สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือ

1. เครื่องเขย่า (Shaker)
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectophotometer)
3. เครื่องปั่นตกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง (Centrifuge)
4. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)
5. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance)
6. ตู้อบแห้ง (Hot air oven)
7. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controlled incubator)
8. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscope)
9. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
10. ชุดปั๊มสูญญากาศ
11. ชุดอุปกรณ์การกรอง
12. เครื่องคอมพิวเตอร์และโปรแกรม Microsoft Excel 2003

3.1.2 สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) เข้มข้น 0.1 นอร์มัล
2. สารละลายกรดซัลฟุริก (H_2SO_4) ผสมซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4)
3. สารละลายมาตรฐานเฟรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.05 นอร์มัล
4. สารละลายเฟอโรอีนอินดิเคเตอร์ (Ferroin Indicator)
5. เมอร์คูริกซัลเฟต (Mercuric sulfate)
6. เฮกเซน (Hexane)
7. เอทานอล (Ethanol)
8. โซเดียมโพรไพโอเนต (Sodium propionate)

3.2 แผนการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนองค์ประกอบความสกปรกในรูปไขมันและน้ำมันในน้ำเสียให้อยู่ในรูปชีวมวลของจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์ และศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของยีสต์ในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย ตลอดจนนำค่าจลนพลศาสตร์ที่ได้ไปใช้ในการสร้างแบบจำลองทางคอมพิวเตอร์และออกแบบถังปฏิกรณ์ทางชีวภาพที่เหมาะสมเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้งานจริง โดยในการทดลองจะดำเนินการจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องและลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้น โดยแผนภูมิสรุปขั้นตอนการทดลองทั้งหมดของงานวิจัยนี้แสดงดังรูปที่ 3.1

งานวิจัยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ช่วงดังนี้

การทดลองช่วงที่ 1 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันสูง

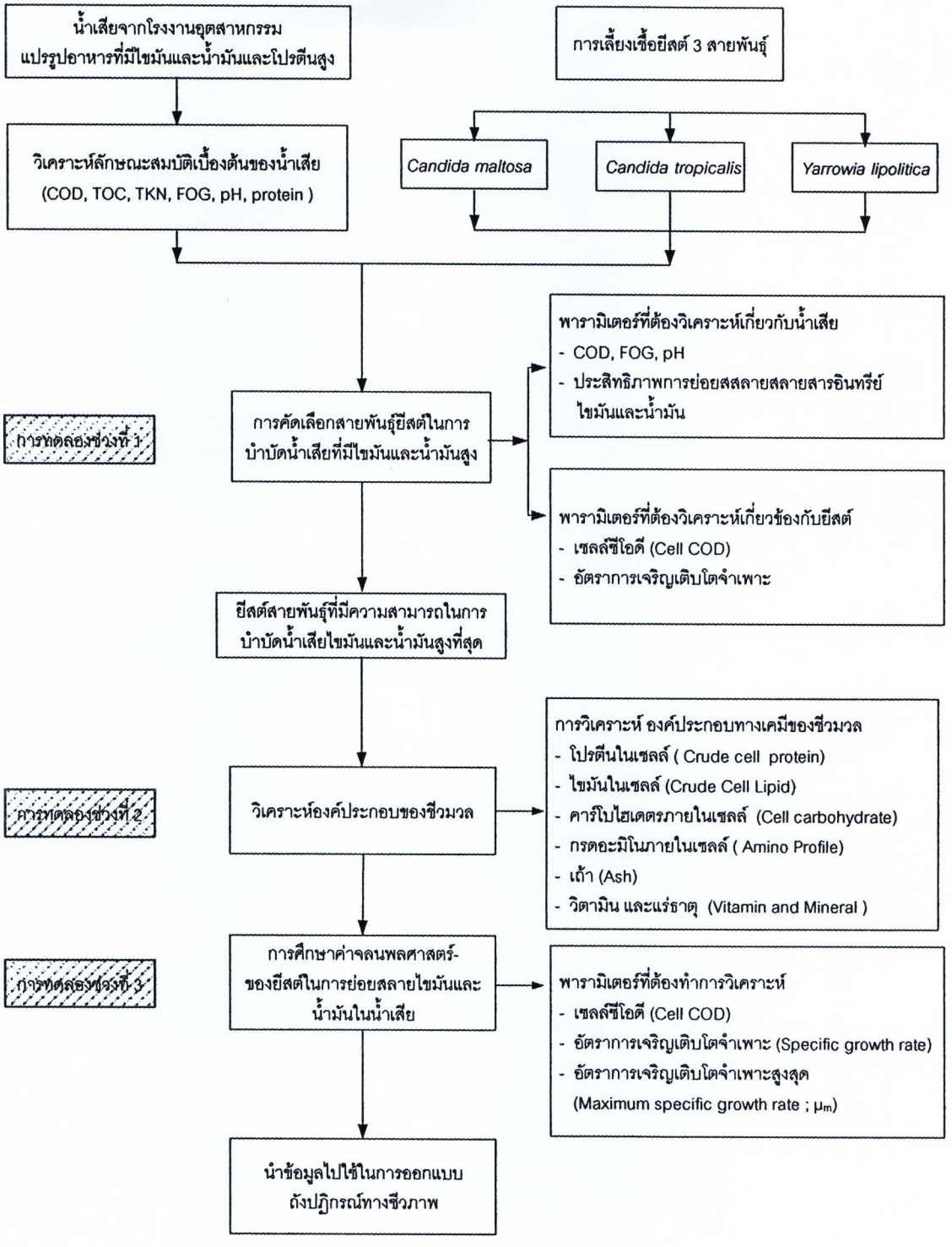
การทดลองช่วงนี้เป็นการเปรียบเทียบความสามารถของยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์จำนวน 3 สายพันธุ์ ในการลดปริมาณไขมันและน้ำมันในน้ำเสียและเปลี่ยนรูปเป็นชีวมวลของยีสต์

การทดลองช่วงที่ 2 การวิเคราะห์องค์ประกอบชีวมวลของยีสต์

หลังจากได้ยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันสูงจากการทดลองช่วงที่ 1 แล้ว จะทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของชีวมวลของยีสต์นั้น เพื่อศึกษาความเหมาะสมและความเป็นไปได้ในการใช้เป็นแหล่งโปรตีนเสริมในอาหารสัตว์

การทดลองช่วงที่ 3 การหาค่าจลนพลศาสตร์ของยีสต์ในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย

การทดลองนี้เป็นการเลี้ยงเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันสูงจากการทดลองช่วงที่ 1 ในชุดการทดลองแบบแบทช์ และศึกษาปริมาณซีโอดีที่เปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ที่เวลาต่างๆ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณพารามิเตอร์ต่างๆ ทางจลนพลศาสตร์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่จะนำไปใช้ในการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพและสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในการผลิตชีวมวลของยีสต์



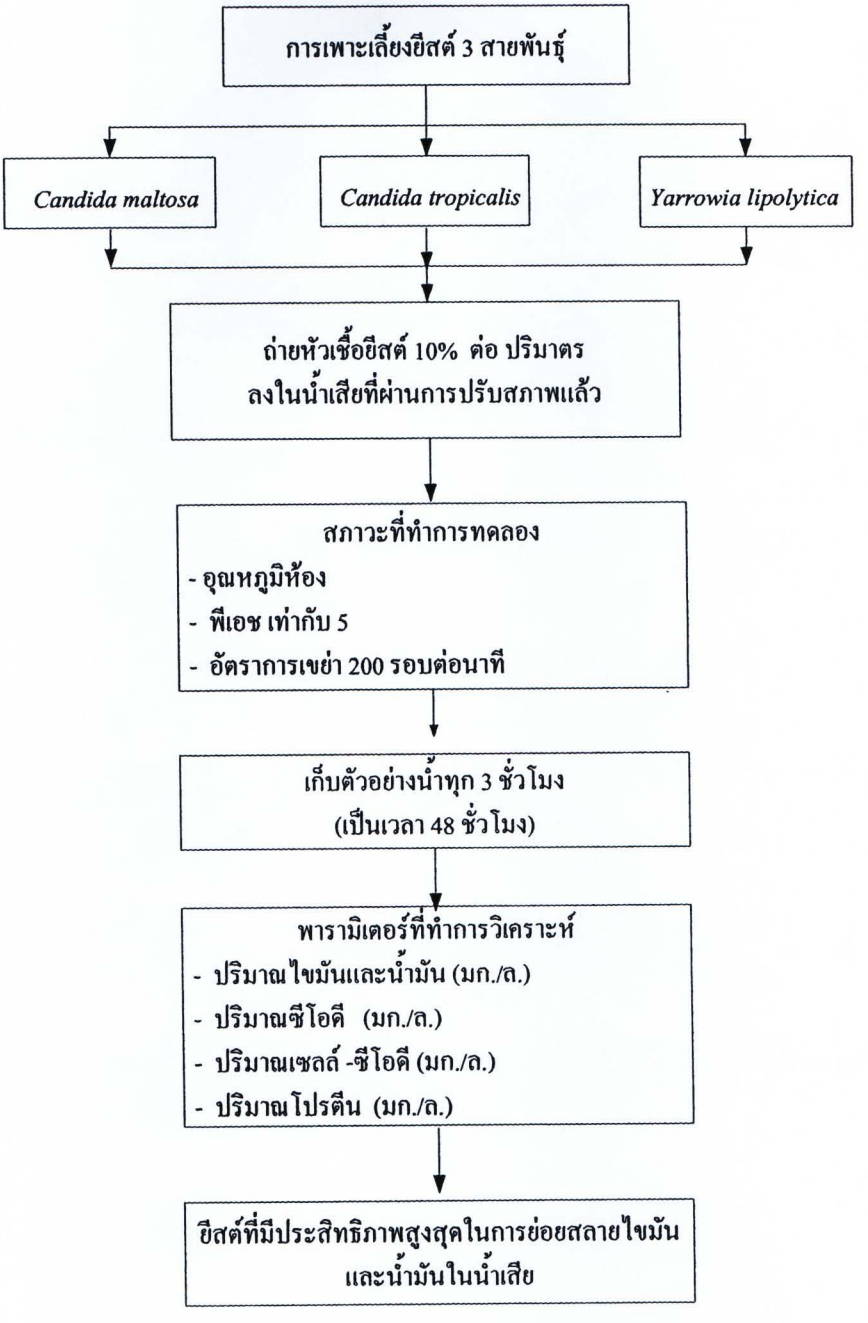
รูปที่ 3.1 แผนผังสรุปการทดลองทั้งหมดของงานวิจัย

การทดลองช่วงที่ 1 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ในการบำบัดน้ำเสียที่ไขมันและน้ำมันสูง

การทดลองในช่วงนี้เป็นการเปรียบเทียบความสามารถของยีสต์ทดสอบ 3 สายพันธุ์ซึ่งผ่านการทดสอบคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเปสขั้นปฐมภูมิแล้วในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย เพื่อคัดเลือกให้ได้สายพันธุ์ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดที่จะใช้ในการทดลอง ระหว่าง *Candida maltosa* (IAM 12247T), *Candida tropicalis* (IAM14385T) และ *Yarrowia lipolytica* (IAM 12188) โดยพิจารณาจากอัตราการใช้สารอินทรีย์และองค์ประกอบในน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันสูงเพื่อการเจริญเติบโต เปรียบเทียบค่าอัตราการเจริญเติบโต (Growth rate) ชีวมวล และปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้น (Biomass and protein content) ตลอดจนประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ ไขมันและน้ำมัน (Fat and oil reduction efficiency) ของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ในชุดการทดลองแบบแบทช์ (Batch) ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยน้ำเสียที่ใช้เป็นน้ำเสียจริงจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีสารอินทรีย์และมีไขมันและน้ำมันสูงซึ่งต้องทำการตรวจวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ทางเคมีเบื้องต้น ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช (pH) ปริมาณไขมันและน้ำมัน (FOG) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) ปริมาณคาร์บอนทั้งหมด (TOC) ปริมาณโปรตีนทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าซีโอดี (COD) ดังแสดงในตารางที่ 3.1 นำมาปรับค่าพีเอชและปริมาณอาหารที่เหมาะสมกับความต้องการของการเจริญเติบโตของยีสต์ก่อนทำการทดลอง โดยแผนภูมิแสดงแผนการทดลองในช่วงที่ 1 แสดงดังรูปที่ 3.2 และตัวแปรต่างๆ ที่ทำการศึกษาแสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 พารามิเตอร์ต่างๆ ทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียที่ทำการวิเคราะห์

พารามิเตอร์	วิธีการวิเคราะห์	หน่วยวัด
ค่าซีโอดี	Close reflux method	มก./ล.
ปริมาณน้ำมันและไขมัน	Soxhlet Ether Extraction method	มก./ล.
ค่าพีเอช	pH meter	-
ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด	Kjedahl method	มก./ล.
ปริมาณคาร์บอนทั้งหมด	TOC analyzer	มก./ล.
ปริมาณโปรตีนทั้งหมด	Lowry method	มก./ล.
ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด	Sugar reducing method	มก./ล.



รูปที่ 3.2 แผนการทดลองช่วงที่ 1

ตารางที่ 3.2 ตัวแปรต่างๆ ที่ทำการศึกษาในช่วงการทดลองที่ 1

ตัวแปรที่กำหนดให้คงที่	ค่าที่ใช้ในการทดลอง
1. ความเร็วรอบในการเขย่า	200 รอบต่อนาที
2. ค่าพีเอชของน้ำเสีย	5
3. อุณหภูมิ	อุณหภูมิห้อง
ตัวแปรอิสระที่ทำการศึกษา	**ค่าที่ใช้ในการทดลอง**
1. ยีสต์สายพันธ์บริสุทธิ์ 3 สายพันธุ์	- *Candida maltosa* - *Candida tropicalis* - *Yarrowia lipolytica*
ตัวแปรตาม	
1. พารามิเตอร์ต่างๆ ทางเคมีของน้ำเสีย (ซีโอดี ปริมาณไขมันและน้ำมัน และค่าความเป็นกรดด่าง)	
2. ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ไขมันและน้ำมัน	
3. พารามิเตอร์ของยีสต์ (เซลล์-ซีโอดี และเซลล์-โปรตีน)	
4. อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ (วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร)	
5. การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเซลล์ (น้ำหนักเซลล์แห้ง)	

การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

นำเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์ที่เจริญอยู่บนอาหารแข็งลาดเอียงที่ผ่านการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชม. มาเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอย โดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 2.5 มล. ต่อหลอดอาหารแข็งลาดเอียง ปิเปตเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.3 มล. ลงในอาหารเหลวสูตร YM ปริมาตร 100 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อยีสต์เจริญเติบโตดีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และกระจายเชื้อในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.30 - 0.35

น้ำเสียและการเตรียมน้ำเสีย

นำน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมปลากระป๋องที่มีองค์ประกอบของไขมัน น้ำมัน และโปรตีนสูง ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างจากบริษัทไทยยูเนียน โฟรเซ็นซีฟู้ดส์ โปรดักส์ จำกัด อำเภอกระทุ่มแบน จังหวัดสมุทรสาคร โดยเก็บตัวอย่างน้ำหลังจุดปล่อยออกจากถังดักไขมันก่อนเข้าระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงาน นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น กำจัดไขมันชั้นลอยซึ่งเป็นฝ้าที่ผิว

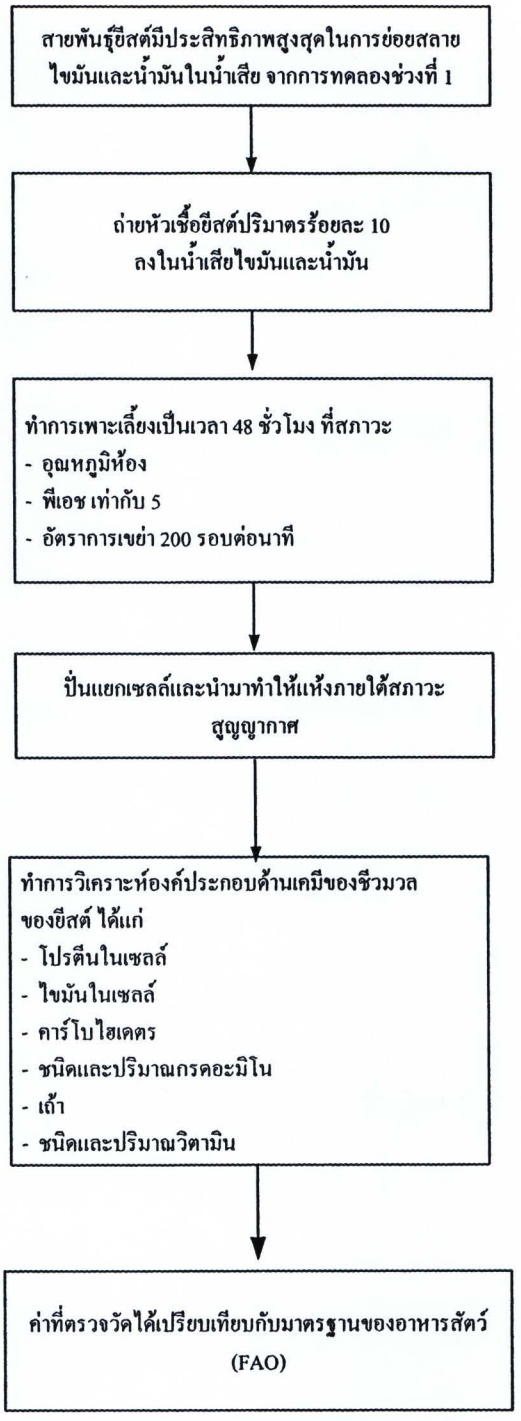
น้ำออก และนำส่วนน้ำใสมาใช้ในการทดลอง โดยเมื่อทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ทางกายภาพและเคมีเบื้องต้นแล้วจะทำการปรับค่าพีเอชให้เป็น 5 และเติมธาตุอาหารที่จำเป็นให้อยู่ในสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 1 : 6 ด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (Zheng, 2005) และเติมร้อยละ 0.25 โซเดียมโพรไพโอเนตเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย

การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของยีสต์

ถ่ายเซลล์แขวนลอยของหัวเชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้ปริมาตรร้อยละ 10 ต่อปริมาตร ลงในน้ำเสียที่ผ่านการเตรียมแล้วปริมาตร 500 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2 ลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทุกๆ 3 ชม. ติดต่อกันเป็นเวลา 48 ชม. เพื่อวิเคราะห์ค่าปริมาณไขมันและน้ำมัน (มก./ล.) ปริมาณโปรตีน (มก./ล.) เซลล์-ซีโอดี (Cell-COD) (มก./ล.) และค่าซีโอดี (มก./ล.) จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาเขียนกราฟการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารอาหารต่อเวลา เพื่อวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ไขมันและน้ำมัน ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดไขมันและน้ำมัน และประสิทธิภาพในการผลิตมวลชีวภาพสูงสุด

การทดลองช่วงที่ 2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของชีวมวลของยีสต์

ถ่ายหัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันสูงจากการทดลองช่วงที่ 1 ปริมาตรร้อยละ 10 โดยปริมาตร และเติมร้อยละ 0.25 โดยน้ำหนักของโซเดียมโพรไพโอเนตลงในน้ำเสียปริมาตร 300 มล.ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชม. ทำการปั่นแยกเซลล์และนำมาทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศ ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ ได้แก่ ปริมาณโปรตีนในเซลล์ ชนิดและปริมาณวิตามิน ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3.3 และนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO guideline) เพื่อประเมินความเหมาะสมในการใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์ โดยแผนการทดลองในช่วงนี้แสดงดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 แผนการทดลองช่วงที่ 2

ตารางที่ 3.3 พารามิเตอร์ต่างๆ ที่ทำการวิเคราะห์ชีวมวลของยีสต์

องค์ประกอบของชีวมวล	วิธีการตรวจวัด
โปรตีนในเซลล์	Kjedahl protein
ไขมันในเซลล์	Lipid chromatography
คาร์โบไฮเดรต	Phenol-sulphuric method
ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน	Amino acid analyzer
เถ้า	Gravimetric method
องค์ประกอบธาตุพื้นฐาน	ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (1965)

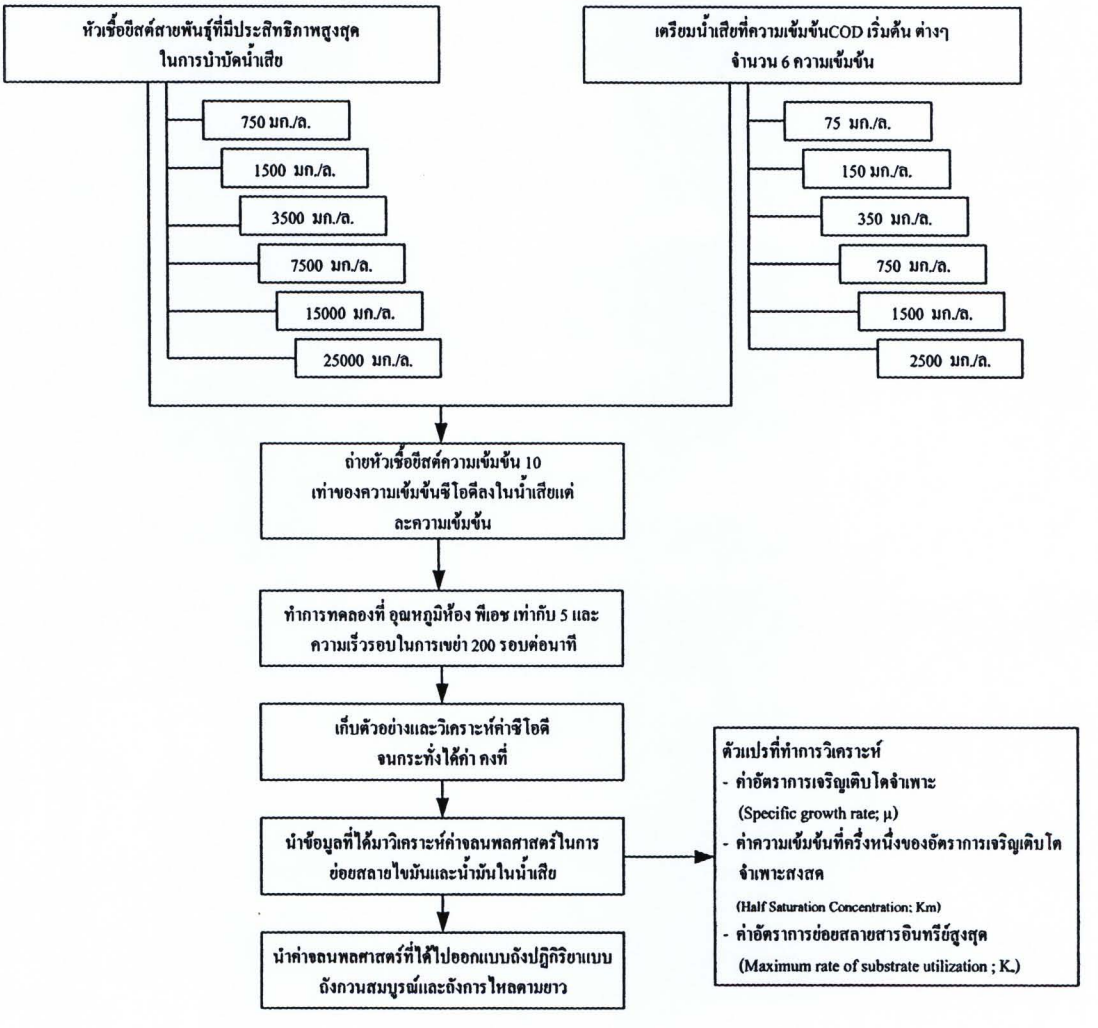
การทดลองช่วงที่ 3 การหาค่าทางจลนพลศาสตร์ของยีสต์ในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย

เป็นการทดลองเพื่อหาค่าจลนพลศาสตร์ของยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันจากการทดลองช่วงที่ 1 โดยทำการเลี้ยงเชื้อในชุดการทดลองแบบแบทช์และเริ่มต้นการทดลองโดยพิจารณาความเข้มข้นของซีโอดีของน้ำเสียที่ใช้ในการทดลอง เตรียมน้ำเสียตามวิธีที่กล่าวข้างต้นและเจือจางให้ได้ทั้งหมด 6 ความเข้มข้น ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ลงในน้ำเสียดังกล่าวด้วยความเข้มข้น 10 เท่าของความเข้มข้นซีโอดีเริ่มต้น ดังรายละเอียดในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ความเข้มข้นของซีโอดีเริ่มต้นและหัวเชื้อยีสต์ในการทดลอง 6 ชุด

ชุดการทดลองที่	ความเข้มข้นของซีโอดีเริ่มต้น (มก./ล.)	ความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ (มก./ล.)
1	75	750
2	150	1,500
3	350	3,500
4	750	7,500
5	1,500	15,000
6	2,500	25,000

ทำการทดลองที่สภาวะเดียวกันทั้งชุดการทดลองและชุดควบคุม คือที่อุณหภูมิห้อง พีเอช เท่ากับ 5 และความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ค่าซีโอดี จนกระทั่งได้ค่าคงที่ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าตัวแปรต่างๆ ทางจลนพลศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate ; μ) อัตราการย่อยสลายสารอินทรีย์สูงสุด (Maximum rate of substrate utilization ; K_m) และค่าคงที่ความเข้มข้นครึ่งหนึ่งของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (Half saturation concentration ; K_s) เป็นต้น และนำไปประยุกต์ใช้ในการออกแบบถังปฏิกิริยาแบบไหลตามแนวยาว (Plug flow tank) และถังปฏิกิริยาแบบกวนสมบูรณ์ (Completely mixed stirred tank) ตามแผนผังการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 แผนการทดลองการหาค่าจลนพลศาสตร์ในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย