สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำล้างมันฝรั่งเลี้ยงรา

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ MAEJO UNIVERSITY

ขนิษฐา อวดห้าว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อเรื่อง

การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำล้างมันฝรั่งเลี้ยงรา

โดย

นางสาวขนิษฐา อวดห้าว

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา ....

(อาจารย์ ดร.มยุรา ศรีกัลยานุกูล)
วันที่ 15 เดือน พค. พ.ศ. 2556

กรรมการที่ปรึกษา ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐปน ชื่นบาล)
วันที่ 15 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2556

กรรมการที่ปรึกษา ....

(อาจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน)
วันที่ 15 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2556

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มงคล ถิรบุญยานนท์)
วันที่ 15 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2556

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จาตุพงศ์ วาฤทธิ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่ 16 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2556

ชื่อเรื่อง	การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำล้างมันฝรั่งเลี้ยงรา
ชื่อผู้เขียน	นางสาวขนิษฐา อวดห้าว
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.มยุรา ศรีกัลยานุกูล

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำล้างมันฝรั่ง (Potato Washing Process Wastewater, PWPW) เลี้ยงรา โดยใช้น้ำล้างมันฝรั่งเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato Dextrose Broth (PDB) สำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5020) และรา (*Rhizopus oligosporus, Aspergillus oryzae*) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง พบว่า ยีสต์และราดังกล่าว สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง เมื่อใช้ผงน้ำล้างมันฝรั่ง (PWPW powder) เตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และ PDA ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design, CCD) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่ให้ค่าการตอบสนองที่เหมาะสม (PDB optimum medium) ต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ประกอบด้วยผงน้ำล้างมันฝรั่ง 170 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลเดกซ์โทรส 22 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เลี้ยง *S. cerevisiae* TISTR 5020 พบว่า มีการเจริญอยู่ที่ 7.06 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB optimum medium และ PDA optimum medium ที่ประกอบด้วยผงน้ำล้างมันฝรั่ง 212 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลเดกซ์โทรส 32 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการเจริญของ *R. oligosporus* ได้สูงสุดเท่ากับ 6.18 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 84 ชั่วโมง และ *A. oryzae* เท่ากับ 7.33 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์และราที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium ดังกล่าว กับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น พบว่า การเลี้ยงยีสต์และราด้วยอาหาร PDB optimum medium ให้ผลในระดับที่น่าพอใจ และดีกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้น้ำล้างมันฝรั่งผลิตและพัฒนาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่มีราคาถูกกว่าเพื่อใช้ในการเรียนการสอนทางห้องปฏิบัติการ แต่อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการปรับปรุงสูตรอาหารให้มีความเหมาะสมมากขึ้นต่อไป

Title	Feasibility Study on the Use of Potato Washing Process Wastewater for Fungi Cultivation
Author	Miss Khanittha Ouadhow
Degree of	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Dr. Mayura Srikanlayanukul

ABSTRACT

The objective of this research was studying the possibility of the used Potato Washing Proeess Wastewater (PWPW) for fungi cultivation. The PWPW is used in replacing Potato Dextrose Broth (PDB) culture medium for cultivating yeast (*Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5020) and molds (*Rhizopus oligosporus*, *Aspergillus oryzae*). The experiment aim is comparing between this PDB with eommercial PDB and also with PDB prepared from potatoes. It was found that yeast and mold were able to grow in PDB that prepared from PWPW. The PDB and PDA medium culture via Central Composite Design (CCD) experiment were prepared from PWPW powder found the PDB optimum medium has a combination of the PWPW powder 170 g/ l and dextrose 22 g/ l and is optimum for growth of *S. cerevisiae TISTR* 5020, used for cultivating *S. cerevisiae* TISTR 5020 showed growth is 7.06 log CFU/ ml in 24 h. The PDB optimum medium and PDA optimum medium has a combination of the PWPW powder 212 g/ l and dextrose 32 g/ l which is optimum for maximum growth of *R. oligosporus* is 6.18 log spore/ ml in 84 h and *A. oryzae* is 7.33 log spore/ ml at 7 days. In comparison, growth of yeast and molds when cultivated in PDB optimum medium with commercial PDB, PDB prepared from potatoes and 2% dextrose in distilled water medium found that cultivation yeast and mold in PDB optimum medium the results obtained is satisfactory and better than when compared using 2% dextrose in distilled water medium. The conclusion from this researeh indicated that it is possible to use PWPW for produetion and develop the cheaper PDB medium in laboratory. StiII, it will need further improvements in order to create an optimum formula.

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษางานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของประธานกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.มยุรา ศรีกัลยานุกูล กรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐปน ชื่นบาล และ อาจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน พร้อมทั้งให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการแก้ไขปัญหาตลอดระหว่างดำเนินงานวิจัย อีกทั้งยังสละเวลาอันมีค่าในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนคอยให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด ทั้งนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณ บริษัท เป๊ปซี่-โคล่า (ไทย) เทรดดิ้ง จำกัด ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำล้างมันฝรั่ง รวมทั้งเจ้าหน้าที่แผนกบำบัดน้ำเสียของโรงงานที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างน้ำล้างมันฝรั่งทุกๆ ครั้ง

ขอกราบขอบพระคุณ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ (IQS) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์การใช้งานเครื่อง Mini spray dryer ขนาด Lab scale คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์การใช้งานเครื่อง Spray dryer ขนาด Pilot scale พร้อมทั้งนางสาวสุปราณี แก้วเทียน และนายสุมิตร เชื่อมชัยตระกูล นักวิทยาศาสตร์ ที่ค่อยช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือดังกล่าวจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นอกจากนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่ออ้าย คุณแม่ผัดดี และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่ได้มอบโอกาสที่ดีในการศึกษาครั้งนี้ รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการกลาง และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านอุตสาหกรรมและอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

ประโยชน์ และความดี อันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแด่คุณพ่อคุณแม่ผู้อบรมเลี้ยงดู และให้การศึกษา ตลอดจนครูอาจารย์ที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ และอบรมสั่งสอนตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ผู้เขียนมีความซาบซึ้งอย่างยิ่งในความเมตตากรุณาจากทุกท่านที่ได้กล่าวนามมา และขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขนิษฐา อวดห้าว

พฤษภาคม 2556

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญเรื่อง	(6)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(10)
สารบัญตารางภาคผนวก	(12)
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
ฟังใจ	4
อาหารเลี้ยงรา	10
มันฝรั่ง	12
วิธีการและการออกแบบพื้นผิวตอบสนอง	19
การทำแห้งแบบพ่นฝอย	27
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	31
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	35
อุปกรณ์เครื่องมือ	35
สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	36
เชื้อมาตรฐาน	37
โปรแกรมคอมพิวเตอร์	37
น้ำล้างมันฝรั่งที่ใช้ในการศึกษา	37
แนวทางในการดำเนินงานวิจัย	38
ขั้นตอนในการวิจัย	39

หน้า

บทที่ 4 ผลและการอภิปรายผลการวิจัย 47
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำล้างมันฝรั่ง 47
ผลการศึกษาความเหมาะสมและความเป็นไปได้ของน้ำล้างมันฝรั่ง ในการนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB 48
ผลการศึกษาการทำแห้งน้ำล้างมันฝรั่งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย 55
ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของปัจจัย ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง 57
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 90
สรุปผลการวิจัย 90
ข้อเสนอแนะ 92
บรรณานุกรม 93
ภาคผนวก 100
ภาคผนวก ก อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์และรา 101
ภาคผนวก ข ข้อมูลการวิจัย 104
ภาคผนวก ค ประวัติผู้วิจัย 114

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ผลการทดสอบประสิทธิภาพ เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDAหลังจากการบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ? 2 องศาเซลเซียส โดยสังเกตการเจริญเติบโตตั้งแต่ 18-24 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยง	11
2	คุณค่าทางอาหารของหัวมันฝรั่ง (ปริมาณต่อ 100 กรัม)	13
3	สมบัติของเสียจากโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ	16
4	สารอาหารที่หลงเหลือในเสียโรงงานแปรรูปมันฝรั่ง	18
5	ตำแหน่งการทดลองและระดับค่า $\alpha = 2^{k/4}$ สำหรับการทดลองแบบ CCD	23
6	จุดหรือสิ่งทดลองของการออกแบบการทดลอง แบบ rotatable design ที่มี 2 ปัจจัย	25
7	ระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง	43
8	จุดหรือสิ่งทดลองสำหรับแผนการทดลอง 2 ปัจจัย ชนิดกำลังสองแบบหมุน (rotatable design) รูปแบบ 5 เหลี่ยม	43
9	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำล้างมันฝรั่ง	48
10	ปริมาณโปรตีนและค่าความชื้นของผงน้ำล้างมันฝรั่ง	56
11	การเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลองที่เตรียมตามแผนการทดลองแบบ CCD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	60
12	การวิเคราะห์ค่าการตอบสนอง (effect) และค่า regression coefficients สำหรับการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* TISTR 5020	61
13	ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม	64
14	จำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งชุดการทดลองที่เตรียมตามแผนการทดลองแบบ CCD	67
15	การวิเคราะห์ค่าการตอบสนอง (effect) และค่า regression coefficients สำหรับการเจริญเติบโตของ *R. oligosporus*	68
16	การวิเคราะห์ค่าการตอบสนอง (effect) และค่า regression coefficients สำหรับการเจริญเติบโตของ *A. oryzae*	69

ตาราง หน้า

17 จำนวนโคโลนีของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ที่ได้จากการทำนายของสมการ (predicted) และจากผลการทดลอง (experimental) เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 73

18 จำนวนสปอร์ของราที่ได้จากการทำนายของสมการ (predicted) และจากผลการทดลอง (experimental) เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium 77

19 ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม 78

20 ลักษณะโคโลนีของ *R. oligosporus* เมื่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม 79

21 ลักษณะโคโลนีของ *A. oryzae* เมื่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม 80

22 ลักษณะเส้นใยราและสปอร์ของ *R. oligosporus* เมื่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม ใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า 82

23 ลักษณะเส้นใยราและสปอร์ของ *A. oryzae* เมื่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม ใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า 83

24 น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม 85

25 ลักษณะเส้นใยราของ *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม 86

26 ลักษณะเส้นใยราของ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม 88

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	กระบวนการผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ และน้ำเสียที่เกิดขึ้นในระบบ	15
2	กราฟ 3 มิติของพื้นผิวตอบสนอง	21
3	ส่วนประกอบทั้ง 3 ส่วนของ CCD และจุดของการออกแบบ 9 สิ่งทดลอง สำหรับ 2 ปัจจัย	22
4	จุดของการออกแบบ 15 สิ่งทดลองใน composite design ที่มี 3 ปัจจัย	23
5	การออกแบบแบบหมุนของ 2 ปัจจัย ใน 3 รูปแบบ	24
6	ขั้นตอนในการศึกษาวิจัย	38
7	การเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร PDB ชนิดต่างๆ	49
8	ลักษณะโคโลนีของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร PDB ชนิดต่างๆ หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	50
9	การเจริญของ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ	51
10	การเจริญของ *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ	52
11	ลักษณะเส้นใยราของ *A. oryzae* และ *R. oligosporus* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร PDB ชนิดต่างๆ	53
12	การเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลอง และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	58
13	ความสัมพันธ์ของระดับปัจจัย ที่ได้แก่ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1 = 91-212 g/ l) และ ปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2 = 10-30 g/ l) ที่ส่งผลต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 (Y) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเหลว ชุดการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง	62
14	การเจริญของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วย อาหารเหลวและอาหารแข็ง ชุดการทดลอง เปรียบเทียบกับอาหารเหลวและอาหารแข็งชุดควบคุม	66
15	ความสัมพันธ์ของระดับปัจจัย ที่ได้แก่ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1 = 91-212 g/ l) และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2 = 10-30 g/ l) ที่ส่งผลต่อจำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus* (Y) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง ชุดการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง	70

ภาพ		หน้า
16	ความสัมพันธ์ของระดับปัจจัย ที่ได้แก่ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1 = 91-212 g/ l) และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2 = 10-30 g/ l) ที่ส่งผลต่อจำนวนสปอร์ของ *A. oryzae* (Y) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน บนอาหารแข็ง ชุดการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง	71
17	การเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	74
18	ลักษณะสัณฐานของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม	75

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวก		หน้า
1	จำนวนโคโลนีของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	105
2	น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน	105
3	น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 84 ชั่วโมง	106
4	จำนวนโคโลนีของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลอง และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมง	106
5	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลอง และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมง	107
6	ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารแข็งชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม	107
7	ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารแข็งชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม	108
8	น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลอง และอาหารเหลวชุดควบคุม	109
9	น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลอง และอาหารเหลวชุดควบคุม	109
10	จำนวนสปอร์ *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารแข็งชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม	110
11	จำนวนสปอร์ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารแข็งชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม	110
12	จำนวนโคโลนีของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	111
13	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	111

ตารางภาคผนวก หน้า

14 จำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม 112
15 ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม 112
16 ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม 113

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ เป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมผลิตอาหารว่างประเภทขนมขบเคี้ยว ที่ได้รับความนิยมบริโภคอย่างแพร่หลายในประเทศไทย จากข้อมูลของ บริษัท เป๊ปซี่-โคล่า (ไทย) เทรดดิ้ง จำกัด ซึ่งเป็นผู้ประกอบการผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ อันดับหนึ่งในประเทศไทย (ข้อมูลจากฝ่ายการตลาด บริษัท เป๊ปซี่-โคล่า (ไทย) เทรดดิ้ง จำกัด ณ เดือนธันวาคม พ.ศ. 2551) พบว่าในแต่ละปีทางบริษัทฯ ต้องใช้มันฝรั่งสดเพื่อการแปรรูปประมาณ 50,000-55,000 ตัน และมีของเสียจากกระบวนการผลิตประมาณ 8,000-9,000 ตันต่อปี (ข้อมูลจากฝ่ายจัดหามันฝรั่ง บริษัท เป๊ปซี่-โคล่า (ไทย) เทรดดิ้ง จำกัด ณ เดือนธันวาคม พ.ศ. 2551) ซึ่งของเสียจำนวนนี้ ทางบริษัทฯ มีภาระที่จะต้องเสียค่ากำจัดในแต่ละปีคิดเป็นมูลค่าหลายล้านบาท (ศุภศักดิ์, 2552) ทั้งนี้พบว่า ระหว่างกระบวนการผลิตของแต่ละวันจะก่อให้เกิดน้ำเสียขึ้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งมาจากขั้นตอนต่างๆ อันได้แก่ การล้างหัวมันฝรั่ง การปลอกเปลือก และการล้างแผ่นมันฝรั่งดิบ โดยน้ำเสียเหล่านี้จะถูกส่งไปบำบัดยังระบบบำบัดของโรงงานจนกระทั่งมีระดับสารอินทรีย์ในช่วงตามที่มาตรฐานกำหนดก่อนจะระบายสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งการดำเนินการดังกล่าวทำให้โรงงานมีค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนหนึ่งอีกเช่นกัน จากรายงานการศึกษาคุณสมบัติของน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมันฝรั่งที่ผ่านมา พบว่า ประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ที่มีปริมาณความเข้มข้นสูง รวมทั้งสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต โปรตีน วิตามิน จึงส่งผลให้น้ำเสียฯ มีค่า COD ค่า BOD และปริมาณสารแขวนลอยที่สูง ก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นเป็นมลพิษทางสิ่งแวดล้อม จึงได้มีความพยายามพัฒนาระบบบำบัดให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ควบคู่ไปกับการใช้ประโยชน์จากน้ำเสียฯ กันอย่างกว้างขวางเพื่อแก้ปัญหามาเป็นเวลานาน ในงานวิจัยนี้มีความสนใจนำน้ำเสียจากขั้นตอนการล้างแผ่นมันฝรั่งดิบ (Potato Washing Process Wastewater, PWPW) มาใช้ในการศึกษา เนื่องจากไม่มีเศษดิน และตะกอนปนเปื้อน เพราะมันฝรั่งที่เข้าสู่ขั้นตอนนี้จะผ่านการล้างทำความสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกต่างๆ และสารเคมีออกก่อน เมื่อพิจารณาในส่วนของน้ำเสียนี้ คาดว่าน่าจะมีสารอาหารชนิดอื่นนอกเหนือจากแป้งและน้ำตาล ที่ถูกล้างออกมาจากแผ่นมันฝรั่งดิบหลงเหลืออยู่และเพียงพอต่อการเจริญของรา จึงทำให้น้ำเสียจากขั้นตอนดังกล่าวมีลักษณะความเหมาะสมที่จะนำกลับมาใช้ประโยชน์ ซึ่งการนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสิ่งที่ควรพิจารณา

โดยทั่วไป ห้องปฏิบัติการในสถาบันวิจัย หรือห้องปฏิบัติการของบางมหาวิทยาลัย จะใช้อาหารสำเร็จรูปสูตร Potato Dextrose Broth (PDB) มาเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงราและยีสต์ เนื่องจากมีมาตรฐานและความคงที่ที่แน่นอน แต่มีราคาค่อนข้างสูง เพราะต้องนำเข้าจากต่างประเทศ โดยราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปนี้จะอยู่ระหว่าง 1,800-3,000 บาท เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการเรียนการสอนให้กับนักศึกษา จึงต้องมีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB จากหัวมันฝรั่งขึ้นมาใช้เอง ซึ่งมีราคาถูกแต่ต้องใช้เวลาในการเตรียมพอสมควร ทั้งยังพบว่ามีปัญหาการขาดแคลนมันฝรั่งในช่วงนอกฤดูการเก็บเกี่ยว และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมได้ในแต่ละครั้งอาจมีสารอาหารไม่คงที่ จึงอาจไม่เหมาะหากจะใช้ในงานวิจัยระดับสูง ดังนั้นจึงได้พิจารณาความเป็นไปได้ของการนำน้ำล้างมันฝรั่งจากขั้นตอนการล้างแผ่นมันฝรั่งมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB และเพื่อเพิ่มความสะดวกจากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง ซึ่งอยู่ในรูปของเหลวยากแก่การจัดเก็บและการนำไปใช้ ตลอดจนอาจเสื่อมเสียคุณภาพระหว่างการเก็บรักษา ในงานวิจัยนี้จึงได้ใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย ทำแห้งน้ำล้างมันฝรั่งให้เป็นผงเพื่อแก้ไขปัญหาข้างต้น โดยจะนำผงน้ำล้างมันฝรั่งที่ได้จากการทำแห้งแบบพ่นฝอยนี้ ไปใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ด้วยหลักการของพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) ใช้การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design, CCD) เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยสำคัญสองปัจจัยที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB จากผงน้ำล้างมันฝรั่ง อันได้แก่ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส ซึ่งนอกจากการศึกษาด้วยวิธี CCD จะช่วยให้สามารถหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมได้แล้ว ยังสามารถแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของผลเมื่อระดับของปัจจัยเปลี่ยนแปลงได้ จึงทำให้ข้อมูลที่มาจากการใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD นี้ อาจถูกนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่งที่มีราคาถูกกว่า สำหรับใช้ในงานการเรียนการสอนต่อไปในอนาคต ควบคู่ไปกับการลดปริมาณน้ำเสียที่จะเข้าสู่ระบบบำบัดได้อีกทางหนึ่ง

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาความความเป็นไปได้ในการใช้น้ำล้างมันฝรั่งเลี้ยงรา ด้วยการออกแบบการทดลองแบบ CCD เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางการพัฒนาสูตรอาหารที่ให้ผลดีเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB สำหรับใช้ในงานการเรียนการสอนทางห้องปฏิบัติการต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่งให้อยู่ในรูปที่สะดวกต่อการใช้งานและการเก็บรักษา โดยมีคุณภาพเทียบเท่า หรือใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป รวมถึงได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์จากการใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD ในการวิเคราะห์ผลเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของปัจจัย เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB จากน้ำล้างมันฝรั่ง ให้สามารถใช้ทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้าต่อไปได้ในอนาคต รวมถึงสามารถช่วยลดปัญหาของเสียจากกระบวนการผลิตมันฝรั่งทอดให้น้อยลงได้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ฟังไจ

ฟังไจ (fungi) หรือ เห็ดรา เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต (eukaryote) ที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) จึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงและสร้างอาหารเองได้ จัดเป็นพวกที่ได้อาหารจากสารอินทรีย์ (heterotrophy) เพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งแบ่งตามลักษณะของเซลล์ได้เป็นสองกลุ่ม คือ ราหลายเซลล์ ประกอบไปด้วยเซลล์เรียงตัวในแนวเดียวกันเป็นเส้นใย หรือไฮฟา (hypha) เรียกว่า ราสาย (mold) และราพวกที่มีเซลล์เดียว เรียกว่า ยีสต์ (yeast)

1. รา (Mold)

รามีโครงสร้างเรียงตัวกันเป็นเส้นใย (multicellular filamentous fungi) เส้นใยราแต่ละเส้นนั้นจะเรียกว่า ไฮฟา (hypha) เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-10 ไมโครเมตร อาจแตกแขนงได้มากมาย เมื่อรวมกลุ่มจำนวนมากจนมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจะเรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) (บุษกร, 2545) เส้นใยรา หรือไฮฟา จะมีลักษณะเป็นเซลล์ติดต่อกันหลายเซลล์ มีผนังกั้น หรืออาจมีลักษณะคล้ายท่อยาวตลอดไม่มีผนังกั้น ภายในประกอบด้วยส่วนประกอบของเซลล์ โดยเส้นใยมีลักษณะแตกต่างกัน 3 ลักษณะ คือ เส้นใยไม่มีผนังกั้น (nonseptate hypha) เส้นใยมีผนังกั้น (septate hypha) แบ่งเซลล์เป็นห้องๆ มีหนึ่งนิวเคลียส (uninucleate) และเส้นใยมีผนังกั้นแต่มีหลายนิวเคลียส (multinucleate) กลุ่มของเส้นใยราอาจมีลักษณะหลวมๆ หรือแน่นมากๆ ก็ได้ ส่วนปลายของเส้นใยราจะมีการเจริญที่ทำให้เกิดการยืดยาวออกไป (อโณทัย, 2535ข: 125-126; สมจิตร, 2552: 2) สามารถแบ่งหน้าที่ของเส้นใยราออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนสืบพันธุ์ (fertile hypha) กับส่วน เวเจเตติฟ (vegetative part) ส่วนสืบพันธุ์สามารถสร้างสปอร์ และส่วนเวเจเตติฟนี้อาจอยู่บนผิวอาหารหรือแทงลงไปในอาหารก็ได้ เพื่อดูดสารอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของรา (อโณทัย, 2535 ข: 126) ตามปกติราสืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ หรือใช้เส้นใยราก็ได้ ซึ่งการสร้างสปอร์ทำได้สองแบบ คือ แบบอาศัยเพศ (non-asexual spore) และแบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) สปอร์แบบอาศัยเพศที่สร้างโดยรา ได้แก่ โอสปอร์ (oospore) ไซโกสปอร์ (zygospore) แอสโคสปอร์ (ascospore) และแบสิดิโอสปอร์ (basidospore) ในการสืบพันธุ์แบบนี้จะมีการผสมกันระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ (sex cell) และนิวเคลียส ส่วนสปอร์แบบไม่อาศัยที่สร้างโดยรา ได้แก่ สปอร์แรงจิโอสปอร์(sporangiospore) โคนิเดีย (conidia) หรือ โคนิดิโอสปอร์ (connidiospore) คลามิโดสปอร์

(clamydospore) และอาร์โทร์สปอร์ (arthrospore) เป็นต้น สร้างขึ้นโดยการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยราที่เติบโตเต็มที่หลุดออกเป็นท่อนๆ ซึ่งไม่เกิดการรวมนิวเคลียสหรือการแบ่งนิวเคลียสแต่อย่างใด และมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส (mitosis) ได้เพียงอย่างเดียว (บุษกร, 2545; วิจัย, 2551: 9-11)

การเติบโตของรา เป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น ราที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous fungi หรือ mold) การเจริญเติบโตจะทำให้เส้นใยมีความยาวและมีการแตกแขนงมากขึ้น อาจวัดการเจริญจากขนาดของโคโลนี (colony) หรือน้ำหนักแห้ง (biomass) ของเส้นใยราสามารถแบ่งเซลล์เจริญยืดยาวออกจากส่วนปลายทุกด้านของเส้นใย ราที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารวุ้น จะมีการยืดยาวของเส้นใยออกไปจากจุดที่เพาะเชื้อ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีอายุน้อยกว่าเซลล์ที่อยู่ด้านในของโคโลนี (สมจิตร, 2552: 33-35) เมื่อราเติบโตบนอาหารอาจเห็นกลุ่มใยมีลักษณะคล้ายกับสำลี มีสีต่างๆ สีของราอาจขึ้นอยู่กับชนิดของรานั้นๆ หรือขึ้นอยู่กับอายุของรา หรือขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่ราเติบโต ราบางชนิดกลุ่มใยรามีลักษณะฟูแต่บางชนิดอัดตัวกันแน่น ลักษณะราด้านบนที่ปรากฏอาจคล้ายกำมะหยี่ หรือมีลักษณะแห้งและเป็นผง ในขณะที่ราบางชนิดอาจมีลักษณะเปียกหรือคล้ายวุ้น สารสีในใยซึ่งมีสีแดง ม่วง เหลือง น้ำตาล เทาและดำ เป็นลักษณะค่อนข้างเฉพาะ เช่นเดียวกับสารสีในสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งอาจมีสีเขียว น้ำเงินเขียว เหลือง ส้ม ชมพู น้ำตาล เทาและดำ ลักษณะโคโลนีด้านบนจะแตกต่างจากด้านล่าง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของรา (อโณทัย, 2535ก: 39-41)

ราสามารถทนอยู่ได้และเติบโตในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าจุลินทรีย์ประเภทอื่นๆ ราสามารถเติบโตในอาหารที่มีน้ำตาลอยู่มากกว่าแบคทีเรีย เนื่องจากราทนทานต่อแรงดันออสโมซิส (osmotic pressure) ได้ดีกว่า ราทนอยู่ได้และเติบโตในอาหารที่มีช่วงความเป็นกรด-เบส กว้างกว่าแบคทีเรียโดยเฉพาะความเป็นกรดจะทนได้มากกว่า คือ อยู่ในช่วงระหว่าง 2-9 ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมของราส่วนมาก คือ 5.6 ราสามารถทนและเติบโตในอาหาร หรือวัตถุที่มีความชื้นต่ำกว่าแบคทีเรีย (ยกเว้นสปอร์แบคทีเรีย) เมื่อมีความชื้นจำกัดราจะสร้างสปอร์ หรือระยะพักตัวชนิดอื่นๆ ราส่วนมากต้องการออกซิเจนในการเติบโต และต้องการช่วงอุณหภูมิค่อนข้างกว้าง คือ ตั้งแต่ 0-62 องศาเซลเซียส แต่ช่วงที่เหมาะสม คือ 22-23 องศาเซลเซียส (อโณทัย, 2535ข: 131) อาหารของรามีหลายชนิดโดยที่ กลูโคส (glucose) เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon source) และพลังงานที่ดีสำหรับราทุกชนิด น้ำตาลชนิดอื่นๆ เช่น ซูโครส (sucrose) และมอลโทส (maltose) รวมทั้งสารประกอบคาร์บอนอินทรีย์อื่นๆ เช่น สตาร์ช (starch) และเซลลูโลส (cellulose) นั้น มีราหลายชนิดสามารถใช้ได้ ส่วนไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) ที่อยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียม (ammonium salt) หรือ ไนเตรท (nitrate) ราบางชนิดสามารถใช้ได้ แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen) เช่น เพปโทน (peptone) นอกจากนี้รายังต้องการ

แร่ธาตุต่างๆ ซึ่งจำเป็นต่อการเติบโต และมีราบางชนิดที่ต้องการวิตามินด้วย อาหารที่ใช้เลี้ยงราอาจเป็นอาหารจากธรรมชาติ เช่น ผลไม้บด ผักบด เมล็ดธัญพืช หรือเนื้อสัตว์ แต่ไม่นิยมใช้กัน อาหารสังเคราะห์เป็นที่นิยมใช้กันมากกว่า ซึ่งมีส่วนประกอบของมันฝรั่งบดหรือต้มสุก ผสมกับวุ้นและกลูโคส หรืออาจมีสูตรอื่นๆ อีก (อโณทัย, 2535ก: 131-132)

ราดูดกินอาหารเพื่อการเจริญเติบโต และหยุดการเจริญเติบโตเมื่ออาหารเหลือน้อยลง ดังนั้นปริมาณอาหารที่น้อยลงจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่กระตุ้นให้ราสร้างสปอร์ สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตมักจะไม่เหมือนกับสภาพที่ราจะสร้างสปอร์ ราหลายชนิดสร้างสปอร์หลายแบบ แต่ละแบบตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมเฉพาะ เมื่อเลี้ยงราบนผิวหน้าของอาหารแข็ง ราจะเจริญเป็นวงกลม เป็นรัศมี มีบริเวณรอบนอก หรือขอบ (extension zone) แล้วสร้างสปอร์ หรือฟรุตติ้งบอดี (fruiting bodies) ส่วนการเลี้ยงราในอาหารเหลว ส่วนใหญ่ราทั่วไปจะเจริญอยู่เฉพาะที่ผิวหน้าของอาหารเหลวที่ไม่มีการกวน ส่วนอาหารเหลวที่มีการกวนเชื้อจะเจริญจมอยู่ในอาหาร ระดับอาหารมีผลต่อการสร้างสปอร์ที่ 3 ระยะใหญ่ด้วยกัน คือ ระยะเจริญเติบโต (vegetative growth) ระยะเหนี่ยวนำให้สร้างสปอร์ (induction of sporulation) และระยะสร้างสปอร์ได้สมบรูณ์ (completion of sporulation) โดยที่ระยะการเจริญเติบโต ราหลายชนิดสร้างสปอร์เมื่อมีการเจริญเติบโตจำกัด ราบางชนิดที่มีฟรุตติ้งบอดีขนาดใหญ่ต้องการเส้นใยจำนวนมาก จึงต้องการอาหารในช่วงแรกมากกว่าปกติ อาหารที่มีความเข้มข้นน้อย หรืออาหารที่ย่อยยาก เช่น แป้ง อาจกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ได้ อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C: N ratio) ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการสะสมอาหาร เช่น ไกลโคเจน (glycogen) กระตุ้นให้ราสร้างสปอร์ได้ ส่วนในระยะเหนี่ยวนำให้สร้างสปอร์ ในราเกือบทุกชนิด เมื่อไนโตรเจนในอาหารเหลือน้อยลง เป็นปัจจัยสำคัญที่เป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้างสปอร์ แต่ถ้าขาดธาตุคาร์บอนด้วย ราจะย่อยสลายตัวเอง และที่ระยะสร้างสปอร์ได้สมบูรณ์ ระหว่างที่มีการสร้างสปอร์จะมีการเปลี่ยนแปลงสารสังเคราะห์ภายในรา เนื่องจากสปอร์แตกต่างจากเส้นใยทั้งในแง่รูปร่างและองค์ประกอบ ราส่วนใหญ่มีการสะสมสารไบโอติน (biotin) ระหว่างที่มีการสร้างสปอร์ ราหลายชนิดต้องการแสงในการสร้างสปอร์ ซึ่งส่วนใหญ่ต้องการแสงที่มองเห็นได้ (visible light) แต่บางชนิดต้องการแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) (นิวัฒ, 2543: 117-121)

2. ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์จะมีลักษณะเป็นเซลล์เดียว (unicellular fungi) มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม ทรงรี สามเหลี่ยม รูปร่างคล้ายผลมะนาวแถบประเทศตะวันตก (lemon) เป็นต้น มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีแตกหน่อ (budding) หรือแบบอาศัยเพศ โดยวิธีการสร้างสปอร์ชนิด

แอสโคสปอร์ หรือแบสิดิโอสปอร์ ซึ่งส่วนใหญ่ยีสต์จะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ ทั้งนี้หากอายุของเซลล์ยีสต์ที่ยังไม่มากจะพบเซลล์ที่กำลังแตกหน่อ โดยจะมีความกว้างของเซลล์ประมาณ 2.5-10.5 ไมโครเมตร อย่างไรก็ตามขนาดเซลล์ยีสต์จะขึ้นกับการเจริญเติบโต ยีสต์แท้ (true yeasts, ascomycotina) จะมีการสร้างแอสโคสปอร์แบบอาศัยเพศ โดยเซลล์ของยีสต์เปรียบเสมือนแอสคัส (ascus) การเกิดแอสโคสปอร์ของยีสต์แท้ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นภายหลังการเกิดคอนจูเกต (conjugation) ของเซลล์ 2 เซลล์ แต่ในยีสต์บางชนิดอาจเกิดแอสโคสปอร์ได้โดยไม่ต้องมีการคอนจูเกต ส่วนยีสต์เทียม (false yeasts) เป็นยีสต์ที่ไม่สร้างแอสโคสปอร์ หรือไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จัดเป็นพวกฟังไจไม่สมบรูณ์ ยีสต์พวกนี้มักจะสร้างคลาไมโดสปอร์ ยีสต์ส่วนใหญ่จะมีการใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอน เซลล์ยีสต์จะมีการเจริญเติบโตและแพร่ขยายจำนวนภายใต้สภาวะต่างๆ เช่น อาหาร อุณหภูมิ และปัจจัยแวดล้อมในกระบวนการหมักที่เหมาะสม ด้วยการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และแอลกอฮอล์ (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2549: 7-11; สุมาลี, 2541) ปกติการเพิ่มจำนวนของเซลล์ยีสต์จะเกิดในสภาวะที่เหมาะสมเท่านั้น ในกรณีของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ถ้าเชื้อเจริญอยู่ในอาหารเพียงพอก็จะเพิ่มจำนวนได้เป็นสองเท่าภายในเวลาสั้นๆ แต่ถ้าอาหารหมดลงยีสต์นั้นจะเข้าสู่ระยะที่ไม่มีการแตกหน่อ (unbudded phase) แต่เซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่ และเมื่อกลับมามีอาหารขึ้นอีก เซลล์จะสามารถเจริญได้ต่อไป (สาวิตรี, 2549)

ถ้าเลี้ยงยีสต์ในสภาพแวดล้อมที่เป็นระบบปิด ที่มีการใส่อาหารเพียงครั้งเดียวตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (batch culture) การเจริญเติบโตที่มีการเพาะเลี้ยงในระบบปิดจะเป็นในลักษณะเดียวกับจุลินทรีย์เซลล์เดี่ยวกลุ่มอื่นๆ โดยกราฟการเติบโต (growth curve) เป็นแบบ sigmoid curve ซึ่งมีระยะการเจริญเติบโตแบ่งแบบกว้างๆ ได้เป็น 4 ระยะ ได้แก่ lag phase ซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นของการเจริญโดยจุลินทรีย์ จะมีการปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ และเตรียมพร้อมในการแบ่งเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีการแบ่งเซลล์ได้เซลล์เป็นจำนวนมาก เนื่องจากในช่วงนี้มีสารอาหารที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต เรียกระยะการเจริญเติบโตในช่วงนี้ว่า log phase (exponential phase) ต่อมาเข้าสู่ stationary phase ในระยะนี้สารอาหารเริ่มมีปริมาณจำกัด สภาพแวดล้อมเริ่มไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต มีของเสียหรือสารเคมีพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึมมากขึ้น ทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตลดลง ในระยะนี้จะพบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ ต่อมาระยะสุดท้ายเรียกว่า decline phase ในระยะนี้สารอาหารขาดแคลน และสภาพแวดล้อมต่างๆ ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ทำให้อัตราการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้น (สมจิตร, 2552: 33-34) ส่วนลักษณะการเจริญของโคโลนียีสต์บนอาหารที่ปรากฏ หากเป็นโคโลนีอายุน้อยจะชื้นมาก หรือเป็นเมือก ส่วนใหญ่จะมีสีขาว ครีมและ

ชมพู บางโคโลนี เมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย ในขณะที่บางโคโลนีจะเริ่มแห้งและย่น ยีสต์ทั่วๆ ไปจะเจริญได้ดีในที่มีความชื้นเพียงพอ แต่เนื่องจากยีสต์หลายชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูงได้มากกว่าแบคทีเรีย ซึ่งอาจสรุปได้ว่า ยีสต์มีความต้องการความชื้นน้อยกว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ แต่อย่างไรก็ตามยีสต์ต้องการความชื้นมากกว่าราา ยีสต์เจริญในช่วงอุณหภูมิเดียวกันกับรา ช่วงที่เหมาะสมอยู่ที่ 25-35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิขั้นสูงที่เจริญได้ คือ 35-47 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า ยีสต์เจริญได้ดีที่ค่า pH เท่ากับ 4-4.5 และเจริญได้ไม่ดีในอาหารที่เป็นด่าง การเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนจะเป็นไปได้ดีมาก (สุมาลี, 2541)

ตามปกติน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานที่ดีที่สุดของยีสต์ แม้ว่าพวกออกซิเดทีฟ (oxidative yeast) จะออกซิไดซ์ (oxidize) กรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์ได้พลังงานออกมาใช้ ยีสต์ใช้อาหารที่มีไนโตรเจนเป็นแหล่งของไนโตรเจนได้หลายอย่าง เช่น แอมโมเนีย (ammonia) ยูเรีย (urea) กรดอะมิโน (amino acid) จนถึง โพลีเพปไทด์ (polypeptide) นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการสารช่วยในการเจริญบางอย่างด้วย (สุมาลี, 2541) ยีสต์หลายชนิดสามารถใช้สารแตกต่างกัน เช่น อาจใช้เพนโทส (pentose) บางชนิดอาจใช้ สตาร์ช น้ำตาลแอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ และกรดอื่นๆ นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการ กำมะถันในรูปของซัลเฟต แต่บางชนิดต้องการกำมะถันอินทรีย์ และแร่ธาตุต่างๆ เพื่อการเติบโตที่ดี อาหารเลี้ยงยีสต์ในห้องปฏิบัติการนั้นอาจใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Agar (MA) ซึ่งใช้ในการแยกเฉพาะยีสต์ หรืออาจใช้อาหารของวิกเกอร์แฮม (Wicker's medium) ก็ได้ หรืออาจใช้อาหารจากแหล่งธรรมชาติ เช่น ผลไม้และผักเพื่อเลี้ยงยีสต์ก็ได้ อาหารบางชนิดช่วยให้ยีสต์สร้างสปอร์ได้ดีขึ้น เช่น อาหารสร้างสปอร์ (sporulation medium) เป็นต้น (อโณทัย, 2535ก: 121-122)

3. ลักษณะทั่วไปของราและยีสต์ที่ใช้ในการศึกษาและวิจัย

3.1 *Rhizopus oligosporus*

จัดอยู่ใน Kingdom Mycota, Division Eumycota, Subdivision Zygomycotina, Class Zygomycetes, Order Mucorales, Family Mucoraceae, Genus *Rhizopus* (Rao et al., 2011: 31) ราใน Genus *Rhizopus* เป็นราพวกที่ไม่มีผนังกั้นในเส้นใย มีโคโลนีที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว มีสโตลอน (stolon) มีรงควัตถุที่ไรซอยด์ (rhizoid) และในช่วงวงจรที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะมี สปอร์แรงจิโอฟอร์ (sporangiophore) สปอร์แรงจิโอฟอร์มีลักษณะเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่มๆ ละ 5 อัน บางครั้งมีลักษณะคล้ายส้อมหรือง่าม ผนังเรียบ มีความยาวถึง 150-2,000 ไมโครเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-14 ไมโครเมตร ภายในสปอร์แรงเจียม (sporangium) มีสปอร์ที่มีขนาดใหญ่มาก เมื่อมีอายุยังน้อยมีสีขาว เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมดำ คอลัมเมลลา (columella) มีสีน้ำตาล

รูปร่างกลมหรือครึ่งวงกลมและมี อะโปไฟซีส (apophysis) สปอร์มีรูปร่างแบบรูปไข่กลมสั้นๆ มุมไม่สม่ำเสมอ มักมีร่องเล็กๆ บนผิวสปอร์ (บางครั้งไม่มีร่อง หากพบสปอร์ในน้ำ) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต คือ 30-35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่เจริญเติบโตได้ คือ 5-7 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญเติบโตได้ คือ 44-49 องศาเซลเซียส (เสาวนิตย์, 2550)

3.2 *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* เป็นราพวกมีผนังกั้นเส้นใย มีโคโลนีที่เจริญอย่างรวดเร็ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-5 เซนติเมตร เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ที่ยาวชูตั้งตรง โคนิดิโอฟอร์ไม่มีผนังกั้น ใส ไม่มีสี มีความยาวถึง 4-5 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่ผนังขรุขระ ไม่แตกแขนง และโป่งพองที่ปลายเรียกว่า เวสซิเคิลเฟียไลด์ (vesicle phialide) กำเนิดขึ้นโดยตรงจาก เวสซิเคิล หรืออาจกำเนิดบนเมตูเล (metulae) โดยโครงสร้างทั้งหมดที่ประกอบด้วย เวสซิเคิลเฟียไลด์ เมตูลา (ถ้ามี) และโคนิเดีย รวมเรียกว่า หัวโคนิเดีย (conidia head) โคนิเดียเป็นชนิดแห้ง ต่อยาวเป็นสายโซ่อัดกันแน่นอยู่ในลักษณะลำ หรือคอลัมน์ เรียกว่า คอลัมนา (columnar) หรือสายโซ่ของโคนิเดียมีการกระจายเรียงตัวในแนวรัศมี เรียกว่า เรดิเอท (radiate) มีสีเหลืองเขียวอ่อน ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลสว่างจนถึงน้ำตาลมัวๆ โคนิเดียเป็นรูปไข่กลมในขณะที่ยังอ่อน เมื่อแก่มีรูปร่างกลมถึงค่อนข้างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5-8 ไมโครเมตร สีเขียว ผนังเรียบถึงขรุขระเล็กน้อย (เสาวนิตย์, 2550)

3.3 *Saccharomyces cerevisiae*

จัดอยู่ใน Kingdom Mycota, Division Eumycota, Subdivision Ascomycotina, Class Hemiascomycetes, Family Saccharomycetaceae, Genus *Saccharomyces* เป็นยีสต์แท้ (hemiascomycetes) เซลล์ของยีสต์ใน Genus นี้จะเป็นรูปกลม รูปไข่ หรือค่อนข้างยาว อาจมีการสร้างไมซีเลียม เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนด้วยการแตกหน่อ ชนิดแบบที่เกิดได้ที่ขั้วของเซลล์ และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้างแอสโคสปอร์ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังจากคอนจูเกชัน (conjugation) หรืออาจพัฒนาจากเซลล์ดิพลอย ที่อยู่ในระยะเวเจตเททีฟ แอสโคสปอร์มักมีรูปกลมหรือไข่ มีจำนวน 1 ถึง 4 ต่อแอสคัส สปอร์มีลักษณะกลมถึงรี ผิวสปอร์เรียบ ยีสต์ในจีนัสนี้สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ แต่ใช้เกลือไนเตรตไม่ได้ ยีสต์ *S. cerevisiae* มีบทบาทในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น ขนมปัง ไวน์ กลีเซอรอล (glycerol) และอินเวอร์เตส (invertase) สามารถหมักน้ำตาลในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) ทำให้ได้แอลกอฮอล์ แต่ในสภาวะมีออกซิเจน ยีสต์ชนิดนี้จะสลายน้ำตาลให้กลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ (สุมาลี, 2541; สุวิมล, 2546: 76)

อาหารเลี้ยงรา

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงรามีมากมายหลายชนิด ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้จะมีผลต่อการเจริญของรา โดยที่ราแต่ละชนิดจะมีความต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงราจึงควรเลือกชนิดของอาหารให้เหมาะสม ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงราทั่วไป คือ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA เป็นหลัก ซึ่งจะมีปริมาณของสารอาหารค่อนข้างสูง (วิไลลักษณ์, 2549: 22) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงราสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ กลุ่มอาหารที่เป็น non-synthetic media หรือ complete media คือ อาหารที่ไม่ทราบองค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอน เช่น อาจมีส่วนผสมบางอย่างที่ได้จากธรรมชาติ จากพืช หรือสัตว์ เช่น สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) หรือ คอร์นมีล (corn meal) ผสมอยู่ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Corn meal อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร CMA และอีกกลุ่มหนึ่ง คือ อาหารที่เป็น synthetic media หรือ อาหารสังเคราะห์ หมายถึงอาหารที่ทราบส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอน เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Czapek's medium และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Glucose medium เป็นต้น

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato Dextrose Agar (PDA)

ในการเลี้ยงหรือแยกเชื้อรา ส่วนใหญ่มักใช้อาหารแข็งสูตร PDA เป็นหลัก เพราะสามารถกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์และรงควัตถุ (pigment) ได้ดี นอกจากนี้ PDA ยังถูกใช้ในการตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนของยีสต์และราในอาหาร ผลิตภัณฑ์จากนม (dairy products) และเครื่องสำอาง (cosmetics) ด้วยเทคนิคการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะบนจานอาหาร (plate count method) การใช้งานทั่วไปสามารถเติมกรด หรือยาปฏิชีวนะ (antibiotics) เพิ่มลงในไปอาหาร เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สามารถเตรียมได้เองจากการนำน้ำสกัดของมันฝรั่งที่ได้จากการต้ม (potato infusion) และกรองเอาเศษมันฝรั่งออก มาเติมน้ำตาลเดกซ์โทรส (dextrose) กับผงวุ้นอะการ์ (agar) ลงไป (อาหารเหลวสูตร Potato Dextrose Broth, PDB คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบเช่นเดียวกันกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แต่ปราศจากการเติมผงวุ้นอะการ์ลงไป) หรือเตรียมได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทั้งสองวิธีดังกล่าว เป็นวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ซึ่งจะได้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรต คือ น้ำตาลเดกซ์โทรส เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของรา สารอาหารอื่นๆ จากน้ำสกัดของมันฝรั่งที่อุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการ ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของฟังไจ และวุ้นที่เติมลงไปเพื่อทำให้อาหารแข็งตัว โดยยีสต์และราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้จะสามารถ

พัฒนาลักษณะทางด้านโครงสร้าง หรือรูปร่างได้ดี ใช้เวลาในการเจริญประมาณ 5-7 วัน ที่อุณหภูมิ 30?2 องศาเซลเซียส การเจริญของยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จะมีลักษณะเป็นโคโลนีสีขาวครีม ส่วนราจะสร้างโคโลนีที่มีลักษณะเป็นเส้นใยฟูคล้ายปุยสำลี หรือเป็นแผ่นคล้ายพรมกำมะหยี่หลากหลายสี ในการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อการตรวจนับจำนวนของยีสต์และรา เพื่อความแม่นยำควรมีการปรับค่า pH ของอาหารให้ต่ำลงอยู่ที่ประมาณ 3.5 เพื่อยับยั้งการเจริญของพวกแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาด้วย เช่น การเติมสารละลายกรดทาร์ทาริก (tartaric acid) ที่ปราศจากเชื้อความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterilized medium) และรอจนมีอุณหภูมิเย็นลงอยู่ที่ 45-50 องศาเซลเซียส และเมื่อเติมกรดลงในอาหารแล้วไม่ควรให้อาหารถูกความร้อนอีก เพราะจะทำให้เกิดการไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) อาหารจะไม่แข็งตัว (European Pharmacopoeia, 2007 cited by RCI Labscan Limited, 2007)

2. การควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปทางจุลชีววิทยา

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปทางการค้าต่างๆ ทุกชนิดต้องมีการควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนที่จะนำออกสู่ตลาด ซึ่งการทดสอบคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อทางจุลชีววิทยากับฟังไจมาตรฐานต่างๆ ผลการทดสอบประสิทธิภาพดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพ เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังจากการบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ? 2 องศาเซลเซียส โดยสังเกตการเจริญเติบโตตั้งแต่ 18-24 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยง

เชื้อจุลินทรีย์	การเจริญ
Aspergilus niger ATCC 16404	ดี
Candida albicans ATCC 10231	ดี
Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763	ดี

ที่มา: European Pharmacopoeia (2007) cited by RCI Labscan Limited (2007)

มันฝรั่ง

มันฝรั่ง (potato) เป็นพืชหัวใต้ดินที่ให้คุณค่าทางอาหารประเภทแป้งสูง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Solanum tuberosum* L. มีชื่อเรียกอย่างอื่นว่า irish potato หรือ white potato สำหรับประเทศไทยนั้น เกษตรกรทางภาคเหนือเรียกว่า มันอาลู หรือ มันอะลู มันฝรั่งจัดอยู่ใน Family Solanaceae ส่วนของมันฝรั่งที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ คือ หัวที่สะสมอาหาร (tuber) อยู่ใต้ผิวดิน มาเป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ 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 แคลอรี่ และ 99.9 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตไม่มีไขมัน นอกจากนี้มันฝรั่งยังมีธาตุแคลเซียม (calcium) โพแทสเซียม (potassium) ฟอสฟอรัส (phosphorus) ไอโอดีน (iodine) แมกนีเซียม (magnesium) เหล็ก กรดโฟลิก (folic acid) วิตามินซี วิตามินบี 1 และบี 2 เมื่อวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของมันฝรั่งจะพบว่า หัวมันฝรั่งประกอบไปด้วยธาตุอาหารในปริมาณต่างๆ ดังแสดงในตาราง 2 (บุญธรรม, 2547: 6-7)

ตาราง 2 คุณค่าทางอาหารของหัวมันฝรั่ง (ปริมาณต่อ 100 กรัม)

รายการ		ปริมาณต่อ 100กรัม
Water (%)		77.8
Food energy (Cal)		83.0
Protein (g)		2.0
Fat (g)		0.1
Carbohydrate	- total (g)	19.1
	- fiber (g)	0.4
	- sugar (g)	1.0
	- other (g)	15.0
Ash (g)		1.0
Ca (mg)		19.0
Mg (mg)		20.0
P (mg)		56.0
K (mg)		370.0
Na (mg)		9.0
Vitamin A (IU)		20.0
Thiamin (mg)		0.11
Riboflavin (mg)		0.04
Niacin (mg)		1.20
Ascorbic acid (mg)		38.0

ที่มา: บุญธรรม (2547)

2. มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ และน้ำเสียจากโรงงานมันฝรั่งทอดกรอบ

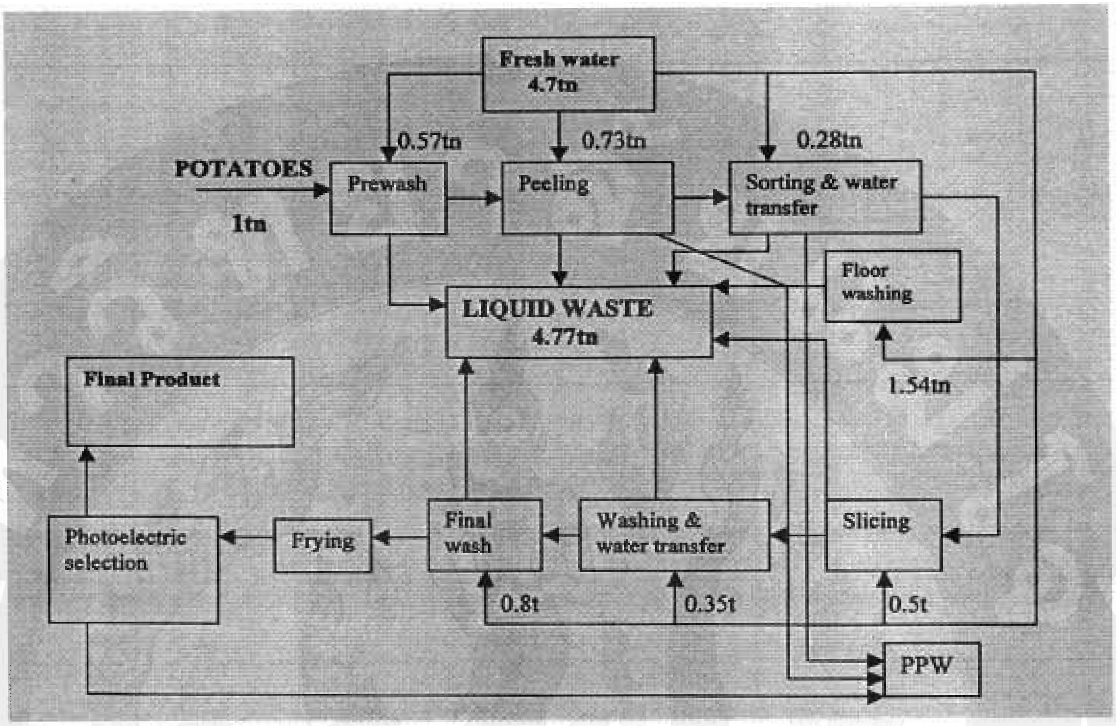
จากแนวโน้มการบริโภคมันฝรั่งที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การแปรรูปผลิตภัณฑ์จากมันฝรั่งมากขึ้นตามไปด้วย เช่น มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ (potato chips) และมันฝรั่งเส้น (french fries) ทั้งในรูปแช่แข็งและทอด (หทัยชนก และ เพ็ญศิริ, 2547: 1) อุตสาหกรรมผลิตมันฝรั่งทอดกรอบ เป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมผลิตอาหารว่างประเภทขนมขบเคี้ยว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

1. การทำความสะอาด เริ่มต้นจากหัวมันฝรั่งดิบถูกปล่อยออกมาจากเครื่องป้อนมันฝรั่งลงสู่สายพานลำเลียง ที่มีเครื่องฉีดน้ำทำการล้างเศษดินออกจากเปลือกหัวมันฝรั่งและถูกขัดให้เปลือกหลุดออกด้วยเครื่องขัดผิวมันฝรั่ง จากนั้นหัวมันฝรั่งจะถูกส่งตามสายพานลำเลียง ซึ่งจะมีผู้ทำการตรวจสอบ คอยตรวจสอบตำหนิและตัดแต่งหัวมันฝรั่งโดยใช้มีดเฉือนส่วนที่มีตำหนิออกหรือส่วนเกินให้ได้ขนาดตามต้องการ

2. การหั่นหรือฝาน เริ่มต้นจากหัวมันฝรั่งที่ผ่านการตรวจสอบและการตกแต่งเรียบร้อยแล้วเลื่อนเข้าสู่เครื่องหั่นหัวมันฝรั่ง ซึ่งจะทำการหั่นหัวมันฝรั่งดิบให้เป็นแผ่นที่มีความหนา 0.6-0.7 มิลลิเมตรจากนั้นมันฝรั่งแผ่นจะเคลื่อนตามสายพานลำเลียง โดยผ่านน้ำเพื่อล้างน้ำแป้งที่เกิดจากการหั่นหัวมันฝรั่งซึ่งติดกับแผ่นมันฝรั่งออก

3. การทอด เริ่มต้นจากมันฝรั่งแผ่นที่ผ่านการล้างเอาน้ำแป้งออกเรียบร้อยแล้ว ถูกลำเลียงเข้าสู่เครื่องทอดซึ่งเป็นแบบระบบปิด โดยมีความร้อนภายในเครื่องทอดประมาณ 185 องศาเซลเซียส และใช้ระยะเวลาทอด 15-20 วินาที ความร้อนจากเครื่องทอดจะถูกระบายด้วยเครื่องดูดอากาศออกสู่บรรยากาศภายนอก จากนั้นแผ่นมันฝรั่งทอดกรอบจะถูกเลื่อนไปตามสายพานลำเลียง ซึ่งจะผ่านเครื่องตรวจสอบและคัดแยกมันฝรั่งทอดกรอบที่มีรอยดำทิ้ง และมันฝรั่งทอดกรอบจะเคลื่อนมายังผู้ตรวจสอบเพื่อทำการตรวจสอบคุณภาพ โดยผู้ตรวจสอบจะต้องสวมถุงมือในการหยิบแผ่นมันฝรั่งที่ไม่ได้คุณภาพทิ้ง เช่น แผ่นมันฝรั่งที่มีรอยดำและไม่ได้ขนาดตามมาตรฐาน เมื่อแผ่นมันฝรั่งผ่านการตรวจสอบแล้ว จะถูกปรุงรสด้วยเครื่องปรุงรสตามความต้องการ

4. การบรรจุ เริ่มจากแผ่นมันฝรั่งทอดกรอบที่ผ่านการปรุงรสเลื่อนตามสายพานลำเลียงไปยังห้องบรรจุ ซึ่งเครื่องบรรจุพร้อมปิดผนึกจะทำการชั่งน้ำหนักมันฝรั่งทอดกรอบให้ได้ตามกำหนดและทำการปิดผนึกอัตโนมัติ จากนั้นซองมันฝรั่งทอดกรอบที่บรรจุแล้วจะเลื่อนไปตามสายพานลำเลียง



ภาพ 1 กระบวนการผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ และน้ำเสียที่เกิดขึ้นในระบบ
ที่มา: Arapoglou et al. (2010)

จากภาพ 1 แสดงกระบวนการผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ และน้ำเสียที่เกิดขึ้นในระบบ ซึ่งมีการใช้น้ำตลอดกระบวนการรวมแล้วเป็นปริมาณมาก เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการล้างทำความสะอาดหัวมันฝรั่ง (prewash) เพื่อกำจัดเศษดิน หิน และสิ่งปนเปื้อนออกไปก่อนส่งหัวมันฝรั่งเข้าสู่ขั้นตอนการปลอกเปลือก (peeling) และฝาน (slicing) ไปจนถึงการล้างแผ่นมันฝรั่งดิบก่อนเข้าเตาทอด (final wash) ซึ่งมีการใช้น้ำในทุกขั้นตอน รวมถึงวิธีการใช้น้ำลำเลียงมันฝรั่ง (water transfer) เพื่อเข้าสู่ขั้นตอนต่างๆ ด้วย โดยสรุปแล้วในการผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบที่ใช้หัวมันฝรั่งเป็นวัตถุดิบ 1 ตัน จะมีการใช้น้ำปริมาณ 4.7 ตัน ซึ่งก่อให้เกิดน้ำเสีย 4.77 ตัน โดยพบว่าในขั้นตอนการล้างแป้งและน้ำตาลออกจากแผ่นมันฝรั่งดิบ เพื่อทำให้ได้มันฝรั่งที่ทอดออกมาไม่เป็นสีน้ำตาล หรือมีรสเกรียม ก่อให้เกิดน้ำเสียจากการล้างที่มีสัดส่วนของแป้งที่ถูกล้างออกมาประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัตถุดิบ (Gelinas and Barrette, 2007) และเนื่องจากแป้งมีคุณสมบัติพองตัวเมื่อได้รับความร้อนกับน้ำพร้อมกัน ทำให้เป็นอุปสรรคในการบำบัด เมื่อน้ำล้างแผ่นมันฝรั่งดังกล่าวผ่านเข้าสู่ระบบบำบัดโดยตรง เพราะไม่สามารถเข้าสู่ถังตกตะกอนเพื่อแยกปริมาณของแข็งออกจากน้ำล้าง เนื่องจากเมื่อแป้งเกิดการพองตัวแล้ว จะเกิดสภาพเป็นสารแขวนลอย ปัญหานี้ส่งผลให้เกิด

กลิ่นเหม็นจากระบบบำบัดน้ำเสียกระจายไปยังพื้นที่ใกล้เคียง (วราภรณ์, ม.ป.ป.) จากการศึกษาลักษณะน้ำเสียของโรงงานผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบพบว่า มีค่า บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD) ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD) ปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมด หรือ ทีดีเอส (Total Dissolved Dolids, TDS) สารแขวนลอยทั้งหมด หรือ ทีเอสเอส (Total Suspended Solid, TSS) และคาร์บอนอินทรีย์ทั้งหมด หรือ ทีโอซี (Total Organic Carbon, TOC) ในปริมาณสูงก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา (Azab, 2008) เช่นตัวอย่างการวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำเสียที่มาจากโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ Haldiram marketing Ltd., New Delhi โดย Mishra et al. (2004) พบว่ามีปริมาณสารอินทรีย์จำนวนมาก ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 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
BOD	1,950 g/ l
COD	8,122 g/ l
pH	7.5

ที่มา: Mishra et al. (2004)

ในกระบวนการแปรรูปมันฝรั่งนั้นจะมีส่วนที่เหลือทิ้งเป็นจำนวนมากประมาณ 20-50 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุดิบที่เข้าสู่กระบวนการผลิต โดยส่วนที่ทิ้งนั้นได้มาจากกระบวนการปอกเปลือก การตัดแต่ง การฝาน และการล้าง (Mahmood et al., 1998) ซึ่งอาจจะเรียกโดยรวมว่า ของเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปมันฝรั่ง (potato proeessing wastes) ทั้งนี้ ของเหลือทิ้งดังกล่าวได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวางมาเป็นเวลานาน เช่น ส่วนของเปลือกที่เกิดจาก

กระบวนการขูด (caustic peel waste) ก็ได้มีการนำไปเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus foetidus* NRRL337 เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส (amylase) และสามารถต่อยอดไปถึงการผลิตเป็นเอทานอล (Bloch et al., 1973) ไม่เพียงเท่านั้น เปลือกมันฝรั่งก็สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ เช่น จากงานวิจัยของ Onwubuemeli et al. (1985) ที่มีการนำเศษมันฝรั่งมาเลี้ยงโคนม ร่วมกับอาหารหลัก คือ ข้าวโพด ซึ่งก็พบว่าไม่ได้ทำให้ปริมาณน้ำนมที่ได้และองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำนมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมที่เลี้ยงด้วยข้าวโพดเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเลี้ยงด้วยเศษมันฝรั่งในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร จะช่วยลดไขมันในน้ำนมและเกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของอะซิเตทกับโพรพิโอเนท (acetate: propionate) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่ระเหยง่าย (Volatile Fatty Acid, VFA) ในกระเพาะรูเมนด้วย นอกจากนี้ Stevens and Gregory (1987) ยังได้ใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งจากโรงงานแปรรูปมันฝรั่ง เป็นแหล่งอาหารเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจาก *Cephalosporium eichhorniae* สำหรับเสริมลงในอาหารสัตว์ พบว่า เมื่อเลี้ยง *C. eichhorniae* ด้วยอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต 2 เปอร์เซ็นต์ เสริมด้วยแอมโมเนียมฟอสเฟต (ammonium phosphate) 0.506 กรัมต่อลิตร และธาตุเหล็ก 0.1 กรัมต่อลิตร ค่า pH เท่ากับ 3.75 สามารถผลิตมวลเซลล์ได้เท่ากับ 0.61 กรัมน้ำหนักแห้ง (gram cell dry weight) ต่อกรัมคาร์โบไฮเดรดของสับสเตรท ซึ่งมวลเซลล์ที่ได้ประกอบด้วยโปรตีน 0.3 กรัม และในปี 1998 Mahmood et al. ก็ได้นำเปลือกมันฝรั่งมาปั่นผสมกับกากส้มในอัตราส่วนต่างๆ และใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* เพื่อผลิตเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส (alpha-amylase) โปรติเอส (protease) และโพลิกาแลคโตลูเนท ไลเอส (polygalactoronate lyase)

ในประเทศไทยก็มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์จากเปลือกมันฝรั่งเช่นกัน โดย ภูวนัฐ (2538) ใช้เปลือกมันฝรั่งผสมกับรำข้าวเจ้าในสัดส่วน 7: 3 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* และ *Rhizopus oligosporus* เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และอะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) แม้กระทั่งสารกันหืนธรรมชาติในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ก็มีการสกัดได้จากเปลือกมันฝรั่งที่เหลือจากกระบวนการแปรรูป โดย ณัฏฐินี (2546) ซึ่งพบว่า สารที่สกัดได้มีหลายชนิดและที่มีปริมาณมากที่สุด คือ กรดแกลลิก (gallic acid) รองลงมา คือ กรดแคฟเฟอิน (affeic acid) กรดคลอโรจินิก (chlorogenic acid) กรดโพรโตแคทีคูอิก (protocatechuic acid) และวานิลลิน (vanillin) ตามลำดับ

นอกจากนี้ ยังมีการใช้ประโยชน์ของแป้งจากถังน้ำล้างแผ่นมันฝรั่งดิบ ซึ่งมีแป้งแขวนลอยอยู่เป็นจำนวนมาก และมีสารอินทรีย์ชนิดอื่นปะปนอยู่ เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยแป้งได้ เพื่อลดปริมาณของแป้งลงร่วมกับการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่นที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น เช่น Gelinas and Barrette (2007) ได้ทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยแป้งมันฝรั่งที่มีอยู่ในน้ำเสียจากกระบวนการ

แปรรูปมันฝรั่ง เพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนของแป้งจากเซลล์ยีสต์ โดยแป้งที่ได้จะถูกนำนำไปเป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ต่อไป

ในส่วนของน้ำเสียจากกระบวนการแปรรูปมันฝรั่ง พบว่ายังคงมีสารอาหารอยู่เป็นจำนวนมาก เช่นตัวอย่างการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมันฝรั่ง Kellogg-Salada Foods ที่แสดงในตาราง 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำเสียฯ มีส่วนประกอบของสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และแร่ธาตุหลงเหลืออยู่ นอกจากความพยายามในการศึกษาเพื่อพัฒนาระบบบำบัด ให้มีประสิทธิภาพเพื่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมันฝรั่งแล้ว การนำน้ำเสียฯ กลับมาประโยชน์ก็ได้รับความนิยมมาเป็นเวลานาน โดยส่วนใหญ่จะใช้น้ำเสียฯ เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ ซึ่งนอกจากจะช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมแล้วยังสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้ เช่น โปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) สำหรับเสริมในอาหารสัตว์ เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase enzyme) กรดแลกติก (lactic acid) เป็นต้น

ตาราง 4 สารอาหารที่หลงเหลือในน้ำเสียโรงงานแปรรูปมันฝรั่ง

องค์ประกอบ	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)	
	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)

วิธีการและการออกแบบพื้นผิวตอบสนอง

เนื่องด้วยทรัพยากรมีจำนวนจำกัด ดังนั้นการทดลองแต่ละครั้งจะต้องให้สาระข้อมูลที่สำคัญที่สุด ซึ่งการทดลองที่มีการวางแผนที่ดีจะทำให้ได้สาระข้อมูลที่สำคัญและมีคุณภาพมากกว่าการทดลองที่เกิดขึ้นจากงานที่ไม่ได้รับการวางแผนมาก่อน และโดยเฉพาะการทดลองตามแผนที่วางไว้จะสามารถวิเคราะห์เกี่ยวกับอิทธิพลของปัจจัยที่ต้องการศึกษาได้ดีกว่าด้วย

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

1. วิธีการของพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM)

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

วิธีการของพื้นผิวตอบสนอง เป็นการรวบรวมเอาเทคนิคทั้งทางคณิตศาสตร์และสถิติที่เป็นประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหา โดยที่ผลตอบสนองที่สนใจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย และสามารถหาจุดที่เหมาะสม (optimization) จากความสัมพันธ์ของปัจจัยเหล่านั้นได้ (Bradley, 2007: 1) เช่น การอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้น (input variable) หรือ ปัจจัยเชิงปริมาณกับค่าการตอบสนอง (response variable) เป็นคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ นอกจากนี้ยังสามารถแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของผลตอบสนอง เมื่อระดับของปัจจัยเชิงปริมาณเปลี่ยนแปลง และการหาระดับของปัจจัยเชิงปริมาณที่เหมาะสม (optimum value) ที่จะทำให้ได้ผลตอบสนองที่ดีที่สุด หรือสามารถเลือกจุดที่เหมาะสมได้จาก

ผลตอบสนองหลายๆ ค่าได้ (นงเยาว์, 2554: 5) โดยรวมแล้วเทคนิคดังกล่าวนี้ ได้ใช้เพื่อให้คำตอบต่างๆ เช่น ค่าตอบสนองได้รับผลกระทบจากชุดสิ่งทดลองบนพื้นที่เฉพาะที่น่าสนใจบางอย่างได้อย่างไร ถ้าจำเป็น ชุดของสิ่งทดลองอะไรที่จะให้ผลิตภัณฑ์หนึ่งเป็นที่น่าพอใจตรงตามข้อกำหนดจำเพาะพร้อมๆ กัน และค่าอะไรของสิ่งทดลองที่จะให้ผลผลิตในจุดที่สูงสุดของพื้นที่เฉพาะหนึ่งๆ และพื้นที่การตอบสนองอะไรที่ใกล้กับค่าสูงสุดนี้ได้ (ไพโรจน์, 2544: 2)

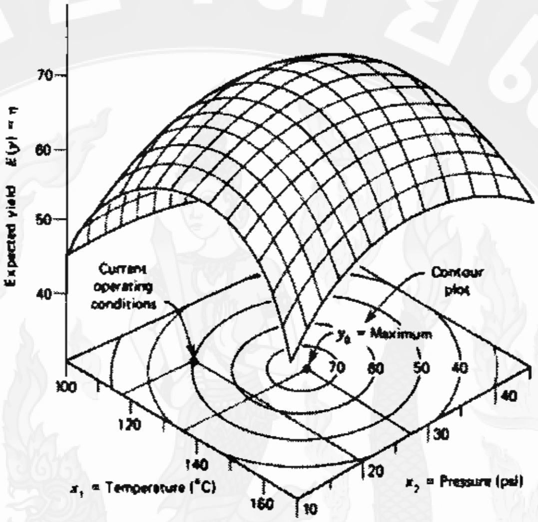
หลักการที่สำคัญของการทำพื้นผิวตอบสนองเพื่อนำเสนอผลการวิจัย คือ การที่จะนำเสนอแบบพื้นผิวตอบสนอง ต้องมีแผนการทดลองที่เหมาะสม อย่างน้อยต้องมีปัจจัย หรือตัวแปรอิสระ 2 ตัวขึ้นไป และต้องเป็นตัวแปรเชิงปริมาณ ต้องมีตัวแปรตามอย่างน้อย 1 ตัวขึ้นไปและต้องเป็นตัวแปรเชิงปริมาณด้วย ดังนั้นแผนการทดลองที่จะสามารถสร้างพื้นผิวตอบสนองได้ คือ การออกแบบการทดลองแบบแฟคตอเรียล (Factorial Design) การออกแบบการทดลองแบบผสม (Mixture Design) การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design, CCD) และการออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken design) นอกจากนี้ระดับของตัวแปรอิสระที่ต้องผันแปรไปนั้น จะเป็นต้องครอบคลุมพื้นที่ที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำข้อมูลของตัวแปรอิสระแต่ละตัว (X_i) ที่สัมพันธ์กับข้อมูลของตัวแปรตาม (Y_i) สร้างเป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (model) (กัลยาณี, 2554: 1) และนำแบบจำลองนี้ไปใช้ในการคาดคะเน (prediction) หรือปรับกระบวนการให้เหมาะสม (process optimization) ซึ่งโดยทั่วไป ตัวแปรตามแต่ละตัวแปรหรือค่าตอบสนอง (response) จะขึ้นกับตัวแปรอิสระ ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรเหล่านี้ สามารถอธิบายโดยแบบหุ่นทางคณิตศาสตร์ที่เรียกว่า สมการรีเกรสชั่น (สมการถดถอย, regression equation) เมื่อพิจารณาสมการ (Bradley, 2007: 1)

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

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

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

ซึ่งจะเรียกว่า พื้นผิวตอบสนอง (response surface) โดยส่วนใหญ่จะแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิวในรูปของกราฟิก โดยที่ η จะถูกพล็อตกับระดับของ X_1 และ X_2 เพื่อที่จะช่วยให้มองรูปร่างของพื้นผิวผลตอบสนองได้ดียิ่งขึ้น ดังภาพ 2



ภาพ 2 กราฟ 3 มิติของพื้นผิวตอบสนอง
ที่มา: อิศรพงษ์ (2550)

อย่างไรก็ตามในการศึกษาโดยใช้วิธีการแสดงผลพื้นผิวตอบสนองนั้น จำเป็นต้องค้นหาฟังก์ชันที่แท้จริงระหว่างตัวแปรตามค่าตอบสนอง ต่อตัวแปรอิสระต่างๆ เป็นลำดับแรก การค้นหาฟังก์ชันต่างๆ เหล่านี้มักใช้ความสัมพันธ์แบบโพลีโนเมียล (polynomial) ลำดับต้นๆ เช่น ลำดับหนึ่งหรือกำลังหนึ่ง (first order) ลำดับสองหรือกำลังสอง (second order) เป็นต้น โดยทั่วไปฟังก์ชันซึ่งประมาณความสัมพันธ์แบบหนึ่ง มีแบบหุ่นดังนี้ (Bradley, 2007: 2)

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

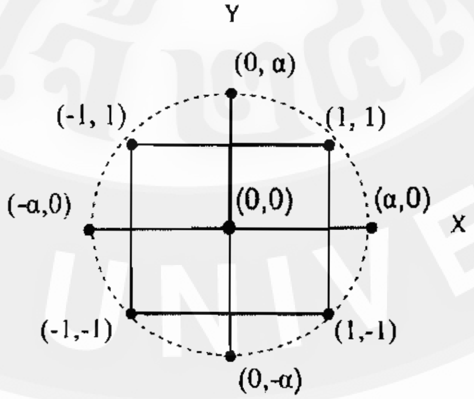
สำหรับระบบมีลักษณะความสัมพันธ์แบบเส้นโค้ง (quadratic regression relationship) ต้องใช้โพลีโนเมียลที่มีลำดับสูงขึ้น เช่น ลำดับสองหรือกำลังสอง ซึ่งมีแบบหุ่นดังนี้ (Montgomery, 1991)

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

2. การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design, CCD)

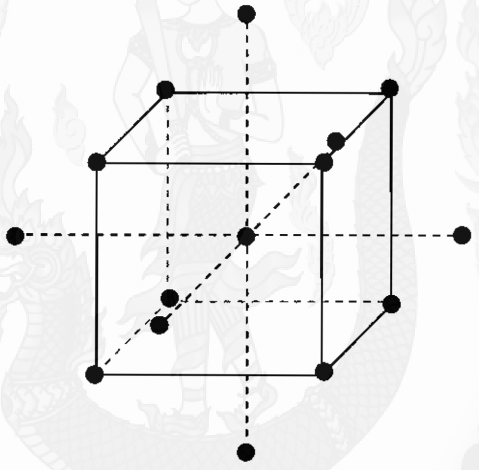
ปัญหาเกี่ยวกับพื้นผิวตอบสนองส่วนมากจะใช้แบบจำลองกำลังหนึ่ง หรือแบบจำลองกำลังสองในการหาพื้นผิวตอบสนอง แต่แบบจำลองทั้งสองชนิดไม่สามารถใช้ประมาณความสัมพันธ์ตลอดพื้นผิวทั้งหมดของตัวแปรอิสระ ถ้าพื้นผิวที่เราสนใจอยู่มีขนาดใหญ่ การออกแบบพื้นผิวตอบสนองมีวิธีการที่นำมาใช้ในการหาค่าที่ดีที่สุดของผลตอบอยู่หลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ วิธีการกำลังสองน้อยสุด (least square) การปีนด้วยทางชัน การออกแบบสำหรับฟิตแบบจำลองอับดับที่หนึ่ง (first-order model) และการออกแบบสำหรับฟิตแบบจำลองอับดับที่สอง (second -order model) ซึ่งการออกแบบสำหรับฟิตแบบจำลองอับดับที่สองนี้เป็นการเน้นไปที่การสร้างแบบจำลอง quadratic ของผลตอบ มีวิธีการที่น่าสนใจอยู่ 2 วิธีด้วยกัน คือ การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง หรือ CCD และแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน

การออกแบบการทดลองแบบ CCD เป็นหนึ่งในวิธีการหาพื้นผิวตอบสนองที่นิยมใช้เพื่อหากระบวนการที่เหมาะสม โดยทั่วไป CCD จะประกอบด้วย 3 ส่วนต่อไปนี้ (ก) ตำแหน่งการทดลองของ 2^n 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) (ภาพ 3)



ภาพ 3 ส่วนประกอบทั้ง 3 ส่วนของ CCD และจุดของการออกแบบ 9 สิ่งทดลองสำหรับ 2 ปัจจัย
ที่มา: เสาวนีย์ (2551)

เพราะฉะนั้นการทดลองแบบ CCD ในกรณีที่มีปัจจัย 2 ตัว จะมีตำแหน่งเพิ่มขึ้นจาก 2^2 fractorial design อีก 5 ตำแหน่ง (2k+1) คือ (+α, 0) (-α, 0) (0, +α) (0, -α) และ (0, 0) เพื่อให้จุดหนึ่งของการเพิ่มเป็นจุดกึ่งกลาง และจุดที่เหลือ 2k เป็นจุดห่าง α รวมทั้งหมดเป็น 9 สิ่งการทดลอง (ภาพ 3) สำหรับจำนวนปัจจัย 3 ตัว (k = 3) จะทำให้การออกแบบ 2^k factorial designs + (2k+1) มี 15 สิ่งทดลอง ดังแสดงในภาพ 4 ทำให้การทดลองแบบนี้จึงสามารถครอบคลุมพื้นที่ที่ต้องการ (กัลยาณี, 2544: 4) สาหรับการทดลอง แบบ CCD นั้น สามารถกำหนดตำแหน่งของการทดลองได้ดังตาราง 5



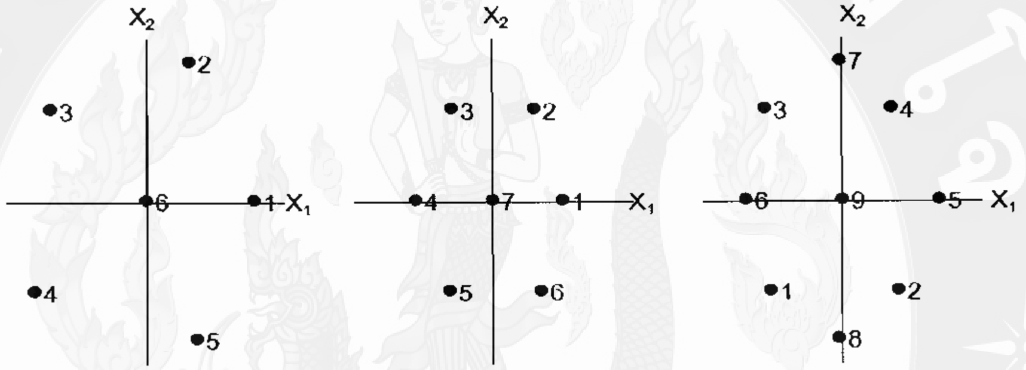
ภาพ 4 จุดของการออกแบบ 15 สิ่งทดลองใน composite design ที่มี 3 ปัจจัย
ที่มา: ไพโรจน์ (2544)

ตาราง 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)

การคาดคะเนของรูปแบบหุ่นการตอบสนองที่ทำให้ข้อมูลสอดคล้องที่ตำแหน่งจุดต่างๆ ในพื้นที่ของการทดลองขึ้นอยู่กับการออกแบบที่กำลังใช้นั้นๆ การออกแบบดังกล่าวเรียกว่า rotatable designs การออกแบบหมุนลำดับที่สองอย่างง่ายสุดสำหรับประมาณรูปแบบหุ่นลำดับที่สองที่มี 2 ปัจจัย ได้แสดงโดยมีจุดมารวมกันของรูปแบน แบบ 5 เหลี่ยม (pentagon) 6 เหลี่ยม (hexagon) และ 8 เหลี่ยม (octagon, แบบมาตรฐาน) ซึ่งแต่ละอย่างจะมี 1 จุดกึ่งกลาง ซึ่งแบบ 5 และ 6 เหลี่ยม จะสามารถลดสิ่งทดลองให้มีจำนวนน้อยลง (ไพโรจน์ 2544: 58) ดังภาพ 5



ภาพ 5 การออกแบบแบหมุนของ 2 ปัจจัย ใน 3 รูปแบบ
ที่มา: ไพโรจน์ (2544)

เพื่อให้การคาดคะเนที่ดีในส่วนจุดกึ่งกลางของการออกแบบ จุดกึ่งกลางควรถูกทำซ้ำมากกว่าจุดที่อยู่รอบนอก ดังตาราง 6 ที่แสดงจุดร่วมสำหรับการออกแบบรูปแบน แบบ 5 เหลี่ยม 6 เหลี่ยม และ 8 เหลี่ยม ในการแสดงดังกล่าวจุดรอบนอกมีระยะห่างเท่ากันจากการออกแบบจุดกึ่งกลางเพื่อให้การหมุนเป็นที่น่าพอใจ และสังเกตได้ว่าจำนวนระดับของปัจจัยเชิงปริมาณจะถูกกำหนดโดยการออกแบบ ตัวอย่างเช่น การออกแบบรูปแบนแบบ 6 เหลี่ยม ที่ต้องการระดับ 5 ระดับของปัจจัย X_1 และ 3 ระดับของปัจจัย X_2 ประโยชน์ของการออกแบบนี้อยู่บนพื้นฐานความจริงที่ว่าการออกแบบนี้จะมีจำนวนของการทดลองที่น้อย ซึ่งเปิดโอกาสให้สามารถสร้างรูปแบบลำดับที่สองที่ทำให้ข้อมูลสอดคล้อง และรวมทั้งสามารถวัดค่าความคลาดเคลื่อนของการทดลองได้ (ไพโรจน์ 2544: 58)

ตาราง 6 จุดหรือสิ่งทดลองของการออกแบบการทดลอง แบบ rotatable design ที่มี 2 ปัจจัย

จุดหรือสิ่งทดลอง	X_1	X_2	
Pentagon design			
1	1.000	0	
2	0.309	0.951	แต่ละปัจจัย มี 5 ระดับ
3	-0.809	0.588	
4	-0.809	-0.588	
5	0.309	-0.951	
6	0	0	
Hexagon design			
1	1.000	0	
2	0.500	0.866	
3	-0.500	0.866	ปัจจัย X_1 มี 5 ระดับ ปัจจัย X_2 มี 3 ระดับ
4	-1.000	0	
5	-0.500	-0.866	
6	0.500	-0.866	
7	0	0	
Octagon design			
1	-1	-1	
2	1	-1	
3	-1	1	
4	1	1	แต่ละปัจจัยมี 5 ระดับ
5	1.4142	0	
6	-1.4142	0	
7	0	1.4142	
8	0	-1.4142	
9	0	0	

ที่มา: อิศรพงษ์ (2550)

การออกแบบพื้นผิวตอบสนอง เป็นเทคนิคหนึ่งที่นับได้ว่ามีประโยชน์อย่างมากต่อการออกแบบผลิตภัณฑ์ สามารถประยุกต์ได้กับการพัฒนาสูตรการผลิต และกระบวนการผลิตที่ต้องการพัฒนา สามารถหาจุดเหมาะสมของข้อมูลทำให้นักพัฒนาสามารถหาจุดที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติ และแนวทางในการปรับสูตรได้ ทำให้มีผู้สนใจใช้วิธีการออกแบบการทดลองนี้ในงานวิจัยต่างๆ เพื่อจะหาค่าที่ดีที่สุดของผลตอบ เช่น กรณีศึกษาถึงอิทธิพลของส่วนประกอบของวัสดุเพาะ คือ ฟางข้าวโอ๊ต (oat straw) รำข้าวโอ๊ต (oat bran) และกะลามะพร้าว (copra cake) ต่อการเจริญของเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* ในสภาพอาหารแข็ง โดยได้มีการใช้หลักการพื้นผิวตอบสนอง ด้วยแผนการทดลองแบบ mixtures methodology พบว่า การเจริญของเส้นใยสูงสุด (0.50?0.02 เซนติเมตรต่อวัน) เกิดในวัสดุที่เพาะเป็นฟางข้างโอ๊ต กะลามะพร้าว และรำข้าวโอ๊ต ตามลำดับ โดยวัดได้จากค่าน้ำหนักเส้นใยแห้งในวัสดุเพาะ คือ 0.633, 0.284 และ 0.083 กรัมต่อกรัมของวัสดุเพาะ จากความชื้นฐานแห้ง (dry basis) ในสภาพดังกล่าว อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็น 22.4-23.2 การสูญเสียน้ำหนักแห้งลดลงจาก 16.9 เป็น 8.5 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปได้ว่า วิธีการของพื้นผิวตอบสนองเป็นวิธีที่มีประโยชน์ต่อการประเมินความสัมพันธ์ระหว่างส่วนประกอบของวัสดุเพาะกับการเจริญของเส้นใยของ *P. ostreatus* ทำให้สามารถประเมินและเลือกส่วนประกอบของวัสดุเพาะเห็ดที่เหมาะสมได้ (Soto-Cruz et al., 1999)

การออกแบบการทดลองแบบ CCD นับได้ว่าเป็นรูปแบบการทดลองหนึ่งในวิธีการของพื้นผิวตอบสนองที่ได้รับความนิยมสูง และถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นแบบการทดลองที่ครอบคลุมพื้นที่ที่ต้องการศึกษา และสามารถใช้เพื่อหากระบวนการที่เหมาะสมได้ ดังเช่น Ibanoglu, S. and Ibanoglu, E. (2001) ได้สร้างแบบจำลองการหมักแป้งถั่วพุ่ม (cowpea flour) ด้วยวิธีการหมักแบบธรรมชาติ (natural fermentation) จากจุลินทรีย์ประจำถิ่น (indigenous microflora) โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD เพื่อศึกษาถึงปัจจัย 2 ปัจจัย อันได้แก่ เวลาและอุณหภูมิ ที่ส่งผลต่อสภาพความเป็นกรด และค่า pH ของการหมัก จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่า เวลาในการหมักส่งผลต่อกิจกรรมของการหมักแป้งถั่วพุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าว สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์แป้งถั่วพุ่มหมักในเชิงพาณิชย์ และเพิ่มปริมาณการหมักต่อไปได้ นอกจากนี้ Wang and Liu (2008) ยังได้ใช้วิธีการออกแบบการทดลองแบบ CCD ในการเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา จาก *Paenibacillus* sp. สายพันธุ์ใหม่ โดยมีปัจจัยในการศึกษาทั้งหมด 4 ปัจจัย ได้แก่ แล็กโทส (lactose) เพปโทน โซเดียมไนไตรต์ (sodium nitrite) และแมกนีเซียม พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสำคัญฯ ประกอบไปด้วยปัจจัยต่างๆ ที่มีค่า ดังนี้ แล็กโทส 12.3

เพปโทน 17.5 โซเดียมไนไตรต์ 0.4 และ แมกนีเซียม 4.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถส่งผลให้เชื้อ *Paenibacillus* sp. ผลิตสาระสำคัญฯ ได้เท่ากับ 4687.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการจัดสิ่งทดลองหากมีปัจจัยที่ต้องการศึกษาหลายปัจจัย จะมีอุปสรรคเกี่ยวกับสิ่งทดลองที่มีเป็นจำนวนมากเกินไป จึงต้องมีการคัดเลือกและกลั่นกรองปัจจัย (factor identification and screening) ที่ส่งผลกระทบหลัก (main effect) เพื่อลดจำนวนของปัจจัยให้เหลือน้อยลงก่อนทำการศึกษาหาค่าที่เหมาะสมของปัจจัยดังกล่าว เช่น การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ (yeast biomass) จากน้ำเสียของโรงงานผลิตกระดาษจากเยื่อไม้ไผ่ (bamboo wastewater) ด้วยวิธีการของพื้นผิวตอบสนอง ซึ่งมีปัจจัยในการศึกษาถึง 9 ปัจจัย อันได้แก่ ค่า pH เริ่มต้น (initial pH) เวลาในการหมัก อุณหภูมิ เชื้อเริ่มต้น (inoculum) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate) แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate) และสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) จึงต้องทำการคัดเลือกปัจจัยที่มีอิทธิต่อการผลิตมวลชีวภาพยีสต์ ด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett–Burman Design ซึ่งพบว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตมวลชีวภาพของ *Candida utilis* มีทั้งหมด 3 ปัจจัย คือ ค่า pH เริ่มต้น เวลาในการหมัก และสารสกัดจากยีสต์ จึงได้ทำการศึกษาหาค่าที่เหมาะสมของปัจจัยที่เลือกดังกล่าวต่อไป ด้วยแผนการทดลองแบบ CCD ซึ่งพบว่าที่ค่า pH เริ่มต้น 6.1 ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 1.17 กรัมต่อลิตร และใช้เวลาในการหมัก 69 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตมวลชีวภาพของ *C. utilis* (Li et al., 2009) จากการศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่า วิธีการและการออกแบบพื้นผิวตอบสนอง มีประสิทธิภาพในการหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการ หรือใช้ในการออกแบบและพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ หรือปรับปรุงผลิตภัณฑ์เดิม สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ดี โดยในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของผลตอบสนองกับปัจจัยการทดลอง จะต้องมีการวางแผน และออกแบบการทดลองให้เหมาะสมกับลักษณะของข้อมูลด้วย

การทำแห้งแบบพ่นฝอย

เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) เป็นวิธีการที่นิยมใช้สำหรับการทำแห้งสารละลายอินทรีย์ สารประเภทอิมัลชัน (emulsion) และของเหลวชนิดต่าง ๆ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะอยู่ในรูปของผงแห้ง มักใช้วิธีนี้ในอุตสาหกรรมทางเคมีและอาหาร ผลิตภัณฑ์ส่วนหนึ่งที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอยที่มีวางขายในปัจจุบันได้แก่ นมผง อาหารเด็กยา และสีย้อม การอบแห้งด้วยวิธีนี้ นอกจากจะใช้สำหรับทำแห้งอย่างรวดเร็วแล้ว ยังเป็นวิธีการที่มีประโยชน์มากใน

การลดขนาดและปริมาตรของของเหลวอีกด้วย และจากการวิจัยและพัฒนาที่ต่อเนื่องกันมาทำ ให้วิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอยกลายเป็นวิธีการอบแห้งที่มีประสิทธิภาพและนิยมนำมาใช้อบแห้งให้กับผลิตภัณฑ์หลายชนิดในปัจจุบัน

1. หลักการของระบบการทำแห้งแบบพ่นฝอย

การทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อระเหยน้ำออกจากของเหลว อย่างรวดเร็วโดยอากาศร้อน อาศัยหลักการพาความร้อนของอากาศ ซึ่งเป็นวิธีการทำแห้งที่มีอัตราการถ่ายเทความร้อนสูงทำให้น้ำระเหยออกจากอาหารได้อย่างรวดเร็ว เวลาที่ให้ในการทำแห้งสั้น กระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นประกอบไปด้วยการพ่นของเหลว (feed) ออกมาจนเป็นละอองขนาดเล็ก เข้าผสมกับอากาศร้อนที่ไหลผ่านอย่างรวดเร็ว ทำให้น้ำที่อยู่ในละอองของเหลวระเหยไปทั้งหมดและได้ผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของผงแห้ง ช่วยลดน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ลง ทำให้ง่ายต่อการขนส่งและการเก็บรักษา สำหรับกระบวนการทำแห้งให้กับผลิตภัณฑ์นั้น จะเริ่มทำตั้งแต่ใส่ของเหลวลงในเครื่อง แล้วรอจนของเหลวมีความชื้นในระดับที่เหมาะสมต่อการฉีดให้ออกมาเป็นละออง จากนั้นจึงแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำแห้งออกมา ตัวอย่างของเหลวที่นำมาทำแห้งนั้นสามารถใช้ได้ทั้งที่เป็น ตัวทำละลาย สารประเภทอิมัลชัน หรือสารแขวนลอยก็ได้ ส่วนเครื่องมือที่ใช้สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย คือ เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) กระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยนี้ สามารถทำการผลิตได้คราวละมากๆ และกระบวนการผลิตเป็นแบบต่อเนื่องซึ่งอัตราการป้อนวัตถุดิบจะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 2-3 กิโลกรัมต่อชั่วโมง หรือมากกว่า 100 ตันต่อชั่วโมง ต่อเครื่อง (Patel et al., 2009; อนุสรา, 2552: 11)

2. ทฤษฎีการทำแห้งแบบพ่นฝอย และการทำงานของเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย

การทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นกระบวนการทำแห้งที่ประยุกต์ใช้กับการแปรรูปอาหารได้ทุกประเภทซึ่งอาหารที่ต้องการทำแห้ง อาจอยู่ในสภาพของสารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน หรือสารละลายที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ที่อยู่ในรูปของสารละลายของผสมระหว่างของแข็งและของเหลว (slurry) หรือของเหลวกับของเหลว (emulsion) ที่มีลักษณะไม่ข้นหนืดมาก หลักการทำแห้งจะดำเนินการโดยอากาศจะถูกดูดผ่านเครื่องกรองและผ่านเครื่องให้ความร้อน จากนั้นจึงเข้าสู่ห้องอบแห้ง (drying chamber) ส่วนของเหลวจะถูกดูดโดยปั๊มผ่านอุปกรณ์ที่ทำให้เกิดละอองฝอย คือ อะตอมไมเซอร์ (atomizer) ทำให้ของเหลวดังกล่าวแตกตัวเป็นละอองหรือหยดเล็กๆ เมื่อละอองของของเหลวสัมผัสกับอากาศร้อนภายในห้องอบซึ่งมีอากาศร้อนไหลผ่าน ในขณะเดียวกันเนื่องจากหยดของเหลวมีขนาดเล็กมากประมาณ 100-200 ไมโครเมตร ทำให้มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตร

มากขึ้นเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการถ่ายโอนมวลและความร้อน การระเหยจึงเกิดขึ้นบนพื้นที่ผิวของหยดของเหลวอนุภาคเล็กๆ อย่างรวดเร็ว ทำให้ได้ผงของผลิตภัณฑ์ตกลงสู่ด้านล่างของห้องอบ ผงบางส่วนที่หลุดออกมากับอากาศจะถูกแยกโดยใช้ ไซโคลน (cyclone) ซึ่งจะรวมเข้าเป็นผลิตภัณฑ์ผงในที่สุด (Patel et al., 2009; อนุสรา, 2552: 12)

3. สารมอลโตเดกซ์ตริน (Maltodextrin, MD)

มอลโตเดกซ์ตริน มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ประมาณ 900-9,000 ซึ่งมีสูตร คือ $(C_6H_{12}O_6)$ H_2O ประกอบด้วยหน่วยของ ดี-กลูโคส (D-glucose) หลายๆ หน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-(1→6) และมีค่าสมมูลเดกซ์โทรส (Dextrose Equivalent, DE) ต่ำกว่า 20 ได้จากแป้งมันสำปะหลังโดยการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) และหรือโดยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (alpha-amylase) มอลโตเดกซ์ตรินมีลักษณะเป็นผงหรือเม็ด (granule) สีขาว มีความหวานเล็กน้อย หรือไม่หวานเลยขึ้นอยู่กับค่า DE มีความชื้นประมาณร้อยละ 3-5 มีความหนาแน่นรวม (bulk density) อยู่ในช่วง 0.31-0.61 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร สามารถใช้มอลโตเดกซ์ตรินได้ในปริมาณที่เหมาะสมกับชนิดอาหาร และหน้าที่ของมอลโตเดกซ์ตรินในอาหารนั้นๆ มอลโตเดกซ์ตรินสามารถละลายได้ในน้ำที่อุณหภูมิห้อง สารละลายที่ได้อาจใสหรือขุ่นขึ้นอยู่กับชนิดของมอลโตเดกซ์ตรินที่นำมาใช้ สารละลายที่ได้มีคุณสมบัติด้านความเป็นเนื้อ (body) และมีความหนืดที่สม่ำเสมอ เนื้อสัมผัสเรียบเนียน มีความสามารถในการดูดความชื้นต่ำ (low hygroscopicity) โดยเฉพาะพวกที่มีค่า DE ต่ำๆ มีจุดเยือกแข็งคงที่ และสามารถควบคุมการเกิดสีน้ำตาลได้เป็นอย่างดี ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เกิดสีน้ำตาลน้อยมาก นอกจากนั้นยังสามารถละลายได้ในของเหลวอื่นๆ เช่น ซุป นม น้ำผลไม้ เป็นต้น โดยอาจเติมในลักษณะผงโดยตรงหรือนำมาละลายในน้ำก่อน มอลโตเดกซ์ตรินสามารถนำมาใช้เพิ่มปริมาณของแข็งให้กับวัตถุดิบก่อนที่จะนำเข้าเครื่องทำแห้ง และยังช่วยลดความชื้นกลับในผลิตภัณฑ์ซึ่งมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบชั้นสูง เช่น น้ำผลไม้ผง และยังช่วยลดการจับตัวเป็นก้อน (caking) ของผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บ เป็นต้น มีการแนะนำให้ใช้มอลโตเดกซ์ตริน ที่มีค่า DE 9-12 เป็นสารตัวพา (carrier) ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย ทำหน้าที่เป็นวัตถุเจือปนในตัวอย่าง ขนส่งและกระจายสารเคมีบางอย่างในตัวอย่างซึ่งถูกทำลายได้ง่ายโดยความร้อน หรือเป็นสารที่ระเหยง่าย เช่น สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของกลิ่น รส สี วิตามิน หรือสารอาหารอื่นๆ ในตัวอย่าง โดยสารตัวพาทำหน้าที่ดักจับและกักเก็บสารเหล่านั้นไว้แทน ทำให้ถูกทำลายด้วยความร้อนหรือระเหยได้น้อยลง และเมื่อนำตัวอย่างผงที่ได้ไปละลายโดยผสมน้ำ สีหรือกลิ่นของอาหารจะถูกปลดปล่อยออกมา ทำให้ สี กลิ่น รส ของตัวอย่างหลังการคืนตัว มีลักษณะคล้ายวัตถุดิบสดก่อนนำมาทำแห้ง (เชาวลิต, 2552: 16-18)

การทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นกรรมวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์ผงที่ได้รับความนิยม เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบกับการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) จะใช้ระยะเวลาและต้นทุนในการผลิตน้อยกว่า โดยได้มีงานวิจัยเป็นจำนวนมากที่ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์ให้อยู่รูปแบบผง เช่น Grabowski et al. (2006) ได้ทำแห้งแบบพ่นฝอยมันเทศสกัดเข้มข้น ที่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อะไมเลส (amylase hydrolyzed sweetpotato puree) โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะหาวิธีการลดความหนืดของมันเทศสกัดเข้มข้นด้วยการเติมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และมอลโตเดกซ์ตริน ไปจนถึงอุณหภูมิขาเข้าของเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย ที่เหมาะสมกับลักษณะเฉพาะทางเคมีกายภาพของผงมันเทศที่ได้จากการทำแห้ง โดยได้ใช้วิธีการของพื้นผิวตอบสนองประเมินผลของการเติมเอนไซม์ต่อน้ำหนักมันเทศสกัดเข้มข้น 1 กิโลกรัม ที่ระดับ 0, 3.75 และ 7.5 มิลลิลิตร ปริมาณความเข้มข้นของมอลโตเดกซ์ตริน ที่ 0, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิขาเข้าของเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย ที่ 150, 190 และ 220 องศาเซลเซียส พบว่า มอลโตเดกซ์ตริน มีผลต่อการเพิ่มความสามารถในการละลาย (solubility) การเปลี่ยนแปลงค่าเฉดสี (hue value) และอุณหภูมิทรานสิชันแก้ว (glass transition temperature) ของผงมันเทศได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการการใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ย่อยมันเทศสกัดเข้มข้นก่อนทำแห้ง มีผลทำให้อุณหภูมิทรานสิชันแก้วต่ำลง และลดขนาดอนุภาคของผงมันเทศได้ ซึ่งผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบพ่นฝอย สามารถผลิตผงมันเทศที่มีคุณภาพดีและเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ในอาหารและผลิตภัณฑ์บำรุงสุขภาพ (nutraceutical products) อื่นๆ

ในประเทศไทย ก็ได้มีการนำวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยมาใช้แปรรูปผลิตภัณฑ์ให้อยู่ในรูปผงอย่างแพร่หลาย เช่น เชาวลิต (2552) ได้ทำการศึกษากรรมวิธีการผลิตเครื่องปรุงผงก๋วยเตี๋ยวผัดไทยด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย ได้ศึกษาปริมาณมอลโตเดกซ์ตริน และอุณหภูมิลมร้อนที่เหมาะสมในการทำแห้งฯ เครื่องปรุงก๋วยเตี๋ยวผัดไทย พบว่า ปริมาณมอลโตเดกซ์ตรินที่เหมาะสมคือ 20 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิลมร้อนขาเข้าและขาออกที่เหมาะสมในการพ่นฝอย ได้แก่ 150/ 90 องศาเซลเซียส โดยเครื่องปรุงผงก๋วยเตี๋ยวผัดไทยที่ได้มีปริมาณความชื้น เท่ากับ 1.24 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบคะแนนความชอบโดยใช้ เครื่องปรุงผงก๋วยเตี๋ยวผัดไทย น้ำก๋วยเตี๋ยวผัดไทยสูตรต้นแบบ และผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงผงก๋วยเตี๋ยวผัดไทยจากท้องตลาดที่ได้รับการยอมรับ ผัดกับเส้นก๋วยเตี๋ยว พบว่าเครื่องปรุงผงก๋วยเตี๋ยวผัดไทย และน้ำก๋วยเตี๋ยวผัดไทยสูตรต้นแบบ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์ต่างๆ ให้อยู่ในรูปผง เช่น น้ำผึ้งผง (อนุสรา, 2552) โยเกิร์ตผง (Wirjantoro and Phionmongkhol, 2009) กระเจี๊ยบผง (พนม และ คณะ, 2550) และน้ำผักผลไม้รวมผง (พรรณจิรา และ คณะ, 2545) เป็นต้น โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ผงแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันไป

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากน้ำเสียปริมาณมากที่เกิดจากกระบวนการแปรรูปมันฝรั่ง ได้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จึงมีรายงานหลายเรื่องที่ได้ศึกษา และพยายามหาวิธีการที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำเสียดังกล่าว ให้มีระดับสารอินทรีย์ในช่วงมาตรฐานกำหนด ก่อนจะบายสู่สิ่งแวดล้อม

Lasik et al. (2002) ได้ศึกษาการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ (biodegradation) ของน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมันฝรั่ง ด้วยการใช้จุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีลักษณะชอบเจริญในอุณหภูมิสูง (thermophilic microflora) ซึ่งถูกคัดแยกมาจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร โดยได้เสริมแหล่งของคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ควบคุมค่า pH ของน้ำเสียให้มีสภาวะเช่นเดียวกับการอาศัยอยู่ตามธรรมชาติของจุลินทรีย์ พบว่า จุลินทรีย์ประชากรผสม และจุลินทรีย์ประชากรเดี่ยวที่คัดแยกได้ มีศักยภาพในการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมทางชีวภาพของน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมันฝรั่ง ภายใต้สภาวะการเขย่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยที่จุลินทรีย์ประชากรผสม มีศักยภาพในการลดค่า COD สูงกว่าการใช้จุลินทรีย์ประชากรเดี่ยว ซึ่งมีกิจกรรมเมตาบอลิกกว่าต่ำ และมีศักยภาพในฟื้นฟูสภาพแวดล้อมทางชีวภาพลดลงเมื่อน้ำเสียมีอุณหภูมิสูงขึ้น

Mishra et al. (2004) ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการทางชีวภาพเพื่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบโดยใช้จุลินทรีย์ผสม (mixed culture) *Aspergillus foetidus* และ *Aspergillus niger* พบว่า *A. foetidus* MTCC 508 และ *A. niger* ITCC 2012 สามารถลดค่า COD ได้ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ และผลิตมวลชีวภาพ (biomass) ได้ถึง 2.4 และ 2.85 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้การเพาะเลี้ยง *Aspergillus* ทั้งสองสายพันธุ์ร่วมกันส่งผลให้มีการผลิตมวลชีวภาพเพิ่มขึ้น และสามารถลดค่า COD ได้สูงกว่าการใช้เชื้อเพียงสายพันธุ์เดียวที่ค่า pH ต่างกัน โดยพบว่าที่ค่า pH เท่ากับ 6 เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตมวลชีวภาพ และลดค่า COD เมื่อมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสของน้ำเสีย ด้วยการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate) 0.1 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ลงไปร่วมกับการบำบัดของจุลินทรีย์ผสม ทำให้การผลิตชีวมวลเพิ่มขึ้นและสามารถลดค่า COD ได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 60 ชั่วโมงหลังจากการบำบัด

Azab (2008) ได้ทดลองใช้เทคนิคใหม่ในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำเสีย และตะกอนที่เกิดขึ้น ด้วยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีที่เรียกว่า ไบโอ-มิกซ์เจอร์ (bio-mixture) ซึ่งเป็นส่วนผสมของ *Aspergillus terreus* หรือ *Rhizopus sexualis* และขี้เลื่อย เรียกไบโอ-มิกซ์เจอร์ ที่มีส่วนประกอบดังกล่าวนี้ว่า SD-BIOMIX ใช้เป็นวัสดุพาหะจุลินทรีย์ (micro-carrier) ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง (activated sludge system) พบว่า วัสดุพาหะจุลินทรีย์ที่ได้จากรูปแบบการ

หมักขี้เลื่อยที่แตกต่างกัน มีผลต่อปริมาณสารอาหาร และเอนไซม์ที่เกิดขึ้น ซึ่งจะส่งผลต่อการยกระดับของกระบวนการบำบัดน้ำเสียในเทอมของค่า BOD, COD, TDS, TSS, น้ำมันและไขมัน (Oil and Grease, O&G) ให้ดีขึ้นได้อย่างมาก ซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลาในการพักน้ำ (retention time) และชนิดของวัสดุทดสอบ โดยพบว่าการใช้ SD-BIOMIX ที่ได้จากการหมักขี้เลื่อยโดย *A. terreus* หรือ *R. sexualis* เป็นเวลา 14 วัน ส่งผลให้มีปริมาณเอนไซม์สูง และเป็นวัสดุที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับกระบวนการบำบัดน้ำเสียของโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ ไบโอ-มิกซ์เจอร์ทางการค้า และจากการวิเคราะห์ทางเคมีของกากตะกอนที่เกิดจากการบำบัด พบว่าสามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์และบำรุงดินได้อย่างปลอดภัย

Hussein et al. (2009) ได้ทำการบำบัดน้ำเสียของโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ เพื่อลดปริมาณอินทรีย์สารโดยใช้ราผสม (mixed culture of fungi) พบว่า *Aspergillus* และ *Rhizopus* สามารถเจริญในอาหารเหลวซึ่งมีเพียงแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ และเมื่อใช้สปอร์ของสองเชื้อดังกล่าวในการบำบัดน้ำเสียร่วมกัน พบว่า สามารถลดค่า 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 ยังมีรายงานการนำน้ำเสียฯ ไปใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน รวมไปถึงการผลิตผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการบำบัด เช่น งานวิจัยของ Meister and Thompson (1976) ที่แสดงให้เห็นว่าน้ำเสียจากโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบประกอบไปด้วยสารอาหารประเภทโปรตีน โดยได้เสนอวิธีการทางเคมีร่วมกับกายภาพในการเก็บเกี่ยวโปรตีนจากน้ำเสียของโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ พบว่า สามารถเก็บเกี่ยวโปรตีนได้ถึง 170 กิโลกรัม จากหัวมันฝรั่งที่เข้าสู่กระบวนการผลิตทั้งสิ้น 31 ตัน การให้ความร้อนที่ 80-90 องศาเซลเซียส และปรับค่า pH ให้เป็น 4-4.5 พบว่า เป็นวิธีที่ทำให้ได้โปรตีนมากที่สุด ต่อมา Lemmel et al. (1979) ก็ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) ของ *Candida utilis* และ *Saccharomycopsis fibuliger* จากน้ำเสียของกระบวนการแปรรูปมันฝรั่ง นอกจากนี้ Strolle et al. (1980) ก็ได้เสนอวิธีการเก็บเกี่ยวสารอาหารต่างๆ ในน้ำเสียนี้โดยการระเหย (evaporation) และการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) ซึ่งสิ่งที่ได้มาสามารถนำไปเลี้ยงสัตว์และจุลินทรีย์ได้

Huang et al. (2003) พัฒนากระบวนการผลิตกรดแลกติก ร่วมกับการบำบัดน้ำเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการแปรรูปมันฝรั่ง โดยได้คัดเลือกรา *Rhizopus* สองสายพันธุ์ อันได้แก่ *Rhizopus arrhizus* และ *Rhizopus oligosporus* ซึ่งมีความสามารถในการหมักเพื่อผลิตกรดแลกติก

และผลิตมวลชีวภาพ ร่วมกับการลดสารอินทรีย์ (แป้ง) ที่มีอยู่ในน้ำใต้เสีย ภายใต้สภาวะหมักแบบ simultaneous saccharification ได้ พบว่า *Rhizopus arrhizus* DAR 36017 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสม เนื่องจากมีความสามารถสูงสำหรับกระบวนการหมักแป้งแบบ simultaneous saccharification และการสังเคราะห์กรดแลกติก ซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่ช่วง pH ระหว่าง 3-7 ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate) 10 กรัมต่อลูกบาศก์เคซิเมตร และที่ค่า pH ระหว่าง 5-7 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดที่ 21 กรัมต่อลูกบาศก์เคซิเมตร มวลชีวภาพ 1.7 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถลดปริมาณของแข็งแขวนลอย และค่า COD ได้ 90 เปอร์เซ็นต์

Jin et al. (1988) ได้ทำการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว และเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส จากน้ำเสียของกระบวนการแปรรูปมันฝรั่งที่มีแป้งละลายอยู่ โดย *Aspergillus oryzae* ด้วยกระบวนการหมักแบบ one-stage process พบว่า เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่มีค่า pH เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สามารถผลิตมวลชีวภาพได้ 6.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีน 38 เปอร์เซ็นต์ และผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ได้ 55 เอ็นโดท๊อกซินต่อลิตร สามารถลดค่า COD, BOD และปริมาณของแข็งแขวนลอยได้ 95, 93 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ Jin et al. (1999) ยังได้นำน้ำเสียจากกระบวนการแปรรูปมันฝรั่ง มาใช้ในผลิตโปรตีนเซลล์เดียว และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จาก *Rhizopus oligosporus* ร่วมกับการบำบัดน้ำเสียดังกล่าวซึ่งมีแป้งมันฝรั่งเป็นส่วนประกอบ พบว่า สามารถผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากราได้ประมาณ 4.5-5.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลผลิตที่ได้นี้มีความปลอดภัยต่อการบริโภคของคนและสัตว์

ในประเทศไทย ดวงใจ และ มาริสา (2541) ก็ได้นำน้ำล้างแผ่นมันฝรั่งมาศึกษาโดยใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR5136 เพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว พบว่า การใช้น้ำล้างแผ่นมันฝรั่งที่ไม่เจือจาง ค่า pH เริ่มต้นที่ 4.5 เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะให้อากาศบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *C. tropicalis* TISTR5136 ซึ่งมีอัตราการเจริญจำเพาะอยู่ที่ 0.47 ต่อชั่วโมง ให้ปริมาณมวลชีวภาพสูงสุด เท่ากับ 1.212 กรัมต่อลิตร โดยเซลล์ยีสต์ที่ได้ประกอบด้วยโปรตีน และไขมันร้อยละ 32.19 และ 0.454 ตามลำดับ

จากตัวอย่างการศึกษาที่กล่าวมาทั้งหมดในข้างต้น พบว่า น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมันฝรั่งยังคงมีสารอาหารที่หลงเหลืออยู่ โดยสารอาหารที่มีอยู่นี้เกิดจากการชะล้างมันฝรั่งดิบ ซึ่งเป็นพืชที่อุดมไปด้วยสารอาหารต่างๆ จึงทำให้น้ำเสียฯ มีปริมาณสารอาหารที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ ดังนั้น จึงมีให้มีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำเสียฯ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำที่เกิดจากขั้นตอนการล้างแผ่นมันฝรั่งดิบ มาใช้ในการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแหล่งสารอาหารและวิตามิน ที่ได้มาจากน้ำสกัดของ

มันฝรั่งเช่นกัน จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบว่ามีการนำน้ำล้างมันฝรั่งกลับมาใช้ในลักษณะของการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่พบว่าในไทยได้มีการศึกษาพัฒนาและดัดแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อรา เพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า จากวัตถุดิบต่างๆ เช่น หทัยชนก และ เพ็ญศิริ (2547) ได้ใช้แป้งมันฝรั่งที่แยกได้จากถังฝานของกระบวนการผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบเลี้ยงรา เพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า โดยได้เลือกแป้งจากถังฝาน เนื่องจากมีสิ่งเจือปนน้อยที่สุด พบว่า *Penicllium sp.* ที่เพาะเลี้ยงด้วยแป้งมันฝรั่งดังกล่าว สามารถเจริญและสร้างสีได้เมื่อมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ลงไปด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา กิตติพันธุ์ และคณะ (2550) ก็ได้พัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงรา สำหรับใช้ในการเรียนการสอนทางห้องปฏิบัติการ โดยทดลองเพาะเลี้ยงราบนอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบทางการเกษตร ได้แก่ มันเทศ ฝักทอง ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วแดง พบว่า แม้อาหารที่พัฒนาขึ้นมาไม่สามารถใช้ทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้าได้อย่างเต็มที่ แต่ก็ให้ผลในระดับที่น่าพอใจ จากนั้น สุพรรณี และ จาตุรงค์ (2552) ได้ศึกษาสูตรอาหารดัดแปลงต่อการเจริญเติบโตทางเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อราจากดินที่มีคุณสมบัติย่อยสลายเซลลูโลส โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สูตรดัดแปลง 4 สูตร ที่เตรียมจาก มันเทศ มันสำปะหลัง ข้าวโพด และมันเทศผสมกับมันสำปะหลัง พบว่า ราเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ได้ไม่แตกต่างกับการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์เครื่องมือ

1. ตู้อบลมร้อน (Binder, Germany)
2. เครื่องฆ่าเชื้อความดันไอ (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. เครื่องวัดค่า pH (Satorious, Germany)
15. เครื่องให้ความร้อน hot plate (Scilution Co.,Ltd. Thailand)
16. ชุดวิเคราะห์โปรตีนด้วย Kjeldahl
    - เครื่องย่อย (Buchi รุ่น CH9230, Switzerland)
    - ชุดกำจัดไอกรด (Buchi รุ่น B414, Switzerland)
    - ชุดเครื่องกลั่น (FOSS รุ่น Kjeltec 2200, Denmark)
    - เตาเผา (Carbolite รุ่น CFW 1200, U.K.)
17. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ
    - จานเพาะเชื้อ (petri dish)
    - ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
    - เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)

- กระบอกตวง (cylinder)
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
- หลอดทดลอง (test tube)
- บีกเกอร์ (beaker)
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- บิวเรต (buret)
- โถดูดความชื้น (desiccator)
- ฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer)
- ปิเปต (pipette)
- ไมโครปิเปต (micropipette) พร้อมกับ ไมโครทิป (microtip)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปทางการค้า (ภาคผนวก ก)
   - อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA และ PDB (ACI Labscan, Thailand)
   - อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPDA และ YPDB
2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA และ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (ภาคผนวก ก)
4. สารละลาย/ สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำล้างมันฝรั่ง
   - น้ำตาลเดกซ์โทรส
   - ผงวุ้นอะการ์ (agar)
5. สารเคมีที่ใช้ในการอบแห้งแบบพ่นฝอยน้ำล้างมันฝรั่ง
   - มอลโตเดกซ์ตริน (DE 10-13)
6. สารละลาย/ สารเคมี ที่ใช้ในการวิเคราะห์
   - 3, 5 Dinitrosalicylic acid (Fluka, Fluka chemika, Switzerland)
   - Sodium hydroxide (UNIVAR, Ajax Finechem, Australia)
   - Potassium sodium tartrate (UNIVAR, Ajax Finechem, Autralia)
   - Glucose (BIOMARK, Biomark Laboratories, India)
   - Sulfurie Acid (GAMMACO, Thailand)
   - Phenol (Sigma-Aldrich, Thailand)
   - Methyl red (Merek Millipore, Germany)

- Bromocresol green (Merck Millipore, Germany)
- Boric acid (Sigma-Aldrich, Thailand)
- Potassium Sulfate (UNIVAR, Ajax Finechem, Autralia)
- Copper Sulfate (Alpha, Alpha chemika, India)
- Hydrochloric acid (Alpha, Alpha chemika, India)
- Sodium carbonate (BDH, BDH Chemicals Ltd., England)
- Hydrogen peroxide (Alpha, Alpha chemika, India)

เชื้อมาตรฐาน

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

โปรแกรมคอมพิวเตอร์

1. Statistix 7 software (Analytical Software, U.S.A.)
2. Statistica 8 software (StatSoft. Inc., U.S.A.)

น้ำล้างมันฝรั่งที่ใช้ในการศึกษา

น้ำล้างมันฝรั่งที่ใช้ในการศึกษา เป็นน้ำเสียที่ได้จากขั้นตอนการล้างแผ่นมันฝรั่งดิบของโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ ตำบลบ้านกลาง อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

แนวทางในการดำเนินงานวิจัย

ในการทดลองเป็นการศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้น้ำล้างมันฝรั่งเลี้ยงรา โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (CCD) เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปริมาณปัจจัยที่ใช้ในการเตรียมอาหารดังกล่าว โดยมีขั้นตอนในการศึกษาวิจัย ดังแสดงในภาพ 6

วิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำล้างมันฝรั่งจากโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ

↓

ใช้น้ำล้างมันฝรั่งเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB

↓

ทำแห้งน้ำล้างมันฝรั่งให้อยู่ในรูปผงแห้ง เพื่อสะดวกต่อการใช้งานและการเก็บรักษาด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย

↓

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB จากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ด้วยการทดลองแบบ CCD โดยมีปัจจัยที่ใช้ในการเตรียม 2 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1) และน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2)

↓

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง โดยการออกแบบการทดลองแบบ CCD เลี้ยงเชื้อมาตรฐาน และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยกับค่าการตอบสนอง ด้วยสมการถดถอย (regression equation) แสดงความสัมพันธ์ที่ได้ด้วยกราฟ 3 มิติ

↓

นำสมการจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้ไปใช้ในการคาดคะเน หรือปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ให้มีค่าการตอบสนองที่เหมาะสม จากนั้นไปเพาะเลี้ยงเชื้อมาตรฐานอีกครั้ง

ภาพ 6 ขั้นตอนในการศึกษาวิจัย

ขั้นตอนในการวิจัย

จากภาพขั้นตอนในการศึกษาวิจัย (ภาพ 6) สามารถอธิบายขั้นตอนในการวิจัยโดยละเอียด ดังนี้

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำล้างมันฝรั่ง

เก็บตัวอย่างน้ำล้างมันฝรั่งจากขั้นตอนการล้างแผ่นมันฝรั่งดิบ และนำกลับมายังห้องปฏิบัติการภายในเวลา 2 ชั่วโมง เก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปใช้ ตัวอย่างน้ำจะถูกนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาความเป็นไปได้ในการนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ต่อไป ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ตามรายการต่างๆ ดังนี้

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 (AOAC, 1990)
4. อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C: N ratio) โดยการคำนวณจากอินทรีย์คาร์บอน (organic carbon) และไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen)

2. ศึกษาความเหมาะสมและความเป็นไปได้ของน้ำล้างมันฝรั่ง ในการนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB

2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษาความเหมาะสมและความเป็นไปได้ ของน้ำล้างมันฝรั่งในการนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ได้แก่ PDB สำเร็จรูปทางการค้า (commercial PDB) PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (PDB prepared from potato) (วิธีเตรียมในภาคภาคผนวก ก) และ PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง (PDB prepared from PWPW)

ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB จากน้ำล้างมันฝรั่ง สามารถเตรียมได้โดยนำน้ำล้างมันฝรั่งมากรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 จากนั้นนำไปผสมกับน้ำตาลเดกซ์โทรสปริมาณ 20 กรัม ปรับค่า pH ให้เป็น 5.6 ? 0.2 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำล้างมันฝรั่งให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2. เปรียบเทียบการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ

2.2.1 การเตรียม *S. cerevisiae* TISTR 5020

ทำการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TISTR 5020 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPDA ด้วยเทคนิค streak plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีของเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว (single colony) เขี่ยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น (inoculum) ต่อไป

2.2.2 เปรียบเทียบการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020

2.2.2.1 ปิเปตหัวเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบ อันได้แก่ PDB สำเร็จรูปทางการค้า PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

2.2.2.2 เก็บตัวอย่างของเชื้อจากข้อ 2.2.2.1 ทุกๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี standard plate count โดยนำตัวอย่างที่ได้มาทำการเจือจางเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อที่ระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-6} ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเลือกปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-4}-10^{-6} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาทำการ spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB แต่ละชนิด

2.2.2.3 ทำการบันทึกและเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ ด้วยการนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าอาหาร YPDA โดยนับเฉพาะในจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีของเชื้ออยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี

2.3 เปรียบเทียบการเจริญของ *A. oryzae* และ *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ

2.3.1 การเตรียม *A. oryzae* และ *R. oligosporus* ในรูปของ spore suspension

ทำการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* และ *R. oligosporus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เชื้อราจะสร้างสปอร์ที่เป็นสีเขียวดำเต็มผิวหน้าอาหาร ทำการเก็บ spore suspension โดยใช้สารละลาย tween 20 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หยดลงบนผิวหน้าอาหารที่มีราเจริญอยู่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงใช้

แท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อขูดไปมาบนผิวหน้าอาหารเบาๆ เพื่อให้สปอร์หลุดออก แล้วจึงดูดสปอร์ที่ได้ไปกรองผ่านสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ในขวดใสที่ปราศจากเชื้อ เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

2.3.2 เปรียบเทียบการเจริญของ *A. oryzae* และ *R. oligosporus*

2.3.2.1 เปรียบเทียบการเจริญของ *A. oryzae* และ *R. oligosporus* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ชนิดต่างๆ ด้วยการหยด spore suspension ที่ได้จากข้อ 2.3.1 ความเข้มข้น 1?10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่ใช้ในการทดสอบ อันได้แก่ PDB สำเร็จรูปทางการค้า PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

2.3.2.2 เก็บตัวอย่างจากข้อ 2.3.2.1 เพื่อหา น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ (dry mass) บันทึกผลและเปรียบเทียบการเจริญของราที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB แต่ละชนิด โดยที่ *A. oryzae* จะเก็บผลทุกๆ 24 ชั่วโมง จนครบ 7 วัน ส่วน *R. oligosporus* ที่มีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็วจะถูกเก็บผลทุกๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 84 ชั่วโมงโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในสูตรอาหารเลี้ยง เชื้อ PDB แต่ละชนิด

3. การทำแห้งน้ำล้างมันฝรั่งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drier)

3.1 การเตรียมน้ำล้างมันฝรั่ง

เตรียมน้ำล้างมันฝรั่งก่อนการทำแห้งโดยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drier) ด้วยการนำน้ำล้างมันฝรั่งมากรองผ่านสำลีสะอาดเพื่อแยกตะกอนปนเปื้อน จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ตาม APHA-AWWA and WEF (1998) แล้วนำผลที่ได้ไปกำหนดปริมาณของมอลโตเดกซ์ตริน (DE 10-13) ที่จะผสมลงในน้ำล้างมันฝรั่งเพื่อช่วยในการอบแห้ง

3.2 การทำแห้งน้ำล้างมันฝรั่งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย

ทำแห้งน้ำล้างมันฝรั่งที่เตรียม ด้วยด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยสองขนาด คือ เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยขนาด lab scale และเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยขนาด pilot scale เพื่อเพิ่มอัตราการผลิตผงน้ำล้างมันฝรั่งให้สูงขึ้นในเวลาที่รวดเร็ว โดยใช้สภาวะการอบแห้งที่หาได้จากการใช้เครื่องขนาด lab scale (modified: Grabowski et al., 2006; 2008) จากนั้นนำผงน้ำล้างมันฝรั่งที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 1990) หาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน และปริมาณความชื้นโดยใช้วิธีวิเคราะห์ตาม AOAC (1990)

3.2.1 **การทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยขนาด lab scale**

ทำแห้งน้ำล้างมันฝรั่งด้วยเครื่อง Mini Spray Dryer (Buchi รุ่น B-290, Japan) หัวฉีดแบบสองของไหล (two-fluid nozzle atomizer) ทิศทางการไหลของตัวอย่างกับอากาศร้อนเป็นแบบการไหลไปในทิศทางเดียวกัน (co-current flow)

3.2.2 **การทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยขนาด pilot scale**

ทำแห้งน้ำล้างมันฝรั่งด้วยเครื่อง Spray Dryer Model: SDE50 (J.C. Machinery and civil work Co., Ltd, Germany) หัวฉีดแบบแรงดัน (pressure nozzles atomizer) ทิศทางการไหลของตัวอย่างกับอากาศร้อนเป็นแบบการไหลสวนทางกัน (counter-current flow)

4. ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของปัจจัย ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง

ใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD เพื่อการศึกษาหาอัตราส่วน หรือปริมาณที่เหมาะสมของปัจจัยในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB จากผงน้ำล้างมันฝรั่ง (PDB prepared from PWPW powder) โดยมีปัจจัยในการศึกษา ได้แก่ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส ที่มีผลต่อค่าตอบสนอง คือ การเจริญของยีสต์ และรา ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว โดยค่าการตอบสนองที่ได้จะถูกนำไปใช้ในการคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB จากผงน้ำล้างมันฝรั่งที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์และรา และให้ค่า regression coefficient (R^2 = 0.90) ที่สูง ซึ่งผลการตอบสนองที่ได้จะแสดงด้วยกราฟ 3 มิติ ของพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) ซึ่งมีรายละเอียดในการศึกษา ดังนี้

4.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB หรือ PDA จากผงน้ำล้างมันฝรั่ง โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD รูปแบบ 5 เหลี่ยม (pentagon) เพื่อกำหนดปริมาณของปัจจัยที่ใช้ในการเตรียม อันได้แก่ ผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1) และน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) ในการศึกษาได้กำหนดค่ากลางของปัจจัยทั้ง 2 ขึ้นมา และกำหนดค่าระดับอื่นๆ ของแต่ละปัจจัยให้มีค่าต่ำกว่าค่ากลาง 1 ระดับ และสูงกว่าค่ากลาง 1 ระดับ โดยให้มีความแตกต่างของค่าในแต่ละระดับที่เท่ากัน ในการกำหนดค่ากลางของผงน้ำล้างมันฝรั่ง จะพิจารณาจากการเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์โปรตีนที่มีอยู่ในผงน้ำล้างมันฝรั่ง กับผงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 1990) ใช้เปอร์เซ็นต์โปรตีนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า เป็นค่ากลางเพื่อกำหนดปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่งที่จะใช้โดยคิดเป็น กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส ซึ่งปกติในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB หรือ PDA ตามสูตรมาตรฐาน ปริมาตร 1 ลิตร จะใช้น้ำตาล

เดกซ์โทรส 20 กรัม ดังนั้น จึงได้กำหนดให้ค่ากลางของน้ำตาลเดกซ์โทรสอยู่ที่ 20 กรัมต่อลิตร ดังตาราง 7 ที่แสดง ค่าระดับต่ำสุด ค่าระดับกึ่งกลาง และค่าต่ำสุดของปัจจัยในการทดลอง โดยกำหนดเป็นรหัส (code) ให้ (1) คือ ค่าระดับสูงสุด (0) คือ ค่าของระดับกึ่งกลาง และ (-1) คือ ค่าระดับต่ำสุดของปัจจัยทั้ง 2

ตาราง 7 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 เป็นวิธีการออกแบบการทดลองทุกระดับของแต่ละปัจจัย และมีการทำซ้ำที่จุดกลาง เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยที่เลือกทั้ง 2 ปัจจัย (X_1 และ X_2) โดยระดับของปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาตามแผนการทดลอง 2 ปัจจัย ชนิดกำลังสองแบบหมุน รูปแบบ 5 เหลี่ยม มีจุดหรือสิ่งทดลองที่กำหนดเป็นรหัส ดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 จุดหรือสิ่งทดลองสำหรับแผนการทดลอง 2 ปัจจัย ชนิดกำลังสองแบบหมุน (rotatable design) รูปแบบ 5 เหลี่ยม

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

จากตาราง 8 การวางแผนการทดลองแบบ CCD และการกำหนดระดับของปัจจัยที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงสูตร PDB จากผงน้ำล้างมันฝรั่ง จึงประกอบไปด้วยแผนการทดลองทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง หรือ 9 run สำหรับใช้ในการศึกษาและหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ และรา เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ต่อไป

4.2 ศึกษาและหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ด้วยการออกแบบการทดลองแบบ CCD

4.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการศึกษานี้ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแบ่งเป็น 2 ชุด คือ อาหารเหลวชุดการทดลอง ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง มีทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง (run1-run9) จากการเตรียมตามแผนการทดลองแบบ CCD รูปแบบ 5 เหลี่ยม และอาหารเหลวชุดควบคุม มี 3 สูตร ได้แก่ (a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ (c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

4.2.2 การศึกษาและหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020

การศึกษาเริ่มจาก เลี้ยง *S. cerevisiae* TISTR 5020 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPDB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จนครบ 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นปิเปตเชื้อเริ่มต้นที่ได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดการทดลอง และอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เก็บผลทุกๆ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-48 ชั่วโมง ด้วยวิธี standard plate count เพื่อตรวจนับโคโลนีของเชื้อ และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) ด้วย ฮีมาไซโตมิเตอร์ วิเคราะห์ผลที่ได้จากการนับจำนวนโคโลนีเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยกับค่าตอบสนองด้วยโปรแกรม Statistix รุ่น 7 (Analytical Software, U.S.A.) จากนั้นวิเคราะห์สมการถอดถอย เพื่อหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยแต่ละตัว ที่ได้ด้วยกราฟ 3 มิติ ของพื้นผิวตอบสนอง จากโปรแกรม Statistica รุ่น 8 (StatSoft. Inc., U.S.A.)

4.3 ศึกษาและหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB และ PDA ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ด้วยการออกแบบการทดลองแบบ CCD

4.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการศึกษานี้จะทำการเลี้ยงราในอาหารเหลว และอาหารแข็ง โดยอาหารเหลวที่ใช้ แบ่งเป็น 2 ชุด คือ อาหารเหลวชุดการทดลอง และอาหารเหลวชุดควบคุม เช่นเดียวกับหัวข้อที่ 4.2.1 เพื่อศึกษาการเจริญของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ ด้วยการหาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ ส่วนอาหารแข็งที่ใช้ แบ่งเป็น 2 ชุด ประกอบด้วย อาหารแข็งชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม เช่นกัน โดยมีการเติมผงวุ้นอะการ์ ลงไป 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ทุกชนิด เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA สำหรับใช้ศึกษาการเจริญของโคโลนี และการสร้างสปอร์ของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae*

4.3.2 การศึกษาและหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae*

4.3.2.1 การเลี้ยง *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ในอาหารเหลว ด้วยการหยด spore suspension ของรา ความเข้มข้น 1?10^{5} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวชุดการทดลอง และอาหารเหลวชุดควบคุม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ บันทึกผลและเปรียบเทียบการเจริญของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB แต่ละชนิด โดยเก็บผลของ *R. oligosporus* ที่ 12 ชั่วโมง และที่ 84 ชั่วโมงหลังการเพาะเลี้ยง ส่วน *A. oryzae* จะเก็บผลในวันที่ 3 และวันที่ 7 หลังการเพาะเลี้ยง

4.3.2.2 การเลี้ยง *R. oligosporus* และ *A. oryzae* บนอาหารแข็ง ด้วยการใช้ชิ้นวุ้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 5 วัน วางลงบนกึ่งกลางจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลองโดยตรวจสอบการเจริญของราจากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของ *R. oligosporus* ทุกๆ 6 ชั่วโมง และ *A. oryzae* ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งโคโลนีเต็มจานเพาะเชื้อ และทำการเก็บสปอร์ เพื่อนับจำนวนสปอร์ของเชื้อทั้งสองด้วย ฮีมาไซโตมิเตอร์ สปอร์ของ *R. oligosporus* เก็บที่ 12 ชั่วโมง และที่ 84 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยง ส่วน *A. oryzae* เก็บสปอร์ที่ 3 วัน และ 7 วัน หลังการเพาะเลี้ยง นำผลที่ได้จากการนับสปอร์ไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Statistix รุ่น 7 และ Statistica รุ่น 8 เพื่อนำค่าที่วิเคราะห์ด้วยโปแกรมทางสถิตินี้ ไปเปรียบเทียบร่วมกับการตรวจสอบความหนาแน่นของเส้นใยรา

บนผิวหน้าอาหารแข็งแต่ละชนิด และน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ ที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารเหลว ในข้อ 4.3.2.1

4.4 ศึกษาการเจริญของยีสต์และราเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่งที่ให้ค่าการตอบสนองที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงยีสต์ และรา ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันด้วยแผนการทดลองแบบ CCD รูปแบบ 5 เหลี่ยม ซึ่งมีทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.2 และ 4.3 ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิผลของปัจจัยที่ศึกษา ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ทั้ง 9 ชุดการทดลอง โดยวิเคราะห์การถดถอยแบบ linear regression analysis ด้วยโปรแกรม Statistix รุ่น 7 ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ ทิศทางความสัมพันธ์ ลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย และสามารถพยากรณ์ค่าของอีกปัจจัยหนึ่ง จากการอาศัยค่าที่ทราบจากปัจจัยหนึ่ง ว่ามีความแปรผันในสัดส่วนเท่าใด หรือในระดับใดได้ เมื่อใช้โปรแกรม Statistica 8 เพื่อสร้างกราฟ 3 มิติ และแสดงสมการกำลังสอง ที่มีลักษณะความสัมพันธ์แบบเส้นโค้ง (quadratic regression relationship) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษา คือ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1) และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) ต่อการเจริญเติบโตของยีสต์และรา (Y) สามารถหาค่าสูงสุดจากการทดลองด้วยสมการที่ได้ 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

B_n = ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย

X_n = ตัวแปรอิสระ

Y_n = ค่าตอบสนองที่เกิดจากการแปรค่าตัวแปร

นำสมการจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้ดังกล่าว ไปใช้ในการคาดคะเน หรือปรับสูตรอาหารให้เหมาะสม โดยคัดเลือกปริมาณของปัจจัยทั้งสองที่เหมาะสมต่อการผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB หรือ PDA ที่ให้ค่าการเจริญของเชื้อที่ถูกเลี้ยงได้สูงที่สุด ไปเลี้ยงเชื้ออีกครั้งด้วยสภาวะการเลี้ยงเดิม เพื่อตรวจสอบผลการทดลองที่ทำนายได้ (validation) จากสมการ และเพื่อยืนยันว่าสมการการประมาณค่าที่ได้ มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ได้มากหรือน้อยเพียงใด

บทที่ 4
ผลและการอภิปรายผลการวิจัย

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำล้างมันฝรั่ง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างน้ำล้างมันฝรั่ง ของโรงงานมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ ตำบลบ้านกลาง อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่าประกอบไปด้วยโปรตีน 0.13 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในรูปของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 408 มิลลิกรัมต่อลิตร คาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในรูปของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 24 มิลลิกรัมต่อลิตร และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 6: 1 (ตาราง 9) ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้น้ำล้างมันฝรั่งในการเตรียมเป็นการอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ต่อไป เนื่องจากประกอบไปด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และคาดว่ามีแร่ธาตุที่เชื้อจุลินทรีย์ต้องการสำหรับการเจริญเติบโตหลงเหลืออยู่ จากการศึกษาของ Hussein et al. (2009) ได้รายงานว่า *Aspergillus* และ *Rhizopus* สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมันฝรั่ง โดยสามารถนำคาร์โบไฮเดรตที่มีในน้ำเสียฯ มาใช้สำหรับการสร้างเซลล์และเพิ่มการเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้ Mironescu and Moza (2011) ก็ได้ใช้น้ำล้างมันฝรั่งจากโรงงานผลิตมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* โดยพบว่า *S. cerevisiae* สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำล้างดังกล่าว เช่นกัน

ขั้นตอนต่างๆ ของกระบวนการในการแปรรูปมันฝรั่ง เช่น การล้าง การปอกเปลือก การตัดแต่งหัวมันฝรั่ง และการล้างแผ่นมันฝรั่งดิบ ทำให้น้ำที่ผ่านกระบวนการเหล่านี้ของโรงงานมีค่า BOD สูงมากถึง 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทางโรงงานจึงจำเป็นต้องมีการแยกของแข็งกากตะกอนออกก่อน เพื่อลดค่า BOD ในระดับหนึ่ง และเพื่อลดภาระของระบบบำบัด (Peters, 1972) ซึ่งในส่วนนี้ทำให้โรงงานมีค่าใช้จ่ายในการดูแลและจัดการ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าของเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปมันฝรั่งไม่มีสารประกอบที่เป็นพิษปนเปื้อน เหมาะแก่การนำกลับมาใช้ประโยชน์ หรือบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ (Peters, 1972) ในส่วนของน้ำที่ผ่านขั้นตอนการล้างแผ่นมันฝรั่งดิบซึ่งมีค่า BOD ที่สูง ทั้งนี้เป็นเพราะประกอบไปด้วย น้ำตาล และแป้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แป้ง ซึ่งเป็นสารแขวนลอยที่มีคุณสมบัติในการพองตัวเมื่อได้รับความร้อนและน้ำพร้อมกัน ได้ก่อให้เกิดอุปสรรคในการบำบัด และสร้างกลิ่นเหม็นตามมา ดังนั้น เมื่อพิจารณาคุณค่าสารอาหารที่หลงเหลืออยู่ในน้ำล้างมันฝรั่งดังกล่าวข้างต้น ร่วมกับการลดปัญหาค่าใช้จ่ายในการบำบัด จึงควรมีการนำน้ำล้างในส่วนนี้กลับมาใช้ประโยชน์ต่อไป

ตาราง 9 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำล้างมันฝรั่ง

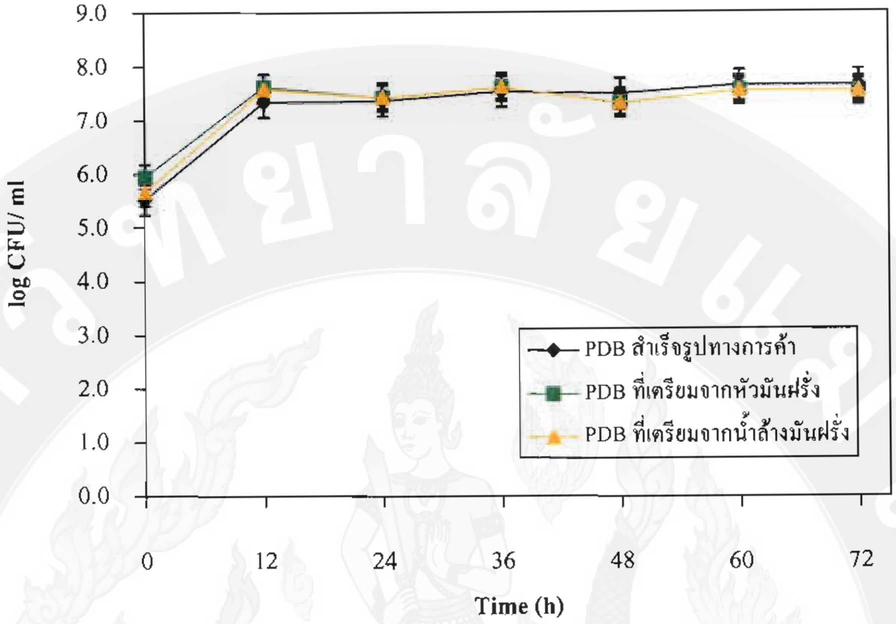
Test item	Test results
Reducing sugar	24 mg/ l
Total sugar	408 mg/ l
Protein	0.13%
C: N ratio	6: 1

หมายเหตุ ค่า pH เท่ากับ 6?0.5

ผลการศึกษาความเหมาะสมและความเป็นไปได้ของน้ำล้างมันฝรั่ง ในการนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB

1. ผลการศึกษาและเปรียบเทียบการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ

จากการศึกษาและเปรียบเทียบการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ PDB สำเร็จรูปทางการค้า PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที วัดการเจริญเติบโตของเชื้อทุกๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี standard plate count ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB แต่ละชนิด บันทึกผลการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร PDB ชนิดต่างๆ โดยนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง YPDA หลังจากการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเลือกนับเฉพาะในจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีของเชื้ออยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี ผลที่ได้ดังแสดงในภาพ 7 และในตารางภาคผนวก 1



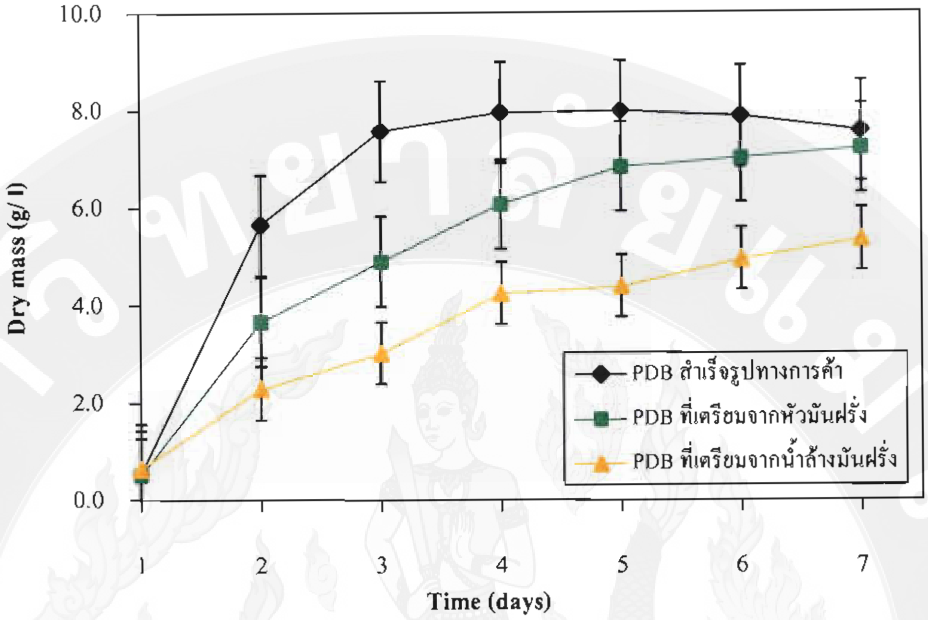
ภาพ 7 การเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ

จากภาพ 7 แสดงการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5020 สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง โดยมีการเจริญที่เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 เช่นเดียวกับการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า และ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง พิจารณาจากจำนวนโคโลนีของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ที่เติบโตบนผิวหน้าอาหารแข็ง YPDA หลังจากการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางภาคผนวก 1) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ชนิดต่างๆ โดยดูจากลักษณะของโคโลนีที่เติบโตบนผิวหน้าอาหารแข็ง YPDA พบว่า ลักษณะโคโลนีของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง PDB สำเร็จรูปทางการค้า และ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง มีลักษณะที่เหมือนกัน (ภาพ 8) คือ เป็นสีขาวครีม ผิวหน้าเรียบ แบน ชื้น ทึบแสง ซึ่งเป็นลักษณะของโคโลนียีสต์สายพันธุ์ดังกล่าว (สุมาลี, 2541)

ภาพ 8 ลักษณะโคโลนีของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. ผลการศึกษาและเปรียบเทียบการเจริญของ *A. oryzae* และ *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ

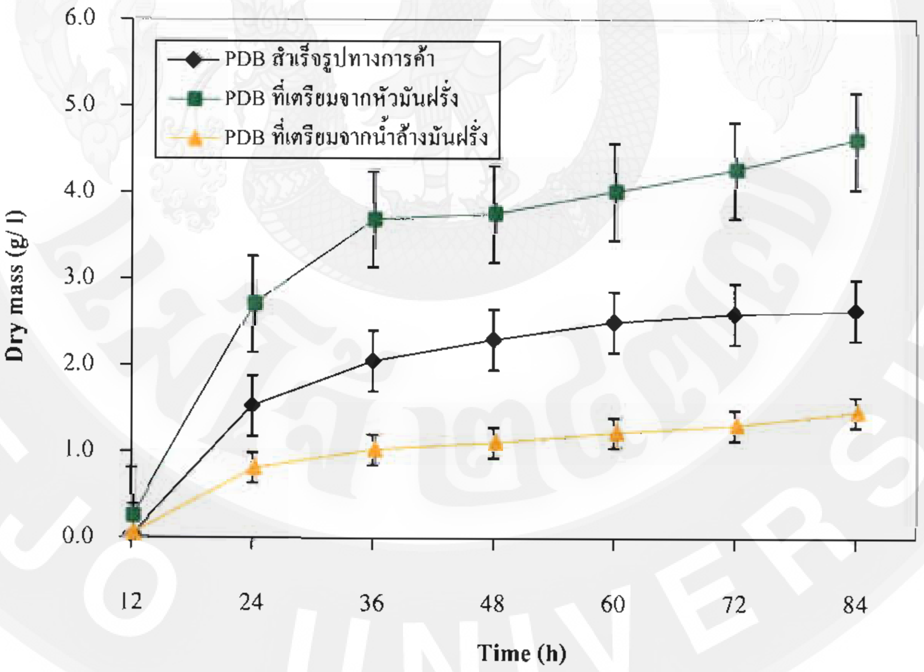
จากการศึกษาและเปรียบเทียบการเจริญของ *A. oryzae* และ *R. olidosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ PDB สำเร็จรูปทางการค้า PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที วัดการเจริญเติบโตของ *A. oryzae* ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนครบ 7 วัน ส่วน *R. olidosporus* วัดการเจริญเติบโต ทุกๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 84 ชั่วโมง ด้วยการหาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB แต่ละชนิด ผลที่ได้จากการศึกษา ดังแสดงในภาพ 9-10 และตารางภาคผนวก 2-3



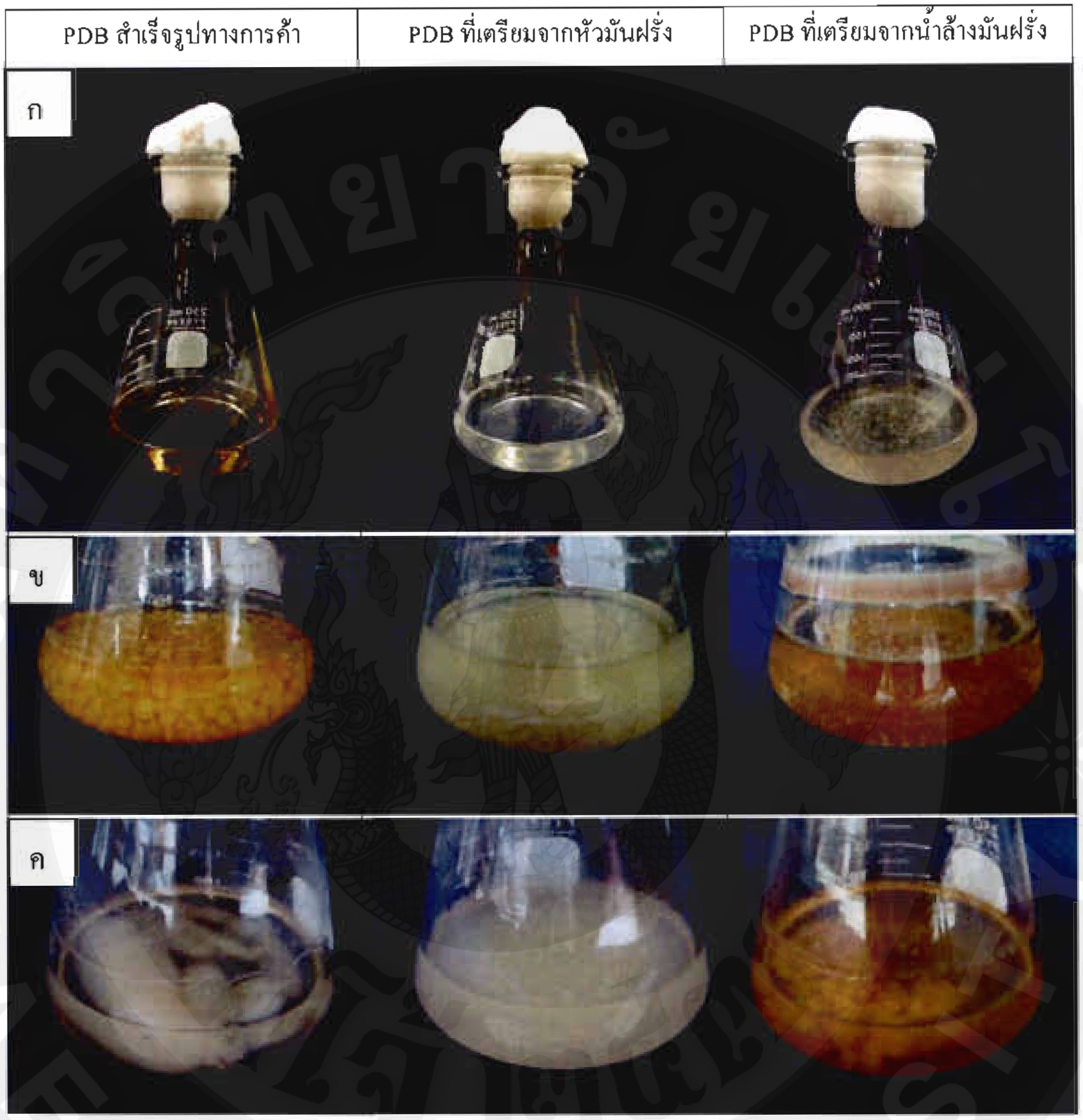
ภาพ 9 การเจริญของ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ

จากภาพ 9 แสดงการเจริญของ *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *A. oryzae* สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง แม้จะมีการเจริญที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า และ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง แต่ก็พบว่าการเจริญของเชื้อ *A. oryzae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง มีแนวโน้มการเจริญที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่วันที่ 1 จนถึง วันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง (ตารางภาคผนวก 2) จากการวัดการเจริญของ *A. oryzae* ด้วยการหาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ พบว่า *A. oryzae* สามารถเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า รองลงมา คือ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง โดยน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพที่วัดได้ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง คือ 7.58, 7.23 และ 5.37 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก 2) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของเส้นใยรา *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ชนิดต่างๆ พบว่า ลักษณะเส้นใยราของ *A. oryzae* จะเจริญอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ที่เรียกว่า mycelium pellet โดยมีขนาดแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่ใช้เลี้ยง ดังแสดงในภาพ 11 ข

ส่วนการเจริญของ *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 84 ชั่วโมง พบว่า *R. oligosporus* สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง เช่นกัน แม้ว่าจะมีการเจริญที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า และ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง โดยพบว่า *R. oligosporus* เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง รองลงมา คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า และอาหารเหลว PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง (ภาพ 10) โดยน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพที่วัดได้หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง อยู่ที่ 4.59, 2.64 และ 1.46 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก 3) ส่วนลักษณะเส้นใยราของ *R. oligosporus* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB แต่ละชนิด มีลักษณะแตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 11 ค



ภาพ 10 การเจริญของ *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ



ภาพ 11 ลักษณะเส้นใยราของ *A. oryzae* และ *R. oligosporus* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ

หมายเหตุ (ก) คือ อาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ ได้แก่ PDB สำเร็จรูปทางการค้า PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง

(ข) คือ ลักษณะเส้นใยราของ *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน

(ค) คือ ลักษณะเส้นใยราของ *R. oligosporus* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

MAEJO UNIVERSITY

จากภาพ 11 แสดงลักษณะเส้นใยราของ *A. oryzae* และ *R. oligosporus* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ โดยที่ ภาพ 11 ก คือ ลักษณะของอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ ได้แก่ PDB สำเร็จรูปทางการค้า PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง ภาพ 11 ข คือ ลักษณะเส้นใยราของ *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน ซึ่งมีลักษณะอยู่รวมกันเป็น pellet แบบหลวมๆ เม็ดกลม โดยพบว่า pellet ของ *A. oryzae* ที่เลี้ยงใน PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง และ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง มีขนาดใกล้เคียงกัน เมื่อเทียบกับ PDB สำเร็จรูปทางการค้าที่มีขนาดของ pellet ที่ใหญ่กว่า นอกจากนี้ยังพบว่า *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วย PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง เริ่มมีการสร้างสปอร์บริเวณผิวหน้าอาหารตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในภาพ ส่วนภาพ 11 ค คือ ลักษณะเส้นใยราของ *R. oligosporus* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร PDB ชนิดต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยเส้นใยราของ *R. oligosporus* ที่เจริญในอาหาร PDB สำเร็จรูปทางการค้าจะก่อตัวกันแบบหลวมๆ เห็นเป็นรูปร่าง (form) มีลักษณะคล้ายสำลี ส่วนการเจริญของเส้นใยราใน PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง จะมีลักษณะอยู่แบบกระจาย (dispersed filaments) และใน PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง ลักษณะเส้นใยเป็น pellet ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน ที่ติดกันแบบหลวมๆ

การที่รามีขนาดและลักษณะของ pellet แตกต่างกันนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ประเภทของสารตั้งต้น ค่า pH อุณหภูมิ ความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการถ่ายเทออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Tung et al., 2004) นอกจากนี้ราแต่ละสายพันธุ์ยังมีลักษณะการเจริญเติบโตในอาหารเหลว ในรูปแบบที่แตกต่างกัน ซึ่งลักษณะการเจริญของเส้นใยราบางชนิดอาจอยู่แบบกระจาย หรืออาจจะอยู่เป็นเป็นรูปร่าง ไปจนถึงการอยู่รวมกันเป็น pellet เช่น *Aspergillus* และในราบางชนิดจะที่มีเส้นใยที่อยู่แบบกระจายกันเพียงช่วงหนึ่ง จากนั้นจะอยู่รวมกันเมื่อเจริญถึงระยะ stationary phase (Moore et al., 2011: 460) นอกจากนี้ ปัจจัยต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น ไม่เพียงแต่จะส่งผลต่อลักษณะ pellet ของราแล้ว ยังส่งผลต่อปริมาณการผลิตเส้นใยของราด้วย เช่น จากการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเส้นใยรา โดย Graham et al. (1976) ซึ่งได้เพาะเลี้ยง *R. oligosporus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณการผลิตเส้นใยรามีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่ออัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น โดยพบว่า การเลี้ยง *R. oligosporus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 15: 1 และมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่งผลให้ *R. oligosporus* ผลิตเส้นใยได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการมีน้ำตาลกาแล็กโทส หรือน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ในอาหารที่มีน้ำตาลกาแล็กโทสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า อัตราส่วนของ

คาร์บอนต่อไนโตรเจน ที่ 7: 1 ส่งผลให้ *R. oligosporus* ผลิตเส้นใยราได้ดีกว่า เมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ Tung et al. (2004) ยังพบว่า การใช้ *A. oryzae* บำบัดน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งมีลักษณะอันประกอบไปด้วยสารแขวนลอยปริมาณสูง ได้แก่ แป้ง และเส้นใย เป็นองค์ประกอบหลัก ได้ส่งผลต่อลักษณะ pellet ของ *A. oryzae* โดยลักษณะการรวมตัวเป็น pellet ของเส้นใยรา เกิดจากการงอกของสปอร์โดยการเกาะติดกับอนุภาคที่เป็นของแข็งในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงก่อให้เกิด pellet ขึ้น โดยที่อนุภาคของของแข็งที่สปอร์เกาะติดจะถูกย่อยระหว่างการหมักของรา ซึ่งส่งผลให้ต่อมา pellet มีลักษณะผิวเรียบและเป็นโพรง

จากการศึกษาความเหมาะสมและความเป็นไปได้ของน้ำล้างมันฝรั่งในการนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากล้างล้างมันฝรั่งนี้ ทดสอบเลี้ยงยีสต์ (*S. cerevisiae* TISTR 5020) และรา (*A. oryzae* และ *R. oligosporus*) ผลการศึกษาที่ได้พบว่า ยีสต์ และรา สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว แม้จะมีการเจริญที่ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า และ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (6: 1) ในน้ำล้างมันฝรั่งมีความเหมาะสมต่อการเจริญต่อการเจริญของเชื้อค่อนข้างน้อย แต่ก็สามารถให้ผลในระดับที่น่าพอใจจึงทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำล้างมันฝรั่งมาใช้เตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

ผลการศึกษาการทำแห้งน้ำล้างมันฝรั่งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย

เมื่อนำน้ำล้างมันฝรั่งมากรองผ่านสำลีสะอาดเพื่อแยกตะกอนปนเปื้อน แล้วนำไปหาปริมาณของแข็งทั้งหมด โดยใช้วิธีวิเคราะห์ตาม APHA-AWWA and WEF (1998) พบว่า ในน้ำล้างมันฝรั่งมีปริมาณของแข็งทั้งหมด เท่ากับ 410 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงได้เติมผงมอลโตเดกซ์ตริน (DE 10-13) ลงไปในน้ำล้างมันฝรั่ง 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มปริมาณของแข็งให้กับตัวอย่างก่อนเข้าเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย และเพื่อช่วยให้ประหยัดเวลาในการทำแห้ง ตลอดจนช่วยรักษาคุณค่าทางอาหารของน้ำล้างมันฝรั่งให้ถูกทำลายด้วยความร้อน หรือระเหยได้น้อยลง (Grabowski et al., 2006; 2008)

จากการทำแห้งน้ำล้างมันฝรั่งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยสองขนาด คือ ขนาด lab scale และขนาด pilot scale โดยการศึกษาสภาวะการอบแห้งด้วยเครื่องขนาด lab scale ได้ใช้สภาวะในการอบแห้งที่ดัดแปลงมาจากงานของ Grabowski et al. (2006; 2008) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทำแห้ง คือ อุณหภูมิลมร้อนขาเข้า (inlet temperature) อยู่ในช่วง 150-160 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้ได้อุณหภูมิลมร้อนขาออก (outlet temperature) ที่อยู่ในช่วง 80-85

องศาเซลเซียส (modified: Grabowski et al., 2006; 2008) โดยในสภาวะการอบแห้งนี้ได้ให้อัตราการระเหยแห้งของน้ำล้างมันฝรั่งอยู่ที่ประมาณ 500 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งค่อนข้างใช้เวลานานในการผลิตผงตัวอย่าง เนื่องจากอัตราการระเหยแห้งของเครื่องกำจัดอยู่ที่ 1 ลิตรต่อชั่วโมง ประกอบกับการที่ตัวอย่างมีปริมาณของแข็งน้อย จึงทำให้อัตราการระเหยแห้ง และกำลังการผลิตลดต่ำลงกว่าเดิม เมื่อนำสภาวะที่ได้ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้กับเครื่องขนาด pilot scale เพื่อช่วยเพิ่มอัตราการผลิตผงน้ำล้างมันฝรั่งให้สูงขึ้นในเวลาที่รวดเร็วกว่าเดิม พบว่าการควบคุมอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าให้อยู่ในช่วง 175-215 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้อุณหภูมิลมร้อนขาออกอยู่ในช่วง 75-90 องศาเซลเซียส เนื่องจากเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยขนาด lab scale มีขนาดห้องอบแห้ง หรือ chamber ที่ใหญ่ขึ้น จึงทำให้ต้องใช้อุณหภูมิลมร้อนขาเข้าในการอบแห้งที่สูงขึ้นเพื่อกระจายความร้อนให้ทั่วบริเวณ

เมื่อนำผงน้ำล้างมันฝรั่งที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน รวมถึงหาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เปรียบเทียบกับผงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า และน้ำต้มมันฝรั่ง (potato infusion) และหาปริมาณค่าความชื้น (moisture content) ของผงน้ำล้างมันฝรั่ง ผลที่ได้ดังแสดงในตาราง 10

ตาราง 10 ปริมาณโปรตีนและค่าความชื้นของผงน้ำล้างมันฝรั่ง

Test item	Sample		
	PWPW powder (solid)	Commercial PDA powder (solid)	Potato infusion (liquid)
Protein	3.25 %w	12.53 %w	1.8 %v
C: N ratio	23.81: 1	25.71: 1	0.64: 1
Moisture content	4 %	13 %	-

จากตาราง 10 พบว่า ผงน้ำล้างมันฝรั่ง (PWPW powder) ผงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า (commercial PDB powder) และในน้ำต้มมันฝรั่ง (potato infusion) มีปริมาณโปรตีนเป็นส่วนประกอบอยู่ที่ 3.25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก 12.53 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และ 1.8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ 23.81: 1 โดยน้ำหนัก 25.71: 1โดยน้ำหนัก และ 0.64: 1 โดยปริมาตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณความชื้นของผงน้ำล้างมันฝรั่งที่วัดได้ อยู่ที่ 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจัดว่ามีค่าความชื้นที่ต่ำปฏิกิริยาเคมีต่างๆ เช่น ออกซิเดชั่น และ

ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (maillard reaction) ไม่สามารถเกิดได้ และเป็นช่วงที่จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ส่งผลต่อการยืดอายุในการเก็บรักษาให้นานขึ้น

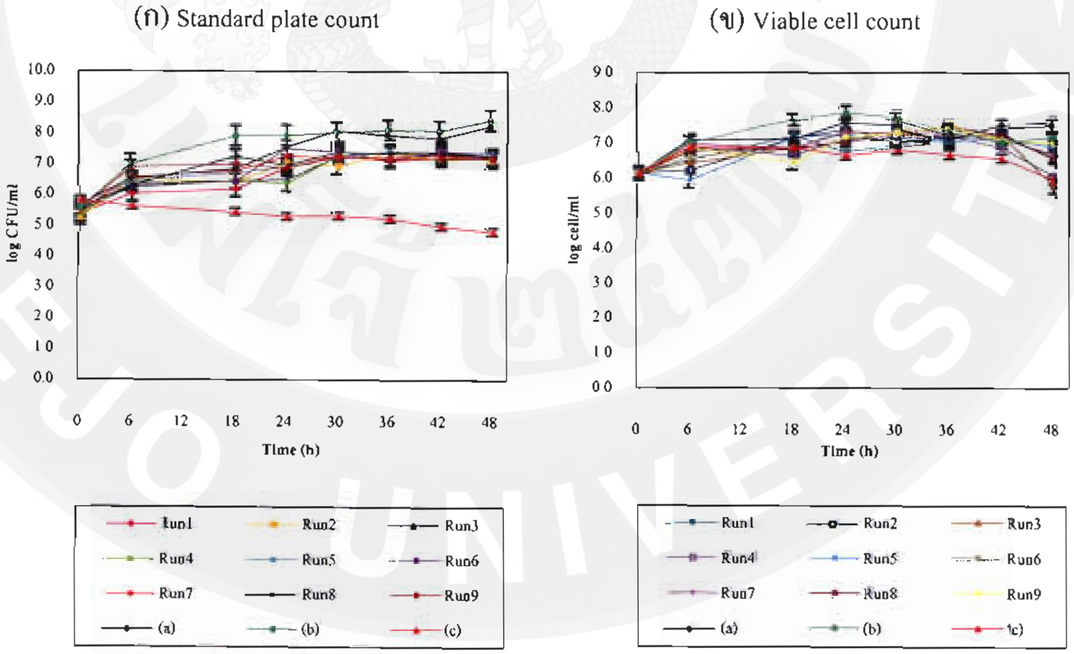
ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของปัจจัย ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผงน้ำล้างมันฝรั่ง ผงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า และน้ำต้มมันฝรั่ง พบว่า โปรตีนในแต่ละตัวอย่างมีปริมาณที่แตกต่างกัน จึงต้องมีการศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของปัจจัยในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ แผนการทดลองแบบ CCD เพื่อหาอัตราส่วน หรือปริมาณที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการเตรียม ซึ่งปัจจัยในการศึกษามี 2 ปัจจัย คือ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส ที่มีผลต่อค่าตอบสนอง คือ การเจริญของยีสต์ และรา ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว โดยได้กำหนดปริมาณต่ำสุดและสูงสุดของปัจจัยทั้ง 2 ที่ศึกษา ดังนี้ คือ ผงน้ำล้างมันฝรั่ง 91-212 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลเดกซ์โทรส 10-30 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตาราง 7 หน้า 43

ในการกำหนดปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่งเพื่อใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ตามแผนการทดลองแบบ CCD ได้เปรียบเทียบจากเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโปรตีน ที่มีอยู่ในตัวอย่างผงน้ำล้างมันฝรั่ง กับผงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า จากการพิจารณาผงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า พบว่า มีปริมาณโปรตีน อยู่ที่ 12.53 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผงน้ำล้างมันฝรั่ง มีปริมาณโปรตีน อยู่ที่ 3.25 เปอร์เซ็นต์ โดยในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 1 ลิตร ใช้ผงอาหารเลี้ยงเชื้อ 39 กรัม คิดเป็นปริมาณโปรตีน เท่ากับ 4.9 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงได้กำหนดช่วงปริมาณโปรตีนในผงน้ำล้างมันฝรั่งที่ใช้ในการศึกษา คือ 2.9-6.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งครอบคลุมอยู่ในช่วงของโปรตีนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และเมื่อเทียบเป็นปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่งที่ใช้จริง ได้ค่าต่ำสุดของผงน้ำล้างมันฝรั่งที่ใช้ คือ 91 กรัมต่อลิตร และค่าสูงสุด คือ 212 กรัมต่อลิตร ดังที่ได้กล่าวข้างต้น ผลการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB หรือ PDA ด้วยแผนการทดลองแบบ CCD สำหรับแผนการทดลอง 2 ปัจจัยชนิดกำลังสองแบบหมุน รูปแบบ 5 เหลี่ยม จึงประกอบไปด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB หรือ PDA ทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง ที่มีระดับของตัวแปรอิสระแตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 11 หน้า 60

1. ผลการศึกษาและหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ด้วยการออกแบบการทดลองแบบ CCD

เมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* TISTR 5020 ในอาหารเหลวชุดการทดลอง ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง หรือ 9 run (run1-run9) จากการเตรียมตามแผนการทดลองแบบ CCD เปรียบเทียบกับอาหารเหลวชุดควบคุม อันได้แก่ (a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ (c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บันทึกผลการเจริญของเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-48 ชั่วโมง โดยการตรวจนับโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง YPDA ด้วยวิธี standard plate count และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย ฮีมาไซโตมิเตอร์ ผลที่ได้ดังแสดงในภาพ 12 (ก) และ 12 (ข) ตามลำดับ



ภาพ 12 การเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลอง และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ run1-run9 คือ อาหารเหลวชุดการทดลอง ซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง หรือ 9 run ส่วน (a) (b) และ (c) คือ อาหารเหลวชุดควบคุม โดยที่

(a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า

(b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง

(c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

จากภาพ 12 แสดงการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลอง และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5020 สามารถเจริญในอาหารเหลวชุดการทดลองได้ทั้ง 9 ชุด โดยกราฟการเจริญมีลักษณะเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5020 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลอง มีการเจริญที่ใกล้เคียงกันกับการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดควบคุม อันได้แก่ (a) อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า และ (b) อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง แต่พบว่ามีการเจริญที่มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดควบคุม (c) ที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น ซึ่งมีแนวโน้มการเจริญเติบโตลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (ตารางภาคผนวก 4 และ 5) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ผงน้ำล้างมันฝรั่งอาจมีสารช่วยในการเจริญบางอย่างนอกเหนือจากน้ำตาลเดกซ์โทรสที่เติมลงไป และมีอยู่ในปริมาณที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต ทำให้ *S. cerevisiae* TISTR 5020 สามารถเพิ่มจำนวนจากเดิมได้

ในการหาปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1) และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) เพื่อเตรียมอาหารเลี้ยงสูตร PDB จากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD แผนการทดลอง 2 ปัจจัย ชนิดกำลังสองแบบหมุนรูปแบบ 5 เหลี่ยม ทำให้ได้อาหารเหลวชุดการทดลอง ที่ประกอบไปด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง ที่มีระดับของปัจจัยแตกต่างกัน ผลการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB แต่ละชุดการทดลอง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 การเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลองที่เตรียมตามแผนการทดลองแบบ CCD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Run	Code levels		Actual levels		Standard plate count
	X_1	X_2	X_1 (g/ l)	X_2 (g/ l)	(log CFU/ ml)
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 และ X_2 คือ รหัสแทนการใช้ค่าที่แปรผันของระดับปัจจัย อันได้แก่ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1) และ ปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) ส่วน actual levels X_1 และ X_2 คือ ปริมาณที่ใช้จริงของผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1) และปริมาณที่ใช้จริงของน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) เพื่อเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB หรือ PDA

จากตาราง 11 ผลการทดลองที่ได้นำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิผลของปัจจัยที่ศึกษา ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่งทั้ง 9 ชุดการทดลอง โดยการวิเคราะห์ค่าสถิติและวิเคราะห์การถดถอยแบบ linear regression analysis ด้วยโปรแกรม Statistix รุ่น 7 ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตาราง 12

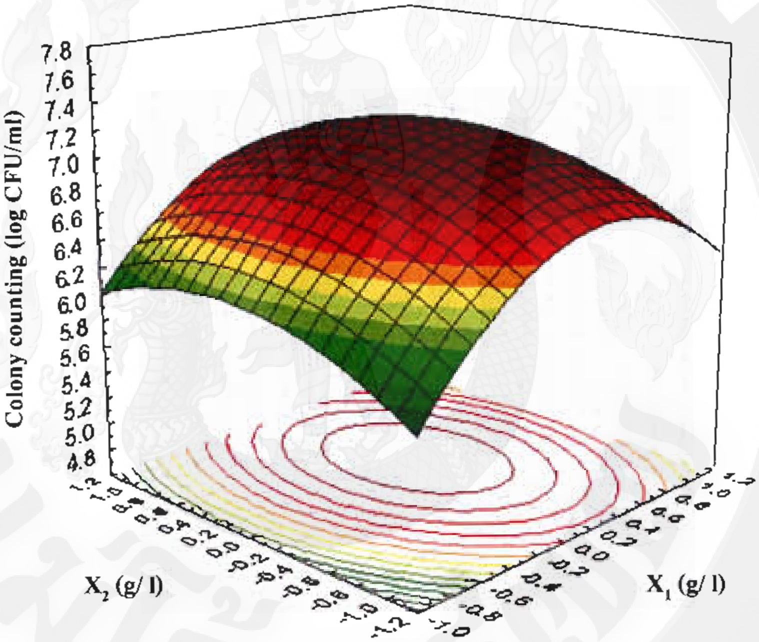
ตาราง 12 การวิเคราะห์ค่าการตอบสนอง (effect) และค่า regression coefficients สำหรับการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* TISTR 5020

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 ($P<0.05$)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษากับค่าการตอบสนองต่อเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 แสดงด้วยจำนวนโคโลนีของเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมด ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่า regression coefficients (R^2) เท่ากับ 0.7277 โดยค่า R^2 แสดงถึงความสามารถของสมการในการอธิบายผลการทดลองได้ใกล้เคียงค่าจริง ในค่าการตอบสนองต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ได้ 72.77 เปอร์เซ็นต์ จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ให้สังเกตจากตาราง ANOVA) พบว่าค่า P มากกว่า 0.05 นั่นคือ แบบหุ่นที่กำหนดไว้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติกับข้อมูลดังกล่าว ฉะนั้น ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB จึงมีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อนำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ที่ได้ มาสร้างกราฟ 3 มิติ และแสดงสมการกำลังสอง ลักษณะความสัมพันธ์แบบเส้นโค้ง (quadratic regression relationship) ระหว่างอิทธิพลของระดับปัจจัยที่ศึกษา คือ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1) และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 (Y) ด้วยโปรแกรม Statistica รุ่น 8 เพื่อหาค่าสูงสุดของการทดลองด้วยสมการ ผลการศึกษาที่ได้ ดังแสดงใน ภาพ 13



ภาพ 13 ความสัมพันธ์ของระดับปัจจัย ที่ได้แก่ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1 = 91-212 g/ l) และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2 = 10-30 g/ l) ที่ส่งผลต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 (Y) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเหลวชุดการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง

จากภาพ 13 แสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษาและค่าการตอบสนอง (การเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020) ในรูปสมการกำลังสองที่แสดงค่านัยสำคัญในแต่ละปัจจัยและระหว่างปัจจัย โดยค่าการตอบสนอง (Y) ที่ได้ ดังแสดงในสมการ (ซึ่งในเทอมของค่ารหัสกำหนดให้ X_1 แทน ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง และ X_2 แทน ปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส)

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

เมื่อนำสมการที่ได้มาทำนายค่าการตอบสนอง โดยประมวลผลด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง จากแผนการทดลองแบบ CCD พบว่า สามารถหาจุดที่เหมาะสมของปริมาณปัจจัย ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อสูงที่สุดได้ โดยกราฟแสดงจุดตอบสนองสูงสุด (maximum point) ดังแสดงในภาพ 13 ซึ่งสามารถหาจุดตอบสนองสูงสุดของปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง และน้ำตาลเดกซ์โทรส ที่ส่งผลให้ *S. cerevisiae* TISTR 5020 มีการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อใช้ค่ารหัส (code value) อยู่ที่ระดับ ดังนี้

ผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1)	=	0.30
น้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2)	=	0.20

ซึ่งจะส่งผลให้ *S. cerevisiae* TISTR 5020 มีจำนวนโคโลนีอยู่ที่ 7.20 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เมื่อแทนรหัสของทั้งสองตัวแปรด้วยค่าจริง เพื่อใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB จากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ให้ค่า ดังนี้

ผงน้ำล้างมันฝรั่ง	=	170	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลเดกซ์โทรส	=	22	กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองเพื่อศึกษาและหาปริมาณของปัจจัย ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD พบว่า แม้สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติจะให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.7277 นั่นคือ ผลของการเจริญเติบโตของเชื้อที่ได้ เป็นผลหรืออิทธิพลจากปัจจัยที่ศึกษา 72.78 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 27.22 เป็นผลจากปัจจัยอื่นที่ไม่ทราบได้ และพบว่าการวางแผนการทดลองนี้มีค่า p-value มากกว่า 0.05 ($P>0.05$) นั่นคือ แบบหุ่นที่กำหนดไว้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติกับข้อมูลดังกล่าว แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าการตอบสนอง (จำนวนโคโลนีของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เท่ากับ 7.20 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) ที่ทำนายได้จากการสมการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ กับการเจริญของเชื้อเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดควบคุม อันได้แก่ (a) อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า (7.54 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) และ (b) อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (7.93 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร)

หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ข้อมูลดังแสดงในตารางภาคผนวก 4) พบว่า การเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดควบคุมดังกล่าว มีค่าที่ใกล้เคียงกันกับค่าที่ได้จากการทำนายของสมการ ดังนั้น จึงได้ปรับใช้ระดับของปัจจัยที่ได้จากการทำนายของสมการข้างต้น เพื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่ให้ค่าการเจริญของเชื้อที่ถูกเลี้ยงได้สูงที่สุด เพื่อใช้ทดลองเลี้ยงเชื้ออีกครั้งด้วยสภาวะเดิม

2. ผลการศึกษาและหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB และ PDA ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ด้วยการออกแบบการทดลองแบบ CCD

เมื่อเลี้ยง *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ด้วยอาหารเหลว และอาหารแข็งชุดการทดลอง ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB และ PDA ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง (run1-run9) จากการเตรียมตามแผนการทดลองแบบ CCD เปรียบเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารเหลว และอาหารแข็งชุดควบคุม อันได้แก่ (a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB หรือ PDA สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB หรือ PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ (c) คือ อาหารเหลว หรืออาหารแข็ง ที่ประกอบด้วยน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น บันทึกผลการเจริญของราทั้งสองชนิดด้วยการหาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ ของเส้นใยราที่เลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น รวมทั้งวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหารแข็ง และนับจำนวนสปอร์ของเชื้อด้วย ฮีมาไซโตมิเตอร์ ผลที่ได้ดังแสดงใน ตาราง 13 และ ภาพ 14

ตาราง 13 ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม

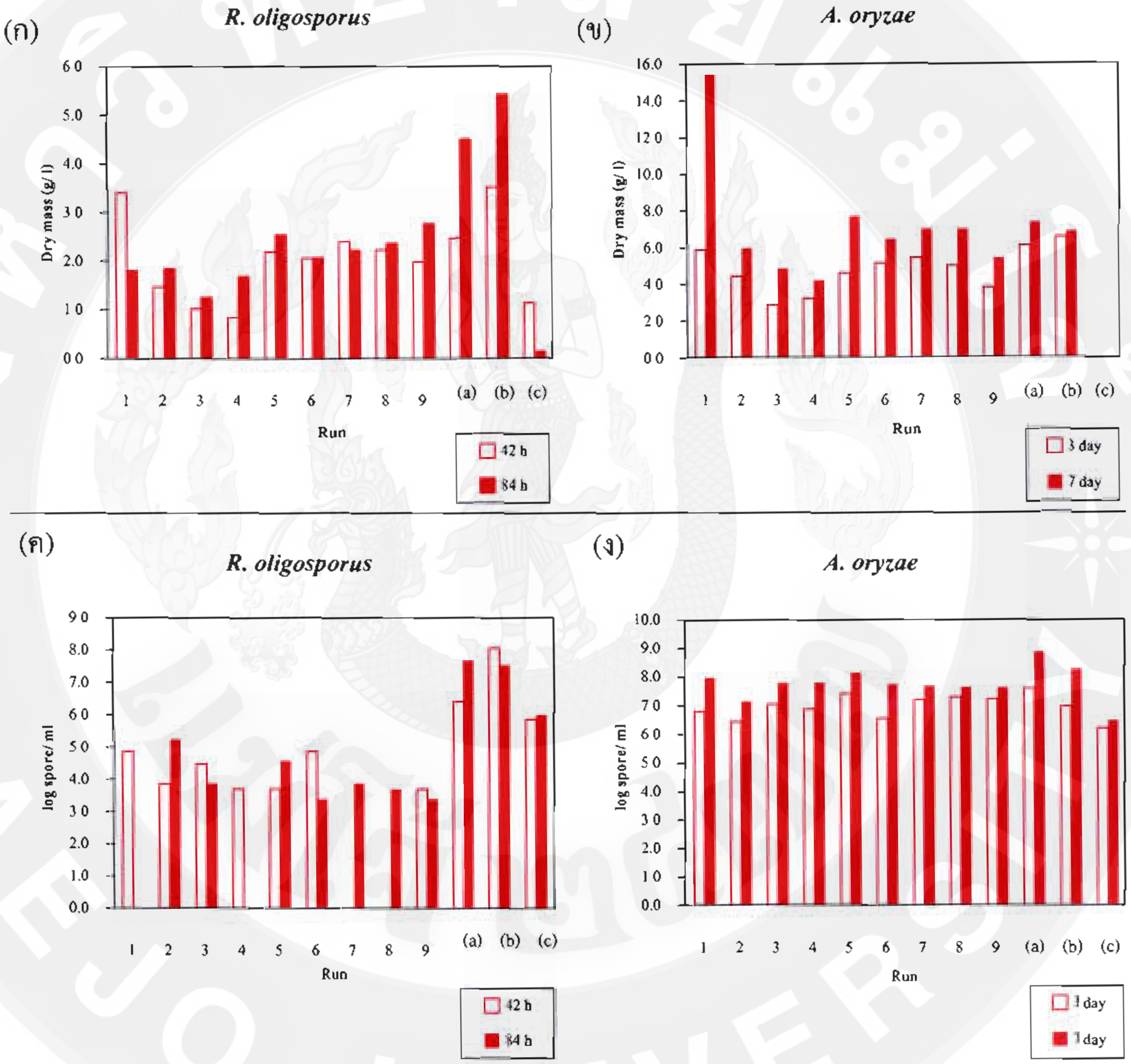
รา	ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตรต่อวัน)											
	อาหารแข็งชุดการทดลอง									อาหารแข็งชุดควบคุม		
	run1	run2	run3	run4	run5	run6	run7	run8	run9	(a)	(b)	(c)
R. oligosporus	10.08	10.32	10.08	9.12	9.60	9.12	8.88	9.60	9.36	6.72	7.20	3.36
A. orzae	1.56	1.60	1.50	1.30	1.43	1.50	1.39	1.36	1.47	1.27	1.39	0.63

จากตาราง 13 แสดงผลจากการวัดการเจริญของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของ

R. oligosporus ทุกๆ 6 ชั่วโมง และ *A. oryzae* ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งโคโลนีเต็มจานเพาะเชื้อ พบว่า ราทั้งสองชนิดสามารถเจริญบนอาหารแข็งชุดการทดลอง ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ทั้ง 9 ชุดการทดลองได้ และสามารถเจริญได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารแข็งชุดควบคุม (c) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น โดย *R. oligosporus* ที่เจริญบนอาหารแข็งชุดการทดลอง ทั้ง 9 ชุด มีการเจริญของโคโลนีอยู่ระหว่าง 8.88-10.32 เซนติเมตรต่อวัน ซึ่งมีการเจริญของโคโลนีที่เร็วกว่าเมื่อเลี้ยงเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงบนอาหารแข็งชุดควบคุม (a) PDA สำเร็จรูปทางการค้า และ (b) PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง ที่มีการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 6.72 และ 7.20 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ ส่วนการเจริญของโคโลนี *A. oryzae* บนอาหารแข็งชุดการทดลอง ทั้ง 9 ชุด อยู่ระหว่าง 1.30-1.60 เซนติเมตรต่อวัน พบว่ามีการเจริญที่ใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญบนอาหารแข็งชุดควบคุม (a) และ (b) ซึ่งมีการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 1.27 และ 1.39 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ (ตารางผนวก 6 และ 7) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหารแข็งชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม พบว่า ลักษณะความหนาแน่นของเส้นใยราของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* มีปริมาณความหนาแน่นของเส้นใยที่เจริญบนอาหารแข็งชุดการทดลองที่น้อยกว่า เมื่อเทียบกับการเจริญบนอาหารแข็งชุดควบคุม (a) และ (b) แต่มีปริมาณความหนาแน่นของเส้นใยที่มากกว่า เมื่อเทียบกับการเจริญบนอาหารแข็งชุดควบคุม (c)

เมื่อทำการหาปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ เพื่อวัดการเจริญของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลอง ซึ่งประกอบไปด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง 9 ชุดการทดลอง (run1-run9) เปรียบเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดควบคุม อันได้แก่ (a) PDB สำเร็จรูปทางการค้า และ (b) PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง โดยวัดการเจริญของ *R. oligosporus* ที่ 12 ชั่วโมง และที่ 84 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยง ส่วน *A. oryzae* วัดการเจริญในวันที่ 3 และวันที่ 7 หลังการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้ดังแสดงในภาพ 14 เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพของราทั้งสองชนิด ที่เลี้ยงในอาหารเหลวชุดการทดลอง กับอาหารเหลวชุดควบคุม พบว่า ราทั้งสองชนิดสามารถเจริญในอาหารเหลวชุดการทดลองทั้ง 9 ชุดได้ แม้ว่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ ที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลองบางชุดจะมีปริมาณที่ต่ำกว่า เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดควบคุม (a) และ (b) แต่พบว่า ปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพของราดังกล่าว ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลอง มีปริมาณมากกว่าเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดควบคุม (c) (ตารางภาคผนวก 8 และ 9) ส่วนน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพของ *R. oligosporus* ที่ลดลงเมื่อเวลาการเพาะเลี้ยงผ่านไปถึง 84 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากเกิดการสลายของเส้นใยราซึ่งมีปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง คือ ความเหมาะสมของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อ

ไนโตรเจน และประเภทของแหล่งคาร์บอน หรือไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อ (Graham et al., 1976)



ภาพ 14 การเจริญของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วย อาหารเหลวและอาหารแข็งชุดการทดลอง เปรียบเทียบกับอาหารเหลวและอาหารแข็งชุดควบคุม

หมายเหตุ run1-run9 คือ อาหารชุดการทดลอง ส่วน (a), (b) และ (c) คือ อาหารชุดควบคุม โดยที่

ภาพ 23 (ก) คือ น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ *R. oligosporus*

ภาพ 23 (ข) คือ น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ *A. oryzae*

ภาพ 23 (ค) คือ จำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus*

ภาพ 23 (ง) คือ จำนวนสปอร์ของ *A. oryzae*

เมื่อทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* จากการเก็บสปอร์ของราทั้งสองชนิดที่เลี้ยงบนอาหารแข็งชุดการทดลอง ที่ประกอบไปด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่งทั้ง 9 ชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม เพื่อหาปริมาณของผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1) และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB หรือ PDA จากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ CCD แผนการทดลอง 2 ปัจจัย ชนิดกำลังสองแบบหมุนรูปแบบ 5 เหลี่ยม ผลจากการตรวจนับจำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus* ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง และ *A. oryzae* ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน บนอาหารแข็งชุดการทดลอง ดังแสดงในตาราง 14

ตาราง 14 จำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งชุดการทดลองที่เตรียมตามแผนการทดลองแบบ CCD

Run	Code levels		Actual levels		Spore count (log spore/ ml)	
	X_1	X_2	X_1 (g/ l)	X_2 (g/ l)	*R. oligosporus*	*A. oryzae*
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 และ X_2 คือ รหัสแทนการใช้ค่าที่แปรผันของระดับปัจจัย อันได้แก่ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1) และ ปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) ส่วน actual levels X_1 และ X_2 คือ ปริมาณที่ใช้จริงของผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1) และปริมาณที่ใช้จริงของน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) เพื่อเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB หรือ PDA

จากตาราง 14 ผลการทดลองที่ได้นำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิผลของปัจจัยที่ศึกษา ต่อการเจริญเติบโตของราเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่งทั้ง 9 ชุดการทดลอง โดยการวิเคราะห์ค่าสถิติและวิเคราะห์การถดถอยแบบ linear regression analysis ด้วยโปรแกรม Statistix รุ่น 7 ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตาราง 15 และ 16

ตาราง 15 การวิเคราะห์ค่าการตอบสนอง (effect) และค่า regression coefficients สำหรับการเจริญเติบโตของ *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)

จากตาราง 15 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษากับค่าการตอบสนองต่อเจริญเติบโตของ *R. oligosporus* แสดงด้วยจำนวนสปอร์ที่ราสร้าง ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9939 โดยค่า R^2 แสดงถึงความสามารถของสมการในการอธิบายผลการทดลองได้ใกล้เคียงค่าจริงในค่าการตอบสนองต่อการเจริญของ *R. oligosporus* ได้ 99.39

เปอร์เซ็นต์ จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่าค่า P น้อยกว่า 0.05 นั่นคือ แบบหุ่นที่กำหนดไว้มีนัยสำคัญทางสถิติกับข้อมูลดังกล่าว หมายความว่า ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่งและปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB จากผงน้ำล้างมันฝรั่ง มีความสัมพันธ์กับจำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus* ที่สร้างขึ้น

ตาราง 16 การวิเคราะห์ค่าการตอบสนอง (effect) และค่า regression coefficients สำหรับการเจริญเติบโตของ *A. oryzae*

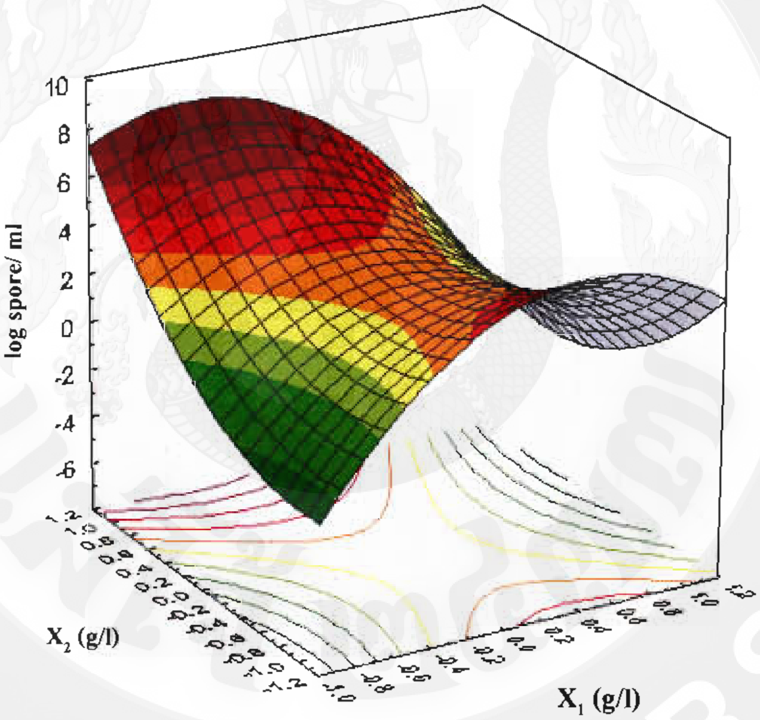
VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	VIF
CONSTANT	7.65250	0.02496	306.61	0.0000	
X_2	-0.38047	0.03157	-12.05	0.0012	1.0
X_2^2	-0.07593	0.04604	-1.65	0.1977	1.0
X_1	0.03235	0.03157	1.02	0.30809	1.0
X_1^2	0.27515	0.04603	5.98	0.0094	1.0
$X_1 X_2$	-0.46999	0.06309	-7.45	0.0050	1.0
R-SQUARED		RESID. MEAN SQUARE (MSE)		0.00249	
0.9877					
ADJUSTED R-SQUARED		STANDARD DEVIATION		0.04992	
0.9673					
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 *แสดงค่านัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

จากตาราง 16 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษากับค่าการตอบสนองต่อของ *A. oryzae* ที่มีต่อจำนวนสปอร์ที่ราสร้าง ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9877 (98.77 เปอร์เซ็นต์) จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่าค่า P น้อยกว่า 0.05 นั่นคือ แบบหุ่นที่กำหนดไว้มีนัยสำคัญทางสถิติกับข้อมูลดังกล่าว นั่นคือ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง

และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB จากผงน้ำล้างมันฝรั่ง มีความสัมพันธ์กับจำนวนสปอร์ของ *A. oryzae* ที่ถูกสร้างขึ้น

เมื่อนำแบบจำลองคณิตศาสตร์จากการนับจำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* มาสร้างกราฟ 3 มิติ และแสดงสมการกำลังสอง โดยมีลักษณะความสัมพันธ์แบบเส้นโค้ง (quadratic regression relationship) ระหว่างอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษา คือ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1) และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2) ต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อรา (Y) ด้วยโปรแกรม Statistica รุ่น 8 เพื่อหาค่าสูงสุดของการทดลองด้วยสมการและกราฟที่แสดง ดังภาพ 15 และ 16

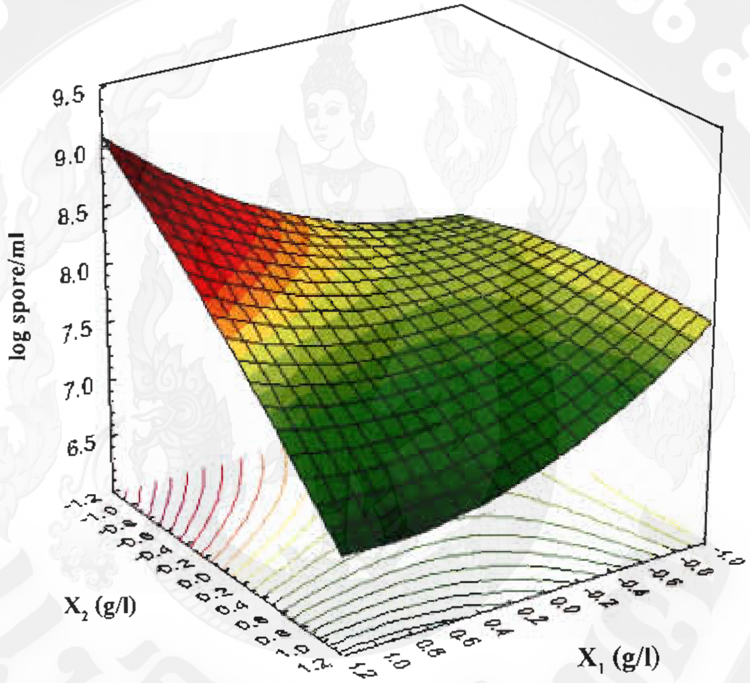


ภาพ 15 ความสัมพันธ์ของระดับปัจจัย ที่ได้แก่ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1 = 91-212 g/ l) และปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2 = 10-30 g/ l) ที่ส่งผลต่อจำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus* (Y) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง บนอาหารแข็งชุดการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง

จากภาพ 15 แสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษาและค่าการตอบสนอง (จำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus*) ในรูปสมการกำลังสองที่แสดงค่านัยสำคัญในแต่ละปัจจัยและระหว่าง

ปัจจัย โดยค่าการตอบสนอง (Y) ที่ได้ ดังแสดงในสมการ (ซึ่งในเทอมของค่ารหัส กำหนดให้ X_1 แทน ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง และ X_2 แทน ปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส)

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



ภาพ 16 ความสัมพันธ์ของระดับปัจจัย ที่ได้แก่ ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1 = 91-212 g/ l) และ ปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2 = 10-30 g/ l) ที่ส่งผลต่อจำนวนสปอร์ของ *A. oryzae* (Y) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน บนอาหารแข็งชุดการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง

จากภาพ 16 แสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษาและค่าการตอบสนอง (จำนวนสปอร์ของ *A. oryzae*) ในรูปสมการกำลังสองที่แสดงค่านัยสำคัญในแต่ละปัจจัยและระหว่างปัจจัย โดยค่าการตอบสนอง (Y) ที่ได้ ดังแสดงในสมการ (ซึ่งในเทอมของค่ารหัส กำหนดให้ X_1 แทน ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง และ X_2 แทน ปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส)

$$Y = 7.6552 + 0.0322X_1 - 0.38X_2 + 0.268X_1X_1 - 0.4697X_1X_2 - 0.0765X_2X_2$$

เมื่อนำสมการที่ได้มาทำนายค่าการตอบสนอง โดยประมวลผลด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง จากแผนการทดลองแบบ CCD พบว่า สามารถหาจุดที่เหมาะสมของปริมาณปัจจัย ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อสูงสุดได้ โดยได้เลือกกราฟที่แสดงจุดตอบสนองสูงสุด (maximum point) ในภาพ 15 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยกับจำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus* เนื่องจากมีค่า R^2 ที่สูงกว่าสมการที่ได้จากกราฟในภาพ 16 โดยจากกราฟที่เลือกดังกล่าว สามารถหาจุดตอบสนองสูงสุดของปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง และน้ำตาลเดกซ์โทรส ที่ส่งผลให้รามีการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อใช้ค่ารหัส (code value) อยู่ที่ระดับ ดังนี้

ผงน้ำล้างมันฝรั่ง (X_1)	=	-0.50
น้ำตาลเดกซ์โทรส (X_2)	=	1.20

ซึ่งจะส่งผลให้จำนวนสปอร์ของรามีจำนวนเท่ากับ 8.36 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อแทนรหัสของทั้งสองตัวแปรด้วยค่าจริง เพื่อใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้ค่า ดังนี้

ผงน้ำล้างมันฝรั่ง	=	212	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลเดกซ์โทรส	=	32	กรัมต่อลิตร

ศึกษาการเจริญของยีสต์และราเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ที่ให้ค่าการตอบสนองที่เหมาะสม

1. ผลการศึกษาการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ที่ให้ค่าการตอบสนองที่เหมาะสม

เมื่อทำการเลือกจุดที่เหมาะสมของปริมาณปัจจัยทั้งสอง ที่ส่งผลให้ *S. cerevisiae* TISTR 5020 มีการเจริญเติบโตสูงสุดได้แล้ว (จากหัวข้อ การศึกษาและหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ด้วยการออกแบบการทดลองแบบ CCD) โดยปริมาณของปัจจัยทั้งสองสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB จากผงน้ำล้างมันฝรั่งที่ให้ค่าการตอบสนองที่เหมาะสม หรือ PDB optimum medium ประกอบด้วย ผงน้ำล้างมันฝรั่ง 170 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลเดกซ์โทรส 22 กรัมต่อลิตร สำหรับเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TISTR 5020 อีกครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ทำนายได้ แม้ว่าค่า R^2 ของสมการการประมาณค่าจะมีค่าต่ำ แต่เมื่อพิจารณาค่าการ

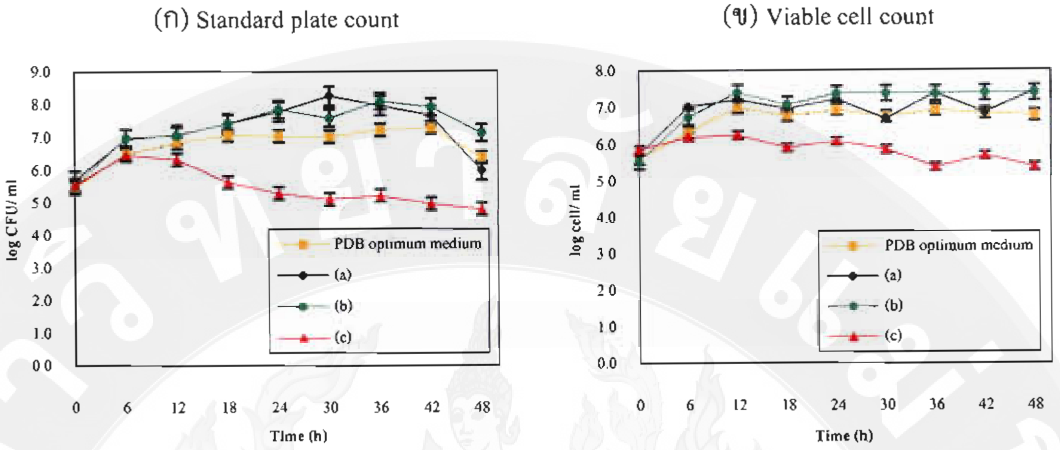
ตอบสนองของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ที่ทำนาย พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันกับค่าการเจริญที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารชุดควบคุม ร่วมกับการพิจารณาวัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้ ที่ต้องการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ผงน้ำล้างมันฝรั่งเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงยีสต์และรา โดยเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อที่ได้ กับการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดควบคุม PDB ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป จึงได้เลือกสูตรอาหารที่มีระดับของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์มากที่สุดจากการทำนายที่ได้ มาทดลองเลี้ยงเชื้อและเปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตที่ได้กับอาหารเหลวชุดควบคุมอีกครั้ง ด้วยสภาวะการเพาะเลี้ยงเดิม ผลที่ได้แสดงในตาราง 17 ภาพ 16-17 และตารางภาคผนวก 12-13

ตาราง 17 จำนวนโคโลนีของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ที่ได้จากการทำนายของสมการ (predicted) และจากผลการทดลอง (experimental) เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผงน้ำล้างมันฝรั่ง (g/ l)	น้ำตาลเดกซ์โทรส (g/ l)	Standard plate count (log CFU/ ml)	
		Predicted	Experimental
170	22	7.20 (100%)	7.06 (98.06%)

จากตาราง 17 เมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* TISTR 5020 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5020 มีจำนวนโคโลนีอยู่ที่ 7.06 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 98.06 เปอร์เซ็นต์ของผลที่ได้จากการทำนาย ส่วนจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ได้จากการทำนายของสมการ มีค่าเท่ากับ 7.20 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (100 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการทดลอง เท่ากับ 1.94 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองเลี้ยง *S. cerevisiae* TISTR 5020 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium เปรียบเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดควบคุม (a) (b) และ (c) บันทึกผลการเจริญของเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-48 ชั่วโมง โดยการตรวจนับโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง YPDA ด้วยวิธี standard plate count และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย ฮีมาไซโตมิเตอร์ ผลที่ได้ดังแสดงในภาพ 17 (ก) และ 17 (ข) ตามลำดับ



ภาพ 17 การเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

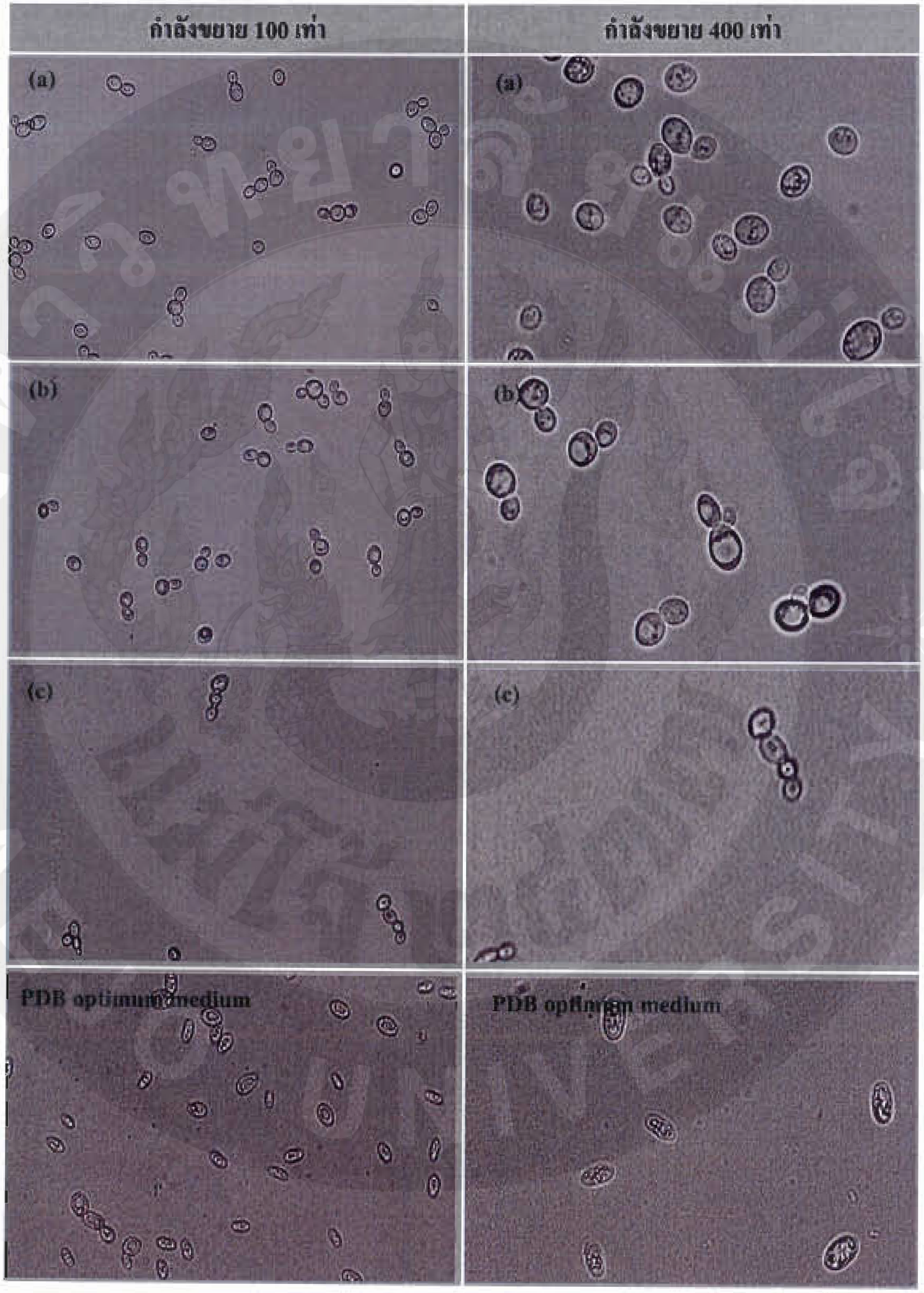
หมายเหตุ (a) (b) และ (c) คือ อาหารเหลวชุดควบคุม โดยที่

(a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า

(b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง

(c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

จากภาพ 17 แสดงการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5020 สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB optimum medium โดยมีการเจริญที่เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง เช่นเดียวกับการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดควบคุม (a) และ (b) ในขณะที่อาหารเหลวชุดควบคุม (c) มีแนวโน้มการเจริญของเชื้อที่ลดต่ำเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป โดยจำนวนโคโลนีสูงสุดของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium อยู่ที่ 7.302 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 42 ชั่วโมง และมีการเจริญที่ลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงจนถึงเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนในอาหารเหลวชุดควบคุม (a) และ (b) มีจำนวนโคโลนีของเชื้อสูงสุดอยู่ที่ 8.249 และ 8.027 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง ตามลำดับ และเริ่มมีการเจริญของเชื้อที่ลดลงเรื่อยๆ หลังจากผ่านเวลาการเพาะเลี้ยงดังกล่าว (ตารางภาคผนวก 12)



ภาพ 18 ลักษณะสัณฐานของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม

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

(a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า

(b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง

(c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

จากภาพ 18 แสดงลักษณะสัณฐานของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม (a) (b) และ (c) ใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดควบคุม จะมีรูปร่างเซลล์ค่อนข้างกลม บางเซลล์มีการแตกหน่อ (budding) ส่วนยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB optimum medium พบว่า มีการสร้างแอสโคสปอร์ที่มีรูปกลม หรือไข่ มีจำนวน 1 ถึง 4 ต่อแอสคัส ซึ่งเป็นการสืบพันธ์แบบอาศัยเพศ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะในการเพาะเลี้ยงมีความไม่เหมาะสม (Bagyaraj and Arpana, 2006) โดยปกติน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานที่ดีที่สุดของยีสต์ ไม่ว่าจะเป็นการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน หรือในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่อย่างไรก็ตาม ชนิดของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ของเชื้อ การเสริมแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญ และปริมาณไนโตรเจน หรือปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ และปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ ล้วนมีผลต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* (Ejiofor et al., 1996) จากการวิเคราะห์อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในผงน้ำล้างมันฝรั่ง เปรียบเทียบกับผงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า (ในหัวข้อ ผลการศึกษาการทำแห้งน้ำล้างมันฝรั่งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย) จึงเป็นไปได้ว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ซึ่งเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ ในผงน้ำล้างมันฝรั่งอาจอยู่ในระดับที่เหมาะสมเจริญต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 น้อย จึงทำให้เชื้อเกิดการสืบพันธุ์โดยสร้างแอสโคสปอร์ขึ้น

2. ผลการศึกษาการเจริญของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB และ PDA ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ที่ให้ค่าการตอบสนองที่เหมาะสม

เมื่อทำการเลือกจุดที่เหมาะสมของปริมาณปัจจัยทั้งสอง ที่ส่งผลให้รามีการเจริญเติบโตสูงสุดได้แล้ว (จากหัวข้อ การศึกษาและหาปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB และ PDA ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ด้วยการออกแบบการทดลองแบบ CCD) โดยปริมาณของปัจจัยทั้งสองสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB และ PDA จากผงน้ำล้างมันฝรั่งที่ให้ค่าการตอบสนองที่เหมาะสม หรือ PDB optimum medium และ PDA optimum medium ประกอบด้วย ผงน้ำล้างมันฝรั่ง 212 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลเดกซ์โทรส 32 กรัมต่อลิตร ใช้เพาะเลี้ยง *R. oligosporus* และ *A. oryzae* อีกครั้ง

เพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้จากการประมาณค่าของสมการ รวมถึงเปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตที่ได้กับอาหารแข็งชุดควบคุม และอาหารเหลวชุดควบคุม อีกครั้ง ด้วยสภาวะการเพาะเลี้ยงเดิม ผลที่ได้แสดงในตาราง 18-26 และตารางภาคผนวก 14-16

ตาราง 18 จำนวนสปอร์ของราที่ได้จากการทำนายของสมการ (predicted) และจากผลการทดลอง (experimental) เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium

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

หมายเหตุ ข้อมูลวิจัยดังตารางภาคผนวก 14

จากตาราง 18 เมื่อเลี้ยง *R. oligosporus* บนอาหารแข็งสูตร PDA optimum medium เป็นเวลา 84 ชั่วโมง พบว่า จำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus* ที่ถูกสร้างขึ้น มีจำนวนเท่ากับ 6.18 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 73.92 เปอร์เซ็นต์ของผลที่ได้จากการทำนาย ส่วนจำนวนสปอร์ที่ได้จากการทำนายของสมการ มีค่าเท่ากับ 8.36 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร (100 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการทดลอง เท่ากับ 26.08 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เมื่อทดลองใช้อาหารแข็งสูตร PDA optimum medium เลี้ยง *A. oryzae* พบว่า *A. oryzae* สามารถสร้างสปอร์ได้เท่ากับ 7.33 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (ตารางภาคผนวก 14)

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA optimum medium กับการเลี้ยงด้วยอาหารแข็งชุดควบคุม (a) (b) และ (c) เป็นเวลา 84 ชั่วโมง พบว่า จำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งชุดควบคุม (a) และ (b) มีจำนวนมากกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร PDA optimum medium โดยมีจำนวนสปอร์ เท่ากับ 7.28, 7.58 และ 6.18 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารแข็งชุดควบคุม (c) พบว่า *R. oligosporus* สร้างสปอร์ได้น้อยกว่า เมื่อเทียบกับการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA optimum medium (6.18 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร) โดย *R. oligosporus* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งชุดควบคุม (c) มีจำนวนสปอร์ เท่ากับ 5.58 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร ส่วน *A. oryzae* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม (a) (b) และ (c) เป็นเวลา 7 วัน พบว่า จำนวนสปอร์ของ *A. oryzae* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งชุดควบคุม (a) และ (b) มีปริมาณมากกว่าเมื่อ

เปรียบเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร PDA optimum medium แต่พบว่า จำนวนสปอร์ของ *A. oryzae* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA optimum medium มีจำนวนมากกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารแข็งชุดควบคุม (c) โดยมีจำนวนสปอร์ เท่ากับ 8.66, 7.99, 7.33 และ 5.81 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก 14)

เมื่อทำการวัดการเจริญของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของ *R. oligosporus* ทุกๆ 6 ชั่วโมง และ *A. oryzae* ทุกๆ 24 ชั่วโมงจนกระทั่งโคโลนีเต็มจานเพาะเชื้อ ผลที่ได้ดังแสดงในตาราง 19

ตาราง 19 ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม

รา	ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตรต่อวัน)			
	อาหารแข็งชุดควบคุม			PDA optimum medium
	(a)	(b)	(c)	
R. oligosporus	6.96	7.44	4.56	8.40
A. orzae	1.42	1.45	0.84	1.70

จากตาราง 19 แสดงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม พบว่า ราทั้งสองชนิดมีค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของโคโลนีที่เร็วกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงบนอาหารแข็งชุดควบคุม (a) (b) และ (c) โดย *R. oligosporus* มีค่าเฉลี่ยการเจริญของโคโลนี ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม (a) (b) และ (c) อยู่ที่ 8.40, 6.96, 7.44 และ 4.56 เซนติเมตรต่อวัน ส่วน *A. oryzae* มีค่าเฉลี่ยการเจริญของโคโลนี อยู่ที่ 1.70, 1.42, 1.45 และ 0.84 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ (ตารางผนวก 15 และ 16)

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหารแข็ง PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม พบว่า ลักษณะความหนาแน่นของเส้นใยราของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* มีปริมาณความหนาแน่นของเส้นใยราที่เจริญบนอาหารแข็งชุดการทดลองที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการเจริญบนอาหารแข็งชุดควบคุม (a) และ (b) แต่มีปริมาณความหนาแน่นของเส้นใยที่มากกว่า เมื่อเทียบกับการเจริญบนอาหารแข็งชุดควบคุม (c) ดังแสดงในตาราง 20 และ 21

ตาราง 20 ลักษณะโคโลนีของ *R. oligosporus* เมื่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม

อาหาร	โคโลนี	ผิวหน้าและลักษณะอื่นๆ
(a)		ลักษณะโคโลนีฟู คล้ายสำลี สปอร์เมื่อมีอายุน้อยสีขาว เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมดำ เส้นใยสีขาว อัดกันแน่นเป็นแผ่นหนา เต็มจานเพาะเชื้อภายใน 30 ชั่วโมง
(b)		ลักษณะโคโลนีฟู คล้ายสำลี สปอร์เมื่อมีอายุน้อยสีขาว เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมดำ เส้นใยสีขาว อัดกันแน่นเป็นแผ่นหนา เต็มจานเพาะเชื้อภายใน 30 ชั่วโมง
(c)		เส้นใยสีขาว เบาบางบางไม่เป็นโคโลนี สปอร์สีดำ

ตาราง 20 (ต่อ)

อาหาร	โคโลนี	ผิวหน้าและลักษณะอื่นๆ
*PDA optimum medium		ลักษณะโคโลนีฟู คล้ายสำลี สปอร์เมื่อมีอายุน้อยสีขาว เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมดำ เส้นใยสีขาว พุ่งเร็วจนเต็มจานเพาะเชื้อในเวลา 24 ชั่วโมง แต่ค่อนข้างบาง

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

(a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า

(b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง

(c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

* จุดสีส้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium เกิดจากแป้งที่แขวนลอยอยู่ในน้ำล้างมันฝรั่งถูกให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ

ตาราง 21 ลักษณะโคโลนีของ *A. oryzae* เมื่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม

อาหาร	โคโลนี	ผิวหน้าและลักษณะอื่นๆ
(a)		โคโลนีเป็นวงซ้อนเป็นระยะ ลักษณะปุยคล้ายกำมะหยี่ สปอร์กระจายอยู่อย่างหนาแน่น สีเหลืองเขียว เส้นใยสีขาวอัดกันแน่นเป็นแผ่นหนา

ตาราง 21 (ต่อ)

อาหาร	โคโลนี	ผิวหน้าและลักษณะอื่นๆ
(b)		โคโลนีเป็นวงซ้อนเป็นระยะ ลักษณะปุย คล้ายกำมะหยี่ สปอร์กระจายอยู่อย่างหนาแน่น สีเขียว เส้นใยสีขาว อัดกันแน่นแต่ไม่หนา เจริญได้อย่างรวดเร็ว
(c)		เส้นใยใส สปอร์สีดำ มีปริมาณน้อยมาก
PDA optimum medium		โคโลนีเป็นวงซ้อนเป็นระยะ สปอร์เป็นผงฝุ่นสีเขียว เส้นใยใสสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว เต็มจานเพาะเชื้อภายใน 5 วัน แต่ค่อนข้างบาง

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

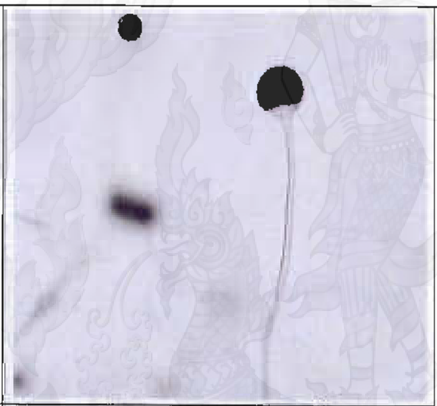
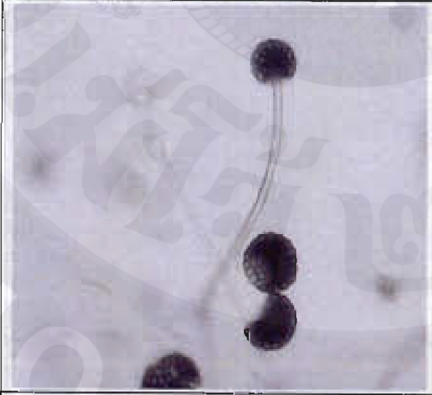
(a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า

(b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง

(c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

เมื่อศึกษาลักษณะเส้นใยราวมถึงสปอร์ของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม (a) (b) และ (c) ใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลที่ได้ดังแสดงในตาราง 22 และ 23

ตาราง 22 ลักษณะเส้นใยราและสปอร์ของ *R. oligosporus* เมื่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม ใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

อาหาร	เส้นใยและสปอร์	ลักษณะสัณฐาน
(a)		เส้นใยไม่มีผนังกั้น ปลายสปอร์แรงจิโอฟอร์ มีสปอร์แรงจิโอสปอร์ขนาดเล็ก รูปร่างกลมมากมาย
(b)		เส้นใยไม่มีผนังกั้น ปลายสปอร์แรงจิโอฟอร์ มีสปอร์แรงจิโอสปอร์ขนาดเล็ก รูปร่างกลมมากมาย
(c)		เส้นใยแห้งลีบ สีดำ สปอร์แรงจิโอสปอร์สีดำ เยื่อหุ้มด้านนอกแตกออก

ตาราง 22 (ต่อ)

อาหาร	เส้นใยและสปอร์	ลักษณะสัณฐาน
PDA optimum medium		เส้นใยไม่มีผนังกั้น ที่ปลายสปอร์แรงจิโอฟอร์ มีสปอร์แรงจิโอสปอร์ขนาดเล็ก รูปร่างกลมมากมาย

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

(a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า

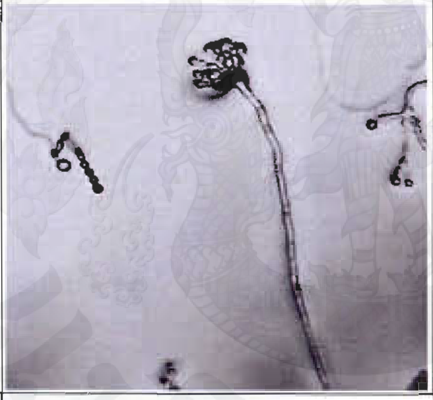
(b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง

(c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

ตาราง 23 ลักษณะเส้นใยราและสปอร์ของ *A. oryzae* เมื่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม ใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

อาหาร	เส้นใยราและสปอร์	ลักษณะสัณฐาน
(a)		เส้นใยมีผนังกั้น โคนิเดียต่อยาวเป็นสายโซ่ ไม่ยาวมาก รูปร่างกลม ผนังเรียบ ถึงขรุขระเล็กน้อย

ตาราง 23 (ต่อ)

อาหาร	เส้นใยราและสปอร์	ลักษณะสัณฐาน
(b)		เส้นใยมีผนังกั้น โคนิเดียต่อยาวเป็นสายโซ่ ยาวและอัดแน่น รูปร่างกลม ผนังเรียบ ถึงขรุขระเล็กน้อย
(c)		เส้นใยมีผนังกั้น โคนิเดียต่อเป็นโซ่สายสั้นๆ รูปร่างกลม ผนังเรียบถึงขรุขระเล็กน้อย
PDA optimum medium		เส้นใยมีผนังกั้น โคนิเดียต่อยาวเป็นสายโซ่ ไม่ยาวมาก แต่อัดแน่น รูปร่างกลม ผนังเรียบ ถึงขรุขระเล็กน้อย

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

(a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า

(b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง

(c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

เมื่อทำการหาปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ เพื่อวัดการเจริญของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม (a) (b) และ (c) โดยวัดการเจริญของ *R. oligosporus* ที่ 12 ชั่วโมง และที่ 84 ชั่วโมงหลังการเพาะเลี้ยง ส่วน *A. oryzae* วัดการเจริญในวันที่ 3 และวันที่ 7 หลังการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้ดังแสดงในตาราง 24-26

ตาราง 24 น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม

อาหาร	น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)			
	R. oligosporus		*A. oryzae*	
	42 ชั่วโมง	84 ชั่วโมง	3 วัน	7 วัน
(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

จากตาราง 24 แสดงน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium กับอาหารเหลวชุดควบคุม พบว่า น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพราทั้งสองชนิดที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium มีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดควบคุม (a) และ (b) โดย *R. oligosporus* มีน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ หลังผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง ด้วยอาหารเหลวชุดควบคุม (a) และ (b) อยู่ที่ 2.58 และ 4.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การเลี้ยง *R. oligosporus* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium ให้น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ อยู่ที่ 1.19 กรัมต่อลิตร ส่วน *A. oryzae* มีน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ หลังผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ด้วยอาหารเหลวชุดควบคุม (a) และ (b) อยู่ที่ 7.57 และ 8.59 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium ให้น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ อยู่ที่ 6.99 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้พบว่าการเลี้ยงราทั้งสองชนิดด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium ส่งผลให้รามีปริมาณน้ำหนัก

แห้งของมวลชีวภาพที่มากกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดควบคุม (c) ที่ *R. oligosporus* มีน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง เท่ากับ 0.21 กรัมต่อลิตร ส่วน *A. oryzae* เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน มีน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ เท่ากับ 0.13 กรัมต่อลิตร ซึ่งลักษณะเส้นใยราของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม มีลักษณะดังแสดงในตาราง 25 และ 26

ตาราง 25 ลักษณะเส้นใยราของ *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม

อาหาร	เส้นใยรา	ลักษณะเส้นใยรา
(a)		เส้นใยเจริญเป็นกลุ่มก่อตัวกันแบบหลวมๆ เป็นรูปร่าง (form) มีลักษณะคล้ายสำลี สีขาวถึงเหลือง
(b)		เส้นใยเจริญอยู่แบบกระจาย (dispersed filaments) สีขาวถึงเหลืองครีม

MAEJO UNIVERSITY

ตาราง 25 (ต่อ)

อาหาร	เส้นใยรา	ลักษณะเส้นใยรา
(c)		เส้นใยเจริญรวมกันเป็นเม็ดสีเขียวขนาดเล็ก ปริมาณไม่มาก
PDB optimum medium		ลักษณะเส้นใยเจริญรวมกันเป็นกลุ่ม สีขาวถึงเหลืองอมน้ำตาล

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

(a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า

(b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง

(c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

ตาราง 26 ลักษณะเส้นใยราของ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม

อาหาร	เส้นใยรา	ลักษณะเส้นใยรา
(a)		เส้นใยอยู่รวมกันเป็น pellet จำนวนมาก สีขาวถึงเหลือง
(b)		เส้นใยอยู่รวมกันเป็น pellet เม็ดเล็ก จำนวนมาก สีเหลือง สร้างสปอร์สีเขียวเหลืองลอยอยู่บนผิวหน้าอาหาร
(c)		เส้นใยเจริญได้น้อย สร้างสปอร์สีเขียวอมน้ำตาล
PDB optimum medium		เส้นใยอยู่รวมกันเป็น pellet เม็ดเล็ก จำนวนไม่มาก สีเหลืองอมเขียว สร้างสปอร์สีเขียวลอยอยู่บนผิวหน้าอาหาร

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

(a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า

(b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง

(c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

อาหารเพาะเลี้ยงรามีมากมายหลายชนิด ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้จะมีผลต่อการเจริญของรา โดยที่ราแต่ละชนิดจะมีความต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน นอกจากความเหมาะสมของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงราแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆ ในการเพาะเลี้ยงที่ส่งผลต่อการเจริญและส่งผลต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของราด้วย สำหรับการเพาะเลี้ยงราในอาหารเหลว มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องต่อการเจริญ และส่งผลต่อลักษณะของ pellet เช่น ลักษณะและชนิดของสารตั้งต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ค่า pH ประเภทของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน อุณหภูมิ ความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ่ายเทออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นต้น (Graham et al., 1976; Tung et al., 2004) ในการศึกษานี้ได้ทำการควบคุมสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงราให้มีสภาวะเดียวกัน ดังนั้นชนิดของสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ปริมาณและลักษณะ pellet ของราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกัน ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB หรือ PDA สำเร็จรูปทางการค้า จัดว่าเป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงราที่มีปริมาณสารอาหารค่อนข้างสูง ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB หรือ PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง ซึ่งมีน้ำสกัดของมันฝรั่งที่อุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน วิตามินและแร่ธาตุหลายชนิดเป็นส่วนประกอบ จึงทำให้ราที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าวเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB หรือ PDA ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่งที่เป็นของเสีย จึงอาจมีสารอาหารที่หลงเหลืออยู่ในปริมาณไม่มาก หากเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB หรือ PDA สองชนิดดังกล่าวข้างต้น แต่ก็พบว่า มีความเป็นไปได้ในการใช้ผงน้ำล้างมันฝรั่งเลี้ยงรา เนื่องจากพบว่า ราสามารถเจริญเติบโตได้เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลให้การเจริญของราที่ได้ไม่เทียบเท่ากับการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB หรือ PDA สำเร็จรูปทางการค้า และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB หรือ PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง อาจเนื่องมากจากอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีในผงน้ำล้างมันฝรั่ง อาจมีปริมาณไม่เหมาะสมต่อการเจริญของรามากเพียงพอ

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำล้างมันฝรั่งเลี้ยงรา พอสรุปผลการทดลองได้ ดังนี้

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำล้างมันฝรั่ง พบว่า ประกอบไปด้วยโปรตีน 0.13 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในรูปของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 408 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลรีดิวซ์ 24 มิลลิกรัมต่อลิตร และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 6:1

2. การศึกษาความเหมาะสมและความเป็นไปได้ของน้ำล้างมันฝรั่งในการนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB พบว่า ยีสต์และราสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง แม้จะมีการเจริญที่ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง แต่ก็สามารถให้ผลในระดับที่น่าพอใจจึงทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำล้างมันฝรั่งมาใช้เตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

3. ผลการศึกษาการทำแห้งน้ำล้างมันฝรั่งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยเติมผงมอลโตเดกซ์ตริน (DE 10-13) ลงไปในน้ำล้างมันฝรั่ง 5 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าให้อยู่ในช่วง 175-215 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิลมร้อนขาออกอยู่ในช่วง 75-90 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ผงน้ำล้างมันฝรั่งที่ได้มีปริมาณความชื้นอยู่ที่ 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเหมาะสมสำหรับการผลิตผงน้ำล้างมันฝรั่ง เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในผงน้ำล้างมันฝรั่งที่ได้ พบว่า มีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 3.25 เปอร์เซ็นต์ และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 23.81:1

4. ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของปัจจัย ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากผงน้ำล้างมันฝรั่งด้วยแผนการทดลองแบบ CCD พบว่า สามารถหาจุดที่เหมาะสมของปริมาณปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อสูงที่สุดได้ด้วยสมการกำลังสอง ที่อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ด้วยการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อทั้งหมด (Y) โดยกำหนดให้ X_1 แทน ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง และ X_2 แทน ปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส ได้ดังนี้

จำนวนโคโลนีของเชื้อทั้งหมด (ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) = $7.1482 + 0.3233X_1 + 0.0792X_2 - 0.585X_1X_1 - 0.0234X_1X_2 - 0.244X_2X_2$

จากสมการที่ได้ สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ด้วยการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ ได้ที่ 72.77 เปอร์เซ็นต์ ($R^2 = 0.7277$) ซึ่งสามารถทำนายการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium ที่ประกอบด้วย ผงน้ำล้างมันฝรั่ง 170 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลเดกซ์โทรส 22 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 7.20 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การตรวจสอบสมการทำนาย (validation) พบว่า เมื่อทดลองเลี้ยง *S. cerevisiae* TISTR 5020 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium ดังกล่าว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้การเจริญของเชื้อได้เท่ากับ 7.056 ล็อคซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

ส่วนสมการกำลังสอง ที่อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและการเจริญของราด้วยการนับจำนวนสปอร์ (Y) โดยกำหนดให้ X_1 แทน ปริมาณผงน้ำล้างมันฝรั่ง และ X_2 แทน ปริมาณน้ำตาลเดกซ์โทรส มีดังนี้

จำนวนสปอร์ (ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร) = $3.595 - 0.0426X_1 + 1.1668X_2 - 3.5524X_1X_1 - 2.636X_1X_2 + 1.8381X_2X_2$

จากสมการที่ได้ สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและการเจริญของราได้ที่ 99.3 เปอร์เซ็นต์ ($R^2 = 0.9939$) ซึ่งสามารถทำนายจำนวนสปอร์ของเชื้อเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium ที่ประกอบด้วย ผงน้ำล้างมันฝรั่ง 212 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลเดกซ์โทรส 32 กรัมต่อลิตร ได้เท่ากับ 8.36 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การตรวจสอบสมการทำนาย พบว่า เมื่อทดลองเลี้ยง *R. oligosporus* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium ดังกล่าว เป็นเวลา 84 ชั่วโมง ให้จำนวนจำนวนสปอร์ เท่ากับ 6.18 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร และ *A. oryzae* ได้เท่ากับ 7.33 ล็อกสปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

จากการเปรียบเทียบการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020, *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium กับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น พบว่า แม้อาหารที่พัฒนาขึ้นมายังไม่สามารถใช้ทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ได้เต็มที่ แต่ก็ให้ผลในระดับที่น่าพอใจ แสดงให้เห็นว่าในน้ำล้างมันฝรั่งยังคงมี

สารอาหารหลงเหลืออยู่พอที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อได้ และสามารถพัฒนาเพื่อนำไปใช้เนื่องจากมีต้นทุนที่ถูกกว่า แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการดำเนินการศึกษา และพัฒนาสูตรเพื่อให้มีความเหมาะสมมากขึ้นต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ในการวิจัยนี้ได้วัดการเจริญของราโดยการหาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ และนับจำนวนสปอร์ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก แต่อาจให้ผลการทดลองที่คลาดเคลื่อนได้ง่าย ดังนั้นจึงควรใช้วิธีการวัดการเจริญของราที่ให้ผลแม่นยำ มีความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด เช่น การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน เป็นต้น

2. ในการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากผงน้ำล้างมันฝรั่งด้วยแผนการทดลองแบบ CCD พบว่า สมการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ที่ได้ ยังมีค่า R^2 (0.7277) ที่ต่ำ นั่นคือ ผลของการเจริญเติบโตของเชื้อที่ได้ เป็นผลหรืออิทธิพลจากปัจจัยที่ศึกษา 72.78 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 27.22 เป็นผลจากปัจจัยอื่นที่ไม่ทราบได้ จึงควรศึกษาหาปัจจัยอื่นๆ ที่อาจส่งผลต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่งต่อไป

3. จากการศึกษาสัณฐานวิทยา พบว่า รูปร่างเซลล์ร่วมถึงลักษณะการสืบพันธุ์ของยีสต์ และลักษณะ pellet ของรา เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง มีลักษณะที่แตกต่างจากการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง จึงควรทำการศึกษาถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อลักษณะสัณฐานและการเจริญของเชื้อต่อไป โดยเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง

บรรณานุกรม

กิตติพันธุ์ เสมอพิทักษ์, อรัญญา คงถาวร, กฤษณา ตระการไทย และ กัญญาลักษณ์ ชัยคำ. 2550. การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราสำหรับใช้ในการเรียนการสอนทางปฏิบัติการ. **ศรีนครินทร์เวชสาร** 22: 394-400.

กัลยาณี เต็งพงศธร. 2554. **เอกสารประกอบการสอนวิชาการวางแผนการทดลองทางอุตสาหกรรม.** กรุงเทพมหานคร: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 15 น.

จันทร์จีรา ยารวง. 2553. **ปัจจัยทำนายการใช้อุปกรณ์ป้องกันเสียงในคนงานโรงงานผลิตมันฝรั่งทอดกรอบ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 123 น.

เชาวลิต อุปฐาก. 2552. **การศึกษากรรมวิธีการผลิตเครื่องปรุงผงก๋วยเตี๋ยวผัดไทย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร. 125 น.

ณัฏฐินี ใจสอาด. 2546. **วัตถุกันหืนธรรมชาติจากเปลือกมันฝรั่ง: การสกัดและการใช้ประโยชน์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 116 น.

ดวงใจ โอชัยกุล และ มาริสา จาตุพรพิพัฒน์. 2541. การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปมันฝรั่ง โดย *Candida tropicalis* TISTR 5136. **วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น** 26: 181-185.

นงเยาว์ ชูสุข. 2554. **เทคนิคในการพัฒนาผลิตภัณฑ์**. ปราจีนบุรี: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ คณะอุตสาหกรรมเกษตร. 37 น.

นิวัฒ เสนาะเมือง. 2543. **เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับรา.** ขอนแก่น: พระธรรมขันต์. 203 น.

บุญธรรม บุญเลา. 2547. **คู่มือการปฏิบัติงาน เรื่อง การปลูกมันฝรั่ง (Potato).** เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร. 49 น.

บุษกร อุตรภิชาติ. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** หาดใหญ่: มหาวิทยาลัยทักษิณ. 245 น.

พนม สุหา, จินดาพร จำรัสเลิศลักษณ์ และ วสันต์ ด้วงคำจันทร์. 2550. การอบแห้งน้ำกระเจี๊ยบแดงแบบพ่นฝอย: อิทธิพลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อสมบัติของผลิตภัณฑ์หลังการอบแห้ง. **Agricultural Science Journal** 38: 267-270.

พรรณจิรา วงศ์สวัสดิ์, มณฑิรา นพรัตน์, ดวงพร ตั้งบำรุงพงษ์ และ สุเทพ อภินันท์จารุพงศ์. 2545. กระบวนการผลิตน้ำผักผลไม้รวมผงโดยใช้เครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจายและไมโครเวฟสุญญากาศ. **วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ** 25: 257-277.

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2544. **การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง Response Surface Design.** เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร. 137 น.

ภูวนัฐ โพธิ์งาม. 2538. **การผลิตอะไมโลกลูโคซิเดสและเซลลูเลสจากเปลือกมันฝรั่งโดยเชื้อราบางชนิด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 121 น.

วราภรณ์ ชื่นใจพาณิชย์. ม.ป.ป. **โครงการนำน้ำล้างมันฝรั่งกลับมาใช้ใหม่ในโรงงานผลิตมันฝรั่งทอด (The endlessly recycling water system from potato washing process in potato chips factory).** 9 น. (จุลสาร).

วิจัย รักวิทยาศาตร์. 2551. **ราวิทยาเบื้องต้น (Introductory Mycology)**. กรุงเทพฯ: จามจุรีโปรดักท์. 351 น.

วิไลลักษณ์ โคมพันธุ์. 2549. **การคัดเลือกพืชผลทางการเกษตรที่เหมาะสมเพื่อผลิตเป็นอาหารเลี้ยงฟังไจ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยนเรศวร. 173 น.

ศุภศักดิ์ เวศกาวี. 2552. **การศึกษาความเป็นไปได้ในการลงทุนโรงงานผลิตเอทานอลในจังหวัดลำพูน.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 74 น.

ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ์. 2544. **การผลิตมันฝรั่งและหัวพันธุ์มันฝรั่ง (Potato and seed potato production)**. พิมพ์ครั้งที่ 3. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้ คณะผลิตกรรมการเกษตร. 116 น.

สมจิตร อยู่เป็นสุข. 2552. **ราวิทยา (Mycology)**. เชียงใหม่: พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์. 136 น.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 611 น.

สุพรรนี แก่นสาร อะโอกิ และ จาตุรงค์ จงจีน. 2552. การศึกษาอาหารสูตรดัดแปลงสำหรับเชื้อราที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากดิน. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร** 1: 425-428.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2541. **จุลชีววิทยาทางอาหาร (Food Microbiology)**. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: ชัยเจริญ. 248 น.

สุวิมล กีรติพิบูล. 2546. **จุลินทรีย์กับการควบคุมสุขลักษณะการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรม.** กรุงเทพฯ: สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น). 160 น.

เสาวนิตย์ ชอบบุญ. 2550. **การจำแนกราเส้นสายที่พบในอาหารและอากาศ.** สงขลา: มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. 302 น.

เสาวนีย์ นิลลักษณ์. 2551. **การศึกษาองค์ประกอบอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรติเอสและไซลาเนส จาก *Bacillus* sp. ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 95 น.

สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2549. **ยีสต์: คุณประโยชน์อุตสาหกรรม (Yeast: valuable assets)**. กรุงเทพฯ: สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ. 39 น.

หทัยชนก ชะนะปาโมกโข และ เพ็ญศิริ ศรีบุรี. 2547. **การใช้ประโยชน์จากของเหลือในกระบวนการผลิตมันฝรั่งแผ่นทอด**. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 6 น.

อนุสรา เมืองมา. 2552. **การลดการเกาะติดของน้ำผึ้งผงระหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 95 น.

อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล. 2550. **การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับอุตสาหกรรมเกษตร**. พิมพ์ครั้งที่ 4. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 168 น.

อโณทัย คมเศวต. 2535ก. **จุลชีววิทยาทางอาหาร (Food Microbiology)**. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้. 319 น.

_____________. 2535ข. **เอกสารคำสอน: จุลชีววิทยา (Microbiology)**. พิมพ์ครั้งที่ 3. เชียงใหม่: สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้. 430 น.

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.

Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). 1990. **Official method of analysis of AOAC international.** 15th ed. Washington, D.C.: Association of Official Agricultural Chemists. 1298 p.

Arapoglou, D., Varzakas, Th., Vlyssides, A. and lsrailides, 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.** Bangalore, India: Microbiology University of Agricultural Sciences. 58 p.

Bloch, F., Brown, G.E. and Fanrkas, 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.

Bradley, N. 2007. **The response surface methodology**. Master thesis. Indiana University of South Bend. 73 p.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamiton, J.K., Rcbcrs, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** 28: 350-356.

Ejiofor, A.O., Chisti, Y. and Moo-Young, M. 1996. Culture of *Saccharomyces cerevisiae* on hydrolyzed waste cassava starch for production of baking-quality yeast. **Enzyme and Microbial Technology** 18: 519-525.

European Pharmacopoeia. 2007. **European Pharmacopoeia.** 6th ed. U.S.A.: Gaithersburg, Maryland. Cited by RCl Labscan Limited. 2007. Potato Dextrose Agar. Thailand: Bangkok.

Gelinas, P. and 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.

Graham, D.C.W., Steinkraus, K.H. and Hackler, L.R., 1976. Factors affecting production of mold mycelium and protein in synthetic media. **Applied and Environmental Microbiology** 32: 381-387.

Heck, J.X., Flores, S.H., Hertz, P.F. and 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.

Huang, L.P., Jin, B., Lant, P. and Zhou, J. 2003. Biotechnological production of lactic acid integrated with potato wastewatcr treatment by *Rhizopus arrhizus*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 78: 899-906.

Hussein, A.A., TajAl-Deen, W.R., Jabri, R.R. and Hussein, H.A. 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 College of Science.

Ibanoglu, S. and Ibanoglu, E., 2001. Modelling of natural fermentation in cowpeas using response surface methodology. **Journal of Food Engineering** 48: 277-281.

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.

Lasik,. M., Nowak, W., Kent, C.A. and Czarnecki, Z. 2002. Assessment of metabolic activity of single and mixed microorganism population assigned for potato wastewater biodegradation. **Polish Journal of Environmental Studies** 11: 719-725.

Lemmel, S.A., Heimsch, R.C. and Edward, L.L. 1979. Optiimizing the continuous production of *Candida utilis* and *Saccharomycopsis fibuliger* on potato processing wastewater. **Applied and environmental microbiology** 37: 227-232.

Li, X., Ouyang, J., Xu, Y., Chen, M., Song, X., Yong, Q. and Yu, S. 2009. Optimization of culture conditions for production of yeast biomass using bamboo wastewater by response surface methodology. **Bioresource Technology** 100: 3613-3617.

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 and Microbial Technology** 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. **Journol of Agricultural and Food Chemistry** 24: 919-923.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing. **Analytical Chcmistry** 31: 426-428.

Mironescu, M. and Moza, M.I. 2011. Preliminary investigation on the use of potato wastewater for lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* single and mixed cultivation. **Annals of the Romanian Society for Cell Biology** 16: 349-353.

Mishra, B.K., Arora A. and 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.

Montgomery, D.C. 1991. **Design and Analysis of Experiments**. New York: John Wiley and Sons. 649 p.

Moorc, D., Robson, G.D. and Trinci, A.P.J. 2011. **21st Century guidebook to fungi**. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press. 627 p.

Onwubuemeli, C., Huber, J.T., King, K.J. and Johnson, C. 1985. Nutritive value of potato processing wastes in total mixed rations for dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 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 and Applied Chemistry** 29: 129-141.

Rao, V.K., Jayalakshmi, R.S., Varma, P.K. and Naidu, V.D. 2011. **Introduction to plant pathogens.** Hyderabad, India: Acharya N.G. Ranga Agricultural University. 117 p.

Soto-cruz, O., Saucedo-Castaneda, G., Pablos-Hach, J.L., Gutierrez-Rojas, M. and Favela-Torres, E. 1999. Effect of substrate composition on the mycelial growth of *Pleurotus ostreatus*. An analysis by mixture and response surface methodologies. **Process Biochemisty** 35: 127-133.

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 Technology** 34: 90-94.

Tung, T.Q., Miyata, N. and lwahori, 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.

Wang, Z.W. and Liu, X.L. 2008. Medium optimization for antifungal active substances production from a newly isolated *Paenibacillus* sp. using response surface methodology. **Bioresource Technology** 99: 8245-8251.

Wirjantoro, T.I. and Phionmongkhol, A. 2009. The viability of lactic acid bacteria and *Pifidobacterium bificium* in yoghurt powder during storage. **Chiangmai University Journal** 8: 95-104.

MAEJO UNIVERSITY

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 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องฆ่าเชื้อความดันไอ 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 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องฆ่าเชื้อความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

3. PDA และ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง

มันฝรั่ง	200	กรัม
เดกซ์โทรส	20	กรัม
ผงวุ้นอะการ์	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่ง หั่นเนื้อมันฝรั่งเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาดด้านละประมาณ 1 เซนติเมตร ชั่งให้ได้น้ำหนักตามสูตร แล้วต้มในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนเดือด นานประมาณ 10-15 นาที อย่าทำให้เนื้อมันฝรั่งเละ กรองเอาแต่น้ำ (potato infusion) โดยใช้ผ้าขาวบาง ชั่งน้ำตาลเดกซ์โทรส และผงวุ้นอะการ์ให้ได้น้ำหนักตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนช่วยจนผงวุ้นอะการ์ละลายหมด ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบตามสูตร (ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีวิธีการเตรียมที่เหมือนกัน ยกเว้น ในอาหาร PDB จะไม่มีการเติมผงวุ้นอะการ์ลงไป) นำไปฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

4. Yeast extract Peptone Dextrose Agar (YPDA) และ Yeast extract Peptone Dextrose Broth (YPDB)

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

ละลายวุ้นในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนช่วยจนวุ้นละลายหมด ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบตามสูตร (ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPDB มีวิธีการเตรียมที่เหมือนกัน ยกเว้น ในอาหาร YPDB จะไม่มีการเติมผงวุ้นอะการ์ลงไป) นำไปฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

ข้อมูลการวิจัย

มหาวิทยาลัยแม่โจ้
MAEJO UNIVERSITY

ตารางภาคผนวก 1 จำนวนโคโลนีของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนโคโลนี (log CFU/ ml)		
	PDB สำเร็จรูปทางการค้า	PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง	PDB ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง
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

ตารางภาคผนวก 2 น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)						
	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน	6 วัน	7 วัน
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 ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง	0.64	2.3	3.03	4.26	4.4	4.96	5.37

ตารางภาคผนวก 3 น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 84 ชั่วโมง

อาหารเลี้ยงเชื้อ	น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)						
	12 ช.ม.	24 ช.ม.	36 ช.ม.	48 ช.ม.	60 ช.ม.	72 ช.ม.	84 ช.ม.
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 ที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่ง	0.06	0.81	1.02	1.11	1.23	1.31	1.46

ตารางภาคผนวก 4 จำนวนโคโลนีของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลอง และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนโคโลนี (log CFU/ ml)											
	อาหารเหลวชุดการทดลอง									อาหารเหลวชุดควบคุม		
	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 อาหารเหลวชุดการทดลอง คือ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง มีทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง (run1-run9) อาหารเหลวชุดควบคุม ได้แก่ (a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ (c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย น้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

ตารางภาคผนวก 5 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลอง และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (log cell/ ml)											
	อาหารเหลวชุดการทดลอง									อาหารเหลวชุดควบคุม		
	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 อาหารเหลวชุดการทดลอง คือ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง มีทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง (run1-run9) อาหารเหลวชุดควบคุม ได้แก่ (a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ (c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย น้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

ตารางภาคผนวก 6 ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารแข็งชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)											
	อาหารแข็งชุดการทดลอง									อาหารแข็งชุดควบคุม		
	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 อาหารแข็งชุดการทดลอง คือ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง มีทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง (run1-run9) อาหารแข็งชุดควบคุม ได้แก่ (a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ (c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย น้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

ตารางภาคผนวก 7 ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารแข็งชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม

เวลา (วัน)	ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)											
	อาหารแข็งชุดการทดลอง									อาหารแข็งชุดควบคุม		
	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 อาหารแข็งชุดการทดลอง คือ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง มีทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง (run1-run9) อาหารแข็งชุดควบคุม ได้แก่ (a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ (c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย น้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

ตารางภาคผนวก 8 น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลอง และอาหารเหลวชุดควบคุม

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)											
	อาหารเหลวชุดการทดลอง									อาหารเหลวชุดควบคุม		
	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 อาหารเหลวชุดการทดลอง คือ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง มีทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง (run1-run9) อาหารเหลวชุดควบคุม ได้แก่ (a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ (c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย น้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

ตารางภาคผนวก 9 น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชุดการทดลอง และอาหารเหลวชุดควบคุม

เวลา (วัน)	น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)											
	อาหารเหลวชุดการทดลอง									อาหารเหลวชุดควบคุม		
	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 อาหารเหลวชุดการทดลอง คือ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง มีทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง (run1-run9) อาหารเหลวชุดควบคุม ได้แก่ (a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ (c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย น้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

ตารางภาคผนวก 10 จำนวนสปอร์ *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารแข็งชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนสปอร์ (log spore/ ml)											
	อาหารแข็งชุดการทดลอง									อาหารแข็งชุดควบคุม		
	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 อาหารแข็งชุดการทดลอง คือ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง มีทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง (run1-run9) อาหารแข็งชุดควบคุม ได้แก่ (a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ (c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย น้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

ตารางภาคผนวก 11 จำนวนสปอร์ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารแข็งชุดการทดลอง และอาหารแข็งชุดควบคุม

เวลา (วัน)	จำนวนสปอร์ (log spore/ ml)											
	อาหารแข็งชุดการทดลอง									อาหารแข็งชุดควบคุม		
	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 อาหารแข็งชุดการทดลอง คือ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA ที่เตรียมจากผงน้ำล้างมันฝรั่ง มีทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง (run1-run9) อาหารแข็งชุดควบคุม ได้แก่ (a) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูปทางการค้า (b) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง และ (c) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย น้ำตาลเดกซ์โทรส 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น

ตารางภาคผนวก 12 จำนวนโคโลนีของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนโคโลนี (log CFU/ ml)			
	อาหารเหลวชุดควบคุม			PDB optimum medium
	PDB สำเร็จรูปทางการค้า	PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง	น้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น	
0	5.70	5.52	5.57	5.50
6	6.96	7.01	6.47	6.52
12	7.09	7.07	6.34	6.85
18	7.42	7.44	5.65	7.09
24	7.78	7.86	5.31	7.06
30	8.25	8.03	5.11	7.04
36	7.97	8.00	5.23	7.23
42	7.67	7.92	4.98	7.30
48	6.00	7.15	4.81	6.40

ตารางภาคผนวก 13 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *S. cerevisiae* TISTR 5020 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB optimum medium และอาหารเหลวชุดควบคุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (log cell/ ml)			
	อาหารเหลวชุดควบคุม			PDB optimum medium
	PDB สำเร็จรูปทางการค้า	PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง	น้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น	
0	5.74	5.54	5.88	5.62
6	7.02	6.75	6.22	6.35
12	7.21	7.41	6.27	7.01
18	6.97	7.09	5.93	6.79
24	7.22	7.38	6.10	6.95
30	6.70	7.39	5.88	6.76
36	7.38	7.38	5.40	6.93
42	6.86	7.39	5.70	6.85
48	7.44	7.39	5.40	6.79

ตารางภาคผนวก 14 จำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus* และ *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนสปอร์ (log spore/ ml)			
	R. oligosporus		*A. oryzae*	
	42 ชั่วโมง	84 ชั่วโมง	3 วัน	7 วัน
(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
PDA optimum medium	5.64	6.18	6.56	7.33

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

ตารางภาคผนวก 15 ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *R. oligosporus* เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)			
	อาหารแข็งชุดควบคุม			PDA optimum medium
	PDB สำเร็จรูปทางการค้า	PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง	น้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น	
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

ตารางภาคผนวก 16 ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *A. oryzae* เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA optimum medium และอาหารแข็งชุดควบคุม

เวลา (วัน)	ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)			
	อาหารแข็งชุดควบคุม			PDA optimum medium
	PDB สำเร็จรูปทางการค้า	PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง	น้ำตาลเดกซ์โทรส 2% ในน้ำกลั่น	
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

ภาคผนวก ค

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวขนิษฐา อวดห้าว	
เกิดเมื่อ	21 ธันวาคม 2529	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2548	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนเมืองเชียงราย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย
	พ.ศ. 2553	สำเร็จการศึกษาระดับครุศาสตร์บัณฑิต (คบ. 5 ปี) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย
การเข้าร่วมงานประชุมวิชาการ		
	พ.ศ. 2555	นำเสนองานวิจัย ในงาน The First Asean Plus Three Graduate Research Congress เรื่อง “Feasibility Studies of Preparation Potato Dextrose Broth from Wastewater of Potato Washing Process in Potato Chips Factory” วันที่ 1-2 มีนาคม 2555 ณ Huai Kaeo Road, Tambon Suthep, Amphoe Mueang Chiang Mai 50200 Thailand
งานวิจัยเผยแพร่		
	พ.ศ. 2552	Khanittha Ouadhow, Tapana Cheunbarn, Pairote Wongputtisin and Mayura Srikanlayanukul. Feasibility Studies of Preparation Potato DextroseBroth from Wastewater of Potato Washing Process in Potato Chips Factory. In Proceeding The First Asean Plus Three Graduate Research Congress.