



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

ปริญญา

วิศวกรรมเคมี

วิศวกรรมเคมี

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การเพาะเลี้ยงและการผลิตไลปิดของ *Arthrobacter* AK19 โดยใช้วิธีการออกแบบ
การทดลองร่วมภายใต้สภาวะบีบคั้น

Cultivation and Lipid Production of *Arthrobacter* AK19 by Means of Design of
Experiments Under Stress Condition

นามผู้วิจัย นางสาวเกล็ดแก้ว รัตนปัญญาพันธุ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์เมธี สายศรีหยุด, Dr.techn.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ, Ph.D.)

รักษาราชการแทน
หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรรถศักดิ์ จารีย์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ _____ เดือน _____ พ.ศ. _____

สืบศิริ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเพาะเลี้ยงและการผลิตไลปิดของ *Arthrobacter* AK19 โดยใช้วิธีการออกแบบการทดลองร่วม
ภายใต้สภาวะบีบคั้น

Cultivation and Lipid Production of *Arthrobacter* AK19 by Means of Design of Experiments
Under Stress Condition

โดย

นางสาวเกล็ดแก้ว รัตนปัญญาพันธุ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

พ.ศ. 2557

เกิ้ลด์แก้ว รัตนปัญญาพันธุ์ 2557: การเพาะเลี้ยงและการผลิตไลปิดของ *Arthrobacter* AK19 โดยใช้วิธีการออกแบบการทดลองร่วมภายใต้สภาวะบีบคั้น

ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี) สาขาวิศวกรรมเคมี

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์เมธี สายศรีหยุด,

Dr.techn. 128 หน้า

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 เพื่อการผลิตชีวมวลและไลปิดได้ ทำการศึกษาสารอาหารหลัก คือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และสารอาหารรอง คือ KNO_3 KH_2PO_4 : K_2HPO_4 CaCl_2 NaCl MgSO_4 H_3BO_3 MnCl_2 FeSO_4 Na_2MoO_4 CoSO_4 ZnSO_4 และ CuSO_4 ภายใต้สภาวะในการเพาะเลี้ยงได้แก่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาทีและค่าความเป็น กรด-ด่างเท่ากับ 7.4 จากการ วิเคราะห์ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่ากลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 54 กรัมต่อลิตรให้ค่า น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดถึง 2.0 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สามารถผลิตชีวมวลได้สูงที่สุด ภายใต้การทดลองที่ สภาวะเดียวกัน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมคือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 54 กรัมต่อลิตร ส่วน KNO_3 KH_2PO_4 : K_2HPO_4 CaCl_2 NaCl FeSO_4 ZnSO_4 : CoSO_4 MgSO_4 H_3BO_3 Na_2MoO_4 CuSO_4 และ MnCl_2 ที่ความเข้มข้น 2.0901 68.6 1.32 1.1791 0.0057 0.4136 0.02 0.00029 0.00025 0.00001 และ 0.000009 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นจะทำการทดลองโดยใช้สูตรอาหาร ที่เหมาะสมภายใต้สภาวะบีบคั้นเพื่อให้เกิดการผลิตไลปิดที่สูงขึ้นโดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต พบว่าเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมง จะได้ค่าชีวมวลและปริมาณ ไลปิดสูงสุดที่ 10.11 กรัมต่อลิตรและ 0.69 กรัม ไลปิดต่อกรัมชีวมวล ตามลำดับ ส่วนการเติมโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้น มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมง ได้ค่าชีวมวลและปริมาณไลปิดสูงสุดเท่ากับ 10.36 กรัมต่อ ลิตรและ 0.57 กรัมไลปิดต่อกรัมชีวมวล ตามลำดับ

Kledkkaew Rattanaphanyapan 2014: Cultivation and Lipid Production of *Arthrobacter* AK19 by Means of Design of Experiments Under Stress Condition. Master of Engineering (Chemical Engineering), Major Field: Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering. Thesis Advisor: Mr. Maythee Saisriyoot, Dr.techn. 128 pages.

Cultivation of *Arthrobacter* AK19 for biomass and lipid production was investigated in term of suitable amount of carbon source (pure glycerol 97 %wt.) with supplementary nutrient (KNO_3 , KH_2PO_4 : K_2HPO_4 , CaCl_2 , NaCl , MgSO_4 , H_3BO_3 , MnCl_2 , $\text{FeSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{MoO}_4$, CoSO_4 , ZnSO_4 and CuSO_4). Results showed that maximum biomass yield (2.0 g/l) was from 54 g/l of pure glycerol with unoptimized nutrients. The Box-Behnken experimental design was used for the optimization of supplementary nutrients. The optimum condition was found to be (g/l) 2.0901 KNO_3 , 68.6 KH_2PO_4 : K_2HPO_4 , 1.32 CaCl_2 , 1.1791 NaCl , 0.0057 MgSO_4 , 0.4136 CoSO_4 : ZnSO_4 , 0.02 MnCl_2 , 0.00029 FeSO_4 , 0.00025 Na_2MoO_4 , 0.00001 H_3BO_3 and 0.000009 CuSO_4 . Furthermore, Sodium chloride and Potassium permanganate were employed as stress agent. The result showed the maximum biomass and lipid yield were 10.11 g/l and 0.69 g lipid/g biomass by using 1.5 g/l of sodium chloride, 10.36 g/l and 0.57 g lipid/g biomass by using 3.2 mg/l of potassium permanganate, respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ เเมธิ สายศรีหยุด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่คอยดูแลให้คำแนะนำ คำปรึกษาและแนวทางในการแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นตลอดการศึกษาวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุศิษฐ์ ธนะพิมพ์เมธา ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิทธิพันธ์ ท่อแก้ว ที่กรุณาสละเวลาเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมถึงให้คำแนะนำและแนวคิดที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้จัดทำ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวกระบวนการ และภาควิชาวิศวกรรมเคมี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิศวกรรมเคมี รวมถึงเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาวิศวกรรมเคมีที่ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KURDI) และบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนในด้านทุนวิจัยและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ญาติพี่น้องที่เป็นกำลังใจเสมอมา จนการศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เกล็ดแก้ว รัตนปัญญาพันธุ์
มิถุนายน 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	62
อุปกรณ์	62
วิธีการ	64
ผลและวิจารณ์	68
สรุปและข้อเสนอแนะ	88
สรุป	88
ข้อเสนอแนะ	90
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	91
ภาคผนวก	99
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	100
ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์ต่างๆ	102
ภาคผนวก ค การออกแบบการทดลอง	104
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	128

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความสามารถในการละลายของโซเดียมคลอไรด์ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ	8
2	ปริมาณของน้ำมันในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	16
3	องค์ประกอบของไขมันในเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	17
4	ตัวอย่างของการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในสภาวะการจำกัดสารอาหาร	21
5	การผลิตไลโปดของจุลินทรีย์ในอุณหภูมิที่ต่างกัน	22
6	การผลิตไลโปดของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะการบีบคั้นด้วยความเค็ม	23
7	การผลิตไลโปดของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะการบีบคั้นด้วยความเป็นกรด-ด่างและการเติมโลหะหนัก	24
8	การผลิตไลโปดของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะการบีบคั้นด้วยการฉายรังสี	25
9	องค์ประกอบและปริมาณของกรดไขมันของไขมันจากแบคทีเรีย <i>Arthrobacter</i> AK19 (ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด)	27
10	ค่าประมาณของค่าวิกฤติสำหรับค่า R_p	40
11	ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนกรณีจำแนกทางเดียว	46
12	ตารางทดสอบความเหมาะสมของสมการต้นแบบ	52
13	การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken แบบ 3 ตัวแปร	55
14	จำนวนปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดสำหรับการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken ในการผลิตชีวมวล โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาณ 54 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน	65
15	จำนวนปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดสำหรับการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken ในการผลิตชีวมวล โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาณ 54 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน	72
16	ค่าสัมประสิทธิ์และค่า p -value ของชีวมวลที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken	76
17	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตมวลชีวภาพ	77
18	เปรียบเทียบปริมาณชีวมวลจากการทำนายและจากการทดลองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย <i>Arthrobacter</i> AK19	80

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
19	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการบีบคั้นด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (กรัมต่อลิตร)	81
20	ปริมาณไลโปดที่ได้ต่อน้ำหนักชีวมวลเมื่อทำการบีบคั้นด้วยโซเดียม คลอไรด์ (กรัมไลโปดต่อกรัมชีวมวล)	82
21	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการบีบคั้นด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ (กรัมต่อลิตร)	84
22	ปริมาณไลโปดที่ได้จากการบีบคั้นด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ (กรัมไลโปดต่อกรัมชีวมวล)	85

สารบัญตาราง (ต่อ)

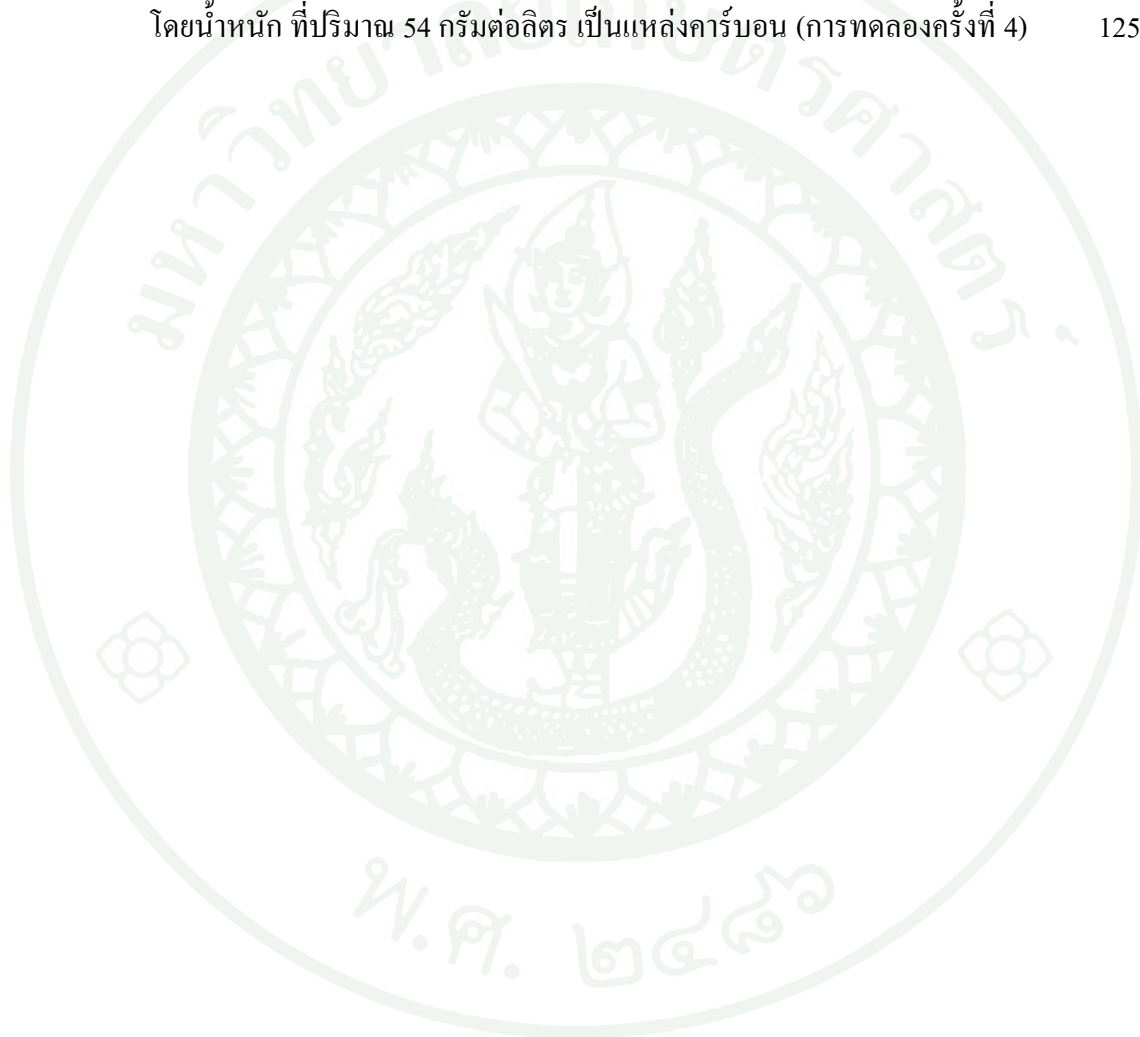
ตารางผนวกที่	หน้า
ก1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) ในน้ำกลั่น 1 ลิตร	101
ก2 สูตรอาหารสำหรับใช้เพาะเลี้ยง <i>Arthrobacter</i> AK19 ในน้ำกลั่น 1 ลิตร	101
ข1 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักรเซลล์แห้งของ <i>Arthrobacter</i> AK19 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลบริสุทธิ์ความเข้มข้น 14 20 27 40 54 และ 108 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง	103
ค1 จำนวนการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken เมื่อปัจจัยที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 6 ปัจจัย	112
ค2 จำนวนการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken เมื่อปัจจัยที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 4 ปัจจัย	115
ค3 น้ำหนักรเซลล์แห้งที่ได้จากการทดลองเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย <i>Arthrobacter</i> AK19 เมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 54 กรัมต่อลิตร ตามการออกแบบการทดลอง Box-Behnken จำนวน 54 การทดลอง	117
ค4 น้ำหนักรเซลล์แห้งที่ได้จากการทดลองเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย <i>Arthrobacter</i> AK19 เมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 54 กรัมต่อลิตร ตามการออกแบบการทดลอง Box-Behnken จำนวน 27 การทดลอง	120
ค5 จำนวนปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดสำหรับการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken ในการผลิตชีวมวล โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาณ 54 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองครั้งที่ 1)	122
ค6 จำนวนปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดสำหรับการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken ในการผลิตชีวมวล โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาณ 54 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองครั้งที่ 2)	123
ค7 จำนวนปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดสำหรับการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken ในการผลิตชีวมวล โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาณ 54 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองครั้งที่ 3)	124

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่

หน้า

ก8	จำนวนปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดสำหรับการออกแบบการทดลอง ด้วยวิธี Box-Behnken ในการผลิตชีวมวล โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาณ 54 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองครั้งที่ 4)	125
----	---	-----



สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน	5
2	สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล	6
3	โครงสร้างผลึกของโซเดียมกลอไรด์	7
4	สูตรโครงสร้างของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต	9
5	การเจริญของจุลินทรีย์	10
6	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ <i>Cryptococcus curvatus</i> หลังการเจริญในวันที่ 2 ภายใต้สภาวะการจำกัดแหล่งไนโตรเจน	18
7	การสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) จากการใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น	19
8	รูปแบบของการสะสมไลโปบรีเวนเยื่อหุ้มเซลล์ของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (Endoplasmic reticulum)	20
9	แบคทีเรีย <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	26
10	แบคทีเรีย <i>Arthrobacter</i> AK19	26
11	ฮีสโตแกรมแสดงค่า Metal recovery yield	37
12	กราฟปกติของส่วนค้ำจากการทดลอง	47
13	กราฟส่วนค้ำกับลำดับการทดลอง	48
14	กราฟส่วนค้ำกับค่าทำนายผลการทดลอง	48
15	พื้นผิวผลตอบสนองในรูปแบบของกราฟ 3 มิติ	53
16	กราฟเส้นโครงร่างของพื้นผิวผลตอบสนอง	54
17	การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box–Behnken แบบ 3 ตัวแปร	56
18	การเจริญของแบคทีเรีย <i>Arthrobacter</i> AK19 โดยใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	69
19	ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยต่อการผลิตชีวมวลของแบคทีเรีย <i>Arthrobacter</i> AK19 โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ 54 กรัมต่อลิตร	71
20	การกระจายตัวของส่วนตกค้าง	73
21	การกระจายตัวในแผนภูมิฮีสโตแกรมของส่วนตกค้าง	74
22	การกระจายตัวของส่วนตกค้างกับค่าที่ถูกทำนายของผลตอบ	75

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	การกระจายตัวของส่วนตกล้างกับลำดับการทดลอง	75
24	ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย <i>Arthrobacter</i> AK19	79
25	ปริมาณชีวมวลที่ได้จากการบีบคั้นด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ	82
26	ปริมาณไลปิดที่ได้จากการบีบคั้นด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ	83
27	ปริมาณชีวมวลที่ได้จากการบีบคั้นด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ	85
28	ปริมาณไลปิดที่ได้จากการบีบคั้นด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ	86

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค1 Worksheet	105
ค2 การเลือกการออกแบบการทดลองแบบ Response Surface	106
ค3 การเลือกชนิดของการออกแบบและจำนวนของตัวแปร	106
ค4 การป้อนข้อปัจจัยที่ต้องการศึกษาและกำหนดระดับของแต่ละตัวแปร	107
ค5 จำนวนการทดลองทั้งหมด	107
ค6 การใส่ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห่งที่ได้จากการทดลอง	108
ค7 การเลือก Analyze Response Surface Design	108
ค8 การเลือกคำตอบสนองที่ต้องการวิเคราะห์ผล	109
ค9 การเลือกปัจจัยที่ต้องการศึกษาและกำหนดค่าความเชื่อมั่นของ Model	109
ค10 การเลือกลักษณะของกราฟที่ต้องการนำเสนอ	110
ค11 การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสม	110
ค12 การเลือก Response Optimizer	111
ค13 ตารางแจกแจงค่าปกติ F (F - Test) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95	126

การเพาะเลี้ยงและการผลิตไลปิดของ *Arthrobacter* AK19 โดยใช้วิธี

การออกแบบการทดลองร่วมภายใต้สภาวะบีบคั้น

Cultivation and Lipid Production of *Arthrobacter* AK19 by Means of Design of Experiments Under Stress Condition

คำนำ

ในปัจจุบันความต้องการใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้นตามจำนวนประชากรโลก พลังงานที่ใช้กันมากคือน้ำมันหรือปิโตรเลียม แต่มีการคาดการณ์ว่าปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่จะลดลงไปเรื่อยๆ ร้อยละ 2 – 3 ต่อปี (Department of the Treasury, n.d.) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาพลังงานทางเลือกอื่น เพื่อที่จะมาทดแทนหรือใช้ร่วมกับปิโตรเลียมได้ และหนึ่งในพลังงานทางเลือกคือไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลหรือ Fatty acid methyl esters (FAME) เป็นเชื้อเพลิงดีเซลทางเลือกที่ผลิตจากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียน เช่น น้ำมันจากพืชหรือไขมันจากสัตว์ โดยไบโอดีเซลมีคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายได้เองตามกระบวนการทางชีวภาพและไม่เป็นพิษ ดังนั้นจึงไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ไบโอดีเซลสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงกับยานพาหนะได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลโดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์แต่อย่างใด แต่อย่างไรก็ตามร้อยละ 95 ของไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันจากพืช เช่น เรปซีด (Rapeseed) ปาล์มและถั่วเหลือง เป็นต้น เมื่อมีการผลิตไบโอดีเซลมากขึ้น ทำให้ความต้องการน้ำมันจากพืชเพิ่มมากขึ้นด้วย แต่เนื่องจากข้อจำกัดในพื้นที่เพาะปลูกจึงส่งผลให้ราคาวัตถุดิบทางการเกษตรสูงขึ้นตามไปด้วย จึงมีผู้สนใจได้ค้นหาวิธีผลิตไบโอดีเซลโดยไม่จำเป็นต้องใช้วัตถุดิบจากการเกษตร ซึ่งก็คือการผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์

มีงานวิจัยที่พบว่ามีจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์สามารถผลิตไลปิด ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซลได้ โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตน้ำมันจะถูกพิจารณาจากจุลินทรีย์ที่มีไลปิดสะสมส่วนเกินร้อยละ 20 ของชีวมวลของจุลินทรีย์ การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลปิดของจุลินทรีย์จะถูกเรียกว่า น้ำมันเซลล์เดี่ยว (Single cell oils, SCO) ตัวอย่างเช่น สาหร่าย *Botryococcus braunii* ผลิตไลปิดได้ร้อยละ 25 – 75 แบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. ผลิตไลปิดได้มากกว่าร้อยละ 40 ยีสต์

Candida curvata ผลิตไลปิดได้ร้อยละ 58 และรา *Aspergillus oryzae* ผลิตไลปิดได้ร้อยละ 57 เป็นต้น (Meng *et al.*, 2009)

นอกจากนี้การสะสมไขมันจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการบีบคั้นเซลล์ด้วยการลดแหล่งไนโตรเจนหรือสารอาหารอื่นๆ ให้น้อยกว่าแหล่งคาร์บอน (Cohen and Ralftledge, 2005) จะทำให้เกิดการสะสมไลปิด (Lipid) และไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นจะมีการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณเกลือหรือโซเดียมคลอไรด์สูง (Takagi *et al.*, 2006) หรือมีการเติมโลหะหนักลงไป เช่น แคดเมียม (Cadmium) เป็นต้น

ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สนใจศึกษาในงานทดลองนี้คือ *Arthrobacter* AK19 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบมากในพื้นที่ดินทั่วไป มีความสามารถในการสะสมไลปิดได้มากกว่าร้อยละ 80 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และประกอบกับยังไม่ค่อยมีงานวิจัยเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียชนิดนี้มาใช้ในการผลิตไลปิดซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซลมากนัก นอกจากนั้นยังศึกษาผลของการบีบคั้นด้วยโซเดียมคลอไรด์และโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต เพื่อเพิ่มการสะสมไลปิดของจุลินทรีย์ด้วย

โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการนำแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 มาใช้ในการผลิตสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซล โดยจะทำการออกแบบการทดลอง (Design of experiment) เพื่อหาสารอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวเพื่อผลิตมวลชีวภาพ และศึกษาถึงวิธีการบีบคั้นเชื้อจุลินทรีย์ *Arthrobacter* AK19 เพื่อให้เกิดการผลิตไลปิดสูงขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาสารอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Arthrobacter* AK19 ด้วยการออกแบบการทดลองวิธี Box-Behnken
2. เพื่อหาวิธีการบีบคั้น (Stress) จุลินทรีย์ *Arthrobacter* AK19 ให้เกิดการผลิตไลปิดสูงขึ้น

ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้จะทำการหาวิธีการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ *Arthrobacter* AK19 โดยจะแบ่งการทดลองออกเป็นสองส่วน ในส่วนแรกเป็นการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken เพื่อหาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลที่สูงที่สุด ซึ่งปัจจัยที่ทำการศึกษามีทั้งหมด 6 ปัจจัย ได้แก่ KNO_3 , NaCl , CaCl_2 , FeSO_4 , ZnSO_4 : CoSO_4 และ KH_2PO_4 : K_2HPO_4 และส่วนที่สองทำการศึกษากการบีบคั้นให้จุลินทรีย์ผลิตน้ำมันให้ได้มากขึ้น โดยการเติมโซเดียมคลอไรด์และโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตลงไปในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สภาวะในการทดลอง ได้แก่ อุณหภูมิในการหมักเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.4 และอัตราการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณไลปิดที่ได้ต่อน้ำหนักเซลล์

การตรวจเอกสาร

1. ไบโอดีเซล (Biodiesel)

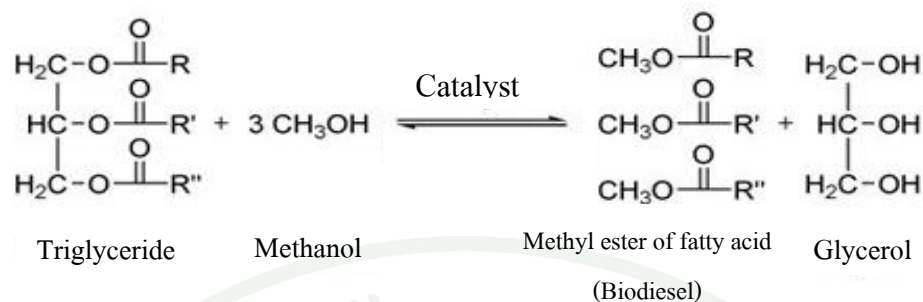
ไบโอดีเซลเป็นที่รู้จักมานานแล้วในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 แอฟริกาใต้ใช้น้ำมันพืช ขับเคลื่อนเครื่องยนต์แต่ในช่วงนั้นน้ำมันปิโตรเลียมยังหาง่ายและราคาถูก จึงไม่ได้รับความสนใจ จนในปี 2513 เกิดวิกฤติการณ์น้ำมัน หน่วยงานในภาครัฐรวมทั้งสถาบันต่างๆของกลุ่มประเทศ ใช้น้ำมันจึงได้ทำการวิจัยและพัฒนาเชื้อเพลิงชนิดนี้ จนกระทั่งผลิตในเชิงพาณิชย์ได้

ไบโอดีเซลเป็นพลังงานทดแทนจากน้ำมันพืชเพื่อใช้ทดแทนน้ำมันดีเซล มีชื่อทางเคมีคือ เอสเทอร์ (Ester) โดยการเรียกชื่อจะขึ้นอยู่กับชนิดของแอลกอฮอล์ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เช่น เมทิลเอสเทอร์ (เมื่อใช้เมทิลแอลกอฮอล์ในการทำปฏิกิริยา) เป็นต้น

ปฏิกิริยาเพื่อให้ได้สารเอสเทอร์ มี 2 กระบวนการด้วยกัน ได้แก่

- Esterification ใช้กรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) เป็นสารตั้งต้น
- Transesterification ใช้ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) เป็นสารตั้งต้น

ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (Transesterification) ของไตรกลีเซอไรด์ที่มีอยู่ใน น้ำมันพืชและน้ำมันสัตว์กับเมทานอลหรือเอทานอล โดยกรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาภายใต้ อุณหภูมิสูง เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ให้อยู่ในรูปของเมทิลเอสเทอร์ (Methyl ester) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน

ที่มา: ชัชวาล และคณะ (ม.ป.ป.)

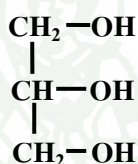
2. กลีเซอรอล (Glycerol)

กลีเซอรอล คือแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่มีคาร์บอน 3 ตัวต่อกันและมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) ต่อกับคาร์บอนทั้ง 3 ตัว ดังภาพที่ 2 อาจจะเรียกได้หลายชื่อ เช่น กลีเซอริน (Glycerin) หรือ 1, 2, 3-โพรเพนไตรออล (1,2,3-Propanetriol) สามารถเขียนสูตรโมเลกุลทางเคมีได้เป็น $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ กลีเซอรอลเป็นไตรไฮดริกแอลกอฮอล์ (Trihydric alcohol) โดยกลีเซอรอลถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1779 โดยนักเคมีชาวสวีเดนชื่อ Carl W Scheele จากการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำมันมะกอกกับ ลีดออกไซด์ (PbO) คำว่ากลีเซอรอลมีที่มาจากคำในภาษากรีกว่า glykys ซึ่งมีความหมายว่า หวาน (Pagliaro and Rossi, 2008) กลีเซอรอลหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 17.8 องศาเซลเซียส เดือดและสลายตัวที่อุณหภูมิ 290 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 760 มิลลิเมตรปรอท ละลายได้ดีในน้ำและเอทานอล แต่ไม่ละลายในอีเทอร์ เบนซีนหรือน้ำมัน (สุจิตราและคณะ, ม.ป.ป.)

2.1 ลักษณะและการใช้ประโยชน์ของกลีเซอรอล

กลีเซอรอล เป็นของเหลวที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีความหนืดและมีรสหวาน กลีเซอรอลผลิตได้จากไขมันสัตว์และน้ำมันพืชที่ผ่านกระบวนการสะปอนนิฟิเคชัน (Saponification) กระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ของกรดไขมัน และกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Tranesterification) นอกจากนั้นยังสามารถสังเคราะห์ได้จากโพรไพรีน (Propylene) และจากการหมักน้ำตาลด้วยโซเดียมไบซัลไฟต์ (Sodium bisulfite) และยีสต์ (Yeast) และมีการผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล กลีเซอรอลสามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์และน้ำ แต่

ไม่ละลายในไขมัน เนื่องจากกลีเซอรอลมีคุณสมบัติทางเคมีที่หลากหลายจึงสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารเคมีอื่นๆได้ และด้วยคุณสมบัติที่สามารถละลายในแอลกอฮอล์และน้ำได้ จึงนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ซึ่งกลีเซอรอลบริสุทธิ์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ ในหลายรูปแบบ เช่น ใช้เป็นส่วนผสมหรือเป็นตัวช่วยในกระบวนการผลิตเครื่องสำอางค์ ผลิตภัณฑ์ในห้องน้ำและสุขอนามัยส่วนบุคคล อาหาร ยาสีฟัน ยาระดมและนิยมใช้มากในอุตสาหกรรมขนู และจากการที่กลีเซอรอลเป็นสารที่ไม่มีพิษในทุกๆ รูปแบบของการประยุกต์ใช้ ไม่ว่าจะใช้เป็นสารตั้งต้นหรือสารเติมแต่ง ทำให้กลีเซอรอลเป็นสารเคมีที่ได้รับความสนใจและนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ด้วย ใช้เป็นยาระบาย และยังสามารถใช้เป็นยาเฉพาะที่สำหรับปัญหาทางผิวหนังหลายชนิด รวมถึงโรคผิวหนัง ผื่น แผลไฟลวก แผลกดทับและบาดแผลจากของมีคม



ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกลีเซอรอล

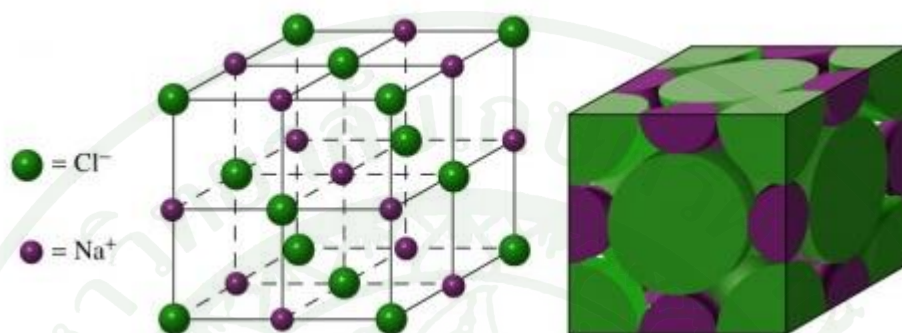
ที่มา: ฐมน (2551)

3. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)

โซเดียมคลอไรด์ มีสูตรเคมี คือ NaCl และมีชื่อที่เรียกทั่วไปว่า เกลือแกงหรือฮาไลต์ เป็นสารประกอบเคมี มีความหนาแน่น 2.16 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จุดหลอมเหลว 801 องศาเซลเซียส (ที่ 1074 เคลวิน) จุดเดือด 1465 องศาเซลเซียส (ที่ 1738 เคลวิน) และ มีความสามารถในการละลายตามตัวทำละลายต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 โซเดียมคลอไรด์เป็นเกลือที่มีบทบาทต่อความเค็มของมหาสมุทรและของเหลวภายนอกเซลล์ของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ เป็นส่วนประกอบหลักในเกลือที่กินได้ มันถูกใช้อย่างกว้างขวางในการเป็นเครื่องปรุงรส และใช้ในการถนอมอาหาร

โซเดียมคลอไรด์ จะเกิดผลึกแบบคิวบิกสมมาตร ในโครงสร้างเหล่านี้ไอออนคลอไรด์ซึ่งมีขนาดใหญ่จะถูกจัดเรียงในคิวบิกแบบโคลสแพค (Close packed) ในขณะที่โซเดียมไอออนซึ่งมี

ขนาดเล็กกว่าจะถูกบรรจุในช่องว่างออกตาฮีดรัล (Octahedral) แต่ละไอออนจะถูกแวดล้อมด้วยไอออนชนิดอื่น 6 ตัว ซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานเดียวกันกับที่พบในแร่อื่นหลายชนิดและรู้จักกันในชื่อโครงสร้างไฮไลต์ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างผลึกของโซเดียมคลอไรด์

ที่มา: สันติรัฐ (2549)

3.1 ความสำคัญทางชีววิทยา

โซเดียมคลอไรด์ มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตบนโลก ในเนื้อเยื่อชีวภาพและของเหลวในร่างกายจะมีเกลือในปริมาณที่แตกต่างกัน ความเข้มข้นของโซเดียมไอออนในเลือดเป็นความสัมพันธ์โดยตรงต่อการควบคุมระดับที่ปลอดภัยของของเหลวในร่างกาย การแพร่กระจายของการกระตุ้นประสาท โดยซิกนัลทรานสดักชัน (Signal transduction) ถูกควบคุมโดยโซเดียมไอออน ร้อยละ 0.9 ของโซเดียมคลอไรด์ในน้ำถูกเรียกว่า สารละลายทางสรีรวิทยา (Physiological solution) หรือ นอร์มัลซาลิน (Normal saline) เพราะเป็นความเข้มข้นเดียว (Isotonic) กับพลาสมาในเลือด นอร์มัลซาลินใช้ในทางการแพทย์เพื่อทดแทนการสูญเสียของเหลวจากร่างกาย และการรักษาแบบนี้เรียกว่า การให้ของเหลวทดแทน (Fluid replacement) ซึ่งใช้แพร่หลายทางการแพทย์ เพื่อป้องกันการขาดน้ำ (Dehydration) หรือ อินทราเวินัสเทอราปี (Intravenous therapy) เพื่อป้องกันการช็อคจากปริมาณเลือดต่ำที่เป็นสาเหตุมาจากการสูญเสียเลือด

ตารางที่ 1 ความสามารถในการละลายของโซเดียมคลอไรด์ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ

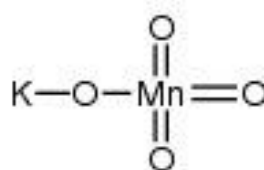
ชนิดของตัวทำละลาย	ความสามารถในการละลายของโซเดียมคลอไรด์ (กรัม ต่อ 100 กรัมของตัวทำละลายที่ 25 องศาเซลเซียส)
น้ำ	36
แอมโมเนียเหลว	3.02
เมทานอล	1.4
กรดฟอร์มิก	5.2
ซัลโฟเลน	0.005
อะซิโตนไทรล์	0.0003
อะซิโตน	0.000042
ฟอร์มามาได์	9.4
ไดเมทิลฟอร์มามาได์	0.04

ที่มา: Burgess (1936)

4. โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (Potassium permanganate)

โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (Potassium permanganate) หรือ ด่างทับทิม มีสูตรทางเคมีคือ KMnO_4 แสดงดังภาพที่ 4 เป็นสารเคมีประเภทอนินทรีย์ (Inorganic) ชนิดหนึ่ง ที่มีลักษณะเป็นผลึกหรือเกล็ดสีม่วงไม่มีสีและไม่มีกลิ่น มีความหนาแน่น 2.703 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จุดหลอมเหลว 240 องศาเซลเซียส (ที่ 513 เคลวิน) สามารถละลายน้ำได้ดีที่ 6.38 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของน้ำ เมื่อละลายน้ำแล้วจะได้สารละลายสีม่วงหรือสีชมพูอมม่วง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณและความเข้มข้นที่ใช้

ในทางเคมีถือว่าด่างทับทิมเป็นเกลือชนิดหนึ่ง โดยมีฤทธิ์เป็นด่างอ่อนๆ และมีคุณสมบัติเป็นสารออกซิเดชัน (Oxidation) อย่างแรง ปัจจุบันมีการนำมาใช้ประโยชน์ในครัวเรือนหรือในอุตสาหกรรมต่างๆ



ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต

ประโยชน์ของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต เช่น นำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ในฐานะเป็นสารออกซิเดชัน (Oxidation) เช่น อุตสาหกรรมการฟอกย้อมสิ่งทอ ฟอกขาวเส้นใยสิ่งทอ ย้อมสีไม้และผ้า เป็นต้น สามารถนำมาใช้ในการล้างแผลเพื่อฆ่าเชื้อโรคได้ ใช้ฆ่าเชื้อในแผลที่เกิดจากอาการน้ำเหลืองเสีย (ทำให้แผลหายช้าหรือแผลที่ยังทิ้งรอย) โดยจะช่วยทำให้แผลหายดีขึ้น นำมาใช้เพื่อฆ่าเชื้อในน้ำ ด้านเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย ตลอดจนสาหร่าย และใช้เป็นสารฟอกขาวได้ เป็นต้น นอกจากนั้นโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตยังมีโทษ เช่น การใช้ต้องระวังไม่ให้สัมผัสกับผิวหนังโดยตรงเพราะจะทำให้ผิวแห้งเป็นขุย หรือถ้าสารละลายมีความเข้มข้นมากก็จะทำให้เป็นผื่นแดง มีอาการปวด เป็นแผลไหม้ หรือเป็นจุดด่างสีน้ำตาล นอกจากนั้นยังเป็นสารออกซิไดซ์อย่างแรง สามารถเกิดการระเบิดได้เมื่อเกิดการสันดาปอย่างแรงหรือถูกความร้อน เปลวไฟ รวมไปถึงการเสียดสี และการสัมผัสกับสารออกซิไดซ์จะก่อให้เกิดการเผาไหม้อย่างรุนแรงได้ ส่วนภาชนะบรรจุที่ปิดผนึกสนิทก็อาจเกิดการระเบิดได้เมื่อถูกความร้อน

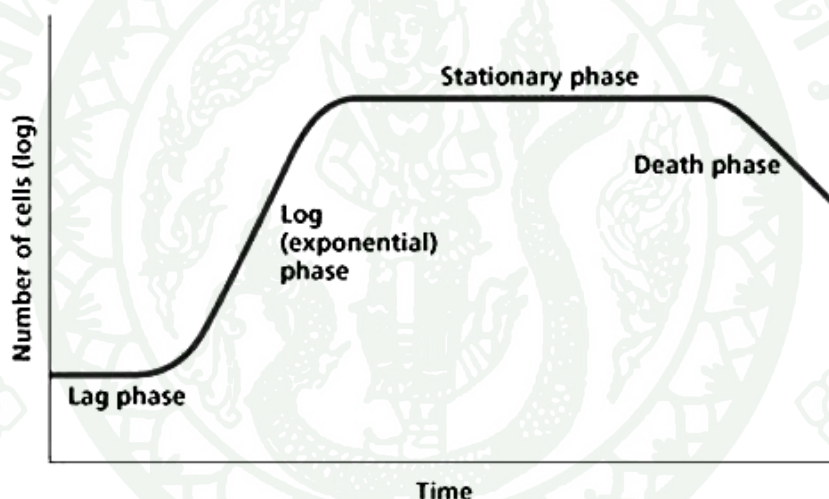
5. จุลินทรีย์ (Microorganism)

จุลินทรีย์ เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจึงจำเป็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ แบคทีเรีย อาร์เคีย รา และ ยีสต์ เป็นต้น เราสามารถพบจุลินทรีย์ได้ทุกสภาวะแวดล้อม แม้แต่ในสภาวะแวดล้อมที่สิ่งมีชีวิตอื่นอยู่ไม่ได้ แต่จุลินทรีย์บางชนิดสามารถปรับตัวอาศัยอยู่ได้ เช่น ในน้ำพุร้อนบริเวณภูเขาไฟใต้ทะเลลึก หรือภูเขาไฟธรรมดา ได้มหาสมุทรที่มีความกดดันของน้ำสูงๆ ในน้ำแข็งที่มีอุณหภูมิเย็นจัด บริเวณที่มีสภาพความเป็นกรดต่ำสูง หรือแม้กระทั่งในบริเวณที่ไม่มีออกซิเจน ส่วนใหญ่หมายถึงสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวหรือหลายๆเซลล์ โดยแต่ละเซลล์เป็นอิสระจากกัน

5.1 การเจริญของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์เซลล์เดียวจะเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนด้วยการแบ่งเซลล์จาก 1 เป็น 2 (Binary fission) เซลล์รุ่นลูกแต่ละเซลล์มีลักษณะเหมือนเซลล์แม่ทุกประการ เมื่อการแบ่งเซลล์สิ้นสุดลง จำนวนเซลล์หรือมวลชีวภาพ (Biomass) จะเพิ่มเป็น 2 เท่าของเมื่อก่อนแบ่งเซลล์

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สามารถศึกษาได้จากกราฟการเติบโต (Growth curve) โดยที่กราฟการเติบโตปกติ (Typical growth curve) ดังภาพที่ 5 จะแสดงให้เห็นถึงระยะการเติบโต 4 ขั้นด้วยกัน ได้แก่



ภาพที่ 5 การเจริญของจุลินทรีย์

ที่มา: Shuler and Kargi (1992)

5.1.1 ระยะปรับตัว (Lag phase)

เป็นระยะที่ใส่จุลินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นระยะที่จุลินทรีย์จะปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ จำนวนจุลินทรีย์ยังไม่เพิ่มขึ้น เพราะยังไม่แบ่งเซลล์ แต่เซลล์จะว่องไว และสังเคราะห์โปรตีนพลาซิมใหม่ รวมทั้งเอนไซม์ โคเอนไซม์ DNA RNA เพื่อให้เพียงพอต่อกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ เป็นช่วงที่จุลินทรีย์มีกิจกรรมทางสรีรวิทยาสูง ขนาดของเซลล์จะ

เพิ่มขึ้น ส่วนใหญ่เป็นการเพิ่มความยาว และมีการเพิ่มโปรตีนและน้ำหนักแห้งด้วย ตอนปลายของระยะนี้ จุลินทรีย์จะแบ่งตัว แต่เนื่องจากจุลินทรีย์ทุกตัวไม่ได้แบ่งตัวพร้อมกัน ดังนั้นจำนวนประชากรจะค่อยๆเพิ่มขึ้น ความยาวของระยะปรับตัวจะยาวนานเพียงใดขึ้นกับสภาพแวดล้อม และชนิดของจุลินทรีย์ เช่น ถ้านำจุลินทรีย์ที่เลี้ยงอาหารชนิดหนึ่งไปเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเดิม ระยะปรับตัวจะสั้น แต่ถ้าจุลินทรีย์นั้นมีความผิดปกติหรือเป็นจุลินทรีย์ที่เก็บไว้นาน ก็จะต้องใช้เวลาในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่

5.1.2 ระยะเพิ่มจำนวน (Logarithmic phase หรือ Exponential phase หรือ Log phase)

เป็นระยะที่จุลินทรีย์แบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ คือ การแบ่งเซลล์แต่ละครั้งจะใช้เวลาเท่าๆกัน ระยะนี้อัตราการเจริญจะมากที่สุด เซลล์ว่องไวที่สุด สารอาหารจะถูกนำไปใช้อย่างมากและรวดเร็ว การแบ่งเซลล์จะสัมพันธ์กับการสังเคราะห์โปรตีน โทพลาซึม และกิจกรรมทางเคมีของจุลินทรีย์ จำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า จึงทำให้ลักษณะของกราฟเป็น Exponential

5.1.3 ระยะคงที่ (Stationary phase)

เป็นระยะที่จุลินทรีย์จะมีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก คือ ถึงแม้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น แต่อัตราที่เพิ่มขึ้นจะเท่ากับอัตราการตาย ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปเกือบหมด และอาจมีการขับของเสียที่เป็นพิษออกมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม

5.1.4 ระยะสิ้นสุด (Death phase หรือ Decline phase)

เป็นระยะที่จุลินทรีย์จะตายอย่างรวดเร็วและตายมากขึ้นจนสม่ำเสมอเป็น Exponential หรือ Logarithm สาเหตุการตายอาจเนื่องมาจากสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์หมดไป และเกิดการสะสมของเสีย และสารพิษที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม จุลินทรีย์จะมีอัตราการตายที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ เช่น พวกทรงกลม แกรมลบ จะตายอย่างรวดเร็วมาก ภายใน 2-3 วัน และเหลือเซลล์ที่มีชีวิตอยู่น้อยมาก เชื้อบางชนิดตายช้าจึงทำให้มีจุลินทรีย์มีชีวิตเหลืออยู่เป็นเวลานานหลายเดือน

5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการปัจจัยที่เหมาะสมเพื่อการเจริญ โดยปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ สามารถจัดแบ่งได้เป็น 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยภายใน (Intrinsic factor) จะมีบทบาทต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยตรง ได้แก่ สารอาหาร ความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ความชื้น สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และโครงสร้างของอาหารตามธรรมชาติที่เป็นอุปสรรคต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และปัจจัยภายนอก (Extrinsic factor) จะมีผลทางอ้อมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ อุณหภูมิในการเก็บรักษา ความชื้นสัมพัทธ์ในการเก็บรักษาอาหาร และสภาพอากาศในการเก็บรักษาอาหาร

5.2.1 สารอาหาร

จุลินทรีย์ต้องการสารอาหารที่เป็นแหล่งของคาร์บอน ไนโตรเจน วิตามิน รวมทั้งแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญ คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งของคาร์บอนที่สำคัญซึ่งจุลินทรีย์จะนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน โปรตีนจะเป็นแหล่งของไนโตรเจน ซึ่งนำมาใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน วิตามิน โดยสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการสามารถแบ่งได้เป็น

ก. แหล่งคาร์บอน (Carbon source) คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50 ถึง 55 ในการสร้างเซลล์ อัตราการเมตาบอลิซึมของสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนมักมีอิทธิพลต่อการสร้างเซลล์ หรือผลผลิต โดยจุลินทรีย์จะเจริญได้อย่างรวดเร็ว หากใช้แหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถ เมตาบอลิซึมได้อย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้นสูงๆ

ข. แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source) สามารถถูกใช้โดยจุลินทรีย์หลากหลายชนิด มักอยู่ในรูปของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ไนโตรเจนส่วนใหญ่ถูกเมตาบอลิซึมเพื่อทำให้เป็นโปรตีน กรดนิวคลีอิก และโพลีเมอร์ของผนังเซลล์ กรดอะมิโนในไนโตรโพลอสซิมทั้งหมดมีประมาณร้อยละ 0.25 ถึง 5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ไนโตรเจนภายในเซลล์แบคทีเรียส่วนใหญ่มีประมาณร้อยละ 12 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่การเจริญของจุลินทรีย์ก็สามารถถูกจำกัดโดยไนโตรเจนได้ โดยปริมาณโปรตีนของชีวมวลจากการเจริญถูกจำกัดด้วยไนโตรเจนจะต่ำกว่าการเจริญที่ถูกจำกัดด้วยแหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปของก๊าซ

ไนโตรเจน บางชนิดสามารถใช้ในรูปของเกลือแอมโมเนียม หรือเกลือไนเตรต และบางชนิดใช้ในรูปแบบของสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เป็นต้น

ค. แร่ธาตุ (Trace element) จุลินทรีย์ต้องการเกลือแร่บางชนิดในปริมาณเล็กน้อย แต่ถ้าไม่มีจะเป็นผลเสียต่อเซลล์จุลินทรีย์มาก เพราะเกลือแร่บางชนิดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวเคมีหลายอย่างและเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์และองค์ประกอบบางอย่างของเซลล์ แร่ธาตุอาจแบ่งออกเป็น แร่ธาตุหลัก (Major element) คือ แร่ธาตุที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณพอสมควร ได้แก่ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โซเดียม ซัลเฟอร์ และแคลเซียม เป็นต้น ส่วนพวกที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งมักไม่จำเป็นต้องเติมลงไปในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากมีปะปนมากับวัตถุดิบหลายชนิดที่นำมาใช้อยู่แล้ว เรียกว่า แร่ธาตุรอง (Minor หรือ Trace elements) ได้แก่ โคบอลต์ คอปเปอร์ เหล็ก แมงกานีส โมบิลีียม และสังกะสี เป็นต้น (คุชฎี, 2537) แต่โดยทั่วไปมักจะพบแร่ธาตุต่างๆ เจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว ดังนั้นจึงอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นการเตรียมอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) จึงต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในการเพาะเลี้ยงโดยตรง โดยแร่ธาตุต่างๆ นิยมใช้ในรูปแบบของสารอินทรีย์

ง. แหล่งอาหารเสริม เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโน หรือวิตามินบางอย่างได้ เช่น ไลซีน เมไทโอนีน วิตามินบีรวม กรดแพนโททีนิก กรดโฟลิก และไบโอติน เป็นต้น ดังนั้นหากเราต้องการให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตไปได้ด้วยดี เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการอย่างมีประสิทธิภาพแล้ว จำเป็นต้องศึกษาถึงความต้องการและปริมาณของอาหารเสริมชนิดต่างๆ ที่จุลินทรีย์จะใช้ด้วย

5.2.2. แหล่งพลังงาน (Energy source)

เนื่องจากการเจริญเป็นกระบวนการที่จำเป็นต้องใช้พลังงานเพื่อนำมาสังเคราะห์ส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ จุลินทรีย์อาจใช้พลังงานจากแหล่งต่างๆ ดังนี้ (มณฑนา, 2545)

- แสงแดด พบในพวก Autotrophic microorganism เช่น สาหร่ายเซลล์เดียว และแบคทีเรียบางชนิด ทั้งนี้เพราะมีความสามารถที่จะสังเคราะห์แสงได้

- ออกซิโดซาร์ประกอบบางชนิด พบในจุลินทรีย์พวก Chemo – autotrophic microorganism เช่นแบคทีเรียในตระกูล *Thiobacillus sp.* *Nitrosomonas sp.* และ *Nitrobacter sp.*

- กระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์โดยเฉพาะพวกแป้ง น้ำตาล พบใน Heterotrophic microorganism ได้แก่ จุลินทรีย์เกือบทั้งหมดที่ใช้ในอุตสาหกรรมหมัก

5.2.3 น้ำหรือความชื้นในอาหาร

น้ำหรือความชื้นในอาหาร เป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ค่าแอกติวิตีของน้ำ (Water activity) เป็นค่าที่แสดงปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ ดังนั้นการลดค่านี้ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การทำแห้ง ใส่น้ำเกลือ หรือเติมน้ำตาลปริมาณสูง จะทำให้อาหารมีค่าแอกติวิตีของน้ำ (Water activity) ต่ำลง ทำให้มีน้ำที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้มีน้อยลง จุลินทรีย์ก็จะเจริญได้ยาก

5.2.4 อุณหภูมิ

จุลินทรีย์มีช่วงของอุณหภูมิในการเจริญที่กว้างและแตกต่างกัน อาจจัดแบ่งประเภทของจุลินทรีย์ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ จุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (Psychrophile) หมายถึงจุลินทรีย์ที่ชอบความเย็น เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส ถึง 5 องศาเซลเซียส และเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิประมาณ 12-15 องศาเซลเซียส แต่จุลินทรีย์พวกนี้จะไม่ทนความร้อน จุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิอบอุ่น (Mesophile) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส และจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Thermophile) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส

5.2.5 ปริมาณอากาศ

จุลินทรีย์มีความต้องการปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน จุลินทรีย์แต่ละประเภทอาจต้องการปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน สามารถแบ่งได้เป็น จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน (Aerobic microorganisms) คือ จุลินทรีย์ที่ต้องการปริมาณออกซิเจนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต เช่น *Escherichia* และ *Pseudomonas* เป็นต้น จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน (Anaerobic

microorganisms) เพราะออกซิเจนรวมกับน้ำเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เช่น *Clostridium* จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative microorganisms) จุลินทรีย์พวกนี้ จะสามารถสร้างพลังงานเองได้จากกระบวนการหายใจหรือกระบวนการหมัก และไม่จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการสังเคราะห์ต่างๆ เช่น *Escherichia* และ *Enterobacter* เป็นต้น และจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนน้อย (Microaerophilic microorganisms) จุลินทรีย์พวกนี้มีความต้องการออกซิเจนน้อยกว่า 0.2 บรรยากาศ อาจเนื่องจากออกซิเจนเป็นพิษต่อจุลินทรีย์เหล่านั้น เช่น *Lactobacillus* และ *Neisseria* เป็นต้น (นงลักษณ์, 2552)

5.2.6 ความเป็นกรด-ด่างของอาหาร

จุลินทรีย์ มีช่วงในการเจริญที่ความเป็นกรดต่างต่างกัน ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียมีการเจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 6.0-8.0 หรือ ยีสต์ในช่วง 4.5 - 6.0 ส่วนราในช่วง 3.5 - 4.0 เป็นต้น

5.2.7 เวลา

โดยปกติจุลินทรีย์จะมีการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ภายในเวลา 20 - 30 นาที ทั้งนี้ต้องพิจารณาชนิดของจุลินทรีย์และสถานะในการเจริญด้วย เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ดังนั้นที่สถานะเหมาะสม จุลินทรีย์เพียง 1 เซลล์ก็อาจสามารถเพิ่มจำนวนเป็นล้านเซลล์ได้ ภายในเวลาประมาณ 10 ชั่วโมง

5.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตน้ำมัน

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตน้ำมัน จะถูกพิจารณาจากจุลินทรีย์ที่มีไขมันส่วนเกินร้อยละ 20 ของชีวมวลของจุลินทรีย์ การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไขมันของจุลินทรีย์จะถูกเรียกว่า น้ำมันเซลล์เดียว (Single cell oils, SCO) ซึ่งได้รับความสนใจจากทั่วโลกในขณะนี้ ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดจะสามารถผลิตและกักเก็บน้ำมันได้ แต่จะสามารถนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซลได้บางชนิดเท่านั้น โดยจะแสดงให้เห็นตามตารางที่ 2 ดังนี้

ตารางที่ 2 ปริมาณของน้ำมันในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Microorganisms	Oil content (% dry wt)	Microorganisms	Oil content (% dry wt)
Microalgae		Yeast	
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Nitzschia</i> sp.	45–47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Schizochytrium</i> sp.	50–77	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
Bacterium		Fungi	
<i>Arthrobacter</i> sp.	>40	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27–38	<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Rhodococcus opacus</i>	24–25	<i>Humicola lanuginosa</i>	75
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18–24	<i>Mortierella vinacea</i>	66

ที่มา: Meng *et al.* (2009)

การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเซลล์เดียว ในเชิงพาณิชย์ได้เริ่มต้นขึ้นในปีพ.ศ. 2538 โดย JE Sturge ในประเทศอังกฤษ โดยการใช้น้ำเชื้อรา *Mucor circinelloides* ในการผลิตกรดแกมมาลิโนไลอิก (γ -linolenic acid) ในถังหมักขนาด 200 ลิตร ภายใต้สภาวะการหมักที่เหมาะสม พบว่าในไลปิดร้อยละ 20 ของน้ำมันจากสาหร่าย มีกรดแกมมาลิโนไลอิกร้อยละ 15 -18 ของกรดไขมัน และโครงการนี้ถูกปิดตัวลงไปใน 6 ปีหลังจากนั้น เนื่องจากผลกระทบของต้นทุนการผลิตที่แพงมาก (Certík, 2012 and Ratledge, 2004) มีการรายงานการเจริญเติบโตและการสะสมของไขมันในปริมาณมากคล้ายกับน้ำมันพืช จึงถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ในปีที่ผ่านมาการศึกษาถึงจุลินทรีย์ที่ทำการสะสมไขมันแบบไม่ละลายน้ำเป็นจำนวนมาก เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำมันเซลล์เดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตไบโอดีเซล ในจุลินทรีย์จะมีความสามารถในการสะสมไขมันขึ้นกับลักษณะทางพันธุกรรม โดยการสะสมไขมันได้มากที่สุดนั้นจะแตกต่างกันไปอย่างมากตามชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และเนื่องจากจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันและสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตที่ต่างกัน เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ระยะเวลาที่ใช้ในการ

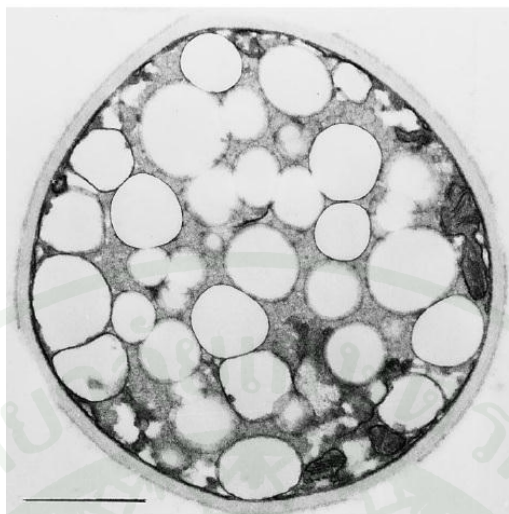
เจริญเติบโต เป็นต้น จะทำให้ปริมาณการสะสมและองค์ประกอบของน้ำมันแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของไขมันในเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Microorganisms	Lipid composition (w/total lipid)					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Microalgae	12–21	55–57	1–2	58–60	4–20	14–30
Yeast	11–37	1–6	1–10	28–66	3–24	1–3
Fungi	7–23	1–6	2–6	19–81	8–40	4–42
Bacterium	8–10	10–11	11–12	25–28	14–17	–

ที่มา: Meng *et al.* (2009)

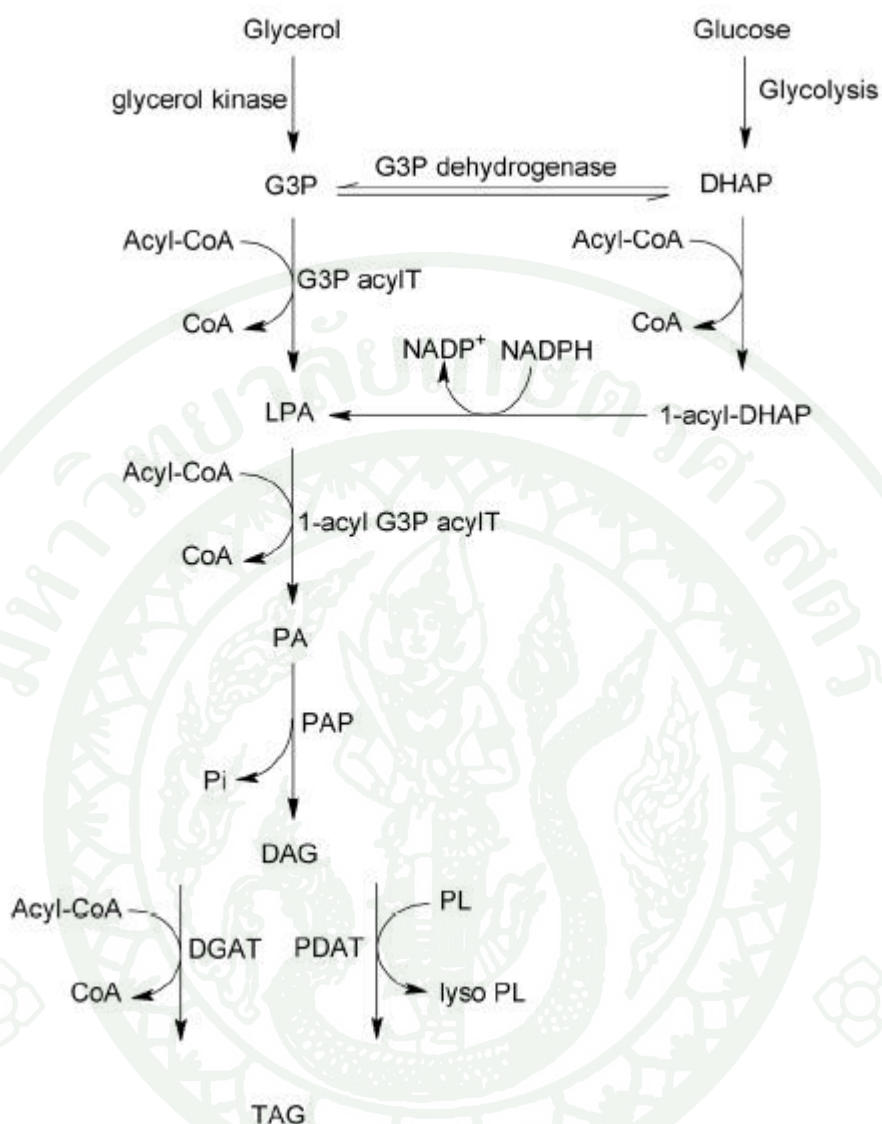
การสะสมไขมันของจุลินทรีย์จะเริ่มต้นขึ้นเมื่อจุลินทรีย์ทำการใช้สารอาหารคือไนโตรเจน ไปจนหมด และปริมาณคาร์บอนที่เหลืออยู่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol; TAG) โดยการสังเคราะห์ไขมันจะเกิดขึ้นไปพร้อมๆ กับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอัตราส่วนที่เท่าๆ กัน เนื่องจากมีปริมาณไนโตรเจนที่จำกัด นั้นหมายความว่า การเพิ่มปริมาณของเซลล์จะถูกจำกัดไปด้วยและจะทำให้เกิดไขมันสะสมภายในเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ *Cryptococcus curvatus* หลังการเจริญในวันที่ 2 ภายใต้สภาวะการจำกัดแหล่งไนโตรเจน

ที่มา: Ratledge (n.d.)

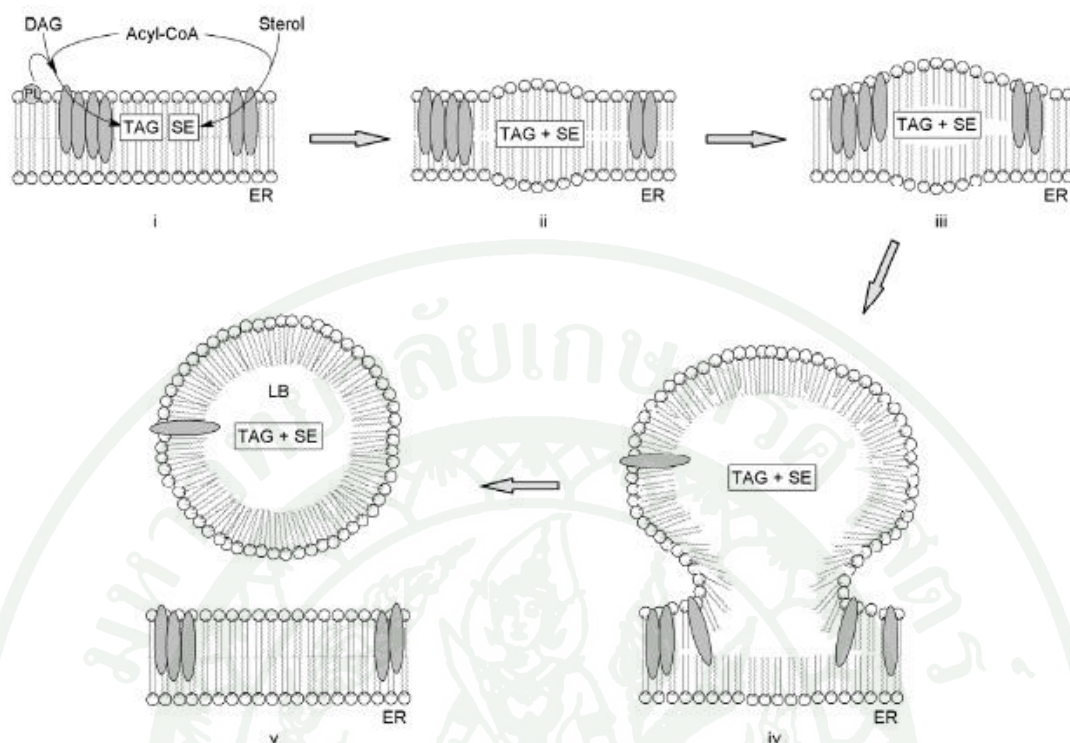
ในการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น กลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนรูปไปเป็น กลีเซอรอล - 3 - ฟอสเฟต (Glycerol-3-phosphate; G3P) โดยใช้เอนไซม์ กลีเซอรอลไคเนส (Glycerol kinase) หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนรูปไปเรื่อยๆ โดย Acyl-CoA จากกรดไลโซฟอสฟาติก (Lysophosphatidic acid; LPA) เป็นกรดฟอสฟาติก (Phosphatidic acid; PA). หลังจากนั้นจะได้ไดเอซิลกลีเซอรอล (Diacylglycerol; DAG) และได้ไตรเอซิลกลีเซอรอล ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 การสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) จากการใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น

ที่มา: Rossi *et al.* (2011)

เมื่อมีการสังเคราะห์ TAG เพิ่มมากขึ้นในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (Endoplasmic reticulum) จะเกิดการฟอร์มตัวเป็น Lipid body (LB) ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 รูปแบบของการสะสมไลปิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (Endoplasmic reticulum)

ที่มา: Rossi *et al.* (2011)

ในการสะสมไขมันของจุลินทรีย์ จะทำการสะสมในสภาวะที่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น และมีงานวิจัยที่พบว่า การสะสมไขมันจะเพิ่มขึ้น เมื่อมีการบีบอัดเซลล์ด้วยการลดแหล่งไนโตรเจนหรือสารอาหารอื่นๆ ให้น้อยกว่าแหล่งคาร์บอน (Cohen and Ralftledge, 2005) จะทำให้เกิดการสะสมไลปิด (Lipid) และไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นจะมีการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณเกลือสูง (Takagi *et al.*, 2006) หรือมีการเติมโลหะหนักลงไป เช่น แคดเมียม (Cadmium) เป็นต้น

5.4 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะบีบอัด (Stress Condition)

การสังเคราะห์และการสะสมไลปิดของจุลินทรีย์ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) จะเพิ่มขึ้นอย่างมากพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบไลปิดและกรดไขมัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะบีบอัดภายใต้สภาวะด้านกายภาพหรือทางเคมีอย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้ง

สองอย่างพร้อมกัน มีการศึกษาทางเทคนิคอย่างกว้างขวางในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะบีบคั้นเพื่อเพิ่มปริมาณไลปิด อาจจะแบ่งได้เป็น 6 เทคนิค ดังต่อไปนี้ การใช้สารอาหารในสภาวะบีบคั้น (Nutrient stress) จะรวมไปถึงการจำกัดแหล่งไนโตรเจนหรือแหล่งฟอสฟอรัส การฉายรังสี ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ การเติมโลหะหนักและการเติมสารเคมีอื่นๆ เป็นต้น (Sharma *et al.*, 2012)

5.4.1 การจำกัดสารอาหาร (Nutrient starvation)

สารอาหารเป็นสิ่งสำคัญในการเจริญเติบโตและการสะสมไลปิดในจุลินทรีย์ โดยจะส่งผลไปถึงองค์ประกอบของไลปิดและกรดไขมันด้วย การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะแวดล้อมบีบคั้นเมื่อมีการจำกัดอาหารเลี้ยงเชื้อ จะส่งผลให้อัตราการแบ่งตัวของเซลล์จะลดลงอย่างต่อเนื่อง เมื่อเซลล์มีการเจริญลดลงเซลล์จะเปลี่ยนจากการสังเคราะห์กรดไขมันไปเป็นการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลแทน โดยไตรเอซิลกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นจะทำหน้าที่เป็นกลไกป้องกันเซลล์ให้การทำงานอย่างปกติต่อไป การจำกัดสารอาหารในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มการผลิตไลปิดมากขึ้น เป็นวิธีการที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตัวอย่างของการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในสภาวะการจำกัดสารอาหาร

จุลินทรีย์ (Microorganism)	การบีบคั้นด้วย สารอาหาร	การเปลี่ยนแปลงของ ปริมาณไลปิด	แหล่งอ้างอิง
<i>Nannochloropsis oculata</i>	จำกัดไนโตรเจน	ไลปิดเพิ่มขึ้นร้อยละ 15.31	Converti <i>et al.</i> , 2009
<i>Chlorella vulgaris</i>	จำกัดไนโตรเจน	ไลปิดเพิ่มขึ้นร้อยละ 16.41	Converti <i>et al.</i> , 2009
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	จำกัดไนโตรเจน	TAG เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 69 เป็นร้อยละ 75	Alonso <i>et al.</i> , 2000
<i>Chlorella kessleri</i>	จำกัดฟอสเฟต	กรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้น	El-Sheek and Rady, 1995

ที่มา: Sharma *et al.* (2012)

5.4.2 การบีบคั้นด้วยอุณหภูมิ (Temperature stress)

มีงานวิจัยที่พบว่าอุณหภูมิจะส่งผลหลักกับองค์ประกอบของกรดไขมัน ดังแสดงในตารางที่ 5 มีแนวโน้มที่พบว่าเมื่อมีการลดอุณหภูมิลงจะทำให้ปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีการเพิ่มขึ้น ในทางกลับกันเมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ปริมาณของกรดไขมันอิ่มตัวเพิ่มขึ้น โดยจะพบมากในสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย และเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณไขมันภายในเซลล์เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้เกิดการทำงานที่ปกติต่อไป ซึ่งส่วนที่เปลี่ยนแปลงคือกรดไขมันไม่อิ่มตัว

ตารางที่ 5 การผลิตไลปิดของจุลินทรีย์ในอุณหภูมิที่ต่างกัน

จุลินทรีย์ (Microorganism)	อุณหภูมิที่ใช้	การเปลี่ยนแปลงของ ปริมาณไลปิด	แหล่งอ้างอิง
<i>Nannochloropsis oculata</i>	เพิ่มขึ้นจาก 20 ถึง 25 องศาเซลเซียส	ไลปิดเพิ่มขึ้นร้อยละ 14.92	Converti <i>et al.</i> , 2009
<i>Isochrysis galbana</i>	เพิ่มขึ้นจาก 15 ถึง 30 องศาเซลเซียส	นิวทรอลไลปิดเพิ่มขึ้น	Zhu <i>et al.</i> , 1997
<i>Selenastrum capricornutum</i>	ลดลงจาก 25 ถึง 10 องศาเซลเซียส	กรดไขมันโอเลอิค (Oleate fatty acid) เพิ่มขึ้น	McLarnon-Riches <i>et al.</i> , 1998

ที่มา: Sharma *et al.* (2012)

5.4.3 การบีบคั้นด้วยความเค็ม (Salinity stress)

เมื่อมีการเพิ่มความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ จะพบว่าการเพิ่มขึ้นของไลปิดแบบสายสั้นและกรดไขมันไม่อิ่มตัว การเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างหลักของไลปิดเหล่านี้อาจจะขัดขวางการเรียงตัวและความแข็งแรงของหัวของฟอสโฟไลปิด (Phospholipid) และซันโฟไกลโคไลปิด (Sulfolipid) จึงเอื้อต่อภาวะสมดุลของการไหลและการซึมผ่านเยื่อหุ้ม

เซลล์ภายใต้สภาวะการบีบคั้นด้วยเกลือ (Lopaco *et al.*, 2013) การบีบคั้นด้วยความเค็มมักจะนิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การผลิตไลปิดของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะการบีบคั้นด้วยความเค็ม

จุลินทรีย์ (Microorganism)	การเปลี่ยนแปลง ความเค็ม	การเปลี่ยนแปลงของ ปริมาณไลปิด	แหล่งอ้างอิง
<i>Dunaliella salina</i>	เดิมโซเดียมคลอไรด์ 29 ถึง 205 กรัมต่อ ลิตร	กรดไขมันโอเลอิกมี การเพิ่มขึ้น	Azachi <i>et al.</i> , 2002
<i>Crythecodinium.cohnii</i> ATCC 30556	ที่โซเดียมคลอไรด์ 9 กรัมต่อลิตร	กรดไขมันเพิ่มขึ้น	Jiang and Chen, 1999
Algae from seaweed	ที่โซเดียมคลอไรด์ 1 กรัมต่อลิตร	ไลปิดเพิ่มขึ้นร้อยละ 23.4	Mohan and Davi, 2014

ที่มา: Sharma *et al.* (2012)

5.4.4 การบีบคั้นด้วยค่าความเป็นกรด-ด่างและการเติมโลหะหนัก (pH and heavy metals stress)

มีงานวิจัยที่ศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ พบว่าเมื่อมีการเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น จุลินทรีย์จะสะสมไตรเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มมากขึ้นไปด้วย ดังแสดงในตารางที่ 7 นอกจากนั้นยังมีการพบว่า เมื่อมีการเติมโลหะหนัก เช่น แคดเมียม เหล็ก คอปเปอร์และสังกะสี เป็นต้น จะทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของไลปิดด้วย

ตารางที่ 7 การผลิตไลปิดของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะการบีบคั้นด้วยความเป็นกรด-ด่างและการเติมโลหะหนัก

จุลินทรีย์ (Microorganism)	การเปลี่ยนแปลง	การเปลี่ยนแปลงของ ปริมาณไลปิด	แหล่งอ้างอิง
<i>Unidentified Chlamydomonas sp.</i>	ความเป็นกรด-ด่าง ต่ำ	กรดไขมันอิ่มตัว เพิ่มขึ้น	Tatsuzawa <i>et al.</i> , 1996
<i>Chlorella sp.</i>	เป็นด่าง	ไตรเอซิลกลีเซอรอล เพิ่มขึ้น	Guckert and Cooksey, 1990
<i>Eugenia gracilis</i>	เติมแคะเมี่ยม คอปเปอร์ สังกะสี	ไลปิดเพิ่มขึ้น	Einicker-Lamas <i>et al.</i> , 2002
<i>Chlorella vulgaris</i>	เติมธาตุเหล็ก	ไลปิดเพิ่มขึ้นเป็น ร้อยละ 56.6	Liu <i>et al.</i> , 2008

ที่มา: Sharma *et al.* (2012)

5.4.5 การบีบคั้นด้วยการฉายรังสี (Light irradiation stress)

การบีบคั้นด้วยการฉายรังสีส่วนมากมักจะพบในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย เนื่องจากสาหร่ายต้องใช้แสงในการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) มีรายงานการวิจัยพบว่าเมื่อสาหร่ายมีการเจริญในความเข้มของแสงที่แตกต่างกันจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมี รงควัตถุและกิจกรรมการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย นอกจากนั้นยังพบว่าค่าความเข้มแสงและค่าความยาวคลื่นที่แตกต่างกันจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมันอีกด้วย โดยเมื่อมีการใช้ค่าความเข้มแสงสูงจะทำให้เกิดการทำลายกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid: PUFA) ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในการสังเคราะห์กรดปาล์มิโตเลอิก (Palmitoleic acid) และปริมาณของกรดไขมันนี้ในสาหร่าย โดยทั่วไปเมื่อมีการใช้ค่าความเข้มแสงต่ำจะทำให้เกิดไขมันแบบมีขั้ว (Polar lipid) โดยเฉพาะไขมันบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับคลอโรพลาสต์ เมื่อมีการใช้ค่าความเข้มแสงสูงจะลดการเกิดไขมันแบบมีขั้วพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของ นิวทรัลไลปิด (Neutral lipid) โดยเฉพาะไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) ตัวอย่างของการบีบคั้นด้วยการฉายรังสี ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การผลิตไลปิดของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะการบีบคั้นด้วยการฉายรังสี

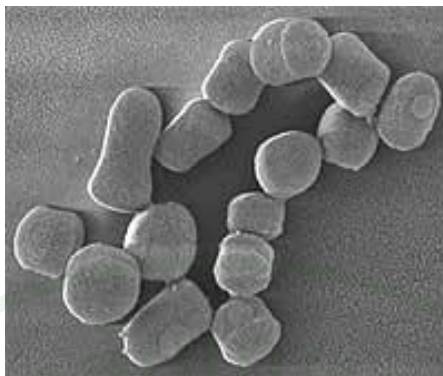
จุลินทรีย์ (Microorganism)	การเปลี่ยนแปลง	การเปลี่ยนแปลงของ ปริมาณไลปิด	แหล่งอ้างอิง
<i>Tichocarpus crinitus</i>	ความเข้มแสงต่ำ	ไตรเอซิลกลีเซอรอล เพิ่มขึ้น	Khotimchenko and Yakovleva, 2005
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	ความเข้มแสงสูง ในช่วงระยะคงตัว	ไตรเอซิลกลีเซอรอล เพิ่มขึ้น	Brown <i>et al.</i> , 1996
<i>Nannochloropsis oculata</i>	UV - A	PUFA เพิ่มขึ้น	Fouqueray <i>et al.</i> , 2007
<i>C. simplex</i>	UV - B สูง	ไลปิดเพิ่มขึ้น	Jiang and Chen, 1999

ที่มา: Sharma *et al.* (2012)

จะเห็นได้ว่ามีความเป็นไปได้สูงในการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ แต่ต้องขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ระยะเวลา อาหาร เลี้ยงเชื้อและวิธีการสกัดน้ำมัน เป็นต้น

5.5 แบคทีเรีย *Athrobacter* sp.

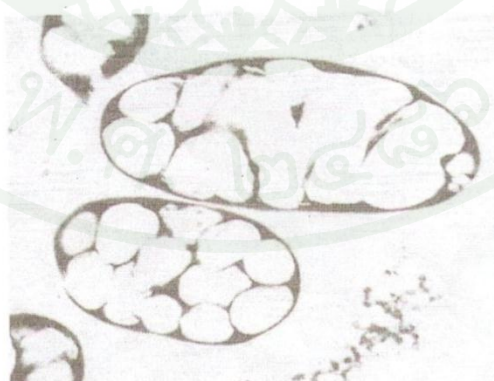
Athrobacter (มาจากภาษากรีก หมายถึง ที่ร่วมกันคิดขนาดเล็ก) เป็นสกุลของแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในดิน (Wikipedia, 2011) การเจริญเติบโตในช่วงระยะเพิ่มจำนวน (Exponential phase) มักจะมีรูปร่างเป็นแบบท่อนไม้ เมื่อถึงช่วงการเจริญเติบโตในระยะคงที่ (Stationary phase) มักจะมีรูปร่างกลมรี แบคทีเรียชนิดนี้มีเมตาบอลิซึมที่หลากหลาย ทำให้เกิดการผลิเอนไซม์ได้แตกต่างกัน ช่วยให้เจริญเติบโตได้ในช่วงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่กว้างขึ้นเหมือนกัน แบคทีเรียที่พบทั่วไปในดิน ตัวอย่างสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Athrobacter* sp. แสดงดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 แบคทีเรีย *Arthrobacter chlorophenolicus*

ที่มา: Encyclopedia of Life (2013)

แบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 ถูกพบว่าการสะสมไขมันในโครงสร้างถึงร้อยละ 40 – 80 โดยน้ำหนักเมื่อมีการเจริญเติบโตในกลูโคส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Ratlidge, 1986) โดยไขมันจะเกิดขึ้นในช่วง ระยะแบ่งตัวทวีคูณและจะสะสมไปเรื่อยๆ จนถึงช่วงระยะคงจำนวนเซลล์ และจะสูงที่สุดเมื่ออยู่ในช่วงสุดท้ายของระยะคงจำนวนเซลล์ (ประมาณ 10 วัน) (Wayman *et al.*, 1983) ลักษณะของไขมันภายในเซลล์ของแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 จะแสดงดังภาพที่ 10 และเมื่อทำการสกัดกรดไขมันที่อยู่ในเซลล์ออกมาจะพบว่าในแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 มีกรดไขมันอยู่หลายชนิดตามแสดงดังตารางที่ 9



ภาพที่ 10 แบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19

ที่มา: Wayman *et al.* (1983)

ตารางที่ 9 องค์ประกอบและปริมาณของกรดไขมันของไขมันจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19
(ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด)

Acid	<i>Arthrobacter</i> AK19	
	Initial extract	Extract after methylation
13:0 iso	-	0.7
14:0*	-	2.7
14:0**	1.4	-
14:0 iso*	4.0	18.4
14:0 iso**	24.5	-
14:0	3.6	-
14:0 iso	4.7	-
15:0*	6.3	23.7
15:0**	31.2	-
15:0 iso*	-	1.7
15:0 iso**	2.4	-
16:0*	1.1	14.5
16:0**	6.8	-
16:0 iso*	-	3.3
16:0 iso**	6.3	-
16:0	1.3	-
16:1*	-	5.2
17:0*	Tr.	5.2
17:0**	4.0	-
18:0*	-	3.3
18:0**	2.4	-
18:0 tetramethyl*	-	0.9
18:1n-9*	-	8.5
18:1n-7*	-	3.9
20:1n-9*	-	2.9

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Acid	<i>Arthrobacter</i> AK19	
	Initial extract	Extract after methylation
20:1n-7*	-	2.3
22:1n-7*	-	2.8

หมายเหตุ * คือ Methyl ester

** คือ Ethyl ester

Tr คือ Traces

ที่มา : Isai *et al.* (2013)

6. กระบวนการหมัก

การหมัก คือ กระบวนการแปลงสภาพทางชีวเคมี เพื่อให้วัตถุดิบเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก เช่น ไวน์ เบียร์ ยาปฏิชีวนะ เอทานอล กรดซิตริก เป็นต้น ในกระบวนการหมักต้องอาศัยสิ่งมีชีวิตซึ่งเรียกว่า จุลินทรีย์ (Microorganisms) ซึ่งมีมากมายหลายชนิด อาศัยอยู่ทั่วไปทั้งในดิน น้ำ อากาศ รวมทั้งในร่างกาย หรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เช่น ไวรัส แบคทีเรีย ยีสต์ ฟังไจ เซลล์สัตว์ หรือ เซลล์พืช

คำว่า การหมัก มาจากภาษาละตินคือ *Fervere* หมายถึงการเดือด (Boil) ซึ่งสื่อถึงลักษณะของฟองก๊าซที่เกิดขึ้นในการหมักผลไม้และข้าวมอลต์โดยยีสต์ การที่น้ำหมักที่ได้มีลักษณะเป็นฟองเนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลในผลไม้เป็นแหล่งอาหาร ทำให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นี้เองที่ทำให้ น้ำหมักที่ได้มีลักษณะเป็นฟอง ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ให้คำจำกัดความของการหมักกว้างขึ้น โดยเน้นว่าการหมักเป็นกระบวนการแปรสภาพทางชีวเคมีเพื่อให้มีการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยกระบวนการดังกล่าวต้องอาศัยการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ (สมาใจ, 2544)

6.1 ประเภทของการหมัก

การหมักสามารถแบ่งออกได้หลายประเภท (มณฑนา, 2545) ดังนี้

6.1.1 การแบ่งตามความสำคัญทางการค้า กระบวนการหมักที่แบ่งตามความสำคัญทางการค้าจะแบ่งได้ทั้งหมด 4 ประเภท ดังนี้

ก. การหมักที่ให้ผลผลิตเป็นตัวเซลล์ (Microbial cell) การผลิตเซลล์จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางการค้า เช่น การผลิตยีสต์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบ (Bakers' yeast) การผลิตเซลล์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นอาหารมนุษย์และสัตว์ (Single cell protein, SCP)

ข. การหมักที่ให้ผลผลิตเป็นเอนไซม์ (Microbial enzyme) การผลิตเอนไซม์สามารถผลิตได้ทั้งจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์จัดเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากที่สุด เนื่องจากสามารถผลิตได้ครั้งละมากๆ ในเวลาอันสั้นโดยใช้เทคนิคการหมัก และสามารถปรับปรุงให้ได้ผลผลิตสูงขึ้นง่ายกว่าการผลิตจากพืชและสัตว์ สำหรับประโยชน์ของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่จะใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับอาหาร เช่น เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) เอนไซม์ไลเปส (Lipase) เอนไซม์โปรตีเอส (Proteases) เป็นต้น

ค. ผลผลิตเป็นสารเมตาบอไลต์ (Microbial metabolite) อาจจะเป็นสารเมตาบอไลต์ปฐมภูมิ (Primary metabolite) เช่น เอทานอล บิวทานอล ไลซีน วิตามิน เป็นต้น จุลินทรีย์จะผลิตสารเหล่านี้ขึ้นในช่วงระยะเพิ่มจำนวน (Log phase) และสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิซึมปฐมภูมิ ซึ่งพบในจุลินทรีย์บางชนิดในช่วงระยะคงที่ (Stationary phase) ของการเจริญ แต่มีความสำคัญเช่น ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโต (Growth promoter) หรือมีคุณสมบัติเป็นยาฆ่าโรค เป็นต้น

ง. เกิดการเปลี่ยนรูปของสารประกอบที่เดิมลงไป (Transformation process) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบให้อยู่ในรูปที่คล้ายกัน แต่มีราคาสูงขึ้นซึ่งสามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ หรือสารเคมีเป็นตัวเร่งทำให้เกิดปฏิกิริยา การใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าการใช้สารเคมี คือ มีความจำเพาะมากกว่า และสามารถทำได้ที่อุณหภูมิ

ต่ำโดยไม่ต้องใช้โลหะหนักซึ่งเป็นสารมลพิษเป็นตัวเร่ง (Transformation process) ที่ใช้จุลินทรีย์ รู้จักกันดี ได้แก่ กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู (การเปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดน้ำส้ม) การผลิต ยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

6.1.2 การแบ่งตามความต้องการอากาศหรือออกซิเจน

ก. การหมักที่ต้องการอากาศหรือออกซิเจน (Aerobic fermentation) เช่น การหมัก กรดอะซิติก และกรดน้ำส้ม เป็นต้น

ข. การหมักที่ไม่ต้องการอากาศหรือออกซิเจน (Anaerobic fermentation) เช่น การหมักอะซิโตน การหมักก๊าซชีวภาพ และบิวทานอล เป็นต้น

6.1.3 การแบ่งตามสภาพการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ

ก. การหมักสภาพเปิด (Septic fermentation) เป็นการหมักที่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อ แต่ใช้วิธีการปรับสภาพต่างๆ ให้เหมาะสมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการเท่านั้น เช่น การเติมเกลือให้มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 10 - 20

ข. การหมักสภาพกึ่งปิด (Semi-septic fermentation) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากภายนอก และใช้วิธีปรับสภาพต่างๆ ให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ต้องการ แต่ไม่เหมาะสมหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ เช่น การหมักแอลกอฮอล์จาก กากน้ำตาลอาศัยการปรับค่าความเป็นกรด – ด่างให้เท่ากับ 3.5 ซึ่งเป็นสภาพกรดที่แรง จึงสามารถ ยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิดได้

ค. การหมักสภาพปิด (Aseptic fermentation) ต้องทำให้วัตถุดิบที่ใช้ปราศจาก เชื้อ และต้องระมัดระวังไม่ให้มีการปนเปื้อนเชื้ออื่นในระหว่างการหมัก เช่น การผลิตยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

6.1.4 การแบ่งตามลักษณะหรือปริมาณน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก. การหมักแบบแห้ง (Solid-state fermentation) เป็นการหมักซึ่งมีการเติมน้ำเล็กน้อย เพื่อให้เหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการเท่านั้น เช่น การหมักกรดซิตริกโดยเชื้อรา เป็นต้น

ข. การหมักในอาหารกึ่งของเหลว (Semi-solid fermentation) เป็นการหมักในสภาพกึ่งของเหลว เช่น การหมักเนยแข็ง โยเกิร์ต ไข่กรอก และแหนม เป็นต้น

ค. การหมักในอาหารเหลว (Submerged fermentation) เป็นการหมักที่วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักละลายอยู่ในอาหารเหลว ดังนั้นส่วนประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นน้ำที่มีสารอาหารต่างๆ และวัตถุดิบ (ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน) ละลายอยู่ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และทำการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการต่อไป เช่น การหมักแอลกอฮอล์และน้ำส้มสายชู เป็นต้น

6.1.5 การแบ่งตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้

ก. การหมักแบบกะ (Batch Fermentation) กระบวนการหมักแบบกะเป็นกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องในระบบปิดที่มีการเติมสารอาหารและต้นเชื้อ (Inoculum) ลงไปเพียงครั้งเดียวตลอดการหมัก

ข. การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous Fermentation) โดยมีการเติมอาหารใหม่และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกันตลอดเวลา ส่งผลทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีข้อจำกัดในเรื่องอาหาร ขณะเดียวกันก็มีการแยกเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกมาตลอดเวลาเช่นกันซึ่งจำเป็นต้องอาศัยสภาพปราศจากเชื้อปนเปื้อนเป็นอย่างมาก

ค. การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-Batch Fermentation) เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างลงไปในการหมักที่เฉพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นระยะๆ เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่ โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าออก การหมักแบบนี้ส่วนใหญ่ใช้เพื่อแก้ปัญหา

เกี่ยวกับข้อจำกัดในเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น ซึ่งถ้าใช้มากเกินไปอาจจะมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หรืออาจจะทำให้มีปัญหาในการให้ออกซิเจนในปริมาณที่เพียงพอ

7. การออกแบบการทดลอง (Design of Experiment)

การออกแบบการทดลอง คือ การกำหนดการทดลอง เพื่อให้ได้ผลนำมาวิเคราะห์ได้โดยกระบวนการทางสถิติ การออกแบบการทดลองใช้อย่างกว้างขวางในงานวิจัยทางการเกษตร วิทยาศาสตร์ สิ่งแวดล้อม การอุตสาหกรรม การแพทย์ การศึกษา ตลอดจนการวิจัยทางสังคมศาสตร์ ความสำคัญของการออกแบบการทดลอง คือ เพื่อให้ดำเนินการทดลองได้ถูกต้องตามหลักวิชาการ เพื่อเป็นการควบคุมตัวแปรที่มีอิทธิพลบางตัวที่ไม่ต้องการ และทำให้การทดลองนั้นเป็นที่น่าเชื่อถือ ไม่ประสบความล้มเหลว อีกทั้งเพื่อใช้วิธีการทางสถิติวิเคราะห์ได้ถูกต้อง และทำให้สรุปผลการทดลอง หรือวิจัยได้อย่างถูกต้อง ถ้าการออกแบบ การทดลองไม่ถูกต้องอาจเกิดปัญหาขึ้น เช่น ข้อมูลไม่พอหรืออาจมีตัวแปรอื่นมาเกี่ยวข้องโดยคาดไม่ถึง อีกทั้งอาจหาวิธีการทางสถิติที่เหมาะสมมาวิเคราะห์ไม่ได้ จึงนับว่าการออกแบบการทดลองมีประโยชน์อย่างยิ่ง โดยเฉพาะมีประโยชน์ต่อการเลือกใช้สถิติที่เหมาะสม

7.1 หลักการพื้นฐานในการออกแบบการทดลอง

หลักการพื้นฐานที่สำคัญ 3 ประการที่เกี่ยวเนื่องกับการออกแบบการทดลองและเป็นหลักการเพื่อช่วยให้ผลการทดลองมีความถูกต้อง เทียบตรงและแม่นยำมากขึ้นประกอบด้วย 3 หลักการ ดังนี้ (สรรรฐดิษฐ์, 2557)

7.1.1 การทดลองซ้ำ (Replications)

การทดลองซ้ำ คือ การทำการทดลองภายใต้เงื่อนไขการทดลองเดียวกันมากกว่า 1 ครั้ง เพื่อยืนยันและเพิ่มความถูกต้องของผลการทดลอง แต่มีข้อเสียคือสิ้นเปลืองทรัพยากรในการทดลอง นอกจากนี้ข้อมูลจากการทดลองซ้ำยังช่วยให้ผู้ทดลองสามารถคำนวณค่าความผิดพลาด (Errors หรือ Random noises) ในการทดลอง เพื่อใช้ในการประมาณค่าความแปรปรวนในการทดลองที่ใช้เป็นหน่วยพื้นฐานสำหรับเปรียบเทียบกับผลกระทบของปัจจัยว่ามีผลต่อการทดลองอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ถ้าพบว่าผลกระทบของปัจจัยไม่มีผลต่อการทดลองอย่างมีนัยสำคัญแสดง

ว่าผลตอบแทนในการทดลองที่เปลี่ยนแปลง เกิดขึ้นเนื่องจากผลของความผิดพลาดในการทดลองและไม่ใช่เกิดจากผลของปัจจัยนั้นอย่างแท้จริง

7.1.2 การบล็อก (Blocking)

เป็นการศึกษาถึงผลกระทบของปัจจัยภายนอก (Nuisance factors) ที่คิดว่ามีผลต่อค่าตอบสนอง และต้องการที่จะศึกษาว่ามีผลกระทบมากหรือน้อยเพียงใด ข้อดีของเทคนิคนี้คือสามารถควบคุมปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้ในระบบ เช่น วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองแต่ละรอบมีคุณภาพไม่เหมือนกัน แต่ไม่สามารถควบคุมคุณสมบัติมันได้ (ปารเมศ, 2545)

7.1.3 การสุ่ม (Randomization)

โดยการจัดลำดับที่เกี่ยวข้องในการทดลองให้เป็นแบบสุ่ม จะช่วยลดความผิดพลาดที่เกิดจากปัจจัยรบกวนที่ไม่สามารถควบคุมได้หรือไม่ทราบแหล่งหรือที่ไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ ไปสู่การทดลองด้วยโอกาสและขนาดเท่าๆ กัน นอกจากนี้ข้อกำหนดเบื้องต้นทางในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติมักกำหนดว่าข้อมูลและความผิดพลาดในการทดลองจะต้องเป็นตัวแปรสุ่มที่มีการแจกแจงแบบอิสระ (Independently distributed Random Variables) และสุ่มมาจากกลุ่มประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติ โดยมีค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนคงที่ด้วย

7.2 แนวทางในการออกแบบการทดลอง

สรรรฐดิชัย (2557) กล่าวว่า การประยุกต์ใช้เทคนิคการออกแบบการทดลองสำหรับปรับปรุงและพัฒนาคุณภาพในกระบวนการได้อย่างมีประสิทธิภาพจำเป็นต้องมีความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับหลักการในแต่ละขั้นตอนของการออกแบบการทดลองอย่างชัดเจน โดยมีหัวข้อดังต่อไปนี้

7.2.1 กำหนดปัญหาและวัตถุประสงค์ในการทดลองให้ชัดเจน (Define problems)

การกำหนดขอบเขตของปัญหาในการทดลองไม่ควรกำหนดกว้างเกินไป ควรกำหนดให้ชัดเจนว่าจะทดลองหรือศึกษาในขั้นตอนใดและดัชนีชี้วัดของปัญหาคืออะไรและก่อน

ทำการทดลองควรรหาข้อมูลเพิ่มเติมจากการศึกษาค้นคว้าจากตำรา งานวิจัยหรือผู้ที่เกี่ยวข้อง เป็นต้น เพื่อช่วยให้เกิดการหาคำตอบของปัญหาในการทดลองได้ง่ายขึ้น

7.2.2 เลือกผลตอบที่เหมาะสม (Selection of the response variables)

การเลือกผลตอบมีส่วนสำคัญมากในการหาคำตอบเพื่อแก้ปัญหา ถ้ากำหนดผลตอบไม่เหมาะสม ผลสรุปที่ได้จากการทดลองอาจไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้แก้ปัญหาในสถานการณ์จริงได้อย่างมีประสิทธิภาพและไม่บรรลุวัตถุประสงค์ในงานวิจัย

7.2.3 ศึกษาความสามารถของระบบการวัดผลตอบ

สิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึงในการวัดผลจากการทดลองคือ ความสามารถในการวัดซึ่งรวมถึงความสามารถของเครื่องมือวัดและผู้วัด โดยเครื่องมือวัดควรมีการบำรุงรักษา มีการสอบเทียบและกำหนดวิธีการวัดที่เป็นมาตรฐาน

7.2.4 เลือกปัจจัยในการศึกษา กำหนดช่วง (Range) และระดับ (Level) ของปัจจัยให้เหมาะสม

ซึ่งผู้ทดลองต้องเลือกปัจจัยที่จะนำมาทำการทดลอง กำหนดช่วงและกำหนดระดับ ที่จะเกิดขึ้นในการทดลอง ต้องพิจารณาด้วยว่าจะควบคุมปัจจัยเหล่านี้ และวัดผลตอบได้อย่างไร และปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้ให้ใช้หลักการสุ่ม ดังนั้นจะต้องมีความรู้เกี่ยวกับกระบวนการอย่างมาก

7.2.5 เลือกรูปแบบวิธีการออกแบบการทดลองที่เหมาะสม

ในขั้นตอนแรกของการวางแผนการทดลอง ผู้ทดลองต้องกำหนดวัตถุประสงค์ในการทดลองให้ชัดเจน เพื่อผู้ทดลองจะเลือกวิธีการออกแบบการทดลองและวิธีการทำการทดลองให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์และได้ผลการทดลองที่ถูกต้องแม่นยำ

7.2.6 ทำการทดลอง

ควรคำนึงถึงหลักการสำคัญในการทดลอง ได้แก่ การทดลองซ้ำ การสุ่ม และการบล็อก ความยากง่ายในการเปลี่ยนระดับการทดลองของแต่ละปัจจัย และพิจารณาเงื่อนไขในการทดลอง ในระหว่างการทดลองควรมีการเฝ้าระวังกระบวนการ เพื่อให้แน่ใจว่าสามารถกำหนดค่าของตัวแปรในการทดลองตามระดับที่กำหนดและวางแผนไว้

7.2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติช่วยให้การสรุปผลที่ได้เหมาะสมกับสาเหตุและผล โดยนำทฤษฎีทางวิชาการมาประยุกต์มากกว่าการสรุปผลเชิงพรรณนา โดยวิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่ใช้ ได้แก่ ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ตารางวิเคราะห์แบบ T-Test นอกจากนี้ควรใช้วิธีวิเคราะห์และนำเสนอข้อมูลโดยกราฟ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ทำให้ผู้วิเคราะห์เห็นภาพ เข้าใจผลและข้อสรุปจากการทดลองได้ง่ายขึ้น เช่น กราฟปกติของผลกระทบและส่วนค้าง

7.2.8 วิเคราะห์ส่วนค้าง เพื่อตรวจสอบความพอเพียงของแบบจำลอง

ก่อนนำไปประยุกต์ใช้ ควรทำการทดลองยืนยันผลก่อนเพื่อตรวจสอบว่าผลการนำไปปฏิบัติงานในสภาวะจริงมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ทำนายจากแบบจำลองหรือไม่ ไม่ควรคาดหวังว่าค่าทั้งสองจะมีค่าเท่ากัน แต่ในความจริงจะมีความแตกต่างกันซึ่งเรียกว่า ค่าส่วนค้าง (Residuals) โดยกำหนดให้มีค่าเท่ากับผลต่างระหว่างค่าจากการทดลองกับค่าทำนายจากการจำลอง โดยค่าทำนายจะขึ้นกับสมรรถนะของแบบจำลองความสัมพันธ์ โดยแบบจำลองดังกล่าวจะรวมเฉพาะเทอมที่มีนัยสำคัญเท่านั้นและสร้างมาจากข้อมูลจากการทดลอง

7.2.9 การสรุปและข้อเสนอแนะ

หลังจากที่วิเคราะห์ผลการทดลองแล้ว ผู้ทดลองต้องหาข้อสรุปจากผลการวิเคราะห์ และให้ข้อแนะนำที่เหมาะสมสำหรับการปฏิบัติต่อไป

7.2.10 การทำการทดลองยืนยันผล

โดยในการทำการทดลองยืนยันผลควรทำการทดลองซ้ำประมาณ 3-5 ครั้ง และไม่ควรคาดหวังว่าจะมีค่าเท่ากัน ตรวจสอบความถูกต้องโดยเปรียบเทียบช่วงความเชื่อมั่นหรือทดสอบสมมติฐานระหว่างค่าเฉลี่ยจากการทดลองกับค่าทำนาย

7.3 การสำรวจข้อมูลเบื้องต้นและการทดสอบสมมติฐานทางสถิติ

สถิติเป็นศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรวบรวมข้อมูล การนำเสนอข้อมูล และการวิเคราะห์ข้อมูลอย่างเป็นระบบ โดยทั่วไปค่าสถิติ (Statistics) จะเป็นเครื่องมือช่วยอธิบายลักษณะต่างๆ ของข้อมูล ค่าสถิติที่นิยมใช้ในการประมาณลักษณะที่แท้จริงของระบบที่สนใจนั้น จัดแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ (ประไพศรีและพงศ์ชนัน, 2551)

7.3.1 ค่าแนวโน้มสู่ศูนย์กลางของข้อมูล (Central Tendency)

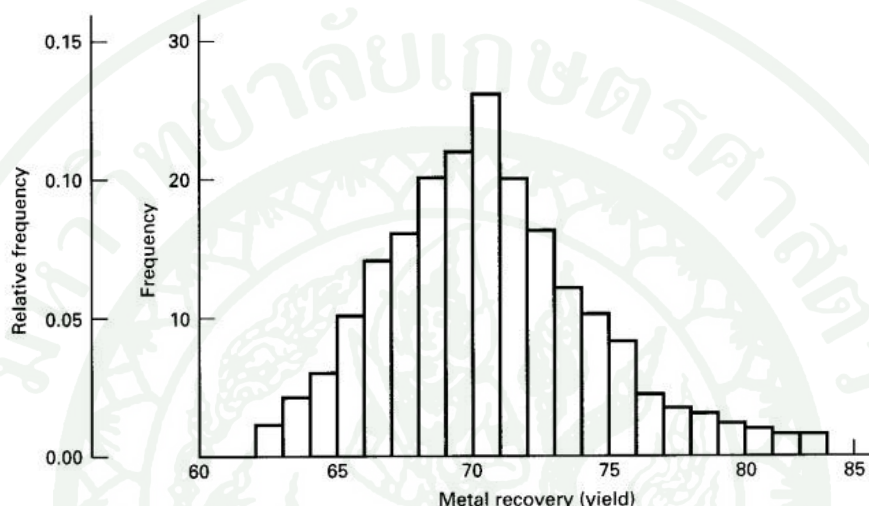
ค่าแนวโน้มสู่ศูนย์กลางของข้อมูลหรือค่าที่ใช้ชี้บ่งตำแหน่งหรือเป็นตัวแทนตำแหน่งของกระบวนการ ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (Mean or Arithmetic mean) ค่ามัธยฐาน (Medium) และค่าฐานนิยม (Mode)

7.3.2 ค่าการกระจาย (Dispersion)

ค่าการกระจายหรือค่าการเปลี่ยนแปลง (Variability) ในระบบ ได้แก่ ค่าพิสัย (Range) ค่าพิสัยควอไทล์ (Inter-quartile range) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error)

การใช้ค่าสถิติในแต่ละกลุ่มจำเป็นต้องทราบข้อจำกัดของค่าสถิติแต่ละค่า และวัตถุประสงค์ในการเก็บรวบรวมข้อมูลเพื่อที่จะได้ทำการวิเคราะห์และสรุปผลได้อย่างถูกต้อง วิธีการที่ใช้ในการเปรียบเทียบข้อมูลจากการทดลองอย่างง่าย (Simple comparative experiments) แบ่งออกเป็น 3 วิธี คือ

ก. การสำรวจข้อมูลเบื้องต้น (Exploratory data analysis) ซึ่งสามารถทำได้ด้วยการวิเคราะห์กราฟหรือตาราง โดยกราฟที่นิยมใช้ได้แก่ แผนภาพจุด (Dot diagram) ฮิสโตแกรม (Histogram) แผนภูมิก้านใบ (Stem and leaf diagram) และแผนภาพกล่อง (Box plot) เป็นต้น โดยตัวอย่างของกราฟฮิสโตแกรม จะแสดงดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 ฮิสโตแกรมแสดงค่า Metal recovery yield

ที่มา: Montgomery (2005)

ข. การทดสอบสมมติฐาน (Hypothesis testing) เป็นวิธีการทดสอบเพื่อหาข้อสรุปทางสถิติเกี่ยวกับค่าพารามิเตอร์ของระบบ เป็นพื้นฐานการอนุมานทางสถิติ การหาข้อสรุปมักจะอิงและเน้นในค่าสถิติหลักทั้งสองกลุ่ม คือ ค่าเฉลี่ยและค่าความแปรปรวน เนื่องจากแปรผันตรงกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งเป็นค่าที่ใช้อธิบายการกระจายของข้อมูลหรือความแตกต่างภายในระบบ โดยจะแบ่งข้อสมมติเป็นสองส่วนเรียกว่า สมมติฐานหลัก (Null hypothesis; H_0) และสมมติฐานอื่นหรือสมมติฐานรอง (Alternate hypothesis; H_A) ตัวอย่างของการสมมติฐานทางสถิติ เช่น

$$\text{สมมติฐานหลัก } H_0 : \theta \leq \theta_0 \quad (1)$$

$$\text{สมมติฐานรอง } H_A : \theta > \theta_0 \quad (2)$$

โดยที่ θ คือ พารามิเตอร์ของประชากร เช่น ค่าเฉลี่ย (μ) หรือ ความแปรปรวน (σ^2)

θ_0 คือ ค่าคงที่ที่ต้องการทดสอบ

ก. การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) เป็นวิธีการทดสอบเพื่อหาข้อสรุปทางสถิติเกี่ยวกับค่าเฉลี่ยของระบบในกรณีศึกษาเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างตั้งแต่สองกลุ่มขึ้นไป โดยมีพื้นฐานมาจากการวิเคราะห์ที่มาของสาเหตุหรือแหล่งที่ก่อให้เกิดความแตกต่างของค่าตอบสนอง (Responses) หรือค่าผลลัพธ์ลักษณะทางคุณภาพที่ต้องการควบคุม ซึ่งการวิเคราะห์ความแปรปรวนนี้เป็นวิธีหลักที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการออกแบบการทดลอง โดยจะอธิบายเพิ่มเติมในหัวข้อต่อไป

7.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance)

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) คือ การทดสอบสมมติฐานสำหรับข้อมูลที่ประกอบด้วยตัวแปรอิสระหรือตัวแปรต้นหลายตัวแปร กับตัวแปรตามเพียงตัวเดียว (Montgomery, 2005) การวิเคราะห์ความแปรปรวนมีจุดประสงค์เพื่อแยกแยะแหล่งของความแปรปรวนที่เกิดขึ้นทั้งหมดในการทดลอง ขั้นตอนในการวิเคราะห์ความแปรปรวนมีดังต่อไปนี้ (Montgomery, 2005)

- กำหนดสมมติฐานหลัก (H_0) และสมมติฐานรอง (H_A)
- กำหนดระดับนัยสำคัญ (α) เช่น 0.01 0.05 หรือ 0.1 เป็นต้น โดยจะขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของแต่ละงานวิจัย
- คำนวณค่าสถิติจากสูตรที่กำหนดไว้ และเปิดตารางค่าสถิติเพื่อหาค่าวิกฤติของระดับนัยสำคัญที่กำหนดไว้
- สร้างเขตการปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0) ที่ตรงข้ามกับสมมติฐานหลัก

- เปรียบเทียบค่าสถิติที่คำนวณได้กับค่าวิกฤติที่ได้จากการเปิดตาราง ถ้าค่าสถิติที่คำนวณได้มีค่ามากกว่าค่าวิกฤติที่ได้จากการเปิดตาราง ดังนั้นจะปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0) แล้วยอมรับสมมติฐานรอง (H_A) และสรุปผลที่ได้

นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนยังมีข้อกำหนดเบื้องต้นคือ กลุ่มตัวอย่างต้องมีการแจกแจงแบบปกติ มีความเป็นอิสระจากกัน และมีค่าความแปรปรวนที่เท่ากัน โดยมีการทดสอบดังต่อไปนี้

ก. การทดสอบว่ากลุ่มตัวอย่างมีการแจกแจงปกติหรือไม่ โดยการทดสอบด้วยวิธีของ Ryan-Joiner (RJ) (Ryan and Joiner, 1976) ซึ่งกราฟการแจกแจงของกลุ่มตัวอย่างเป็นการพล็อตกราฟระหว่างค่าผลตอบของการทดสอบกับค่า p_i โดยวิธีการทดสอบสามารถคำนวณจากสูตร ดังแสดงในสมการที่ (3) และ (4)

$$P_i = \frac{\left(i - \frac{3}{8}\right)}{\left(n + \frac{1}{4}\right)} \times 100 \quad (3)$$

$$R_p = \frac{\sum Y_i b_i}{\sqrt{\sum (Y_i - \bar{Y})^2 \sum b_i^2}} \quad (4)$$

โดยที่ P_i คือ Probability ของข้อมูลลำดับที่ i ในกลุ่มตัวอย่าง

i คือ ลำดับตัวอย่าง

n คือ จำนวนตัวอย่าง

R_p คือ Correlation coefficient

B_i คือ Pith percentage point of the standard normal distribution

Y_i คือ ค่าผลตอบสนองของแต่ละตัวอย่าง

$\bar{Y}$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลตอบสนอง

และค่า b_i สามารถคำนวณได้ดังแสดงในสมการที่ (5)

$$b_i \approx 4.91[p_i^{0.14} - (1-p_i)^{0.14}] \quad (5)$$

เมื่อได้กราฟการแจกแจงแล้วจะพิจารณาว่ากราฟดังกล่าวเป็นการแจกแจงแบบปกติหรือไม่โดยการพิจารณาจากค่า R_p เปรียบเทียบกับค่าวิกฤติ (Critical values) ที่ได้จากสูตรคำนวณดังแสดงในสมการที่ (6) (7) และ (8) เมื่อกำหนดระดับนัยสำคัญ (α) ได้แก่ 0.01 0.05 และ 0.10 ตามลำดับ และแสดงตัวอย่างค่าวิกฤติตามจำนวนของการทดลองดังแสดงในตารางที่ 10

$$cv(n) \approx 0.9963 - \frac{0.0211}{\sqrt{n}} - \frac{1.4106}{n} + \frac{3.1791}{n^2} \quad (6)$$

$$cv(n) \approx 1.0063 - \frac{0.1288}{\sqrt{n}} - \frac{0.6118}{n} + \frac{1.3505}{n^2} \quad (7)$$

$$cv(n) \approx 1.0071 - \frac{0.1371}{\sqrt{n}} - \frac{0.3682}{n} + \frac{0.7780}{n^2} \quad (8)$$

โดยที่ cv คือ Critical values

n คือ จำนวนการทดลอง

ตารางที่ 10 ค่าประมาณของค่าวิกฤติสำหรับค่า R_p

จำนวนการทดลอง	$\alpha=0.01$	$\alpha=0.05$	$\alpha=0.10$
4	0.8318	0.8734	0.8951
5	0.8320	0.8804	0.9033
10	0.8804	0.9180	0.9347
15	0.9110	0.9383	0.9506
20	0.9290	0.9503	0.9600
25	0.9408	0.9582	0.9662
30	0.9490	0.9639	0.9707

ดังนั้นหากต้องการสรุปว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติหรือไม่ ทำได้โดยการเปรียบเทียบค่าดังนี้

ถ้าค่า $R_p > cv(n)$ ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ

ถ้าค่า $R_p < cv(n)$ ข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ

นอกจากนี้ยังสามารถพล็อตกราฟฮิสโตแกรมเพื่อดูการแจกแจงของข้อมูลว่ามีการแจกแจงแบบปกติหรือไม่ โดยการพล็อตกราฟระหว่างค่าผลตอบของการทดลองกับค่าความถี่ของผลตอบ

ข. กลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่มเป็นอิสระต่อกัน โดยมีวิธีการทดสอบคือ Kruskal-Wallis (H-test) ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้ (Kruskal and Wallis, 1952)

- ตั้งสมมติฐานในการทดสอบ

H_0 : กลุ่มตัวอย่างทุกกลุ่มมีค่า Median เท่ากัน

H_A : กลุ่มตัวอย่างอย่างน้อย 1 กลุ่มมีค่า Median ไม่เท่ากัน

- คำนวณค่าทดสอบทางสถิติ (F_H) โดยการเรียงข้อมูลแต่ละตัวจากน้อยไปหามากและถือว่าเป็นข้อมูลชุดเดียวกัน จากนั้นหาผลรวมของข้อมูลและคำนวณค่า F_H โดยใช้สูตรดังแสดงในสมการที่ (9)

$$F_H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^K \left(\frac{T_i^2}{n_i} \right) - 3(N+1) \quad (9)$$

โดยที่ F_H คือ ค่าสถิติ F_H

T_i^2 คือ ผลรวมของผลตอบ n จำนวนในกลุ่มตัวอย่าง

n_i คือ จำนวนตัวอย่างกลุ่มที่ i

N คือ จำนวนตัวอย่าง

K คือ จำนวนกลุ่ม

- เปิดตารางเพื่อหาค่า χ^2 ที่ตำแหน่ง $\chi^2_{\alpha,df}$
- หาเขตปฏิเสธและสรุปผล โดยจะปฏิเสธ H_0 เมื่อค่า F_H ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่าค่า $\chi^2_{\alpha,df}$

ค. กลุ่มตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จะต้องมีความแปรปรวนเท่ากันทุกกลุ่ม (Variance homogeneity) $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2 = \sigma^2$ มีวิธีการทดสอบคือ Levene test (Gastwirth *et al.*, 2009)

- กำหนดสมมติฐานหลัก (H_0) และสมมติฐานรอง (H_A)

$$H_0 = \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2$$

$$H_A = \sigma_i^2 \neq \sigma_j^2 \text{ อย่างน้อย 1 คู่}$$

- คำนวณค่า F_w โดยใช้สูตรดังแสดงในสมการที่ (10)

$$F_w = \frac{N - k}{k - 1} \frac{\sum_{i=1}^k (\bar{Z}_i - \bar{Z})^2}{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} N_i (Z_{ij} - \bar{Z}_i)^2} \quad (10)$$

โดยที่ F_w คือ ค่าสถิติ F_w

T_i^2 คือ ผลรวมของผลตอบ n จำนวนในกลุ่มตัวอย่าง

n_i คือ จำนวนตัวอย่างกลุ่มที่ i

N คือ จำนวนตัวอย่าง

k คือ จำนวนกลุ่ม

และค่า Z_{ij} สามารถคำนวณได้ดังแสดงในสมการที่ (11)

$$Z_{ij} = |Y_{ij} - \bar{Y}_i| \quad (11)$$

โดยที่ Z_{ij} คือ ค่าผลต่างระหว่างค่าผลตอบในข้อมูลลำดับที่ i ของกลุ่ม j

Y_{ij} คือ ค่าผลตอบในข้อมูลลำดับที่ i ของกลุ่ม j

$\bar{Y}_i$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลตอบในข้อมูลลำดับที่ i

- เปิดตารางค่าหาค่า $F_{\alpha, k-1, N-k}$
- สรุปผลการทดสอบ ถ้าค่า F_w ที่ได้มีค่ามากกว่าค่า $F_{\alpha, k-1, N-k}$ จะปฏิเสธ

สมมติฐานหลัก (H_0)

โดยจากการทดลองเพื่อศึกษาผลของปัจจัย 1 ปัจจัย จำนวน 3 ระดับขึ้นไป ประกอบด้วย ความแปรปรวนจาก 2 แหล่ง ได้แก่ (สรรรฐดิษฐ์, 2557)

7.4.1 ความแปรปรวนที่เกิดจากความผิดพลาดในการทดลอง

ความแปรปรวนที่เกิดจากความผิดพลาดในการทดลอง หรือความแปรปรวนที่เกิดขึ้นภายในกลุ่ม (Within Treatment Variance) คือความแปรปรวนภายในวิธีปฏิบัติ (Treatment) เดียวกันที่ทดลองมากกว่า 1 ครั้ง (ทดลองซ้ำ) โดยขนาดของความผันแปรที่เกิดขึ้นจะแสดงขนาดของความผิดพลาดที่เกิดขึ้นในกาทดลอง

7.4.2 ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นจากผลของปัจจัย

ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นจากผลของปัจจัยหรือความผันแปรที่เกิดขึ้นระหว่าง ทรีตเมนต์ (Variance Due to a Factor Between Treatment Variations) คือความแปรปรวนที่เกิดจากการปรับเปลี่ยนระดับของปัจจัยหรือวิธีปฏิบัติ หรือเกิดจากผลกระทบของปัจจัยที่ศึกษา

ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นจากทั้งสองแหล่งนั้น สามารถแสดงได้คงสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าตอบสนอง ปัจจัยและความผิดพลาด ตามรูปแบบการทดลองได้ดังนี้

$$Y_{ij\dots} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad (12)$$

$$= \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad (13)$$

$$= \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (14)$$

$$= \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \gamma_k + (\tau\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \quad (15)$$

โดยที่ μ	คือ ค่าเฉลี่ยรวม เท่ากับ $\frac{\sum \sum Y_{ij\dots}}{N}$ โดยที่ N คือ จำนวนครั้งที่ทดลอง
τ_i	คือ ผลกระทบจากปัจจัยที่ 1 ที่ระดับที่ i ; $i = 1, 2, \dots, a$
β_j	คือ ผลกระทบจากปัจจัยที่ 2 ที่ระดับที่ j ; $j = 1, 2, \dots, b$
γ_k	คือ ผลกระทบจากปัจจัยที่ 3 ที่ระดับที่ k ; $k = 1, 2, \dots, c$
$(\tau\beta)_{ij}$	คือ ผลกระทบร่วม (อันตรกิริยา; Interaction) ระหว่างปัจจัยที่ 1 ที่ระดับที่ i และปัจจัยที่ 2 ที่ระดับที่ j
$(\tau\gamma)_{ik}$	คือ ผลกระทบร่วม ระหว่างปัจจัยที่ 1 ที่ระดับที่ i และปัจจัยที่ 3 ที่ระดับที่ k
$(\beta\gamma)_{jk}$	คือ ผลกระทบร่วม ระหว่างปัจจัยที่ 2 ที่ระดับที่ j และปัจจัยที่ 3 ที่ระดับที่ k
$(\tau\beta\gamma)_{ijk}$	คือ ผลกระทบร่วม ระหว่างปัจจัยที่ 1 ที่ระดับที่ i ปัจจัยที่ 2 ที่ระดับที่ j และปัจจัยที่ 3 ที่ระดับที่ k
ε_{ijk}	คือ ความผิดพลาดหรือส่วนที่ยังคงอธิบายไม่ได้จากการทดลอง (Error หรือ Residuals)

จากสมการข้างต้น จะสามารถแบ่งการวิเคราะห์ความแปรปรวนออกเป็น 3 แบบคือ การออกแบบอย่างสมบูรณ์หรือการจำแนกทางเดียว (Complete randomized design; CRD หรือ One-Way ANOVA) เป็นการออกแบบการทดลองที่ผู้ทดลองทราบว่าปัจจัยที่กล่าวว่าจะมีผลเพียงหนึ่ง

ปัจจัย ศึกษาทั้งหมด a ระดับ หรือ a ค่าที่แตกต่างกัน สามารถแสดงได้ดังสมการที่ 12 การออกแบบกลุ่มอย่างสมบูรณ์ในแต่ละกลุ่มหรือการจำแนกสองทาง (Complete randomized block design; RBD หรือ Two-Way ANOVA) เป็นการออกแบบการทดลองที่ผู้ทดลองมีปัจจัยศึกษาสองปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยวิธีปฏิบัติและปัจจัยกลุ่ม สามารถแสดงได้ดังสมการที่ 13 และการออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล (Factorial experiment) เป็นการออกแบบการทดลองกรณีที่มีหลายปัจจัย (มากกว่า 2 ปัจจัย) และสนใจศึกษาผลกระทบร่วมหรืออันตรกิริยา สามารถแสดงได้ดังสมการที่ 14 (กรณีศึกษา 2 ปัจจัย) และสมการที่ 15 (กรณีศึกษา 3 ปัจจัย) โดยจะกล่าวถึงการออกแบบอย่างสมบูรณ์หรือการจำแนกทางเดียว

7.4.3 การออกแบบอย่างสมบูรณ์หรือการจำแนกทางเดียว (Complete randomized design; CRD หรือ One-Way ANOVA)

ในกรณีนี้เป็นการสนใจศึกษาปัจจัยเพียงปัจจัยเดียว ซึ่งจำนวนระดับที่สนใจศึกษาของปัจจัยนี้เท่ากับ a ระดับ เพื่อดูว่าระดับที่แตกต่างกันของปัจจัยนั้นจะมีผลกระทบต่อค่าเฉลี่ยของตัวแปรตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่อย่างไร และในการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองแบบ CRD นี้จะทำการวิเคราะห์ส่วนของความแปรปรวนได้จากสมการต้นแบบ คือ

$$Y_{ij...} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij} \quad (16)$$

$$(Y_{ij} - \mu) = \tau_i + \epsilon_{ij} \quad (17)$$

$$v(Y_{ij} - \mu) = v(\tau_i) + v(\epsilon_{ij}) \quad (18)$$

$$\text{จาก} \quad \sum_i^a \sum_j^n (y_{ij} - \bar{y}_{..})^2 = \sum_i^a \left[n_i (\bar{y}_i - \bar{y}_{..})^2 \right] + \sum_i^a \sum_j^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad (19)$$

ความแปรปรวนทั้งหมดที่ปรับแล้วด้วยค่าเฉลี่ย = ความแปรปรวนจากปัจจัย + ความแปรปรวนจากค่าผิดพลาด จะเห็นได้ว่าแหล่งที่มาของความแปรปรวนแบ่งได้เป็น 2 ส่วน และสารเขียนแทนด้วยสมการ

$$SST = SSA + SSE \quad (20)$$

โดยที่ SST คือ ผลบวกกำลังสองของทั้งหมดที่ปรับแล้ว (Sum square of total)

SSA คือ ผลบวกกำลังสองของปัจจัย A หรือ วิธีปฏิบัติ (Sum square of factor A effect or treatment)

SSE คือ ผลบวกกำลังสองของค่าผิดพลาดหรือสิ่งที่อธิบายไม่ได้ (Sum square error or residuals)

สามารถสรุปและนำไปเขียนตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของการจำแนกทางเดียวได้ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนกรณีจำแนกทางเดียว

แหล่งที่มา (Source)	องศาเสรี (Degree of freedom)	ผลบวกกำลังสอง (Sum square)	ค่าเฉลี่ย SS (Mean square)	ค่าสถิติ (F)
วิธีปฏิบัติ (Treatment)	a - 1	SSA	$MSE = \frac{SSA}{a-1}$	$F = \frac{MSA}{MSE}$
ความผิดพลาด (Error)	N - a	$SSE = SST - SSA$	$MSE = \frac{SSE}{N-a}$	
ทั้งหมดที่ปรับแล้ว (Total adjust)	N - 1	SST		

ที่มา: ประไพศรี และ พงษ์ชนัน (2551)

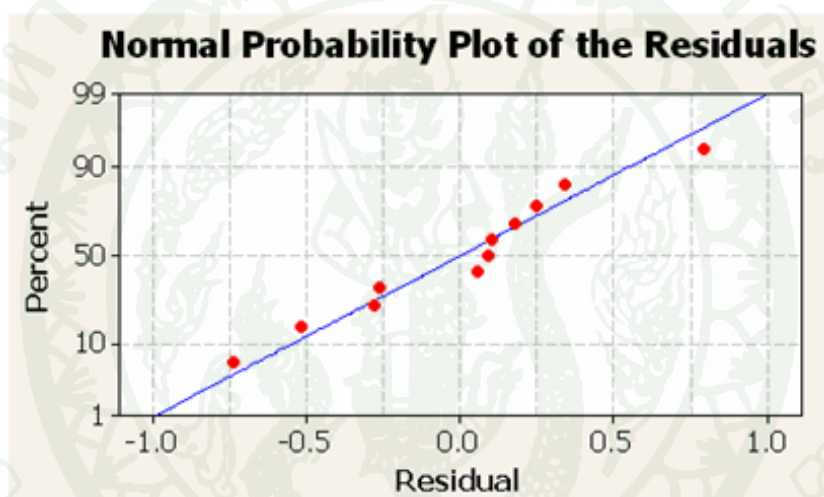
7.4.4 ข้อสมมติที่สำคัญในการวิเคราะห์ความแปรปรวน

การวิเคราะห์ความแปรปรวนจะสามารถทำได้และรูปแบบสมการตัวแบบจะเหมาะสมเมื่อข้อสมมติทั้ง 4 ข้อนี้เป็นจริง

ก. ข้อมูลหรือค่าผิดพลาด (E) มีการแจกแจงปกติ

- ข. ค่าเฉลี่ยของค่าผิดพลาดมีค่าเท่ากับศูนย์ $E(\varepsilon_{ij})=0$
- ค. ความแปรปรวนของค่าความผิดพลาดคงที่ $V(\varepsilon_{ij})=\sigma^2$
- ง. ค่าความผิดพลาดเป็นอิสระต่อกัน $Cov(\varepsilon_i, \varepsilon_j)=0$

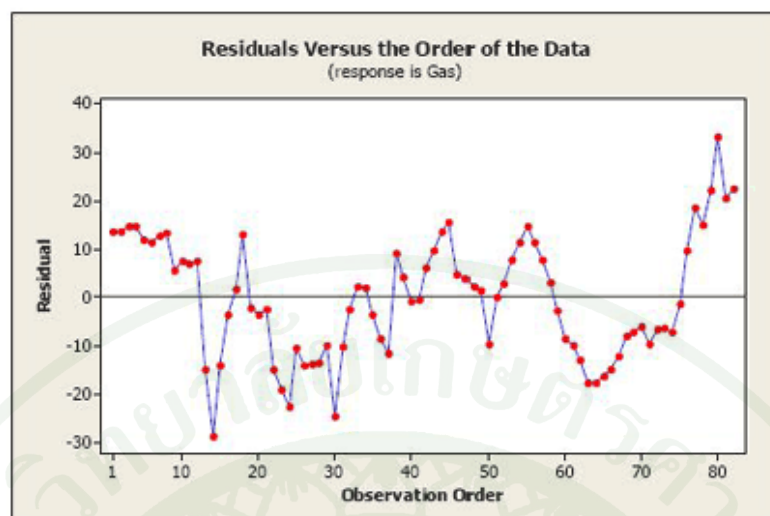
ซึ่งสามารถตรวจสอบความถูกต้องของสมมติฐานได้โดยใช้เครื่องมือดังนี้ คือ กรณิ
ตรวจสอบข้อสมมติที่ ก. ใช้กราฟความน่าจะเป็นของการแจกแจงปกติ (Normal probability plot)
ถ้ากราฟมีแนวโน้มเป็นเส้นตรง สามารถสรุปได้ว่า ค่าผิดพลาดมีการแจกแจงปกติ ตามแสดงดัง
ภาพที่ 12



ภาพที่ 12 กราฟปกติของส่วนค้างจากการทดลอง

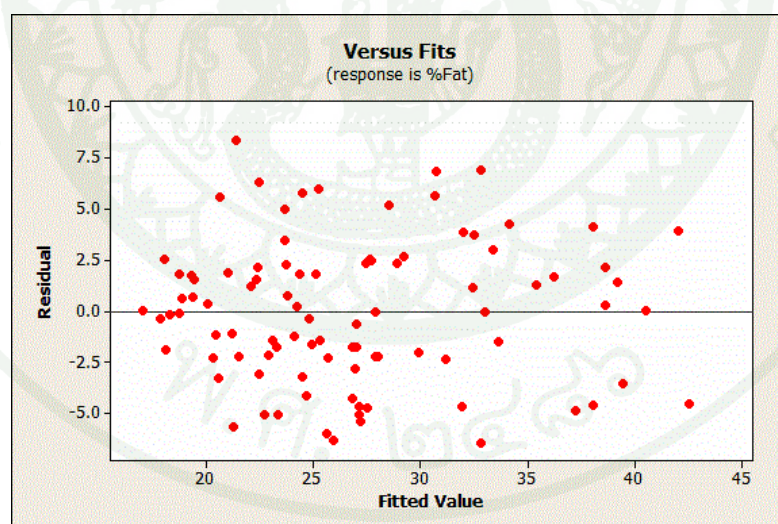
ที่มา: Calidad (2012)

ส่วนกรณีตรวจสอบข้อสมมติที่ ข. ค. และง. จะใช้กราฟของค่าส่วนค้าง (Residuals plot)
โดยในการตรวจสอบข้อสมมติทั้ง 3 จะผ่าน เมื่อกราฟระหว่างขนาดของส่วนค้างกับลำดับในการ
ทดลองไม่มีรูปแบบที่คาดเดาได้ แสดงถึงความเป็นอิสระของข้อมูลต่อกัน แสดงดังภาพที่ 13 และ
เมื่อพิจารณากราฟของส่วนค้างกับค่าทำนายจากแบบจำลอง ควรมีการกระจายตัวแบบสุ่มและไม่มี
รูปแบบใดใด แสดงดังภาพที่ 14



ภาพที่ 13 กราฟส่วนค้างกับลำดับการทดลอง

ที่มา: The Pennsylvania State University (2014)



ภาพที่ 14 กราฟส่วนค้างกับค่าทำนายผลการทดลอง

ที่มา: Frost (2012)

7.5 การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis)

การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น เป็นการศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างตัวแปรปัจจัยหรือตัวแปรอิสระ (Factor or Independent variables; X's) กับค่าตอบสนองหรือตัวแปรตาม (Response or Dependent variable; Y) ว่ามีความสัมพันธ์กันในลักษณะใด เพื่อประโยชน์ในด้านการพยากรณ์ค่าตัวแปรตาม (ค่าตอบสนองหรือลักษณะทางคุณภาพที่สนใจ) ซึ่งในทางวิศวกรรมจะนำไปใช้เพื่อการวางแผนกระบวนการผลิต ปรับปรุงกระบวนการผลิต และกำหนดค่าตัวปัจจัยเพื่อให้ค่าตอบสนองที่ดีที่สุด

สำหรับการวิเคราะห์การถดถอยจะออกมาในรูปสมการพยากรณ์ ดังแสดงตามสมการที่ 12 เพื่อพยากรณ์ค่าในอนาคต

$$\hat{Y}=f(x) \quad (21)$$

รูปแบบของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น แบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ ขึ้นกับจำนวนตัวแปรอิสระ ดังนี้

7.5.1 การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (Simple linear regression analysis)

คือการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระเพียง 1 ตัวกับตัวแปรตาม 1 ตัว โดยกำหนดรูปแบบความสัมพันธ์ตัวแบบจากกราฟแผนภาพการกระจาย ตัวอย่างลักษณะความสัมพันธ์อาจกำหนดได้ในรูปต่อไปนี้

ก. สมการเส้นตรงเต็มรูป

$$Y=\beta_0+\beta_1X+\varepsilon \quad (22)$$

ข. สมการเส้นตรงผ่านจุดกำเนิด

$$Y=\beta_1X+\varepsilon \quad (23)$$

ค. สมการโพลิโนเมียลดีกรีสอง (Quadratic model)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + \varepsilon \quad (24)$$

ง. สมการโพลิโนเมียลดีกรีสาม (Cubic model)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + \beta_3 X^3 + \varepsilon \quad (25)$$

7.5.2 การวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุ (Multiple regression analysis)

คือการศึกษความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไปกับตัวแปรตาม 1 ตัว โดยกำหนดรูปแบบความสัมพันธ์ตัวแบบจากกราฟแผนภาพการกระจายหรือแผนภาพเมตริกซ์ ตัวอย่างความสัมพันธ์อาจกำหนดได้ดังนี้

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon \quad (26)$$

หรือ

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_1 X_1^2 + \beta_2 X_2^2 + \varepsilon \quad (27)$$

7.5.3 การทดสอบความเหมาะสมของสมการต้นแบบ (Model adequacy checking)

ก่อนจะนำสมการที่ได้ไปใช้พยากรณ์จำเป็นต้องทำการทดสอบความเหมาะสมของสมการ โดยจะมีวิธีที่นิยมใช้ 2 วิธี ดังต่อไปนี้

ก. การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination; R^2)

เป็นค่าที่ใช้อธิบายความสามารถของสมการถดถอยหรือตัวแปรอิสระในสมการถดถอยว่าสามารถจะอธิบายการเปลี่ยนแปลงของค่าตองสนองหรือตัวแปรตามได้ในสัดส่วนเท่าใด ดังนั้นค่า R^2 ยิ่งมากสมการก็ยิ่งมีความเหมาะสมมาก โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์ความแปรปรวน และสามารถเขียนได้ตามสมการที่ 19 ดังนี้

$$R^2 = \frac{(SST - SSE)}{SST} \quad (28)$$

ในทางปฏิบัติ เนื่องจากค่า R^2 มีความไวในการเปลี่ยนแปลง คือ เมื่อเพิ่มจำนวนตัวแปรอิสระในสมการ ค่า R^2 จะมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ จึงใช้ค่า R^2 ที่ทำการปรับค่าแล้ว คือ R^2_{adj} แทน จะสามารถเขียนได้ตามสมการที่ ดังนี้

$$R^2_{adj} = 1 - \frac{MSE}{MST} \quad (29)$$

$$MST = \frac{SST}{n-1} \quad (30)$$

ข. การทดสอบการขาดความเหมาะสมของสมการ (Lack-of-Fit test)

การทดสอบความเหมาะสมของสมการ จะทำขึ้นเฉพาะกรณีที่มีการเก็บข้อมูลค่า x ซ้ำ แต่ผลลัพธ์ของค่า y ที่ได้ต่างกัน มักจะเป็นข้อมูลที่ได้จากการออกแบบการทดลอง เนื่องจากต้องทำการเก็บค่าซ้ำ (ทำการทดลองซ้ำ) สามารถเขียนได้ตามสมการต่อไปนี้

$$SS_{LOF} = SSE - SS_{PE} \quad (31)$$

$$SS_{PE} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad (32)$$

โดยที่ SS_{LOF} คือ ผลบวกกำลังสองที่เกิดจากการขาดความเหมาะสมของสมการ (Sum square Lack-of-Fit)

SS_{PE} คือ ผลบวกกำลังสองของข้อผิดพลาดจริง (Sum square pure error)

n_i คือ ขนาดตัวอย่างของ y ในกลุ่มที่เกิดค่า x ซ้ำ กลุ่มที่ i

จากสมการที่ใช้ในการทดสอบความเหมาะสมของสมการข้างต้น จะสามารถสรุปเป็นตารางได้ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ตารางทดสอบความเหมาะสมของสมการต้นแบบ

แหล่งที่มา (Source)	Degree of freedom (d.f.)	SS	MS = $\frac{SS}{d.f.}$	F
Regression	p	SS_{Regr}	MS_{Regr}	$F_1 = \frac{MS_{Regr}}{MSE}$
Error	n - p	SSE	$MSE = S^2$	
Lack-of-Fit		SS_{LOF}	MS_{LOF}	$F_2 = \frac{MS_{LOF}}{MS_{PE}}$
PE	$\sum (n_i - 1)$	SS_{PE}	MS_{PE}	
Total (adj)	n - 1	$SST = S_{yy}$		

ที่มา: ประไพศรีและพงศ์ชนัน (2551)

7.6 การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology)

วิธีการหาพื้นผิวตอบสนอง เป็นวิธีการที่ใช้ในการสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (Optimal condition) ของระบบหรือกระบวนการทดลอง โดยอาศัยการสร้างแบบจำลอง (Mathematical model) และการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีอยู่ ผลตอบสนองของปัญหาเป็นความสัมพันธ์หรือฟังก์ชันของหลายปัจจัยหรือตัวแปรอิสระ โดยมีเป้าหมายเพื่อหาระดับของปัจจัยต่างๆ ที่ทำให้ผลตอบสนองมีค่าเหมาะสมที่สุด ซึ่งโดยปกติจะหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการทดลองซึ่งทำให้ค่าเฉลี่ยของผลตอบสนองมีค่าเหมาะสมที่สุด ซึ่งสภาวะที่หาได้นั้นจะเหมาะสมกับกรณีที่มีความแปรปรวนของผลตอบสนองมีค่าน้อยและคงที่ เช่น ผลตอบสนอง Y เป็นฟังก์ชันของปัจจัย X_1 และ X_2 ดังนั้นจะสามารถเขียนในรูปสมการได้ดังนี้

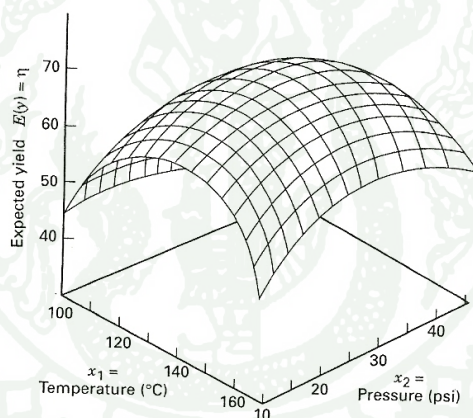
$$Y = f(x_1, x_2) + \epsilon \quad (33)$$

โดยที่ ε คือ สิ่งรบกวน (Error) ที่เกิดขึ้นในการทดลองและมีผลกระทบต่อผลตอบสนอง Y

ถ้ากำหนดให้ $E(Y) = f(x_1, x_2) = \eta$ คือ ค่าคาดหวังของผลตอบสนอง Y
 ดังนั้น สามารถเขียนสมการของพื้นผิวสำหรับระบบที่มีจำนวน 2 ปัจจัย ได้ดังนี้

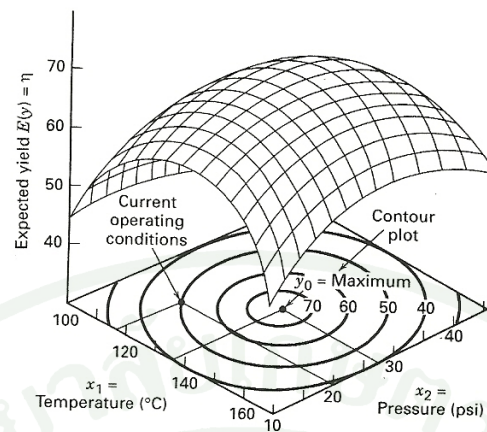
$$\eta = f(x_1, x_2) \quad (34)$$

พื้นผิวตอบสนองจะสามารถแสดงได้ดังภาพที่ 15 โดยเป็นการพล็อตระหว่าง η กับแต่ละระดับของปัจจัย X_1 และ X_2 และจะพล็อตเส้นระดับ (Contour) ของพื้นผิวตอบสนองดังภาพที่ 16 โดยเส้นระดับที่มีค่าของผลตอบสนองคงที่จะถูกพล็อตลงในระนาบ $X_1 - X_2$ โดยแต่ละเส้นระดับจะสอดคล้องกับความสูงของพื้นผิวตอบสนอง



ภาพที่ 15 พื้นผิวผลตอบสนองในรูปแบบของกราฟ 3 มิติ

ที่มา: ณรงค์ชัย (2549)



ภาพที่ 16 กราฟเส้นโครงร่างของพื้นผิวผลตอบแทน

ที่มา: ณรงค์ชัย (2549)

ในปัญหาเกี่ยวกับพื้นผิวผลตอบแทน มักจะไม่ทราบรูปแบบของความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบแทนกับปัจจัยต่างๆ ดังนั้นขั้นตอนแรกในการหาพื้นผิวผลตอบแทนคือ การประมาณความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบแทนกับปัจจัยต่างๆ โดยทั่วไปจะใช้รูปแบบของสมการลำดับที่ 1 (First order model) ในการประมาณความสัมพันธ์โดยมีรูปแบบคือ

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \epsilon \quad (35)$$

แต่ในกรณีพื้นผิวมีความโค้ง (Curvature) จะทำการประมาณโดยใช้รูปแบบของสมการลำดับที่ 2 โดยมีรูปแบบคือ

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \quad (36)$$

7.7 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box–Behnken

การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box–Behnken เป็นการออกแบบสามระดับ สำหรับพิตพื้นที่การตอบสนอง (Response surface) การออกแบบแบบนี้ถูกสร้างขึ้นจากการรวมการออกแบบแฟกทอเรียล 2^k กับการออกแบบบล็อกไม่บริบูรณ์ ผลของการออกแบบมีประสิทธิภาพมากในด้านจำนวนของการทดลองที่ต้องการมีจำนวนน้อยและมีคุณสมบัติด้านการหมุน (Rotatability) หรือใกล้เคียงการหมุน (Near Rotatability) ในการออกแบบการทดลองตามวิธี Box–Behnken นั้น Box และ Behnken (1960) ได้มีตารางสำหรับแผนการทดลองเพื่อใช้กับปัจจัยสูงสุดไม่เกิน 16 ปัจจัย (ไม่รวมกรณี $k=8$) ดังตารางที่ 13 แสดงให้เห็นถึงการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box–Behnken ที่มีตัวแปร 3 ตัว รูปทรงเรขาคณิตของการออกแบบแสดงดังภาพที่ 17 พบว่า การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box–Behnken เป็นการออกแบบรูปทรงกลม ที่จุดวางอยู่บนวงกลมรัศมี 2 นอกจากนี้ การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box–Behnken ไม่ได้รวมเอาจุดใดๆ ที่เป็นจุดยอดของรูปลูกบาศก์ที่สร้างขึ้นจากขีดจำกัดบนและล่างของแต่ละตัวแปรเอาไว้ การกระทำเช่นนี้เป็นประโยชน์อย่างมากเมื่อจุดที่อยู่บนมุมของลูกบาศก์ คือการรวมของปัจจัยระดับ (Factor-Level Combination) ที่แพงมากหรือเป็นไปได้ที่จะทำการทดลองเนื่องจากข้อจำกัดในด้านกายภาพของกระบวนการ

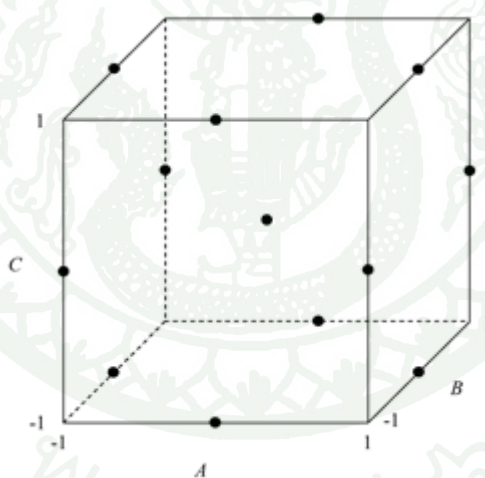
ตารางที่ 13 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box–Behnken แบบ 3 ตัวแปร

การทดลอง	ปัจจัยการทดลอง		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1

ตารางที่ 13 (ต่อ)

การทดลอง	ปัจจัยการทดลอง		
	X_1	X_2	X_3
10	0	-1	1
11	0	1	-1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

ที่มา: ประไพศรีและพงศ์ชนัน (2551)



ภาพที่ 17 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken แบบ 3 ตัวแปร

ที่มา: ประไพศรีและพงศ์ชนัน (2551)

การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken สามารถทำให้ศึกษาผลกระทบเชิงเส้น (Linear effects) ผลกระทบในเชิงเส้นกำลังสอง (Quadratic effects) และอันตรกิริยาหรือผลกระทบร่วม 2 ปัจจัย (2-Factor inter-actions) แต่มีข้อเสีย คือ จำนวนครั้งที่ทดลอง (Number of runs) มีค่า

มากและไม่สามารถที่จะลดได้ ไม่ว่าผู้ศึกษาจะสนใจผลกระทบที่เกินกว่าผลกระทบเชิงเส้นหรือไม่ การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken สามารถประมวลผลกระทบในรูปโพลีโนเมียลกำลังสอง และผลกระทบร่วมสองปัจจัยได้เสมอ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Wayman *et al.* (1983) ได้ทำการศึกษาการผลิตไขมันและน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 ทำการศึกษาผลของแหล่งของสารไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Arthrobacter* AK19 ระหว่าง 0.1 มิลลิโมล - 0.1 โมล ด้วยอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสความเข้มข้น 0.2 โมล และใช้แหล่งของสารไนโตรเจน 3 ชนิด คือ โพแทสเซียมไนเตรด (KNO_3) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และแอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) ในขบวนการหมักขนาด 250 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน และด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที พบว่าที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนทั้งสามแหล่งระหว่าง 5 - 7.5 มิลลิโมล มีปริมาณไขมันเกิดขึ้นมากที่สุดประมาณ 70 - 105 มิลลิกรัมต่อลิตร และการเติบโตของเซลล์ที่ 7.5 มิลลิโมล และ 5 มิลลิโมล มีค่าประมาณ 3.3 - 3.5 กรัมต่อลิตร และ 2.7 กรัมต่อลิตร

Hassan *et al.* (1995) ได้ทำการศึกษาผลของการจำกัดไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) และเหล็กคือ เฟอรัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ที่ใช้เป็นแหล่งอาหารให้จุลินทรีย์ *Cryptococcus curvatus* ในการหมักแบบกะและแบบกึ่งกะ โดยการหมักแบบกะภายใต้สภาวะการทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 5.5 ปริมาตร 1.8 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการขาดธาตุเหล็กจะไม่มีผลชัดเจนต่อการผลิตไขมันและองค์ประกอบของไขมัน โดยจะได้ปริมาณของกรดไขมันสเตียริกร้อยละ 14 แต่เมื่อทำการหมักแบบกึ่งกะภายใต้สภาวะการทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 5.5 ปริมาตรเริ่มต้น 1.2 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะพบว่าปริมาณของ กรดไขมันสเตียริกเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 19 ในอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20 กรัมต่อกรัม และพบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนระหว่าง 20 - 50 กรัมต่อกรัม มีความเหมาะสมที่สุดในการสะสมไขมันในเซลล์ และที่อัตราส่วนมากกว่า 50 กรัมต่อกรัม จะเป็นอัตราต่อการเจริญเติบโตและการผลิตน้ำมันในการหมักแบบกึ่งกะ

Takagi *et al.* (2006) ได้ศึกษาผลกระทบของเกลือคือ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในการสะสมไขมันและไตรเอซิลกลีเซอไรด์ ในสาหร่าย *Dunaliella* โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศา

เซลล์ ความเข้มข้นเท่ากับ 150 ไมโครโมลต่อวินาทีต่อตารางเมตร ปริมาตรอากาศเท่ากับ 250 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 240 ชั่วโมง พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เริ่มต้นจาก 0.5 โมลต่อลิตรเป็น 1.0 โมลต่อลิตรจะสามารถเพิ่มการสะสมน้ำมันในเซลล์จากร้อยละ 60 เป็นร้อยละ 70 ได้ นอกจากนั้นเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นที่ 0.5 โมลต่อลิตรหรือ 1.0 โมลต่อลิตร ในช่วงกลางของระยะแบ่งตัววิถุณหรือช่วงสุดท้ายของระยะแบ่งตัววิถุณ ระหว่างการเพาะเชื้อ โดยมีความเข้มข้นเริ่มต้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาณของไขมันจะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 70

Li *et al.* (2007) ได้ศึกษาการเลี้ยงยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* Y4 เพื่อผลิตไขมัน โดยการเลี้ยงแบบกะในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร จะบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตรและยีสต์ *R. toruloides* Y4 5 มิลลิลิตร ทำการเขย่าที่ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.5 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบกะจะเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเล็กน้อยที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อมีการเลี้ยงแบบกึ่งกะในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 22.5 มิลลิลิตรและยีสต์ *R. toruloides* Y4 2.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 25 วันจะได้ชีวมวลเท่ากับ 151.5 กรัมต่อลิตร และปริมาณไขมันเท่ากับร้อยละ 48.0 โดยน้ำหนัก และเมื่อมีการเพิ่มขนาดของการเลี้ยงเชื้อในถังเป็น 15 ลิตร ทำการเลี้ยง 134 ชั่วโมง (5.58 วัน) พบว่า จะได้ชีวมวลเท่ากับ 106.5 กรัมต่อลิตร และปริมาณไขมันเท่ากับร้อยละ 67.5 โดยน้ำหนัก

Liu *et al.* (2008) ได้ศึกษาผลกระทบของธาตุเหล็กคือ เฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl_3) ในการเจริญเติบโตและการสะสมไขมันของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ได้ทำการศึกษาโดยแบ่งเป็น 2 การทดลองคือ การทดลองแรก เติมเฟอร์ริกคลอไรด์ในช่วงหลังจากระยะแบ่งตัววิถุณ พบว่ามีการเพิ่มปริมาณของเซลล์ แต่ไม่ทำให้เกิดการสะสมน้ำมันในเซลล์มากขึ้น ส่วนการทดลองที่สองคือ ทำการเก็บสาหร่าย *Chlorella vulgaris* จากช่วงหลังจากระยะแบ่งตัววิถุณ และนำไปเลี้ยงเชื้อใหม่ในสารอาหารที่เติมเฟอร์ริกคลอไรด์ลงไป ปริมาตรระหว่าง 1.2×10^{-8} ถึง 1.2×10^{-5} โมลต่อลิตร พบว่า เมื่อเติม เฟอร์ริกคลอไรด์ปริมาตร 1.2×10^{-5} โมลต่อลิตร จะทำให้ได้ปริมาณไขมันร้อยละ 56.6 โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่า 3.7 เท่าของความเข้มข้นของธาตุเหล็กที่เท่ากับ 1.2×10^{-8} โมลต่อลิตร

Converti *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนคือ โซเดียมไนเตรด (NaNO_3) ที่ส่งผลต่อการผลิตไขมันจากจุลินทรีย์ *Nannochloropsis oculata* และสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยทำการทดลองโดยใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แหล่งคาร์บอนคือ คาร์บอนไดออกไซด์ที่อยู่ในอากาศประมาณ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรดระหว่าง 0.015 ถึง 0.075 กรัมต่อลิตร ของจุลินทรีย์ *N. oculata* และความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรดระหว่าง 0.075 ถึง 0.375 กรัมต่อลิตร ของจุลินทรีย์ *C. vulgaris* พบว่า เมื่อทำการลดความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรดลงไปร้อยละ 75 ปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้จาก จุลินทรีย์ *N. oculata* จะเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 7.90 โดยน้ำหนักแห้งเป็นร้อยละ 15.31 โดยน้ำหนักแห้ง และจากจุลินทรีย์ *C. vulgaris* จะเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 5.90 โดยน้ำหนักแห้ง เป็นร้อยละ 16.41 โดย น้ำหนักแห้ง

Wua *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของซัลเฟตในการสะสมไขมันของยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* Y4 พบว่า เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารอาหารที่มีอัตราส่วนของ ปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณของซัลเฟอร์เท่ากับ 46,750 ปริมาณของไขมันที่ได้จะเท่ากับร้อยละ 58.3 นอกจากนั้นเมื่อทำการศึกษาผลกระทบของซัลเฟตภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของ ไนโตรเจนสูงหรืออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในช่วง 28.3 – 5.7 แล้วพบว่า การใช้สารอาหาร ที่มีอัตราส่วนของปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณของซัลเฟอร์เท่ากับ 11,380 ปริมาณของไขมันที่ได้จะ เท่ากับร้อยละ 57

Li *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella minutissima* UTEX2341 เพื่อให้เกิดการผลิตชีวมวลได้ปริมาณสูงสุด โดยใช้การออกแบบการ ทดลองด้วยวิธี Box–Behnken โดยกำหนดปัจจัยที่ต้องการศึกษาคือ แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนและ ฟอสฟอรัส และทำการเลี้ยงในสภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิก (Photoheterotrophic) ภายในฟลาส ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 200 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 145 รอบต่อ นาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ภายใต้พลังงานจากแสงช่วง PAR ปริมาณ 50 มิลลิโมลโฟตอน เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 1 กรัม ต่อลิตรต่อวันจะให้ปริมาณชีวมวลและไลปิดสูงสุดที่ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 17.86 มิลลิกรัม ต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ เคซีนที่ความเข้มข้น 0.74 กรัมต่อลิตร จะ ให้ปริมาณชีวมวลและไลปิดสูงสุดที่ 0.22 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 34.83 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ และเมื่อทำการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box–Behnken โดยกำหนดปัจจัยที่ต้องการ

ศึกษาคือ แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถผลิตชีวมวลได้สูงที่สุดเท่ากับ 1.83 กรัมต่อลิตรต่อวัน คือ แหล่งคาร์บอน 26.37 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน 2.61 กรัมต่อลิตร และฟอสฟอรัส 0.03 กรัมต่อลิตร

Mohan and Devi (2014) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย แบบมิกโซโทรฟิก (Mixotrophic) ภายใต้สภาวะบีบคั้น โดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไป ซึ่งสาหร่ายที่ใช้ในการทดลองจะเก็บมาจากบ่อกักน้ำทิ้งจากบ้านเรือนในประเทศอินเดีย โดยจะทำการเพาะเลี้ยงในบ่อระบบเปิดที่มีปริมาตร 40 ลิตร ลึก 40 เซนติเมตร และพื้นที่ผิวสัมผัส 0.23 ตารางเมตร อาหารเลี้ยงสาหร่ายคือน้ำเสียจากบ้านเรือนที่มีค่า COD เท่ากับ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า TDS เท่ากับ 750 มิลลิกรัมต่อลิตรและไนเตรตเท่ากับ 115 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมนิโคต โซเดียมไนเตรตและโซเดียมฟอสเฟตปริมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด – ด่าง 8.2 ทำการเพาะเลี้ยง 8 วัน แล้วทำการเก็บชีวมวลของสาหร่ายที่ได้ไปเลี้ยงในบ่อใหม่ ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองโดยการเปิดไฟ 12 ชั่วโมง ในขณะที่เปิดไฟจะทำการทดลองในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที และความเข้มแสง 0.075 โมลต่อตารางเมตร ต่อวินาที และทำการปิดไฟ 12 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า เมื่อมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตรลงจะทำให้สาหร่ายมีชีวมวลสูงสุดคือ 6.12 กรัมต่อลิตร และผลิตไลปิดได้ปริมาณสูงสุดจะแสดงในรูปของร้อยละไลปิดรวมต่อนิวทรัลไลปิด (Total lipid/Neutral lipid) ที่ร้อยละ 23.4 ต่อ 9.2 นอกจากนี้ยังพบว่ามีปริมาณกรดปาลมิติก (Palmitic acid) สูงที่สุดที่ร้อยละ 38.4 อีกด้วย

Mata et al. (2013) ได้ทำการศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณชีวมวลและไลปิดของสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* โดยทำการเพาะเลี้ยงในสารอาหารมาตรฐาน โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.7 เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 5000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปิดและปิดไฟทุกๆ 12 ชั่วโมง โดยความเข้มแสงที่ใช้เท่ากับ 5000 ลักซ์ และเติมอากาศปริมาณ 4 มิลลิลิตรต่อวินาที เป็นเวลา 25 วัน และทำการเก็บตัวอย่างชีวมวลและวิเคราะห์ปริมาณไลปิดที่ได้จากการทดลองพบว่า เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนขึ้นเป็น 10 ของสารอาหารปกติ ในวันที่ 5 ของการทดลอง จะทำให้ได้ปริมาณชีวมวลสูงสุดที่ 141.8 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และได้ปริมาณชีวมวลเฉลี่ย 63.1 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ปริมาณไลปิดร้อยละ 33.5 และสูงสุดที่ 47.4 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งเพิ่มขึ้น 3 เท่าของการเพาะเลี้ยงด้วยสารอาหารปกติ และเมื่อมีการเพิ่มความ

เข้มข้นของเหล็กเป็น 10 เท่าของสารอาหารปกติ ในวันที่ 28 ของการทดลอง จะทำให้ได้ปริมาณไลปิดสูงสุดที่ 28 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งเพิ่มขึ้น 2 เท่าของการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารปกติ

Chen *et al.* (2005) ทำการศึกษาผลของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตต่อสาหร่าย *Chodatella* sp. เพื่อศึกษาการตกตะกอนของสาหร่าย ทำการทดลองโดยเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต โดยนำผลึกโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตละลายในน้ำกลั่น จากนั้นกรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตรแล้วไทเทรตด้วยโซเดียมออกซาลेट แล้วนำไปปรับตามความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ลงไป จากนั้นเติมโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตในระหว่างการเลี้ยงเมื่อการเจริญของสาหร่ายเข้าสู่ระยะคงที่ และทำการเก็บเซลล์สาหร่ายหลังจากการทดลองในวันที่ 7 พบว่าความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต 3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรด-ด่างของสารเท่ากับ 4 จะทำให้เซลล์สาหร่ายแตกออกและปล่อยสารอินทรีย์ภายในเซลล์ออกมา

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

จุลินทรีย์ คือ แบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 จาก American Type Culture Collection (ATCC number 27779)

2. วัสดุหลัก

แหล่งคาร์บอนที่ใช้คือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก โดยกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ใช้จะลักษณะเป็นของเหลวใสและไม่มีกลิ่น

3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองและวิเคราะห์

- 3.1 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร: Pyrex, Germany
- 3.2 หลอดทดลอง
- 3.3 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator): Model SI2, CTL, Taiwan
- 3.4 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator): VS-8480SRN(L), Vision, Korea
- 3.5 เตาเผาอุณหภูมิสูง
- 3.6 ตู้ดูดความชื้น
- 3.7 ลวดเขี่ยเชื้อ
- 3.8 เพลตเขี่ยเชื้อ
- 3.9 สำลีและกระดาษฟรอนด์
- 3.10 หลอดเก็บตัวอย่างพลาสติกขนาด 12 และ 50 มิลลิลิตร: Nalgene, USA
- 3.11 เครื่องชั่งแบบละเอียด (ทศนิยม 5 ตำแหน่ง): XP205, Mettler Toledo, Switzerland
- 3.12 เครื่องชั่งแบบหยาบ (ทศนิยม 2 ตำแหน่ง): BBL51, Boeco, Germany
- 3.13 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ: TAI CHANG medical instrument factory
- 3.14 ตู้อบลมร้อน: 500, Memmert

- 3.15 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge): PLC-012, Gemmy, Taiwan
- 3.16 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge): Model 7780, Kubota, Japan
- 3.17 เครื่องวัดพีเอช: 420A, Orion
- 3.18 เครื่อง Gas Chromatography (GC): SHIMADZU GC-2010
- 3.19 ออโต้ปีเปต: Boeco, Germany

4. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 4.1 กลูโคส: เกรดวิเคราะห์ Ajax finechem, Australia
- 4.2 กลีเซอรอล: เกรดอุตสาหกรรม ความบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก
- 4.3 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต: เกรดวิเคราะห์, Ajax finechem, Australia
- 4.4 ไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต: เกรดวิเคราะห์, Univar, Australia
- 4.5 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต: เกรดวิเคราะห์, Univar, Australia
- 4.6 โซเดียมคลอไรด์: เกรดวิเคราะห์, Univar, Australia
- 4.7 แคลเซียมคลอไรด์: เกรดวิเคราะห์, Univar, Australia
- 4.8 โพแทสเซียมไนเตรต: เกรดวิเคราะห์, Univar, Australia
- 4.9 กรดบอริก: เกรดวิเคราะห์, Univar, Australia
- 4.10 แมงกานีสคลอไรด์เตรไฮเดรต: เกรดวิเคราะห์, Univar, Australia
- 4.11 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต: เกรดวิเคราะห์, Univar, Australia
- 4.12 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต: เกรดวิเคราะห์, Univar, Australia
- 4.13 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต: เกรดวิเคราะห์, Univar, Australia
- 4.14 โคบอลต์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต: เกรดวิเคราะห์, Univar, Australia
- 4.15 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต: เกรดวิเคราะห์, Univar, Australia
- 4.16 คลอโรฟอร์ม: เกรดวิเคราะห์, Merck, Germany
- 4.17 เมทานอล: เกรดวิเคราะห์, Univar, Australia
- 4.18 โซเดียมซัลเฟต: เกรดวิเคราะห์, Fisher-scientific, UK
- 4.19 กรดซัลฟิวริก: เกรดวิเคราะห์, Merck, Germany
- 4.20 โซเดียมไฮดรอกไซด์: เกรดวิเคราะห์, Ajax finechem, Australia
- 4.21 โพแทสเซียมคลอไรด์: เกรดวิเคราะห์, Univar, Australia
- 4.22 พงู้น (Agar)

วิธีการ

1. การเตรียมต้นเชื้อแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 เพื่อใช้ในการทดลอง

ทำการถ่ายโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Nutrient Broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลอง นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 80 ไมโครลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียตามสูตรอาหารที่อ้างอิงไว้ในภาคผนวก ก1 ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมีค่าความเป็นกรด – ด่างเท่ากับ 7.4 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากขั้นตอนนี้จะเป็นต้นเชื้อที่ใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2. การศึกษาค่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธิที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 คือ กลีเซอรอลบริสุทธิร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ความเข้มข้น 14 20 27 40 54 81 108 กรัมต่อลิตร และอาหารเลี้ยงแบคทีเรียตามสูตรอาหารที่อ้างอิงไว้ในภาคผนวก ก2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการปรับค่าความเป็นกรด – ด่างเท่ากับ 7.4 โดยใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1 โมลาร์ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจะถูกฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ใช้ปริมาณต้นเชื้อ *Arthrobacter* AK19 ในการทดลองเท่ากับร้อยละ 5 โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บชีวมวลปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในขั้นตอนต่อไป

3. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box - Behnken

ในการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 เพื่อผลิตชีวมวล โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken และให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาตร 54 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน จะทำการกำหนดปัจจัยที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 6 ปัจจัย ได้แก่ KNO_3 NaCl CaCl_2 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ KH_2PO_4 : K_2HPO_4 ซึ่งระดับการทดลองของแต่ละปัจจัย จะแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ ขอบล่าง (-1) ค่ากลาง (0) และขอบบน (+1) ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 จำนวนปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดสำหรับการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken ในการผลิตชีวมวล โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาตร 54 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

ปัจจัยการทดลอง	สัญลักษณ์	ระดับของปัจจัย		
		-1	0	+1
KNO_3	X_1	0.14	2.898	5.656
NaCl	X_2	0.028	1.064	2.10
CaCl_2	X_3	0.0264	0.6732	1.32
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	X_4	0.0001	0.00505	0.01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	X_5	0.0002	0.08412	0.168
$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$	X_6	2.45	35.525	68.60

ขั้นตอนการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken ด้วยโปรแกรม MINITAB version 16.0 สำหรับการทดลอง 6 ปัจจัย จะได้การทดลองทั้งหมด 54 การทดลอง ดังตารางภาพผนวกที่ 11 ซึ่งในแต่ละการทดลองมีปริมาตรเท่ากับ 50 มิลลิลิตรและกำหนดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนคือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์เท่ากับ 54 กรัมต่อลิตร โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจะถูกฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ใช้ปริมาณต้นเชื้อ *Arthrobacter* AK19 ในการทดลองเท่ากับร้อยละ 5 โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการบ่ม

ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บชีวมวลปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในขั้นตอนต่อไป

ความเข้มข้นของเซลล์แห้งที่ได้จากการทดลองทั้ง 54 การทดลอง จะถูกนำมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม MINITAB version 16.0 เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อไป

4. การศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 ภายใต้สภาวะบีบคั้น

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 ภายใต้สภาวะบีบคั้น จะทำการทดลองโดยใช้แหล่งคาร์บอน คือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 ที่ความเข้มข้น 54 กรัมต่อลิตร และใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken ตามข้างต้น ในปริมาณ 50 มิลลิลิตร ทำการปรับค่าความเป็นกรด – ด่างเท่ากับ 7.4 โดยใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1 โมลาร์ โดยอาหารเลี้ยงแบคทีเรียจะถูกฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ใช้ปริมาณดินเชื้อ *Arthrobacter* AK19 ในการทดลองเท่ากับร้อยละ 5 โดยปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจะเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้น 0 1.7 3.2 6.4 9.6 และ 12.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในช่วงเวลาที่ 108 120 และ 132 ชั่วโมง หลังจากการเติมโซเดียมคลอไรด์และโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ที่เวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างปริมาณ 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์แห้งและปริมาณไลโปดที่ได้ต่อไป

5. การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยการนำหลอดเหวี่ยงพลาสติกไปอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดความชื้นและนำมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำหลอดเหวี่ยงพลาสติกที่ได้ไปทำการเก็บตัวอย่างชีวมวลปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที รินน้ำส่วนใสออก แล้วทำการล้างเซลล์ส่วนที่เหลือด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 20 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำ

กลั่นจำนวน 3 ครั้ง แล้วนำหลอดเหวี่ยงพลาสติกที่มีชีวมวลอยู่ไปอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดความชื้นและนำมาชั่งน้ำหนักจนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่ นำน้ำหนักที่ได้ไปลบกับน้ำหนักของหลอดพลาสติกเปล่าที่ได้ชั่งไว้แล้ว น้ำหนักที่ได้คือน้ำหนักของเซลล์แห้งในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 30 มิลลิลิตร

6. การวิเคราะห์หาปริมาณไลปิดที่ได้

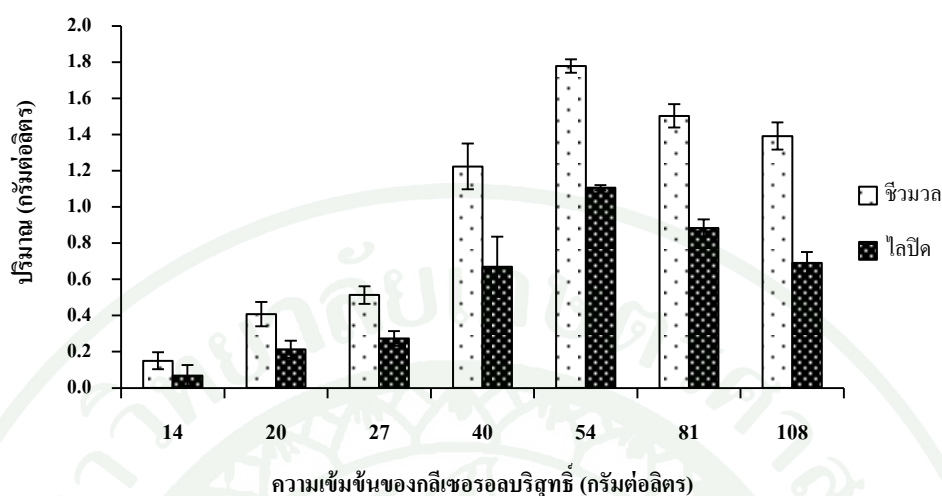
การวิเคราะห์หาปริมาณไลปิด โดยการนำเซลล์แห้งที่ได้จากข้างต้นมาทำการสกัดไลปิด ด้วยการประยุกต์ใช้วิธีของ Bligh and Dyer (1959) โดยทำการชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้และจดบันทึกไว้ หลังจากนั้นทำการเติมสารละลายคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ปริมาตรโดยปริมาตรลงไป นำไปสกัดเซลล์โดยใช้เครื่องโซนิเคเตอร์ (Sonicator) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปในอัตราส่วน 0.6 โดยปริมาตร นำไปผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สารที่ได้จะแยกชั้นกัน โดยชั้นบนซึ่งเป็นเมทานอลและน้ำจะทำการดูดทิ้ง ส่วนสารชั้นล่างซึ่งเป็นไลปิดและคลอโรฟอร์ม จะทำการดูดใส่หลอดเหวี่ยงพลาสติกที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน และกากเซลล์ที่เหลือ จะทำการสกัดต่อตามวิธีการข้างต้นซ้ำอีก 3 ครั้ง นำสารที่อยู่ในชั้นล่างของหลอดเหวี่ยงพลาสติกของทุกๆ ครั้งในการสกัดเซลล์มารวมกันทั้งหมดและนำไประเหยคลอโรฟอร์มออกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการชั่งน้ำหนักไลปิดที่ได้จนได้น้ำหนักที่คงที่ และนำไปคำนวณค่าร้อยละผลได้ของไลปิดที่ได้ต่อไป

ผลและวิจารณ์

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการผลิตไลโปดของ *Arthrobacter* AK19 (ATCC 27779) ภายใต้สภาวะแวดล้อมบีบคั้น โดยขั้นตอนแรกจะทำการศึกษาหาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 โดยใช้แหล่งคาร์บอนคือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ความเข้มข้น 54 กรัมต่อลิตร ด้วยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken และขั้นตอนที่สองจะทำการศึกษาการผลิตไลโปดของ *Arthrobacter* AK19 ภายใต้สภาวะแวดล้อมบีบคั้น โดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้น 0 1.7 3.2 6.4 9.6 และ 12.8 มิลลิกรัมต่อลิตร

1. การศึกษาความเป็นไปได้และค่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19

ในการศึกษาความเป็นไปได้และค่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 โดยจะใช้ค่าความเข้มข้นคือ 14 20 27 40 54 81 และ 108 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองที่ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิตร โดยใช้สูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงตามตารางภาคผนวกที่ ก2 นำไปเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และทำการเก็บเซลล์ โดยวัดค่าเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งและทำการสกัดไลโปดออกมา ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นนำน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณไลโปดที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กับค่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ จะได้ดังแสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 18 การเจริญของแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 โดยใช้กลีเซอรอลบริสุทรีที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากการทดลองข้างต้น เมื่อมีการใช้กลีเซอรอลบริสุทรีที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 พบว่าการเจริญของแบคทีเรียเมื่อวัดค่าจากน้ำหนักเซลล์แห้ง จะมีการเจริญที่เพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับค่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้น ตั้งแต่ค่าความเข้มข้น 14 ถึง 54 กรัมต่อลิตร โดยจะให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงสุดเท่ากับ 1.77 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทรีเท่ากับ 54 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 แต่เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทรีกับ 81 และ 108 กรัมต่อลิตร พบว่า ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จะมีค่าลดลง โดยจะได้เท่ากับ 1.50 และ 1.39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อาจจะเนื่องเพราะความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่มากเกินไปจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ และเมื่อพิจารณาที่ปริมาณไลโปลิด จะพบว่าปริมาณไลโปลิดที่ได้จะมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยปริมาณไลโปลิดที่สูงที่สุดจะเท่ากับ 1.10 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทรี 54 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าเมื่อพิจารณาจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณไลโปลิดที่ได้ พบว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทรีเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่มีการนำกลีเซอรอลบริสุทรีมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เช่น *Chlorella minutissima* UTEX2341 และ *Yarrowia lipolytica* (Li et al., 2011 and Juszczuk et al., 2013)

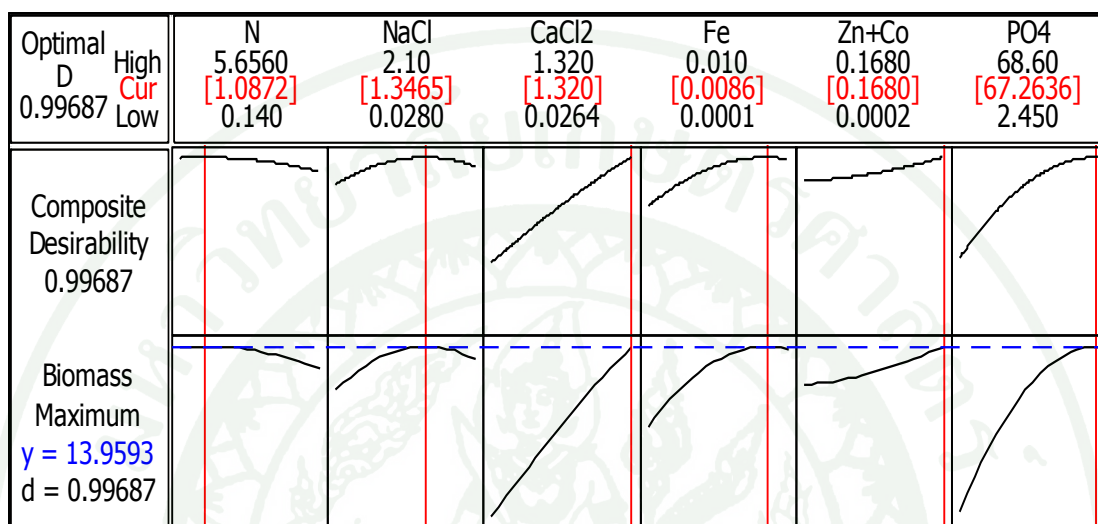
2. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box – Behnken

การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box–Behnken ซึ่งการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box–Behnken เป็นการออกแบบการทดลองเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารอาหารชนิดต่างๆ ที่มีนัยสำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรีย

จากงานวิจัยของอาทิตยา (2556) ได้ศึกษาสารอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 โดยใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้โพแทสเซียมไนเตรดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการหาสารอาหารที่มีนัยสำคัญในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 เพื่อทำการลดปัจจัยหรือลดสารอาหารที่ไม่มีนัยสำคัญออก สามารถสรุปได้ว่าสารอาหารที่มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางบวกในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 คือ KH_2PO_4 : K_2HPO_4 , CoSO_4 , ZnSO_4 , CaCl_2 , NaCl และ FeSO_4 สารอาหารที่มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางลบคือ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ และสารอาหารที่ไม่มีนัยสำคัญคือ MgSO_4 , H_3BO_3 , CuSO_4 และ MnCl_2 .

ดังนั้นจึงนำสารอาหารที่มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญมาเป็นปัจจัยที่ต้องการศึกษาการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box–Behnken โดยสารอาหารที่มีนัยสำคัญทางลบและสารอาหารที่ไม่มีนัยสำคัญจะทำการเติมลงไปปริมาณที่ลดลงจากสูตรอาหารปกติ (ดังแสดงในตารางภาพผนวกที่ ก2) 10 เท่า ดังนั้นเมื่อทำการออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ MINITAB version 16.0 จากจำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษาทั้งหมด 6 ตัวแปร โดยกำหนดช่วงของปัจจัยที่ต้องการศึกษาดังตารางที่ 14 จะได้การทดลองทั้งหมด 54 การทดลอง จากนั้นเมื่อทำการทดลองและวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ของแต่ละการทดลอง พบว่า ในการทดลองครั้งที่ 1 ถึง 4 มีความผิดพลาดในการกำหนดช่วงของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง ทำให้ไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ต้องการศึกษาได้ จึงมีการเพิ่มช่วงของปัจจัยที่ต้องการศึกษาในแต่ละการทดลองให้มากขึ้นเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม แสดงดังตารางภาพผนวกที่ ค5 – ค8 หลังจากนั้นในการทดลองครั้งที่ 5 ได้กำหนดช่วงของปัจจัยที่ต้องการศึกษาใหม่ แสดงดังตารางที่ 14 ในส่วนของวิธีการทดลองข้างต้น เมื่อทำการทดลองและวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ของแต่ละการทดลอง โดยผลการทดลองแสดงดังภาพผนวกที่ ค3

จากผลการทดลอง เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ไปวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ MINITAB version 16.0 เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแต่ละปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดที่จะทำให้ได้ชีวมวลสูงสุด จะได้กราฟดังแสดงในภาพที่ 19



ภาพที่ 19 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยต่อการผลิตชีวมวลของแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AK19 โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ 54 กรัมต่อลิตร

จากกราฟพบว่าค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆ ที่จะทำให้เกิดการผลิตชีวมวลสูงสุดตามสมการทำนายเท่ากับ 13.9593 กรัมต่อลิตร คือ โพแทสเซียมไนเตรด (KNO₃) 1.0872 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.3465 กรัมต่อลิตร เฟอรัสซัลเฟต (FeSO₄) 0.0086 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂) พบว่า ช่วงของความเข้มข้นที่ได้กำหนดขึ้น ไม่สามารถหาค่าที่เหมาะสมได้ โดยจะต้องมีการเพิ่มช่วงของค่าความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์มากขึ้นไปอีก ในทำนองเดียวกันกับค่าความเข้มข้นของซิงค์ซัลเฟต (ZnSO₄) และ โคบอลต์ซัลเฟต (CoSO₄) พบว่า ที่ช่วงของความเข้มข้นที่กำหนดไว้ ยังไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมได้ จึงต้องมีการเพิ่มช่วงของค่าความเข้มข้นขึ้นไปอีก แต่เนื่องจากว่า เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เป็น 1.452 กรัมต่อลิตรหรือ 11 เท่าของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น จะพบว่า เมื่อมีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากสูตรอาหารที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ 1.452 กรัมต่อลิตร จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการตกตะกอน จึงไม่สามารถที่จะเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ให้สูงกว่า 1.32 กรัมต่อลิตรได้ ในทำนองเดียวกันกับค่าความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อโคโพแทสเซียมไฮโดรเจน

ฟอสเฟต ($\text{KH}_2\text{PO}_4 : \text{K}_2\text{HPO}_4$) เมื่อมีการเพิ่มค่าความเข้มข้นมากขึ้นเป็น 83.40 กรัมต่อลิตร จะพบว่า ไดโพลแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจะไม่สามารถละลายได้หมด จึงกำหนดให้ค่าความเข้มข้นของ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อไดโพลแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 68.60 กรัมต่อ ลิตร

จากผลการทดลองข้างต้นจึงได้มีการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken ใหม่ โดย กำหนดปัจจัยที่ต้องการศึกษาทั้งหมด 4 ปัจจัย คือ KNO_3 , NaCl , $\text{CoSO}_4 : \text{ZnSO}_4$, CaCl_2 และ FeSO_4 และกำหนดช่วงของแต่ละปัจจัย ดังแสดงตารางที่ 15

ตารางที่ 15 จำนวนปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดสำหรับการออกแบบการทดลองด้วย วิธี Box-Behnken ในการผลิตชีวมวล โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาณ 54 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

ปัจจัยการทดลอง	สัญลักษณ์	ระดับของปัจจัย		
		-1	0	+1
KNO_3	X_1	0.14	2.898	5.656
NaCl	X_2	0.028	1.064	2.10
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	X_3	0.0001	0.00505	0.01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	X_4	0.05	0.275	0.50

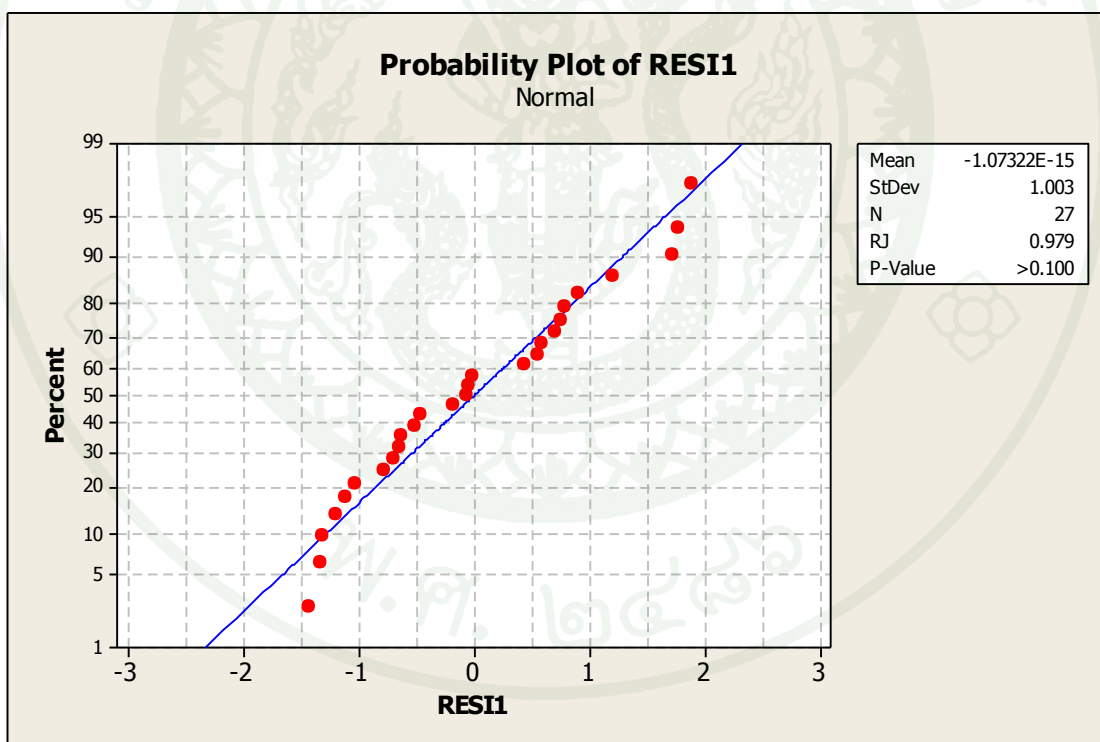
เมื่อทำการออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ MINITAB version 16.0 จาก จำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษาทั้งหมด 4 ปัจจัย ได้การทดลองทั้งหมด 27 การทดลอง ตามตาราง ภาคผนวกที่ ค2 จากนั้นเมื่อทำการทดลองและวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ของแต่ละการทดลอง แสดงดังตารางภาคผนวกที่ ค4

จากผลการผลการทดลองพบว่า ปริมาณชีวมวลที่ได้จะอยู่ในช่วง 3.9367 - 11.9833 กรัมต่อ ลิตร โดยก่อนจะทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ต้องทำการทดสอบความถูกต้องของข้อมูลที่ได้จากการ ทดลอง โดยเมื่อทำการแทนค่าของตัวแปรในแบบจำลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองเพื่อ

ทำนายผลตอบแทน โดยสามารถแสดงความความสัมพันธ์ระหว่างค่าพยากรณ์ ($\hat{y}$) กับค่าจริง (y_i) และส่วนตกค้าง (Residual) และแบบจำลองดังกล่าวต้องตั้งอยู่บนสมมติฐานหลัก 3 ข้อ ดังต่อไปนี้

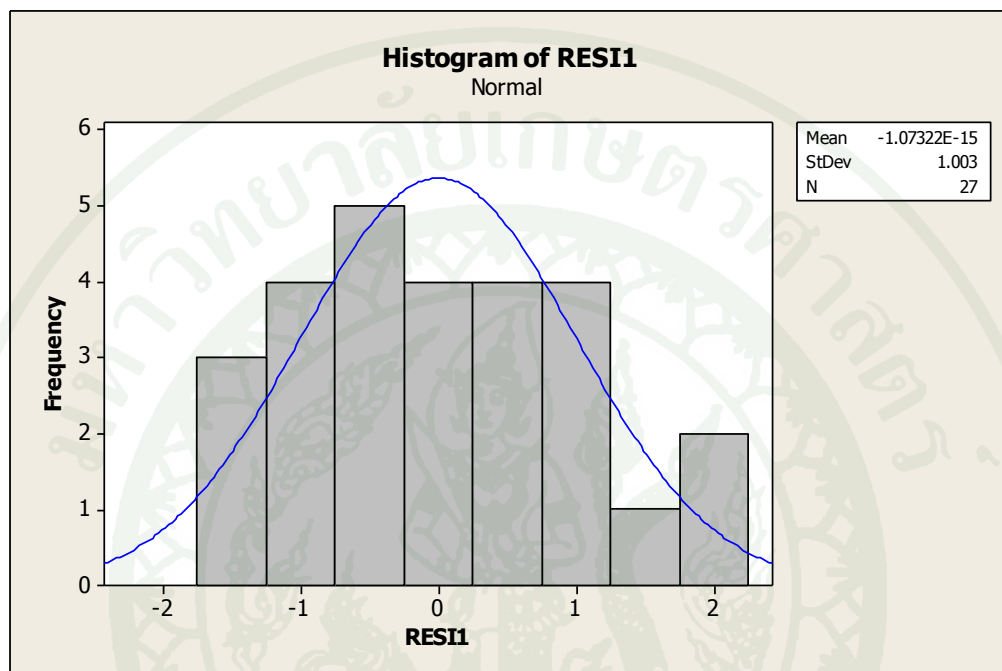
3.1 การตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลอง

3.1.1 ค่าส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ (Normal distribution) โดยเมื่อพิจารณาจากภาพที่ 20 พบว่าผลที่ได้จากการพล็อตกราฟความน่าจะเป็นเป็นแบบปกติของส่วนตกค้าง มีแนวโน้มเป็นเส้นตรง และเมื่อดูข้อมูลที่ได้จากการทำการทดสอบ Normality test ที่แสดงผลของค่าทดสอบทางสถิติของ Ryan-Joiner (RJ) เท่ากับ 0.979 และค่า p -value มากกว่า 0.100 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่ามากกว่า R_p ที่จุดวิกฤติ และมากกว่าค่า p -value เท่ากับ 0.05 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าค่าส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ



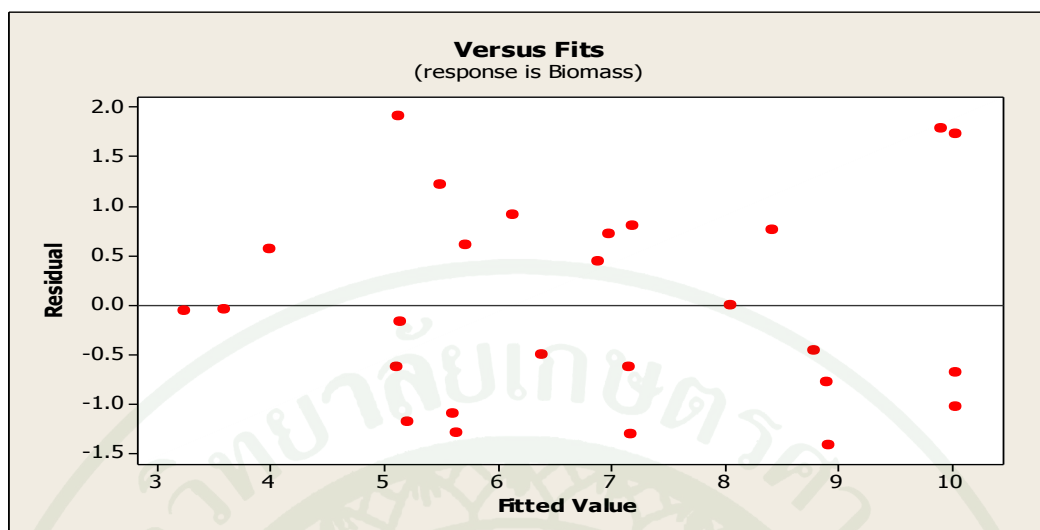
ภาพที่ 20 การกระจายตัวของส่วนตกค้าง

ในทำนองเดียวกันกับการพิจารณาการกระจายตัวของส่วนตกค้าง เมื่อพิจารณาจากกราฟฮิสโตแกรมของส่วนตกค้าง ดังแสดงในภาพที่ 21 พบว่า มีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ โดย กราฟจะมีการเรียงตัวแบบ Plateau distribution



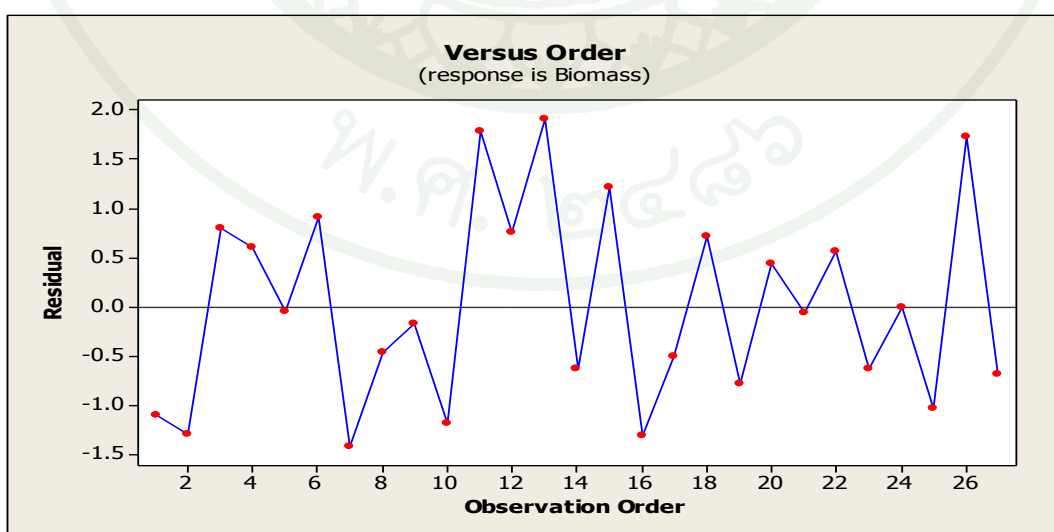
ภาพที่ 21 การกระจายตัวในแผนภูมิฮิสโตแกรมของส่วนตกค้าง

3.1.2 การตรวจสอบความแปรปรวนของส่วนตกค้าง (Variance stability) ในส่วนของกราฟระหว่างส่วนตกค้างกับค่าที่ถูกทำนายของผลตอบของข้อมูล ดังแสดงในภาพที่ 22 เมื่อทำการทดสอบความแปรปรวนของส่วนตกค้างโดยวิธีการของ Levene test (Gastwirth *et al.*, 2009) พบว่าให้ค่า F_w เท่ากับ 14.8 ซึ่งน้อยกว่า $F_{\alpha, k-1, N-k}$ และค่า p -value เท่ากับ 0.00 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าผลตอบของส่วนตกค้างให้ค่า p -value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่าสมมติฐานหลักของการทดสอบความแปรปรวนถูกปฏิเสธ จึงสรุปได้ว่าค่าความแปรปรวนของส่วนตกค้างมีค่าคงที่



ภาพที่ 22 การกระจายตัวของส่วนตกค้างกับค่าที่ถูกทำนายของผลตอบ

3.1.3 การตรวจสอบความเป็นอิสระของค่าตกค้าง (Independently distributed) จากกราฟระหว่างส่วนตกค้างกับลำดับการทดลองของข้อมูล ดังแสดงในภาพที่ 23 เมื่อทดสอบด้วยวิธีการของ Kruskal-Wallis (Kruskal and Wallis, 1952) พบว่าให้ค่า F_H เท่ากับ 26 และค่า p -value เท่ากับ 0.463 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าผลตอบของส่วนตกค้างให้ค่า p -value มากกว่า 0.05 และให้ค่า F_H น้อยกว่า $\chi^2_{0.05,35}$ (38.87) แสดงว่าสมมติฐานหลักของการทดสอบความเป็นอิสระของค่าตกค้างถูกยอมรับ จึงสรุปได้ว่าค่าส่วนตกค้างมีการกระจายตัวอย่างอิสระ



ภาพที่ 23 การกระจายตัวของส่วนตกค้างกับลำดับการทดลอง

เมื่อทำการตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลองแล้ว พบว่าไม่มีความผิดปกติของการทดลองและรูปแบบการทดลองที่ได้มีความน่าเชื่อถือ จึงนำข้อมูลของการทดลองไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนเพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของปัจจัยทั้ง 4 ปัจจัย โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ MINITAB version 16.0 และกำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ($\alpha=0.05$) ผลการวิเคราะห์แสดงในรูปของค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ดังแสดงตามตารางที่ 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตชีวมวล ดังแสดงตามตารางที่ 17

ตารางที่ 16 ค่าสัมประสิทธิ์และค่า p -value ของชีวมวลที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box–Behnken

ปัจจัย	ค่าคงที่	ชีวมวล	
		ค่าสัมประสิทธิ์	p -value
	ค่าคงที่	10.0478	0.000
X_1	KNO_3	-0.3586	0.417
X_2	NaCl	0.4139	0.351
X_3	FeSO_4	0.6058	0.181
X_4	$\text{ZnSO}_4 : \text{CoSO}_4$	1.9994	0.001
X_1^2	KNO_3^2	-1.2236	0.008
X_2^2	NaCl^2	-2.7857	0.001
X_3^2	FeSO_4^2	-1.5336	0.034
X_4^2	$(\text{ZnSO}_4 : \text{CoSO}_4)^2$	-1.6524	0.024
$X_1 * X_2$	$\text{KNO}_3 * \text{NaCl}$	-0.3725	0.623
$X_1 * X_3$	$\text{KNO}_3 * \text{FeSO}_4$	-0.6492	0.397
$X_1 * X_4$	$\text{KNO}_3 * \text{ZnSO}_4 : \text{CoSO}_4$	-0.3875	0.609
$X_2 * X_3$	$\text{NaCl} * \text{FeSO}_4$	0.4242	0.576
$X_2 * X_4$	$\text{NaCl} * \text{ZnSO}_4 : \text{CoSO}_4$	0.0333	0.965
$X_3 * X_4$	$\text{FeSO}_4 * \text{ZnSO}_4 : \text{CoSO}_4$	-0.6708	0.382

ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตมูลชีวภาพ

Source	DF	SS	MS	F	p-value
Regression (model)	14	107.029	7.645	3.51	0.018
Residual Error	12	26.172	2.181		
Total	26	133.202			
$R^2 = 80.35\% \quad R^2(\text{adj}) = 57.43\%$					

3.2 ผลการวิเคราะห์สมการแบบจำลองทำนายปริมาณชีวมวลที่ได้

สมการแบบจำลองที่ได้จากการทดลองนั้น จะอยู่ในรูปของสมการแบบจำลองกำลังสอง ซึ่งจะประกอบไปด้วย 4 พจน์ ได้แก่ พจน์ของค่าคงที่ พจน์ของเชิงเส้นตรง พจน์ของกำลังสอง และพจน์ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย ดังสมการที่ 28

$$\begin{aligned}
 Y = & \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 \\
 & + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4
 \end{aligned} \quad (28)$$

โดยที่ Y คือ ค่าปริมาณชีวมวลที่ได้จากสมการ

β_1 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ (coefficient) ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรตในพจน์ของเชิงเส้นตรง

β_2 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในพจน์ของเชิงเส้นตรง

β_3 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความเข้มข้นของเฟอร์ริคซัลเฟตในพจน์ของเชิงเส้นตรง

β_4 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความเข้มข้นของซิงค์ซัลเฟตและโคบอลต์ซัลเฟตในพจน์ของเชิงเส้นตรง

β_{11} คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรตในพจน์ของกำลังสอง

β_{22} คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในพจน์ของกำลังสอง

β_{33} คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความเข้มข้นของเฟอร์ริคซัลเฟตในพจน์ของกำลังสอง

β_{44} คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความเข้มข้นของซิงค์ซัลเฟตและโคบอลต์ซัลเฟตในพจน์ของกำลังสอง

X_1 คือ ค่าความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรด

X_2 คือ ค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

X_3 คือ ค่าความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต

X_4 คือ ค่าความเข้มข้นของซิงค์ซัลเฟตและโคบอลต์ซัลเฟต

จากสมการที่ 28 เมื่อแทนค่าสัมประสิทธิ์ของแต่ละปัจจัยที่ได้จากการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 16 จะได้สมการแบบจำลองอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณชีวมวลที่ได้กับค่าความเข้มข้นของแต่ละปัจจัยทั้งหมด 4 ปัจจัย ดังนี้ KNO_3 , NaCl , CoSO_4 : ZnSO_4 , CaCl_2 และ FeSO_4 แสดงดังสมการที่ 29

$$Y = 10.0478 + -0.3586 X_1 + 0.4139 X_2 + 0.6058 X_3 + 1.9994 X_4 - 1.2236 X_1^2 - 2.7857 X_2^2 - 1.5336 X_3^2 - 1.6524 X_4^2 - 0.3725 X_1 X_2 - 0.6492 X_1 X_3 - 0.3875 X_1 X_4 + 0.4242 X_2 X_3 + 0.0333 X_2 X_4 - 0.6708 X_3 X_4 \quad (29)$$

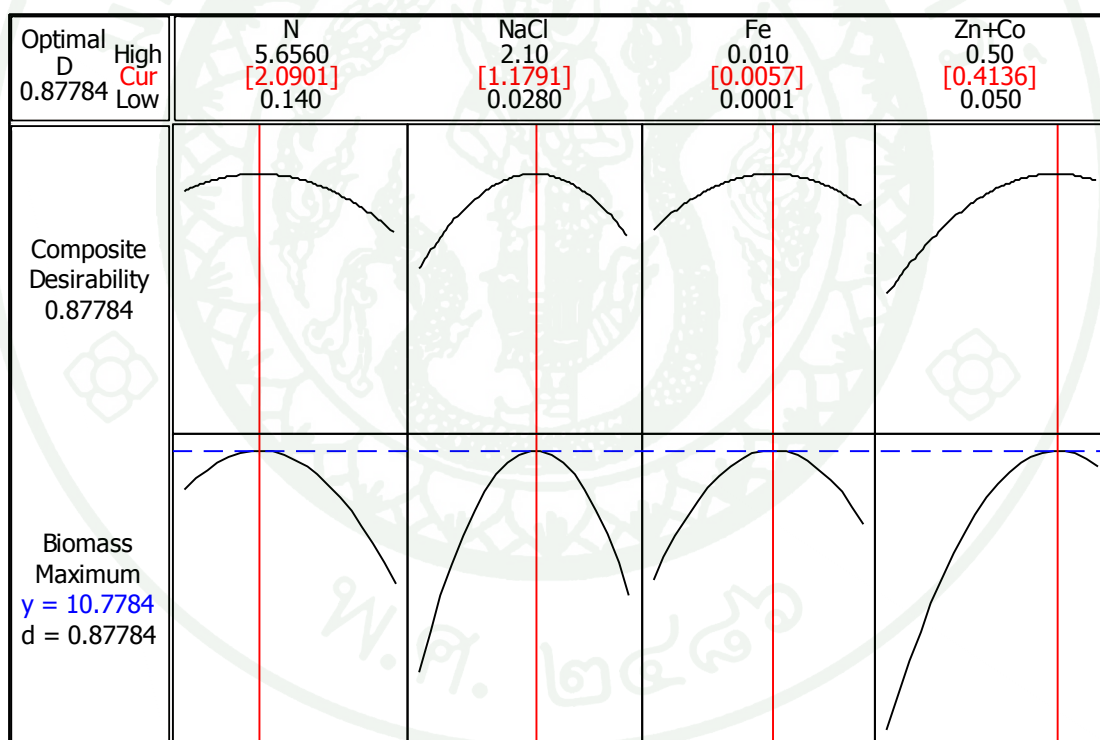
ในส่วนต่อมาจะทำการพิจารณาค่า p -value ของสมการแบบจำลองและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ซึ่งเป็นค่าที่พิจารณาว่าสมการแบบจำลองที่ได้มีความเหมาะสมและสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของค่าตอบสนองหรือปัจจัยที่ต้องการศึกษาได้มากน้อยเพียงใด โดยค่า p -value จะหาได้จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ MINITAB version 16.0 ดังแสดงในตารางที่ 17 ซึ่งค่า p -value ของสมการแบบจำลองที่ได้มีค่าเท่ากับ 0.018 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าสมการนี้มีความเหมาะสมในการนำไปใช้เพื่อทำนายปริมาณชีวมวลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ โดยค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจจะแสดงถึงค่าความเหมาะสมของสมการแบบจำลอง โดยถ้าวัดค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจยิ่งมาก แสดงว่าสมการที่ได้มีความเหมาะสมและน่าเชื่อถือ โดยจากตารางที่ 17 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับร้อยละ 80.35 แสดงว่าสมการแบบจำลองที่ได้นั้นมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ต่อไป

เมื่อพิจารณาค่าวิกฤตการแจกแจง (F) ของสมการแบบจำลอง ดังแสดงในตารางที่ 17 โดยค่าวิกฤตการแจกแจงจะแสดงถึงความเหมาะสมของการนำสมการไปใช้ โดยพิจารณาจากการเปรียบเทียบค่าวิกฤตการแจกแจงที่ได้กับค่าวิกฤตการแจกแจงจากตารางค่าวิกฤตการแจกแจง (F-test) ถ้าหากว่าค่า F_{model} มีค่ามากกว่า F_{table} นั้นแสดงว่าสมการที่ได้จากการทำนายมี

ความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ โดยจากการเปิดตารางค่าวิกฤตการแจกแจงที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ตามภาพภาคผนวกที่ ค13 จะได้ค่า F_{table} ($F_{\alpha(model, residual\ error)} = F_{0.05(9,35)}$) เท่ากับ 2.64 เมื่อเปรียบเทียบกับค่า F_{model} ตามตารางที่ 17 จะได้เท่ากับ 3.51 แสดงว่า สมการแบบจำลองที่ได้มีความเหมาะสมและเชื่อถือได้

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลของแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการใช้โปรแกรมวิเคราะห์ MINITAB version 16.0 เป็นการนำเอาเทคนิคการวิเคราะห์ที่เรียกว่า Simultaneous optimization technique มาใช้ โดยจะได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยดังแสดงในภาพที่ 24



ภาพที่ 24 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

Arthrobacter AK19

3.4 ยืนยันผลการทดลอง

ในการยืนยันผลการทดลอง เป็นการทำการทดลองในภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ได้จากการการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box–Behnken เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าค่าความเข้มข้นที่ได้มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ โดยทำการทดลองโดยใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ปริมาณ 54 กรัมต่อลิตร CaCl_2 1.32 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 : K_2HPO_4 68.6 กรัมต่อลิตร MgSO_4 0.02 กรัมต่อลิตร H_3BO_3 0.29 กรัมต่อลิตร Na_2MoO_4 0.25 กรัมต่อลิตร CuSO_4 0.01 กรัมต่อลิตร และ MnCl_2 0.009 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามที่กล่าวไว้ จะได้ปริมาณชีวมวลดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบปริมาณชีวมวลจากการทำนายและจากการทดลองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19

สภาวะที่เหมาะสม (กรัมต่อลิตร)					ชีวมวลที่ได้ (กรัมต่อลิตร)	
X_1	X_2	X_3	X_4	ค่าจากสมการ	ค่าจากการทดลอง	ค่าจากความคลาดเคลื่อน (%)
2.0901	1.1791	0.0057	0.4136	10.7784	10.2916	4.52

จากการทดลองเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 ตามสภาวะที่เหมาะสมแล้วพบว่าจะได้ชีวมวลที่ได้จะเท่ากับ 10.2916 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณชีวมวลที่ได้กับปริมาณชีวมวลจากสมการ พบว่าจะมีความคลาดเคลื่อนร้อยละ 4.52 ซึ่งค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ไม่ควรเกินร้อยละ 10 ดังนั้นสมการแบบจำลองที่ได้จึงมีความเหมาะสมและสามารถนำไปใช้เพื่อทำนายปริมาณชีวมวลที่ได้จากการทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เมื่อได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารอาหารชนิดต่างๆ จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box–Behnken ตามที่กล่าวไว้ข้างต้นแล้ว ในขั้นตอนต่อไปจะเป็นการศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 ภายใต้สภาวะบีบคั้น เพื่อการผลิตไลปิดที่สูงขึ้น

4. การศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 ภายใต้สภาวะบีบคั้น

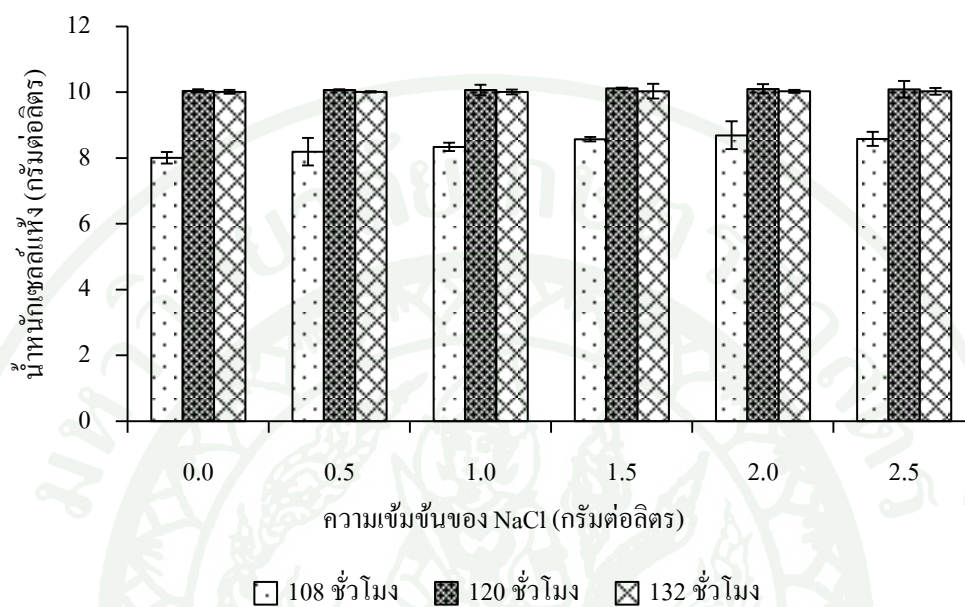
ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 ภายใต้สภาวะบีบคั้น โดยใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 54 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ก่อนที่จะทำการทดลองโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมตามที่ได้ออกแบบการทดลองเอาไว้ข้างต้น มีการทดลองเพื่อหาช่วงของค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม จึงทำการทดลองโดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 54 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สูตรอาหารอื่นตามตารางในภาคผนวกที่ ก2 พบว่า ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ในการบีบคั้นคือ 0 – 2.5 กรัมต่อลิตร

เมื่อทำการทดลองโดยใช้สูตรอาหารที่ความเข้มข้นตามที่ได้ออกแบบการทดลองไว้ข้างต้น โดยปรับปริมาณอาหารเท่ากับ 50 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.4 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจะทำการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้น 0 1.7 3.2 6.4 9.6 และ 12.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในช่วงเวลา 108 120 และ 132 ชั่วโมง หลังจากการเติมโซเดียมคลอไรด์และโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ที่เวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างปริมาณ 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งและทำการสกัดไลโปดออกจากเซลล์ โดยผลของการบีบคั้นด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ แสดงดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการบีบคั้นด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (กรัมต่อลิตร)

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ช่วงเวลาที่บีบคั้นด้วยโซเดียมคลอไรด์		
	ชั่วโมงที่ 108	ชั่วโมงที่ 120	ชั่วโมงที่ 132
0.0	8.0033	10.0438	10.0115
0.5	8.1900	10.0678	10.0122
1.0	8.3356	10.0689	10.0111
1.5	8.5689	10.1189	10.0311
2.0	8.6900	10.1022	10.0300
2.5	8.5833	10.0922	10.0267

และเมื่อทำการพล็อตกราฟระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และความเข้มข้นของ โซเดียมคลอไรด์ ดังแสดงตามภาพที่ 25



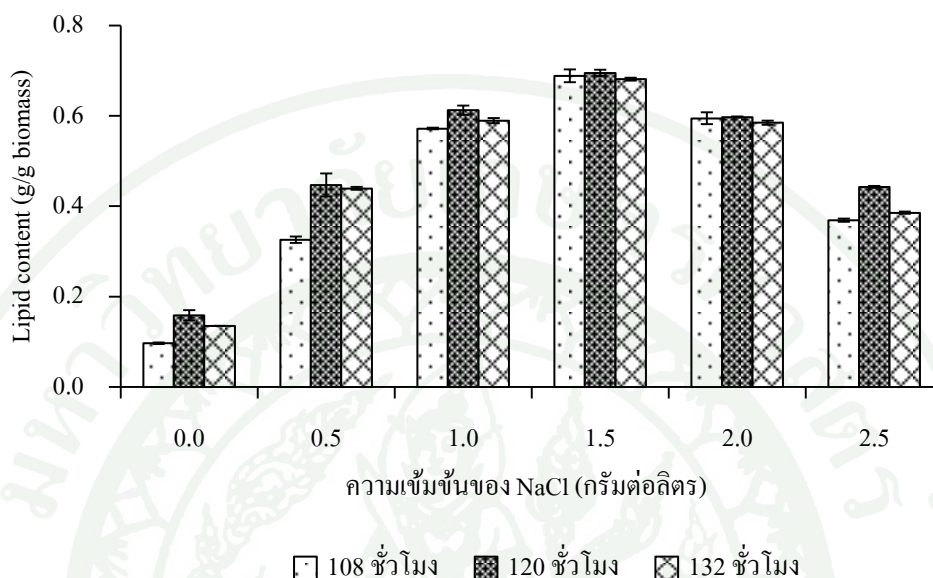
ภาพที่ 25 ปริมาณชีวมวลที่ได้จากการบีบคั้นด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ

เมื่อทำการสกัดไลปิดเพื่อหาปริมาณไลปิดที่ได้ต่อน้ำหนักชีวมวล แสดงดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ปริมาณไลปิดที่ได้ต่อน้ำหนักชีวมวลเมื่อทำการบีบคั้นด้วยโซเดียมคลอไรด์ (กรัมไลปิดต่อกรัมชีวมวล)

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ช่วงเวลาที่บีบคั้นด้วยโซเดียมคลอไรด์		
	ชั่วโมงที่ 108	ชั่วโมงที่ 120	ชั่วโมงที่ 132
0.0	0.09670	0.15890	0.13543
0.5	0.32560	0.44697	0.43946
1.0	0.57185	0.61245	0.58935
1.5	0.68854	0.69507	0.68121
2.0	0.59455	0.59723	0.58491
2.5	0.36893	0.44259	0.38564

และเมื่อพล็อตกราฟระหว่างปริมาณไลปิดที่ได้กับค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ แสดงดังภาพที่ 26



ภาพที่ 26 ปริมาณไลปิดที่ได้จากการบดคั้นด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ

เมื่อพิจารณาผลของการบดคั้นด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 108 120 และ 132 ชั่วโมง จากภาพที่ 22 พบว่า เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1.5 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมง จะได้ปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 10.11 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 108 ชั่วโมง ปริมาณชีวมวลที่ได้จะมีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 8.58 กรัมต่อลิตร และที่เวลา 132 ชั่วโมง พบว่า จะปริมาณชีวมวลที่ได้มีค่าลดลงประมาณ 10.10 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาที่ปริมาณไลปิดที่ได้จากภาพที่ 23 พบว่า ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับศูนย์ หรือไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไป ปริมาณไลปิดที่ได้จะเท่ากับ 0.15 กรัมไลปิดต่อกรัมชีวมวล และปริมาณไลปิดที่ได้จะแปรผันตรงกับค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เติมลงไป โดยจะให้ค่าปริมาณไลปิดสูงสุดเท่ากับ 0.69 กรัมไลปิดต่อกรัมชีวมวลเมื่อทำการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ทำการหมัก 120 ชั่วโมงหรือ 5 วัน แต่เมื่อทำการเพิ่มค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จาก 1.5 กรัมต่อลิตร เป็น 2.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตร พบว่า ปริมาณไลปิดที่ได้จะลดลงเท่ากับ 0.59 และ 0.45 ตามลำดับ อาจจะเนื่องมาจากความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่มากเกินไป จะไปทำลายระบบการออสโมซิสของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ ส่งผลให้เกิดการหยุดการเจริญหรือในที่สุดก็ทำให้เซลล์แตก ซึ่งจะสอดคล้อง

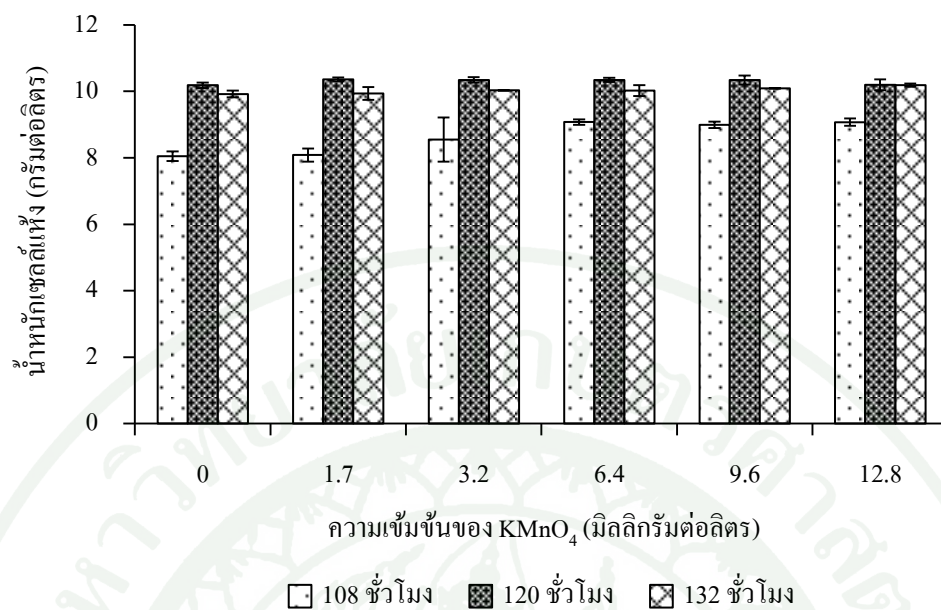
กับงานวิจัยของ Mohan *et al.* (2014) ทำการศึกษาผลของความเค็มต่อการผลิตไลปิดของสาหร่ายจากบ่อน้ำทิ้ง พบว่าเมื่อมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปที่มีความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณชีวมวลและปริมาณไลปิดสูงสุดที่เท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร และ 0.7 กรัมไลปิดต่อกรัมของชีวมวล ตามลำดับ และเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 2 กรัมต่อลิตร ปริมาณชีวมวลและปริมาณไลปิดที่ได้จะมีค่าลดลงเท่ากับ 5.30 กรัมต่อลิตร และ 0.58 กรัมไลปิดต่อกรัมของชีวมวล ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของการบีบคั้นด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ คำนี้นักเซลล์แห้งที่ได้จะแสดงดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการบีบคั้นด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ (กรัมต่อลิตร)

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ช่วงเวลาที่บีบคั้นด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต		
	ชั่วโมงที่ 108	ชั่วโมงที่ 108	ชั่วโมงที่ 108
0	8.0521	10.1833	9.9214
1.7	8.0822	10.3600	9.9367
3.2	8.5522	10.3444	10.0300
6.4	9.0767	10.3444	10.0233
9.6	8.9922	10.3456	10.0933
12.8	9.0744	10.1978	10.1889

เมื่อทำการพล็อตกราฟระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ (กรัมต่อลิตร) และความเข้มข้นของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงตามภาพที่ 27



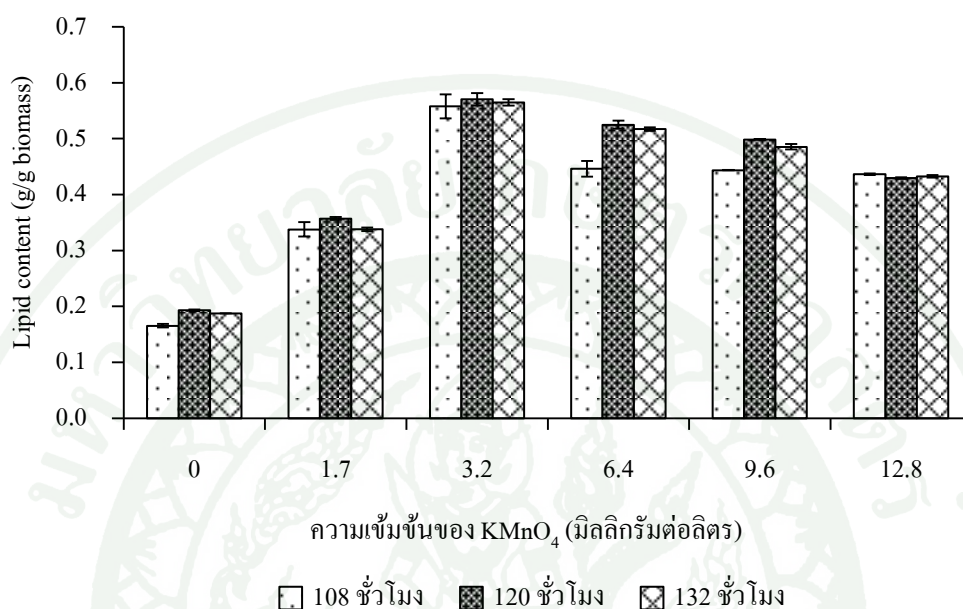
ภาพที่ 27 ปริมาณชีวมวลที่ได้จากการบีบคั้นด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ

เมื่อทำการสกัดไลปิดเพื่อหาปริมาณไลปิดที่ได้ต่อน้ำหนักชีวมวล แสดงดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ปริมาณไลปิดที่ได้จากการบีบคั้นด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ (กรัมไลปิดต่อกรัมชีวมวล)

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ช่วงเวลาที่บีบคั้นด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต		
	ชั่วโมงที่ 108	ชั่วโมงที่ 108	ชั่วโมงที่ 108
0	0.1654	0.1932	0.1876
1.7	0.3378	0.3571	0.3381
3.2	0.5577	0.5704	0.5647
6.4	0.4462	0.5249	0.5172
9.6	0.4437	0.4987	0.4855
12.8	0.4364	0.4295	0.4324

และเมื่อพล็อตกราฟระหว่างปริมาณไลปิดที่ได้กับค่าความเข้มข้นของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต แสดงดังภาพที่ 28



ภาพที่ 28 ปริมาณไลปิดที่ได้จากการบ่มด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ

เมื่อพิจารณาผลจากการบ่มด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้น 0 1.7 3.2 6.4 9.6 และ 12.8 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเจริญของแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 ภายใต้สภาวะแวดล้อมบ่มด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตมีการเจริญและการสะสมไลปิดคล้ายกับการบ่มด้วยโซเดียมคลอไรด์ โดยที่ค่าความเข้มข้นของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตเท่ากับ 3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมง จะให้ปริมาณชีวมวลและปริมาณไลปิดสูงสุดที่ 10.36 กรัมต่อลิตรและ 0.56 กรัมไลปิดต่อกรัมชีวมวล ตามลำดับ เมื่อทำการเพิ่มค่าความเข้มข้นของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตขึ้นเป็น 6.4 9.6 และ 12.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณชีวมวลและปริมาณไลปิดที่ได้จะลดลงแปรผันตรงกับความเข้มข้นของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจะสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen *et al.* (2005) ที่ศึกษาผลของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ต่อการตกตะกอนของสาหร่าย *Chodatella* sp พบว่าที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต 3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำเซลล์สาหร่ายเกิดการแตกตัวและปล่อยสารอินทรีย์ภายในเซลล์ออกมา โดยใช้หลักการเดียวกันกับการทำให้สาหร่ายแตกตัว โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตจะไปทำลายผนังเซลล์ของ

แบคทีเรียเมื่อใช้ในปริมาณที่มาก ดังนั้นแบคทีเรียจึงสร้างไลโปดเพิ่มมากขึ้นที่ผนังเซลล์เพื่อป้องกันไม่ให้ผนังเซลล์ถูกทำลายได้ และเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตมากขึ้นไปอีก อาจจะทำให้โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่เติมลงไปเกิดการออกซิไดซ์กับไลโปดที่เกิดขึ้น จึงทำให้ปริมาณไลโปดที่ได้มีค่าลดลง



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการผลิตไลโปดของ *Arthrobacter* AK19 ภายใต้สภาวะแวดล้อมบีบคั้น โดยขั้นตอนแรกจะทำการศึกษาหาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 โดยใช้แหล่งคาร์บอนคือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ความเข้มข้น 54 กรัมต่อลิตร ด้วยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken และขั้นตอนที่สองจะทำการศึกษาการผลิตไลโปดของ *Arthrobacter* AK19 ภายใต้สภาวะแวดล้อมบีบคั้น โดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตรและโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้น 0 1.7 3.2 6.4 9.6 และ 12.8 กรัมต่อลิตร

1. การศึกษาความเป็นไปได้และค่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19

ในการศึกษาค่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง แบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 โดยจะใช้ค่าความเข้มข้นคือ 14 20 27 40 54 81 และ 108 กรัมต่อลิตร พบว่าการเจริญของแบคทีเรียเมื่อวัดค่าจากน้ำหนักเซลล์แห้ง จะมีการเจริญที่เพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับค่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ค่าความเข้มข้น 14 ถึง 54 กรัมต่อลิตร โดยจะให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงสุดเท่ากับ 1.79 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์เท่ากับ 54 กรัมต่อลิตร

2. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box – Behnken

ศึกษาสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง *Arthrobacter* AK19 โดยออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken ทำให้ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลดังนี้

แหล่งคาร์บอนที่ใช้คือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 54 กรัมต่อลิตร และสารอาหารรอง คือ

● KNO_3	2.0901	กรัมต่อลิตร
● $\text{KH}_2\text{PO}_4 : \text{K}_2\text{HPO}_4$	68.6	กรัมต่อลิตร
● CaCl_2	1.32	กรัมต่อลิตร
● NaCl	1.1791	กรัมต่อลิตร
● FeSO_4	0.0057	กรัมต่อลิตร
● $\text{ZnSO}_4 : \text{CoSO}_4$	0.4136	กรัมต่อลิตร
● MgSO_4	0.02	กรัมต่อลิตร
● H_3BO_3	0.00029	กรัมต่อลิตร
● Na_2MoO_4	0.00025	กรัมต่อลิตร
● CuSO_4	0.00001	กรัมต่อลิตร
● MnCl_2	0.000009	กรัมต่อลิตร

4. การศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 ภายใต้สภาวะบีบคั้น

การศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 ภายใต้สภาวะบีบคั้น โดยการเติม โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้น 0 1.7 3.2 6.4 9.6 และ 12.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในช่วงเวลาที่ 108 120 และ 132 ชั่วโมง พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ทำการบีบคั้นคือที่เวลา 120 ชั่วโมง โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตรจะทำให้ได้ปริมาณชีวมวลและปริมาณไลปิดสูงสุดที่ 10.11 กรัมต่อลิตรและ 0.69 กรัมไลปิดต่อกรัมชีวมวล ตามลำดับ และใช้โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ความเข้มข้น 3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ได้ปริมาณชีวมวลและปริมาณไลปิดสูงสุดที่ 10.36 กรัมต่อลิตรและ 0.57 กรัมไลปิดต่อกรัมชีวมวล ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

ในโครงการวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้ทำการทดลองโดยการออกแบบด้วยวิธี Box-Behnken เพื่อหาความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้ในการเจริญของแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 โดยทำการวัดผลจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ และทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะบีบคั้นเพื่อให้เกิดการผลิตไลปิดมากขึ้น โดยวัดค่าปริมาณไลปิดรวม (Total lipid) แต่เนื่องจากไม่สามารถบอกปริมาณของไลปิดแต่ละชนิดและชนิดของกรดไขมันที่สามารถนำไปเป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาเพื่อผลิตไบโอดีเซลได้ ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงควรทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของไขมันที่ได้ทั้งหมด และนำไปทำปฏิกิริยาเพื่อผลิตเป็นไบโอดีเซลต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ชัชวาล คำวงศ์, ณัฐวิทย์ พงศ์พันธุ์, นฤมลกิจ ทุนกาศ, วิลาวัลย์ ปั่นอิน และ วิไลวรรณ ลีนะกุล.

ม.ป.ป.. ไบโอดีเซล (Biodiesel). แหล่งที่มา:

http://www.thaienergydata.in.th/econtent/upload_pic/1190645300.pdf, 5 มีนาคม 2554.

ณฐมน คีปะติ. 2551. การผลิตและการพัฒนากระบวนการทำให้บริสุทธิ์ของกลีเซอรินที่ได้จากกากของเสียโรงงานอุตสาหกรรมผลิตถัณฑ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

ณรงค์ชัย สถาพรวิจิตร. 2549. การศึกษาวิธีฟื้นฟูดอกสนองโดยแผนการทดลองแบบบล็อกซ์-เป็นเลน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสถิติประยุกต์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

คุณิ ณะบริพัฒน์. 2537. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 2 พฤศจิกายน. โครงการตำราคณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2552. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 7. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร.

ประไพศรี สุทัศน์ ณ อยุธยา และ พงศ์ชนัน เหลืองไพบูลย์. 2551. การออกแบบและวิเคราะห์การทดลอง. บริษัท สำนักพิมพ์ท็อป จำกัด, กรุงเทพมหานคร.

ปารเมศ ชูติมา. 2545. การออกแบบการทดลองทางวิศวกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ปราโมทย์ สิริโรจน์. 2536. เทคนิคการหมักแบบ Fed-batch และการประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตแอลกอฮอล์ทางอุตสาหกรรม, น 1-7. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

มัทนา โคติบุญโล. 2545. การออกแบบระบบให้อากาศของถังหมักแบบหมุนสำหรับการหมักแบบแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ ศิริโกก. 2544. **ชีววิทยาอุตสาหกรรม**. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ, กรุงเทพมหานคร

สรรรถดิษฐ์ ชั่วสุทธิศิลป์. 2557. **กลยุทธ์การออกแบบการทดลองสำหรับวิศวกรรม**. พิมพ์ครั้งที่ 1 มกราคม. บริษัท นันทพันธ์พรินต์ติ้ง จำกัด, เชียงใหม่.

สุจิตรา พรหมเชื้อ, วิชญ์ ออมทรัพย์สิน, เพ็ญศิริ จำรัสฉายและวัชร ศรีรักษา. ม.ป.ป.. **การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกลีเซอรอลบริสุทธิ์**. ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 7, สุราษฎร์ธานี.

สันติรัฐ นันสะอาจ. 2549. **Engineering Metallurgy**. คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพมหานคร.

อาทิตยา ไชยเชษฐ์. 2556. สารอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *Arthrobacter* AK19 เพื่อการผลิตชีวมวล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Azachi M., A. Sadka, M. Fisher, P. Goldschlag, I. Gokhman and A. Zamir. 2002. Salt induction of Fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the extreme halotolerant alga *Dunaliella salina*. **Plant Physiol** (129): 1320–1329.

Alonso D.L., E.-H. Belarbi, J.M. Fernández-Sevilla, J. Rodríguez-Ruiz and E.M. Grima. 2000. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Phytochemistry** (54): 461–471.

Burgess J..1936. **Metal ions in solution**. Ellis Horwood, New York, USA.

Box G. and D. Behnken. 1960. Some New Tree Level Designs for the Study of Quantitative Factors. **Technometrics** (2): 455 – 475.

Brown M. R., G. A. Dunstan, S. J. Norwood and K. A. Miller. 1996. Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. **J. Phycol** (32): 64–73.

Calidad U. 2011. Normal probability plot. Available Source:
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Normal_probability_plot_0001_residuals.png,
 April 27, 2012.

Chen J.J. and H.H. Yeh. 2005. The mechanism of potassium permanganate on algae removal. **Water Research** (39): 4420–4428.

Certík M., Z. Adamechová and K. Laoteng. 2012. Microbial Production of γ -Linolenic Acid: Submerged versus Solid-state Fermentations. **Food Sci. Biotechnol.** 21(4): 921-926.

Cohen, Z. and C. Raltledge. 2005. **Single Cell Oils**. AOCS Press, Champaign, IL, USA.

Converti A., A.A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego and M. D. Borghi. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing** (48): 1146–1151.

Department of the Treasury. n.d..**Oil and Gas Industry**. United States of America.

Duan X., G. Y. Ren, L. L. Liu and W. X. Zhu. 2013. Salt-induced osmotic stress for lipid overproduction in batch culture of *Chlorella vulgaris*. **African Journal of Biotechnology** 11(27): 7072-7078.

- Einicker-Lamas M., G. A. Mezian, T. B. Fernandes, F. L. S. Silva, F. Guerra, K. Miranda, M. Attias and M. M. Oliveira. 2002. *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu^{2+} and Zn^{2+} toxicity and accumulation in eukaryotic cells. **Environ. Pollut** (120): 779–786.
- Encyclopedia of Life. 2013. **SEM of *Arthrobacter chlorophenolicus***. Available Source: http://eol.org/data_objects/27122615, June 12, 2014.
- El-Sheek M.M. and A.A. Rady. 1995. Effect of phosphorus starvation on growth, photosynthesis and some metabolic processes in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*. **Phyton** (35): 139–151.
- Fouqueray M., J.-L. Mouget, A. Morant-Manceau and G. Tremblin. 2007. Dynamics of short-term acclimation to UV radiation in marine diatoms. **J. Photochem. Photobiol. B-Biol** (89): 1–8.
- Frost J. 2012. **The Minitab Blog**. Available Source: <http://blog.minitab.com/blog/adventures-in-statistics/why-you-need-to-check-your-residual-plots-for-regression-analysis>, April 5, 2012.
- Gastwirth, J. L., Y. R. Gel and W. Miao. 2009. The impact of Levene's test of equality of variances on statistical theory and practice. **Statistical Science** 24 (3): 343-360.
- Guckert J.B. and K. E. Cooksey. 1990. Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (chlorophyta) during high pH-induced cell cycle inhibition. **J. Phycol** (26): 72–79.
- Hassan M., P. J. Blanc, L-M G. A. Pareilleux and G. Goma. 1995. Influence of Nitrogen and Iron Limitations on Lipid Production by *Cryptococcus curvatus* Grown in Batch and Fed-batch Culture. **Process Biochemistry** 31 (4): 355-361.

- Isai S.V, N.G. Busarova and E.M. Katrich. 2013. Lipid from Therapeutic Mud Bacteria *Pseudomonas* sp. And *Arthrobacter* sp.. **Chemistry of Natural Compounds** 49 (3): 411-416.
- Jiang Y. and F. Chen. 1999. Effects of salinity on cell growth and docosahexaenoic acid content of the heterotrophic marine microalga *Cryptocodinium cohnii*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** (23): 508–513.
- Juszczak P., L. Tomaszewska, A. Kita and W. Rymowicz. 2013. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. **Bioresource Technology** (137): 124–131.
- Khotimchenko, S. V. and I. M. Yakovleva. 2005. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. **Phytochemistry** (66): 73–79.
- Kruskal, W. H. and W. A. Wallis. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association** 47 (260): 583–621.
- Li Y., Z. K. Zhaob and F. Bai. 2007. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology** (41): 312–317.
- Li Z., H. Yuan, J. Yang and B. Li. 2011. Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341. **Bioresource Technology** (102): 9128–9134.
- Liu Z-Y., G-C. Wang and B-C. Zhou. 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology** (99): 4717–4722.

- Lopaco P., R. Angelini, S. Lobasso, S. Köcher, M. Thompson, V. Müller and A. Corcelli. 2013. Adjusting membrane lipids under salt stress: the case of the moderate halophilic organism *Halobacillus halophilus*. **Environmental Microbiology** 15(4): 1078–1087.
- McLarnon-Riches C.J., C.E. Rolph, D.L.A. Greenway and P.K. Robinson. Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids. **Phytochemistry** (49): 1241-1247.
- Mata T., Almeida R. and Caetano N. S.. 2013. Effect of the Culture Nutrients on the Biomass and Lipid Productivities of Microalgae *Dunaliella tertiolecta*. **Chemical Engineering Transactions** (32): 973 – 978.
- Meng X., J. Yang, X. Xu, L. Zhang, Q. Nie and M. Xian. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy** (34): 1–5.
- Mohan S. V. and M. P. Devi. 2014. Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae. **Bioresource Technology** (165): 288–294.
- Montgomery, C. D. 2005. **Design and Analysis of Experiments**. John Wiley & Sons Inc., United States of America.
- Pagliaro, M. and M. Rossi. 2008. **The Future of Glycerol: New Uses of a Versatile Raw Material**. RSC Publishing, Cambridge.
- Ratledge C. n.d.. The Potential of Microorganisms for Oil Production-A Review of Recent Publications, pp 318-331. In A. R. Baldwin. **World Conference on Emerging Technologies in the Fats and Oils Industry**. The American Oil Chemists' Society, USA.

Ratledge C., 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. **Biochimie** (86): 807–815.

Rossi M., A. Amaretti, S. Raimondi and A. Leonardi, 2011. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi. **Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies**. Croatia.

Ryan, T. A. and B. L. Joiner. 1976. **Normal probability plots and tests for normality**. Statistics Department, The Pennsylvania State University.

Sharma K. K., H. Schuhmann and P. M. Schenk. 2012. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. **Energies** (5): 1532-1553.

Shuler, M. L. and F. Kargi. 1992. **Bioprocess Engineering: Basic concept**. Prentice Hall PTR., New Jersey.

Takagi M., Karseno, and T. Yoshida. 2006. Effect of Salt Concentration on Intracellular Accumulation of Lipids and Triacylglyceride in Marine *Microalgae Dunaliella* Cells. **Bioscience and Bioengineering**. 101(3): 223–226.

Tatsuzawa H., E. Takizawa, M. Wada and Y. Yamamoto. 1996. Fatty acid and lipid composition of the acidophilic green alga *Chlamydomonas* sp. **J. Phycol** (32): 598–601.

The Pennsylvania State University. 2004. Regression Method. Available Source: <https://onlinecourses.science.psu.edu/stat501/node/2>, June 11, 2004.

Wayman M., A. D. Jenkins and A. G. Kormendy. 1983. Bacterial Production of Fat and Oils, pp. 129 – 144. In C. Ratledge, P. Dawson and J. Rattray, eds. **Biotechnology for the Oils and Fats Industry**. The American Oil Chemists' Society, USA.

Wikipedia. 2011. *Arthrobacter*. Available Source: <http://en.wikipedia.org/wiki/Arthrobacter>, March 3, 2011.

Wua S., X. Zhao, H. Shen, Q. Wang and Z. K. Zhao. 2011. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate - limited conditions. **Bioresource Technology** (102): 1803–1807.

Zhu, C., Y. Lee and T. Chao. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* tk1. **J. Appl. Phycol.** (9): 451–457.





ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางผนวกที่ ก1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) และ Nutrient Agar (NA) ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
Nutrient Broth	8
Agar	25

ตารางผนวกที่ ก2 สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง *Arthrobacter* AK19 ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นของสูตรอาหาร (ต่อลิตร)
กลีเซอรอลบริสุทธิ์	14-108 กรัม
K_2HPO_4	1.770 กรัม
KH_2PO_4	0.680 กรัม
NaCl	0.140 กรัม
$CaCl_2$	0.132 กรัม
KNO_3	0.280 กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.200 กรัม
H_3BO_3	2.900 มิลลิกรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2.500 มิลลิกรัม
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	2.500 มิลลิกรัม
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	1.200 มิลลิกรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.200 มิลลิกรัม
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.100 มิลลิกรัม
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.090 มิลลิกรัม



ภาคผนวก ข
ผลการวิเคราะห์ต่าง ๆ

ตารางผนวกที่ ข1 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Arthrobacter* AK19 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยกระบวนการหมักแบบเปิด ด้วยกลีเซอรอลบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 14 20 27 40 54 81 และ 108 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

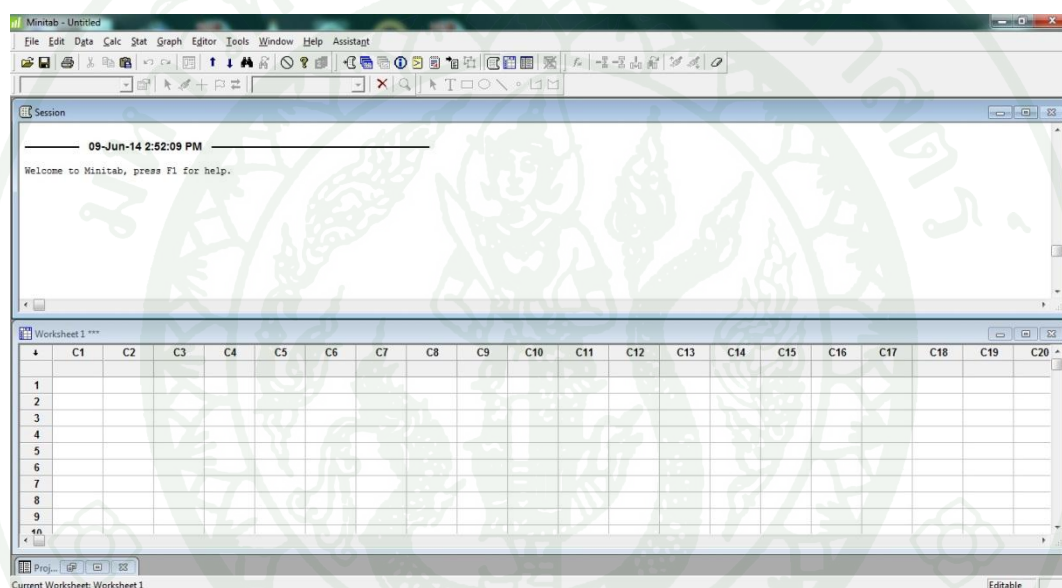
ความ เข้มข้น	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	เฉลี่ย
14	0.1505	0.1163	0.1832	0.1500
20	0.4080	0.3605	0.4548	0.4078
27	0.5233	0.4792	0.5375	0.5133
40	1.2444	1.1351	1.2738	1.2178
54	1.7789	1.7953	1.7425	1.7722
81	1.5033	1.5489	1.4578	1.5033
108	1.4022	1.3392	1.4352	1.3922



ภาคผนวก ค
การออกแบบการทดลอง

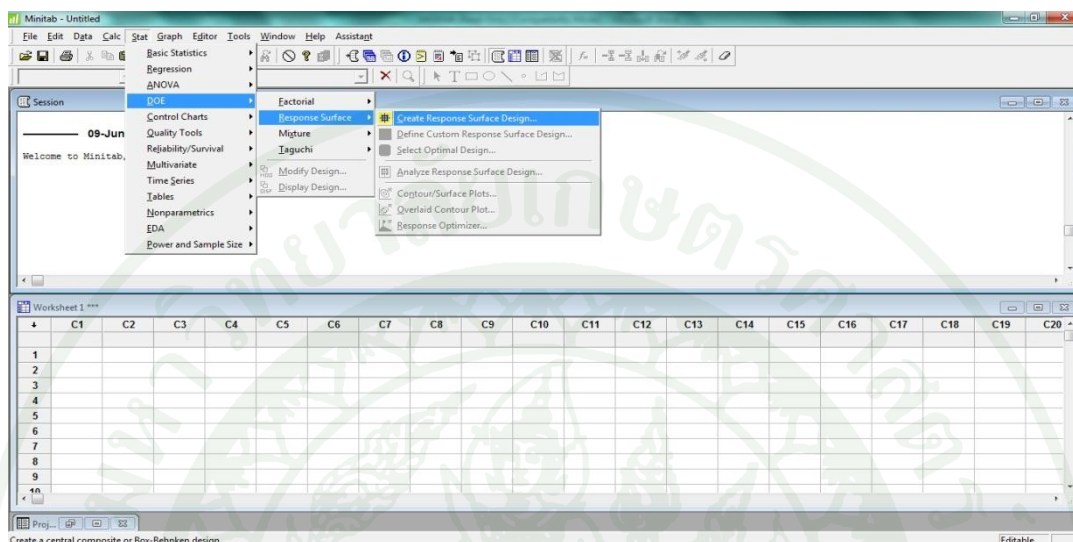
1. การออกแบบการทดลองโดยวิธี Box-Benhken ด้วยโปรแกรม MINITAB version 16.0
มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เข้าสู่โปรแกรม MINITAB version 16.0



ภาพผนวกที่ ค1 Worksheet

2. เลือกฟังก์ชัน Stat >> DOE >> Response Surface >> Create Response Surface Design



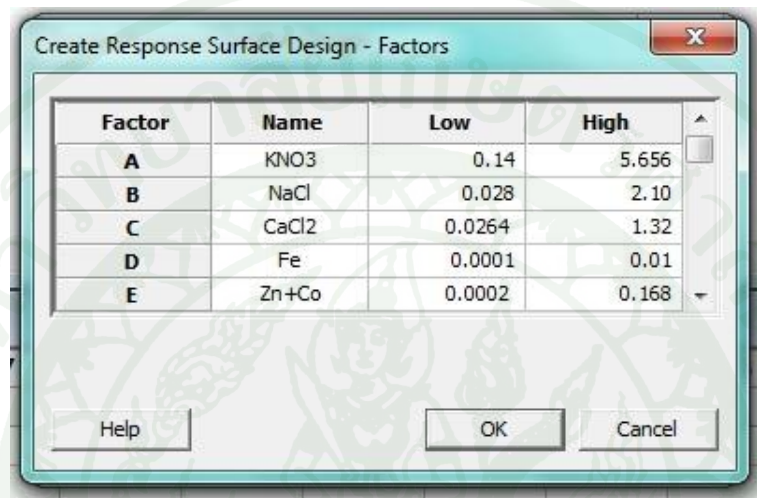
ภาพผนวกที่ ค2 การเลือกการออกแบบการทดลองแบบ Response Surface

3. เลือก Box-Behnken และกำหนดปัจจัย (Number of factor) ที่ใช้ในการออกแบบการทดลอง ในที่นี้คือ 6 ปัจจัย



ภาพผนวกที่ ค3 การเลือกชนิดของการออกแบบและจำนวนของตัวแปร

4. เลือกฟังก์ชัน Factors ใส่ปัจจัยที่ต้องการศึกษา ในที่นี้คือ KNO_3 NaCl CaCl_2 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ ส่วนระดับการทดลองของแต่ละปัจจัย จะแบ่งออกเป็น 2 ระดับ ได้แก่ ขอบล่าง (-1) และขอบบน (+1) กด OK (ทางโปรแกรมจะคำนวณค่ากลาง (0) ออกมาให้อัตโนมัติ)



ภาพผนวกที่ ค4 การป้อนชื่อปัจจัยที่ต้องการศึกษาและกำหนดระดับของแต่ละตัวแปร

5. กด OK จะได้จำนวนการทดลองทั้งหมด 54 การทดลอง

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20
	StdOrder	RunOrder	PartType	Blocks	KNO3	NaCl	CaCl2	Fe	Zn+Co	PO4	Biomass									
1	1	1	2	1	0.140	0.028	0.0264	0.00010	0.0041	35.525										
2	2	2	2	1	5.656	0.028	0.0264	0.00010	0.0041	35.525										
3	3	3	2	1	0.140	2.100	0.0264	0.00010	0.0041	35.525										
4	4	4	2	1	5.656	2.100	0.0264	0.00010	0.0041	35.525										
5	5	5	2	1	0.140	0.028	0.0264	0.01000	0.0041	35.525										
6	6	6	2	1	5.656	0.028	0.0264	0.01000	0.0041	35.525										
7	7	7	2	1	0.140	2.100	0.0264	0.01000	0.0041	35.525										
8	8	8	2	1	5.656	2.100	0.0264	0.01000	0.0041	35.525										
9	9	9	2	1	2.898	0.028	0.0264	0.00505	0.0002	35.525										
10	10	10	2	1	2.898	2.100	0.0264	0.00505	0.0002	35.525										
11	11	11	2	1	2.898	0.028	1.3200	0.00505	0.0002	35.525										
12	12	12	2	1	2.898	2.100	1.3200	0.00505	0.0002	35.525										
13	13	13	2	1	2.898	0.028	0.0264	0.00505	0.1680	35.525										
14	14	14	2	1	2.898	2.100	0.0264	0.00505	0.1680	35.525										
15	15	15	2	1	2.898	0.028	1.3200	0.00505	0.1680	35.525										
16	16	16	2	1	2.898	2.100	1.3200	0.00505	0.1680	35.525										
17	17	17	2	1	2.898	1.064	0.0264	0.00010	0.0041	2.450										
18	18	18	2	1	2.898	1.064	1.3200	0.00010	0.0041	2.450										
19	19	19	2	1	2.898	1.064	0.0264	0.01000	0.0041	2.450										
20	20	20	2	1	2.898	1.064	1.3200	0.01000	0.0041	2.450										
21	21	21	2	1	2.898	1.064	0.0264	0.00010	0.0041	68.600										
22	22	22	2	1	2.898	1.064	1.3200	0.00010	0.0041	68.600										
23	23	23	2	1	2.898	1.064	0.0264	0.01000	0.0041	68.600										

ภาพผนวกที่ ค5 จำนวนการทดลองทั้งหมด

6. เมื่อได้จำนวนการทดลองแล้ว ทำการทดลองหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 จากนั้นนำค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ใส่ลงในโปรแกรมใน คอลัมน์ “Biomass” ถัดจากคอลัมน์ของปัจจัย เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

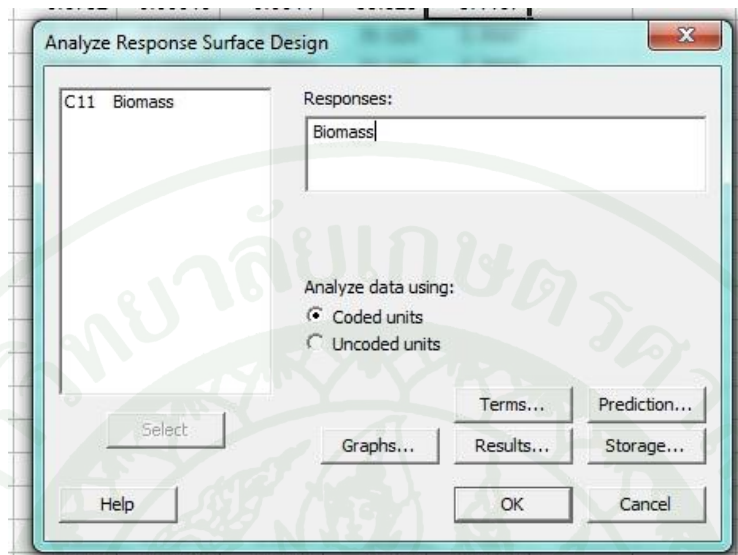
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20
StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	KNO3	NaCl	CaCl2	Fe	Zn+Co	PO4	Biomass									
1	1	2	1	0.140	0.028	0.6732	0.00010	0.0841	35.525	5.4467									
2	2	2	1	5.656	0.028	0.6732	0.00010	0.0841	35.525	5.9567									
3	3	3	2	0.140	2.100	0.6732	0.00010	0.0841	35.525	6.3600									
4	4	2	1	5.656	2.100	0.6732	0.00010	0.0841	35.525	5.6300									
5	5	5	2	0.140	0.028	0.6732	0.01000	0.0841	35.525	5.5733									
6	6	2	1	5.656	0.028	0.6732	0.01000	0.0841	35.525	5.4867									
7	7	7	2	0.140	2.100	0.6732	0.01000	0.0841	35.525	4.6433									
8	8	2	1	5.656	2.100	0.6732	0.01000	0.0841	35.525	6.5033									
9	9	9	2	2.898	0.028	0.0264	0.00505	0.0002	35.525	11.5633									
10	10	2	1	2.898	2.100	0.0264	0.00505	0.0002	35.525	4.0700									
11	11	11	2	2.898	0.028	1.3200	0.00505	0.0002	35.525	7.2167									
12	12	2	1	2.898	2.100	1.3200	0.00505	0.0002	35.525	8.0333									
13	13	13	2	2.898	0.028	0.0264	0.00505	0.1680	35.525	1.7633									
14	14	2	1	2.898	2.100	0.0264	0.00505	0.1680	35.525	4.7867									
15	15	15	2	2.898	0.028	1.3200	0.00505	0.1680	35.525	6.9733									
16	16	2	1	2.898	2.100	1.3200	0.00505	0.1680	35.525	7.0900									
17	17	17	2	2.898	1.064	0.0264	0.00010	0.0841	2.450	2.3267									
18	18	2	1	2.898	1.064	1.3200	0.00010	0.0841	2.450	2.6000									
19	19	19	2	2.898	1.064	0.0264	0.01000	0.0841	2.450	1.0367									
20	20	2	1	2.898	1.064	1.3200	0.01000	0.0841	2.450	2.6967									
21	21	21	2	2.898	1.064	0.0264	0.00010	0.0841	68.600	5.8567									
22	22	2	1	2.898	1.064	1.3200	0.00010	0.0841	68.600	10.7000									
23	23	23	2	2.898	1.064	0.0264	0.01000	0.0841	68.600	4.3133									

ภาพผนวกที่ 6 การใส่ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการทดลอง

7. เลือกฟังก์ชัน Stat >> DOE >> Response Surface >> Analyze Response Surface Design

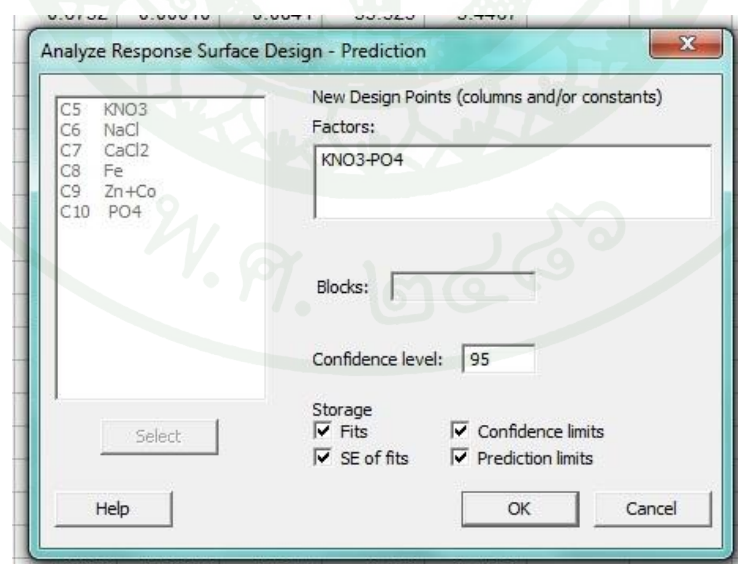
ภาพผนวกที่ 7 การเลือก Analyze Response Surface Design

8. ช่อง Response เลือก Column “Biomass”



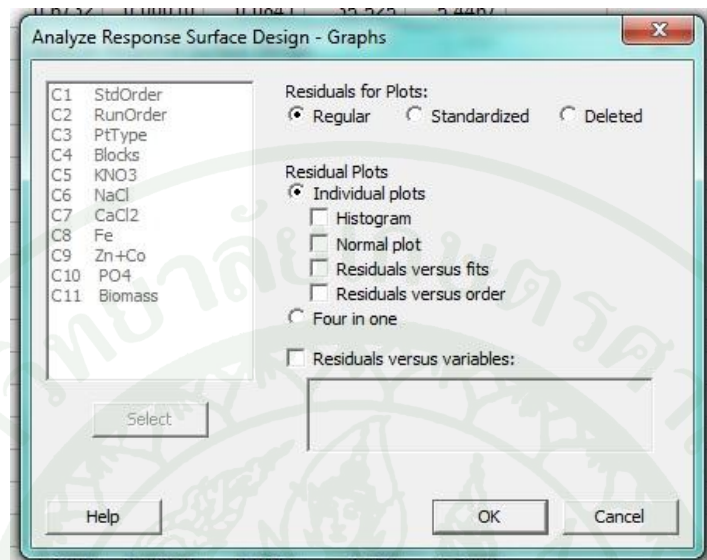
ภาพผนวกที่ ค8 การเลือกค่าตอบสนองที่ต้องการวิเคราะห์ผล

9. เลือกช่อง Prediction เพื่อเลือกปัจจัยที่ต้องการศึกษาและเลือกค่าความเชื่อมั่น (Confidence level)



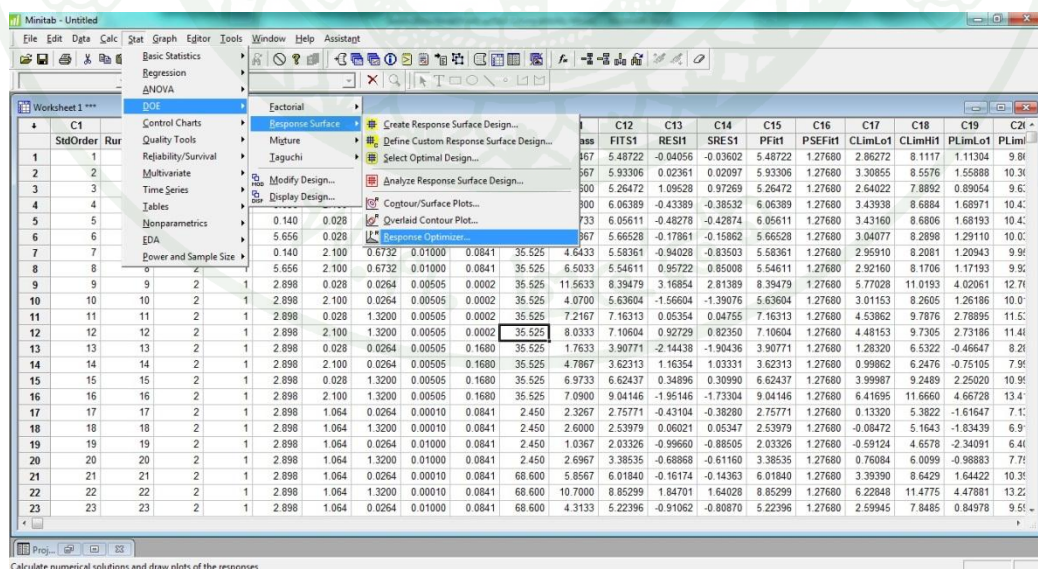
ภาพผนวกที่ ค9 การเลือกปัจจัยที่ต้องการศึกษาและกำหนดค่าความเชื่อมั่นของ Model

10. เลือกช่อง Graphs เพื่อเลือกลักษณะของกราฟที่ต้องการ



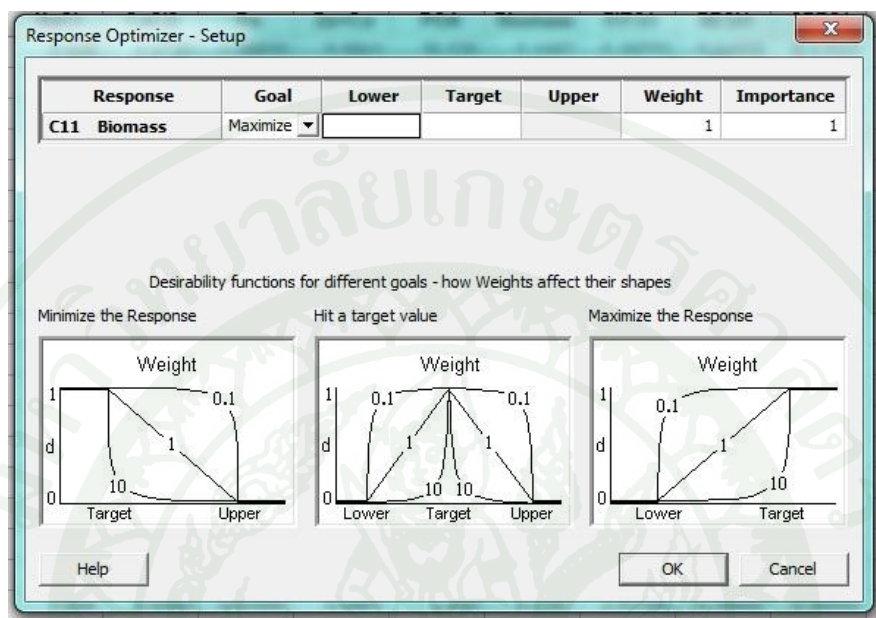
ภาพผนวกที่ ค10 การเลือกลักษณะของกราฟที่ต้องการนำเสนอ

11. การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสม โดยการเลือก Stat >> DOE >> Response Surface Response Optimizer



ภาพผนวกที่ ค11 การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสม

12. เลือก Biomass >> Setup >> Minimize >> กำหนดค่า Lower และค่า Target ตามต้องการ



ภาพผนวกที่ ค12 การเลือก Response Optimizer

2. การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken

เมื่อทำการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken จำนวนของการทดลองที่ได้จะขึ้นอยู่กับจำนวนปัจจัย ดังแสดงตามตารางภาพผนวกที่ ค1

ตารางผนวกที่ ค1 จำนวนการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken
เมื่อปัจจัยที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 6 ปัจจัย

การทดลอง	KNO ₃	NaCl	CaCl ₂	FeSO ₄ •7H ₂ O	ZnSO ₄ •7H ₂ O	KH ₂ PO ₄
					:	:
					CoSO ₄ •7H ₂ O	K ₂ HPO ₄
1	-1	-1	0	-1	0	0
2	+1	-1	0	-1	0	0
3	-1	+1	0	-1	0	0
4	+1	+1	0	-1	0	0
5	-1	-1	0	+1	0	0
6	+1	-1	0	+1	0	0
7	-1	+1	0	+1	0	0
8	+1	+1	0	+1	0	0
9	0	-1	-1	0	-1	0
10	0	+1	-1	0	-1	0
11	0	-1	+1	0	-1	0
12	0	+1	+1	0	-1	0
13	0	-1	-1	0	+1	0
14	0	+1	-1	0	+1	0
15	0	-1	+1	0	+1	0
16	0	+1	+1	0	+1	0
17	0	0	-1	-1	0	-1
18	0	0	+1	-1	0	-1
19	0	0	-1	+1	0	-1

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

การทดลอง	KNO_3	NaCl	CaCl_2	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	KH_2PO_4 : K_2HPO_4
20	0	0	+1	+1	0	-1
21	0	0	-1	-1	0	+1
22	0	0	+1	-1	0	+1
23	0	0	-1	+1	0	+1
24	0	0	+1	+1	0	+1
25	-1	0	0	-1	-1	0
26	+1	0	0	-1	-1	0
27	-1	0	0	+1	-1	0
28	+1	0	0	+1	-1	0
29	-1	0	0	-1	+1	0
30	+1	0	0	-1	+1	0
31	-1	0	0	0	+1	0
32	+1	0	0	0	+1	0
33	0	-1	0	0	-1	-1
34	0	+1	0	0	-1	-1
35	0	-1	0	0	+1	-1
36	0	+1	0	0	+1	-1
37	0	-1	0	0	-1	+1
38	0	+1	0	0	-1	+1
39	0	-1	0	0	+1	+1
40	0	+1	0	0	+1	+1
41	-1	0	-1	0	0	-1
42	+1	0	-1	0	0	-1
43	-1	0	+1	0	0	-1
44	+1	0	+1	0	0	-1

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

การทดลอง	KNO_3	NaCl	CaCl_2	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	KH_2PO_4 : K_2HPO_4
45	-1	0	-1	0	0	+1
46	+1	0	-1	0	0	+1
47	-1	0	+1	0	0	+1
48	+1	0	+1	0	0	+1
49	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ ค2 จำนวนการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken เมื่อปัจจัยที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 4 ปัจจัย

การทดลอง	KNO_3	NaCl	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} :$ $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1	-1	-1	0	0
2	+1	-1	0	0
3	-1	+1	0	0
4	+1	+1	0	0
5	0	0	-1	-1
6	0	0	+1	-1
7	0	0	-1	+1
8	0	0	+1	+1
9	-1	0	0	-1
10	+1	0	0	-1
11	-1	0	0	+1
12	+1	0	0	+1
13	0	-1	-1	0
14	0	+1	-1	0
15	0	-1	+1	0
16	0	+1	+1	0
17	-1	0	-1	0
18	+1	0	-1	0
19	-1	0	+1	0
20	+1	0	+1	0
21	0	-1	0	-1
22	0	+1	0	-1
23	0	-1	0	+1
24	0	+1	0	+1
25	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

การทดลอง	KNO_3	NaCl	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} :$ $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ ค3 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการทดลองเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 เมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 54 กรัมต่อลิตร ตามการออกแบบการทดลอง Box–Behnken จำนวน 54 การทดลอง

การทดลอง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
1	5.4467	3.9133	4.6800
2	5.9567	5.1133	5.5350
3	6.3600	5.8533	6.1067
4	5.6300	5.5033	5.5667
5	5.5733	7.6800	6.6267
6	5.4867	6.7267	6.1067
7	4.6433	6.4067	5.5250
8	6.5033	7.3533	6.9283
9	11.5633	8.8533	10.2083
10	4.0700	3.1400	3.6050
11	7.2167	10.9633	9.0900
12	8.0333	10.2833	9.1583
13	1.7633	2.7667	2.2650
14	4.7867	5.2467	5.0167
15	6.9733	9.8733	8.4233
16	7.0900	10.8167	8.9533
17	2.3267	5.8667	4.0967
18	2.6000	4.5267	3.5633
19	1.0367	0.9533	0.9950
20	2.6967	3.9067	3.3017
21	5.8567	1.8000	3.8283
22	10.7000	11.3633	11.0317

ตารางผนวกที่ ค3 (ต่อ)

การทดลอง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
23	4.3133	5.4433	4.8783
24	10.9100	9.3967	10.1533
25	4.4967	6.9800	5.7383
26	7.2667	7.4800	7.3733
27	9.2033	6.6867	7.9450
28	4.9967	6.6200	5.8083
29	4.2300	6.7367	5.4833
30	5.0167	7.3300	6.1733
31	4.2033	9.7300	6.9667
32	6.6267	9.6367	8.1317
33	1.4033	2.3433	1.8733
34	2.3900	3.1333	2.7617
35	2.4133	5.9800	4.1967
36	1.8867	2.2733	2.0800
37	7.1633	9.3733	8.2683
38	6.5433	8.1467	7.3450
39	6.5367	8.2300	7.3833
40	7.5100	9.0433	8.2767
41	4.5833	0.9967	2.7900
42	2.5533	1.4133	1.9833
43	4.7033	4.5967	4.6500
44	3.3900	3.9633	3.6767
45	3.6967	6.2500	4.9733
46	9.2100	8.5867	8.8983

ตารางผนวกที่ ค3 (ต่อ)

การทดลอง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
47	9.8067	13.1800	11.4933
48	6.7600	11.4800	9.1200
49	4.7833	7.8900	6.3367
50	5.2767	9.7300	7.5033
51	5.9667	8.7033	7.3350
52	6.5433	14.0833	10.3133
53	6.0767	5.8500	5.9633
54	5.7300	7.8667	6.7983

ตารางผนวกที่ ค4 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการทดลองเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19
เมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 54 กรัมต่อลิตร ตามการออกแบบการทดลอง Box-
Behnken จำนวน 27 การทดลอง

การทดลอง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
1	4.5033	3.5233	4.0133
2	4.3333	5.2333	4.7833
3	7.9800	7.5933	7.7867
4	6.3200	6.1867	6.2533
5	3.5400	4.3333	3.9367
6	7.0500	7.0300	7.0400
7	7.5067	7.6600	7.5833
8	8.3333	7.9467	8.1400
9	4.9733	4.0933	4.5333
10	4.0067	4.1300	4.0683
11	11.6933	12.2733	11.9833
12	9.1767	9.2500	9.2133
13	7.0333	6.9300	6.9817
14	4.4833	4.1800	4.3317
15	6.7067	7.1767	6.9417
16	5.8533	5.2633	5.5583
17	5.8800	5.7300	5.8050
18	7.6833	7.7267	7.7050
19	8.1233	8.6600	8.3917
20	7.3300	7.2600	7.2950
21	3.1667	5.9133	4.5400
22	4.5533	5.1200	4.8367

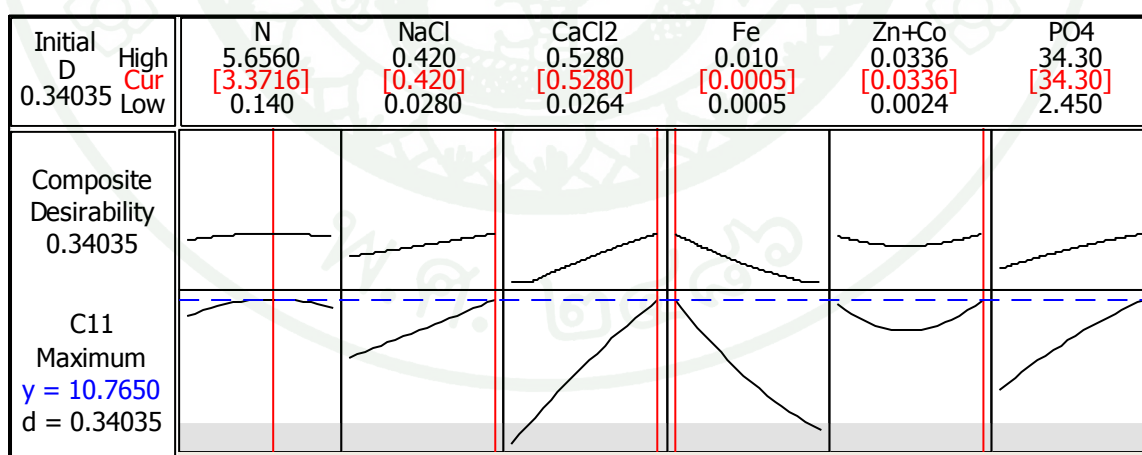
ตารางผนวกที่ ค4 (ต่อ)

การทดลอง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
23	6.5267	7.0600	6.7933
24	8.0467	8.2167	8.1317
25	9.0167	9.1500	9.0833
26	11.7700	10.6300	11.2000
27	9.3567	9.7000	9.5283

3. ผลของการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken ครั้งที่ 1-4

ตารางผนวกที่ ค5 จำนวนปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดสำหรับการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken ในการผลิตชีวมวล โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาณ 54 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองครั้งที่ 1)

ปัจจัยการทดลอง	สัญลักษณ์	ระดับของปัจจัย		
		-1	0	+1
KNO_3	X_1	0.14	2.898	5.656
NaCl	X_2	0.028	0.224	0.42
CaCl_2	X_3	0.0264	0.2772	0.528
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	X_4	0.0005	0.00525	0.01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	X_5	0.0024	0.018	0.0336
$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$	X_6	2.45	18.375	34.3



ภาพผนวกที่ ค13 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยต่อการผลิตชีวมวลของแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ 54 กรัมต่อลิตร (การทดลองครั้งที่ 1)

ตารางผนวกที่ ค6 จำนวนปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดสำหรับการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken ในการผลิตชีวมวล โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาณ 54 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองครั้งที่ 2)

ปัจจัยการทดลอง	สัญลักษณ์	ระดับของปัจจัย		
		-1	0	+1
KNO_3	X_1	0.14	2.898	5.656
NaCl	X_2	0.028	1.064	2.10
CaCl_2	X_3	0.0264	0.6732	1.32
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	X_4	0.0001	0.00005	0.01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	X_5	0.0002	0.08412	0.168
$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$	X_6	2.45	35.525	68.6

Optimal D	N	NaCl	CaCl ₂	Fe	Zn+Co	PO ₄
0.99687	5.6560 [1.0872] 0.140	2.10 [1.3465] 0.0280	1.320 [1.320] 0.0264	0.010 [0.0086] 0.0001	0.1680 [0.1680] 0.0002	68.60 [67.2636] 2.450
Composite Desirability 0.99687						
Biomass Maximum $y = 13.9593$ $d = 0.99687$						

ภาพผนวกที่ ค14 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยต่อการผลิตชีวมวลของแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ 54 กรัมต่อลิตร (การทดลองครั้งที่ 2)

ตารางผนวกที่ ค7 จำนวนปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดสำหรับการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken ในการผลิตชีวมวล โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาณ 54 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองครั้งที่ 3)

ปัจจัยการทดลอง	สัญลักษณ์	ระดับของปัจจัย		
		-1	0	+1
KNO_3	X_1	0.14	2.898	5.656
NaCl	X_2	0.028	1.064	2.10
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	X_3	0.0001	0.005025	0.01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	X_4	0.0841	0.12606	0.168
$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$	X_5	2.45	35.525	68.60

Optimal D 0.85331	N 5.6560 [0.140] 0.140	NaCl 2.10 [1.3047] 0.0280	Fe 0.010 [0.0001] 0.0001	Zn+Co 0.1680 [0.0985] 0.0841	PO4 68.60 [64.5909] 2.450
Composite Desirability 0.85331					
Biomass Maximum $y = 10.3864$ $d = 0.85331$					

ภาพผนวกที่ ค15 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยต่อการผลิตชีวมวลของแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ 54 กรัมต่อลิตร (การทดลองครั้งที่ 3)

ตารางผนวกที่ ค8 จำนวนปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดสำหรับการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken ในการผลิตชีวมวล โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาณ 54 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองครั้งที่ 4)

ปัจจัยการทดลอง	สัญลักษณ์	ระดับของปัจจัย		
		-1	0	+1
KNO ₃	X ₁	0.14	2.898	5.656
NaCl	X ₂	0.028	1.064	2.10
FeSO ₄ ·7H ₂ O	X ₃	0.0001	0.005025	0.01
ZnSO ₄ ·7H ₂ O + CoSO ₄ ·7H ₂ O	X ₄	0.0002	0.5401	1.08
KH ₂ PO ₄ + K ₂ HPO ₄	X ₅	2.45	42.875	83.30

Optimal D 1.0000	N 5.6560 [3.7059] 0.140	NaCl 2.10 [1.5140] 0.0280	Fe 0.010 [0.0054] 0.0001	Zn+Co 1.080 [0.0002] 0.0002	PO4 83.30 [83.30] 2.450
Composite Desirability 1.0000					
Biomass Maximum y = 16.8101 d = 1.0000					

ภาพผนวกที่ ค16 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยต่อการผลิตชีวมวลของแบคทีเรีย *Arthrobacter* AK19 โดยให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ 54 กรัมต่อลิตร (การทดลองครั้งที่ 4)

4. ตารางที่ใช้คำนวณค่าทางสถิติ

ตารางแสดงค่าแจกแจงปกติ F (F - Test) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

df ₂ \ df ₁		Numerator Degrees of Freedom								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Denominator Degrees of Freedom	1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54
	2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.330	19.353	19.371	19.385
	3	10.128	9.5521	9.2766	9.1172	9.0135	8.9406	8.8867	8.8452	8.8123
	4	7.7086	9.9443	6.5914	6.3882	6.2561	6.1631	6.0942	6.0410	6.9988
	5	6.6079	5.7861	5.4095	5.1922	5.0503	4.9503	4.8759	4.8183	4.7725
	6	5.9874	5.1433	4.7571	4.5337	4.3874	4.2839	4.2067	4.1468	4.0990
	7	5.5914	4.7374	4.3468	4.1203	3.9715	3.8660	3.7870	3.7257	3.6767
	8	5.3177	4.4590	4.0662	3.8379	3.6875	3.5806	3.5005	3.4381	3.3881
	9	5.1174	4.2565	3.8625	3.6331	3.4817	3.3738	3.2927	3.2296	3.1789
	10	4.9646	4.1028	3.7083	3.4780	3.3258	3.2172	3.1355	3.0717	3.0204
	11	4.8443	3.9823	3.5874	3.3567	3.2039	3.0946	3.0123	2.9480	2.8962
	12	4.7472	3.8853	3.4903	3.2592	3.1059	2.9961	2.9134	2.8486	2.7964
	13	4.6672	3.8056	3.4105	3.1791	3.0254	2.9153	2.8321	2.7669	2.7144
	14	4.6001	3.7389	3.3439	3.1122	2.9582	2.8477	2.7642	2.6987	2.6458
	15	4.5431	3.6823	3.2874	3.0556	2.9013	2.7905	2.7066	2.6408	2.5876
	16	4.4940	3.6337	3.2389	3.0069	2.8524	2.7413	2.6572	2.5911	2.5377
	17	4.4513	3.5915	3.1968	2.9647	2.8100	2.6987	2.6143	2.5480	2.4943
	18	4.4139	3.5546	3.1599	2.9277	2.7729	2.6613	2.5767	2.5102	2.4563
	19	4.3807	3.5219	3.1274	2.8951	2.7401	2.6283	2.5435	2.4768	2.4227
	20	4.3512	3.4928	3.0984	2.8661	2.7109	2.5990	2.5140	2.4471	2.3928
	21	4.3248	3.4668	3.0725	2.8401	2.6848	2.5727	2.4876	2.4205	2.3660
	22	4.3009	3.4434	3.0491	2.8167	2.6613	2.5491	2.4638	2.3965	2.3419
	23	4.2793	3.4221	3.0280	2.7955	2.6400	2.5277	2.4422	2.3748	2.3201
	24	4.2597	3.4028	3.0088	2.7763	2.6207	2.5082	2.4226	2.3551	2.3002
	25	4.2417	3.3852	2.9912	2.7587	2.6030	2.4904	2.4047	2.3371	2.2821
	26	4.2252	3.3690	2.9752	2.7426	2.5868	2.4741	2.3883	2.3205	2.2655
	27	4.2100	3.3541	2.9604	2.7278	2.5719	2.4591	2.3732	2.3053	2.2501
	28	4.1960	3.3404	2.9467	2.7141	2.5581	2.4453	2.3593	2.2913	2.2360
	29	4.1830	3.3277	2.9340	2.7014	2.5454	2.4324	2.3463	2.2783	2.2229
30	4.1709	3.3158	2.9223	2.6896	2.5336	2.4205	2.3343	2.2662	2.2107	
40	4.0847	3.2317	2.8387	2.6060	2.4495	2.3359	2.2490	2.1802	2.1240	
60	4.0012	3.1504	2.7581	2.5252	2.3683	2.2541	2.1665	2.0970	2.0401	
120	3.9201	3.0718	2.6802	2.4472	2.2899	2.1750	2.0868	2.0164	1.9588	
∞	3.8415	2.9957	2.6049	2.3719	2.2141	2.0986	2.0096	1.9384	1.8799	

ภาพผนวกที่ ค17 ตารางแจกแจงค่าปกติ F (F - Test) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

F - Distribution ($\alpha = 0.05$ in the Right Tail)

$df_2 \backslash df_1$		Numerator Degrees of Freedom									
		10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	241.88	243.91	245.95	248.01	249.05	250.10	251.14	252.20	253.25	254.31	
2	19.396	19.413	19.429	19.446	19.454	19.462	19.471	19.479	19.487	19.496	
3	8.7855	8.7446	8.7029	8.6602	8.6385	8.6166	8.5944	8.5720	8.5494	8.5264	
4	5.9644	5.9117	5.8578	5.8025	5.7744	5.7459	5.7170	5.6877	5.6581	5.6281	
5	4.7351	4.6777	4.6188	4.5581	4.5272	4.4957	4.4638	4.4314	4.3985	4.3650	
6	4.0600	3.9999	3.9381	3.8742	3.8415	3.8082	3.7743	3.7398	3.7047	3.6689	
7	3.6365	3.5747	3.5107	3.4445	3.4105	3.3758	3.3404	3.3043	3.2674	3.2298	
8	3.3472	3.2839	3.2184	3.1503	3.1152	3.0794	3.0428	3.0053	2.9669	2.9276	
9	3.1373	3.0729	3.0061	2.9365	2.9005	2.8637	2.8259	2.7872	2.7475	2.7067	
10	2.9782	2.9130	2.8450	2.7740	2.7372	2.6996	2.6609	2.6211	2.5801	2.5379	
11	2.8536	2.7876	2.7186	2.6464	2.6090	2.5705	2.5309	2.4901	2.4480	2.4045	
12	2.7534	2.6866	2.6169	2.5436	2.5055	2.4663	2.4259	2.3842	2.3410	2.2962	
13	2.6710	2.6037	2.5331	2.4589	2.4202	2.3803	2.3392	2.2966	2.2524	2.2064	
14	2.6022	2.5342	2.4630	2.3879	2.3487	2.3082	2.2664	2.2229	2.1778	2.1307	
15	2.5437	2.4753	2.4034	2.3275	2.2878	2.2468	2.2043	2.1601	2.1141	2.0658	
16	2.4935	2.4247	2.3522	2.2756	2.2354	2.1938	2.1507	2.1058	2.0589	2.0096	
17	2.4499	2.3807	2.3077	2.2304	2.1898	2.1477	2.1040	2.0584	2.0107	1.9604	
18	2.4117	2.3421	2.2686	2.1906	2.1497	2.1071	2.0629	2.0166	1.9681	1.9168	
19	2.3779	2.3080	2.2341	2.1555	2.1141	2.0712	2.0264	1.9795	1.9302	1.8780	
20	2.3479	2.2776	2.2033	2.1242	2.0825	2.0391	1.9938	1.9464	1.8963	1.8432	
21	2.3210	2.2504	2.1757	2.0960	2.0540	2.0102	1.9645	1.9165	1.8657	1.8117	
22	2.2967	2.2258	2.1508	2.0707	2.0283	1.9842	1.9380	1.8894	1.8380	1.7831	
23	2.2747	2.2036	2.1282	2.0476	2.0050	1.9605	1.9139	1.8648	1.8128	1.7570	
24	2.2547	2.1834	2.1077	2.0267	1.9838	1.9390	1.8920	1.8424	1.7896	1.7330	
25	2.2365	2.1649	2.0889	2.0075	1.9643	1.9192	1.8718	1.8217	1.7684	1.7110	
26	2.2197	2.1479	2.0716	1.9898	1.9464	1.9010	1.8533	1.8027	1.7488	1.6906	
27	2.2043	2.1323	2.0558	1.9736	1.9299	1.8842	1.8361	1.7851	1.7306	1.6717	
28	2.1900	2.1179	2.0411	1.9586	1.9147	1.8687	1.8203	1.7689	1.7138	1.6541	
29	2.1768	2.1045	2.0275	1.9446	1.9005	1.8543	1.8055	1.7537	1.6981	1.6376	
30	2.1646	2.0921	2.0148	1.9317	1.8874	1.8409	1.7918	1.7396	1.6835	1.6223	
40	2.0772	2.0035	1.9245	1.8389	1.7929	1.7444	1.6928	1.6373	1.5766	1.5089	
60	1.9926	1.9174	1.8364	1.7480	1.7001	1.6491	1.5943	1.5343	1.4673	1.3893	
120	1.9105	1.8337	1.7505	1.6587	1.6084	1.5543	1.4952	1.4290	1.3519	1.2539	
∞	1.8307	1.7522	1.6664	1.5705	1.5173	1.4591	1.3940	1.3180	1.2214	1.0000	

ภาพผนวกที่ ค17 (ต่อ)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	เกล็ดแก้ว รัตนปัญญาพันธุ์
เกิดวันที่	17 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2529
สถานที่เกิด	แพร่
ประวัติการศึกษา	วศ.บ (วิศวกรรมเคมี) มหาวิทยาลัยมหิดล
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-