่งและหัวพันธุ์มันฝรั่ง (Potato and seed potato
 production). พิมพ์ครั้งที่ 3. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้ คณะผลิตกรรมการเกษตร.
 116 น.
- สมจิตร อยู่เป็นสุข. 2552. ราวิทยา (Mycology). เชียงใหม่: พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์. 136 น.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพมหานคร:
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 611 น.
- สุมาลี เหลืองสกุล. 2541. จุลชีววิทยาทางอาหาร (Food Microbiology). พิมพ์ครั้งที่ 4.
 กรุงเทพมหานคร: ชัยเจริญ. 248 น.
- สุวิมล กิรติพิบูล. 2546. จุลินทรีย์กับการควบคุมสุขลักษณะการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรม.
 กรุงเทพมหานคร: สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น). 160 น.
- เสาวนิตย์ ชอบบุญ. 2550. การจำแนกราสันสายที่พบในอาหารและอากาศ. สงขลา:
 มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. 302 น.
- เสาวนีย์ นิลลักษณ์. 2551. การศึกษาองค์ประกอบอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนและ
 ไขมันจาก *Bacillus* sp. ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติ. วิทยานิพนธ์
 ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 95 น.
- สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และ. 2549. ยีสต์:
 คุณประโยชน์อุตสาหกรรม (Yeast: valuable assets). กรุงเทพมหานคร:
 สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ. 39 น.
- หทัยชนก ชะนะปาโมกข์ และ เพ็ญศิริ ศรีบุรี. 2547. การใช้ประโยชน์จากของเหลือใน
 กระบวนการผลิตมันฝรั่งแผ่นทอด. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 6 น. อนุสรณ์
 เมืองมา. 2552. การลดการเกาะติดของน้ำผึ้งผระหว่างกรอบแห้งแบบพ่นฝอย.
 วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 95 น.
- อิสรพงษ์ พงษ์ศิริกุล. 2550. การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับ
 อุตสาหกรรมเกษตร. พิมพ์ครั้งที่ 4. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 168 น.
- อโณทัย คมเสวต. 2535ก. จุลชีววิทยาทางอาหาร (Food Microbiology). พิมพ์ครั้งที่ 2.
 เชียงใหม่: สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้. 319 น.
- _____. 2535ข. เอกสารคำสอน: จุลชีววิทยา (Microbiology). พิมพ์ครั้งที่ 3. เชียงใหม่:
 สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้. 430 น.

- Amal, A.H., Wijdam, R.T., Raya, R.J. and Huda, A.H. 2009. **Biological treatment of potato chips industry waste-water using a mixed culture of fungi.** pp. 282-287. In Proceeding of the College of Science 4th Scientific Conference. Babylon University.
- American Public Health Association (APHA)-the American Water Works Association (AWWA) and the Water Environment Federation (WEF). 1998. **Standard methods for the examination of water and wastewater 20th ed.** Washington, D.C.: American Public Health Association. 1220 p.
- _____. 2005. **Standard methods for the examination of water and wastewater 21st ed.** Washington, D.C.: APHA-AWWA-WEF. 1368 p.
- Asaduzzaman, M.D. 2007. **Standardization of yeast growth curves from several curves with different initial sizes.** Sweden: Chalmers University of Technology and Goteborg University. 42 p.
- Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). 1990. **Official method of analysis of AOAC international 15th ed.** Arlington, VA.
- _____. 1996. **Official method of analysis of AOAC international 16th ed.** Gaithersburg, Maryland: AOAC International.
- Arapoglou, D., Varzakas, Th., Vlyssides, A. and Israilides, C. 2010. Ethanol production from potato peel waste (PPW). **Waste Management.** 30: 1898–1902.
- Azab, M. S. 2008. Waste-waste treatment technology and environmental management using sawdust bio-mixture. **Journal of Taibah University for Science.** 1: 12-23.
- Bagyaraj, D.J. and Arpana, J. 2006. **Diversity of microbes and cryptograms.** Microbiology University of Agricultural Sciences. 58 p.
- Bloch, F., Brown, G.E. and Fanrka, D.F. 1973. Utilization of alkaline potato peel waste by fermentation amylase production by *Aspergillus fortidus* NRRL337 and alcohol fermentation. **American Journal of Potato Research.** 50: 357-364.
- Dobois, M., Gilles, K.A., Hamiton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry.** 28, 350-356.
- European Pharmacopoeia. 2007. **European Pharmacopoeia 6th ed.** U.S.A.: Gaithersburg, Maryland. Cited by RCI Labscan Limited. 2007. Potato Dextrose Agar. Thailand: Bangkok.

- Gelinas, P., Barrette, J. 2007. Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation. **Bioresource technology**. 98: 1138-1143.
- Grabowski, J.A., Truong, V.D. and Daubert, C.R. 2006. Spray-drying of amylase hydrolyzed sweetpotato puree and physicochemical properties of powder. **Journal of Food Science**. 71: 209-217.
- _____. 2008. Nutritional and rheological characterization of spray dried sweetpotato powder. **LWT-Food Science and Technology**. 41: 206-216.
- Jin, B., Van Leeuwen, H.J., Patel, B. and Yu, Q. 1998. Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**. 66: 201-206.
- Jin, B., Van Leeuwen, H.J., Patel, B., Doelle, H.W. and Yu, Q. 1999. Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater. **Process Biochemistry**. 34: 59-56.
- Gelinas, P. and Barrette, J. 2007. Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation. **Bioresource Technology**. 98: 1138-1143.
- Graham, C. W., Steinkraus, K.H., Hackler R. 1976. Factors affecting production of mold mycelium and protein in synthetic media. **Applied and Environmental Microbiology**. 32: 381-387.
- Griffin, D.H., 1994. **Fungal Physiology 2nd ed.** U.S.A.: John Wiley and Sons Publication. 472 p.
- Heck, J.X., Flores, S.H., Hertz, P.F., Ayub, M.A.Z. 2006. Statistical optimization of thermo-tolerant xylanase activity from Amazon isolated *Bacillus circulans* on solid-state cultivation. **Bioresource Technology**. 97: 1902-1906.
- Held, P. 2010. **Application Note: Monitoring of cell suspensions by kinetic absorbance measurements: Monitoring growth of beer brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*.** Vermont, USA: BioTek Instruments, Inc. 6 p.
- Lemmel, S.A., Heimsch, R.C., and Edward, L.L. 1979. Optimizing the continuous production of *Candida utilis* and *Saccharomycopsis fibuliger* on potato processing wastewater. **Applied and environmental microbiology**. 37: 227-232.

- Mahmood, A. U., Greenman, J. and Scragg, A. H. 1998. Orange and potato peel extracts: analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. **Enzyme Microb Technol.** 22: 130-137.
- Meister, E. and Thompson, N. R. 1976. Physical-chemical methods for the recovery of protein from waste effluent of potato chip processing. **J Agric Food Chem.** 24: 919-923.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing. **Analytical Chemistry.** 31: 426-428.
- Mishra, B. K., Arora A., Lata. 2004. Optimization of a biological process for treating potato chips industry wastewater using a mixed culture of *Aspergillus foetidus* and *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology.** 94: 9-12.
- Moore-landecker, E. 1996. **Fundamentals of the fungi.** 4th ed. U.S.A.: Prentice-Hall. 574 p.
- Moore, D., Robson, G.D. and Trinci, A.P.J. 2011. **21st Century guidebook to fungi.** Cambridge, UK: Cambridge University Press. 627 p.
- Onwubuemel, C., Huber, J.T., King, K.J. and Johnson, C. 1985. Nutritive value of potato processing wastes in total mixed rations for dairy cattle. **J Dairy Sci.** 68: 1207-1214.
- Patel, R.P., Patel, M.P. and Suthar, A.M. Spray drying technology: an overview. **Indian Journal of Science and Technology.** 10: 44-47.
- Peters, H. 1972. Measures taken against water pollution in starch and potato processing industries. **Pure Appl Chem.** 29: 129-141.
- Rao, V.K., Jayalakshmi, R. S., Varma, P. K. and Naidu, V. D. 2011. Introduction to plant pathogens. Departments of Plant Pathology. Acharya N.G. Ranga Agricultural University. 117 p.
- Reiser, C.O. 1954. Food yeast: *Torula* yeast from potato starch waetes. **J Agric Food Chem.** 2: 70-74.
- Tung, T.Q., Miyata, N. and Iwahori, K. 2004. Growth of *Aspergillus oryzae* during treatment of cassava starch processing wastewater with high content of suspended solids. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** 97: 329-335.

- Stevens, A.C. and Gregory, K. 1987. Production of microbial biomass protein from potato processing wastes by *Cephalosporium eichhorniae*. **Applied and environmental microbiology**. 53: 284-291.
- Strolle, E.O., Aceto, N.C., Stabile, R.L. and Turkot, V.A. 1980. Recovering useful by-products from potato starch factory waste effluents: a feasibility study. **Food Technol.** 34: 90-94.
- Walker, G.M. 1998. **Yeast Physiology and Biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons. 347 p.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์และรา

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์และรา

1. Potato Dextrose Agar; PDA (ACI Labscan, Thailand)

ผงอาหาร PDA สำเร็จรูป	39	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน ละลายโดยให้ความร้อนจากการต้มและกวนบ่อยๆ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบตามสูตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. Potato dextrose Broth; PDB (ACI Labscan, Thailand)

ผงอาหาร PDB สำเร็จรูป	26.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน ละลายโดยให้ความร้อนจากการต้มและกวนบ่อยๆ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบตามสูตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

3. PDA และ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง

มันฝรั่ง	200	กรัม
เดกซ์โทรส	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่ง หั่นเนื้อมันฝรั่งเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาดด้านละประมาณ 1 เซนติเมตร ชั่งให้ได้น้ำหนักตามสูตร แล้วต้มในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนเดือดนานประมาณ 10-15 นาที อย่าทำให้เนื้อมันฝรั่งและ กรองเอาแต่น้ำ (potato infusion) โดยใช้ผ้าขาวบาง ชั่งน้ำตาลเดกซ์โทรส และอุ่นให้ได้น้ำหนักตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนช่วยจนอุ่นละลายหมด ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบตามสูตร (ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีวิธีการเตรียมที่เหมือนกัน ยกเว้น ในอาหาร PDB จะไม่มีการเติมวุ้นลงไป) นำไปฆ่าเชื้อที่หม้อ นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

4. YPDA (Yeast extract Peptone Dextrose Agar)

Yeast extract	10	กรัม
Peptone	20	กรัม
Dextrose	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายวุ้นในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนช่วยจนวุ้นละลายหมด ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบตามสูตร นำไปฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที



การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งและแป้งมันฝรั่ง

1. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธี DNS Method (Miller, 1959)

สารเคมี

1. 3, 5 dinitrosalicylic acid (DNS) 1.0% เตรียมซังดีเอ็นเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างที่น้อย (NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติม potassium sodium tartrate (Rochelle salt) ลงไปที่ละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง (อาจจะเติมโซเดียมซัลไฟด์อีก 0.05 % ก่อนนำสารละลายดีเอ็นเอสไปใช้)

2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมซังสารกลูโคส 0.1000 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNS method

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (ml)	น้ำกลั่น (ml)	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/ml)
1	0	1.0	0
2	0.2	0.8	0.2
3	0.4	0.6	0.4
4	0.6	0.4	0.6
5	0.8	0.2	0.8
6	1.0	0	1.0

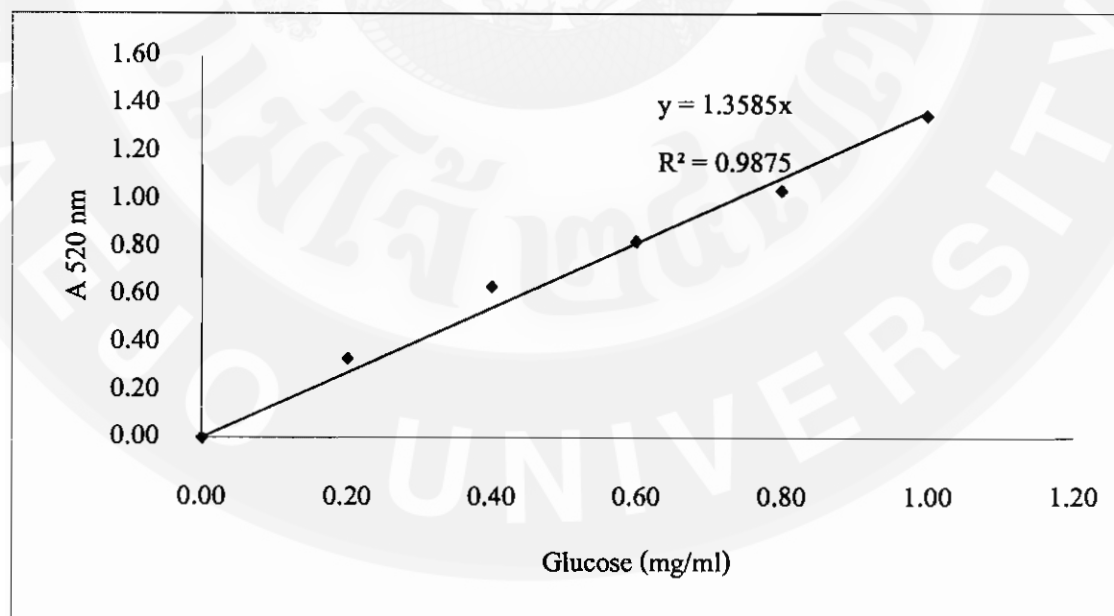
วิธีการ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง หรือสารละลายกลูโคส (ความเข้มข้น 0 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ต้องการวิเคราะห์ 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายดีเอ็นเอสปริมาตร 1 มิลลิลิตร
3. นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

4. แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็น 5 นาที เพื่อรอให้เย็น
5. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี DNS method ที่ความยาวคลื่น 520 nm

กลูโคส (mg/ml)	A_{520}
0	0
0.2	0.3335
0.4	0.633
0.6	0.824
0.8	1.0355
1.0	1.346



ภาพภาคผนวกที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส ด้วยวิธี DNS method ที่ความยาวคลื่น 520 nm

2. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธี Phenol Sulfuric (Dobois, 1956)

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (reagent grade 95.5%, specific gravity 1.84)
2. ฟีนอล 5% โดยน้ำหนัก เตรียมโดย ชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.0400 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

ตารางภาคผนวกที่ 3 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธี Phenol sulfuric

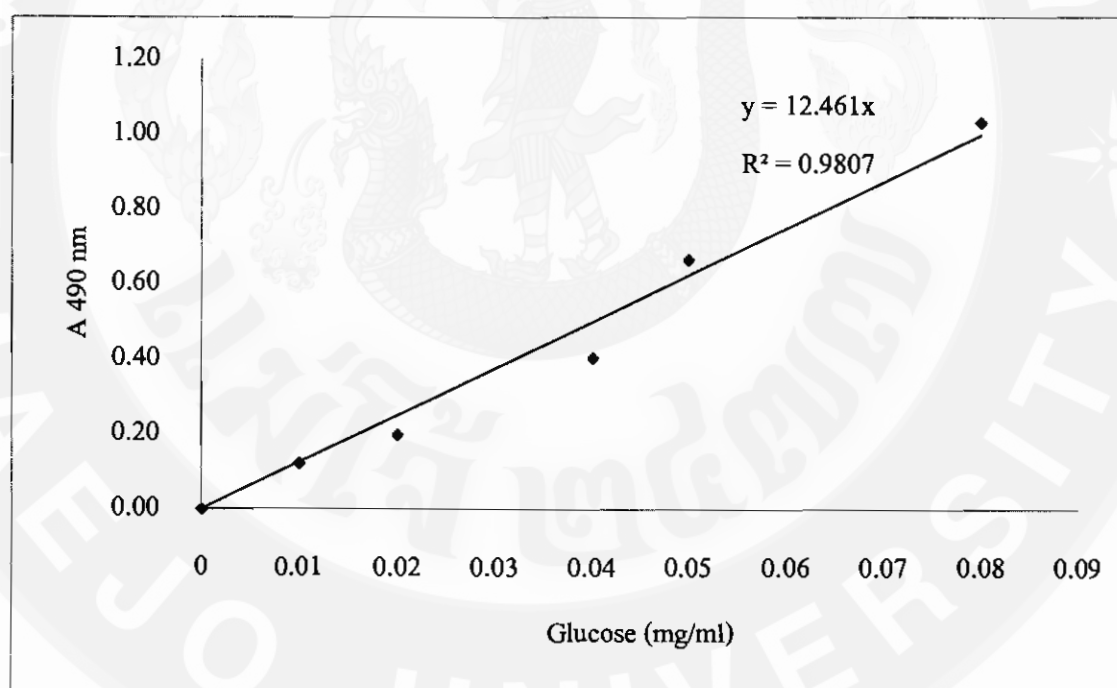
หลอดที่	สารละลายกลูโคส (μl)	น้ำกลั่น (μl)	ความเข้มข้นของกลูโคส (μg/ml)
1	0	1000	0
2	25	975	10
3	50	950	20
4	100	900	40
5	125	875	50
6	200	800	80

วิธีการ

1. บีบเปิดสารละลายตัวอย่าง หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0 – 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล 5% ลงไป 1.0 มิลลิลิตร แล้วเขย่า
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยลงไปทีละหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆ ปล่อยลงที่ข้างหลอด
3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วรออีก เป็นเวลา 30 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง โดยใช้ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Phenol sulfuric ที่ความยาวคลื่น 490 nm

Glucose (mg/ml)	OD at 490nm
0	0
0.01	0.1215
0.02	0.1985
0.04	0.404
0.05	0.665
0.08	1.031



ภาพภาคผนวกที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส ด้วยวิธี Phenol sulfuric ที่ความยาวคลื่น 490 nm

3. ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total Kjeldahl Nitrogen) ด้วยวิธี Kjeldahl ใช้วิธีวิเคราะห์ตาม A.O.A.C (1990)

ไนโตรเจนและการหาปริมาณไนโตรเจน

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ปริมาณโปรตีนในอาหารคำนวณได้จากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร ซึ่งจะเป็นพวกสารประกอบโปรตีน (True protein) และสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่ (Non-protein nitrogen) ดังนั้นปริมาณโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์นี้จึงเป็นโปรตีนรวม หรือโปรตีนหยาบ (Crude protein) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ตามวิธีของ Kjeldahl method โดยวิธีการมี 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การย่อย (digestion) เป็นขั้นตอนของการเปลี่ยนสารประกอบไนโตรเจนที่มีอยู่ในอาหารให้อยู่ในรูป $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ โดยใช้กรดกำมะถันเข้มข้น (H_2SO_4) เพื่อทำให้จุดเดือดของกรดสูงขึ้นควรเติมโพแทสเซียมซัลเฟต เพื่อเร่งให้สารตัวอย่างถูกย่อยได้เร็วขึ้นควรเติมตัวเร่ง (Catalyst) ซึ่งได้แก่ Cu, Hg และ Se ในการย่อยใช้อุณหภูมิสูง ซึ่งไม่ต่ำกว่า 405 องศาเซลเซียส และไม่ควรเกิน 417 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เวลาสั้นลงและไม่เกิดการสูญเสียแอมโมเนียไนโตรเจน (Ammonia nitrogen)

สมการการย่อย



คาร์บอนและไฮโดรเจนถูกออกซิไดซ์ได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำส่วนหนึ่งของกรดซัลฟิวริกถูกออกซิไดซ์เป็น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งซัลเฟอร์ไดออกไซด์นี้จะปฏิกิริยาสารไนโตรเจนอินทรีย์ให้เป็นแอมโมเนีย แล้วทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริก ได้แอมโมเนียมซัลเฟต

2. การกลั่น (distillation) ตัวอย่างที่ย่อยทิ้งไว้อาจจะเกิดผลึกควรเติมน้ำเพื่อละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ในส่วนผสมที่ได้จากสมการย่อยทำให้กลายเป็นกลางโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (NaOH) แล้วทำการกลั่นเพื่อไล่ก๊าซแอมโมเนียออกมา ซึ่งใช้กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 2 หรือ เป็นตัวจับก๊าซแอมโมเนีย

3. การไทเทรต (titration) ใช้ boric acid เป็นตัวเก็บแอมโมเนีย ให้ไทเทรตด้วยสารละลายกรดมาตรฐานเพื่อหาปริมาณสารละลายกรดมาตรฐานที่ทำปฏิกิริยาแอมโมเนีย

จากปริมาณแอมโมเนียคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนและคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนโดยใช้ Conversion factor โดยทั่วไปคูณด้วย 6.25 โดยถือว่าโปรตีนทั่วไปมีปริมาณไนโตรเจนเฉลี่ยร้อยละ 16

การคำนวณ

1. การหาเปอร์เซ็นต์ Nitrogen ทำได้โดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{14.007 \times (A-B) \times N \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (g)} \times 1,000}$$

A = ปริมาตรของกรดที่ไทเทรตกับตัวอย่าง

B = ปริมาตรของกรดที่ไทเทรตกับ Blank

N = ความเข้มข้นเป็น Normal ของกรด

2. การหาปริมาณโปรตีน การคำนวณหาปริมาณโปรตีนนั้นหาจากปริมาณไนโตรเจนที่ได้โดยปกติแล้วในตัวอย่างต่างๆ ไป จะมีปริมาณไนโตรเจนอยู่ 16% ของไนโตรเจนในโปรตีน = 6.25 (100/ 16)

$$\text{เปอร์เซ็นต์โปรตีน} = 6.25 \times \text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน}$$

* Factor ของไนโตรเจน อาจเปลี่ยนได้ในอาหารบางชนิด เช่น นมและผลิตภัณฑ์นม มีค่า Factor = 6.38 ข้าวสาลี Factor = 5.7 เป็นต้น

TKN (Total Kjeldahl Nitrogen)

เป็นปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดที่อยู่ในน้ำเสีย ทั้งในรูปของแข็งและสารละลาย ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกสภาพของน้ำเสียอีกตัวหนึ่ง ถ้าค่าน้ำเสียมีค่า TKN มาก น้ำจะมีสภาพเป็นด่าง และมีกลิ่นค่อนข้างเหม็น (เหม็นเปรี้ยวเหมือนกลิ่นแอมโมเนีย) ซึ่งระบบไร้อากาศหรือระบบก๊าซชีวภาพไม่สามารถจะกำจัด TKN ได้ การกำจัด TKN ต้องใช้อากาศหรือใช้พืชน้ำ เพราะพืชน้ำใช้ในโตรเจนในการเจริญเติบโต

การเตรียมสาร

1. สารละลาย NaOH 32% ชั่ง Sodium Hydrogen (NaOH) 320 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร (เตรียมใน Hood)
2. Mixed indicator ชั่ง Methyl red จำนวน 0.1 กรัม นำมาละลายด้วย Ethanol 50 มิลลิลิตร และชั่ง Bromocresal green จำนวน 0.1 กรัม นำมาละลายด้วย Ethanol 50 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายทั้งสองเทรวมกัน และคนให้เข้ากัน

3. สารละลาย Boric acid 4% ชั่ง Boric acid จำนวน 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาณ 500 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนจนละลายหมด จากนั้นนำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

4. Mixed Catalyst ชั่ง Potassium Sulfate (K_2SO_4) + Copper Sulfate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ในอัตราส่วน 95 : 5 โดยน้ำหนัก (ใช้ 7 กรัม/หลอด)

5. 0.002 N HCl ปิเปตกรด Hydrochloric acid (HCl) จำนวน 1.70 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรที่มีในน้ำกลั่นอยู่ส่วนหนึ่ง แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

ตอนที่ 1 การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของกรดมาตรฐาน 0.02 N HCl

1. อบ Na_2CO_3 Anhydrous ที่บดละเอียด ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
2. ชั่ง Na_2CO_3 Anhydrous มา 0.1300 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

3. หยด Mixed indicator 3-5 หยด

4. ไทเทรตด้วยสารละลายกรดมาตรฐาน 0.02 N HCl สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียว เป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรที่ใช้เป็น A_1

5. ต้มสารละลายในขวดรูปชมพู่ให้เดือดประมาณ 2 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. ไทเทรตด้วยสารละลายกรดมาตรฐาน 0.02 N HCl จนได้สีชมพูอีกครั้ง บันทึกปริมาตรที่ใช้เป็น A_2

$$\text{ความเข้มข้นที่แน่นอนของ HCl} = \frac{2000 \times \text{น้ำหนักที่แน่นอนของ } Na_2CO_3}{(A_1 + A_2) \times \text{น้ำหนักโมเลกุลของ } Na_2CO_3}$$

ตอนที่ 2 การเตรียมตัวอย่างน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำในขวด Polyethylene หรือขวดแก้ว ตัวอย่างน้ำที่เก็บควรจะทำ การวิเคราะห์ให้เร็วที่สุด หรือหากยังไม่วิเคราะห์ทันทีให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 2-5 องศาเซลเซียส จนกระทั่งต้องการจะวิเคราะห์ เดิมกรดซัลฟูริกที่มีค่า pH ต่ำกว่า 2 จะช่วยในการเก็บรักษาได้ดีขึ้น ทั้งนี้เพื่อไม่ให้สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ออกไป หรือให้สารอินทรีย์ที่อยู่ยังคงอยู่ในน้ำ

ถ้ารู้ค่าโดยประมาณความเข้มข้นของไนโตรเจนของตัวอย่าง สามารถที่จะเลือก ปริมาตรน้ำตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้

ความเข้มข้นไนโตรเจน (mg N/ L)	ปริมาตรที่ควรใช้ (ml)
< 10 mg N/ L	200
10-20 mg N/ L	100
20-50 mg N/ L	50
50-100 mg N/ L	25
> 100 mg N/ L	10

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ TKN (Total Kjeldahl Nitrogen)

1. ปิเปิดตัวอย่างน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อย
2. เติม Catalyst 7 กรัม
3. เติม Conc. H_2SO_4 15 มิลลิลิตร
4. เติม Hydrogen peroxide 30% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หรือ Stearic acid ปริมาณ
ปลายช้อน
5. ทำการย่อยสาร
 - 5.1 ทำการ preheat โดยการปรับความร้อนไปที่ตำแหน่ง 10 เป็นเวลา 10 นาที
 - 5.2 เปิดเครื่องกำจัดไอน้ำ (หลักการทำงานของ Scrubber) ไอน้ำที่มาจากเครื่องย่อยจะผ่าน Condenser เพื่อให้ไอน้ำกลั่นตัวเป็นหยดน้ำลงมาในขวดที่อยู่ด้านล่างแล้วจึงผ่านสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเพื่อกำจัดกรดส่วนที่เหลือ และผ่านผงถ่านเพื่อกำจัดกลิ่นในขณะที่ย่อยให้สารเป็นต้องเปิด Scrubber ตลอดเวลาจนกว่าไอของกรดจะหมดไป ใน Scrubber ประกอบด้วย Bromothymol blue ลงไป (Bromothymol blue 1 กรัม ผสมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) เมื่อสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตจับกับกรดมากๆ เข้า จะเปลี่ยนจากสารน้ำเงินเป็นเขียว เหลือง และส้มตามลำดับ
 - 5.3 นำหลอดย่อยสารซึ่งใส่ตัวอย่างน้ำและสารเคมีเรียบร้อยแล้วมาประกอบเข้าเป็นชุดแล้วเข้าเครื่องย่อยสาร
 - 5.4 ปรับความร้อนมาที่ตำแหน่งเลข 8 พร้อมทั้งจับเวลาในการย่อยสาร ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างโดยสามารถยกขึ้นมาดูได้ ตัวอย่างที่ย่อยสมบูรณ์จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวใสไม่มีตะกอน (ประมาณ 3 ชั่วโมง)
 - 5.5 หลังจากการย่อยสารเสร็จ นำหลอดย่อยออกจากเครื่องย่อยสารมาวางไว้บน Rack เพื่อรอให้หลอดย่อยเย็นก่อนที่จะนำไปเข้าเครื่องกลั่นสาร (วางไว้ใน Hood)

6. การกลั่นสาร

6.1 การเตรียมเครื่องกลั่นสาร

- 1) เติม Sodium Hydroxide 32% ซึ่งถูกปล่อยให้เย็นแล้วเทลงในถังล้าง
- 2) เปิดเครื่องกลั่นสาร พร้อมเปิดน้ำหล่อเย็น
- 3) ทำการ Preheat เครื่อง 1 ครั้ง โดยการเติมน้ำกลั่นในหลอดย่อยประมาณครึ่งหลอด ตั้งเวลาในการกลั่นประมาณ 4 นาที แล้วกดปุ่ม Star

6.2 การกลั่นสาร

- 1) เตรียม Boric acid 4% จำนวน 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 2) หยด Mixed Indicator 2-3 หยด (จะได้สารละลายสีชมพู)
- 3) นำขวดรูปชมพู่ดังกล่าวใส่เข้าไปในเครื่องกลั่น
- 4) เติมน้ำกลั่นจำนวน 50 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อยสารเพื่อทำการเจือจางตัวอย่าง
- 5) นำหลอดย่อยเข้าเครื่องกลั่น
- 6) เติม NaOH 32% โดยกดปุ่ม REAGENT รอจนกระทั่งสีในหลอดกลั่นสารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือฟ้า หรือที่ตัวเลขแสดง 5.0 (ใช้ต่างประมาณ 70-80 มิลลิลิตร)
- 7) ตั้งเวลาในการกลั่นประมาณ 4 นาที หรือดูจากสารที่กลั่นได้ประมาณ 100 มิลลิลิตร
- 8) กดปุ่ม Start
- 9) หลังจากกลั่นสารเสร็จสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวใส และนำสารที่กลั่นได้ไปทำการไตเตรทด้วย 0.05 N HCl ไตเตรทจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนบันทึกค่าปริมาตรกรดที่ใช้ในการไตเตรท แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณ ตามสูตร

การคำนวณ	mg TKN/L	=	$\frac{(T-B) \times 14.007 \times N \times 1,000}{\text{Volume of sample (มิลลิลิตร)}}$
	เมื่อ T	=	ปริมาตรกรดที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง
	B	=	ปริมาตรกรดที่ใช้ในการไตเตรท Bank
	N	=	ความเข้มข้นในหน่วย Normality ของกรด

4. ปริมาณแมกนีเซียม (Magnesium) โพแทสเซียม (Potassium) โดยใช้เครื่อง Flame ASS ใช้วิธีวิเคราะห์ตาม A.O.A.C (2005)

หลักการ

เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยเปลี่ยนตัวอย่างให้อยู่ในรูปเถ้า ละลายเถ้าด้วยกรด หลังจากนั้นวัดค่าอะตอมมิกแอบซอร์ปชันด้วยเครื่อง AAS ปริมาณแสงแปรผันตรงกับความเข้มข้นของธาตุที่มี

สารเคมี

1. แลนทานัมเข้มข้น 5% (น้ำหนัก/ ปริมาตร) เก็บได้นาน 6 เดือน
 - 1.1 ชั่ง แลนทานัมออกไซด์ (La_2O_3 หรือ LaCl_3) 14.66 กรัม ในขวดวัดปริมาตร 250 มิลลิลิตร
 - 1.2 เติมน้ำปราศจากไอออนเล็กน้อย
 - 1.3 เติมกรด HCl เข้มข้น 62.5 มิลลิลิตร
2. CsCl 5% ชั่ง CsCl 6.35 กรัม ปรับปริมาตรในน้ำปราศจากไอออนในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร
3. สารละลายมาตรฐาน Merck 1,000 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร

วิธีการทดสอบ

1. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง
 - 1.1 ชั่งสารตัวอย่างในถ้วยพอสเลน 1 กรัม สำหรับ Magnesium ใช้มากกว่า อาจถึง 50 กรัม
 - 1.2 วางบนเตาค่อยๆ ให้ความร้อนจนแห้ง นำไปอบไล่ความชื้นในเตาเผาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เผาตัวอย่างจนควันหมด
 - 1.2 เผาในเตาอบที่อุณหภูมิ 525 องศาเซลเซียส นาน 3-5 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น กลายเป็นเถ้า
 - 1.3 เถ้าที่ไม่ขาวหยคน้ำลงบนเถ้าให้เปียก เติมกรดไนตริกเข้มข้น 0.5-3 มิลลิลิตร ระเหยจนกรดแห้งบนเตาไฟฟ้าเผาที่เตาอบ 525 องศาเซลเซียส 1-2 ชั่วโมง ทำซ้ำจนเถ้าขาว (ถ้าหากวัด Potassium ควรหลีกเลี่ยง)
 - 1.4 ละลายเถ้าที่ได้ด้วยกรดไนตริก 1 นอร์มอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
 - 1.5 ให้ความร้อนบนเตาไฟฟ้า 2-3 นาที เพื่อช่วยให้เถ้าละลาย
 - 1.6 ถ่ายสารละลายลงขวดวัดปริมาตร 50 มิลลิลิตร
 - 1.7 ล้างสารละลายที่ติดด้วยด้วยกรดไนตริก 1 นอร์มอล

1.8 ปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก 1 นอร์มอล

2. การเตรียม Bank ทำเหมือนข้อ 1 แต่ไม่ใส่สารตัวอย่าง

3. หา % Recovery โดย Spiked Sample ซึ่งตัวอย่างเหมือนตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์
เติมสารละลายมาตรฐานโลหะลงปกติเติมสารละลายมาตรฐาน 1 เท่าตัวอย่าง ทำเหมือนข้อ 1

ตารางภาคผนวกที่ 5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโลหะ

สารมาตรฐาน ที่ต้องเตรียม		สารละลายมาตรฐาน		5% LaCl ₃ (ml)	5% CsCl (ml)	ปรับด้วย	อายุสาร
ความ เข้มข้น (µg/ml)	ปริมาตร (ml)	ความ เข้มข้น µg/ml	ปริมาตร (ml)				
Mg 10	100	1,000	1	0	0	1 N HNO ₃	1 เดือน
0	50	10	0	2	0		
0.2	50	10	1	2	0		
0.4	50	10	2	2	0		
0.6	50	10	3	2	0		
0.8	50	10	4	2	0		
1.0	50	10	5	2	0		
K 10	100	1,000	1	0	0	1 N HNO ₃	1 เดือน
0	100	10	0	0	2		
0.1	100	10	1	0	2		
0.5	100	10	5	0	2		
1.0	100	10	10	0	2		
1.5	100	10	15	0	2		
2.0	100	10	20	0	2		

ตารางภาคผนวกที่ 6 ปริมาณการเติมสารละลายมาตรฐานเพื่อหา % Recovery

สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาตรที่เติม (ml)
Ca	1,000	5
Cu	10	2
Fe	10	2
K	1,000	5
Mg	1,000	5
Mn	10	2
Na	1,000	5
Zn	10	2

4. วิธีการวัด FAAS สำหรับ Ca, Mg เติม LaCl_3 ลง Bank, สารละลายตัวอย่าง ในชั้นตอนสุดท้ายที่เจือจาง (ก่อนวัด) LaCl_3 0.2% (น้ำหนัก/ ปริมาตร) สำหรับ Na, K เติม CsCl ลงใน Bank, สารมาตรฐาน, สารละลายตัวอย่าง ในชั้นตอนสุดท้ายที่เจือจาง (ก่อนวัด) CaCl_2 0.2% (น้ำหนัก/ ปริมาตร)

ตารางภาคผนวกที่ 7 ปริมาตรของสารละลาย LaCl_3 , CsCl

ปริมาตรสารที่เติม	5% LaCl_3	5% CsCl
10	0.4	0.2
25	1	0.5
50	2	1
100	4	2
250	10	5
500	20	10

นำสารละลายมาตรฐาน, Bank, สารละลายตัวอย่าง วัด FAAS ปรับความยาวคลื่น
ดังตารางภาคผนวกที่ 8

ตารางภาคผนวกที่ 8 การวัด FAAS และการปรับความขาวคลิ่น

สาร	ความขาวคลิ่น	ความเข้มข้น (µg/ml)		องศา Burner
		หาค Sensitivity	หาค Detection Limit	
Ca	422.7	10	5	0
Cu	324.8	2	0.1	0
Fe	248.3	4	0.6	0
K	766.5	2	0.1	10
Mg	285.2	0.4	0.2	1
Mn	279.5	1	0.2	0
Na	589.0	0.4	0.2	0
Zn	213.8	1	0.2	0

5. การคำนวณ

5.1 การหาปริมาตรของสารละลาย LaCl_3 หรือ CsCl ที่เติมลงไปในตัวอย่าง

$$V_2 = \frac{C_1 \times V_1}{C_2}$$

5.2 การหาความเข้มข้นของโลหะ

$$\text{ppm } (\mu\text{g/g, } \mu\text{g/ml}) = \frac{\text{CVF}}{W}$$

เมื่อ $C = \mu\text{g/ml}$

$V = \text{ml}$

$F =$ จำนวนเท่าของสารละลาย

$W =$ ผลคูณของ (ปริมาตรที่เตรียม ml/ปริมาตรที่เจือจาง ml)

โลหะ (มิลลิกรัม/100 กรัม หรือ มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) = โลหะ ppm/10

โลหะ (กรัม/100 กรัม หรือ กรัม/100 มิลลิลิตร) = โลหะ ppm/10⁴

5.3 การคำนวณ % Recovery

$$\% \text{ Recovery} = (C_{sp} - C_s / C_a) \times 100$$

เมื่อ C_{sp}	=	ความเข้มข้นโลหะที่วัดได้จากสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานโลหะ (ไมโครกรัม/กรัม หรือ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
C_s	=	ความเข้มข้นโลหะที่วัดสารตัวอย่าง (ไมโครกรัม/กรัม หรือ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
C_a	=	ความเข้มข้นที่เติมในตัวอย่าง (ไมโครกรัม/กรัม หรือ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

การรายงานผล

วิเคราะห์ได้ $\pm$ ความไม่แน่นอน

1. ต่ำกว่า LOD ตรวจไม่พบ
2. LOD-LOQ น้อยกว่า LOD (<LOQ)
3. หากปริมาตรตัวอย่าง การปรับปริมาตรสุดท้ายก่อนการวิเคราะห์ไม่เป็นไปตามวิธี

ทดสอบมีการเจือจางสารละลาย ให้คำนวณค่า LOD และ LOQ ใหม่โดยแทนค่าตัวแปรต่างๆ ดังสมการ $V_2 = (C_1 \times C_2) / C_2$ เมื่อ C คือค่า LOD (มิลลิกรัม/ลิตร) หรือ LOQ (มิลลิกรัม/ลิตร)

5. ปริมาณ Chemical Oxygen Demand (COD) โดยวิธีวิเคราะห์ตาม APHA-AWWA (2005)

สารเคมี

1. สารละลายย่อยสลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต

โพแทสเซียมไดโครเมตปฐมภูมิ (Primary Standard)	4.1913	กรัม
เมอร์คิวริกซัลเฟต	33.3	กรัม
กรดซัลฟูริกเข้มข้น	137	มิลลิลิตร

อบโพแทสเซียมไดโครเมตปฐมภูมิในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น แล้วเติมเมอร์คิวริกซัลเฟตจนให้ละลายกันอย่างดีปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

2. ซัลฟูริกเอเจนต์

ซิลเวอร์ซัลเฟต (AgSO_4)	22	กรัม
กรดซัลฟูริกเข้มข้น	4.0	กิโลกรัม

เติมซิลเวอร์ซัลเฟตในขวดของกรดซัลฟูริกเข้มข้นทิ้งไว้ให้ละลาย 2 วัน

3. สารละลายเฟอร์โรอินดิเคเตอร์

1,10 - ฟีนันโทรลีน โมโนไฮเดรต ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{H}_2\text{N}_2\text{O}$)	1.485	กรัม
ไฮดรอนซัลเฟตเฮปต้าไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.695	กรัม

ละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS)

แอมโมเนียมซัลเฟตเฮกซาไฮเดรต	39.2	กรัม
กรดซัลฟูริกเข้มข้น	20	มิลลิลิตร

ละลายแอมโมเนียมซัลเฟตเฮกซาไฮเดรตในน้ำกลั่นแล้วค่อย ๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นทิ้งไว้ให้เย็นปรับปริมาตร ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์ COD (Chemical oxygen demand)

- ล้างหลอดย่อยสลายและฝาจากด้วยกรดซัลฟูริก 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารอินทรีย์
- เลือกใช้ปริมาตรของตัวอย่างน้ำและสารเคมีที่เหมาะสม
- นำตัวอย่างน้ำมาใส่ในหลอดย่อยสลายเติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต
- ค่อย ๆ เทกรดซัลฟูริกเอเจนต์ให้ไหลลงก้นหลอดเพื่อให้ชั้นของกรดอยู่ภายใต้ตัวอย่างน้ำและสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต

5. ปิดฝาหลอดแก้วให้แน่นแล้วคว่ำหลอดไปมาหลายๆ ครั้งเพื่อให้สารละลายผสมกันอย่างทั่วถึง

6. นำหลอดทดสอบนี้ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง โดยนำมาวางในที่วางหลอดทดลอง

7. เทสารผสมลงในขวดรูปชมพู่ แล้วเติมเฟอโรอินอินดิเคเตอร์ 1-2 หยด นำไปไตเตรทกับ 0.1 โมลาร์ เพอร์สแอมโมเนียมซัลเฟต จนถึงจุดยุติเมื่อสารละลายเปลี่ยนสีจากฟ้าอมเขียวเป็นน้ำตาลแดง

8. ด้วยวิธีการเดียวกันให้หบน้ำกลั่น (blank) ในปริมาตรเท่ากับปริมาตรน้ำตัวอย่าง รวมทั้งใช้รีเอเจนต์เดียวกันและไตเตรทด้วย 0.1 โมลาร์ เพอร์สแอมโมเนียมซัลเฟต เช่นกัน

การคำนวณ

COD (มิลลิกรัม O_2 ต่อ ลิตร) = $[(A - B) \times M \times 8,000] / \text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}$

โดย A = ปริมาตรของ 0.1 โมลาร์ เพอร์สแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ใช้ในการไตเตรท Blank (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของ 0.1 โมลาร์ เพอร์สแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ใช้ในการไตเตรท น้ำตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

M = โมลาริตีของเพอร์สแอมโมเนียมซัลเฟต

6. ปริมาณออกซิเจนละลาย หรือดีโอ (dissolved oxygen, DO) โดยวิธีวิเคราะห์ตาม APHA-AWWA (2005)

หลักการ

การหาค่าออกซิเจนละลาย คือ การหาปริมาณออกซิเจนซึ่งละลายอยู่ในน้ำ อันเป็นลักษณะสำคัญที่จะบอกให้ทราบว่าน้ำนั้นมีความเหมาะสมเพียงใดต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำ และแนวการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในน้ำว่าเป็นแบบใช้ออกซิเจนอิสระ (aerobic) หรือไม่ใช้ออกซิเจนอิสระ (anaerobic) ปริมาณออกซิเจนซึ่งละลายในน้ำที่มีความสัมพันธ์กับ

1. อุณหภูมิของน้ำ
2. ความกดดันของอากาศ
3. สิ่งเจือปนในน้ำ (impurities)

การหาค่าออกซิเจนละลายสามารถทำการวิเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น วัดโดยใช้เครื่องดีโอมิเตอร์ (DO meter) หรือออกซิเจนมิเตอร์ (oxygen meter) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลายเป็น มก./ลบ.คม. ได้โดยตรง หรือจะใช้วิธีทางเคมี เช่น วิธีไอโซด์โมดิฟิเคชันของไอโอโดเมตริก (Azide Modification of Iodometric Method) ซึ่งเหมาะสำหรับใช้วิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนในน้ำที่สกปรก เช่น น้ำทิ้ง น้ำในแม่น้ำลำคลอง เป็นต้น วิธีการวัดดีโอโดยใช้เครื่องขึ้นอยู่กับการเฉพาะของแต่ละบริษัท

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวด BOD ขนาด 300 มิลลิลิตร
2. ขวดวัดปริมาตร
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
4. บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร

รีเอเจนต์

1. สารละลายแมงกานีสซัลเฟต (manganese sulfate solution) ละลายแมงกานีสซัลเฟตเตตราไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 480 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 400 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 364 กรัม ในน้ำกลั่น กรอง แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2. อัลคาลิ-ไอโอไดด์-เอไซด์ รีเอเจนต์ (Alkali-Iodide-Azide Reagent) – AIA ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 500 กรัม หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 700 กรัม และโซเดียมไอโอไดด์ (NaI) 135 กรัม หรือโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 150 กรัม ในน้ำกลั่น แล้ว

ทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) 10 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ข้างต้น ($\text{NaOH}+\text{NaI}$ หรือ $\text{KOH}+\text{KI}$)

3. กรดซัลฟูริก เข้มข้น (Conc. H_2SO_4) ซึ่งกรดซัลฟูริก เข้มข้น 1 มิลลิลิตร จะสมมูลกับ 3 มิลลิลิตร อัลคาไล-ไอโอไดค์-เอไซด์ รีเอเจนต์

4. น้ำแป้ง ละลายแป้ง (Soluble starch) 2 กรัม ในน้ำกลั่นที่ร้อน 100 มิลลิลิตร และเติมกรดซาลิไซลิก (Salicylic acid) 0.2 กรัม เพื่อให้เก็บได้นาน

5. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.0250 โมล/ลบ.คม. ละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 6.205 กรัม ในน้ำกลั่น เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 6 โมล/ลบ.คม. จำนวน 1.5 มิลลิลิตร หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะต้องนำไปหาความเข้มข้นที่แน่นอน (Standardization) ด้วยสารไบโอไอโอด

6. สารละลายมาตรฐานไบโอไอโอด 0.0021 โมล/มิลลิลิตร ละลาย $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$ 812.4 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

7. สารละลายโพแทสเซียมฟลูออไรด์ (potassium fluoride solution) ละลายโพแทสเซียมฟลูออไรด์ไดไฮเดรต ($\text{KF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 40 กรัมในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้ใช้ต่อเมื่อตัวอย่างน้ำมีไอออน $\text{Fe}(\text{III})$ มาก

การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต

ละลาย KI ประมาณ 2 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 100 – 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 โมล/ลบ.คม. จำนวน 1 มิลลิลิตร หรือกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) 2-3 หยด และสารละลายมาตรฐานไบโอไอโอด 20.00 มิลลิลิตร แล้วทำให้เจือจางเป็น 200 มิลลิลิตร แล้วไทเทรตไอโอดีนซึ่งถูกขับออกมาด้วยสารละลายมาตรฐานไทโอซัลเฟต ที่เตรียมไว้ เติมน้ำแป้ง เมื่อใกล้จะถึงจุดยุติ (end of titration) สังเกตจากสีของสารละลายมีสีเหลืองอ่อน ถ้าสารละลายมาตรฐานไทโอซัลเฟตมีความเข้มข้น 0.0250 โมล/ลบ.คม. ปริมาตรที่ใช้ในการไทเทรตจะเท่ากับ 20 มิลลิลิตร ถ้าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไทโอซัลเฟตไม่ได้ค่าดังกล่าว ให้ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 0.0250 โมล/ลบ.คม.

การวิเคราะห์ออกซิเจนละลายน้ำ (DO)

การหาค่าออกซิเจนละลายจากตัวอย่างน้ำ ซึ่งเก็บไว้ในขวดบีโอดี ขนาด 300 มิลลิลิตร ทำได้ดังต่อไปนี้

1. เติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต (MnSO_4 solution) 1 มิลลิลิตร และอัลคาไล-ไอโอไดค์-เอไซด์ รีเอเจนต์ (AIA) 1 มิลลิลิตร ลงในขวดบีโอดีที่ใส่ตัวอย่างน้ำแล้ว โดยให้ปลายปิเปต

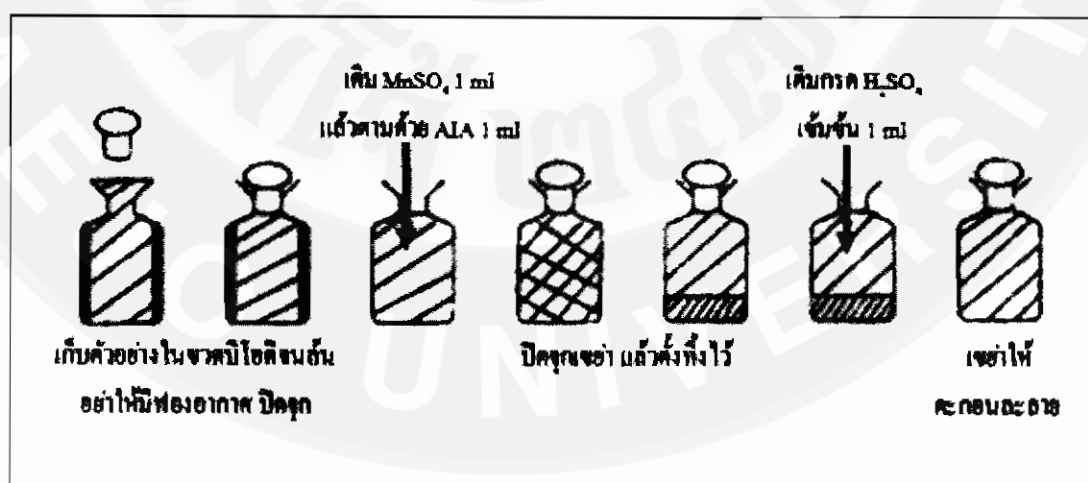
อยู่ใต้ผิวของตัวอย่างน้ำ ปิดจุกขวดระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ผสมให้เข้ากัน โดยจับขวดโดยใช้นิ้วชี้ กดฝาขวดไว้ แล้วคว่ำขวดขึ้นลงอย่างน้อย 15 ครั้ง

2. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนจนได้ปริมาณน้ำใส $1/2$ ของขวด (อย่างน้อย 15 นาที จะมีตะกอนเกิดขึ้น)

3. เมื่อตั้งทิ้งไว้จนเกิดสารละลายใสข้างบนปริมาณ $1/2$ ของขวดแล้ว เดิมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 1 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดขึ้นมา แล้วให้ปลายปิเปตแตะข้างขวดและค่อยๆ ปล่อยให้กรดไหลลงไปข้างๆ คอขวด ปิดจุกและผสมให้เข้ากัน โดยจับขวดโดยใช้ นิ้วชี้กดฝาขวดไว้ แล้วคว่ำขวดขึ้นลงจนกระทั่งตะกอนละลายหมด

4. เทน้ำตัวอย่างในขวดปิโอติลงในกระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร ปริมาตร 99 มิลลิลิตร เพราะฉะนั้นจะเหลือน้ำในขวดปิโอติปริมาตร 201 มิลลิลิตร เพื่อนำไปไทเทรต (ปริมาตรตัวอย่างน้ำนี้มีค่าเท่ากับปริมาตรตัวอย่างน้ำเริ่มต้น 200 มิลลิลิตร เนื่องจากการสูญเสียตัวอย่างน้ำจากขวดปิโอติ โดยการแทนที่ของสารละลายเคมีที่เติมลงไปทั้งสิ้น 2 มิลลิลิตร ดังนั้นปริมาตรตัวอย่างซึ่งใช้ในการไทเทรตจึงควรเท่ากับ $\{(200 \times 300) / (300-2)\} = 201$ มิลลิลิตร)

5. นำน้ำตัวอย่างที่เหลือในขวดปิโอติ (201 มิลลิลิตร) เติมน้ำแบ่ง 2-3 หยด (อินดิเคเตอร์) น้ำตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน นำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.025 โมล/ลบ.คม. จนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป อ่านปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้



ภาพภาคผนวกที่ 3 Flow chart การเก็บรักษาตัวอย่าง

การคำนวณ

ถ้าใช้ตัวอย่างน้ำในการไทเทรต 200 มิลลิลิตร สารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.025 โมล/ลบ.คม. 1 มิลลิลิตร มีค่าสมมูลพอดีกับ 1 มก./ลบ.คม. ของออกซิเจนละลาย

$$\text{ออกซิเจนละลาย (DO)} = \frac{\text{ปริมาตร โซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)}}{\text{หน่วยเป็น มก./ลบ.คม}}$$

7. ปริมาณ Biochemical Oxygen Demand (BOD) โดยวิธีวิเคราะห์ตาม APHA-AWWA (2005)

หลักการทั่วไป

การวิเคราะห์ค่าบีโอดี เป็นการวิเคราะห์เพื่อที่จะทราบถึงปริมาณความสกปรกของน้ำ เช่น น้ำในแม่น้ำลำคลอง น้ำทิ้งจากอาคารบ้านเรือน และโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น เพื่อประโยชน์ในการออกแบบระบบบำบัด ควบคุมคุณภาพน้ำทิ้งและประสิทธิภาพของระบบนั้นๆ โดยคิดเปรียบเทียบในรูปของปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์

การวิเคราะห์ค่าบีโอดี โดยทั่วไปเป็นการวัดปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้หมดไปในเวลา 5 วัน ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส

เนื่องจากออกซิเจนในอากาศสามารถละลายน้ำได้ในจำนวนจำกัด คือ ประมาณ 9 มก./ลบ.คม. ในน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ดังนั้น ในน้ำเสียซึ่งมีความสกปรกมาก จำเป็นจะต้องทำให้ปริมาณความสกปรกเจือจางลงอยู่ในระดับ ซึ่งสมมูลพอดีกับปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ การวิเคราะห์นี้เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ในน้ำ จึงจำเป็นต้องทำให้มีสภาพที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ กล่าวคือไม่มีสารพิษ แต่มีอาหารเสริมเพียงพอสำหรับจุลินทรีย์ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส เป็นต้น นอกจากนี้การย่อยสลายสารอินทรีย์ให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำกระทำโดยจุลินทรีย์หลายชนิด ในตัวอย่างน้ำที่ทำการวิเคราะห์จึงจำเป็นต้องมีปริมาณจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เหล่านี้อยู่อย่างเพียงพอ ถ้าไม่มีหรือมีปริมาณน้อยไปควรเติมจุลินทรีย์ ซึ่งเรียกว่า หัวเชื้อ (Seed) ลงไป

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวดอินคิวเบต (incubation bottles) หรือขวดบีโอดี (BOD) ขนาด 300 มิลลิลิตร ซึ่งมีจุกเป็นจุกแก้วปิดสนิท พร้อมฝาครอบพลาสติก (BOD cap) เพื่อป้องกันไม่ให้อากาศผ่านเข้าไปในขวดบีโอดีในระหว่างการเพาะเชื้อ สามารถทำได้โดยใช้น้ำหล่อปากขวดไว้โดยกลับขวดบีโอดีคว่ำลงในอ่างน้ำอุ่น (water bath) หรือหล่อน้ำไว้รอบๆ ปากขวดบีโอดี และใช้ถ้วยกระดาษหรือถ้วยพลาสติกครอบปากขวดไว้เพื่อลดการระเหยของน้ำหล่อ ก่อนที่จะนำขวดบีโอดีมาใช้ จะต้องนำขวด

มาล้างให้สะอาดปราศจากอินทรีย์สารต่างๆ การล้างควรล้างด้วยสารละลายของกรดโครมิก (chromic acid solution) หลังจากนั้นนำขวดมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ครั้งสุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งหนึ่งแล้วทำให้แห้ง

2. ตู้อินคิวเบต (incubator) ชนิดใช้อากาศหรือน้ำ ซึ่งสามารถควบคุมและปรับอุณหภูมิได้เองโดยอัตโนมัติ 20 ± 1 องศาเซลเซียส และต้องเป็นตู้ซึ่งสามารถป้องกันไม่ให้แสงผ่านเข้าไปได้ เพื่อป้องกันการเกิดดีไอโคโดยการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis)

3. บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร

4. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

5. กระบอกตวง ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

รีเอเจนต์

1. น้ำกลั่น น้ำกลั่นจะต้องมีคุณภาพดีกลั่นจากเครื่องกลั่นที่ทำด้วยแก้ว และต้องเป็นน้ำกลั่นซึ่งมีปริมาณของทองแดงน้อยกว่า 0.01 มก./ลบ.คม. และต้องปราศจากคลอรีน คลอรามิน ความเป็นด่างเนื่องจากไฮดรอกไซด์ อินทรีย์สาร และกรด

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 8.5 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 21.75 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 33.4 กรัม และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 1.7 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.2

3. สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต ละลายแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22.5 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

4. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ละลายแอนไฮไดรัสแคลเซียมคลอไรด์ (anhydrous CaCl_2) 27.5 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

5. สารละลายไอร่อน (III) คลอไรด์ ละลายไอร่อน (III) คลอไรด์เฮกซาไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

6. สารละลายกรดและด่างเข้มข้น 1 โมล/ลบ.คม. ใช้สำหรับปรับตัวอย่างน้ำที่เป็นกรดและด่างให้เป็นกลาง ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์

7. สารละลายแมงกานีสซัลเฟต (manganese sulfate solution) ละลายแมงกานีสซัลเฟตเตตราไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 480 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 400 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 364 กรัม ในน้ำกลั่น กรอง แล้วทำให้

เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร (สารละลายนี้จะต้องไม่เกิดสีกับน้ำแป้งเมื่อเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ ในสภาพที่เป็นกรด)

8. สารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ รีเอเจนต์ (Alkali-Iodide-Azide Reagent) - AIA ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 500 กรัม และโซเดียมไอโอไดด์ (NaI) 135 กรัม (หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 700 กรัม และโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 150 กรัม) ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) 10 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ข้างต้น (สารละลายนี้ไม่ควรเกิดสีกับน้ำแป้ง เมื่อทำให้เป็นกรด หรือทำให้เจือจาง)

9. กรดซัลฟูริก เข้มข้น ซึ่งกรดซัลฟูริก เข้มข้น 1 มิลลิลิตร จะสมมูลกับ 3 มิลลิลิตร อัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์รีเอเจนต์

10. น้ำแป้ง ละลายแป้ง (Soluble starch) 2 กรัม ในน้ำกลั่นที่ร้อน 100 มิลลิลิตร และเติมกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) 0.2 กรัม เพื่อให้เก็บได้นาน

11. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.0250 โมล/ลบ.คม. ละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 6.205 กรัม ในน้ำกลั่น เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 6 โมล/ลบ.คม. จำนวน 1.5 มิลลิลิตร หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

12. สารละลายโซเดียมซัลไฟต์ 0.0125 โมล/ลบ.คม. ละลายแอนไฮไดรต์โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) 1.575 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร (สารละลายนี้ไม่ยวดยาว ต้องเตรียมในวันที่จะใช้งานเท่านั้น)

การวิเคราะห์หาค่า BOD

การเตรียมตัวอย่างน้ำก่อนการวิเคราะห์ (pretreatment)

1. ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำเป็นกลาง จะต้องทำให้มีพีเอช 6.5 - 7.5 โดยใช้กรดซัลฟูริก 0.5 โมล/ลบ.คม. หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมล/ลบ.คม.

2. ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีคลอรีนตกค้าง จะต้องกำจัดออกก่อน โดยปฏิกิริยารีดอกซ์คลอรีนตกค้างจะลดลงเอง เมื่อตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ 1 - 2 ชั่วโมง แต่ในตัวอย่างซึ่งมีคลอรีนตกค้างปริมาณมากๆ จะต้องกำจัดโดยการเติมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ ซึ่งจะทราบปริมาณว่าต้องเติมไปเท่าใด โดยนำตัวอย่างน้ำมาในปริมาณที่เหมาะสม (ระหว่าง 100 - 1,000 มิลลิลิตร) เติมกรดแอสซิดิก (1+1) หรือกรดซัลฟูริก (1+50) 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 10 มิลลิลิตร (เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 10 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) แล้วไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ 0.0125 โมล/ลบ.คม. โดยใช้แป้งไอโอไดด์ เป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นก็จะทราบ

ปริมาณของโซเดียมซัลไฟด์ที่เติมลงไปในตัวอย่าง หลังจากเติมสารละลายโซเดียมซัลไฟด์ตามปริมาณที่คำนวณได้ลงในตัวอย่างแล้ว กวนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 – 20 นาที

3. ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีสารพาเจือปนอยู่ เช่น น้ำทิ้งจากโรงงานชุบโลหะ จะต้องศึกษาหาทางแก้ไขเป็นกรณีๆ ไป

4. ตวงน้ำตัวอย่างปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ในกระบอกตวง เทลงในถังพลาสติก แล้วเติมอากาศอย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้ น้ำอิ่มตัวด้วยปริมาณออกซิเจน

การวิเคราะห์มี 2 วิธี

1. วิธีตรง (Direct Method) ใช้ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีค่าบีโอดีน้อยกว่า 7 มก./ลบ.คม.

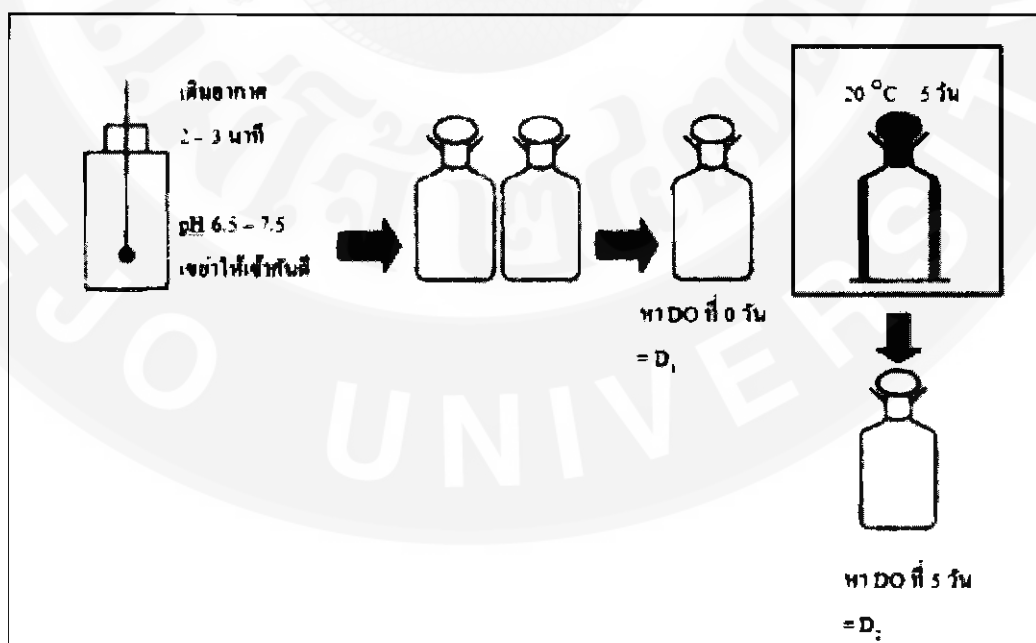
ทำได้ดังนี้

1.1 นำตัวอย่างน้ำที่ปรับปรุ้งแล้ว มาปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 20 องศาเซลเซียส

1.2 เติมอากาศให้มีออกซิเจนละลายอิ่มตัว (ใช้เวลาประมาณ 5–10 นาที)

1.3 รินตัวอย่างน้ำลงใส่ขวดบีโอดีจนเต็ม 3 ขวด ปิดจุกให้สนิท ดูให้แน่ใจว่ามีน้ำหล่อที่ปากขวด นำขวดหนึ่งมาหาค่าออกซิเจนละลายก่อน อีก 2 ขวดนำไปอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

1.4 หลังจาก 5 วันแล้ว นำตัวอย่างนั้นมาหาค่าออกซิเจนละลายที่เหลืออยู่



ภาพภาคผนวกที่ 4 Flow chart วิธีการโดยตรง (ไม่ต้องเจือจางตัวอย่าง)

การคำนวณ

ค่าบีโอดี (BOD) = D1-D2 มีหน่วยเป็น มก./ลบ.คม.

เมื่อ D1 = ค่าออกซิเจนละลายที่ไทเทรตได้ในวันแรก

D2 = ค่าออกซิเจนละลายที่ไทเทรตได้ในวันที่ 5

2. วิธีทำให้เจือจาง ใช้ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีความสกปรกสูง (มีค่าบีโอดีมากกว่า 7 มก./ลบ.คม.) จำเป็นจะต้องทำให้ตัวอย่างน้ำที่สกปรกเจือจางลงโดยใช้น้ำผสมเจือจาง (dilution water) และควรทำหลายๆ ความเข้มข้น อย่างน้อย 3 ความเข้มข้น

2.1 การเตรียมน้ำผสมเจือจาง

1) นำน้ำกลั่นที่ปราศจากสารมีพิษ (กลั่นจากเครื่องกลั่นแก้ว) มาปรับอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 20 ± 1 องศาเซลเซียส

2) ปรับคุณภาพให้เหมาะสมกับการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ โดยเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ และไอร์ออน (III) คลอไรด์ อย่างละ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำกลั่น 1 ลบ.คม.

3) เติมอากาศให้มีออกซิเจนละลายอิ่มตัว

2.2 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (seed)

เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย จำเป็นต้องเลือกหัวเชื้อที่เหมาะสมกับตัวอย่างแต่ละชนิด โดยทั่วไปใช้น้ำจากส้วมหรือน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อมาก่อนเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์

2.3 การผสมเจือจาง

เนื่องจากการวิเคราะห์ค่าบีโอดีอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยมีจุลินทรีย์เป็นตัวกลางในการย่อยสลาย สภาพแวดล้อมจะมีผลต่อการวิเคราะห์มาก ทำให้ค่าบีโอดีที่ได้มีความผันแปรสูง การวิเคราะห์ตัวอย่างหนึ่งๆ จึงมักจะทำการผสมเจือจางหลายๆ ความเข้มข้น (โดยทั่วไปไม่น้อยกว่า 3 ความเข้มข้น) ส่วนอัตราส่วนในการผสมเจือจางอาจประมาณจากชนิดของตัวอย่าง (ดูตารางภาคผนวกที่ 9) หรือค่าความเข้มข้นโดยประมาณ (ดูตารางภาคผนวกที่ 10)

ตารางภาคผนวกที่ 9 การเจือจางและชนิดตัวอย่างน้ำ (Dilution and Type of Sample)

Dilution	Type of sample
0.0 – 1.0 %	Strong industrial wastes
1 – 5 %	Raw & settled wastewater
5 – 25 %	Biologically treated effluent
25 – 100 %	Polluted river waters

ตารางภาคผนวกที่ 10 บีโอดีที่วัดได้กับอัตราการเจือจางต่างๆ

By direct pipetting into 300 ml bottle	
ml	Range of BOD
0.02	30,000 – 105,000
0.05	12,000 – 42,000
0.10	6,000 – 21,000
0.20	3,000 – 10,500
0.50	1,200 – 4,200
1.0	600 – 2,100
2.0	300 – 1,050
5.0	100 – 420
10.0	60 – 210
20.0	30 – 105
50.0	12 – 42
100	6 – 21
300	0 – 7

เมื่อได้อัตราส่วนที่เหมาะสมแล้วจึงทำการผสมเจือจาง ดังนี้

- 1) ค่อยๆ รินน้ำผสมเจือจาง (หัวข้อ 2.1) ลงในกระบอกตวง ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ประมาณ 500 มิลลิลิตร โดยให้น้ำค่อยๆ ไหลลงตามข้างกระบอกตวง

2) เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (หัวเชื้อ 2.2) ลงในกระบอกตวง 2 มิลลิลิตร (ในกรณี
ที่จำเป็นต้องเติม)

3) เติมตัวอย่างน้ำตามส่วนที่คำนวณได้จากตารางที่ 1 และ 2

4) เติมน้ำผสมเชื้อจากลงจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

5) กวนให้เข้ากันโดยใช้แท่งแก้วเสียบจุกยางไว้ที่ปลาย ชักขึ้นลงเบาๆ ระวัง
อย่าให้เกิดฟองอากาศ

6) ค่อยๆ รินตัวอย่างน้ำที่ผสมเข้ากันดีแล้วนี้ลงในขวดบีโอดีที่แห้งและ
สะอาด จนเต็ม 3 ขวด ปิดจุกให้สนิท ขวดหนึ่งนำไปวิเคราะห์หาค่าออกซิเจนละลายวันแรก อีก 2
ขวดนำไปอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำไปอินคิวเบตให้ตรวจดูว่า
มีน้ำหล่อที่ปากขวด และควรตรวจดูทุกวันอย่าให้แห้ง (ถ้าแห้งให้เติมด้วยน้ำผสมเชื้อจาก)

2.4 การอินคิวเบต หลังจากอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในที่มีดครบ
5 วันแล้ว นำมาหาค่าออกซิเจนละลาย ตัวอย่างที่ใช้ได้จะต้องมีค่าออกซิเจนละลายเหลืออยู่อย่าง
น้อย 1 มก./ลบ.คม. และมีการใช้ออกซิเจนไปอย่างน้อย 2 มก./ลบ.คม.

2.5 การแก้ค่าเนื่องจากการเติมหัวเชื้อ (seed correction) ถ้ามีการใส่หัวเชื้อ
จะต้องนำหัวเชื้อมาทำให้เจือจาง แล้วนำไปอินคิวเบต เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำ หลังจากนั้นนำมาหา
ค่าการใช้ออกซิเจนหลังจาก 5 วัน เลือกอันที่มีการใช้ออกซิเจนระหว่าง 40 - 70 % การคำนวณดูใน
หัวข้อสุดท้าย

2.6 การตรวจสอบคุณภาพน้ำผสมเชื้อจาก (dilution water check) เติมน้ำผสมเชื้อ
จากที่ยังไม่ได้ใส่หัวเชื้อลงในขวดบีโอดี 3 ขวด ขวดหนึ่งนำไปหาค่าออกซิเจนละลายก่อน อีก 2
ขวด ปิดจุกนำไปอินคิวเบต หลังจากนั้นนำมาหาค่าการใช้ออกซิเจนไป หลังจากอินคิวเบต 5 วัน ที่
อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และไม่ต้องนำไปใช้ในการคำนวณผลต่างของค่าออกซิเจนละลายก่อน
และหลัง 5 วันที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ไม่ควรเกิน 0.2 มก./ลบ.คม. และยิ่งดีถ้าไม่เกิน 0.1 มก./
ลบ.คม.

2.7 การตรวจสอบโดยใช้กลูโคส - กรดกลูตามิก (glucose-glutamic acid check)
เนื่องจากน้ำกลั่นที่ใช้ อาจจะมีสารพิษเจือปนอยู่ โดยเฉพาะทองแดง ซึ่งจะทำให้หัวเชื้อมี
ประสิทธิภาพลดลง มีผลทำให้ค่าบีโอดีที่ได้ต่ำกว่าความเป็นจริง ควรตรวจสอบโดยใช้สารอินทรีย์
บริสุทธิ์ที่ทราบค่าบีโอดีแล้ว ซึ่งได้แก่ กลูโคสและกรดกลูตามิก กลูโคสออกซิไดซ์ได้ง่าย และอัตรา
การออกซิไดซ์ไม่คงที่ ใช้ได้กับหัวเชื้อต่างๆ ไป เมื่อใช้ผสมกับกรดกลูตามิก ทำให้อัตราการ
ออกซิไดซ์จะคงที่ และมีสมบัติคล้ายกับน้ำเสียชุมชน

วิธีการตรวจสอบการวิเคราะห์ ทำโดย

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีกลูโคสและกรดกลูตามิก ซึ่งอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง อย่างละ 150 มก./ลบ.ดม.
2. ดูดสารละลายที่เตรียมมา 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดบีโอดี จำนวน 3 ขวด เติมน้ำผสมเจือจางที่ใส่หัวเชื้อแล้วลงไปจนเต็ม ปิดจุกให้แน่น
3. ขวดหนึ่งนำไปไทเทรตหาค่าออกซิเจนละลายวันแรก อีก 2 ขวดนำไปอินคิวบพร้อมด้วยตัวอย่างน้ำ (ดูหัวข้อ 2.5) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน
4. นำมาหาค่าออกซิเจนที่ใช้ไป (oxygen depletion) และค่าบีโอดีนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของหัวเชื้อที่ใส่ลงไป ดังตัวอย่างในตารางภาคผนวกที่ 11

ตารางภาคผนวกที่ 11 ชนิดของแหล่งน้ำต่อค่าบีโอดี

Type of Seed	5-day Seed Correction (mg/l)	Mean 5-day BOD (mg/l)	Standard Deviation (mg/l)
Settled fresh sewage	>0.6	218	±11
Settled stale sewage	>0.6	207	±8
River water (4 sources)	0.05–0.22	224–242	±7–13
Activated sludge effluent	0.07–0.68	221	±13
Trickling filter effluent	0.2–0.4	225	± 8

2.8 ไอดีไอดี (Immediate Dissolved oxygen Demand, IDOD) สารประกอบพวกไอร์ออน(II)ซัลไฟด์ (sulfide compound) และอัลคัลไฮด์สามารถถูกออกซิไดส์โดยออกซิเจน ถ้ามีอยู่ในตัวอย่างน้ำจะทำให้ปริมาณการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น ซึ่งจะต้องนำมาพิจารณาด้วย ปริมาณการใช้ออกซิเจนทั้งหมดของสารดังกล่าว สามารถหาได้โดยการคำนวณหาออกซิเจนละลายเริ่มต้น (initial dissolved oxygen) หรือโดยใช้ผลบวกของค่าออกซิเจนละลายที่ถูกใช้ไปในตัวอย่างที่ทำให้เจือจางแล้วเป็นเวลา 15 นาที (immediate dissolved oxygen demand) และค่าบีโอดี 5 วัน แต่ต้องทราบเสียก่อนว่าค่าไอดีไอดีอาจเกิดขึ้นในขณะที่ทำการเติมกรดลงไปเพื่อให้เกิดไอโอดีนอิสระ (free I₂) ในการวิเคราะห์ออกซิเจนละลายโดยวิธีไอโอโดเมตริกก็ได้

วิธีทำ คำนวณค่าออกซิเจนละลายของตัวอย่าง (S) (ส่วนมากเป็นศูนย์) และออกซิเจนละลายของน้ำผสมเจือจางก่อน แล้วจึงนำตัวอย่างนั้นมาทำให้เจือจางด้วยน้ำผสมเจือจาง (DO) ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จึงทำการหาค่าออกซิเจนละลายของตัวอย่างที่ทำให้เจือจาง (D1) แล้วคำนวณหาค่าออกซิเจนละลายของตัวอย่างที่ทำให้เจือจางลงนี้ จากนั้นจะสามารถหาค่าไอดีโอดี (มก./ลบ.คม.) ของตัวอย่างได้โดยเอาค่าออกซิเจนละลายที่คำนวณได้ลบด้วยค่าออกซิเจนละลายที่หาได้หลังจากตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

2.9 การหาค่าออกซิเจนละลาย

การหาค่าออกซิเจนละลายในวันแรก และวันหลังจากอินคิวเบทแล้ว 5 วัน ใช้วิธีเดียวกับวิธีการวิเคราะห์หาออกซิเจนละลายน้ำ (DO)

การคำนวณ

$$\text{ค่าบีไอดี เมื่อไม่ใส่หัวเชื้อ: บีไอดี (มก./ลบ.คม.)} = \frac{(D1 - D2)}{P}$$

$$\text{ค่าบีไอดี เมื่อใส่หัวเชื้อ : บีไอดี (มก./ลบ.คม.)} = \frac{(D1 - D2) - (B1 - B2)}{P}$$

$$\text{ค่าบีไอดี เมื่อคิดไอดีโอดี : บีไอดี (มก./ลบ.คม.)} = \frac{(DC - D2)}{P}$$

$$\text{ค่าไอดีโอดี : บีไอดี (มก./ลบ.คม.)} = \frac{(DC - D1)}{P}$$

PW	=	decimal fraction of dilution water used
PS	=	decimal fraction of sample used
DO	=	DO of original dilution water (mg/l)
D1	=	DO of diluted sample 15 minutes after preparation (mg/l)
D2	=	DO of original sample after 5 days incubation at 20 °C (mg/l)
S	=	DO of original undiluted sample (mg/l)
DC	=	DO available in dilution at zero time (mg/l)
	=	PWDO + PS
B1	=	DO of dilution of seed control before incubation (mg/l)
B2	=	DO of dilution of seed control after incubation (mg/l)

$$\begin{aligned}
 f &= \text{ratio of seed in diluted sample to seed in seed control} \\
 &= \% \text{ seed in D1} / \% \text{ seed in B1} \\
 \text{Seed correction} &= (B1 - B2) f
 \end{aligned}$$

การควบคุมคุณภาพ

1. ผลต่างของปริมาณ DO0 และ DO5 ต้องมีค่าน้อย 2 mg/l
2. ปริมาณ DO5 ต้องมีค่าน้อย 1 mg/l
3. ผลต่างของ DO0 และ DO5 สำหรับ Blank ของน้ำเจือจางต้องมีค่าไม่มากกว่า 0.2 mg/l
4. ทำการวิเคราะห์ซ้ำ
5. การวิเคราะห์ตัวอย่าง QC (Glucose-glutamic acid) 198 30.5mg/l

8. การวิเคราะห์ความชื้น (Moisture content) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ตาม AOAC, 1990

วิธีการ

1. นำถ้วยอบตัวอย่างพร้อมฝาที่ล้างสะอาดและแห้ง อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง โดยเปิดฝาด้วยอบออกเล็กน้อย จากนั้นนำถ้วยอบออกจากตู้อบพร้อมกับปิดฝาด้วยอบออกใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งให้เย็นแล้วนำมาชั่งบนตีกน้ำหนัก
2. ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการหาความชื้นให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ประมาณ 2 กรัม ใส่ลงในถ้วยอบ บันทึกรน้ำหนัก ปิดฝาด้วย แล้วเขย่าเล็กน้อยให้ตัวอย่างกระจายเต็มพื้นที่สม่ำเสมอ นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง โดยให้มีระยะห่าง 1 นิ้ว ต่อความจุของตู้ 1 ลิตร ขณะที่อบต้องเปิดฝาด้วย เมื่อครบกำหนดเวลา นำถ้วยอบออกใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก
4. อบซ้ำจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(W_1 - W_2) \times (100)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

W_1 คือ ผลรวมของน้ำหนักรับถ้วยอบ กับน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

W_2 คือ ผลรวมของน้ำหนักรับถ้วยอบ กับน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

9. การวิเคราะห์ปริมาณ Total solid (TS) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ตามAPHA-AWWA and WEF, 1998

วิธีการ

1. นำถ้วยกระเบื้องสำหรับระเหยที่ล้างสะอาดอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ใช้ตัวอย่างปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในถ้วยกระเบื้องที่เตรียมจากข้อ 1
3. นำไประเหยแห้งบนเครื่องให้ความร้อน (hot plate)
4. อบให้แห้งในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง
5. ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
6. ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างที่ได้ แล้วนำมาคำนวณตามสูตร ดังนี้

การคำนวณ

$$\text{TS (mg/l)} = \frac{\text{น้ำหนักของของแข็ง (mg/l)}}{\text{ml ของตัวอย่าง}}$$



การหาปริมาณน้ำหนักแห้ง (Cell dry weight) ของเชื้อรา

อุปกรณ์

1. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman)
2. ปากคีบ (Forceps)
3. อลูมิเนียมฟอยล์
4. ชุดเครื่องกรอง
5. ตู้อบลมร้อน

วิธีการ

1. เตรียมกระดาษกรองเบอร์ 1 ด้วยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นำไปใส่ไว้ในโถดูดความชื้นรอให้เย็นจึงชั่งน้ำหนักที่คงที่ของกระดาษกรอง (บันทึกเป็นน้ำหนัก A)
2. ใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 ที่เตรียมไว้ กรองเส้นใยที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง
3. นำกระดาษกรองที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ (บันทึกผลเป็นน้ำหนัก B) คำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้ง โดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณน้ำหนักแห้ง} = B - A$$



ภาคผนวก ง

การนับจำนวนเซลล์ยีสต์ และการนับจำนวนสปอร์เชื้อราด้วย Haemocytometer

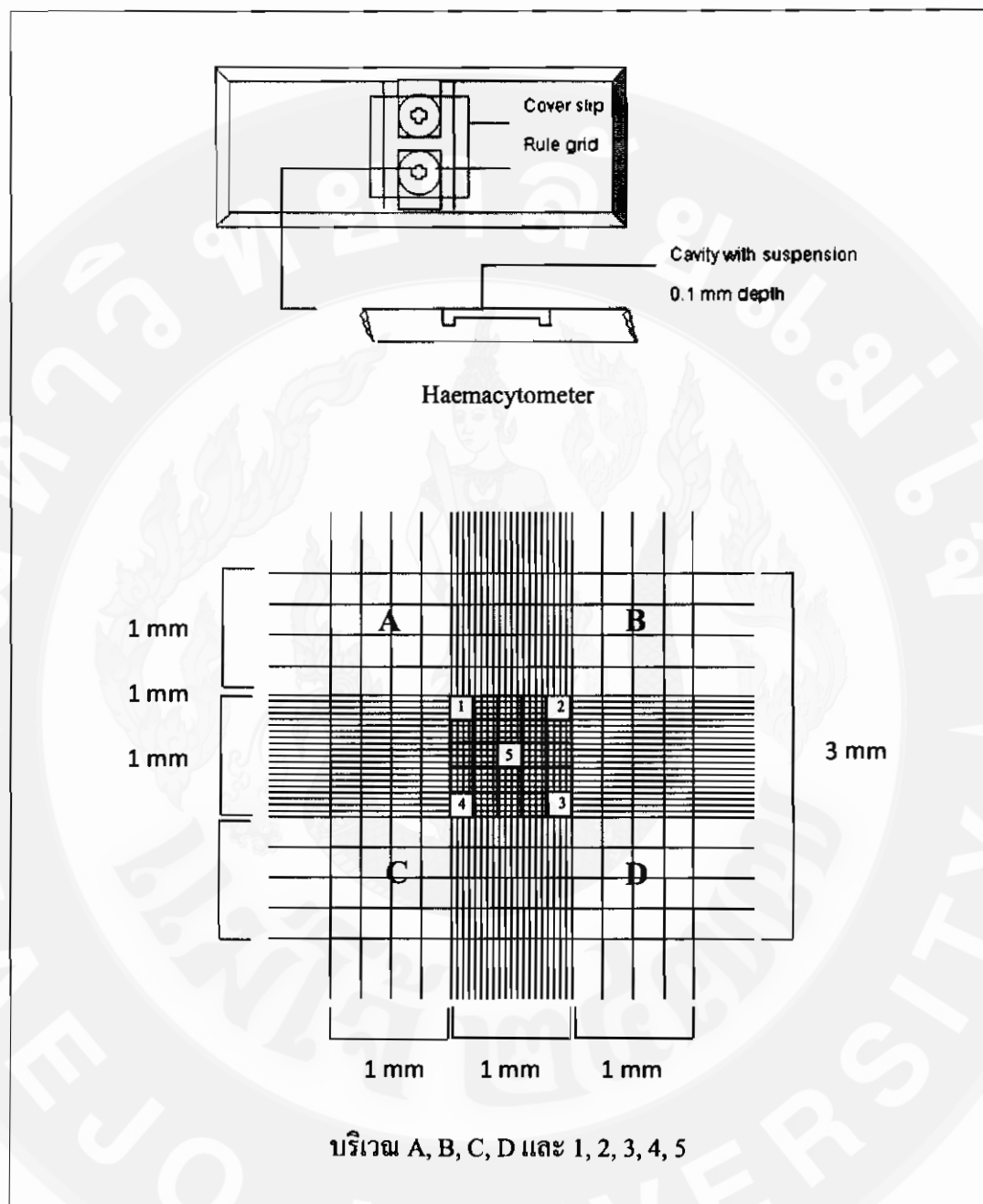
การนับจำนวนเซลล์ยีสต์ และการนับจำนวนสปอร์เชื้อราด้วย Haemocytometer

อุปกรณ์

1. haemocytometer
2. สารทำการเจือจาง (diluent) ได้แก่ 0.85 % NaCl และ 2% tween 20
3. กล้องจุลทรรศน์
4. ไมโครปิเปต

วิธีการ

1. เจือจางตัวอย่างเชื้อยีสต์ด้วย 0.85% NaCl และตัวอย่างสปอร์เชื้อราด้วย 2% tween 20
2. วางกระจกปิดสไลด์บน haemocytometer ตรงบริเวณที่มีตาราง ซึ่งกระจกปิดสไลด์จะอยู่เหนือผิวตาราง 0.1 มิลลิเมตร
3. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้ววางปลายปิเปตใกล้ขอบกระจกปิดสไลด์ จากนั้นค่อยๆ หยดตัวอย่างลงไปบน haemocytometer ตัวอย่างจะไหลเข้าใต้กระจกปิดสไลด์เองจนเต็มพื้นที่ตาราง โดยต้องระวังอย่าให้ตัวอย่างไหลลงไปในห้องที่อยู่รอบๆ หรือไหลเข้าไม่เต็มพื้นที่ตาราง
4. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบบริเวณ A, B, C, D และ 1, 2, 3, 4, 5 ดังแสดงในภาพภาคผนวก 5 วิธีการนับเซลล์ หากเซลล์มีความหนาแน่นต่ำให้เลือกนับช่อง A, B, C, D ในกรณีที่ตัวอย่างมีความหนาแน่นของเซลล์ที่สูงมาก การนับช่องใหญ่ (A, B, C, D) อาจทำให้เสียเวลามาก จึงสามารถเลือกนับช่องเล็ก (1, 2, 3, 4, 5) ได้
5. นับจำนวนเซลล์ โดยทิศทางการนับให้นับจาก 1 ไป 2 3 4 และ 5 หรือจาก A ไป B C และ D และให้นับเซลล์ที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมที่เป็นเส้นคู่ทั้งหมด โดยเซลล์ที่ซ้อนทับอยู่บนเส้นขอบให้นับเฉพาะขอบด้านบน และด้านซ้ายของช่อง จากการนับเซลล์จะสามารถคำนวณปริมาตรตัวอย่างได้จาก พื้นที่ตาราง $\times$ ความลึก เมื่อนับจำนวนเซลล์ก็จะได้ จำนวนเซลล์ต่อปริมาตรของตารางนั้น จากนั้นจึงคำนวณเป็นจำนวนเซลล์ต่อปริมาตรตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร



ภาพภาคผนวกที่ 5 Hemocytometer และสเกลใน Hemocytometer

การคำนวณ

ช่อง A B C และ D มีความกว้างและยาวเท่ากับ 1 มิลลิเมตร

$$\begin{aligned} \text{Volume ของช่อง A B C หรือ D ช่องใดช่องหนึ่ง} &= \text{ความกว้าง} \times \text{ความยาว} \times \text{ความลึก} \\ &= 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} \\ \text{หรือ} &= 0.1 \text{ cm} \times 0.1 \text{ cm} \times 0.01 \text{ cm} \\ \text{หรือ} &= 0.0001 \text{ cm}^3 \\ \text{หรือ} &= 10^{-4} \text{ ml} \end{aligned}$$

ดังนั้น

ความหนาแน่นของเซลล์ = ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่ช่อง A, B, C, D $\times 10^4$ เซลล์/ml

ช่อง 1 2 3 4 และ 5 มีความกว้างและยาวเท่ากับ 1 มิลลิเมตร

$$\begin{aligned} \text{Volume ของช่อง 1 2 3 4 หรือ 5 ช่องใดช่องหนึ่ง} &= \text{ความกว้าง} \times \text{ความยาว} \times \text{ความลึก} \\ &= 0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} \\ \text{หรือ} &= 0.02 \text{ cm} \times 0.02 \text{ cm} \times 0.01 \text{ cm} \\ \text{หรือ} &= 0.000004 \text{ cm}^3 \\ \text{หรือ} &= 10^{-6} \text{ ml} \end{aligned}$$

ดังนั้น

ความหนาแน่นของเซลล์ = ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่ช่อง 1, 2, 3, 4, 5 $\times 1/4 \times 10^6$ เซลล์/ml



ตารางภาคผนวกที่ 12 จำนวนโคโลนีของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ

Time (h)	Standard plate count (log CFU/ml)		
	PDB สำเร็จรูปทางการค้า	PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง	PDB ที่เตรียมจากน้ำเลี้ยงมันฝรั่ง
0	5.52	5.95	5.67
12	7.34	7.63	7.59
24	7.36	7.43	7.43
36	7.53	7.62	7.62
48	7.49	7.32	7.32
60	7.64	7.56	7.56
72	7.65	7.54	7.54

ตารางภาคผนวกที่ 13 น้ำหนักแห้งของเชื้อรา *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	Cell dry weight (g/l)						
	1 days	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days	7 days
PDB สำเร็จรูปทางการค้า	0.54	5.65	7.57	7.96	7.99	7.89	7.58
PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง	0.51	3.67	4.9	6.08	6.85	7.03	7.23
PDB ที่เตรียมจากน้ำเลี้ยงมันฝรั่ง	0.64	2.3	3.03	4.26	4.4	4.96	5.37

ตารางภาคผนวกที่ 14 น้ำหนักแห้งของเชื้อรา *R. oligosporus* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	Cell dry weight (g/l)						
	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h	84 h
PDB สำเร็จรูปทางการค้า	0.04	1.53	2.05	2.30	2.51	2.60	2.64
PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง	0.26	2.71	3.68	3.75	4.01	4.26	4.59
PDB ที่เตรียมจากน้ำเลี้ยงมันฝรั่ง	0.06	0.81	1.02	1.11	1.23	1.31	1.46

ตารางภาคผนวกที่ 15 จำนวนโคโลนีของยีสต์ *S.cerevisiae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง และอาหารเหลวชุดควบคุมทั้งหมด เป็นเวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมง

Time (h)	Standard plate count (log CFU/ml)											
	ชุดการทดลอง									ชุดควบคุม		
	Run1	Run2	Run3	Run4	Run5	Run6	Run7	Run8	Run9	(a)	(b)	(c)
0	5.39	5.26	5.46	5.36	5.66	5.54	5.48	5.54	5.54	5.69	5.58	5.81
6	6.04	6.49	6.23	6.36	6.43	6.32	6.57	6.28	6.91	6.51	7.00	5.63
18	6.18	6.43	6.45	6.45	6.72	6.43	6.78	7.23	7.00	6.83	7.91	5.45
24	6.89	7.04	6.48	6.36	6.90	7.52	7.26	6.95	6.86	7.54	7.93	5.30
30	7.30	6.93	7.26	7.26	7.23	7.41	7.20	7.37	7.26	8.08	8.04	5.32
36	7.11	7.39	7.18	7.37	7.42	7.11	7.20	7.33	7.15	7.94	8.11	5.23
42	7.20	7.40	7.36	7.15	7.40	7.43	7.29	7.32	7.20	7.83	8.08	4.98
48	7.20	7.11	7.28	7.20	7.35	7.26	7.18	7.23	7.18	8.23	8.43	4.81

หมายเหตุ ชุดทดลอง คือ อาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง (run1-run9), ชุดควบคุมได้แก่ (a) คือ อาหารเหลวสูตร PDB สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (c) คือ อาหารเหลวที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 20 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 16 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ *S.cerevisiae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง และอาหารเหลวชุดควบคุมทั้งหมด เป็นเวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมง

Time (h)	Viable cell count (log cell/ml)											
	ชุดการทดลอง									ชุดควบคุม		
	Run1	Run2	Run3	Run4	Run5	Run6	Run7	Run8	Run9	(a)	(b)	(c)
0	6.09	6.09	6.09	6.09	6.09	6.09	6.09	6.09	6.09	6.09	6.09	6.09
6	6.48	6.18	6.39	6.84	5.90	6.57	6.94	6.74	6.83	7.04	6.97	6.86
18	7.16	7.10	6.81	6.60	7.11	6.78	6.81	6.81	6.40	7.06	7.63	6.83
24	6.70	7.33	7.29	7.10	7.19	7.02	7.26	6.98	7.13	7.52	7.80	6.59
30	6.90	7.04	7.20	7.08	7.08	7.30	7.24	7.20	7.24	7.43	7.67	6.75
36	7.05	7.08	7.13	7.13	6.98	7.33	7.22	7.42	7.41	7.04	7.26	6.60
42	7.22	7.20	7.11	6.80	7.06	7.13	7.06	7.16	7.02	7.43	6.95	6.49
48	5.70	6.48	5.70	6.00	6.81	6.54	6.60	6.48	6.93	7.51	7.08	5.88

หมายเหตุ ชุดทดลอง คือ อาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง (run1-run9), ชุดควบคุมได้แก่ (a) คือ อาหารเหลวสูตร PDB สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (c) คือ อาหารเหลวที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น

ตารางภาคผนวกที่ 17 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *R. oligosporus* ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง และอาหารแข็งชุดควบคุม

Time (h)	Mean of colony diameter (cm)											
	ชุดการทดลอง									ชุดควบคุม		
	Run1	Run2	Run3	Run4	Run5	Run6	Run7	Run8	Run9	(a)	(b)	(c)
6	3.15	3.52	3.63	3.33	3.31	3.41	2.96	2.73	2.60	2.53	2.75	1.45
12	5.52	5.72	5.49	5.07	5.32	5.01	4.90	5.26	5.13	3.88	4.13	2.20
cm/h	0.42	0.43	0.42	0.38	0.40	0.38	0.37	0.40	0.39	0.28	0.30	0.14

หมายเหตุ ชุดทดลอง คือ อาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง (run1-run9), ชุดควบคุมได้แก่ (a) คือ อาหารแข็งสูตร PDA สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (c) คือ อาหารแข็งที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น

ตารางภาคผนวกที่ 18 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำลำมันฝรั่ง และอาหารแข็งชุดควบคุม

Time (day)	Mean of colony diameter (cm)											
	ชุดการทดลอง									ชุดควบคุม		
	Run1	Run2	Run3	Run4	Run5	Run6	Run7	Run8	Run9	(a)	(b)	(c)
0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
1	1.88	1.89	1.72	1.65	1.72	1.86	1.85	1.78	1.74	1.79	1.80	1.32
2	2.75	3.43	4.03	2.95	3.20	3.36	3.42	3.45	3.37	3.04	3.16	2.12
3	5.15	5.50	4.94	4.74	4.99	5.04	5.27	5.18	5.16	5.43	4.88	2.87
4	6.40	6.90	6.90	6.20	6.53	6.60	6.54	6.00	7.05	5.73	6.19	3.43
5	8.30	8.50	7.98	7.00	7.64	8.00	7.47	7.32	7.87	6.85	7.44	3.67
cm/day	1.56	1.60	1.50	1.30	1.43	1.50	1.39	1.36	1.47	1.27	1.39	0.63

หมายเหตุ ชุดทดลอง คือ อาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำลำมันฝรั่ง (run1-run9), ชุดควบคุมได้แก่ (a) คือ อาหารแข็งสูตร PDA สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (c) คือ อาหารแข็งที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น

ตารางภาคผนวกที่ 19 น้ำหนักแห้งของเชื้อรา *R. oligosporus* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำลำมันฝรั่ง และอาหารเหลวชุดควบคุม

Time (h)	Cell dry weight (g/l)											
	ชุดการทดลอง									ชุดควบคุม		
	Run1	Run2	Run3	Run4	Run5	Run6	Run7	Run8	Run9	(a)	(b)	(c)
42	3.41	1.47	1.02	0.84	2.19	2.06	2.41	2.23	1.98	2.47	3.51	1.13
84	1.80	1.85	1.25	1.68	2.54	2.06	2.22	2.36	2.77	4.50	5.42	0.14

หมายเหตุ ชุดทดลอง คือ อาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำลำมันฝรั่ง (run1-run9), ชุดควบคุมได้แก่ (a) คือ อาหารเหลวสูตร PDB สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (c) คือ อาหารเหลวที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น

ตารางภาคผนวกที่ 20 น้ำหนักแห้งของเชื้อรา *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำถั่วเหลืองและอาหารเหลวชุดควบคุม

Time (day)	Cell dry weight (g/l)											
	ชุดการทดลอง									ชุดควบคุม		
	Run1	Run2	Run3	Run4	Run5	Run6	Run7	Run8	Run9	(a)	(b)	(c)
3	5.85	4.40	2.86	3.18	4.56	5.11	5.40	4.97	3.78	6.06	6.56	0.01
7	15.44	5.95	4.82	4.18	7.69	6.43	6.99	7.00	5.38	7.36	6.85	0.07

หมายเหตุ ชุดทดลอง คือ อาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำถั่วเหลือง (run1-run9), ชุดควบคุมได้แก่ (a) คือ อาหารเหลวสูตร PDB สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารเหลวสูตร PDB ที่เตรียมจากหัวถั่วเหลือง (c) คือ อาหารเหลวที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น

ตารางภาคผนวกที่ 21 จำนวนสปอร์ของเชื้อรา *R. oligosporus* ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำถั่วเหลืองและอาหารแข็งชุดควบคุม

Time (h)	Spore count (log spore/ml)											
	ชุดการทดลอง									ชุดควบคุม		
	run1	run2	run3	run4	run5	run6	run7	run8	run9	a	b	c
42	4.86	3.88	4.48	3.70	3.70	4.88	0.00	0.00	3.70	6.41	8.06	5.85
84	0.00	5.24	3.88	0.00	4.57	3.40	3.88	3.70	3.40	7.67	7.53	6.00

หมายเหตุ ชุดทดลอง คือ อาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำถั่วเหลือง (run1-run9), ชุดควบคุมได้แก่ (a) คือ อาหารแข็งสูตร PDA สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากหัวถั่วเหลือง (c) คือ อาหารแข็งที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น

ตารางภาคผนวกที่ 22 จำนวนสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงนํ้าล้างมันฝรั่ง และอาหารแข็งชุดควบคุม

Time (day)	Spore count (log spore/ml)											
	ชุดการทดลอง									ชุดควบคุม		
	run1	run2	run3	run4	run5	run6	run7	run8	run9	a	b	c
3	6.78	6.43	7.03	6.86	7.40	6.52	7.17	7.27	7.21	7.58	6.94	6.18
7	7.96	7.12	7.78	7.78	8.12	7.72	7.66	7.62	7.61	8.85	8.23	6.47

หมายเหตุ ชุดทดลอง คือ อาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากผงนํ้าล้างมันฝรั่ง (run1-run9), ชุดควบคุมได้แก่ (a) คือ อาหารแข็งสูตร PDA สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารแข็งสูตร PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (c) คือ อาหารแข็งที่มีนํ้าตาลเดกซ์โทรส 2% ในนํ้ากลั่น

ตารางภาคผนวกที่ 23 จำนวนโคโลนีของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงนํ้าล้างมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Time (h)	Standard plate count (log CFU/ ml)			
	ชุดควบคุม			PDB optimum medium
	PDB สำเร็จรูปทางการค้า	PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง	นํ้าตาลเดกซ์โทรส 2% ในนํ้ากลั่น	
0	5.695	5.524	5.573	5.495
6	6.961	7.007	6.474	6.517
12	7.092	7.074	6.340	6.853
18	7.424	7.438	5.650	7.088
24	7.783	7.857	5.308	7.056
30	8.249	8.027	5.114	7.038
36	7.966	8.004	5.230	7.234
42	7.668	7.924	4.978	7.302
48	6.000	7.146	4.813	6.401

ตารางภาคผนวกที่ 24 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Time (h)	Viable cell count (log cell/ml)			
	ชุดควบคุม			PDB optimum medium
	PDB สำเร็จรูปทางการค้า	PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง	น้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น	
0	5.740	5.544	5.875	5.62
6	7.019	6.752	6.217	6.35
12	7.214	7.412	6.267	7.01
18	6.973	7.090	5.929	6.79
24	7.217	7.376	6.097	6.95
30	6.699	7.385	5.875	6.76
36	7.380	7.376	5.398	6.93
42	6.860	7.394	5.699	6.85
48	7.439	7.394	5.398	6.79

ตารางภาคผนวกที่ 25 จำนวนสปอร์ของเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม

Medium	Spore count (log spore/ml)			
	<i>R. oligosporus</i>		<i>A. oryzae</i>	
	42 h	84 h	3 day	7 day
(a) PDB สำเร็จรูปทางการค้า	6.15	7.28	7.43	8.66
(b) PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง	7.92	7.58	7.05	7.99
(c) น้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น	5.35	5.58	5.01	5.81
PDB optimum medium	5.64	6.18	6.56	7.33

หมายเหตุ (a), (b), และ (c) คือ อาหารแข็งชุดควบคุม

ตารางภาคผนวกที่ 26 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *R. oligosporus* ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม

Time (h)	<i>R. oligosporus</i> mean of colony diameter (cm)			
	ชุดควบคุม			PDA optimum
	PDB สำเร็จรูปทางการค้า	PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง	น้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น	medium
0	0.5	0.5	0.5	0.5
6	1.89	2.14	1.68	1.69
12	3.66	4.35	3.00	4.42
18	6.02	6.92	4.38	8.34
24	7.48	8.00	5.16	9.00
(cm/h)	0.29	0.31	0.19	0.35

ตารางภาคผนวกที่ 27 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมจากผงน้ำตาลมันฝรั่ง สูตร optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม

Time (day)	<i>A. oryzae</i> mean of colony diameter (cm)			
	ชุดควบคุม			PDA optimum
	PDB สำเร็จรูปทางการค้า	PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง	น้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น	medium
0	0.5	0.5	0.5	0.5
1	1.83	1.71	1.10	2.00
2	3.26	3.49	2.17	3.95
3	4.80	5.19	3.12	5.72
4	5.98	6.65	3.97	7.30
5	7.58	7.75	4.69	9.00
(cm/day)	1.42	1.45	0.84	1.70