



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดแยกและการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีน้ำมันสูงในน้ำทิ้ง
จากอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร

Screening and Cultivation of Oleaginous Bacteria in Food
Processing Industrial Wastewater

ผศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษ์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย

จากเงินงบประมาณรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554-2555

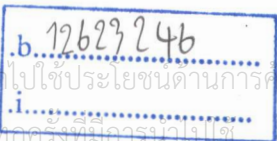
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นช

ค ๘๖๖๗

๒๕๕๔-๒๕๕๕



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
แม้ว่ากรณีใดก็ตาม ผู้ที่ห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลขหมู่ 137315

เลขทะเบียน 22 ส.อ. 2558

วันเดือนปี 22 ส.อ. 2558

ชื่อโครงการ การคัดแยกและการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีน้ำมันสูงในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรม
แปรรูปอาหาร

แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2554-2555

ประจำปีงบประมาณ 2554-2555 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 250,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม พ.ศ. 2553 ถึง กันยายน พ.ศ. 2555

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ผศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สจล.
2. ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกษ์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สจล.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ใช้เทคนิคการกวาดเชื้อร่วมกับการฉีดเชื้อในการคัดแยกกลุ่มของแบคทีเรียจากน้ำทิ้ง
โรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่แห่งหนึ่งในจังหวัดลพบุรี พร้อมทั้งศึกษาปริมาณลิพิดในแบคทีเรียที่
คัดแยกได้ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับการชั่งน้ำหนัก ผลจากการคัดแยกพบว่าได้
โคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียทั้งหมด 12 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 สามารถสะสมลิพิดได้
สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB คิดเป็นปริมาณลิพิดเท่ากับร้อยละ 27.20 ± 0.92 โดยน้ำหนักเซลล์
แห้ง จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16เอส ไรโบโซมอลอาร์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย R4.4
สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้เป็นสกุล *Aeromonas* จึงตั้งชื่อแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 นี้ว่า
Aeromonas sp. KMITL-R4.4 จากการศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงและองค์ประกอบของ
อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการ
เจริญและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ แสดงให้
เห็นว่าเซลล์มีปริมาณลิพิดสูงสุดเมื่ออยู่ในช่วงต้นของระยะพักตัว เซลล์ของแบคทีเรียดังกล่าวจะมีการ
เจริญเติบโตได้ดีและมีปริมาณลิพิดสูง เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสหรือฟรุคโตสเป็น
แหล่งคาร์บอน โดยมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน การปรับเพิ่มค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อ
ไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยวิธีการใดวิธีการหนึ่ง ได้แก่ (i) การลดความเข้มข้นของแอมโมเนียม
ซัลเฟตและกำหนดให้ความเข้มข้นของคาร์บอนในน้ำเสียสังเคราะห์มีค่าคงที่ หรือ (ii) การเพิ่มความ
เข้มข้นของกลูโคสและกำหนดให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์มีค่าคงที่ ทำให้
Aeromonas sp. KMITL-R4.4 มีการผลิตลิพิดได้มากขึ้น จากการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของน้ำทิ้ง
จากกระบวนการต้มเส้นขนมจีนพบว่า มีลักษณะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตลิพิด
นั้นคือมีอินทรีย์คาร์บอนในปริมาณสูงและมีค่าที่เคเอ็นไนโตรเจนในปริมาณที่ต่ำกว่ามากเมื่อเทียบกับ
คาร์บอน แต่ผลจากการเพาะเลี้ยงพบว่า การเติบโตของแบคทีเรียในน้ำทิ้งและผลิตผลของลิพิดที่ได้จาก
การเพาะเลี้ยงมีค่าต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB และน้ำเสียสังเคราะห์

คำสำคัญ : ลิพิดจากจุลินทรีย์, จุลินทรีย์สะสมน้ำมัน, ปัจจัยจากการเพาะเลี้ยง, น้ำเสียอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และส่งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Screening and Cultivation of Oleaginous Bacteria in Food Processing
Industrial Wastewater

Researcher: 1. Asst.Prof.Dr. Usarat Thawornchaisit¹
2. Asst.Prof.Dr. Saranya Phunpruch²

Faculty: Science

Department: ¹Chemistry, ²Biology

ABSTRACT

In this research, the bacterial associates were isolated from a poultry processing wastewater in Lopburi province using spread plate technique along with cross streak technique. In addition, cellular lipid contents of all isolated bacteria were determined using solvent extraction technique and gravimetry technique. Results from bacterial isolation showed that a total of 12 isolates of single bacterial colonies was obtained, and bacterial isolate R4.4 grown on LB Broth was found to produce highest lipids content of $27.20 \pm 0.92\%$ of cell dry weight. On the basis of 16S rDNA nucleotide sequence of the bacteria, the strain R4.4 was belonging to the genus *Aeromonas*. Therefore, it was designated as *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4. The study on time course and effects of culture media components including carbon sources, nitrogen sources and carbon-to-nitrogen ratio to growth and lipid contents of *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 revealed that cells have highest lipid contents during the early stationary growth phase. The bacterial cells grew well and had high lipid contents when cultivated in synthetic wastewater using glucose or fructose as carbon source and ammonium sulfate as nitrogen source. Increase in C/N ratio either by (i) decreasing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentrations with fixed amount of carbon source or (ii) increasing glucose concentrations with fixed amount of nitrogen source improved lipid production of *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4. Analysis of wastewater from cooking fermented rice noodles revealed that the water contained high amounts of organic carbon and small amounts of nitrogen in comparable to carbon contents in the water. This characteristic should make wastewater from cooking fermented rice noodles applicable for bacterial growth and lipid production. However, results from cultivation study showed that growth and lipid productivity in the wastewater was significantly lower than the results obtained from cultivation of bacteria in LB and synthetic wastewater

Keywords : Microbial lipid, oleaginous microorganisms, cultivation parameters, industrial processing wastewater

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และแจ้งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่แห่งหนึ่งในจังหวัดลพบุรี และโรงงานผลิตขนมจีน นิคมอุตสาหกรรมขนมจีน จังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการเก็บรวบรวมน้ำตัวอย่าง เพื่อใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียและการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ขอขอบใจนางสาวรัตติยา อ่องมะลิ ผู้ช่วยนักวิจัยที่มีส่วนทำให้การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูลในระหว่างการทำทดลองสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย ทำให้คณะผู้วิจัยสามารถนำความคิดสู่การปฏิบัติ ซึ่งช่วยให้เห็นผลที่เป็นรูปธรรม รวมทั้งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาตนเองในการด้านการงานวิจัยของคณะผู้วิจัย การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนวิจัยประเภทงานวิจัยเชิงบูรณาการและเชิงพาณิชย์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554-2555

ผศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์

ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พฤษ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 วิธีการดำเนินการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ลิขิตจากจุลินทรีย์	4
2.2 กลไกการสังเคราะห์กรดไขมัน	9
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตลิขิตของจุลินทรีย์	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	15
3.1 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง	15
3.1.1 แหล่งที่มาของน้ำทิ้งที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรีย	15
3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB	15
3.1.3 น้ำเสียสังเคราะห์ (synthetic wastewater, SW)	15
3.1.4 แหล่งที่มาของน้ำตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาความเป็นไปได้ในการบำบัดน้ำทิ้งและ การผลิตลิขิตของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	16
3.2 วิธีการทดลอง	17
3.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตลิขิตในปริมาณสูงจากน้ำทิ้งอุตสาหกรรม แปรรูปเนื้อไก่	17
3.2.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA	19
3.2.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิขิตของแบคทีเรีย ที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียสังเคราะห์	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ IV ข้างอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การศึกษาความเป็นไปได้ในการบำบัดน้ำทิ้งอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย	23
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	24
บทที่ 4 ผลการวิจัย	25
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่	25
4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิพิดในปริมาณสูง	26
4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA	27
4.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียสังเคราะห์	29
4.4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์	29
4.4.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์	31
4.4.3 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์	32
4.5 การศึกษาความเป็นไปได้ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย	35
4.5.1 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทิ้ง	35
4.5.2 การเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนเทียบกับน้ำเสียสังเคราะห์และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB	36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	40
5.1 สรุปผลการวิจัย	40
5.2 ข้อเสนอแนะ	41
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก ก	48
ภาคผนวก ข	51
ภาคผนวก ค	56

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปริมาณลิวตินของจุลินทรีย์บางสายพันธุ์.....	4
2.2 องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับน้ำมันพืช.....	7
2.3 แหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์.....	7
2.4 อัตราผลผลิต (Productivity) ของจุลสาหร่ายเทียบกับพืชน้ำมันที่ใช้ผลิตไบโอดีเซล.....	8
3.1 ส่วนประกอบของน้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษา.....	16
3.2 องค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA.....	21
3.3 สภาพที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA.....	21
3.4 พารามิเตอร์ที่ทำการวิเคราะห์ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน.....	24
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกจากบ่อฝังของโรงงานอุตสาหกรรม แปรรูปเนื้อไก่.....	25
4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn.....	29
4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิวตินของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์เป็น เวลา 36 ชั่วโมง.....	30
4.4 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน.....	35
4.5 คุณลักษณะของน้ำทิ้งภายหลังการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย.....	39
ก.1 ตารางแสดงการปิเปตสารละลายมาตรฐานกลูโคส.....	50
ค.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนต่อ ปริมาณลิวตินของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	56
ค.2 ผลการทดสอบหลังการวิเคราะห์ (Post hoc analysis) ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT): ชนิดของแหล่งคาร์บอน.....	56
ค.3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนต่อ ปริมาณลิวตินของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	57
ค.4 ผลการทดสอบหลังการวิเคราะห์ (Post hoc analysis) ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT): ชนิดของแหล่งไนโตรเจน.....	57
ค.5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นไนโตรเจน ต่อปริมาณลิวตินของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	58
ค.6 ผลการทดสอบหลังการวิเคราะห์ (Post hoc analysis) ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT): ความเข้มข้นของไนโตรเจน.....	58

ค.7 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นกลูโคสต่อปริมาณลิตของแบคทีเรีย Aeromonas sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์	59
ค.8 ผลการทดสอบหลังการวิเคราะห์ (Post hoc analysis) ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT): ความเข้มข้นของกลูโคส	59



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 กลไกการสังเคราะห์ไขมันของ Oleaginous Yeasts.....	10
3.1 แสดงระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่และจุดเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรีย.....	15
3.2 แผนภาพการทดลอง.....	17
3.3 เทคนิคการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ cross streak.....	18
4.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth นาน 72 ชั่วโมง เมื่อ (ก) โคโลนีทรงกลมผิวหน้าเรียบและมีสีเหลือง (ข) โคโลนีทรงกลมผิวหน้าเรียบ สีขาว (ค) โคโลนีทรงกลมผิวหน้าเรียบ สีครีม และ (ง) โคโลนีทรงกลมผิวหน้าขรุขระ สีครีม.....	26
4.2 ปริมาณลิวตินของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนักของเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB Broth นาน 72 ชั่วโมง.....	27
4.3 PCR Product ที่ได้จากการทำ genome walking โดยการเพิ่มจำนวนของยีน 16S rDNA เมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 (lane 1) เทียบกับเมื่อใช้ DNA size marker λ DNA/ HindIII (lane M) และน้ำกลั่น (lane 2).....	28
4.4 (ก) ความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) และ (ข) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต (●), ยูเรีย (■), แอมโมเนียมคลอไรด์ (△) และ โซเดียมไนเตรท (◇).....	31
4.5 ปริมาณลิวติน (Lipid content, ◆) และน้ำหนักแห้ง (□) ของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกันนาน 36 ชั่วโมง.....	32
4.6 ผลของ C/N ratio ต่อการเติบโตและการผลิตลิวตินของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์นาน 36 ชั่วโมง เมื่อ (ก) คือแปรค่าความเข้มข้นของไนโตรเจน โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของคาร์บอนมีค่าคงที่ และ (ข) แปรค่าความเข้มข้นของคาร์บอนโดยกำหนดให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนมีค่าคงที่.....	33
4.7 การเจริญเติบโตและการผลิตลิวตินของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ใน LB broth (○), น้ำเสียสังเคราะห์ (□), น้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน (△) และ น้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนเมื่อเติมกลูโคสเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (×).....	37
ข.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท R.4 เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่มีการรายงานไว้ใน GenBank.....	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อนุญาตเห็นาเบเซบระเยชชานการการค่า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ VIII อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ลิพิดจากจุลินทรีย์ (Microbial lipids) จัดเป็นวัตถุดิบทดแทนน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ที่ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์มาตั้งแต่ช่วงทศวรรษ 80s^[1] เนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดไขมันที่คล้ายคลึงกับน้ำมัน/ไขมันจากพืชและสัตว์^[2] จนทำให้มีแนวคิดในการนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดไขมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) เช่น กรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (Docosahexaenoic acid; DHA), กรดไอโคซาเพนทาอีโนอิก (Eicosapentaenoic acid; EPA) และกรดอาราคิโดนิก (Arachidonic acid; ARA) ซึ่งนิยมใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ^[1, 3] อีกทั้งการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ใช้เวลาและพื้นที่น้อยกว่าการปลูกพืชน้ำมัน การเพาะเลี้ยงสามารถทำได้ตลอดปีไม่ขึ้นกับฤดูกาลและสภาพภูมิอากาศ รวมทั้งสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงได้^[4, 5] ประกอบกับลิพิดจากจุลินทรีย์ที่ผลิตน้ำมันหลายชนิด (Oleaginous microorganisms) ยังมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงเหลวจำพวกอัลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid mono alkyl ester, FAAE) หรือไบโอดีเซล^[4, 6] ทำให้แนวคิดเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์ของลิพิดจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจมากขึ้น

ปัจจุบันงานวิจัยเรื่องการผลิตลิพิดจากจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล ส่วนใหญ่ศึกษาในสาหร่ายขนาดเล็ก ยีสต์ และรา เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผลิตและสะสมลิพิดจำพวกไตรเอซิลกลีเซอรอลได้เช่นเดียวกับพืชน้ำมันภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม^[5-9] รวมทั้งปริมาณลิพิดที่สะสมภายในเซลล์อาจมีสูงถึงร้อยละ 80 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง^[7, 10] นอกจากนี้การใช้ลิพิดจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาหร่ายยังให้ผลผลิตของไบโอดีเซล (Productivity) สูงกว่าพืชน้ำมัน ตัวอย่างเช่น การผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ให้ผลผลิตน้ำมันสูงถึง 8,200 L/ha/yr เทียบกับ 544 L/ha/yr และ 1,560 L/ha/yr ที่ได้จากน้ำมันถั่วเหลืองและสบู่ดำตามลำดับ^[4,7] ในขณะที่แบคทีเรียบางชนิดอย่างเช่น *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, หรือ *Nocardia* สามารถสะสมลิพิดจำพวกไตรเอซิลกลีเซอรอล^[6, 11] แต่พบว่าการศึกษาในเรื่องปริมาณและองค์ประกอบของไตรเอซิลกลีเซอรอลที่สะสมในแบคทีเรียมีอยู่ค่อนข้างจำกัดเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสาหร่าย ยีสต์ และรา อีกทั้งแบคทีเรียมีข้อได้เปรียบในด้านการเพาะเลี้ยงที่เหนือกว่าจุลินทรีย์อื่น คือ เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว การเพาะเลี้ยงง่าย และยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิด^[7] นอกจากนี้งานวิจัยในเรื่องการคัดแยกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสะสมลิพิดจากแหล่งน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมภายในประเทศยังมีน้อยมาก

โครงการวิจัยนี้จึงถูกจัดทำขึ้นเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตลิพิดจากน้ำทิ้งของ

อุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร รวมทั้งศึกษาผลของสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโต และการผลิตลิตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียสังเคราะห์ ตลอดจนศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารที่สามารถสะสมลิตินในปริมาณสูงได้
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียสังเคราะห์
3. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารและการผลิตลิตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีระยะเวลาในการศึกษาวิจัย 2 ปี เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2555 และมีขอบเขตการวิจัยแบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอนใหญ่ดังนี้คือ

ขั้นตอนที่ 1 คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีและสะสมลิตินได้ในปริมาณสูงจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่

ขั้นตอนที่ 2 จำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนที่ 1 โดยใช้เทคนิคการศึกษาลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ชนิดของแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาความเป็นไปได้ในการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตขนมจีนและการผลิตลิตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

ขั้นตอนที่ 5 การวิเคราะห์ สรุปผล จัดทำรายงานและนำเสนอผลงาน

1.4 วิธีการดำเนินการวิจัย

แนวทางในการทำวิจัยมีรายละเอียดการดำเนินงานดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตลิตินได้ในปริมาณสูงจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร ในขั้นตอนนี้จะแบ่งวิธีการดำเนินงานออกเป็น 3 ขั้นตอนย่อยได้แก่

- 1) การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากจุดต่างๆของบ่อฝังที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่แห่งหนึ่งในจังหวัดลพบุรี ด้วยวิธีการเก็บแบบผสมรวมแต่ละจุดเก็บ (Integrated sampling)

- 2) คัดแยกแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร LB จนได้โคโลนีเดียวด้วยเทคนิคแบบกวาดเชื้อ (spread plate technique) ร่วมกับเทคนิคการขีดเชื้อแบบซับซ้อน (cross streak technique)

เอกสารนี้เป็นเอกสารทรัพย์สินทางปัญญาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่สามารถนำออกเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตเห็นเป็นเชิงประนีประนอมในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) การศึกษารูปแบบอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณลิวตินของแบคทีเรียแต่ละโคลนที่แยกได้ ด้วยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวสูตร LB จากนั้นวัดค่าความขุ่นที่ระยะเวลาต่างๆกันและวิเคราะห์ปริมาณลิวตินด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับเทคนิคการชั่งน้ำหนัก

ขั้นตอนที่ 2 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนที่ 1 โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เริ่มจากการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส นำผลิตภัณฑ์ PCR ไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิวตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยการทำการทดลองแบบแบทช์ โดยปัจจัยที่ทำการศึกษได้แก่ ชนิดของแหล่งคาร์บอน (น้ำตาล และกรดอินทรีย์ระเหยง่าย) ชนิดของแหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจน ทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการแปรค่าประเภทของแหล่งคาร์บอน ประเภทของแหล่งไนโตรเจน หรืออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจน จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณลิวตินด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับการชั่งน้ำหนัก รวมทั้งศึกษาองค์ประกอบของลิวตินที่สกัดได้ด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาความเป็นไปได้ในการบำบัดน้ำทิ้งอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารและการผลิตลิวตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ซึ่งวิธีการดำเนินงานจะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนย่อยได้แก่

1) การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนพารามิเตอร์ที่ทำการวัดได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (TOC) ปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic acids) ปริมาณทีเคเอ็นไนโตรเจน (Total Kjehdal nitrogen, TKN) ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน (Ammonia-nitrogen) ไนเตรทไนโตรเจน (nitrate-nitrogen) และปริมาณจุลชีพแขวนลอย (Mixed liquor suspended solids, MLSS)

2) ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน จากนั้นวัดการเจริญเติบโตและการผลิตลิวติน รวมทั้งตรวจวัดคุณภาพของน้ำทิ้งที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB และน้ำเสียสังเคราะห์

ขั้นตอนที่ 5 การประมวลผล สรุปผล จัดทำรายงานและนำเสนอผลงานทางวิชาการ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิดของสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตลิวตินได้ รวมทั้งทราบชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันในลิวตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
2. ทราบปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิวตินของแบคทีเรียที่คัดเลือก
3. ได้แหล่งวัตถุดิบทางเลือกที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลิพิดจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์จัดเป็นแหล่งของกรดไขมันที่สำคัญหลายชนิด เนื่องจากสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวจำพวก โปรโตซัว อะมีบา จุลสาหร่าย ตลอดจนจุลินทรีย์ต่างๆ จะมีการสังเคราะห์ไขมันเพื่อทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับโครงสร้างเมมเบรนของจุลินทรีย์^[8] ทำให้จุลินทรีย์ทุกชนิดล้วนแล้วแต่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบของเซลล์ทั้งสิ้น โดยจะมีปริมาณมากหรือน้อยแตกต่างกันไปตามชนิด-สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ แหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์นั้นๆ^[3] รวมไปถึงวิธีการและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงดังแสดงในตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตและสะสมไขมันได้มากกว่า 20 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เรียกจุลินทรีย์ดังกล่าวว่า *จุลินทรีย์ผลิตไขมัน (Oleaginous microorganisms)*^[4, 9]

ตารางที่ 2.1 ปริมาณลิพิดของจุลินทรีย์บางสายพันธุ์^[4, 10, 11]

ชนิดของจุลินทรีย์	วิธีการเลี้ยง	แหล่งคาร์บอนที่ใช้	ปริมาณลิพิด (Lipid content % w/w)
แบคทีเรีย (Bacteria)			
<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	shake	gluconate	52.2
<i>Rhodococcus ruber</i>	shake	glucose	35.0
<i>Arthobacter</i> sp.	n/a	n/a	40
<i>ACP netobacter calcoaceticus</i>	n/a	n/a	27.28
<i>Streptomyces albus</i>	n/a	glucose	2.2
<i>Streptomyces coelicolor</i>	n/a	glucose	3.8
<i>Streptomyces griseus</i>	n/a	glucose	2.8
<i>Streptomyces lividans</i>	n/a	glucose	4.6
ยีสต์ (Yeast)			
<i>Candida curvata</i> D	fermenter	whey	50.0
<i>Candida lipolytica</i>	shake	glucose	36.0
<i>Candida paralipotica</i>	shake	glucose	32.0
<i>Cryptococcus terricolus</i>	shake and fermenter	glucose	55.0-65.0
<i>Lipomyces lipofer</i> IF00673	shake	glucose	63.5
<i>Lipomyces lipofer</i> CBS 944	shake	glucose	37.0
<i>Lipomyces lipofer</i> 199	shake	pentoxide	44.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่เผยแพร่โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	วิธีการเลี้ยง	แหล่งคาร์บอนที่ใช้	ปริมาณลิปิด (Lipid content % w/w)
ยีสต์ (Yeast)			
<i>Lipomyces starkeyi</i> IF00678	shake	glucose	43.0
<i>Lipomyces starkeyi</i>	fermenter	glucose	37.0
<i>Lipomyces starkeyi</i> IAM4753	shake	glucose	15.0
<i>Lipomyces tetrasporus</i> sp.	shake	glucose/urea	16.0-64.0
<i>Lipomyces</i> sp. No. 33	shake	glucose	67.0
<i>Lipomyces</i> sp. No. 33	shake	xylose	48.0
<i>Lipomyces</i> sp. No. 33	shake	wastes and molasses	66.0
<i>Rhodotorula gracillis</i>	shake and fermenter	molasses	40.0
<i>Rhodotorula gracillis</i>	fermenter	glucose	57.0-64.0
<i>Rhodotorula gracillis</i>	fermenter	corn sugar	48.0
<i>Rhodotorula gracillis</i>	fermenter	ethanol	62.0
<i>Rhodotorula gracillis</i>	fermenter	alkanes	32.0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	shake	glucose	49.0-71.0
<i>Trichosporon cutaneum</i>	fermenter	glucose	45
รา (Fungi)			
<i>Aspergillus flavus</i>	static	glucose	28.0
<i>Aspergillus minutus</i>	static	glucose	35.0
<i>Aspergillus nidulans</i>	static	glucose	27.0-51.0
<i>Aspergillus terreus</i>	static	sucrose	51.0-57.0
<i>Chaetomium globosum</i>	static	lactose	54.0
<i>Fusarium</i> sp.	shake	whey	30.0-39.0
<i>Cunninghamella</i> sp.	shake	glucose	45.0-56.0
<i>Mocor circinelloides</i>	shake and static	glucose	45.0-65.0
<i>Mortierella vinacea</i>	shake	various carbon sources	25.0-66.0
สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae)			
<i>Botryococcus braunii</i>	n/a	n/a	25.0-75.0
<i>Cylindrotheca closterium</i>	n/a	n/a	27.0
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	n/a	n/a	28.0
<i>Chlorella vulgaris</i>	n/a	n/a	30.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	วิธีการเลี้ยง	แหล่งคาร์บอนที่ใช้	ปริมาณลิปิด (Lipid content % w/w)
สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae)			
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	n/a	n/a	72.0
<i>Chlorosarcinopsis negevinsis</i>	n/a	n/a	32.0
<i>Nizschia sp.</i>	n/a	n/a	45.0-47.0
<i>Schizochytrium sp.</i>	n/a	n/a	50.0-77.0
<i>Scenedesrus sp. 3</i>	n/a	n/a	25.0

n/a = not available

ด้วยเหตุที่ความต้องการในการบริโภคน้ำมันและไขมันนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดมา ทั้งเพื่อใช้เป็นอาหารและเพื่อประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่นการป้องกันและรักษาโรคในร่างกายของมนุษย์ ทำให้ลืมหินจากจุลินทรีย์จัดเป็นวัตถุดิบทางเลือกที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษามากมาย เพื่อใช้เสริมและทดแทนน้ำมันจากพืชและไขมันจากสัตว์^[1] โดยมีเหตุผลสำคัญดังนี้

1. ไขมันจากจุลินทรีย์มีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกับน้ำมันพืชซึ่งแสดงในตารางที่ 2.2
2. ไขมันจากจุลินทรีย์บางชนิดยังประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะ (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) ที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์และมีความสำคัญต่อสุขภาพดังแสดงในตารางที่ 2.3 ทำให้ไขมันจากจุลินทรีย์เหล่านี้บางชนิดมีคุณค่ามาก (Certik and Shimizu, 1999 อ้างถึงในธัญวัฒน์^[12])
3. จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญที่สูงมากและสามารถใช้สารตั้งต้นในการเจริญเติบโตหรือสืบสเตรทได้หลากหลาย (Certik and Shimizu, 1999 อ้างถึงในธัญวัฒน์^[12]) ทำให้ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงและเนื้อที่ที่ใช้ในการผลิตน้อยกว่า^[4, 5] รวมทั้งมีอัตราการให้ผลผลิต (Productivity) สูงกว่าเมื่อเทียบกับพืชน้ำมัน (ตารางที่ 2.4) ส่งผลให้มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่า
4. การควบคุมสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สามารถทำได้ง่ายกว่า^[11] ทำให้สามารถผลิตไขมันได้ตลอดปี โดยไม่ขึ้นกับฤดูกาลและภูมิประเทศ
5. จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ควบคุมโดยสารอาหารอาจไปกระตุ้นหรือยับยั้งขั้นตอนสำคัญในการสร้างกรดไขมัน ทำให้สามารถปรับปรุงผลผลิตและองค์ประกอบของกรดไขมันได้ (Certik and Shimizu, 1999 อ้างถึงในธัญวัฒน์^[12])

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับน้ำมันพืช

แหล่งที่มา	ชนิดและปริมาณ (%) ของกรดไขมันที่พบ					
	Palmitic acid (C16:0)	Palmitoleic acid (C16:1)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)
แบคทีเรีย^[10]						
<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	25.70	9.50	3.50	22.0	-	-
<i>Rhodococcus opacus</i> UFA4	47.10	17.80	18.80	6.40	-	-
รา^[13]						
<i>Aspergillus nidulans</i>	14.50	-	-	30.80	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	29.50	-	-	52.40	-	-
ยีสต์^[14]						
<i>Rhodotorula glutinis</i>	37	4	7	48	3	-
<i>Yarrowia lipolytica</i>	11	6	1	28	51	1
<i>Candida lipolytica</i>	14.0	11.0	5.0	60.0	11.0	-
จุลสาหร่าย^[15]						
<i>Codium fernandezianum</i>	29.27	-	0.50	15.14	8.25	16.93
<i>Codium dimorphum</i>	54.49	-	0.24	20.39	2.17	9.83
น้ำมันพืช^[2]						
น้ำมันรำ	16.90	0.20	1.60	39.10	33.40	1.60
น้ำมันถั่วเหลือง	10.30	0.20	3.80	22.80	51.00	6.80
น้ำมันมะพร้าว	8.20	0.20	2.80	2.80	1.80	-
น้ำมันปาล์ม	43.50	0.30	4.30	36.60	9.10	0.20
น้ำมันสุปุดำ	26.72	0.22	3.67	33.82	13.77	0.40

ตารางที่ 2.3 แหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์

ชนิดของ PUFAs	แหล่งที่มาในปัจจุบัน	แหล่งของจุลินทรีย์
γ -linolenic acid (GLA)	พืช (Evening primrose, Borage, Blackcurrant)	รา (<i>Mucor circinelloides</i> , <i>Mucor mucedo</i> , <i>Mortierella isabellina</i> , <i>Cunninghamella echinulata</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Cunninghamella japonica</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Thamnidium elegans</i>) สาหร่าย (<i>Spirulina platensis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

ชนิดของ PUFAs	แหล่งที่มาในปัจจุบัน	แหล่งของจุลินทรีย์
Dihomo- γ -linolenic acid (DGLA)	นมมรดา เนื้อเยื่อสัตว์ ปลา (<i>Scomber scombrus</i>) มอส (<i>Pogonatum urnigerum</i>)	รา (<i>Mortierella</i> spp., โดยเฉพาะ <i>Mortierella alpine</i> , <i>Saprolegnia ferax</i>)
Arachidonic acid (AA)	เนื้อเยื่อสัตว์ ปลา (<i>Brevoortia clupea</i>) มอส (<i>Ctenidium molluscum</i>)	รา (<i>Mortierella alpine</i> , <i>Conidiobolus nanodes</i> , <i>Entomophthora exitalis</i> , <i>Blastocladiella emersonii</i>) สาหร่าย (<i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Sargassum salicifolium</i> , <i>Euglena gracillis</i>)
Eicosapentaenoic (EPA)	ปลา (herring, menhaden) หอย (blue crab, oyster, lobster, mussel)	รา (<i>Mortierella alpine</i> , <i>Mortierella elongate</i> , <i>Pythium irregular</i> , <i>Pythium ultimum</i>) สาหร่าย (<i>Chlorella minutissima</i> , <i>Polysiphonia latifolium</i> , <i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Amphidinium carteri</i> , <i>Thalassiosira pseudonana</i>) แบคทีเรีย (<i>Shewanella putrefaciens</i>)
Docosahexaenoic (DHA)	ปลา (tuna, herring, cod, sardine, salmon, menhaden) หอย (blue crab, mussel, lobster, oyster)	รา (<i>Thraustochytrium aureum</i> , <i>Thraustochytrium roseum</i> , <i>Schyzochytrium SR21</i> , <i>Schyzochytrium aggregatum</i>)

ที่มา: Certik and Shimizu, 1999 อ้างถึงในธัญวัฒน์^[12]

ตารางที่ 2.4 อัตราผลผลิต (Productivity) ของจุลสาหร่ายเทียบกับพืชน้ำมันที่ใช้ผลิตไบโอดีเซล

แหล่งไขมัน	ชีวมวล (Mt/ha/yr)	ปริมาณน้ำมัน (% โดยน้ำหนักแห้ง)	ไบโอดีเซล (Mt/ha/yr)	ค่าพลังงาน (boe/1000ha/day)
ถั่วเหลือง (soya)	1-2.5	20	0.2-0.5	3-8
เมล็ดพืชตระกูลเรพ (rape seed)	3	40	1.2	22
ปาล์มน้ำมัน (palm oil)	19	20	3.7	63
สบู่ดำ (Jatropha)	7.5-10	30-50	2.2-5.3	40-100
จุลสาหร่าย (microalgae)	140-255	35-65	50-100	1,150-2,000

ที่มา: <http://www.hrbp.com/Algae/images/comparison-table-oil-crops.jpg> อ้างถึงในผกาวิไลและแพรวพิลาศ^[16]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

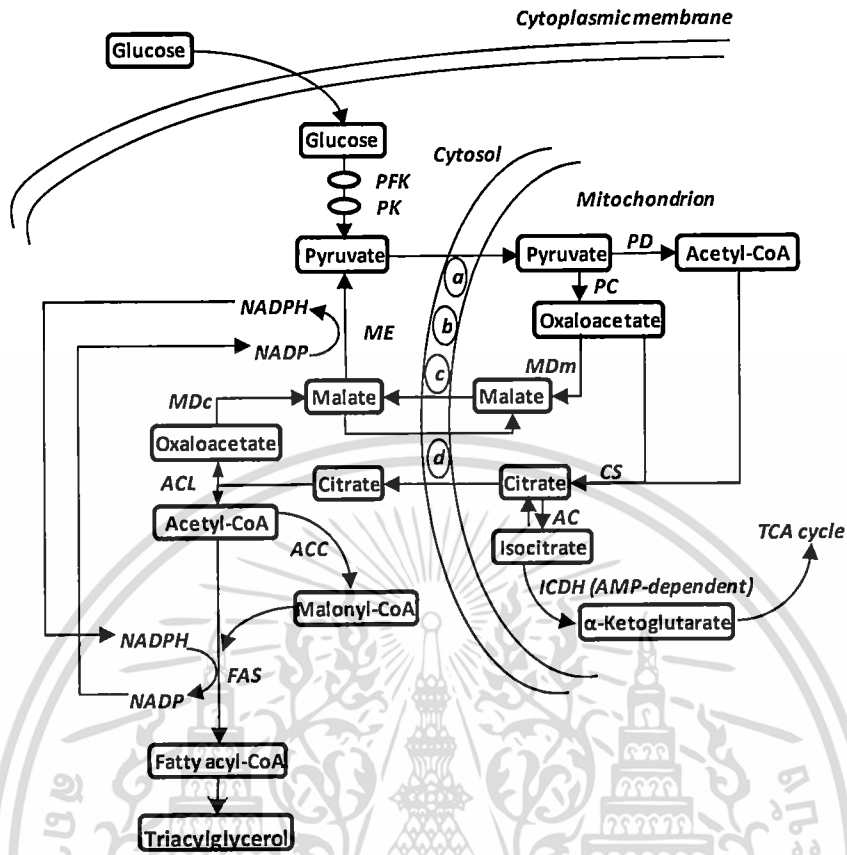
ในสภาวะทั่วไปของการเพาะเลี้ยง จุลินทรีย์มีการผลิตลิพิดเพื่อเป็นส่วนประกอบที่สำคัญต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเมมเบรน จุลินทรีย์จะสะสมลิพิดในรูปไขมันและน้ำมันไว้ภายในเซลล์มากขึ้นเมื่อเซลล์ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไนโตรเจนอยู่อย่างจำกัด และมีแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่มากเกินไป^[4, 10, 17, 18] การขาดแคลนแหล่งไนโตรเจนจะทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถสร้างสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์ ได้แก่ โปรตีน กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก และทำให้เซลล์เติบโตได้ช้าลงหรือหยุดการเจริญเติบโต^[18] การสลายตัวของแหล่งคาร์บอนจะทำให้เกิดการสะสม NADPH ซึ่งจะถูกผลักดันให้เซลล์เข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ไขมันมากขึ้น^[11, 19] ลักษณะการสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์แตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ การเก็บไขมันไว้ในรูปหยดน้ำมัน (Oil droplets) ซึ่งจะแขวนลอยอยู่ในไซโตพลาสซึม พบได้มากในกรณีของยีสต์ รา และจุลสาหร่าย ในขณะที่แบคทีเรียจะสะสมไขมันไว้ที่ cell envelope^[11] ไขมันที่สะสมไว้ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ประกอบด้วยไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerols, TAGs) เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้สามารถพบไข (waxes) และสารประกอบจำพวกโพลีเอสเตอร์ (Polyesters) เป็นส่วนประกอบได้ในจุลินทรีย์บางชนิด^[20-22] Alvarez, Klascheuer และ Steinbüchel^[22] ศึกษาเมตาบอลิซึมของลิพิดในแบคทีเรียกลุ่ม *Rhodococcus* sp. พบว่าเซลล์ของ *Rhodococcus ruber* ในช่วงปลายของระยะแบ่งตัว (Late exponential growth phase) และในช่วงระยะพักตัว (Stationary phase) สังเคราะห์และสะสมลิพิดในรูปของ TAGs และสารประกอบโพลีเอสเตอร์จำพวก Polyhydroxyalkonate ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งคาร์บอนอยู่อย่างพอเพียง แต่มีไนโตรเจนอยู่อย่างจำกัด

2.2 กลไกการสังเคราะห์กรดไขมัน

การสังเคราะห์ไขมันของจุลินทรีย์พวก Oleaginous ส่วนใหญ่เกิดในไซโตพลาสซึม โดยใช้อะซิลโคเอนไซม์เอ (Acetyl coenzymeA, Acetyl CoA) เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน^[11, 23] กลูโคสจะเป็นแหล่งที่มาสำคัญของ Acetyl CoA สำหรับยีสต์ผลิตไขมันสูง (Oleaginous yeasts) ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์ไขมันเริ่มจากการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวท (Pyruvate) ในไซโตพลาสซึมด้วยวิถีไกลโคลอลิซิส จากนั้นไพรูเวทจะถูกนำเข้าสู่ไมโทคอนเดรียและเปลี่ยนเป็น Acetyl CoA ดังแสดงในรูปที่ 2.1 แต่เนื่องจาก Acetyl CoA ไม่สามารถซึมผ่านผนังของไมโทคอนเดรียออกสู่ไซโตพลาสซึมได้โดยตรง ทำให้ยีสต์จำเป็นต้องใช้วิธีการดังต่อไปนี้ในการนำเอา Acetyl CoA ออกสู่ไซโตพลาสซึม^[11]

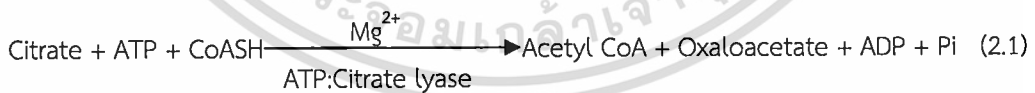
i) เกิดปฏิกิริยา deacylation กลายเป็น acetate ซึ่งผ่านออกสู่ไซโตพลาสซึมได้และจะถูกเปลี่ยนเป็น Acetyl CoA อีกครั้งโดยเอนไซม์ Acetic thiokinase ซึ่งพบมากในไซโตพลาสซึม

ii) เกิดปฏิกิริยา condensation กับ oxaloacetate ซึ่งเป็นสารตัวกลางในวัฏจักร Tricarboxylic ภายในไมโทคอนเดรียกลายเป็นซิเตรท (citrate) ผ่านออกมาอยู่ในไซโตพลาสซึมดังแสดงในรูปที่ 2.1 จากนั้นเกิดการแตกตัวของ Citrate โดยมีเอนไซม์ที่สำคัญคือ ATP:Citrate lyase

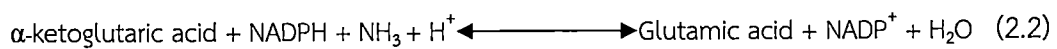


ภาพที่ 2.1 กลไกการสังเคราะห์ไขมันของ Oleaginous Yeasts
ที่มา : Certik and Shimizu (1998) อ้างถึงในธัญวัฒน์^[12]

(ACL) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการแตกตัวของ Citrate ให้กลายเป็น Oxaloacetate ซึ่งสามารถผ่านกลับเข้าไปในไมโทคอนเดรีย และ Acetyl CoA ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมันดังสมการ 2.1



iii) Citrate ซึ่งอาจไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียได้ดีพอ จะถูกเปลี่ยนเป็น α -ketoglutarate ในวัฏจักร Tricarboxylic และเปลี่ยนเป็น Glutamate ในไมโทคอนเดรียดังแสดงในสมการ 2.2 ซึ่ง Glutamic acid จะผ่านเข้าไปในไซโทพลาสซึมและเปลี่ยนเป็น Oxaloacetate และ Acetyl CoA ในที่สุด

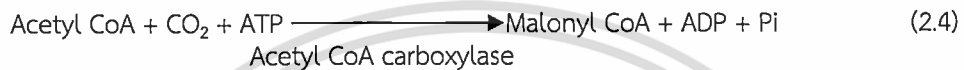


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

iv) เกิดการรวมตัวคาร์นิทีน (carnitine) ได้เป็น acetyl carnitine ซึ่งซึมผ่านไมโทคอนเดรีย แล้วทำปฏิกิริยากับ CoA เปลี่ยนเป็น Acetyl CoA และ Carnitine อีกครั้งในไซโตพลาสซึม ดังสมการ 2.3



Acetyl CoA ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมจะถูกเปลี่ยนเป็น Malonyl CoA ซึ่งเป็นคาร์บอนสามอะตอมเพื่อต่อสายกรดไขมันให้ยาวขึ้น ปฏิกิริยานี้เป็นขั้นตอนจำกัดอัตรา (rate limiting step) ที่จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ Acetyl CoA carboxylase (ACC) ดังสมการ 2.4 ^[12, 23]



จากนั้น Malonyl CoA จะทำปฏิกิริยากับ Acetyl CoA โดยมี Fatty acid Synthase (FAS) ซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มี Acyl Carrier Protein (ACP) เป็นส่วนประกอบ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาจนได้ butyryl-ACP เป็นผลผลิต ซึ่งในกรณีของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ butyryl-ACP จะเป็นดังสมการที่ (2.5) ถึงสมการ (2.10) ^[24]



Butyryl-ACP (C₄) จะเข้าทำปฏิกิริยากับ Malonyl-CoA โดยปฏิกิริยาที่แสดงในสมการ (2.7)-(2.10) จะเกิดขึ้นซ้ำๆ ไป โดยแต่ละครั้งที่รับ Malonyl-CoA ใหม่ 1 ตัวจะได้ Fatty acyl-ACP ที่มีคาร์บอนเพิ่มขึ้นทีละสองตัวเป็น Craproyl-ACP (C₆) จนถึง palmityl-ACP (C₁₆) เอนไซม์ชุดนี้จะหยุดทำงาน และ palmityl-ACP จะถูกย่อยสลาย โดยเอนไซม์ deacylase ได้กรดปาล์มมิติก ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัวยาวที่สุดที่จะสร้างได้ด้วยเอนไซม์กลุ่มนี้ ^[23] จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดไขมันจะเห็นว่าต้องใช้ปริมาณ NADPH เป็นจำนวนมากสำหรับขั้นตอนรีดักชัน ทำให้ในสภาวะที่มีการขาดแคลนแหล่ง

ไนโตรเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อและทำให้การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกหรือโปรตีนซึ่งเป็นกระบวนการใช้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NADPH ซ้ำลงหรือหยุดไป ผลที่ตามมาคือ NADPH เกิดการสะสมในเซลล์มากขึ้น และถูกผลักดันไปใช้ในการสร้างกรดไขมันของเซลล์มากขึ้น ทำให้จุลินทรีย์มีการผลิตไขมันเพิ่มขึ้น^[11]

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของจุลินทรีย์

ปริมาณไขมันและชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในลิวทิคที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นจะมีมาก-น้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ นอกจากนี้สภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะอย่างยิ่งองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร ก็จัดเป็นปัจจัยสำคัญที่มีบทบาทต่อปริมาณและชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในไขมันของจุลินทรีย์ การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนในปริมาณมากเกินไป และมีการจำกัดปริมาณของสารอาหารอื่นๆ โดยเฉพาะไนโตรเจน จัดเป็นขั้นตอนพื้นฐานที่ทำให้เกิดการสะสมไขมันปริมาณสูงในจุลินทรีย์^[4, 9, 17, 25, 26] หัวข้อนี้จะทบทวนปัจจัยบางประการเกี่ยวกับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการสังเคราะห์ไขมันของจุลินทรีย์สะสมน้ำมัน

2.3.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนไม่เพียงแต่มีผลต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ ยังจัดว่ามีบทบาทสำคัญต่อการสังเคราะห์ไขมันของจุลินทรีย์ สารชีวโมเลกุลจำพวกคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลูโคส จัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ผลิตน้ำมัน ทั้ง ยีสต์ รา แบคทีเรียหรือจุลสาหร่าย^[19, 27, 28] Yokochi และคณะ^[29] ได้รายงานผลการศึกษาดังอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดไขมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง docosahexaenoic acid (DHA) ในรา *Schizochytrium limacinium* SR21 พบว่าการเพาะเลี้ยงราดังกล่าวในกลูโคสและฟรุคโตสจะได้น้ำมันเซลล์แห้งและปริมาณกรดไขมันทั้งหมดในระดับสูงกว่าเมื่อเทียบกับน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharides) ได้แก่ แลคโตสและมอลโทส รวมไปถึงโพลีแซคคาไรด์ เช่น แป้ง (starch) ข้อจำกัดที่สำคัญของการใช้กลูโคสหรือฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนคือต้นทุนในการผลิตสูง^[30] ทำให้การศึกษาหาแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นที่มีราคาถูก เช่น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (agro-industry wastes)^[31, 32] กากน้ำตาล (molasses)^[33] ของเหลวที่เหลือจากการกลั่นเอทานอล (thin stillage)^[34] และกลีเซอรอลดิบที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซล^[34, 35] เป็นหัวข้อที่หลายฝ่ายให้ความสนใจ นอกจากนี้กรดอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile fatty acids, VFAs) ทั้งในรูปแบบสารบริสุทธิ์และสารผสม จัดเป็นแหล่งคาร์บอนอีกชนิดที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ผลิตน้ำมัน^[30, 36-38] เนื่องจากกรดอินทรีย์สามารถย่อยสลายกลายเป็น Acetyl CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ไขมัน^[39] Fei และคณะ^[30] ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของ *Cryptococcus albidus* โดยใช้ VFAs เป็นแหล่งคาร์บอน ผลจากการศึกษาพบว่า *Cryptococcus albidus* สามารถสะสมปริมาณไขมันได้สูงถึงร้อยละ 27.8 น้ำมันเซลล์เมื่อใช้กรดอินทรีย์ผสมระหว่าง acetic, propionic และ butyric acids ในอัตราส่วน 8:1:1 เป็นแหล่งคาร์บอน

2.3.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการสร้างสารชีวโมเลกุลอย่างเช่น กรดนิวคลีอิกและโปรตีน การสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลเหล่านี้จัดเป็น กระบวนการใช้ NADPH ซึ่งโดยทั่วไปจะเกิดได้ช้าลงหรือหยุดไปในสภาวะที่มีการขาดแคลนแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ NADPH ที่สังเคราะห์ขึ้นนั้นถูกผลักดันไปใช้ในการสร้างกรดไขมันของเซลล์มากขึ้น ส่งผลให้จุลินทรีย์มีการสังเคราะห์ไขมันเพิ่มขึ้น^[11] จุลินทรีย์สามารถใช้ไนโตรเจนทั้งรูปของอินทรีย์สารและอนินทรีย์สารเพื่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์ไขมันชนิดของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างเซลล์และการสังเคราะห์ไขมันแตกต่างกันตามชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปพบว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนจำพวกอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ หรือโซเดียมไนเตรท จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่า ในขณะที่การสังเคราะห์ไขมันเกิดขึ้นได้ดีเมื่อใช้ไนโตรเจนในรูปสารประกอบอินทรีย์ เช่น ยูเรีย สารสกัดจากยีสต์^[40, 41]

2.3.3 อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน หรือ C/N ratio จัดเป็นปัจจัยที่สำคัญมากต่อการสังเคราะห์ลิวพิดของจุลินทรีย์สะสมน้ำมันสูง โดยผลของค่า C/N ratio สามารถศึกษาได้ 2 ลักษณะคือ (i) แปรผันความเข้มข้นของไนโตรเจน โดยมีปริมาณคาร์บอนอยู่อย่างจำกัด และ (ii) แปรผันความเข้มข้นของคาร์บอนให้มืออยู่อย่างเพียงพอ พร้อมกับจำกัดปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิธีการอย่างหลังจัดเป็นวิธีที่นิยมใช้มากกว่า

(i) ผลของความเข้มข้นไนโตรเจน

ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเติบโตและการสังเคราะห์ไขมันของจุลินทรีย์ การเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนอยู่อย่างจำกัด ซึ่งทำให้อัตราส่วนของ C/N มีค่าลดลง ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้น แต่จะพบการสังเคราะห์ไขมันในปริมาณต่ำลง^[22, 40] Alvarez, Kalscheuer และ Steinbüchel^[22] พบว่า *Rhodococcus opacus* PD630 และ *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126 สามารถสะสมไตรเอซิลกลีเซอรอลได้สูงถึงร้อยละ 75.8 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียคลอไรด์เข้มข้นเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร การเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียคลอไรด์เป็น 1.0 กรัมต่อลิตร ทำให้ปริมาณไตรเอซิลกลีเซอรอลในแบคทีเรียดังกล่าวมีค่าลดลงตามไปด้วย เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Turcotte และ Kosaric (อ้างถึงในมนูเทพ^[11]) ที่พบว่า *Rhodosporidium toruloides* ATCC10788 เริ่มมีการสะสมไขมันหลังจากความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารลดลงเหลือน้อยกว่า 3.0×10^{-5} M นอกจากนี้ความเข้มข้นที่สูงเกินไปของไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมไอออนสามารถยับยั้งการเติบโตและการผลิตลิวพิด^[42] ดังที่เห็นได้จากงานวิจัยของ Zheng และคณะ^[42] ซึ่งพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Cryptococcus curvatus* ซึ่งเป็นยีสต์สะสมน้ำมันสูงชนิดหนึ่งมีปริมาณลดลงจาก 5.9 กรัมต่อลิตร เหลือ 2.0 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียจาก 131 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 3,140 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ii) ผลของความเข้มข้นของคาร์บอน

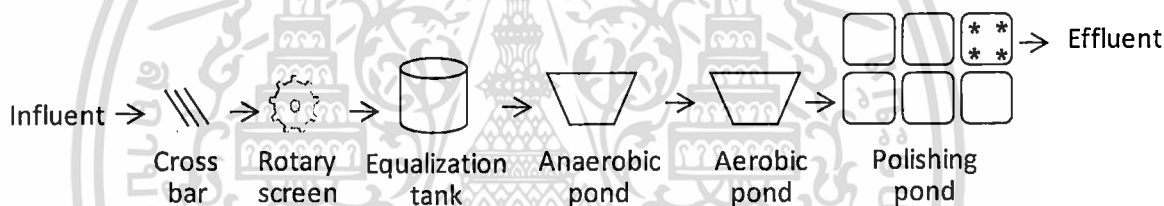
การเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยจำกัดปริมาณไนโตรเจนในอาหาร ซึ่งทำให้ค่า C/N ratio มีค่าสูงขึ้น จะทำให้จุลินทรีย์มีการสะสมไขมันมากขึ้น Park และคณะ (อ้างถึงในธัญวัฒน์^[12]) ได้รายงานว่ *Apiotrichum curvatum* ATCC20509 สามารถสะสมน้ำมันไว้ภายในเซลล์ได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงภายใต้ภาวะการขาดไนโตรเจนแต่มีปริมาณคาร์บอนเพียงพอ โดยเมทาบอลิซึมของไขมันจะขึ้นกับอัตราส่วนของ C/N ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่ออัตราส่วนของ C/N สูงจะมีการสร้างไขมันมากกว่าที่ C/N ต่ำ ส่วนในอาหารสูตรสมดุล (C/N=18) ไขมันทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นช้ามากเพียง 25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งเท่านั้น รัตนภรณ์^[19] พบว่า ยีสต์โอโซเลท OYS3 เจริญเติบโตได้ลดลง แต่มีปริมาณลิวซีนสูงขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารหรือค่า C/N สูงขึ้นจาก 88 เป็น 197 นอกจากนี้พบว่า การเพิ่มปริมาณกลูโคสเป็น 100 กรัมต่อลิตรหรือค่า C/N เป็น 219 เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตลิวซีนต่ำลง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Li และคณะ^[27] ที่พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสในสภาวะที่มีไนโตรเจนอย่างจำกัด ช่วยเพิ่มปริมาณลิวซีนของยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* Y4 แต่การเจริญและผลิตลิวซีนของยีสต์ดังกล่าวลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณกลูโคสสูงกว่า 120 กรัมต่อลิตร

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 แหล่งที่มาของน้ำทิ้งที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรีย

น้ำตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรีย ถูกเก็บรวบรวมในเดือนธันวาคม พ.ศ.2552 จากบ่อผึ่ง (Polishing pond) ลำดับสุดท้ายของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่แห่งหนึ่งในจังหวัดลพบุรี โดยบ่อผึ่งดังกล่าวจัดเป็นส่วนหนึ่งของระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน และมีขนาดความจุ 4,800 m³ จุดเก็บตัวอย่างซึ่งมีระยะห่างจากขอบบ่อแต่ละด้านประมาณ 2 เมตร ดังแสดงด้วยเครื่องหมาย * ในรูปที่ 3.1 น้ำตัวอย่างจะถูกจ้วงเก็บจากขอบบ่อทั้ง 4 ด้านโดยใช้กระบวยตักน้ำและนำมาผสมรวมกัน จากนั้นถูกนำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียต่อไป



ภาพที่ 3.1 แสดงระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่และจุดเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรีย

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ทั้งในรูปอาหารเหลวและอาหารแข็ง ถูกใช้เป็นสูตรอาหารในการคัดแยกและศึกษาปริมาณลิตของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่ อาหารดังกล่าวประกอบด้วยเปปโตน (Peptone) 10 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด (Yeast-extract) 5 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 10 กรัมต่อลิตร พร้อมกับปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ก่อนนำไปใช้งานจะถูกนำไปหนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.1.3 น้ำเสียสังเคราะห์ (synthetic wastewater, SW)

น้ำเสียสังเคราะห์ถูกนำมาใช้ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิตของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ซึ่งเป็นสูตรน้ำเสียสังเคราะห์ที่ดัดแปลงจาก Lee et al. ^[43] จัดเป็นสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบของสารอาหารขั้นพื้นฐานที่แบคทีเรียต้องการครบถ้วนดังแสดงใน

ตารางที่ 3.1 เอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของน้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษา[†]

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
กลูโคส (C ₆ H ₁₂ O ₆)	9.0 กรัมต่อลิตร [‡]
แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH ₄) ₂ SO ₄)	1.0 กรัมต่อลิตร [‡]
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	2.50 กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K ₂ HPO ₄)	2.10 กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	5.07 กรัมต่อลิตร
เฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl ₃)	1.45 กรัมต่อลิตร
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	1.26 กรัมต่อลิตร
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	440 มิลลิกรัมต่อลิตร
โคบอลตคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	420 มิลลิกรัมต่อลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	400 มิลลิกรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	370 มิลลิกรัมต่อลิตร
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต (MnCl ₂ ·4H ₂ O)	280 มิลลิกรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast-extract)	30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

[†]สำหรับสูตรน้ำเสียสังเคราะห์ในรูปอาหารแข็ง (SW agar) จะเติมวุ้น (agar) ให้มีความเข้มข้นสุทธิเท่ากับ 15,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

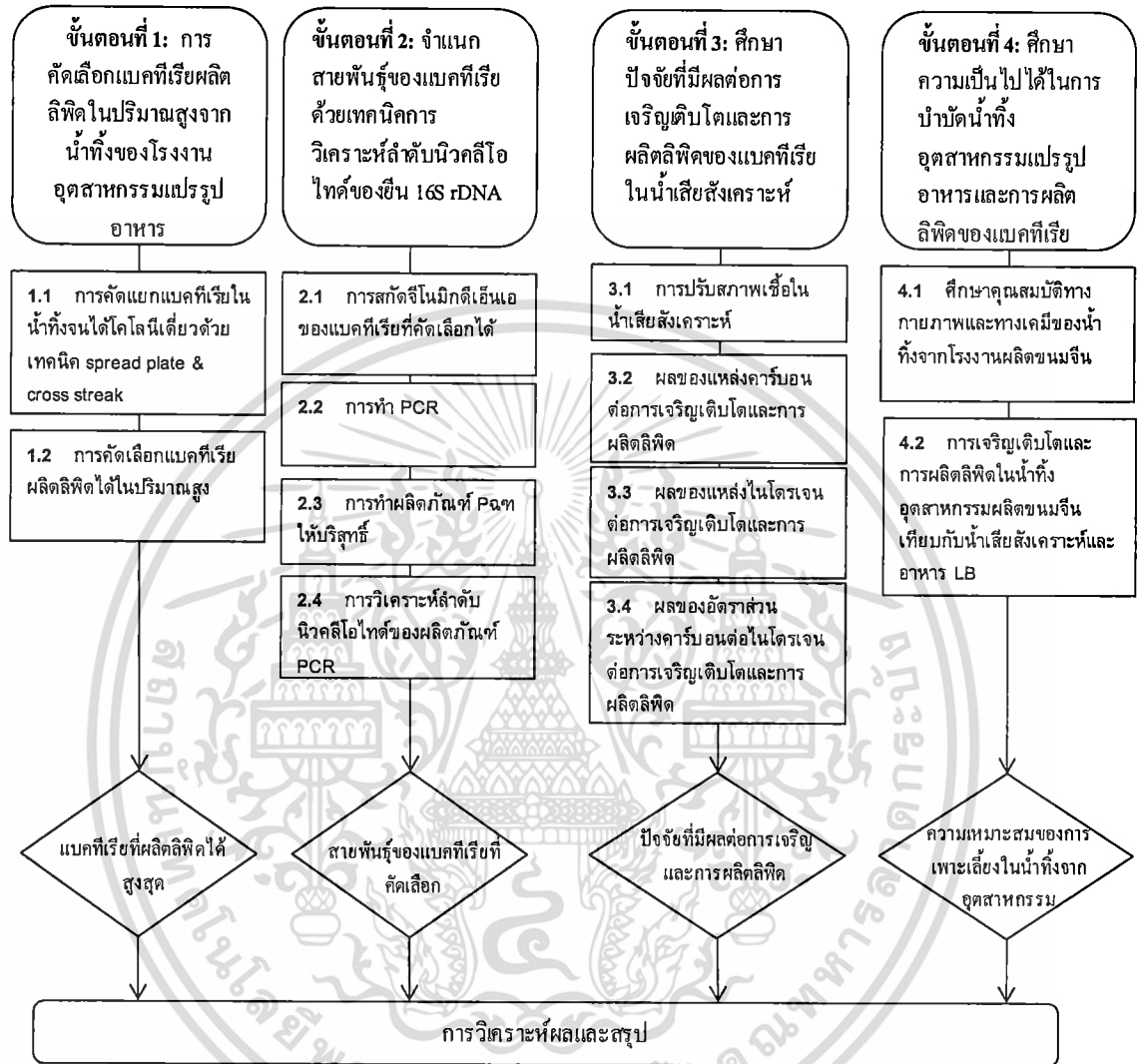
[‡]ในการศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนจะมีการแปรผันค่าดังนี้ (i) 0.1, 1.0, 2.0, 5.0 และ 10.0 กรัมของ (NH₄)₂SO₄ ต่อลิตร โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของกลูโคสคงที่ที่ 9 g/L และ (ii) 4.5, 9.0, 18.0, 28.0, 35.0 กรัมของกลูโคสต่อลิตร โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ (NH₄)₂SO₄ ไว้ที่ 0.1 กรัมต่อลิตร

3.1.4 แหล่งที่มาของน้ำตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาความเป็นไปได้ในการบำบัดน้ำทิ้งและการผลิตลิวทินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

ตัวอย่างน้ำที่เลือกนำมาใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างน้ำทิ้งจากกระบวนการต้มเส้นขนมจีนของโรงงานผลิตขนมจีนแห่งหนึ่งในจังหวัดฉะเชิงเทรา โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้ในการทดลอง น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมดังกล่าวถูกเลือกใช้ในการศึกษา เนื่องจากขนมจีนเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวเจ้า ซึ่งมีแป้งเป็นส่วนประกอบหลัก อีกทั้งกระบวนการผลิตขนมจีนจำเป็นต้องใช้น้ำปริมาณมาก ผลที่ตามมาคือน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตย่อมมีมาก โดยน้ำทิ้งควรมีสารอินทรีย์คาร์บอนในปริมาณสูง และมีที่เคเอ็นไนโตรเจนในปริมาณที่ต่ำกว่า ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของน้ำตัวอย่างที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตลิวทินของจุลินทรีย์

3.2 วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนใหญ่ ซึ่งแบ่งเป็นการทดลองย่อยดังแสดงในรูปที่ 3.2 โดยในแต่ละการทดลองย่อยมีรายละเอียดการดำเนินงานดังนี้



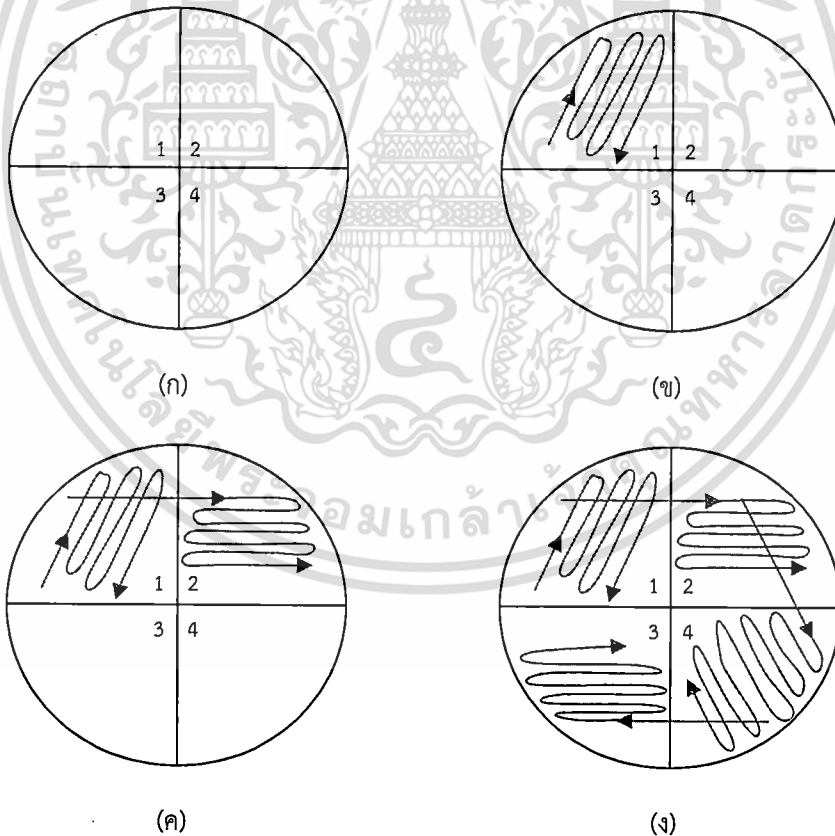
ภาพที่ 3.2 แผนภาพการทดลอง

3.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตลิตินในปริมาณสูงจากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่

3.2.1.1 การคัดแยกแบคทีเรียในน้ำทิ้งด้วยเทคนิค spread plate ร่วมกับ cross streak

ตัวอย่างน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่ที่เก็บรวบรวมได้ในข้อ 3.1.1 ถูกนำมาเจือจางแบบ 10 เท่า (Ten-fold serial dilution) ให้มีความเข้มข้นของสารละลายน้ำทิ้งในอาหารเหลวสูตร LB ที่ระดับ 10^{-1} ถึง 10^{-5} จากนั้นปิเปตสารละลายน้ำทิ้งในแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 ml. ถ่ายลงที่ตำแหน่งตรงกลางของจานเพาะเชื้อที่บรรจุบนอาหารแข็งสูตร LB ด้วยเอกซาร์นี้เป็นเอกซาร์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกซาร์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) และทำการเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล (L spreader) กลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเพาะเชื้ออยู่ด้านบน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด จะใช้ลูป (Loop) ที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อที่เป็นโคโลนีเดียว แล้วนำไปลากหรือขีด (Streak) บนผิวอาหารแข็ง LB ที่บรรจุในจานเพาะเชื้อใบใหม่ โดยเริ่มจากการขีดเส้นเป็นแนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้นในบริเวณพื้นที่หมายเลข 1 ของจาน (รูปที่ 3.3 ก-ข) แล้วนำ Loop ไปลงไฟด้วยเปลวไฟจากตะเกียงเบนเสน เพื่อฆ่าเชื้อที่ติดอยู่กับ Loop ให้หมด รอให้ Loop เย็นลง ลากเชื้อออกจากบริเวณพื้นที่หมายเลข 1 เป็นแนวระนาบติดต่อกันไปตามแนว 2 (รูปที่ 3.3 ค) ทำซ้ำด้วยวิธีการแบบเดียวกันจนครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อซึ่งมีทั้งหมด 4 ระบาย (รูปที่ 3.3ง) จากนั้นทำการกลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเพาะเชื้ออยู่ด้านบน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทำวิธีการ Cross streak ข้ำ จนได้เชื้อโคโลนีเดี่ยวบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งแยกเก็บเป็นหัวเชื้อ (Stock culture) ใน LB agar ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดย Stock culture ที่เก็บรักษาไว้จะถูกถ่ายลงบนอาหารแข็งใหม่ ทุกๆ เดือน



ภาพที่ 3.3 เทคนิคการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ cross streak

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตลิพิดในปริมาณสูง

(1) การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

Stock culture ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทที่ถูกเก็บรักษาไว้ดังอธิบายในหัวข้อ 3.2.1.1 จะถูกเตรียมเป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น (Seed culture) ซึ่งสามารถทำได้โดยเชื้อ Stock culture มา 1 โคโลนี นำไปปลูกลงบนจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหาร LB agar จากนั้นกลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเพาะเชื้ออยู่ด้านบน แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด เชื้อเอาเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้ Seed culture เพื่อนำไปใช้การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตลิพิดต่อไป

(2) การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย

ปิเปต Seed culture ลงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จนได้ค่าความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 0.1 เมื่อนำไปวัดค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Optical density, OD₆₀₀) นำไปบ่มในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C พร้อมทั้งปิเปตสารละลายเซลล์ไปวัดค่า OD₆₀₀ ที่เวลาต่างๆ กันจนครบ 72 ชั่วโมง เมื่อครบ 72 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ที่ปั่นเหวี่ยงด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยงอีก 1 ครั้ง จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แห้งโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) ซึ่งน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้และวิเคราะห์ปริมาณลิพิดอ้างอิงตามวิธีการ Bligh and Dyer^[44]

3.2.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

3.2.2.1 การสกัดและการตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้

แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ถูกนำมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของด้วยชุดทดสอบ DNA Wizard® SV Genomic DNA Purification System Kit (Promega, USA) โดยเชื้อ seed culture ของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง LB กระจายในสารละลาย cell lysis ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ที่มีสารละลาย proteinase K ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ทำการ vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พร้อมกับกลับหลอดไปมาทุกๆ 5 นาที จนครบ 15 นาที เติมสารละลาย MPC protein precipitation ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ทำการ vortex เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ใหม่ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 475 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง หลังจากนั้นล้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเข้มข้น 75 % ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง ดูดส่วนใสทิ้งและตั้งทิ้งไว้จนตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วย่อย RNA ด้วยการเติม RNase เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตร-โฟเรซิส (Agarose gel electrophoresis) เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction หรือ PCR) โดยองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.2 บรรจุหลอด PCR ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังแสดงในตารางที่ 3.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) โดยวิธี Agarose gel electrophoresis

3.2.2.3 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำ PCR product ที่ได้จากขั้นตอน 3.2.2.2 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทดสอบ GeV/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid, Taiwan) โดยเติมบัฟเฟอร์ DF ในปริมาณ 5 เท่าของปริมาตรของผลิตภัณฑ์ PCR ผสมให้เข้ากันแล้วดูดลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสใน Collection tube ทิ้ง เติมบัฟเฟอร์สำหรับล้าง (Wash buffer) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนใสที่เหลือติด column ย้าย column มายังหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจอันใหม่ เติมบัฟเฟอร์สำหรับชะ (Elution buffer) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.2.2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First BASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน GenBank (National Center for Biotechnology Information, (NCBI) โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์ PCR 5 เท่า	10
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1
แมกนีเซียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์	3
ไพรเมอร์ตัวที่ 1: 27F 5 ไมโครโมลาร์ [†]	2.5
ไพรเมอร์ตัวที่ 2: 1492R 5 ไมโครโมลาร์ [‡]	2.5
เอนไซม์ <i>Taq</i> DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ^{††}	3
จีโนมิกดีเอ็นเอ	0.5
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	27.5
ปริมาตรสุทธิ	50

[†]ไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')^[47]

[‡]ไพรเมอร์ 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[47]

^{††}ตัวเร่งปฏิกิริยา

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	Initial Denaturation	94	5 นาที
2	Denaturation	94	30 วินาที
	Annealing	50	
	Primer Extension	72	
3	Final Extension	72	10 นาที

3.2.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียสังเคราะห์

3.2.3.1 การปรับสภาพเชื้อในน้ำเสียสังเคราะห์

เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ผสมกับอาหารเหลวสูตร LB ในสัดส่วน 10:90 (v/v) จากนั้นเปิด seed culture ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวจนได้ OD₆₀₀ ประมาณ 0.10 บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พร้อมกับทำการวัดค่า OD₆₀₀ ที่เวลาต่าง ๆ กัน เมื่อได้ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.5 จะถ่ายเชื้อลงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ผสมกับอาหารเหลวสูตร LB ในสัดส่วน 20:80, 40:60, 60:40, 80:20, 90:10 และ 100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตามลำดับ เก็บรักษาแบคทีเรียที่สามารถเติบโตได้ในน้ำเสียสังเคราะห์ 100 เปอร์เซ็นต์ในรูปของหัวเชื้อ (Stock culture) ด้วยการเพาะเชื้อบนน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการเติมไขมันให้อยู่ในรูปอาหารแข็ง (Synthetic wastewater agar; SW Agar) พร้อมกับถ่ายลงอาหาร SW Agar

ใหม่ในทุกเดือน โดยก่อนนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป จะถูกนำไปเตรียมเป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในน้ำเสียสังเคราะห์

3.2.3.2 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิด

เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสและความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำเสียสังเคราะห์เท่ากับ 9 กรัมต่อลิตรและ 1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หรือมีค่า C/N ratio เท่ากับ 20 จากนั้นปิเปตกล้าเชื้อเริ่มต้น (Seed culture) ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ จนกระทั่งมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.1 นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ปิเปตสารละลายเซลล์ไปวัดการเจริญเติบโตที่เวลาต่างๆ กัน จนครบ 72 ชั่วโมง โดยที่เวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เซลล์อยู่ในระยะเริ่มต้นของระยะพักตัว (Early stationary phase) และมีการผลิตลิพิดได้สูงสุด^[2] จะทำการเก็บเซลล์ด้วยเทคนิคการปั่นเหวี่ยง และทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze drying^[2] พร้อมกับวัดน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ จากนั้นทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณลิพิดอ้างอิงตามวิธีการของ Bligh and Dyer^[44] ทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนชนิดของแหล่งคาร์บอนจากกลูโคสเป็นฟรุคโตส, ซูโครส, แลคโตส, โซเดียมอะซิเตท, กรดโพธิโอนิก และ กรดบิวไทริก ตามลำดับ

3.2.3.3 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิด

เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ให้มีกลูโคสเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1.0 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ปิเปตกล้าเชื้อเริ่มต้น (Seed culture) ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ จนกระทั่งมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.1 นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ปิเปตสารละลายเซลล์ไปวัดการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่างๆ กันจนครบ 72 ชั่วโมง โดยที่เวลา 36 ชั่วโมง จะทำการเก็บเซลล์ด้วยเทคนิคการปั่นเหวี่ยง และทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze drying^[2] พร้อมกับวัดน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ จากนั้นทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณลิพิด ทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนชนิดของแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรท และยูเรีย ตามลำดับ

3.2.3.4 การศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิด

ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ จะทำการทดลองใน 2 รูปแบบคือ (1) การแปรค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของคาร์บอนมีค่าคงที่ และ (2) การเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนมีค่าคงที่ รายละเอียดวิธีการทดลองเป็นดังนี้

(1) ผลของความเข้มข้นไนโตรเจน

เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ให้มีกลูโคสเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน หรือมีค่า C/N ratio เท่ากับ 200 จากนั้นปีเปิดกล้าเชื้อเริ่มต้น (Seed culture) ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ จนกระทั่งมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.1 นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ปีเปิดสารละลายเซลล์ไปวัดการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่างๆ กันจนครบ 72 ชั่วโมง โดยที่เวลา 36 ชั่วโมง จะทำการเก็บเซลล์ด้วยเทคนิคการปั่นเหวี่ยง และทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze drying^[2] พร้อมกับวัดน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ จากนั้นทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณลิพิด ทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำเสียสังเคราะห์ จาก 0.1 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เป็น 1, 2, 5 และ 10 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร น้ำเสียดังกล่าวจะมี C/N ratio ลดลงจาก 200 เป็น 20, 10, 4 และ 2 ตามลำดับ

(2) ผลของความเข้มข้นคาร์บอน

เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.1 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีกลูโคสเข้มข้น 4.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน หรือมีค่า C/N ratio เท่ากับ 100 จากนั้นปีเปิดกล้าเชื้อเริ่มต้น (Seed culture) ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ จนกระทั่งมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.1 นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ปีเปิดสารละลายเซลล์ไปวัดการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่างๆ กันจนครบ 72 ชั่วโมง โดยที่เวลา 36 ชั่วโมง จะทำการเก็บเซลล์ด้วยเทคนิคการปั่นเหวี่ยง และทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze drying^[2] พร้อมกับวัดน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ จากนั้นทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณลิพิด ทำการทดลองซ้ำแต่เพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสในน้ำเสียสังเคราะห์ จาก 4.5 กรัมต่อลิตรเป็น 9, 18, 28 และ 35 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น C/N ratio ในน้ำเสียสังเคราะห์ จาก 100 เป็น 200, 400, 600 และ 800 ตามลำดับ

3.2.4 การศึกษาความเป็นไปได้ในการบำบัดน้ำทิ้งอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย

3.2.4.1 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน

น้ำทิ้งที่เก็บรวบรวมได้กระบวนการณ์ต้มเส้นขนมจีน จะถูกนำมาวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 พารามิเตอร์ที่ทำการวิเคราะห์ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน

พารามิเตอร์ที่วิเคราะห์	วิธี/เครื่องมือวิเคราะห์
1. อุณหภูมิ	Themometer
2. ค่าพีเอช	pH Meter
3. ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (Total Organic Carbon, TOC)	TOC analyzer (High Temperature combustion-Infrared detector)
4. แอมโมเนียไนโตรเจน ($\text{NH}_4^+ \text{-N}$)	Kjeldhal Method ^[45]
5. ไนเตรทไนโตรเจน ($\text{NO}_3^- \text{-N}$)	Kjeldhal Method ^[45]
6. Total Kjeldahl Nitrogen,TKN	Kjeldhal Method ^[45]
7. กรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile fatty acid,VFA)	Titration ^[45]
8. เอ็มแอลเอสเอส (Mixed Liquor Suspended Solids, MLSS)	Gravimetric method ^[46]

3.2.4.2 การเจริญเติบโตและการผลิตลิตินในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนเทียบกับน้ำเสียสังเคราะห์และอาหาร LB

ปีเปต seed culture ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ จำนวน 10% โดยปริมาตร ใส่ลงในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปีเปตสารละลายเซลล์ไปวัดค่าพีเอช ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (Total Organic Carbon, TOC) สารอินทรีย์ระเหยได้ง่าย (Volatile fatty acids, VFA) ปริมาณที่เคเอ็นไนโตรเจน (Total Kjeldahl Nitrogen, TKN) และแอมโมเนียไนโตรเจน (Ammonia nitrogen) พร้อมทั้งทำการเก็บเซลล์และทำให้เซลล์แห้งด้วยเทคนิค freeze drying รวมทั้งทำการวิเคราะห์ปริมาณลิตินของเซลล์แห้งที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการทดสอบซ้ำแต่เปลี่ยนอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตขนมจีน เป็นน้ำทิ้งที่มีการเติมกลูโคสเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร น้ำเสียสังเคราะห์ และอาหารเหลวสูตร LB

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลผลการศึกษาที่ได้ ได้แก่ น้ำหนักแห้ง และปริมาณลิติน มาทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างประชากรที่ศึกษาด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way Analysis of Variance: one way ANOVA) พร้อมทั้งทำการทดสอบหลังการวิเคราะห์ (Post hoc analysis) ในกรณีที่มีความแตกต่างระหว่างประชากรที่ศึกษาด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติสำเร็จรูป SPSS version 20.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่

ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำทิ้งที่เก็บรวบรวมได้จากบ่อฝังของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่ด้วยวิธีการเจือจางแบบ 10 เท่า (Ten-fold Serial dilution) ร่วมกับเทคนิค spread plate และทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak บนอาหารแข็งสูตร LB (LB Agar) พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลท ภายหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.1) โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง LB ที่แตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม ตามลักษณะและสีของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีทรงกลมผิวหน้าเรียบและมีสีเหลือง ซึ่งมีรหัสเชื้อคือ Y1.1 กลุ่มที่ 2 แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีทรงกลมผิวหน้าเรียบ สีขาว ใช้รหัสเชื้อคือ W2.1, W2.2 และ W2.3 กลุ่มที่ 3 แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีทรงกลมผิวหน้าเรียบ สีครีม ซึ่งใช้รหัสเชื้อคือ C3.1, C3.2 และ C3.3 และกลุ่มที่ 4 แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีทรงกลมผิวหน้าขรุขระ สีครีม ที่มีรหัสเชื้อคือ R4.1, R4.2, R4.3, R4.4 และ R4.5 เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแกรม (Gram staining) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลทจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากย้อมติดสีแดงของ safranin-O และเซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือแท่ง (rod) เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นไอโซเลท W2.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกจากบ่อฝังของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่

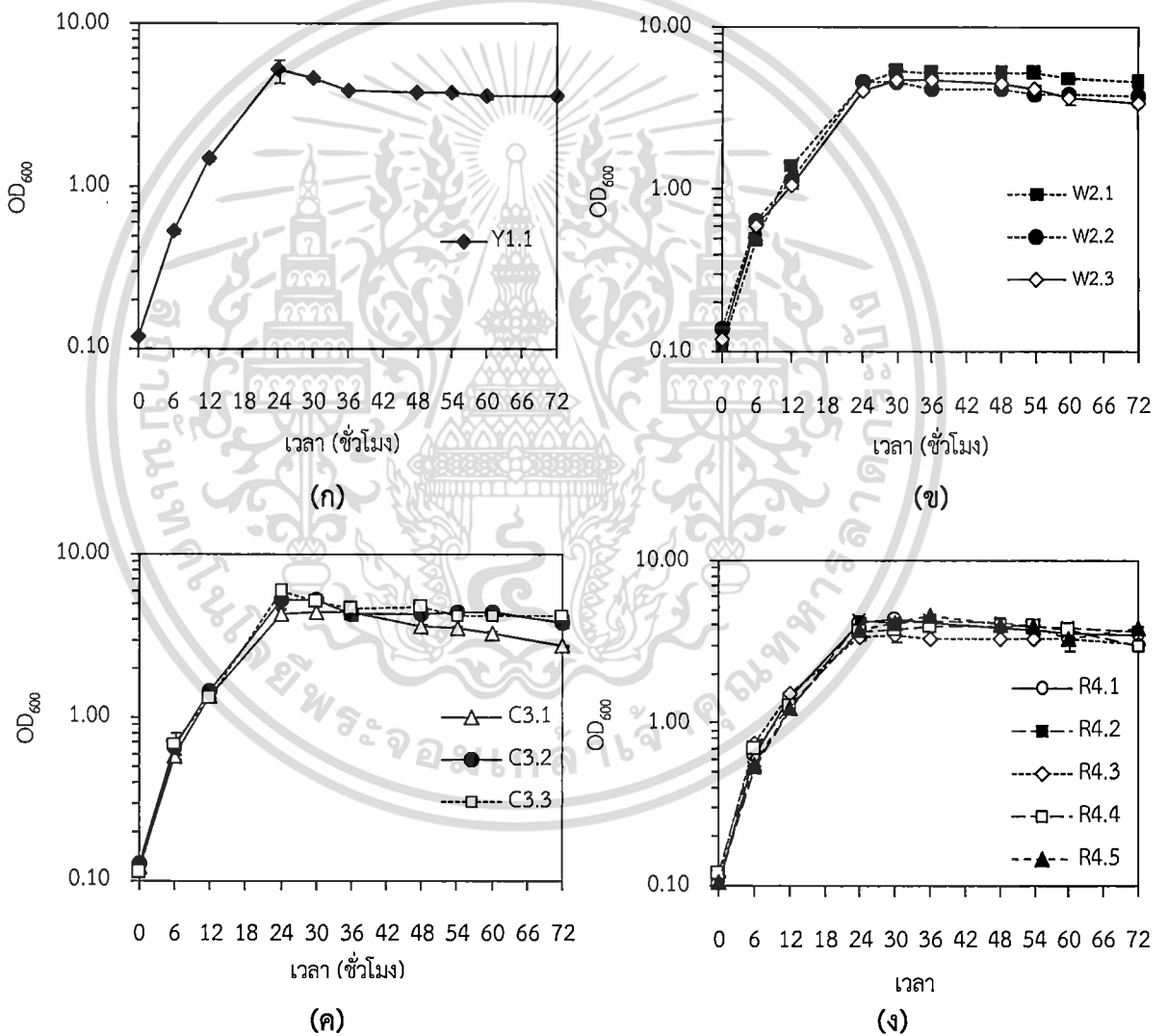
ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB	สีของโคโลนี	ลักษณะรูปร่าง	การย้อมแกรม
1	Y1.1	ทรงกลมผิวหน้าเรียบ	สีเหลือง	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
2	W2.1	ทรงกลมผิวหน้าเรียบ	สีขาว	รูปร่างกลม	แกรมลบ
3	W2.2	ทรงกลมผิวหน้าเรียบ	สีขาว	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
4	W2.3	ทรงกลมผิวหน้าเรียบ	สีขาว	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
5	C3.1	ทรงกลมผิวหน้าเรียบ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
6	C3.2	ทรงกลมผิวหน้าเรียบ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
7	C3.3	ทรงกลมผิวหน้าเรียบ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
8	R4.1	ทรงกลมผิวหน้าขรุขระ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
9	R4.2	ทรงกลมผิวหน้าขรุขระ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
10	R4.3	ทรงกลมผิวหน้าขรุขระ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
11	R4.4	ทรงกลมผิวหน้าขรุขระ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
12	R4.5	ทรงกลมผิวหน้าขรุขระ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่สามารถเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิพิดในปริมาณสูง

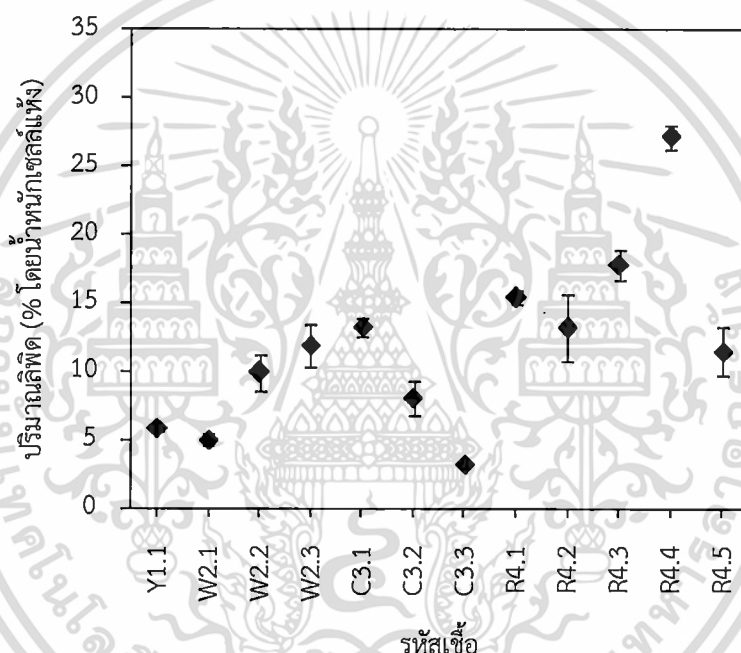
เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 12 ไอโซเลท มาศึกษารูปแบบการเจริญเติบโต (growth curve) และคัดเลือกหาแบคทีเรียที่ผลิตปริมาณลิพิดได้สูงสุด โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนครบ 72 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลท มีรูปแบบการเจริญเติบโตที่คล้ายคลึงกัน โดยแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นรูปแบบการเจริญเติบโตจะมีลักษณะคงที่ (รูปที่ 4.1) ซึ่งจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียในแต่ละไอโซเลทสามารถเจริญได้เป็นอย่างดี เนื่องจากในอาหารเหลว LB เป็นอาหารเหลวสูตรสมบูรณ์ (enriched medium) ที่ประกอบไปด้วยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจากเปปโตเนและสารสกัดจากยีสต์ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์



ภาพที่ 4.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงในอาหาร LB นาน 72 ชั่วโมง เมื่อ (ก) โคโลนีทรงกลมผิวหน้าเรียบและมีสีเหลือง (ข) โคโลนีทรงกลมผิวหน้าเรียบ สีขาว (ค) โคโลนีทรงกลมผิวหน้าเรียบ สีครีม และ (ง) โคโลนีทรงกลมผิวหน้าขรุขระ สีครีม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณลิวตินของแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลท ที่เจริญในอาหารเหลวสูตร LB นาน 72 ชั่วโมงพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 เพียงไอโซเลทเดียวที่ให้ปริมาณลิวตินมากกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้ง โดยให้ปริมาณลิวตินเท่ากับร้อยละ 27.2 ± 0.92 โดยน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 4.2) ส่วนเชื้อที่ให้ปริมาณลิวตินรองลงไปตามลำดับคือ ไอโซเลทในรหัส R4.3, R4.1, C3.1, R4.2, R4.5, W2.3, W2.2, C3.2, W2.1, Y1.1 และ C3.3 ซึ่งมีปริมาณลิวตินเท่ากับร้อยละ 17.80 ± 1.1 , 15.380 ± 0.51 , 13.23 ± 0.69 , 13.19 ± 2.40 , 11.90 ± 1.79 , 11.90 ± 1.58 , 9.91 ± 1.29 , 8.06 ± 1.30 , 5.04 ± 0.50 , 5.88 ± 0.26 และ 3.19 ± 0.21 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 4.2) ทั้งนี้การผลิตลิวตินที่แตกต่างกันอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการนำอาหารเข้าไปในเซลล์ที่ต่างกัน ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตลิวตินได้สูงสุดไปใช้ในการศึกษาต่อไป



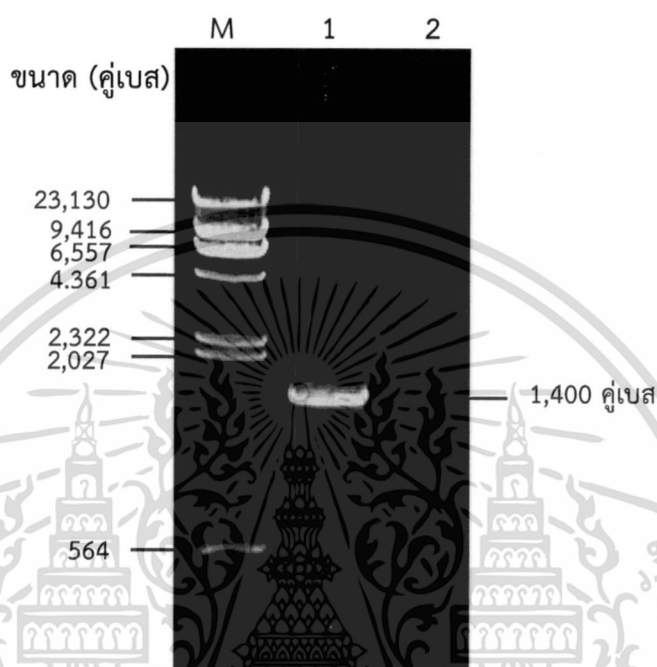
ภาพที่ 4.2 ปริมาณลิวตินของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนักของเซลล์แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB นาน 72 ชั่วโมง

4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูคโพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และไพรเมอร์ 1,492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย^[47] เปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR กับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าได้ผลิตผลของปฏิกิริยาลูคโพลีเมอเรส (PCR product) เกิดขึ้นอย่างชัดเจน (lane 1) (รูปที่ 4.3) โดย PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

product มีขนาดประมาณ 1,400 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้ซึ่งเท่ากับ 1,456 คู่เบส^[47] นอกจากนี้ไม่พบผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในการทดลองควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นแทน DNA (lane 2) (รูปที่ 4.3) แสดงให้เห็นว่า PCR product ของเชื้อไอโซเลท R4.4 ไม่มีการปนเปื้อนและมีความบริสุทธิ์สูง



ภาพที่ 4.3 PCR Product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณของยีน 16S rDNA เมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 (lane 1) เทียบกับเมื่อใช้ DNA size marker λ DNAI HindIII (lane M) และน้ำกลั่น (lane 2)

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์ของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูลในธนาคารยีน (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria*, *A. hydrophilla*, *A. veronii*, และ *A. calicicola* ถึงร้อยละ 99.61-99.90 (ตารางที่ 4.2) ดังนั้นจึงตั้งชื่อแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 นี้ว่า *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 (KMITL หมายถึง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, R4.4 หมายถึงแบคทีเรียมีรูปร่างโคโลนีเป็นทรงกลม (Round) ตัวที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

ลำดับที่	สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	Accession No.	Homology (%)
1	<i>Aeromonas sobria</i> strain JY081016-1	GQ232759	99.90 (1030/1031)
2	<i>Aeromonas sobria</i> strain NQ090701	HM358836	99.71 (1029/1032)
3	<i>Aeromonas sobria</i> strain LD081008A-1	GQ205446	99.71 (1030/1034)
4	<i>Aeromonas hydrophila</i> NBRC 12658	AB680307	99.71 (1034/1037)
5	<i>Aeromonas veronii</i> strain G10-2A	JN644562	99.71 (1034/1037)
6	<i>Aeromonas veronii</i> strain BMA12_2B	JN644542	99.71 (1034/1037)
7	<i>Aeromonas veronii</i> strain JF4612	JN120274	99.71 (1043/1046)
8	<i>Aeromonas veronii</i> strain YA090911	GU735964	99.71 (1034/1037)
9	<i>Aeromonas veronii</i> strain CYJ202	FJ940848	99.71 (1034/1037)
10	<i>Aeromonas calicicola</i> strain 03037TRG	AY347679	99.61 (1033/1037)

4.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิวปีดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียสังเคราะห์

4.4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิวปีดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่แปรผันชนิดของน้ำตาลหรือกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส (Glucose) ฟรุคโตส (Fructose) ซูโครส (Sucrose) แลคโตส (Lactose) โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) กรดโพรพิโอนิก (Propionic acid) และกรดบิวไทริก (Butyric acid) โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน และน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่า C/N ratio คงที่เท่ากับ 20 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียสามารถเติบโตและผลิตลิวปีดได้ดีที่สุดในน้ำเสียที่มีกลูโคสหรือฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังจะเห็นได้จาก OD₆₀₀ ที่มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.137 เป็น 4.254 และ 0.142 เป็น 4.668 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) นอกจากนี้ น้ำหนักแห้งที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันคือ 0.72-0.73 กรัมต่อลิตร รวมไปถึงปริมาณลิวปีดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในกลูโคสมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับปริมาณลิวปีดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 4.3) รองลงไปคือซูโครส ในขณะที่แบคทีเรียเติบโตได้น้อยมากหรือแทบไม่มีการเติบโตในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากกลูโคสและฟรุคโตสจัดเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีโครงสร้างอย่างง่าย ทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	OD ₆₀₀		น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณลิพิด (% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง)
	เริ่มต้น	36 ชั่วโมง		
กลูโคส	0.137	4.254±0.023	0.73	10.5±1.2 ^a
ฟรุคโตส	0.142	4.668±0.042	0.72	12.0±0.9 ^a
ซูโครส	0.140	3.338±0.176	0.61	8.2±0.7 ^b
แลคโตส	0.180	0.182±0.025	ND	ND
โซเดียมอะซิเตท	0.170	1.212±0.056	0.35	12.1±1.0 ^a
กรดโพธิโอนิก	0.120	0.120±0.000	ND	ND
กรดบิวไทริก	0.150	0.150±0.000	ND	ND

ND หมายความว่า ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ (Not determined) เนื่องจากแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตน้อยมากหรือไม่มีการเติบโต ส่วนตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

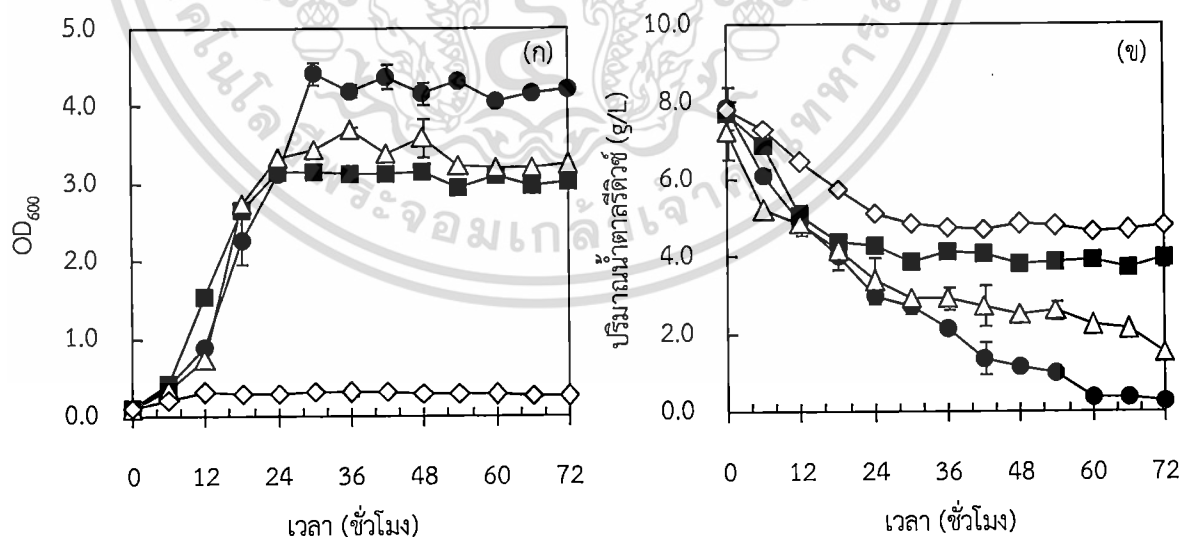
เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่มีโครงสร้างซับซ้อนอย่างเช่นซูโครสหรือแลคโตส เมื่อเปรียบเทียบการเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกรดอินทรีย์ระเหยง่ายเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าแบคทีเรียสามารถเติบโตได้ดีที่สุดในน้ำเสียที่มีโซเดียมอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่เซลล์ไม่มีการเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงในกรดโพธิโอนิกและกรดบิวไทริก ดังจะเห็นได้จากค่า OD₆₀₀ ที่เพาะเลี้ยงในโซเดียมอะซิเตท มีค่าเพิ่มขึ้นจากค่าเริ่มต้น 0.148 เป็น 1.212 และมีค่าน้ำหนักแห้งหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 36 ชั่วโมงเท่ากับ 0.35 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ค่า OD₆₀₀ ที่เพาะเลี้ยงในกรดโพธิโอนิกและกรดบิวไทริกมีค่าใกล้เคียงกับค่าความหนาแน่นของสารละลายเซลล์เริ่มต้นที่ 0.1 (ตารางที่ 4.3) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากโซเดียมอะซิเตท ซึ่งมีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่าเมื่อเทียบกับกรดโพธิโอนิก และกรดบิวไทริก ทำให้เซลล์นำไปใช้ในการเติบโตได้ง่ายกว่า นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตลิพิดได้ดีเมื่อใช้โซเดียมอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณลิพิดที่ได้มีค่าสูงถึง 12.1±1.0 ซึ่งเป็นค่าที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับปริมาณลิพิดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยใช้กลูโคสหรือฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตามพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่มีโซเดียมอะซิเตทเกิดขึ้นได้ช้ากว่า (ไม่แสดงข้อมูล) และต่ำกว่าเทียบกับการเพาะเลี้ยงเมื่อใช้กลูโคสหรือฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังจะเห็นได้จากค่า OD₆₀₀ ของสารละลายเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 36 ชั่วโมงมีค่าน้อยกว่า (1.212 เทียบกับ 4.254 และ 4.668) อีกทั้งได้น้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่า (ตารางที่ 4.3) ซึ่งความสามารถในการเติบโตที่ต่างกันระหว่างเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำตาลเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในกรดอินทรีย์ระเหยง่ายได้มีการรายงานไว้ทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการเติบโตของแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*^[48] และยีสต์ผลิตไขมันสูง *Yarrowia lipolytica*^[49] โดยการศึกษาการเติบโตของ *Aeromonas hydrophila* พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตและมีระยะ lag phase เพียง 4 ชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวในโซเดียมอะซิเตท ทำให้เซลล์มีระยะ lag phase นานขึ้นถึง 2 วัน จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น จึงเลือกใช้กลูโคส (ซึ่งมีราคาถูกกว่าฟรุคโตส) เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4.4.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas sp. KMITL-R4.4* ในน้ำเสียสังเคราะห์

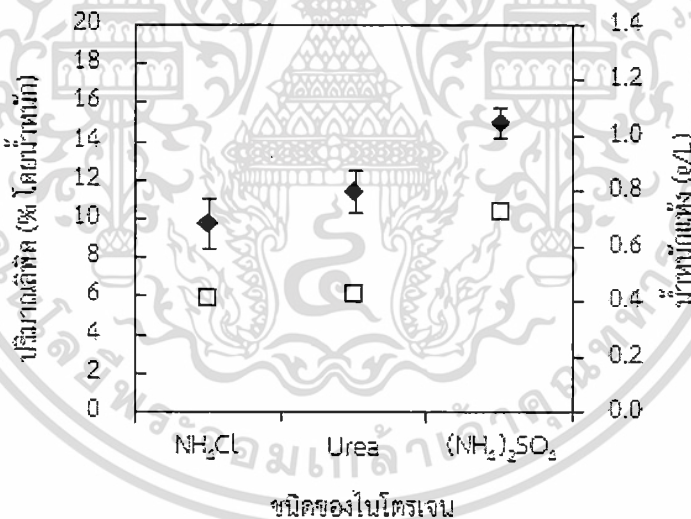
จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas sp. KMITL-R4.4* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่แปรผันชนิดของสารเคมีที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH₄Cl) โซเดียมไนเตรท (NaNO₃) และยูเรีย โดยใช้กลูโคสเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และกำหนดให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนมีค่าคงที่ คือ 1.0 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร หรือมีค่า C/N ratio เท่ากับ 20 พบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแบคทีเรียเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อใช้ (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนดังจะเห็นได้จาก OD₆₀₀ ที่มีค่าเพิ่มขึ้นมากที่สุดจาก 0.106 เป็น 4.216 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์นาน 72 ชั่วโมง (รูปที่ 4.4ก) สอดคล้องกับการลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเสียที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น (รูปที่ 4.4ข) รองลงไปคือ NH₄Cl และยูเรีย ในขณะที่แบคทีเรียมีการเติบโตได้น้อยมากในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มี NaNO₃ เป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 4.4 (ก) ความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD₆₀₀) และ (ข) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของแบคทีเรีย *Aeromonas sp. KMITL-R4.4* เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต (●), ยูเรีย (■), แอมโมเนียมคลอไรด์ (△) และ โซเดียมไนเตรท (◇)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน จัดเป็นอีกหนึ่งตัวชี้วัดที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเติบโตของ แบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ดังแสดงในรูปที่ 4.5 โดยการเพาะเลี้ยงในสารอนินทรีย์ ไนโตรเจนอย่างเช่น $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ จะมีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุด ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเซลล์ใน NH_4Cl และยูเรีย จะได้น้ำหนักแห้งของเซลล์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.5) ในขณะที่ NaNO_3 ไม่เหมาะสมต่อการเติบโตเนื่องจากมีน้ำหนักแห้งของเซลล์น้อยมาก (ไม่แสดงข้อมูล) นอกจากนี้พบว่า ชนิดของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตลิพิดได้ สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงใน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ รองลงไปคือ ยูเรีย หรือ NH_4Cl (รูปที่ 4.5) ผลของชนิดของแหล่ง ไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของจุลินทรีย์ ได้มีการรายงานไว้ทั้งในการศึกษา แบคทีเรีย *Rhodococcus opacus*^[50] ยีสต์^[51] รา *Monascus purpureus*^[52] และสาหร่าย^[53] โดย ในงานวิจัยของอภิเชษฐ์และรัตนภรณ์^[54] ที่พบว่ายีสต์ไอโซเลท U5/2 ซึ่งคัดแยกได้จากดินตัวอย่าง มี ปริมาณลิพิดสูงที่สุด (23.26 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก) เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่ง ไนโตรเจน รองลงไปคือ ยูเรีย โดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในโซเดียมไนเตรทมีปริมาณลิพิดต่ำสุด จากผลการ ทดลองดังกล่าวข้างต้น $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ จึงถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการศึกษาต่อไป



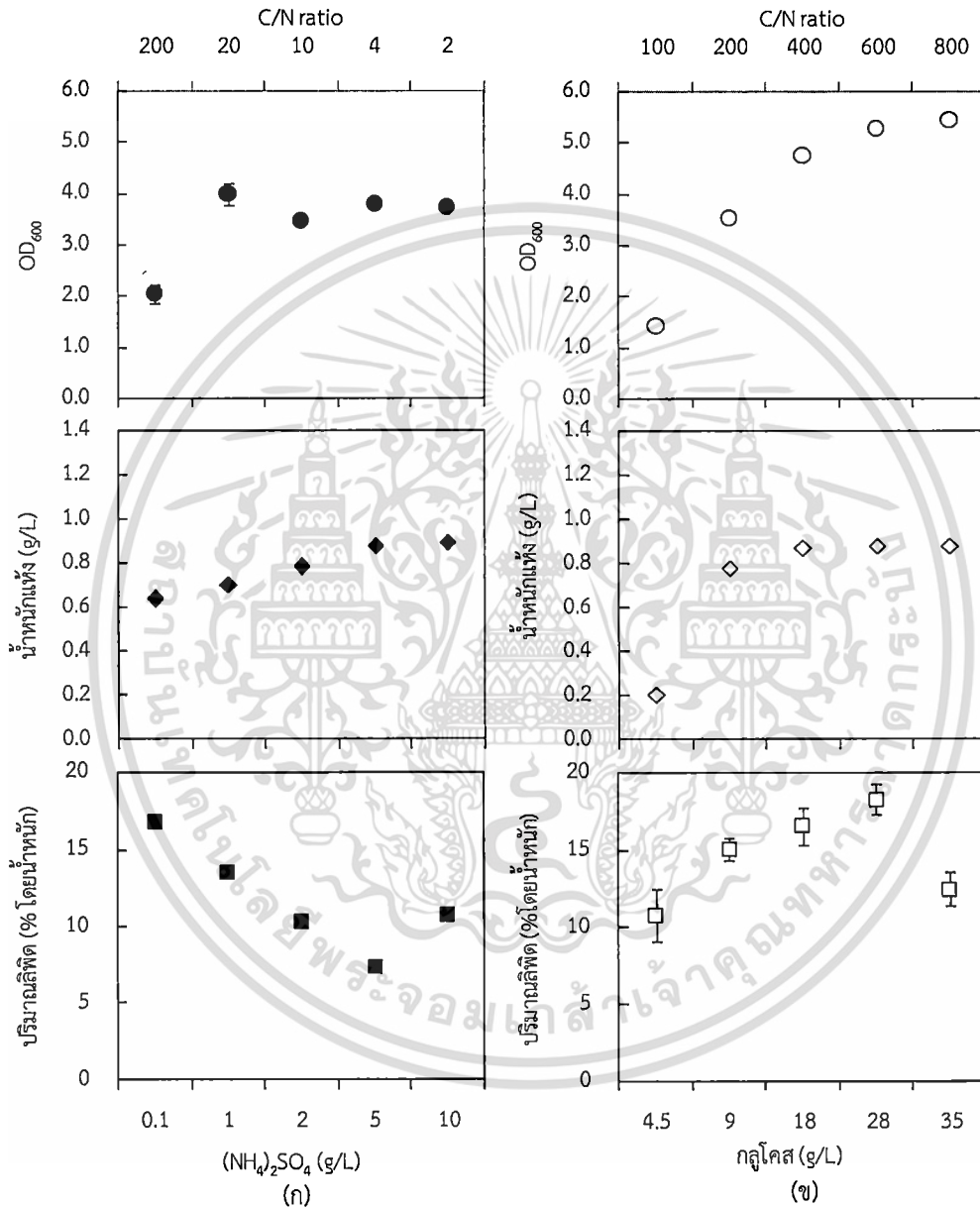
ภาพที่ 4.5 ปริมาณลิพิด (Lipid content, ◆) และน้ำหนักแห้ง (□) ของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน นาน 36 ชั่วโมง

4.4.3 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ถูกทำการศึกษาใน 2 รูปแบบคือ (1) การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แปรค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของคาร์บอนในรูปกลูโคสมีค่าคงที่ และ (2) การเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมซัลเฟตมีค่าคงที่ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 ผลของ C/N ratio ต่อการเติบโตและการผลิตลิวติดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์นาน 36 ชั่วโมง เมื่อ (ก) คือ แปรค่าความเข้มข้นของไนโตรเจน โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของคาร์บอนมีค่าคงที่ และ (ข) แปรค่าความเข้มข้นของคาร์บอนโดยกำหนดให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนมีค่าคงที่

4.4.3.1 ผลของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการเจริญเติบโตและการผลิต ลิพิดของแบคทีเรีย

การเพิ่มความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำเสียสังเคราะห์จาก 0.1 กรัมต่อลิตร เป็น 10 กรัมต่อลิตร โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของคาร์บอนในรูปกลูโคสมีค่าคงที่นั้น จัดเป็นวิธีการลด C/N ratio ในน้ำเสียสังเคราะห์ ซึ่งผลจากการปรับลดค่าดังกล่าวมีผลต่อการเติบโตและการสังเคราะห์ลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในทิศทางตรงข้ามกันดังแสดงในรูปที่ 4.6ก โดยการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนจะทำให้เซลล์มีการเติบโตได้มากกว่า ดังจะเห็นได้จากความหนาแน่นของสารละลายเซลล์ที่วัดในรูป OD₆₀₀ มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 2.1 เป็น 3.9 อีกทั้งน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าสูงสุดคือ 0.89 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (C/N ratio = 2) ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของไนโตรเจนต่อการสร้างเซลล์ของแบคทีเรีย ไนโตรเจนจัดเป็นองค์ประกอบสำคัญของสารชีวโมเลกุลที่สำคัญหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน โปรตีน กรดนิวคลีอิก และโคเอนไซม์ ซึ่งสารเหล่านี้มีบทบาทและหน้าที่สำคัญในเซลล์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นการขาดแหล่งไนโตรเจนในอาหาร จะทำให้การสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลเหล่านี้เกิดได้ช้าลงหรือหยุดไป จนส่งผลต่อการเติบโตและน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย ในทางกลับกันพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตจาก 0.1 เป็น 5 กรัมต่อลิตร หรือการลดค่า C/N ratio จาก 200 เป็น 4 ทำให้เซลล์มีการผลิตลิพิดลดลงจากร้อยละ 16.74±1.43 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นร้อยละ 7.40±1.06 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Alvarez และคณะ^[22] และงานวิจัยของ Leesing และ Nontaso^[40] ที่พบว่า การจำกัดความเข้มข้นของไนโตรเจนส่งผลทางบวกต่อการผลิตลิพิดของจุลินทรีย์ แต่ทำให้เซลล์มีการเติบโตได้น้อยลง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากในสภาวะที่มีไนโตรเจนอย่างจำกัด ทำให้การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีน ซึ่งทำให้กระบวนการใช้ NADPH ช้าลงหรือหยุดไป ส่งผลให้เกิดการสะสมของ NADPH ไว้ในเซลล์ โดย NADPH นี้ถูกนำไปสร้างกรดไขมัน ซึ่งผลักดันให้เซลล์เข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ลิพิดมากขึ้น^[11] จากผลการทดลองดังกล่าว จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตรในน้ำเสียสังเคราะห์ ซึ่งแบคทีเรียมีการผลิตลิพิดได้ในปริมาณสูงสุด เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

4.4.3.2 ผลของความเข้มข้นกลูโคสต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของ แบคทีเรีย

การเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตมีค่าคงที่เท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร จัดเป็นวิธีการเพิ่ม C/N ratio ในน้ำเสียสังเคราะห์ ซึ่งการเพิ่มค่าดังกล่าวมีผลทางบวกทั้งต่อการเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ดังแสดงในรูปที่ 4.6ข โดยจะได้น้ำหนักแห้งของเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 0.20 กรัมต่อลิตร เป็น 0.88 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสจาก 9 กรัมต่อลิตรเป็น 18 กรัมต่อลิตร หรือเพิ่ม C/N ratio จาก 100 เป็น 400 หลังจากนั้นน้ำหนักแห้งที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้เฉพาะในหอสมุดที่เก็บรักษาไว้เท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์อันใดจากเอกสารฉบับนี้ กรุณาแจ้งให้หอสมุดทราบเพื่อปรับปรุงเอกสารให้ดียิ่งขึ้น

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขณะที่ผลของความเข้มข้นกลูโคสต่อการผลิตลิพิดของเซลล์ให้ผลในลักษณะที่คล้ายคลึงกัน โดยเซลล์มีการสังเคราะห์ลิพิดได้มากขึ้นจากร้อยละ 10.8 เป็น 16.5 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อกลูโคสในน้ำเลี้ยงสังเคราะห์มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 9 กรัมต่อลิตรเป็น 18 กรัมต่อลิตร และแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 มีการผลิตลิพิดได้สูงสุดที่ร้อยละ 18.8 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้กลูโคสเข้มข้น 28 กรัมต่อลิตร หรือ C/N ratio เท่ากับ 600 ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มค่า C/N ด้วยการเพิ่มปริมาณกลูโคสและจำกัดแหล่งไนโตรเจนสามารถช่วยส่งเสริมการสะสมลิพิดในเซลล์ของแบคทีเรียดังที่มีการรายงานไว้ในงานวิจัยที่ผ่านมาของ Patnayak and Sree^[1] และ Kurosawa และคณะ^[55] แต่เมื่อเพิ่มค่า C/N ให้สูงขึ้นจาก 600 เป็น 800 หรือมีความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นจาก 28 กรัมต่อลิตรเป็น 35 กรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์จะมีการผลิตลิพิดลดลงเหลือร้อยละ 12.5 โดยน้ำหนักแห้ง แสดงให้เห็นว่าปริมาณกลูโคสที่สูงจนเกินไป ทำให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเซลล์และการผลิตลิพิดของแบคทีเรียดังแสดงให้เห็นในงานวิจัยของ Riesenbergs and Guthke^[56], Li et al.^[27], Leesing and Nontaso^[40] และ Wu et al.^[57]

4.5 การศึกษาความเป็นไปได้ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย

4.5.1 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทิ้ง

น้ำทิ้งที่เก็บรวบรวมได้จากกระบวนการต้มเส้นขนมจีนของโรงงานอุตสาหกรรมผลิตขนมจีนแห่งหนึ่งในจังหวัดฉะเชิงเทรา มีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน

พารามิเตอร์	ค่าที่ได้ [†]
1. อุณหภูมิ (Temperature)	28.6 °C
2. พีเอช (pH)	6.35
3. ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (TOC)	1,214±76 mg C/L
4. แอมโมเนีย-ไนโตรเจน (NH ₃ -N)	11.1±1.6 mg N/L
5. ไนเตรทไนโตรเจน (NO ₃ ⁻ -N)	1.75±0.01 mg N/L
6. ทีเคเอ็น (TKN)	65.1±39 mg N/L
7. กรดอินทรีย์ระเหยง่าย (VFA)	362±18 mg/L as CaCO ₃
8. Mixed Liquor Suspended Solids, MLSS ^b	280±32 g/L

[†] Mean ± S.D.

จากตารางที่ 4.4 พบว่าอุณหภูมิในน้ำทิ้งที่ใช้ในการศึกษามีค่าเท่ากับ 28.6 ในขณะที่พีเอชของน้ำมีค่าเท่ากับ 6.35 ถือว่าเป็นสภาวะที่แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ น้ำทิ้งมีปริมาณอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (TOC) ในปริมาณสูงถึง 1,214 mg C/L มีกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile fatty

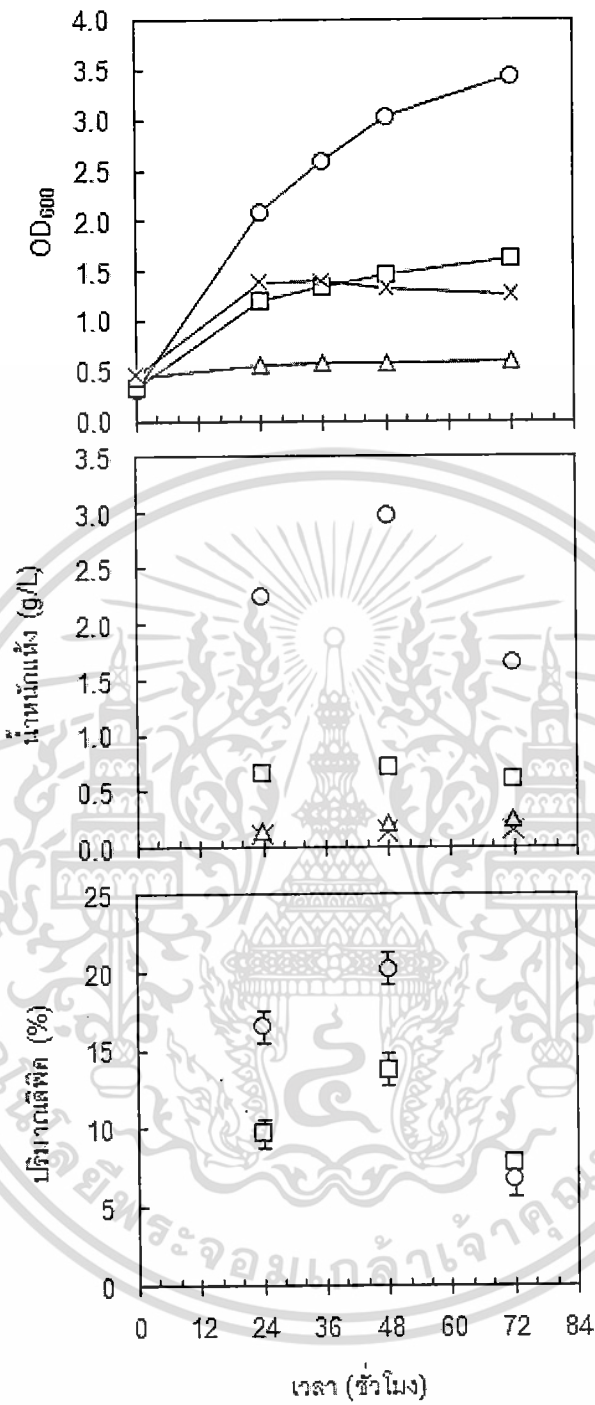
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขอขอบคุณค่า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acids, VFA) เข้มข้น 362 mg/L as CaCO₃ เป็นส่วนประกอบ จากการวิเคราะห์แหล่งไนโตรเจนซึ่งเป็นสารอาหารที่แบคทีเรียใช้ในการเจริญเติบโต พบว่าน้ำทิ้งจากกระบวนการต้มเส้นขนมจีนมีไนโตรเจน ซึ่งวัดในรูปทีเคเอ็น (TKN) แอมโมเนีย-ไนโตรเจน และไนเตรท-ไนโตรเจนในปริมาณต่ำกว่ามากเมื่อเทียบกับปริมาณอินทรีย์คาร์บอนที่มีในน้ำทิ้ง ตัวชี้วัดดังกล่าวบอกลถึงความเป็นไปได้ของการใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนในการเพาะเลี้ยง *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เพื่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์ลิพิด

4.5.2 การเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนเทียบกับน้ำเสียสังเคราะห์และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB

จากการศึกษาการเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB และน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่าแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ดังจะเห็นได้จากการเพิ่มของ OD₆₀₀ จาก 0.311 เป็น 3.430 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร LB นาน 72 ชั่วโมง (รูปที่ 4.7ก) รองลงไปคือการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ ซึ่ง OD₆₀₀ มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.331 เป็น 1.627 ในขณะที่เซลล์มีการเติบโตได้น้อยมากเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน โดย OD₆₀₀ มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 0.433 เป็น 0.592 (รูปที่ 4.7ก) เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างกันสามช่วงเวลาได้แก่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าได้ผลที่สอดคล้องกัน นั่นคือการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด รองลงไปคือการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนตามลำดับ (รูปที่ 4.7ข) ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเติบโตของจุลินทรีย์อาหารเหลว LB จัดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรสมบูรณ์ (nutritionally enriched medium) ที่ประกอบไปด้วยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจากเปปโตน (peptone) รวมไปถึงวิตามินต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ในขณะที่น้ำเสียสังเคราะห์ (synthetic wastewater) จัดเป็นอาหารที่มีส่วนประกอบของธาตุต่างๆในปริมาณน้อย เฉพาะที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จึงทำให้แบคทีเรียเติบโตในอาหารเหลวสูตร LB ได้ดีกว่าน้ำเสียสังเคราะห์ ส่วนน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนที่แม้ว่าจะมีอินทรีย์คาร์บอนในปริมาณที่มากพอต่อการเติบโต (ตารางที่ 4.4) แต่อาจอยู่ในรูปฟอร์มที่ยากต่อการนำไปใช้ ดังนั้นการเติมกลูโคสเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรในน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน ทำให้แบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เติบโตได้ดีขึ้น โดย OD₆₀₀ ในน้ำทิ้งดังกล่าวมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.450 เป็น 1.408 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง (รูปที่ 4.7ก) และเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเป็น 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า OD₆₀₀ ในน้ำทิ้งดังกล่าวมีค่าลดลงเหลือ 1.318 และ 1.259 ตามลำดับ แสดงถึงการเจริญเติบโตที่ลดลงของแบคทีเรียที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการหมดไปของกลูโคสที่ใช้แหล่งคาร์บอนในน้ำทิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 การเจริญเติบโตและการผลิตเลพิทของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ใน LB broth (○), น้ำเสียสังเคราะห์ (□), น้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน (△) และน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนเมื่อเติมกลูโคสเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (×)¹

¹ ไม่มีการรายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณเลพิทในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนทั้งที่เติมกลูโคสและไม่เติม
เอกสาร กลูโคสเนื่องจากน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์และอาหารเหลวสูตร LB
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้แบคทีเรียต้องเริ่มใช้อินทรีย์คาร์บอนที่มีอยู่ในน้ำทิ้ง ซึ่งอาจไม่อยู่ในรูปฟอร์มที่ง่ายต่อการนำไปใช้ ส่งผลให้ OD₆₀₀ มีแนวโน้มลดลงในสองช่วงเวลาดังกล่าว เมื่อพิจารณาปริมาณลิวติพิคของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในตัวอย่างน้ำทิ้ง 4 ประเภท พบว่าการผลิตลิวติพิคเกิดขึ้นได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB และน้ำเสียสังเคราะห์ (รูปที่ 4.7ค) สอดคล้องกับปริมาณน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียที่ได้ในอาหารทั้งสองชนิดดังกล่าว (รูปที่ 4.7ข) นอกจากนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้นจาก 48 ชั่วโมงเป็น 72 ชั่วโมง ทำให้น้ำหนักแห้งของเซลล์และปริมาณลิวติพิคที่พบในแบคทีเรียมีค่าลดลง (รูปที่ 4.7ค) แสดงให้เห็นว่าลิวติพิคที่ผลิตและเก็บสะสมไว้ในเซลล์ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเติบโต สอดคล้องกับงานวิจัยของ Alvarez และคณะ^[22] และงานวิจัยของ Kurosawa และคณะ^[55] ที่พบการลดลงของลิวติพิคที่สะสมไว้ในเซลล์ของแบคทีเรีย *Rhodococcus opacus* PD630 เมื่อเซลล์อยู่ในระยะพักตัวและแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดไป

เมื่อทำการวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำที่ผ่านการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าปริมาณอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (total organic carbon, TOC) มีค่าลดลงในน้ำตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด (ตารางที่ 4.5) โดยเปอร์เซ็นต์การลดลงในน้ำเสียสังเคราะห์ (51.4%) มีค่าใกล้เคียงกับในน้ำทิ้งจากโรงงานนมจีนที่เติมกลูโคสเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (51.0%) รองลงไปคือน้ำทิ้งจากโรงงานนมจีนที่ไม่เติมกลูโคส (49.3%) และในอาหารเหลวสูตร LB (-38.1%) การลดลงของค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงการย่อยสลายและการบำบัดสารประกอบอินทรีย์ในน้ำตัวอย่าง ซึ่งในกรณีของน้ำทิ้งจากโรงงานนมจีนที่เติมกลูโคสและในกรณีของอาหารเหลวสูตร LB สารประกอบอินทรีย์นั้นอาจถูกย่อยสลายเป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile fatty acids) ส่งผลให้ค่าดังกล่าวในน้ำตัวอย่างภายหลังการเพาะเลี้ยงมีค่าสูงขึ้น (ตารางที่ 4.5) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณทีเคเอ็นไนโตรเจน (total kjedahl nitrogen, TKN) ซึ่งเป็นผลรวมของไนโตรเจนในรูปสารประกอบอินทรีย์และแอมโมเนียไนโตรเจน พบว่ามีค่าลดลงเช่นเดียวกัน โดยร้อยละของการลดลงในน้ำเสียสังเคราะห์มีค่ามากที่สุด (65.9%) รองลงไปที่อาหารเหลวสูตร LB (35.3%) ในขณะที่การลดลงในน้ำทิ้งจากโรงงานนมจีนมีค่าระหว่าง 6.0-8.6% นอกจากนี้แอมโมเนียไนโตรเจนมีค่าลดลงในทุกตัวอย่าง ยกเว้นในอาหารเหลวสูตร LB สาเหตุของการลดลงส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากการสลายตัวและการนำไนโตรเจนไปใช้ในการสร้างเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังเป็นผลเนื่องมาจากการระเหยของแอมโมเนีย ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นได้เมื่อพีเอชของน้ำมีค่าสูงขึ้น สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์พีเอชของน้ำตัวอย่างที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกตัวอย่าง ยกเว้นในน้ำทิ้งที่เติมกลูโคส ซึ่งมีปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายในปริมาณเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 คุณลักษณะของน้ำทิ้งภายหลังการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

ดัชนีคุณภาพน้ำ	ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ											
	อาหารเหลวสูตร LB			น้ำเสียสังเคราะห์			น้ำทิ้งจากโรงงานนมจีน					
	ก่อนเพาะเลี้ยง	หลังเก็บเกี่ยวเซลล์	เปลี่ยนแปลง (%)†	ก่อนเพาะเลี้ยง	หลังเก็บเกี่ยวเซลล์	เปลี่ยนแปลง (%)†	ไม่เติมกลูโคส			เติมกลูโคสเข้มข้น 10g/L		
							ก่อนเพาะเลี้ยง	หลังเก็บเกี่ยวเซลล์	เปลี่ยนแปลง (%)†	ก่อนเพาะเลี้ยง	หลังเก็บเกี่ยวเซลล์	เปลี่ยนแปลง (%)†
พีเอช (pH)	6.92	8.53	n/a	5.72	6.10	n/a	6.35	7.31	n/a	5.88	5.12	n/a
อินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (TOC, mg C/L)	6,165±123	3,818±123	-38.1	3,429±8	1,665±76	-51.4	1,214±76	616±8	-49.3	5,444±23	2,669±11	-51.0
ทีเคเอ็นไนโตรเจน (Total Kjehdal nitrogen, TKN, mg N/L)	1,153±46	746±34	-35.3	806±5	275±34	-65.9	65.1±3.9	59.5±3.6	-8.60	64.9±0.0	61.0±0.8	-6.01
กรดอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic acids, mg/L as CaCO3)	599±71	624±35	+4.17	624±0	549±71	-12.0	362±18	237±53	-34.5	412±18	561±18	+36.2
แอมโมเนียไนโตรเจน (Ammonia-N, mg N/L)	30.8±2.0	84.0±12.2	+173	21.9±0.4	19.4±0.8	-11.4	11.1±1.6	2.49±0.39	-77.6	10.8±0.39	1.94±0.39	-82.0

† คำนวณโดยใช้สูตรต่อไปนี้ : $\frac{(\text{หลังเก็บเกี่ยวเซลล์} - \text{ก่อนเพาะเลี้ยง})}{\text{ก่อนเพาะเลี้ยง}} \times 100$ โดยเครื่องหมาย + หรือ - แสดงการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของดัชนีคุณภาพน้ำที่คำนวณ ยกเว้น พีเอช ซึ่งไม่มีการคำนวณ (not available, n/a)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิพิดได้ในปริมาณสูงจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่ พร้อมทั้งศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ รวมทั้งศึกษาความเป็นไปได้ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือก ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ผลจากการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่โดยใช้เทคนิควาดเชื้อ (spread plate technique) ร่วมกับเทคนิคขีดเชื้อ (cross streak technique) พบว่าได้แบคทีเรียทั้งหมด 12 ไอโซเลท จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่ส่วนใหญ่มีลักษณะรูปร่างท่อน ผลจากการศึกษาปริมาณลิพิดโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับการชั่งน้ำหนัก พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 จัดเป็นแบคทีเรียที่ผลิตลิพิดได้สูงสุด

2. ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ *Aeromonas* sp. จึงตั้งชื่อว่า *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4

3. ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียในช่วงต้นของระยะพักตัว (early stationary phase) ซึ่งคือ 36 ชั่วโมง สามารถผลิตลิพิดได้ดีที่สุด แบคทีเรียสามารถเติบโตและผลิตลิพิดได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่ใช้กลูโคสหรือฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน การปรับลดค่า C/N ratio ในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยการเพิ่มปริมาณกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และจำกัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้เซลล์มีการผลิตลิพิดได้ดีขึ้น แต่มีข้อควรระวังในเรื่องการยับยั้งการเติบโตและการผลิตลิพิดเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสในปริมาณที่มากเกินไป หรือมีความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ต่ำเกินไป

4. ผลการศึกษสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนพบว่า น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมดังกล่าวมีอินทรีย์คาร์บอนในปริมาณสูง ในขณะที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในน้ำในระดับที่ต่ำกว่ามากเมื่อเทียบกับปริมาณอินทรีย์คาร์บอน

5. จากการศึกษาการเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB และน้ำเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์พบว่าน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียได้ไม่ดีเท่าอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และน้ำเสียสังเคราะห์

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาปัจจัยของสภาวะแวดล้อมอื่นๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์เช่น พีเอช, อุณหภูมิ แร่ธาตุ หรือวิตามินชนิดต่างๆ
2. ควรศึกษาการผลิตลิพิดด้วยระบบแบบป้อน (Fed batch) ที่มีการเติมกลูโคสหรือแหล่งคาร์บอนเป็นช่วงๆ เพื่อหาแนวทางการเพิ่มผลผลิตลิพิดในน้ำเสียสังเคราะห์
3. ควรศึกษาถึงความเป็นไปได้ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแหล่งคาร์บอนราคาถูกชนิดอื่นๆ เช่น กากน้ำตาล, กลีเซอรอล รวมไปถึงน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. Patnayak, S. and A. Sree. 2005. Screening of bacterial associates of marine sponges for single cell oil and PUFA. *Letters in Applied Microbiology*. 40: 358-363.
2. รัตติยา อ่องมะลิ. 2555. การคัดแยกแบคทีเรียที่สะสมลิพิดจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2555.
3. พรพจน์ ศรีสุขขะกุล. 2549. กรดไขมัน...ชนิดไหนที่เราต้องการ. *วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี วารสารวิจัยและพัฒนา*. 21: 51-56.
4. Meng, X., J. Yang, X. Xu, L. Zhang, Q. Nie, and M. Xian. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. 34: 1-5.
5. Xue, F., X. Zhang, H. Luo, and T. Tan. 2006. A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochemistry*. 41: 1609-1702.
6. Li, Q., W. Du, and D. Liu. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80: 749-756.
7. Gouda, M.K., S. Omar, and L. Aouad. 2008. Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 1703-1711.
8. Zhang, J., X. Fang, X.-L. Zhu, Y. Li, H.-P. Xu, B.-F. Zhao, L. Chen, and X.-D. Zhang. 2011. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. *Biomass and Bioenergy*. 35: 1906-1911.
9. Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advance*. 25: 294-306.
10. Alvarez, H.M. and A. Steinbüchel. 2002. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 367-376.
11. มนุเทพ กนกศิลป์. 2533. ผลของสภาวะแวดล้อมต่อการผลิตกรดไขมันของยีสต์ *Rhodotorula gracilis*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะพลังงานและวัสดุ มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี พ.ศ. 2533.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. ฉัญวัฒน์ ใจใส. 2545. การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะจากจุลินทรีย์ป่าชายเลน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2545.
13. Azeem, A., Y.F. Neelagund, and V. Rathod. 1999. Biotechnological production of oil: Fatty acid composition of microbial oil. *Plant Foods for Human Nutrition*. 53: 381-386.
14. Li, Q., W. Du, and D. Liu. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80: 749-756.
15. Goecke, F., Hernandez, M. Bittner, M. Gonzalez, J. Becerra, and M. Silva. 2010. Fatty acid composition of three species of *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 45: 325-330.
16. ผกาวดี แก้วกันเนตร และแพรวพิลาศ ดุจจานุทัศน์. 2553. การใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมเกษตรเป็นแหล่งอาหารให้สาหร่ายเพื่อผลิตไบโอดีเซล. *วารสารศูนย์บริการวิชาการ*. 18: 4-10.
17. Beopoulos, A., J. Cescut, R. Haddouche, J.-L. Uribelarra, C. Molina-Jouve, and J.-M. Nicaud. 2009. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*. 48: 375-387.
18. Rattedge, C. and J.P. Wynn. 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advance Applied Microbiology*. 51: 1-51.
19. รัตน์ภรณ์ ลีสิงห์. 2551. การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูง. *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น*. 36: 129-138.
20. Alvarez, H.M., R. Kalscheuer, and A. Steinbüchel 1997. Accumulation of storage lipids in species of *Rhodococcus* and *Norcadia* and effects of inhibitors and polyethylene glycol. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 99: 239-246.
21. Rattedge, C. 2000. Microbial lipids. In *Products of Secondary Metabolism*. Eds: H. Kleinkauf and H.V. Dohren; Wiley-VCH. 133-186.
22. Alvarez, H.M., R. Kalscheuer, and A. Steinbüchel. 2000. Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54: 218-223.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

23. ไพฑูรย์ สุขสถาวรพันธุ์. 2537. การสังเคราะห์กรดไขมันจำเป็นที่อยู่ตัวโดยยีสต์และวิธีทางเคมี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี พ.ศ. 2537.
24. Gottschalk, G. 1985. *Bacteria Metabolism*. New York: Springer-Verlag.
25. Kosa, M. and A. J. Ragauskas. 2011. Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research. *Trends in Biotechnology*. 29: 53-61.
26. Alvarez, H.M. and A. Steinbüchel. 2002. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 367-376.
27. Li, Y., Z.K. Zhao, and F. Bai. 2007. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 41: 312-317.
28. Perez-Garcia, O., F. M. E. Escalante, L. E. de-Bashan, and Y. Bashan. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*. 45: 11-36.
29. Yokochi, T., D. Honda, T. Higashihara, and T. Nakahara. 1998. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49: 72-76.
30. Fei, Q., H. N. Chang, L. Shang, J.-D.-R. Choi, N. Kim, and J. Kang. 2011. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 102: 2695-2701.
31. Gouda, M., S. Omar, and L. Aouad. 2008. Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 1703-1711.
32. Ryu, B.-G., J. Kim, K. Kim, Y. -E. Choi, J. -I. Han, and J. -W. Yang. High-cell-density cultivation of oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biodiesel production using organic waste from the brewery industry. *Bioresource Technology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.054>.
33. Karatay, S.E. and G. Donmez. 2010. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. *Bioresource Technology*. 101: 7988-7990.

34. Yen, H.-W., Y.-C. Yang, and Y.-H. Yu. 2012. Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 114: 453-456.
35. Kitcha, S. and B. Cheirsilp. 2011. Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. *Energy Procedia*. 9: 274-282.
36. du Preez, J.C., M. Immelman, and S.G. Kilian. 1996. The utilization of short-chain monocarboxylic acids as carbon sources for the production of gamma-linolenic acid by *Mucor* strains in fed-batch culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2: 66-72.
37. Rodrigues, G. and C. Pais. 2000. The influence of acetic and other weak carboxylic acids on growth and cellular death of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Food Technology and Biotechnology*. 38: 27-32.
38. Yahara, G.A., M.A. Javier, M.J.M. Tulio, G.R. Javier, and A.U.M. Guadalupe. 2007. Modeling of yeast *Brettanomyces bruxellensis* growth at different acetic acid concentrations under aerobic and anaerobic conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 30: 389-395.
39. Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*. 86: 807-815.
40. Leesing, R. and N. Nontaso. 2011. Isolation and cultivation of oleaginous yeast for microbial oil production. *KKU Research Journal*. 16: 112-126.
41. Evan, C.T. and C. Ratledge. 1984. Influence of nitrogen metabolism on lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Journal of General Microbiology*. 130: 1693-1704.
42. Zheng, Y., Z. Chi, B. K. Ahring, and S. Chen. 2012. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biofuel production: Ammonia's effect. *Biomass and Bioenergy*. 37: 114-121.
43. Lee, W., S. Kang, and H. Shin. 2003. Sludge characteristics and their contribution to microfiltration in submerged membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science*. 216: 217-227.
44. Bligh, E.G. and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 37: 911-917.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

45. สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, คณะกรรมการจัดทำคู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย. 2547. *คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย*. พิมพ์ครั้งที่ 4 (ปรับปรุงครั้งที่ 2) กรุงเทพฯ: สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.
46. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation. 1995. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 19th ed. Washington: APHA, AWWA, WEF.
47. Hongxiang, X., W. Min, W. Xiaogu, Y. Junyi, and W. Chunsheng. 2008. Bacterial diversity in deep-sea sediment from northeastern Pacific Ocean. *Acta Ecologica Sinica*. 28: 479-485.
48. van der Kooji, D., A. Visser, and W.A.M. Hijenen. 1980. Growth of *Aeromonas hydrophila* at low concentrations of substrates added to tap water. *Applied Environmental Microbiology*. 39: 1198-1204.
49. Fontanille, P., V. Kumar, G. Christophe, R. Nouaille, and C. Laroche. 2012. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*. 114: 443-449.
50. Voss, I. and A. Steinbüchel. 2001. High cell density cultivation of *Rhodococcus opacus*; for lipid production at a pilot-plant scale. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55: 547-555.
51. Zhu, L.Y., M.H. Zong, and H. Wu. 2008. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology*. 99: 7881-7885.
52. Rasheva, T.V., A.V. Kujumdzieva, and J.N. Hallet. 1997. Lipid production by *Monascus albino* strain. *Journal of Biotechnology*. 56: 217-224.
53. Leasing, R. and N. Nontaso. 2010. *Microalgal oil production by green microalgae under heterotrophic cultivation*. *KKU Research Journal*. 15: 787-793.
54. อภิเชษฐ์ ศรีวิชา และรัตนภรณ์ ลีสิงห์. 2553. *การผลิตลิปิดโดยยีสต์ไขมันสูงเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล*. การประชุมทางวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 11 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
55. Kurosawa, K., P. Boccazzi, N. M. de Almeida, and A. J. Sinskey. 2010. High-cell-density batch fermentation of *Rhodococcus opacus* PD630 using high glucose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- concentration for triacylglycerol production. *Journal of Biotechnology*. 147: 212-218.
56. Riesenber, D. and R. Guthke. 1999. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51: 422-430.
57. Wu, H., Y. Li, L. Chen, and M. Zong. 2011. Production of microbial oil with high oleic acid content by *Trichosporon capitatum*. *Applied Energy*. 88: 138-142.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ก.1 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ทำการวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธีการ 2 วิธีได้แก่

i. วัดความหนาแน่นโดยแสง (optical density) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในกรณีตัวอย่างที่วัดมีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 1.0 ทำการเจือจางตัวอย่างนั้นอย่างเหมาะสมและวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.1-1.0 ทำการวัดค่า 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างและบันทึกผลการทดลอง

ii. วัดน้ำหนักแห้งของเซลล์ โดยนำตัวอย่างสารละลายเซลล์ (suspension) ของแบคทีเรีย ไปทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze drying และชั่งน้ำหนักแห้งที่ได้

ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณลิพิด

ปริมาณลิพิดของแบคทีเรียหาโดยใช้วิธีการดัดแปลงของ Bligh และ Dyer (1959) โดยมีขั้นตอนการทำดังต่อไปนี้

1. ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย 0.2 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์ม 7 มิลลิลิตร และเมทานอล 14 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 30 วินาที

2. นำหลอดทดลองวางในอ่างอัลตราโซนิค (ultrasonic bath) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

3. เติมคลอโรฟอร์ม 7 มิลลิลิตร ทำการเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร ทำการเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น 15 นาที

4. ใช้พลาสติกเจอร์ไปเปิดดูเอาสารละลายส่วนล่างที่มีคลอโรฟอร์มและลิพิดไปใส่ขวดก้นกลมที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนัก

5. ทำการสกัดแบบเดิมซ้ำอีกครั้ง ใช้พลาสติกเจอร์ไปเปิดดูเอาสารที่สกัดได้ใส่ลงในขวดก้นกลมในข้อที่ 4 จากนั้นนำไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator) สภาพที่ใช้ในการระเหยคือ ความดัน 200 มิลลิเมตรปรอท อุณหภูมิ 70 ± 2 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเครื่องทำความเย็น (Cooling) 20 ± 2 องศาเซลเซียส

6. นำขวดก้นกลมที่ผ่านการระเหยแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (Dessicator) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลม พร้อมกับคำนวณหาลิพิดในแบคทีเรียโดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณลิพิด (\%โดยน้ำหนักแห้ง)} = \frac{\text{น้ำหนักขวดอบแห้งหลังสกัด} - \text{น้ำหนักขวดอบแห้งก่อนสกัด}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อ้างอิงตามวิธี Somogyi Nelson's method (1952) มีรายละเอียดวิธีการทำดังนี้คือ

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลาย Copper reagent เตรียมโดย

1.1 ละลาย 10 กรัม Copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ใน 100 มิลลิลิตรของน้ำกลั่น

1.2 เตรียม Phosphate-tartrate solution โดยละลาย $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 70.55 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม Sodium potassium tartrate (Tetrahydrate) 40 กรัม ทำให้ละลาย แล้วเติม 1 นอร์มอล Sodium Hydroxide (NaOH) 100 มิลลิลิตร ตามด้วย Anhydrous Na_2SO_4 120 กรัม ทำให้ละลาย จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ถึงขีด 900 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองออกด้วยกระดาษ Whatman no.4

1.3 ผสมสารละลายในข้อ 1.1 และข้อ 1.2 ผสมให้เข้ากัน

2. สารละลาย Arsenomolybdate reagent เตรียมโดย

2.1 ละลาย Ammoniummolybdate ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติม Sulfuric acid (Conc. H_2SO_4) 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.2 ละลาย Disodium arsenate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

2.3 ผสมสารละลายในข้อ 2.1 และข้อ 2.2 เข้าด้วยกัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ถึงขีด 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายใส่ขวดสีชาและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

1. ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตาราง ก.1

2. เติมสารละลาย Copper reagent 1 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอด

3. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที วางลูกแก้วบนปากหลอดทดลองจากนั้นนำมาทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำ

4. เติมสารละลาย Arsenomolybdate reagent อีกหลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเห็นเป็นสีเขียวหรือสีน้ำเงิน ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาล

5. เติมน้ำกลั่นอีกหลอดละ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

6. นำค่าการดูดกลืนแสงไปพลอตกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (แกน x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.1 ตารางแสดงการปิเปตสารละลายมาตรฐานกลูโคส

ความเข้มข้นสารละลาย กลูโคสมาตรฐาน ($\mu\text{g/mL}$)	ปริมาตร สารละลาย กลูโคส (mL)	ปริมาตรน้ำกลั่น (mL)	ปริมาตรรวม (mL)
0	0	1.0	1.0
10	0.1	0.9	1.0
20	0.2	0.8	1.0
30	0.3	0.7	1.0
40	0.4	0.6	1.0
50	0.5	0.5	1.0
60	0.6	0.4	1.0
70	0.7	0.3	1.0
80	0.8	0.2	1.0
90	0.9	0.1	1.0
100	1.0	0	1.0

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ปิเปต 1 มิลลิลิตร ของตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ใส่ลงในหลอดทดลอง นำมาทำให้เกิดสีด้วยวิธีการเดียวกับสารละลายมาตรฐานกลูโคส ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร พร้อมกับคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากหัวข้อก่อนหน้า

ภาคผนวก ข

R4_4	----	CTA-CACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	44
Aeromonas sobria strain JY081016-1	----	CTA-CACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	44
Aeromonas sobria strain NQ090701	----	CTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	45
Aeromonas sobria strain LD081008A-1	----	CTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	45
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658	----	CTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	45
Aeromonas veronii strain YA0900911	----	CTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	45
Aeromonas veronii strain CYJ202	----	CTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	45
Aeromonas culicicola strain 037TRG	----	CTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	45
Aeromonas veronii strain JF46112	----	CTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	45
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1	AGGCCT	TAACACA-TGCAAGTCGAGCGG-----ATGAAGGGAGCTTGC--CC	43
Pseudomonas fluorescens strain KB6	AGGCCT	TAACACA-TGCAAGTCGAGCGG-----TAGAGAGAAGCTTGCTTCT	45
Pseudomonas putida isolate Tel	AGGCCT	TAACACA-TGCAAGTCGAGCGG-----ATGACGGGAGCTTGC--TC	43
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110	-----	ATACAATGCA-GTCGAGCGG-----A-GA-GTGAGCTTGC--TC	34
Pseudomonas aeruginosa strain AV2	TGCCCT	AAAAACA-TGCA-GTCGAGCGG-----ATGAAGGGAGCTTGC--TC	42
		*** **	
R4_4	TTTGCC	CGGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	94
Aeromonas sobria strain JY081016-1	TTTGCC	CGGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	94
Aeromonas sobria strain NQ090701	TTTGCC	CGGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	95
Aeromonas sobria strain LD081008A-1	TTTGCC	CGGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	95
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658	TTTGCC	CGGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	95
Aeromonas veronii strain YA09011	TTTGCC	CGGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	95
Aeromonas veronii strain CYJ202	TTTGCC	CGGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	95
Aeromonas culicicola strain 03037TRG	TTTGCC	CGGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	95
Aeromonas veronii strain JF46112	TTTGCC	CGGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	95
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1	TCGTAT	--TCAGCGGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCCTGGT	91
Pseudomonas fluorescens strain KB6	CTTGA	----GAGCGGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCCTGGT	91
Pseudomonas putida isolate Tel	TTTGAT	--TCAGCGGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCCTGGT	91
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110	ACGGAT	--TCAGCGGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCCTGGT	82
Pseudomonas aeruginosa strain AV2	CTGGAT	--TCAGCGGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCCTGGT	90

R4_4	CGAGGG	GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACCGCCTACG	144
Aeromonas sobria strain JY081016-1	CGAGGG	GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACCGCCTACG	144
Aeromonas sobria strain NQ090701	CGAGGG	GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACCGCCTACG	145
Aeromonas sobria strain LD081008A-1	CGAGGG	GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACCGCCTACG	145
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658	CGAGGG	GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACCGCCTACG	145
Aeromonas veronii strain YA0900911	CGAGGG	GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACCGCCTACG	145
Aeromonas veronii strain CYJ202	CGAGGG	GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACCGCCTACG	145
Aeromonas culicicola strain 037TRG	CGAGGG	GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACCGCCTACG	145
Aeromonas veronii strain JF46112	CGAGGG	GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACCGCCTACG	145
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1	AGTGGGG	GACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACCGCCTACG	141
Pseudomonas fluorescens strain KB6	AGTGGGG	GACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACCGCCTACG	141
Pseudomonas putida isolate Tel	AGTGGGG	GACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACCGCCTACG	141
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110	AGTGGGG	GATAACGTTTCGAAAGGGGGCGCTAATACCGCATAACCGCCTACG	132
Pseudomonas aeruginosa strain AV2	AGTGGGG	GATAACGTTTCGAAAGCGGCGCTAATACCGCATAACCGCCTACG	140
		* **	
R4_4	GGGAAAG	CAGGGACCTTCGGGCCTTGCCCGATTGGATGAACCCAGGTG	194
Aeromonas sobria strain JY081016-1	GGGAAAG	CAGGGACCTTCGGGCCTTGCCCGATTGGATGAACCCAGGTG	194
Aeromonas sobria strain NQ0907 01	GGGAAAG	CAGGGACCTTCGGGCCTTGCCCGATTGGATGAACCCAGGTG	195
Aeromonas sobria strain LD081008A-1	GGGAAAG	CAGGGACCTTCGGGCCTTGCCCGATTGGATGAACCCAGGTG	195
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658	GGGAAAG	CAGGGACCTTCGGGCCTTGCCCGATTGGATGAACCCAGGTG	195
Aeromonas veronii strain YA09011	GGGAAAG	CAGGGACCTTCGGGCCTTGCCCGATTGGATGAACCCAGGTG	195
Aeromonas veronii strain CYJ202	GGGAAAG	CAGGGACCTTCGGGCCTTGCCCGATTGGATGAACCCAGGTG	195
Aeromonas culicicola strain 03037TRG	GGGAAAG	CAGGGACCTTCGGGCCTTGCCCGATTGGATGAACCCAGGTG	195
Aeromonas veronii strain JF46112	GGGAAAG	CAGGGACCTTCGGGCCTTGCCCGATTGGATGAACCCAGGTG	195
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1	GGGAAAG	CAGGGACCTTCGGGCCTTGCCCGATTGGATGAACCCAGGTG	191
Pseudomonas fluorescens strain KB6	GGGAAAG	CAGGGACCTTCGGGCCTTGCCCGATTGGATGAACCCAGGTG	191
Pseudomonas putida isolate Tel	GGGAAAG	CAGGGACCTTCGGGCCTTGCCCGATTGGATGAACCCAGGTG	191
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110	GGGAAAG	CAGGGACCTTCGGGCCTTGCCCGATTGGATGAACCCAGGTG	182
Pseudomonas aeruginosa strain AV2	GGGAAAG	CAGGGACCTTCGGGCCTTGCCCGATTGGATGAACCCAGGTG	190
		** **	

ภาพที่ ข.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท R.4 เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่มีการรายงานไว้ใน GenBank

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R4_4
Aeromonas sobria strain JY081016-1 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 244
Aeromonas sobria strain NQ090701 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 244
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 245
Aeromonas hydrophila strain NBRC12658 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 245
Aeromonas veronii strain YA0900911 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 245
Aeromonas veronii strain CYJ202 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 245
Aeromonas culicicola strain 037TRG GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 245
Aeromonas veronii strain JF46112 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 245
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 241
Pseudomonas fluorescens strain KB6 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 241
Pseudomonas putida isolate Tel GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 241
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 232
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 240
***** **

R4_4
Aeromonas sobria strain JY081016-1 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACT 294
Aeromonas sobria strain NQ090701 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACT 294
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACT 295
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACT 295
Aeromonas veronii strain YA0900911 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACT 295
Aeromonas veronii strain CYJ202 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACT 295
Aeromonas culicicola strain 03037TRG TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACT 295
Aeromonas veronii strain JF46112 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACT 295
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACT 291
Pseudomonas fluorescens strain KB6 TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACT 291
Pseudomonas putida isolate Tel TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACT 291
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACT 282
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACT 290
***** **

R4_4
Aeromonas sobria strain JY081016-1 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGAT 344
Aeromonas sobria strain NQ090701 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGAT 344
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGAT 345
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGAT 345
Aeromonas veronii strain YA0900911 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGAT 345
Aeromonas veronii strain CYJ202 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGAT 345
Aeromonas culicicola strain 03037TRG CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGAT 345
Aeromonas veronii strain JF46112 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGAT 345
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGAT 341
Pseudomonas fluorescens strain KB6 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGAT 341
Pseudomonas putida isolate Tel CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGAT 341
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGAT 332
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGAT 340
***** **

R4_4
Aeromonas sobria strain JY081016-1 GCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 394
Aeromonas sobria strain NQ090701 GCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 394
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 GCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 395
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 GCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 395
Aeromonas veronii strain YA0900911 GCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 395
Aeromonas veronii strain CYJ202 GCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 395
Aeromonas culicicola strain 03037TRG GCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 395
Aeromonas veronii strain JF46112 GCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 395
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGCACTTTA 391
Pseudomonas fluorescens strain KB6 CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGCACTTTA 391
Pseudomonas putida isolate Tel CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGCACTTTA 391
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGCACTTTA 382
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGCACTTTA 390
***** **

R4_4
Aeromonas sobria strain JY081016-1 AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 444
Aeromonas sobria strain NQ090701 AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 444
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 445
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 445
Aeromonas veronii strain YA0900911 AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 445
Aeromonas veronii strain CYJ202 AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 445
Aeromonas culicicola strain 03037TRG AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 445
Aeromonas veronii strain JF46112 AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 445
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 AGTTGGGAGGAAAGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCG 441
Pseudomonas fluorescens strain KB6 AGTTGGGAGGAAAGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCG 441
Pseudomonas putida isolate Tel AGTTGGGAGGAAAGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCG 441
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 AGTTGGGAGGAAAGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCG 432
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 AGTTGGGAGGAAAGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCG 440
** ***** **

ภาพที่ ข.1 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R4_4
Aeromonas sobria strain JY081016-1 GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG 494
Aeromonas sobria strain NQ090701 GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG 494
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG 495
Aeromonas hydrophila_strain NBRC 12658 GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG 495
Aeromonas veronii strain YA0900911 GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG 495
Aeromonas veronii strain CYJ202 GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG 495
Aeromonas culicicola strain_03037TRG GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG 495
Aeromonas veronii strain JF46112 GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG 495
Pseudomonas_vancouverensis strain MEBHU1 ACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG 491
Pseudomonas fluorescens strain KB6 ACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG 491
Pseudomonas putida isolate Te1 ACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG 491
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 ACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG 482
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 ACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG 490

R4_4
Aeromonas sobria strain JY081016-1 GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAGCAGCGGTT 544
Aeromonas sobria strain NQ090701 GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAGCAGCGGTT 544
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAGCAGCGGTT 545
Aeromonas hydrophila_strain NBRC 12658 GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAGCAGCGGTT 545
Aeromonas veronii strain YA0900911 GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAGCAGCGGTT 545
Aeromonas veronii strain CYJ202 GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAGCAGCGGTT 545
Aeromonas culicicola strain_03037TRG GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAGCAGCGGTT 545
Aeromonas veronii strain JF46112 GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAGCAGCGGTT 545
Pseudomonas_vancouverensis strain MEBHU1 GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGTAGTGGTT 541
Pseudomonas fluorescens strain KB6 GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGTAGTGGTT 541
Pseudomonas putida isolate Te1 GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGTAGTGGTT 541
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGTAGTGGTT 532
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGTAGTGGTT 539

R4_4
Aeromonas sobria strain JY081016-1 GGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTAA 594
Aeromonas sobria strain NQ090701 GGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTAA 594
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 GGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTAA 595
Aeromonas hydrophila_strain NBRC 12658 GGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTAA 595
Aeromonas veronii strain YA0900911 GGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTAA 595
Aeromonas veronii strain CYJ202 GGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTAA 595
Aeromonas culicicola strain_03037TRG GGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTAA 595
Aeromonas veronii strain JF46112 GGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTAA 595
Pseudomonas_vancouverensis strain MEBHU1 TGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTCAA 591
Pseudomonas fluorescens strain KB6 TGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTCAA 591
Pseudomonas putida isolate Te1 TGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTCAA 591
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 TGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTCAA 582
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 CAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTCAA 589

R4_4
Aeromonas sobria strain JY081016-1 AACTGT-CCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGC 643
Aeromonas sobria strain NQ090701 AACTGT-CCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGC 643
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 AACTGT-CCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGC 644
Aeromonas hydrophila_strain NBRC 12658 AACTGT-CCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGC 644
Aeromonas veronii strain YA0900911 AACTGT-CCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGC 644
Aeromonas veronii strain CYJ202 AACTGT-CCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGC 644
Aeromonas culicicola strain_03037TRG AACTGT-CCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGC 644
Aeromonas veronii strain JF46112 AACTGT-CCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGC 644
Pseudomonas_vancouverensis strain MEBHU1 AACTGA-CAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAACTTCTGTGTAGC 640
Pseudomonas fluorescens strain KB6 AACTGA-CTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAACTTCTGTGTAGC 640
Pseudomonas putida isolate Te1 AACTGG-CGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAACTTCTGTGTAGC 640
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 AACTGGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAACTTCTGTGTAGC 631
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 AACTAC-TGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAACTTCTGTGTAGC 638

R4_4
Aeromonas sobria strain JY081016-1 GGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCCCC 693
Aeromonas sobria strain NQ090701 GGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCCCC 693
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 GGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCCCC 694
Aeromonas hydrophila_strain NBRC 12658 GGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCCCC 694
Aeromonas veronii strain YA0900911 GGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCCCC 694
Aeromonas veronii strain CYJ202 GGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCCCC 694
Aeromonas culicicola strain_03037TRG GGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCCCC 694
Aeromonas veronii strain JF46112 GGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCCCC 694
Pseudomonas_vancouverensis strain MEBHU1 GGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGCGGCCCC 690
Pseudomonas fluorescens strain KB6 GGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGCGGCCCC 690
Pseudomonas putida isolate Te1 GGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGCGGCCCC 690
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 GGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGCGGCCCC 681
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 GGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGCGGCCCC 688

ภาพที่ ข.1 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R4_4
 Aeromonas sobria strain JY081016-1 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 742
 Aeromonas sobria strain NQ090701 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 742
 Aeromonas sobria strain LD081008A-1 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 743
 Aeromonas hydrophila_strain NBRC 12658 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 743
 Aeromonas veronii strain YA0900911 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 743
 Aeromonas veronii strain CYJ202 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 743
 Aeromonas culicicola strain_03037TRG TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 743
 Aeromonas veronii strain JF46112 TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 739
 Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 739
 Pseudomonas fluorescens strain KB6 TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 739
 Pseudomonas putida isolate Tel TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 739
 Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 731
 Pseudomonas aeruginosa strain AV2 TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 737
 ***** * ***** ** ***** ***** ***** *****

R4_4
 Aeromonas sobria strain JY081016-1 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGATTTGGAGGCTGTG 792
 Aeromonas sobria strain NQ090701 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGATTTGGAGGCTGTG 792
 Aeromonas sobria strain LD081008A-1 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGATTTGGAGGCTGTG 793
 Aeromonas hydrophila_strain NBRC 12658 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGATTTGGAGGCTGTG 793
 Aeromonas veronii strain YA0900911 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGATTTGGAGGCTGTG 793
 Aeromonas veronii strain CYJ202 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGATTTGGAGGCTGTG 793
 Aeromonas culicicola strain_03037TRG TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGATTTGGAGGCTGTG 793
 Aeromonas veronii strain JF46112 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGATTTGGAGGCTGTG 793
 Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGATTTGGAGGCTGTG 789
 Pseudomonas fluorescens strain KB6 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGATTTGGAGGCTGTG 789
 Pseudomonas putida isolate Tel TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGATTTGGAGGCTGTG 789
 Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGATTTGGAGGCTGTG 781
 Pseudomonas aeruginosa strain AV2 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGATTTGGAGGCTGTG 787
 ***** * ***** ** ***** ***** ***** *****

R4_4
 Aeromonas sobria strain JY081016-1 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGCTTAAATCGACCGCCTGGGG 842
 Aeromonas sobria strain NQ090701 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGCTTAAATCGACCGCCTGGGG 842
 Aeromonas sobria strain LD081008A-1 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGCTTAAATCGACCGCCTGGGG 843
 Aeromonas hydrophila_strain NBRC 12658 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGCTTAAATCGACCGCCTGGGG 843
 Aeromonas veronii strain YA0900911 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGCTTAAATCGACCGCCTGGGG 843
 Aeromonas veronii strain CYJ202 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGCTTAAATCGACCGCCTGGGG 843
 Aeromonas culicicola strain_03037TRG TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGCTTAAATCGACCGCCTGGGG 843
 Aeromonas veronii strain JF46112 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGCTTAAATCGACCGCCTGGGG 843
 Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 TCCTTGAGACTCTTAGTGGCGCAGCTAACCGCTTAAATCGACCGCCTGGGG 839
 Pseudomonas fluorescens strain KB6 TCCTTGAGACTCTTAGTGGCGCAGCTAACCGCTTAAATCGACCGCCTGGGG 839
 Pseudomonas putida isolate Tel TCCTTGAGACTCTTAGTGGCGCAGCTAACCGCTTAAATCGACCGCCTGGGG 839
 Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 TCCTTGAGACTCTTAGTGGCGCAGCTAACCGCTTAAATCGACCGCCTGGGG 831
 Pseudomonas aeruginosa strain AV2 TCCTTGAGACTCTTAGTGGCGCAGCTAACCGCTTAAATCGACCGCCTGGGG 837
 ***** * ***** ** ***** ***** ***** *****

R4_4
 Aeromonas sobria strain JY081016-1 AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 892
 Aeromonas sobria strain NQ090701 AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 892
 Aeromonas sobria strain LD081008A-1 AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 893
 Aeromonas hydrophila_strain NBRC 12658 AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 893
 Aeromonas veronii strain YA0900911 AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 893
 Aeromonas veronii strain CYJ202 AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 893
 Aeromonas culicicola strain_03037TRG AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 893
 Aeromonas veronii strain JF46112 AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 893
 Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 889
 Pseudomonas fluorescens strain KB6 AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 889
 Pseudomonas putida isolate Tel AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 889
 Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 881
 Pseudomonas aeruginosa strain AV2 AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 887
 ***** * ***** ** ***** ***** ***** *****

R4_4
 Aeromonas sobria strain JY081016-1 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 942
 Aeromonas sobria strain NQ090701 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 942
 Aeromonas sobria strain LD081008A-1 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 943
 Aeromonas hydrophila_strain NBRC 12658 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 943
 Aeromonas veronii strain YA0900911 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 943
 Aeromonas veronii strain CYJ202 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 943
 Aeromonas culicicola strain_03037TRG GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 943
 Aeromonas veronii strain JF46112 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 943
 Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG 939
 Pseudomonas fluorescens strain KB6 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG 939
 Pseudomonas putida isolate Tel GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG 939
 Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG 931
 Pseudomonas aeruginosa strain AV2 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG 937
 ***** * ***** ** ***** ***** ***** *****

ภาพที่ ข.1 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R4_4
Aeromonas sobria strain JY081016-1 CCTTGACATGCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 991
Aeromonas sobria strain NQ090701 CCTTGACATGCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 992
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 CCTTGACATGCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 992
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 CCTTGACATGCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 992
Aeromonas veronii strain YA0900911 CCTTGACATGCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 992
Aeromonas veronii strain CYJ202 CCTTGACATGCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 992
Aeromonas culicicola strain_03037TRG CCTTGACATGCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 992
Aeromonas veronii strain JF46112 CCTTGACATGCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 992
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 CCTTGACATCCAATGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG-AAC 988
Pseudomonas fluorescens strain KB6 CCTTGACATCCAATGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG-AAC 988
Pseudomonas putida isolate Te1 CCTTGACATGCGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG-AAC 988
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 CCTTGACATGCGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG-AAC 980
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 CCTTGACATGCTGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAAC 987
***** ** * ***** ***** **

R4_4
Aeromonas sobria strain JY081016-1 CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTG 1041
Aeromonas sobria strain NQ090701 CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTG 1041
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTG 1042
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTG 1042
Aeromonas veronii strain YA0900911 CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTG 1042
Aeromonas veronii strain CYJ202 CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTG 1042
Aeromonas culicicola strain_03037TRG CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTG 1042
Aeromonas veronii strain JF46112 CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTG 1042
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 ATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTG 1038
Pseudomonas fluorescens strain KB6 ATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTG 1038
Pseudomonas putida isolate Te1 TCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTG 1038
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 TCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTG 1030
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 TCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTG 1037
* ***** *****

R4_4 GG 1043
Aeromonas sobria strain JY081016-1 GG 1043
Aeromonas sobria strain NQ090701 GG 1044
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 GG 1044
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 GG 1044
Aeromonas veronii strain YA0900911 GG 1044
Aeromonas veronii strain CYJ202 GG 1044
Aeromonas culicicola strain_03037TRG GG 1044
Aeromonas veronii strain JF46112 GG 1044
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 GG 1040
Pseudomonas fluorescens strain KB6 GG 1040
Pseudomonas putida isolate Te1 GG 1040
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 GG 1032
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 GG 1039
**

ภาพที่ ข.1 (ต่อ)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ค.1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณลิตของแบคทีเรีย *Aeromonas sp.* KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

$$H_0 : \mu_{\text{glucose}} = \mu_{\text{fructose}} = \mu_{\text{sucrose}} = \mu_{\text{Na acetate}}$$

H_a : มีแหล่งคาร์บอนอย่างน้อย 1 แหล่ง ที่มีปริมาณลิตแตกต่างกันไป

ตารางที่ ค.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณลิตของแบคทีเรีย *Aeromonas sp.* KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28.601	3	9.534	9.952	0.004
Within Groups	7.663	8	0.958		
Total	36.264	11			

จากตารางที่ ค.1 พบว่าค่า Sig. เท่ากับ 0.004 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ H_0 แสดงว่ามีแหล่งคาร์บอนอย่างน้อย 1 แหล่งที่มีปริมาณลิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ค.2 ผลการทดสอบหลังการวิเคราะห์ (Post hoc analysis) ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT): ชนิดของแหล่งคาร์บอน

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Sucrose	3	8.2481	
Glucose	3		10.4909
Fluctose	3		11.9647
Sodium acetate	3		12.0707
Sig.		1.000	.094

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ค.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณลิวตินของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

$H_0 : \mu_{\text{ammonium sulfate}} = \mu_{\text{urea}} = \mu_{\text{ammonium chloride}}$

H_a : มีแหล่งไนโตรเจนอย่างน้อย 1 แหล่ง ที่มีปริมาณลิวตินแตกต่างกันไป

ตารางที่ ค.3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณลิวตินของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	42.334	2	21.167	18.764	0.003
Within Groups	6.768	6	1.128		
Total	49.102	8			

จากตารางที่ ค.3 พบว่าค่า Sig. เท่ากับ 0.003 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ H_0 สรุปว่าแหล่งไนโตรเจนอย่างน้อย 1 แหล่งที่มีปริมาณลิวตินแตกต่างกันไปอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ค.4 ผลการทดสอบหลังการวิเคราะห์ (Post hoc analysis) ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) : ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

Nitrogen source	N	Subset for alpha =	
		0.05	
		1	2
Ammonium chloride	3	9.8050	
Urea	3	11.4936	
Ammonium sulfate	3		15.0114
Sig.		.099	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ค.3 ผลของความเข้มข้นไนโตรเจนต่อปริมาณลิวติงของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

$$H_0 : \mu_{0.1} = \mu_1 = \mu_2 = \mu_5 = \mu_{10}$$

H_a : มีความเข้มข้นของไนโตรเจนอย่างน้อย 1 ระดับ ที่มีปริมาณลิวติงแตกต่างกันไป

ตารางที่ ค.5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อปริมาณลิวติงของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	149.416	4	37.354	40.382	0.000
Within Groups	9.250	10	0.925		
Total	158.666	14			

จากตารางที่ ค.5 พบว่าค่า Sig. เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ H_0 สรุปว่าความเข้มข้นของไนโตรเจน อย่างน้อย 1 ความเข้มข้นมีปริมาณลิวติงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ค.6 ผลการทดสอบหลังการวิเคราะห์ (Post hoc analysis) ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) : ความเข้มข้นของไนโตรเจน

Nitrogen concentration		Subset for alpha = 0.05			
n (g/L)	N	1	2	3	4
5	3	7.4142			
2	3		10.3681		
10	3		10.7905		
1	3			13.5540	
0.1	3				16.7425
Sig.		1.000	.602	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ค.4 ผลของความเข้มข้นกลูโคสต่อปริมาณลิวตินของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

$$H_0 : \mu_{4.5} = \mu_{9.0} = \mu_{18.0} = \mu_{28} = \mu_{35}$$

H_a : มีความเข้มข้นของกลูโคสอย่างน้อย 1 ระดับ ที่มีปริมาณลิวตินแตกต่างกันไป

ตารางที่ ค.7 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อปริมาณลิวตินของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	108.998	4	27.250	19.142	0.000
Within Groups	14.236	10	1.424		
Total	123.234	14			

จากตารางที่ ค.7 พบว่าค่า Sig. เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ H_0 สรุปว่าความเข้มข้นของกลูโคสอย่างน้อย 1 ค่ามีปริมาณลิวตินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ค.8 ผลการทดสอบหลังการวิเคราะห์ (Post hoc analysis) ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT): ความเข้มข้นของกลูโคส

Glucose concentration (g/L)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4.5	3	10.8154		
35	3	12.4693		
9.0	3		15.0581	
18	3		16.5451	16.5451
28	3			18.2717
Sig.		.120	.158	.107

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

b. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้