การสะสมลิพิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียของอุตสาหกรรมแปรรูปไก่

LIPID ACCUMULATION BY BACTERIA ISOLATED FROM A POULTRY PROCESSING WASTEWATER

นางสาวกฤชภร จุลโพธิ์

นางสาวจินตนา เจียรนันทะ

นางสาวเพ็ญประภา สุขวารี

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

LIPID ACCUMULATION BY BACTERIA ISOLATED FROM A POULTRY PROCESSING WASTEWATER

MISS KITCHAPORN JULLAPO

MISS JINTANA CHEARANANTA

MISS PENPRAPA SUKVAREE

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN ENVIRONMENTAL RESOURCE CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การสะสมลิพิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียของอุตสาหกรรมแปรรูปไก่ Lipid Accumulation by Bacteria Isolated from a Poultry Processing Wastewater		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกฤชภร	จุลโพธิ์	50050418
	นางสาวจินตนา	เจียรนันทะ	50050427
	นางสาวเพ็ญประภา	สุขวารี	50050477
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต		
สาขาวิชา	เคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์		

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน	
ผศ.พิสมัย ชัยรัตน์อุทัย	
ผศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การสะสมลิพิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียของอุตสาหกรรมแปรรูปไก่		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกฤชภร	จุลโพธิ์	50050418
	นางสาวจินตนา	เจียรนันทะ	50050427
	นางสาวเพ็ญประภา	สุขวารี	50050477
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต		
สาขาวิชา	เคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม		
ปีการศึกษา	2553		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์		

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมลิพิดในแบคทีเรียแกรมลบ *Aeromonas sobria* ที่คัดแยกได้จากบ่อผึ่งของระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปไก่และผลิตภัณฑ์เนื้อไก่สำเร็จรูปแห่งหนึ่ง ปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ช่วงเวลาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ชนิดของแหล่งไนโตรเจนและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียครบตามสภาวะและเวลาที่กำหนด จะทำการวัดปริมาณชีวมวลของแบคทีเรียด้วยเทคนิคการชั่งน้ำหนักและวัดปริมาณลิพิดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายและชั่งน้ำหนัก

จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ในช่วงระยะเวลาพักตัวสามารถสะสมไขมันได้ดีที่สุด โดยแบคทีเรียในช่วงเวลาการเติบโตดังกล่าวสามารถสะสมลิพิดไว้ได้ในปริมาณสูงสุดคือร้อยละ 31.81 โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งของคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ การสะสมลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ในช่วงระยะเวลาพักตัวมีค่าไม่แตกต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตหรือโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปริมาณลิพิดที่สกัดได้มีค่าใกล้เคียงกันคือ ประมาณร้อยละ 31-32 โดยน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตและสะสมลิพิดได้สูงสุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 150:1 ที่สภาวะดังกล่าวแบคทีเรียมีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.356 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณลิพิดเท่ากับร้อยละ 47.79 โดยน้ำหนักแห้ง

คำสำคัญ : เชื้อเพลิงชีวภาพ, ไบโอดีเซล, น้ำเสียสังเคราะห์, แบคทีเรียไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Lipid Accumulation by Bacteria Isolate from a Poultry Processing Wastewater		
Students	Kitchaporn	Jullapo	50050418
	Jintana	Chearananta	50050427
	Penprapa	Sukvaree	50050477
Degree	Bachelor of Science		
Major Program	Environmental Resource Chemistry		
Academic Year	2010		
Advisor	Asst.Prof. Dr Usarat Thawornchaisit		

ABSTRACT

This special project studied factors affecting lipid accumulation of *Aeromonas sobria*, a gram-negative bacteria being isolated from a polishing pond which is a part of wastewater treatment plant of a poultry processing facility. Factors being investigated are bacterial growth period, type of nitrogen source and carbon to nitrogen ratio in synthetic wastewater. After growing bacteria in certain condition for specific time, bacterial biomass was then measured using gravimetric technique. Crude lipids were measured using partition and gravimetric analysis.

Results showed that *Aeromonas sobria* in the stationary phase was able to accumulate highest lipid contents. The maximal lipid contents of 31.8 %by weight were obtained when growing the stationary phase of bacteria for 36 hours in synthetic wastewater using glucose and ammnonium sulfate as carbon and nitrogen source, respectively. Lipid accumulation of *Aeromonas sobria* was insignificant when growing the bacteria in synthetic wastewater using either ammonium sulfate or sodium nitrate as nitrogen source. The bacterial lipid content was approximately 31-32 percent of dry weight. In addition, highest biomass and lipid contents were observed by culturing *Aeromonas sobria* in synthetic medium with carbon to nitrogen ratio of 150:1. Cell dry weight of 0.356 grams per liter and lipid content of 47.79 % were obtained.

Keywords : biofuels, biodiesel, synthetic wastewater, bacterial isolates

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สำเร็จลุล่วงได้ ทางคณะผู้จัดทำต้องขอขอบพระคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องและให้ความอนุเคราะห์กับโครงงานพิเศษ ดังนี้ ผศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งกรุณาสละเวลาให้ความรู้และคำแนะนำตลอดการทำโครงงานพิเศษ รศ.ดร.มาลินี ชัยศุภกิจสินธ์ อาจารย์ประจำสาขาวิชาพอลิเมอร์ซึ่งให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง(Freeze Dryer) นางสาวรัตติยา อ่องมะลิ นักศึกษาปริญญาโท สาขาเคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม ที่ได้ให้การอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย R4.4 และคำปรึกษาในทุกๆเรื่อง พี่นักวิทยาศาสตร์ประจำสาขาวิชาเคมีและสาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ช่วยจัดหาและสอนการใช้อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ

ขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับทำโครงงานพิเศษ ขอขอบคุณ เพื่อนๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงาน

ท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ ผู้เป็นที่รัก ผู้ให้กำลังใจและให้โอกาสการศึกษาจนโครงงานพิเศษนี้สำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงงานพิเศษนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่มีความสนใจได้บ้างตามสมควร หากมีข้อเสนอแนะประการใดเพื่อปรับปรุงผลงานให้ดีขึ้น ทางคณะผู้จัดทำขอน้อมรับคำเสนอแนะ ด้วยความขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

คณะผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับลิพิด	4
2.1.1 ประเภทของลิพิด	4
2.1.2 ไตรเอซิลกลีเซอรอล	6
2.1.3 กรดไขมัน	6
2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย	7
2.2.1 ประเภทของแบคทีเรีย	8
2.2.2 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย	9
2.3 จุลินทรีย์ที่สะสมน้ำมัน	10
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมน้ำมันของจุลินทรีย์	11
2.5 การใช้ประโยชน์ของน้ำมันที่สะสมในเซลล์จุลินทรีย์	14
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	20
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	20
3.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา	21
3.3 การเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรีย (Stock culture)	21
3.4 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น (Seed culture)	22
3.5 การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์	23
3.6 ผลของช่วงเวลาการเจริญเติบโตของเซลล์ต่อการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย	23
3.7 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย	23
3.8 ผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจต่อการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย	24
3.9 การสกัดลิพิดด้วยวิธีของ Bligh และ Dyer	24
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	26
4.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา	26
4.2 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์	27
4.3 ผลของช่วงเวลาการเจริญเติบโตต่อการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย	28
4.4 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต และการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย	30
4.5 ผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต และการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย	32
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	34
5.1 สรุปผลวิจัย	34
5.2 ข้อเสนอแนะ	34
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปริมาณน้ำมันที่สะสมในจุลินทรีย์ประเภทต่าง ๆ	10
2.2 ตัวอย่าง Generation time ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ	13
3.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)	22
3.2 น้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษา	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์	4
2.2 สูตรโครงสร้างของฟอสโฟลิพิด	5
2.3 โครงสร้างของไกลโคลิพิดชนิดต่างๆ	5
2.4 โครงสร้างของเซลล์แบคทีเรีย	8
2.5 รูปร่างต่างๆ ของแบคทีเรีย	9
2.6 Standard growth curve of bacteria	9
2.7 Generation time of bacteria	13
4.1 แบคทีเรีย *Aeromonas sobria*	26
4.2 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์	27
4.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง (■) และค่า OD_{600} (■)ของของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ภายหลังการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 18, 36 และ 72 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์	28
4.4 ปริมาณลิพิดอย่างหยาบ (crude lipids) ของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18, 36 และ 72 ชั่วโมง	29
4.5 น้ำหนักเซลล์แห้ง (■) และค่า OD_{600} (■)ของของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ภายหลังการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	30
4.6 ปริมาณลิพิดอย่างหยาบ (crude lipids) ของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ภายหลังการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนต่างๆ	31
4.7 น้ำหนักเซลล์แห้ง (■) และค่า OD_{600} (■)ของของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ภายหลังการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีอัตราส่วน C:N แตกต่างกัน	32
4.8 ปริมาณลิพิดอย่างหยาบ (crude lipids) ของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ภายหลังการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีอัตราส่วน C:N แตกต่างกัน	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

สถานการณ์ความต้องการใช้พลังงานมีแนวโน้มสูงขึ้นตามจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น โดยพลังงานเชื้อเพลิงที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมากกว่าร้อยละ 80 เป็นเชื้อเพลิงจำพวกฟอสซิลซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่ใช้แล้วหมดไป และในปัจจุบันมีแนวโน้มลดลง อีกทั้งราคาของเชื้อเพลิงจำพวกฟอสซิลยกตัวอย่างเช่น น้ำมันดิบ ถ่านหิน หรือแก๊สธรรมชาติก็ยังมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (คณะผู้แทนไทยประจำประชาคมยุโรป. 2549) นอกจากนี้การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงจำพวกฟอสซิลเหล่านี้ยังก่อให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งถือเป็นก๊าซเรือนกระจกที่มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลก ด้วยข้อจำกัดที่กล่าวมาข้างต้นจึงทำให้การค้นคว้าวิจัยหาแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงทดแทนเป็นหัวข้อวิจัยที่ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย หนึ่งในนั้นก็คือพลังงานชีวภาพหรือเชื้อเพลิงชีวภาพ(biofuels) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อเพลิงเหลวไบโอดีเซลที่ผลิตจากกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของสารตั้งต้น 2 ชนิดคือ แอลกอฮอล์และลิพิดจำพวกไตรเอซิลกลีเซอรอล วัตถุดิบที่มีศักยภาพในการนำมาผลิตไบโอดีเซล ได้แก่ พืชน้ำมัน และน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว (วิกิพีเดีย, 2553) เนื่องจากวัตถุดิบเหล่านี้มีลิพิดจำพวกไตรเอซิลกลีเซอรอลที่เป็นสารตั้งต้นสำคัญสำหรับการผลิตไบโอดีเซลด้วยกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชันในปริมาณสูงถึงร้อยละ 90 จากการที่หลายประเทศทั่วโลกตื่นตัวเรื่องการใช้เชื้อเพลิงชีวภาพโดยเฉพาะไบโอดีเซล ซึ่งต้องใช้พืชน้ำมันในปริมาณสูงนั้น ปัญหาที่ตามมาก็คือการแย่งชิงพื้นที่เพาะปลูกระหว่างพืชน้ำมันกับพืชอาหาร รวมไปถึงการแย่งชิงวัตถุดิบอย่างเช่นน้ำมันปาล์มระหว่างอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมพลังงานทดแทน (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศ, 2551) จากปัญหาดังกล่าวข้างต้นส่งผลให้การค้นหาวัตถุดิบอื่นๆที่มีศักยภาพในการนำมาผลิตไบโอดีเซลจึงเป็นหัวข้อวิจัยที่หลายฝ่ายให้ความสนใจ

ลิพิดจากจุลินทรีย์ไขมันสูง (oleaginous microorganism) เช่น สาหร่ายขนาดเล็ก ยีสต์ รา และแบคทีเรีย เป็นวัตถุดิบทางเลือกอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในขณะนี้ เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผลิตและสะสมลิพิดไว้ภายในเซลล์ได้สูงเกินกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และในบางสายพันธุ์สามารถสะสมได้สูงถึงร้อยละ 90 โดยน้ำหนักเซลล์แห้งภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตที่เหมาะสม (Chisti, 2007; Meng et al., 2009; Gouda et al., 2008) นอกจากนี้จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผลิตและสะสมลิพิดจำพวกไตรเอซิลกลีเซอรอลได้เช่นเดียวกับน้ำมันภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบกับงานวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับสาหร่ายขนาดเล็ก ยีสต์และราที่สะสมน้ำมันได้มีอยู่เป็นจำนวนมาก ในขณะที่ความรู้เกี่ยวกับแบคทีเรียไขมันสูงยังมีอยู่อย่างจำกัด ด้วยเหตุนี้การคัดแยกแบคทีเรียไขมันสูงจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปไก่และผลิตภัณฑ์เนื้อไก่สำเร็จรูปจึงเป็นหัวข้อวิจัยที่ทางสาขาวิชาเคมีได้ร่วมดำเนินการกับสาขาชีววิทยา จากผลการศึกษาเบื้องต้นในเรื่องการคัดแยกแบคทีเรียไขมันสูงจากน้ำทิ้งที่ได้จากบ่อผึ่งของ Ongmali, Thawornchaisit and Punphruch (2010) พบว่าได้ไอโซเลทของแบคทีเรียที่สะสมลิพิดไว้ภายในเซลล์รวมทั้งสิ้น 12 สายพันธุ์ และแบคทีเรีย R 4.4 เป็นไอโซเลทที่สามารถสะสมลิพิดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวแบบ LB Broth ได้ในปริมาณสูงสุด (ร้อยละ 27 น้ำหนักแห้ง) และเนื่องจากการศึกษาการสะสมลิพิดของไอโซเลท R 4.4 เป็นการศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนอย่างสมบูรณ์ อีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงในเรื่องอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเหตุนี้โครงงานพิเศษนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาถึงความเป็นไปได้ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวในน้ำเสียสังเคราะห์ โครงงานพิเศษนี้จึงได้ถูกจัดทำขึ้นเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียไอโซเลท R 4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อน้ำเสียมีชนิดของแหล่งคาร์บอน และชนิดของแหล่งไนโตนเจน รวมทั้งอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของแบคทีเรียไอโซเลท R 4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสในปริมาณสูง

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของช่วงเวลาการเจริญเติบโตของเซลล์ต่อการสะสมลิพิดของแบคทีเรียไอโซเลท R 4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสในปริมาณสูง

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อของแบคทีเรียไอโซเลท R 4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นแบคทีเรีย R 4.4 ที่คัดแยกได้จากบ่อผึ่งของระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปไก่และผลิตภัณฑ์เนื้อไก่สำเร็จรูปแห่งหนึ่งในจังหวัดลพบุรี โดยได้รับการอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียจากนางสาวรัตติยา อ่องมะลิ นักศึกษาปริญญาโท สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม โดยจะทำการเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรีย (Stock culture) เพื่อทำการเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น (Seed culture)

2. การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสในปริมาณสูง และติดตามการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรที่ระยะเวลาต่างๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ศึกษาผลของระยะเวลาการเจริญเติบโตของเซลล์ต่อการสะสมลิพิด โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสในปริมาณสูงด้วยเวลาแตกต่างกัน จากนั้นวัดปริมาณชีวมวลและลิพิดที่สะสมในเซลล์

4. ศึกษาผลของชนิดของไนโตรเจนต่อการสะสมลิพิด ด้วยการแปรค่าชนิดของไนโตรเจนที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็น 3 ชนิดได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท และยูเรีย

5. ศึกษาผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ด้วยการแปรค่าอัตราส่วน C:N ในน้ำเสียสังเคราะห์จาก 40:1 เป็น 60:1, 100:1 และ 150:1

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิต total lipid และสามารถนำสารที่ได้จากกระบวนการผลิตไปประยุกต์ใช้เป็นพลังงานทางเลือกหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

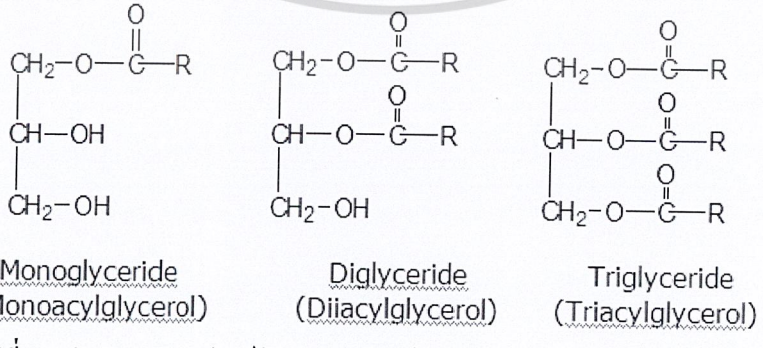
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับลิพิด

ลิพิด (lipid) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นแหล่งพลังงานสำรองของร่างกายรองจากคาร์โบไฮเดรต และพบเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ลิพิดประกอบด้วยธาตุหลักคือ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ลิพิดบางชนิดอาจมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสประกอบด้วย สารชีวโมเลกุลประเภทนี้มีคุณสมบัติที่สำคัญต่างจากคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนคือ ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble) แต่จะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เช่น อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เบนซิน อะซิโตน เอธานอล และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ เป็นต้น ดังนั้นในการสกัดแยกลิพิดออกจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตสามารถทำได้โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้

2.1.1 ประเภทของลิพิด

ลิพิดสามารถแบ่งตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีออกได้เป็น 4 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1. ลิพิดอย่างง่าย (Simple lipid) ได้แก่ เอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ ถ้าแอลกอฮอล์นั้นเป็นกลีเซอรอล เรียกลิพิดจำพวกเอสเตอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอลนี้ว่า เอซิลกลีเซอรอล (acylglycerol) หรือกลีเซอไรด์ (glyceride) ลิพิดชนิดนี้พบได้ทั้งเนื้อเยื่อของเซลล์พืชและสัตว์ รวมทั้งจุลินทรีย์ โดยกลีเซอรอลหนึ่งโมเลกุลอาจสร้างพันธะเอสเทอร์กับกรดไขมันได้หนึ่ง สอง หรือสามโมเลกุล เกิดเป็นโมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ดังรูปที่ 2.1 ซึ่งกลีเซอไรด์อย่างหลังนี้ถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นที่สำคัญในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ จำพวกไบโอดีเซล ซึ่งจะกล่าวถึงในหัวข้อการใช้ประโยชน์ของลิพิดจากจุลินทรีย์



รูปที่ 2.1 โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ ตามลำดับ
(ภัทรและคณะ, 2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลีเซอไรด์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันและแอลกอฮอล์นี้พบใน 2 สถานะ คือ ถ้าอยู่ในสภาพของแข็ง เรียกว่า ไขมัน (fat) ถ้าอยู่ในสภาพของเหลว เรียกว่า น้ำมัน (oil) ในกรณีที่แอลกอฮอล์ที่ทำปฏิกิริยากับกลีเซอรอลนั้นมีมวลโมเลกุลมากกว่ากลีเซอรอล ลิพิดที่ได้จากการทำปฏิกิริยาก็จะมีสถานะเป็นของแข็งและเรียกว่า ไข (wax) เช่น ขี้ผึ้ง

2. ลิพิดประกอบ (Compound lipid) ได้แก่ ลิพิดอย่างง่ายหรือเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ที่มีหมู่สารประกอบอื่นๆ เพิ่มขึ้น มีอยู่สี่ชนิดด้วยกันตามหมวดหมู่ฟังก์ชันหรือสารอื่นๆ ที่เพิ่มขึ้นมา ได้แก่

2.1 ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) หรือ ฟอสโฟกลีเซอไรด์ (phosphoglyceride) เป็นลิพิดที่พบในธรรมชาติมากเป็นอันดับสอง รองจากน้ำมันและไขมัน มีส่วนที่เพิ่มขึ้นเป็นหลัก คือ หมู่ฟอสเฟต และอาจมีสารอื่น(x) ที่มีขนาดเล็กและมักมีขั้วหรือมีประจุนั้นมาสร้างพันธะกับหมู่ฟอสเฟต สูตรทั่วไปแสดงดังรูป 2.2

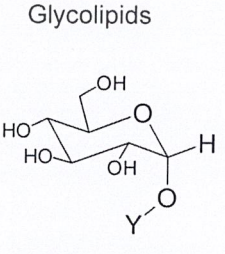
สูตรทั่วไปของฟอสโฟลิพิด

X คือ หมู่ฟังก์ชันอื่นที่สร้างพันธะกับฟอสเฟต

R_1, R_2 คือ ส่วนที่เป็นไฮโดรคาร์บอน

รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของฟอสโฟลิพิด (ภัทรและคณะ, 2551)

2.2 ไกลโคลิพิด (glycolipid) มีหมู่ฟังก์ชันที่เพิ่มขึ้นเป็นสารชีวโมเลกุลจำพวกคาร์โบไฮเดรต ดังรูปที่ 2.3



Y = Lipid

รูปที่ 2.3 สูตรทั่วไปของไกลโคลิพิด (wapedia, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ไลโปโปรตีน (lipoprotien) เป็นลิพิดที่จับกับโปรตีนด้วยพันธะโคเวเลนต์ ทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งลิพิดในโลหิตและเป็นส่วนประกอบของเยื่อเซลล์ แบ่งตามความหนาแน่นออกได้เป็น 4 ชนิด (http://en.wikipedia.org/wiki/Lipoprotein) ได้แก่ ไคโลไมครอน(chylomicron), ไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำมาก(very low density lipoprotine , VLDL), ไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotine , LDL) และไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง (high density lipoprotine , HDL)

2.4 สฟิงโกลิพิด (sphingolipid) มีหมู่ฟังก์ชันสฟิงโกซีน (sphingosine) ซึ่งเป็นสารจำพวกอะมิโนแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอนอยู่ 18 อะตอม เป็นส่วนประกอบเพิ่มเติม

3. อนุพันธ์ของลิพิด (derived lipid) ได้แก่ อนุพันธ์ต่าง ๆ ที่เกิดจากการสลายตัวของลิพิดธรรมดา และลิพิดประกอบ ซึ่งยังคงคุณสมบัติความเป็นลิพิดอยู่ ได้แก่ กรดไขมัน กลีเซอรอล มอโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ รวมทั้งแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ

4. ลิพิดเบ็ดเตล็ด (miscellaneous lipid) ได้แก่ สารอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติคล้ายลิพิด (ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ใช้สกัดไขมัน) สารเหล่านี้ได้แก่ สเตอรอยด์ เทอร์พีน และวิตามินที่ละลายได้ในไขมัน

2.1.2 ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol)

ไตรเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรกลีเซอรอลจัดเป็นวัตถุดิบสำคัญในอุตสาหกรรมพลังงานทดแทน เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันและกลีเซอรอล ซึ่งถูกเก็บสะสมไว้เป็นแหล่งพลังงานให้กับสิ่งมีชีวิต เนื่องจากถูกออกซิไดซ์ง่ายและให้พลังงานสูงเมื่อเทียบกับคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน (Alvarez and Steiubüchel, 2002) พบเป็นองค์ประกอบสำคัญของลิพิดในสิ่งมีชีวิตทุกประเภท ทั้งพวกยูคาริโอต (eukaryotic organism) และโปรคาริโอต (prokaryotic organism) เก็บสะสมไว้ในเมล็ดพืชในรูปของน้ำมัน (Murphy, 1993 อ้างถึงใน Alvarez and Steiubüchel, 2002) ในสัตว์จะเก็บไว้ในเนื้อเยื่อจำพวกเซลล์สะสมไขมัน(apidose) (Voet and Voet, 1990) สำหรับจุลินทรีย์อย่างเช่นราหรือยีสต์ สามารถสะสมลิพิดจำพวก TAG ในช่วงที่มีภาวะกดดันต้องการเจริญเติบโต ไตรเอซิลกลีเซอรอลมีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่แตกต่างกันขึ้นกับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งส่งผลต่อสถานะของไตรเอซิลกลีเซอรอลที่พบที่อุณหภูมิห้อง ลิพิดที่พบในพืชส่วนใหญ่มีกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบหลัก

2.1.3 กรดไขมัน

กรดไขมันแบ่งได้ 2 ชนิดตามโครงสร้างทางชีวเคมี คือ

1. กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่เกิดพันธะระหว่างอะตอคาร์บอนกับคาร์บอนยึดเหนี่ยวด้วยพันธะเดี่ยว (single bond) ทั้งหมด พบทั้งในพืชและสัตว์กรดไขมันชนิดนี้จะมีสถานะเฉื่อยต่อกระบวนการเคมีของร่างกาย ถ้าไม่ถูกย่อยไปใช้เป็นพลังงานก็มีแนวโน้มที่จะ

เอกสารนี้ถูกจัดทำขึ้นเพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตกตะกอนในหลอดเลือด กรดไขมันอิ่มตัวที่พบมากที่สุด ได้แก่ กรดปาล์มิติก (palmitic acid) และกรดสเตียริก(stearic acid)

2. กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) มีอะตอมของคาร์บอนที่ต่อกันด้วยพันธะคู่หรือพันธะสาม ทำให้มีความว่องไวในปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid, MUFA) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid, PUFA) (แพทย์หญิงสายพิณ โชติวิเชียร, 2553)

สมบัติทางกายภาพของกรดไขมัน (พจน์และคณะ, 2543)

1. โครงสร้างของกรดไขมันประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วคือหมู่คาร์บอกซิล และส่วนที่ไม่มีขั้วคือสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนที่ต่อกับหมู่คาร์บอกซิล ดังนั้นยิ่งสายโซ่ยาวยิ่งขึ้น ยิ่งทำให้กรดไขมันมีขั้วน้อยลง

2. จุดเดือดและจุดหลอมเหลวของกรดไขมันชนิดอิ่มตัวจะเพิ่มขึ้นตามความยาวของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนหรือเพิ่มขึ้นตามจำนวนอะตอมคาร์บอน ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะมีจุดเดือดและจุดหลอมเหลวต่ำกว่าของกรดไขมันอิ่มตัวที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอนเท่ากัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากันแต่มีพันธะคู่ต่างกัน จะพบว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่าจะมีจุดเดือดและจุดหลอมเหลวต่ำกว่า

3. กรดไขมันที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอนเท่ากัน แต่มีจำนวนพันธะคู่ต่างกัน จำนวนพันธะคู่ที่เพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้จุดหลอมเหลวลดลง

สมบัติทางเคมีของกรดไขมัน(พจน์และคณะ, 2543)

1. ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส เป็นปฏิกิริยาที่เกิดได้ทั้งในสภาวะกรดและเบส เมื่อทำการไฮโดรลิซิสไขมันหรือน้ำมันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้กลีเซอรอลและกรดไขมัน 3 โมเลกุล ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของกรดไขมัน (deterioratine)

2. ปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชั่นเป็นปฏิกิริยาการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างแอลกอฮอล์กับกรดไขมันตรงตำแหน่งหมู่คาร์บอกซิล

3. ปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (hydrogination) ลงในพันธะคู่ของกรดไขมันหรือเอสเทอร์ของกรดไขมัน โดยมีโลหะ เช่น Pt, Pd, Ni หรือ Cu เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

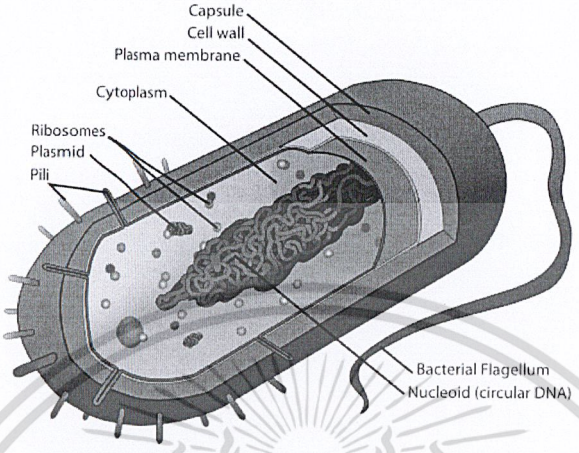
4. ปฏิกิริยาการเติมฮาโลเจน พันธะคู่ที่อยู่ในไขมันหรือน้ำมันชนิดไม่อิ่มตัวเกิดปฏิกิริยากับเติมฮาโลเจน เช่น คลอรีน ไอโอดีน และโบรมีนเติมตรงตำแหน่งของพันธะคู่ของกรดไขมัน

2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว (unicellular) ประเภทโปรคาริโอต (prokaryote) ประกอบด้วยออร์แกแนลที่ไม่มีเยื่อหุ้ม ไม่มีนิวเคลียสประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ และไซโทพลาสซึม โดยในไซโทพลาสซึมจะมีไรโบโซม (ribosome) ไม่มีนิวเคลียส ส่วน DNA จะเป็นรูปวงแหวนพัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อยู่กับโปรตีน อยู่ในไซโทพลาสซึมเรียกว่านิวคลีออยด์ (neucleoid) ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ จะมีผนังเซลล์ประกอบด้วยเปบทิโดไกลแคน (วิกิพีเดีย, 2553) แบคทีเรีย แกรมลบจะมีเยื่อหุ้มด้านนอกผนังเซลล์ (outer membrane) อีกชั้น แต่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มี ทำให้ย้อมติดสีแกรมต่างกัน



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของเซลล์แบคทีเรีย (วิกิพีเดีย, 2553)

2.2.1 ประเภทของแบคทีเรีย

แบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ตามการติดสีย้อมแกรม

1. แกรมบวก (Gram Positive) แบคทีเรียที่ย้อมติดสีน้ำเงินม่วง

2. แกรมลบ (Gram Negative) แบคทีเรียที่ย้อมติดสีแดง

การย้อมสีแกรม(Gram Staining technique) เป็นการทำให้เซลล์ติดแน่นกับแผ่นสไลด์ด้วยความร้อนหรือสารเคมีแล้วจึงย้อมสี ซึ่งอาจจะเป็นสีเบสิก(Basic dyes) สีอะซิดิก(acidic dyes) สีที่เป็นกลาง(neutral dyes) การย้อมสีแบคทีเรียทำได้หลายวิธีเช่น การย้อมสีเดียว(Simple stain) การย้อมสีทนกรด(AFB stain) การย้อมให้ได้สีแตกต่างกัน(Differential stain) การย้อมสีพิเศษ (Special stain) (จรัญ, 2553)

หลักการของการย้อมสีเซลล์แบคทีเรียคือ กรดนิวคลีอิกและโปรตีนเป็นตัวสำคัญในการดูดซึมสีเข้าไปในเซลล์ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีความเป็นกรดเนื่องจากมีโปรตีนและกรดอะมิโนสายสั้นๆส่วนในไซโตรพลาสซึมมี ribonucleic acid และ deoxyribonucleic acid แบคทีเรียจึงติดสี basic ได้ดีกว่าสี acidic (จรัญ, 2553)

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งแบคทีเรียได้ตามรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ ดังนี้

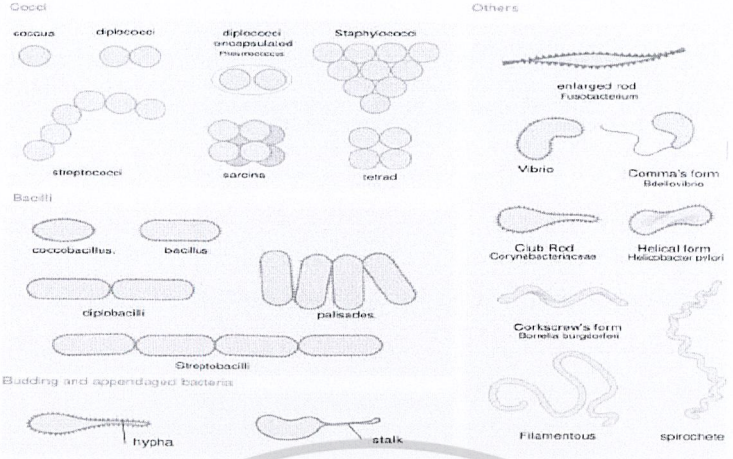
1. รูปร่างของแบคทีเรีย โดยทั่วไปมี 3 แบบ

1.1 แบบทรงกลม(sphere) เรียกว่า coccus, cooci

1.2 แบบทรงกระบอก(rod) เรียกว่า bacillus, bacilli, palisade

1.3 แบบอื่นๆ(other) ได้แก่ spirillum, spirilli, vibrio, spriochete, filamentous,. etc

เอกสารนี้เป็นเอกสาร[illegible] ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 รูปร่างต่างๆ ของแบคทีเรีย (ตรี, 2553)

2. การเรียงตัวของเซลล์ มีดังนี้

2.1 เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ โดยที่แต่ละเซลล์จะอยู่เป็นอิสระต่อกัน เช่น *Micrococcus* spp., *E. coli* เป็นต้น

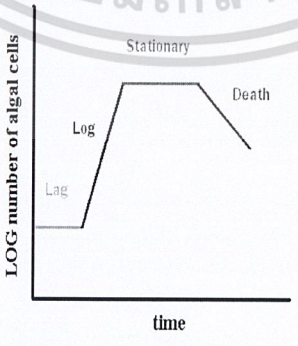
2.2 เป็นคู่ ได้แก่ *Diplococcus*

2.3 เป็นสาย ได้แก่ *Streptococcus* ส่วนในแบคทีเรียรูปท่อนนั้น พวกที่เซลล์มาเรียงเป็นสาย เช่น *Hyphomicrobium, Rhodomicrobium* ฯลฯ และบางชนิดอาจมี sheath หุ้มสายอีกด้วย เช่น *Crenothrix, Leptothrix* ฯลฯ

2.4 เป็นกลุ่มพวกที่เป็นกลุ่มมีจำนวน 8 เซลล์ ได้แก่ Sarcina ส่วนพวกที่เป็นกลุ่มมีจำนวนมากมาย ได้แก่ *Straphylococcus*

2.2.2 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ถึงแม้แบคทีเรียจะมีรูปร่างแตกต่างกันมากมาย แต่มีรูปแบบการเจริญเติบโตที่คล้ายคลึงกัน โดยการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ดังรูป



รูปที่ 2.6 Standard growth curve of bacteria

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปการเจริญเติบโตของแบคทีเรียยังแบ่งเป็น 4 ระยะ คือ

1. ระยะเตรียมการ(Lag phase) เป็นช่วงที่แบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อเตรียมความพร้อมสำหรับการแบ่งเซลล์

2. ระยะเพิ่มจำนวน(Log phase) ในระยะนี้แบคทีเรียจะแบ่งเซลล์จาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์ จาก 2 เซลล์เป็น 4 เซลล์ และทวีคูณไปเรื่อย ๆ ทำให้อัตราการเพิ่มจำนวนคงที่

3. ระยะคงที่(Stationary phase) อัตราการเพิ่มจำนวนกับอัตราการตาย เนื่องมาจากความหนาแน่นของเซลล์และของเสียที่เซลล์ปล่อยออกมา

4. ระยะตาย(Death phase) อัตราการตายสูงกว่าอัตราการเพิ่มจำนวน

2.3 จุลินทรีย์ที่สะสมน้ำมัน (Oleaginous microorganisms)

จุลินทรีย์สามารถเพิ่มชีวมวลด้วยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในสิ่งแวดล้อมและใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงาน จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสะสมน้ำมันไว้ภายในเซลล์ได้มากขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจนและมีแหล่งของคาร์บอนในปริมาณที่มากเกินพอ(Fu *et al.*, 2004; Miao and Wu, 2006) โดยทั่วไปปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์มีค่าระหว่าง 20-50% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Miao and Wu, 2006; Chisti, 2007) แต่ในจุลินทรีย์บางชนิดอาจมีปริมาณน้ำมันสูงถึง 80% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (Mata *et al.*, 2009) ดังตารางที่ 3.1 นอกจากนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจนและมีแหล่งของคาร์บอนในปริมาณที่มากเกินพอไม่เพียงแต่ทำให้เกิดการสะสมลิพิดไว้ภายในเซลล์ แต่พบว่ากรดไขมันอิสระที่พบในเซลล์นั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอลซึ่งเป็นวัตถุดิบตั้งต้นที่สำคัญในการผลิตไบโอดีเซล (Tsukahara and Sawayama, 2005; Meng et al., 2009; Widjaja, Chien and Ju, 2009)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณน้ำมันที่สะสมในจุลินทรีย์ประเภทต่าง ๆ (Meng et al., 2009)

ชนิดของจุลินทรีย์	ปริมาณน้ำมัน (% น้ำหนักเซลล์แห้ง)
Microalgae	
Botryococcus braunii	25-27
Cylindrotheca sp.	16-37
Nitzschia sp.	45-47
Schizochytrium sp.	50-77
Bacterium	
Arthrobacter sp.	>40
Acinetobacter calcoaceticus	27-38
Rhodococcus opacus	24-25
Bacillus alcalophilus	18-24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของจุลินทรีย์	ปริมาณน้ำมัน (% น้ำหนักเซลล์แห้ง)
Yeast	
Candida curvata	58
Cryptococcus albidus	65
Lipomyces starkeyi	64
Rhodotorula glutinis	72
Fungi	
Aspergillus oryzae	57
Mortierella isabellina	86
Humicola lanuginose	75
Mortierella vinacea	66

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมน้ำมันในจุลินทรีย์

1. ชนิดของสารอาหาร

1.1 แหล่งคาร์บอน คาร์บอนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญเติบโตแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ 1)ใช้อนินทรีย์คาร์บอนในรูปแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ตรึงได้จากอากาศ หรือในรูปของเกลือคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนตที่ละลายน้ำเป็นแหล่งพลังงานหรือที่เรียกว่าแบบออโตโทรปิค(autotrophic) โดยจุลินทรีย์สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้จากอากาศได้ในปริมาณสูงมาก 150,000 ppmV (Brown, 1996) และ 2) ใช้คาร์บอนในรูปของสารประกอบอินทรีย์อย่างเช่นน้ำตาลชนิดต่างๆ (ลัดดา, 2540) เป็นแหล่งพลังงานหรือที่เรียกว่าแบบเฮทเทอร์โรโทรปิค(heterotrophic) สำหรับแบคทีเรีย พบว่าเมื่อใช้กลูโคสในปริมาณสูงเป็นแหล่งอินทรีย์คาร์บอนและลดปริมาณไนโตรเจนลงทำให้ภายในเซลล์มีปริมาณไขมันเพิ่มขึ้น เมื่อเติมกลูโคสจะทำให้เปอร์เซ็นต์ไขมันในเซลล์สาหร่ายเพิ่มขึ้น (Gouda, Omar and Aouad, 2008)

1.2 แหล่งไนโตรเจน ไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึมภายใน ในจุลินทรีย์ที่ขาดไนโตรเจนจะมีการสร้างสารประเภทคาร์บอน เช่น น้ำมันหรือแป้งมาแทน (ลัดดา , 2540)

จุลินทรีย์สามารถใช้ไนโตรเจนได้ทั้งรูปของอินทรีย์สารและอนินทรีย์สาร เมื่อเปรียบเทียบชนิดของไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรท พบว่า แอมโมเนียมคลอไรด์นั้นเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการสะสมลิพิดของจุลินทรีย์ อีกทั้งยังพบว่าเมื่อทำการลดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนลง จะทำให้ประสิทธิภาพในการสะสมลิพิดของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น (Gouda, Omar and Aouad, 2008) ส่วนไนโตรเจนในรูปอินทรีย์สารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ได้แก่ เอไมด์ เอมีน ยูเรีย และแอสพารา

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

จีน เป็นต้น ทั้งนี้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยไนโตรเจนจะทำให้ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์เพิ่มขึ้น แต่ในจุลินทรีย์ที่มีปริมาณเซลล์มากจะมีการผลิตและสะสมลิปิดต่ำ จึงจำกัดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีการผลิตและสะสมลิพิดสูงขึ้น

1.3 แหล่งเกลือแร่ จุลินทรีย์ต้องการเกลือแร่บางชนิดในปริมาณเล็กน้อย แต่ถ้าไม่มีจะเป็นผลเสียต่อเซลล์จุลินทรีย์มาก เพราะเกลือแร่บางชนิดเป็นตัวเร่งในการเกิดปฏิกิริยาชีวเคมีหลายอย่าง และเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์และองค์ประกอบบางอย่างของเซลล์ แบ่งเกลือแร่ออกเป็น 1) major elements ได้แก่เกลือแร่ที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณพอสมควร ได้แก่ P, Mg, Ca, K, S และ Na 2) minor หรือ trace elements เป็นเกลือแร่ที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งมักไม่จำเป็นต้องเติมลงไปในสารอาหาร เนื่องจากมีปะปนมากับวัตถุดิบหลายชนิดที่นำมาใช้อยู่แล้ว ได้แก่ Fe, Co, Cu, Mn, Zn, Mo และ B เกลือแร่ที่จำเป็นมากที่จะต้องมีอยู่ในสารอาหาร ได้แก่ P และ Mg เพราะเป็นตัวเร่งในการเกิดปฏิกิริยาการสร้างและถ่ายพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ (วราวุฒิ, 2529)

2. อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีผลต่อการสะสมไขมันของจุลินทรีย์ต่าง ๆ โดยชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยไนโตรเจนจะทำให้ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์เพิ่มขึ้น แต่ในจุลินทรีย์ที่มีปริมาณเซลล์มากจะมีการผลิตและสะสมลิปิดต่ำ จึงจำกัดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีการผลิตและสะสมลิพิดสูงขึ้น ส่วนแหล่งคาร์บอนที่ใช้ จากการศึกษาพบว่าการสะสมลิพิดของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ได้รับอิทธิพลจากแหล่งคาร์บอน โดยการเพิ่มประสิทธิภาพของการสะสมลิพิดของจุลินทรีย์สามารถทำได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและลดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนลง (Gouda, Omar and Aouad, 2008)

3. อุณหภูมิ (Temperature) แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25 - 40 °C แต่มีบางกลุ่มสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงและมีบางกลุ่มเจริญได้ดี(ถึงแม้จะช้า) ที่อุณหภูมิ 0 -15 °C ดังนั้นโดยทั่วไปเราแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 3 กลุ่ม ตามอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ ดังนี้

3.1 Mesophilic bacteria หรือ mesophiles เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง 20 - 50 °C

3.2 Thermophilic bacteria หรือ thermophiles เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง 45 - 80 °C

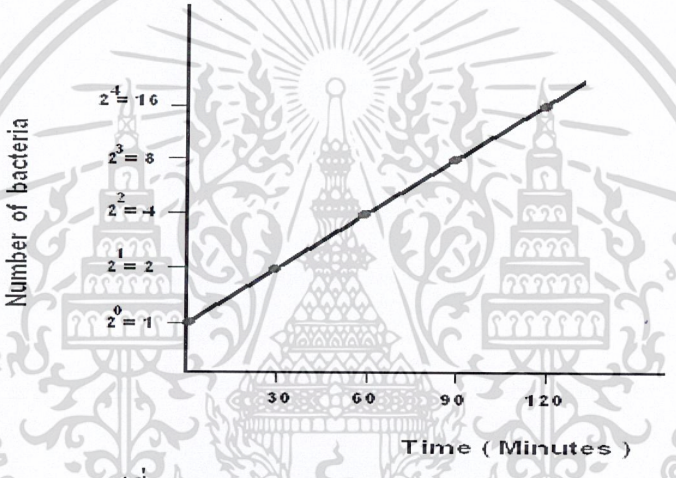
3.3 Psychrophilic bacteria หรือ psychrophiles เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำ –10 - 25 °C

นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียบางกลุ่มที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงมาก เช่น กลุ่ม hyperthermophiles สามารถเจริญเติบโตได้ที่ 80 - 100 °C และกลุ่ม extremophiles ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 100 - 120 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ความเป็นกรดด่าง (pH) ความเป็นกรด-ด่าง ของสภาวะแวดล้อมมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วง pH 6 – 8 อย่างไรก็ดี มีแบคทีเรียบางกลุ่มที่ทนต่อกรด (acid-tolerant bacteria) และบางกลุ่มที่ทนต่อด่าง (alkaline-tolerant bacteria) โดยทั่วไปแบคทีเรียจะเจริญในช่วง pH ที่เป็นด่าง (ค่า pH มากกว่า 7) ได้ดีกว่า ช่วง pH ที่เป็นกรด (ค่า pH น้อยกว่า 7) แต่ก็มีแบคทีเรียบางกลุ่มเช่น Sulfur bacteria ที่เจริญได้โดยใช้กรด sulfuric acid เป็นแหล่งพลังงาน

5. เวลา (Time) แบคทีเรียใช้เวลาในการเจริญเติบโตแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย ชนิดของอาหารที่แบคทีเรียใช้ และปัจจัยอื่น ๆ การอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีและมีระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญ (Generation time) น้อยลง



รูปที่ 2.7 Generation time of bacteria

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่าง Generation time ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ (Kenneth, 2008)

แบคทีเรีย	อาหารเลี้ยงเชื้อ	Generation time(นาที)
E. coli	Glucose - salt	17
S . aureus	Brain Heart Infusion	27-30
Lactobacillus sp.	Milk	6-87

6. อากาศ (Oxygen)

แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการอากาศที่แตกต่างกัน เราสามารถแบ่งประเภทของแบคทีเรียตามความต้องการออกซิเจนได้ ดังนี้

6.1 Aerobes เป็นแบคทีเรียที่ต้องการ ออกซิเจนในการเจริญเติบโตสร้างพลังงานโดยกระบวนการ respiration ซึ่งเป็นการสร้างพลังงานโดยใช้ออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2 Facultative anaerobes เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียกลุ่มนี้สร้างพลังงานได้จากกระบวนการ respiration และยังสามารถสร้างพลังงานจากกระบวนการ fermentation ซึ่งเป็นการสร้างพลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจน โดยกระบวนการ respiration จะให้พลังงานมากกว่า กระบวนการ fermentation และยังทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้เร็วกว่าด้วย

6.3 Aerotolerant anaerobes เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถใช้ออกซิเจนได้เพราะไม่มีสารตั้งต้นระบวนการ respiration แต่ออกซิเจนก็ไม่ทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้ตายได้

6.4 Strictly anaerobes ออกซิเจนจะเป็นพิษ กับแบคทีเรียกลุ่มนี้ ทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้ ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน

6. ความเข้มข้นของเกลือ แบคทีเรียหลายชนิดสามารถเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือมากน้อยต่างกัน แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญได้แม้มีอยู่อยู่เพียงเล็กน้อย แบคทีเรียบางชนิดต้องการเกลือปริมาณหนึ่งในการเจริญแต่แบคทีเรียบางกลุ่มอาจเจริญได้แม้อยู่ในสภาวะมีมีเกลือมาก ๆ เราเรียกแบคทีเรียกลุ่มนั้นว่า halophilic bacteria เช่นเดียวกับน้ำตาลแม้เกลือช่วยให้แบคทีเรียบางกลุ่มเจริญได้ แต่ความเข้มข้นของเกลือที่สูงมาก ๆ จะทำให้เซลล์แบคทีเรียตาย

7. แหล่งพลังงาน การเจริญเติบโตของแบคทีเรียเป็นขบวนการที่จำเป็นต้องใช้พลังงานเพื่อนำมาสังเคราะห์ ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ จุลินทรีย์อาจได้พลังงานมาจากแหล่งต่าง ๆ ดังนี้

7.1 แสงแดด พบในพวก autotrophic microorganism เช่นสาหร่ายเซลล์เดียวและแบคทีเรียบางชนิด ทั้งนี้เพราะมีความสามารถที่จะสังเคราะห์แสงได้

7.2 การออกซิไดส์สารประกอบบางชนิดพบในพวก chemo-autotrophic microorganism เช่น แบคทีเรียในตระกูล *Thiobacillus* sp., *Nitrosomanas* sp., *Nitrobacter* sp., *Desulfovibrio* sp.

7.3 ขบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยเฉพาะพวกแป้ง, น้ำตาล พบในพวก heterotrophic microorganisms ได้แก่จุลินทรีย์เกือบทั้งหมดที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก

2.5 การใช้ประโยชน์ของน้ำมันที่สะสมในเซลล์จุลินทรีย์

พลังงานทดแทน การเกิดเชื้อเพลิงธรรมชาติในรูปถ่านหิน น้ำมัน ก๊าซธรรมชาติต้องใช้เวลานับล้านๆ ปี โดยเกิดจากการทับถมของซากพืชซากสัตว์ที่ตายรวมกันเป็นตะกอน โดยอาศัยอุณหภูมิสูงและแรงกดดัน รวมทั้งการกระทำของจุลินทรีย์ เชื้อเพลิงซึ่งเป็นทรัพยากรธรรมชาติชนิดสิ้นเปลืองกำลังลดปริมาณลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่โลกมีความต้องการพลังงานจากเชื้อเพลิงมากขึ้น จึงอาจเกิดปัญหาการขาดแคลนพลังงาน ทั่วโลกจึงหันมาสนใจหาแหล่งพลังงานทดแทน ซึ่งมีหลายแบบ แบบหนึ่ง คือ การผลิตเชื้อเพลิงโดยอาศัยจุลินทรีย์ เชื้อเพลิงชนิดนี้ ได้แก่ แอลกอฮอล์และมีเทน จุลินทรีย์จำพวกยีสต์ สามารถเกิดกระบวนการหมักสารคาร์โบไฮเดรตให้ได้แอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อใช้ทำเครื่องดื่มดังได้กล่าวแล้ว นอกจากนี้แอลกอฮอล์ยังใช้เป็นตัวทำละลายที่ดีด้วยและยังสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ โดยการผสมแอลกอฮอล์ประมาณ 10-15% กับน้ำมันที่เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (Gasohol)

พลังงานอีกชนิดหนึ่งได้จากก๊าซชีวภาพ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นก๊าซมีเทน (CH_4) ที่ได้จากการหมักมูลสัตว์และของเสียจากสัตว์ โดยรวบรวมของเสียเหล่านี้ใส่ในถังหมักที่มีเชื้อ จุลินทรีย์อยู่ ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่ไม่มีอากาศ จุลินทรีย์จะใช้สารอินทรีย์ในของเสียไปและเกิดก๊าซมีเทนขึ้น ก๊าซนี้นำ ไปใช้เป็นเชื้อเพลิงในการปรุงอาหารและกระบวนการอื่นๆ ที่ต้องการใช้ความร้อน ของเหลือจากถังหมัก เมื่อสะสมมากๆ ยังนำไปใช้เป็นปุ๋ยได้ ปัจจุบันครอบครัวตามชนบทมีการทำเชื้อเพลิงแบบนี้ใช้เอง

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กุสุมา พรหมสีดา (2552) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบกรดไขมันจากยีสต์ชนิดต่างๆ โดยยีสต์ที่เลือกศึกษา ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A และ *Saccharomyces cerevisiae* Iz-1904 ที่เจริญในกากน้ำตาลในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน พบว่าปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบจะมีความแตกต่างกัน แม้จะทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ทั้ง 2 ชนิด ในสภาวะที่เหมือนกันและเป็นสายพันธ์เดียวกัน แต่เนื่องจากยีสต์ทั้ง 2 ชนิด มี isolate ต่างกัน จึงทำให้ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบจะมีความแตกต่างกันด้วย โดยกรดไขมันที่พบในยีสต์ทั้ง 2 ชนิด ปริมาณสูงสุด ประกอบไปด้วย กรดไขมันอิ่มตัวชนิดปาล์มิติก (C16:0) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดกรดเลโนเลอิก (C18:2) แต่ *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A จะพบกรดไขมันทั้ง 2 ชนิด ปริมาณน้อยกว่าใน *Saccharomyces cerevisiae* Iz-1904

ไพฑูรย์ สุขสถาวรพันธุ์ (2537) ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไขมันได้สูง องค์ประกอบของกรดไขมันคล้ายกับที่พบในน้ำมันจากพืช กรดไขมันที่พบมีจำนวนคาร์บอน 10 ถึง 26 อะตอม ส่วนใหญ่เป็นกรดปาล์มิติกประมาณ 10-25% ของกรดไขมันทั้งหมด บางจะชนิดมีกรดไมริสติก (myristic) เป็นส่วนใหญ่ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ยีสต์บางกลุ่มสามรถผลิตไขมันได้สูงถึง 40-70% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เช่น *Crytococcus* sp., *Endomycopsis* sp., *Rhodotorula* sp. และ *Trichosporon* sp. กรดไขมันประมาณ80-90% ในเซลล์ยีสต์จะอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ตรงตำแหน่งที่ 2 จะเป็นกรดไขมันโอเลอิกหรือลิโนเลอิก

ชิโนรส, ยิ่งยศ และกันยารัตน์ (2551) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและเปอร์เซ็นต์ของการสะสมไขมันในการเลี้ยงสาหร่ายพื้นเมืองสายพันธุ์คลอเรลลา โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลงของ Watanabe's medium ซึ่งมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนที่ต่ำเพื่อให้สาหร่ายมีการผลิตปริมาณไขมันสูงขึ้น และทำการเพิ่มปริมาณสารอาหารอื่น เช่น กลูโคส และเหล็กที่อยู่ในรูปสารประกอบเฟอร์ริค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอไรด์ เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วย สภาวะที่ทำการศึกษาเป็นดังนี้ กำหนดให้สูตรอาหารมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 1% ที่ความเข้มแสง 3,000 และ 5,000 ลักซ์ โดยใช้แสงสีส้มและแสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ขนาด 36 วัตต์ ช่วงเวลาของการให้แสงสว่างต่อมืดเท่ากับ 12:12 และ 16:8 ชั่วโมง อุณหภูมิประมาณ 27-29 เซลเซียส ทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 วัน จากการทดลองพบว่า อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดของสาหร่ายอยู่ที่ 0.511 ต่อวัน ที่ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ ช่วงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16:8 ชั่วโมง โดยมีแสงสีส้มเป็นแหล่งพลังงาน ในทางกลับกัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำสุดของสาหร่ายอยู่ที่ 0.262 ต่อวัน ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงสว่างต่อมืดเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง โดยมีแสงสีขาวเป็นแหล่งพลังงานทั้งนี้เพราะสาหร่ายไม่สามารถนำพลังงาจากแสงสีขาวมาใช้ได้เต็มที่หรือใช้ได้ในปริมาณที่น้อย เนื่องจากสาหร่ายไม่มีรงควัตถุในการรับแสงที่จำเพาะ และที่สภาวะความเข้มแสงสูง (5,000 ลักซ์) ช่วงระยะเลาการให้แสงมาก (16:8 ชั่วโมง) จะทำให้สาหร่ายได้รับแสงยาวนานขึ้น อัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายก็จะเพิ่มขึ้นด้วย เป็นผลให้ปริมาณการเจริญเติบโตสูงกว่าที่สภาวะความเข้มแสงต่ำ (3,000 ลักซ์) ช่วงระยะเวลาการให้แสงน้อย (12:12 ชั่วโมง) นอกจากนี้ที่ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 1% ซึ่งมีการเพิ่มกลูโคสและเฟอร์ริคคลอไรด์ โดยเมื่อเติมสารอาหารอย่างใดอย่างหนึ่ง จะส่งผลให้มีการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ต่ำ เมื่อเทียบกับการเติมสารอาหารทั้ง 2 ชนิด พร้อมกัน พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 0.542 ต่อวัน และเปอร์เซ็นต์ของการสะสมน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 6.42

อภิเชษฐ์ และรัตนภรณ์ (2553) ได้ทำการคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างดินทั้งหมด 53 ตัวอย่างที่เก็บในเขตพื้นที่จังหวัดขอนแก่นและจังหวัดใกล้เคียง ได้ยีสต์ทั้งหมด 76 ไอโซเลท จากนั้นหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้มีการผลิตและสะสมลิปิดในเซลล์มากที่สุด พบว่า การเพาะเลี้ยงใน Lipid accumulation medium เป็นเวลา 8 วัน มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5 อุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 30 °C โดยใช้ $(NH4)_2SO_4$ 0.1 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจนและกลูโคส 80 g/L ในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น พบว่ายีสต์ไอโซเลท U5/2 มีการสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงสุด เท่ากับ 23.26 % โดยน้ำหนักแห้ง

Angerbauer et al. (2008) ศึกษาการใช้กากสลัดจ์เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตลิพิดของยีสต์สายพันธ์ *Lipomycese starkeyi* และศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการสะสมลิพิดของยีสต์ชนิดนี้ จากการศึกษาพบว่าค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน(C:N) มีผลต่อการสะสมลิพิดของยีสต์ชนิดนี้ พบว่าค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน(C:N) เท่ากับ 150 จะมีการสะสมของลิพิดสูงถึง 68 % และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน(C:N) เท่ากับ 60 มีการสะสมของลิพิดเพียง 40 % เท่านั้น และที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน(C:N) เท่ากับ 30, 20 และ15 พบว่าการสะสมของลิพิดจะมีค่าลดลง จากผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน(C:N)มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลต่อการสะสมลิพิดของยีสต์ชนิดนี้ และพบว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน(C:N) เท่ากับ 150 มีการสะสมของลิพิดในปริมาณสูงสุด

Gouda, Omar and Aouad (2008) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไขมันจากเซลล์เดี่ยวที่ผลิตจาก *Gordonia* sp. DG โดยทำการเปรียบเทียบกับ *Rhodococcus opacus* PD630 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ไขมันสูง จุลินทรีย์ไขมันสูงเป็นจุลินทรีย์ที่มีไขมันส่วนเกินกว่า 20% ภายในเซลล์จุลินทรีย์พวกนี้สามารถกักเก็บ Triacylglyceral (TAG) ในรูปของหยดน้ำมันไว้ภายในเซลล์ สังเกตได้ว่าการสะสม ลิพิดจะสูงสุดในช่วง Stationary phase ซึ่ง *R. opacus* และ*Gordonia* sp.มีค่า 80% และ 72% ตามลำดับ โดยโครงสร้างของ TAG ประกอบไปด้วยองค์ประกอบหลักๆ ดังนี้ คือ TAG (87%), diacylglyceral (5%), free fatty acids (5%) , Phospholipid "PLs" และ (1.2%) Protiens (0.8%) (Packter and Olukoshi, 1995) โดย acetyl-CoA เป็นสารตั้งต้นหลักในการควบคุมการสังเคราะห์กรดไขมัน นอกจากนี้องค์ประกอบและโครงสร้างของแบคทีเรียที่สามารถสะสม lipid จะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอน

การศึกษานี้มีการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรท พบว่า แอมโมเนียมคลอไรด์นั้นเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการสะสมลิพิดของจุลินทรีย์ อีกทั้งยังพบว่าเมื่อทำการลดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนลง จะทำให้ประสิทธิภาพในการสะสมลิพิดของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยไนโตรเจนจะทำให้ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์เพิ่มขึ้น แต่ในจุลินทรีย์ที่มีปริมาณเซลล์มากจะมีการผลิดและสะสมลิปิดต่ำ จึงจำกัดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีการผลิตและสะสมลิพิดสูงขึ้น ทั้งนี้แหล่งคาร์บอนที่ใช้คือของเสียจำพวกส้ม ผลการศึกษาพบว่ากรดไขมันที่มีจำนวนคู่ของอะตอมคาร์บอนที่สะสมส่วนใหญ่มีช่วงการเจริญเติบโตของเซลล์ในการทดสอบของเสียมากที่สุด และพบว่าการสะสมลิพิดของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ได้รับอิทธิพลจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยการเพิ่มประสิทธิภาพของการสะสมลิพิดของจุลินทรีย์สามารถทำได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและลดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนลง

จากการศึกษานี้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสมลิพิด คือการใช้สารสกัดที่ได้จากส้ม 60%(v/v),แอมโมเนียมคลอไรด์0.2g/l และแมกนีเซียมซัลเฟต0.05 g/l ซึ่งจากสภาวะดังกล่าวนี้สามารถทำให้เกิดการสะสมลิพิดได้ถึง80%(w/w) ของเซลล์น้ำหนักแห้ง

Miao and Wu (2006) ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันโดยใช้วิธีการเพาะปลูกแบบ autotrophic (เป็นการเพาะเลี้ยงแบบปกติคือการให้แสง) และแบบ heterotrophic (เป็นเพาะเลี้ยงแบบไม่ให้แสงและใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน) พบว่าสาหร่ายคลอเรลลาโปรโตเธคอยส์แบบเฮทเทอร์โรโทรฟิค(heterotrophic)จะมีปริมาณไขมันดิบอยู่ 55.2%แต่ในแบบ ออโตโทรฟิค(autotrophic)จะมีปริมาณไขมันดิบอยู่เพียง 14.57% ซึ่งน้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสาหร่ายจะถูกดึงออกมาอย่างเต็มประสิทธิภาพจากเซลล์เฮทเทอร์โรโทรฟิคโดยใช้เฮกเซน (n-hexane) และเปลี่ยนสภาพไปเป็นไบโอดีเซลโดยอาศัยกระบวนการทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันแบบกรด

Niyom Kamlangdee (2003) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวจากเชื้อรา Schizochytrium จำนวน 5 สายพันธุ์ (strains N-1, N-2, N-5, N-6 and N-9) ที่แยกได้จากใบ Kandelia candel ที่หล่นจมน้ำในป่าชายเลนบริเวณเกาะฮ่องกง นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง glucose yeast extract โดยเขย่าเป็นเวลา 52 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25° C มวลชีวภาพทั้ง 5 สายพันธุ์ เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงมีค่าตั้งแต่ 10.8 ถึง 13.2 กรัม/ลิตร ซึ่งสายพันธุ์ N-2 มีค่ามวลชีวภาพสูงสุดในรูปของเซลล์แห้งเท่ากับ 13.2 กรัม/ลิตร และสายพันธุ์ N-9 เจริญเติบโตได้น้อยที่สุด มีมวลชีวภาพเท่ากับ 10.8 กรัม/ลิตร โดยกรดไขมันที่มีการสะสมภายในเซลล์ของเชื้อรา ทั้ง 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วย กรดไขมัน EPA (Eicosapentaenoic acid, 20:5n-3) มีการสะสมปริมาณต่ำในเซลล์ กรดไขมัน DHA (Docosahexaenoic acid, 22:6n-3) มีการสะสมในปริมาณที่สูง ปริมาณ โดยในสายพันธุ์ N-2 มีสัดส่วนของกรดไขมันดีเอชเอสูงสุดเท่ากับ 203.6 มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง ทั้งนี้ยังพบกรดไขมันชนิดอื่นๆ อีก แต่พบในปริมาณที่น้อย ได้แก่ กรดเพนตะดีไซคลิก (C15:0) กรดปาล์มิติก (C16:0) กรดโอเลอิกและกรดลิเลอิก นอกจากนี้เชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์ ยังเจริญได้ที่ระดับความเค็ม (salinity) ตั้งแต่ 0-30% และมีค่าความเค็มที่เหมาะสมในการเจริญระหว่าง 20-30%

Papanikolaou และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไขมันจากราในสายพันธุ์ Mucorales, *Mortierella isabellina* และ *Cunninghamella echinulata*,บนแหล่งคาร์บอนหมุนเวียน โดยแหล่งคาร์บอนที่ทำการศึกษาได้แก่ กลูโคส เพกติน น้ำแป้ง และแลกโตส น้ำเสียที่ศึกษามีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100:1 จากการศึกษาพบว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อปริมาณลิพิดที่สะสม โดยราในสายพันธุ์ *Mortierella isabellina* เจริญเติบโตได้ดีบนแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด คือ เปกติน น้ำแป้ง และแลกโตส ส่วนสายพันธุ์ *Cunninghamella echinulata* เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนน้ำแป้ง และองค์ประกอบของกรดไขมันจะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปลี่ยนชนิดของแหล่งคาร์บอน ซึ่งกรดไขมันที่พบภายในเซลล์ของราประกอบไปด้วย กรดโอเลอิก กรดปาลมิติก กรดลิโนเลอิก กรดสเตียริก กรดไมลีสติก และกรดแกรมมาลิโนเลอิก (GLA) โดยปริมาณของกรดไขมันที่พบจะมีความแตกต่างกัน ที่ชัดเจนที่สุดคือ กรดแกรมมาลิโนเลอิกจะพบในปริมาณต่ำภายในเซลล์ของราสายพันธุ์ *Mortierella isabellina* แต่ในทางกลับกันกรดชนิดนี้จะพบในปริมาณสูง ภายในเซลล์ของราสายพันธุ์ *Cunninghamella echinulata*

Widjaja, Chien, Ju. (2009) ศึกษาเรื่องการสะสมลิพิดและการเพิ่มการผลิตลิพิดของ *Chlorella vulgaris* โดยศึกษาปัจจัยของความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ การสูญเสียไนโตรเจน เวลา และวิธีการเก็บเกี่ยวและพบว่าวิธีการสกัดและอุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้งมีผลต่อองค์ประกอบของไขมัน การอบแห้งที่อุณหภูมิต่ำภายใต้สภาวะสุญญากาศนั้นจะให้ผลดีที่สุดแต่การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C จะยังคงเก็บรักษาองค์ประกอบของไขมันได้อยู่ทั้งหมดหรือลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นและการอบที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ไตรเอซิลกลีเซอรอลลดลง และพบว่าปริมาณไขมันและการผลิตไขมันจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับการเจริญเติบโตอย่างช้าๆเนื่องจากขาดสารอาหารประเภทไนโตรเจนและมีการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ พบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจนและมีแหล่งของคาร์บอนในปริมาณที่มากเกินพอไม่เพียงแต่ทำให้เกิดการสะสมลิพิดไว้ภายในเซลล์ แต่พบว่ากรดไขมันอิสระที่พบในเซลล์นั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอลซึ่งเป็นวัตถุดิบตั้งต้นที่สำคัญในการผลิตไบโอดีเซล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Visible Spectrophotometer) รุ่น UV 6400 บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
2. เครื่องชั่งชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น 205A บริษัท Precisa ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Z333K บริษัท Hermle-Labortec ประเทศเยอรมัน
4. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น Autoclave-325 บริษัท Tomy ประเทศญี่ปุ่น
5. เครื่องระเหยความดันสุญญากาศ (Evaporator) รุ่น N-N Series บริษัท EYELA ประเทศญี่ปุ่น
6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) บริษัท Gallenkamp ประเทศอังกฤษ
7. เครื่องกรองสุญญากาศ (Suction) รุ่น A-35 บริษัท Aspirator ประเทศญี่ปุ่น
8. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ยี่ห้อ Memmert ประเทศเยอรมัน
9. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer)
10. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)
11. คิวเวต
12. เครื่องแก้วต่างๆ
13. จานเพาะเชื้อและลูปเขี่ยเชื้อ
14. ตะเกียงแอลกอฮอลล์
15. หลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร
16. จุกยาง

3.1.2 สารเคมี

1. เปปโตน (Peptone)
2. สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)
3. วุ้น (agar)
4. กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Apex
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Apex
7. เมทานอล (CH_3OH) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Apex
8. คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Italmar
9. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_3.2H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Italmar
10. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Lab Systems
11. แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Apex
12. ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Apex
13. เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Apex
14. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Apex
15. โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Italmar
16. โซเดียมโมลิบดินัม ($Na_2MoO_4.2H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Italmar
17. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Italmar
18. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Italmar
19. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Italmar

3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นแบคทีเรีย R4.4 ที่คัดแยกได้จากบ่อผึ่งของระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปไก่และผลิตภัณฑ์เนื้อไก่สำเร็จรูปแห่งหนึ่งในจังหวัดลพบุรี โดยได้รับการอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียจาก นางสาวรัตติยา อ่องมะลิ นักศึกษาปริญญาโท สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสะสมลิพิดได้มากกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Ongmali *et al.*, 2010)

3.3 การเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรีย (Stock culture)

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาได้รับมาในรูปหัวเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Luria-Bertani (LB agar) ซึ่งจะถูกถ่ายลงบนอาหารแข็งใหม่ทุกๆเดือน และทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยอาหารแข็ง LB จะมีสูตรดังแสดงในตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)*

พารามิเตอร์	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)
เปบโทน (peptone)	10
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10
วุ้น (agar)	15

*พีเอชเท่ากับ 7.4

3.4 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น (Seed culture)

ก่อนการทดลองทุกครั้ง จะมีการเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น ซึ่งทำได้โดยเขี่ย Stock culture ในหัวข้อ 3.3 มา 1 โคโลนี ขีดเชื้อลงในจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดถ่ายเชื้อลงในน้ำเสียสังเคราะห์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยน้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้มีสูตรดังแสดงในตารางที่ 3.2 จากนั้นนำไปบ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อปรับสภาพให้เชื้อมีความคุ้นเคยกับน้ำเสียสังเคราะห์ เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดจะได้กล้าเชื้อเริ่มต้นซึ่งจะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 3.2 น้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษา

พารามิเตอร์	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
กลูโคส†	197.183
ไนโตรเจนชนิดต่างๆ†	1000.000
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	25.000
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	21.000
แคลเซียมคลอไรด์	0.368
แมกนีเซียมซัลเฟต	5.070
แมงกานีสคลอไรด์	0.275
ซิงค์ซัลเฟต	0.440
เฟอร์ริกคลอไรด์	1.450
คอปเปอร์ซัลเฟต	0.391
โคบอลต์คลอไรด์	0.420
โซเดียมโมลิบดินัม	1.260

†มีค่าผันแปรขึ้นกับการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

ปิเปต Seed culture จากข้อ 3.4 ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จนได้ค่าความขุ่นประมาณ 0.100 เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) จากนั้นนำไปบ่มในอ่างเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C พร้อมทั้งดูดสารละลายเซลล์ไปวัดค่า OD_{600} ที่เวลาต่างๆ กัน

3.6 ผลของช่วงเวลาการเจริญเติบโตของเซลล์ต่อการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย

1. ถ่าย Seed culture จากหัวข้อ 3.4 ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จนมีค่าความขุ่น OD_{600} เท่ากับ 0.100 (กำหนดให้น้ำเสียสังเคราะห์มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ 100:1)หลังจากนั้นนำไปบ่มด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
2. เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด ทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีและทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze drying
3. นำเซลล์แห้งที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก เพื่อวัดปริมาณชีวมวลที่ได้
4. นำเซลล์แห้งที่ผ่านการอบแห้ง และทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว ไปเติมตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล ในอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร ทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณลิพิด อ้างอิงตามวิธีการของ Bligh and Dyer (1959)
5. ทำวิธีการในข้อ 1-4 ซ้ำอีก แต่เปลี่ยนระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจาก 18 ชั่วโมงเป็น 36 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

3.7 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย

1. เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสูตรดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน กำหนดให้มีความเข้มข้นของไนโตรเจนในน้ำเสียเท่ากับ 1 g/L และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100:1
2. ปิเปต Seed culture ใส่ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ตามข้อ 1 ปริมาตร100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จนกระทั่งค่า OD_{600} เท่ากับ 0.100 นำไปบ่มด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C ตามระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 3.6
3. เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด ทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีและทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze drying
4. นำเซลล์แห้งที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก เพื่อวัดปริมาณชีวมวลที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำเซลล์แห้งที่ผ่านการอบแห้ง และทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว ไปเติมตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล ในอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร ทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณลิพิด อ้างอิงตามวิธีการของ Bligh and Dyer (1959)
6. ทำวิธีการในข้อ 1-5 ซ้ำ แต่เปลี่ยนชนิดของไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์จาก $(NH_4)_2SO_4$ เป็น $NaNO_3$ และยูเรีย

3.8 ผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย

1. ปิเปต Seed cultureให้มี OD_{600} เท่ากับ 0.100 ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสูตรดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยใช้ชนิดของไนโตรเจนที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3.7 กำหนดให้มี C:N ratio = 100
2. นำไปบ่มด้วยการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C โดยใช้ระยะเวลาในการเขย่าที่เหมาะสมตามหัวข้อ 3.6
3. เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด ทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีและทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze drying
4. นำเซลล์แห้งที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก เพื่อวัดปริมาณชีวมวลที่ได้
5. นำเซลล์แห้งที่ผ่านการอบแห้ง และทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว ไปเติมตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล ในอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร ทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณลิพิด อ้างอิงตามวิธีการของ Bligh and Dyer (1959)
6. ทำวิธีการ ในข้อ 1-5 ซ้ำ แต่เปลี่ยนอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในน้ำเสียโดยใช้การเพิ่มหรือลดปริมาณกลูโคสจาก 100:1 เป็น 150:1, 60:1และ 40:1 ตามลำดับ

3.9 การสกัดลิพิดด้วยวิธีของ Bligh และ Dyer (1959)

1. ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแบคทีเรียให้ทราบปริมาณที่แน่นอน จากนั้นเติมตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 1:2 (ปริมาตร 7 มิลลิลิตรและ 14 มิลลิลิตร ตามลำดับ) ทำการเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 30 วินาที
2. เติมคลอโรฟอร์ม 7 มิลลิลิตร ทำการเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 30 วินาที
3. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 7 มิลลิลิตรแล้วเขย่าผสมด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น
4. ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1000 รอบเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อทำให้ใสขึ้น
5. ทำการดูดสารละลายชั้นบนคือเมทานอลผสมกับน้ำ และดูดชั้นของตะกอนออก เก็บชั้นของคลอโรฟอร์มเอาไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ถ่ายชั้นของคลอโรฟอร์มลงในขวดก้นกลมที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนัก นำไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้งโดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator สภาวะที่ใช้ในการระเหยคือ ความดัน 200 มิลลิลิตรปรอท อุณหภูมิ 50 ± 2 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเครื่องทำความเย็น (Cooling) 20 ±2 องศาเซลเซียส
7. นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น คำนวณหาลิพิดในแบคทีเรียได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณร้อยละของลิพิดทั้งหมด} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัด}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

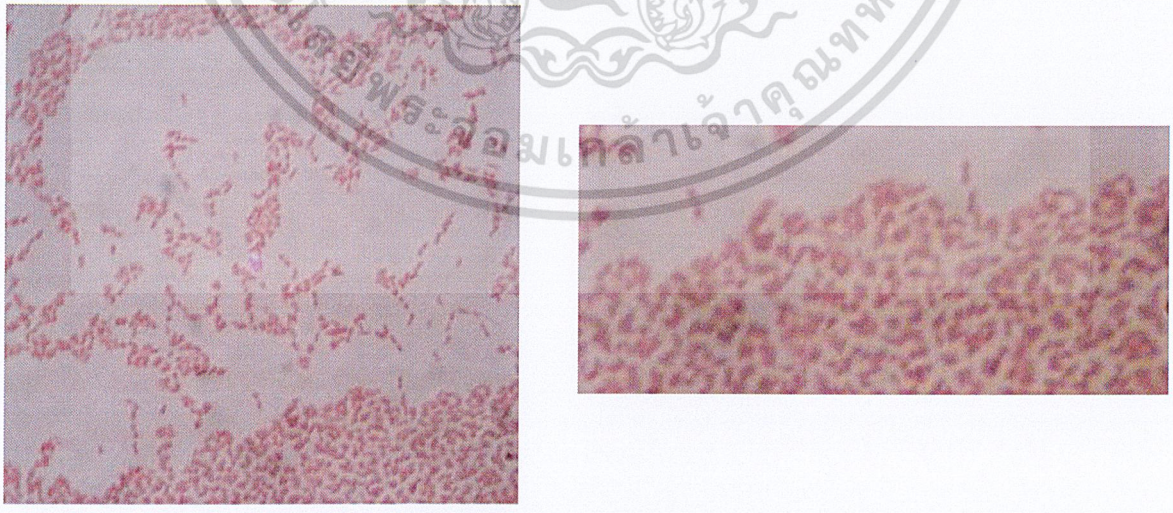
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

โครงงานพิเศษนี้ได้ทำการศึกษาผลของช่วงเวลาการเจริญเติบโต ชนิดของแหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* การทดลองเริ่มจากวัดรูปแบบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ เมื่อได้กราฟการเจริญเติบโต (growth curve) ของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์แล้ว จะทำการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ช่วงเวลาการเจริญเติบโต ชนิดของแหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ผลการศึกษาสามารถอธิบายได้ดังนี้

4.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 ที่คัดแยกได้จากบ่อผึ่งของระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปไก่และผลิตภัณฑ์เนื้อไก่สำเร็จรูป เมื่อนำไปจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิคการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ได้แบคทีเรียที่ชื่อว่า *Aeromonas sobria* (Ongmali *et al*., 2010) จากการศึกษาลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย โดยวิธีการย้อมสีแกรม พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวติดสีแดงของสีย้อม Safranin-O จัดเป็นชนิดแกรมลบ มีลักษณะเป็นทรงกระบอกหรือท่อน (rod) ดังรูปที่ 4.1

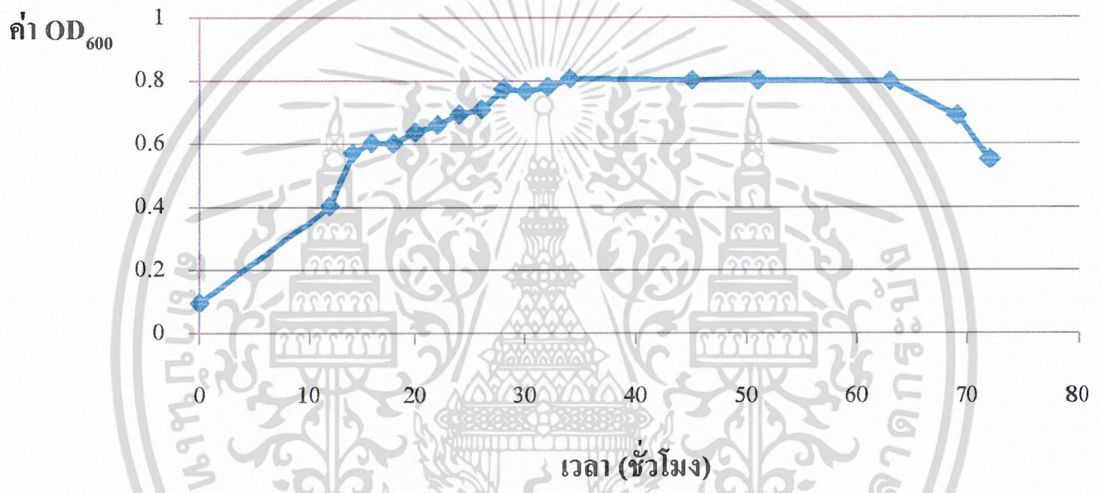


รูปที่ 4.1 แบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า (Ongmali *et al*., 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

การติดตามรูปแบบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ ทำโดยถ่ายกล้าเชื้อ (seed culture) จากอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ นำไปบ่มด้วยการเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2 วัน เพื่อปรับสภาพให้เชื้อมีความคุ้นเคยกับน้ำเสียสังเคราะห์ เมื่อครบเวลาถ่ายเชื้อลงในน้ำเสียสังเคราะห์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จนมีค่าความขุ่นเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.100 จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ไปวัดค่า OD_{600} ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์

จากรูปที่ 4.2 พบว่าแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* สามารถเพิ่มจำนวนได้ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังจะเห็นได้จากค่าความขุ่นของสารละลายเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.097 เป็น 0.403 เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยแบคทีเรียดังกล่าวมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในช่วง 18 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียค่อยๆ มีค่าลดลง ดังจะเห็นได้จากความชันของกราฟจะมีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับช่วงเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจนครบ 34 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียเติบโตได้ช้ามากดังจะเห็นได้จากค่าความขุ่นตั้งแต่ระยะเวลาดังกล่าวไปจนถึง 63 ชั่วโมงนั้นมีค่าคงที่ แสดงว่าแบคทีเรียจะเข้าสู่ระยะเวลาพักตัว(Stationary phase) ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 34 ชั่วโมง และเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียต่อไปเกินกว่า 63 ชั่วโมง ค่าความขุ่นที่วัด

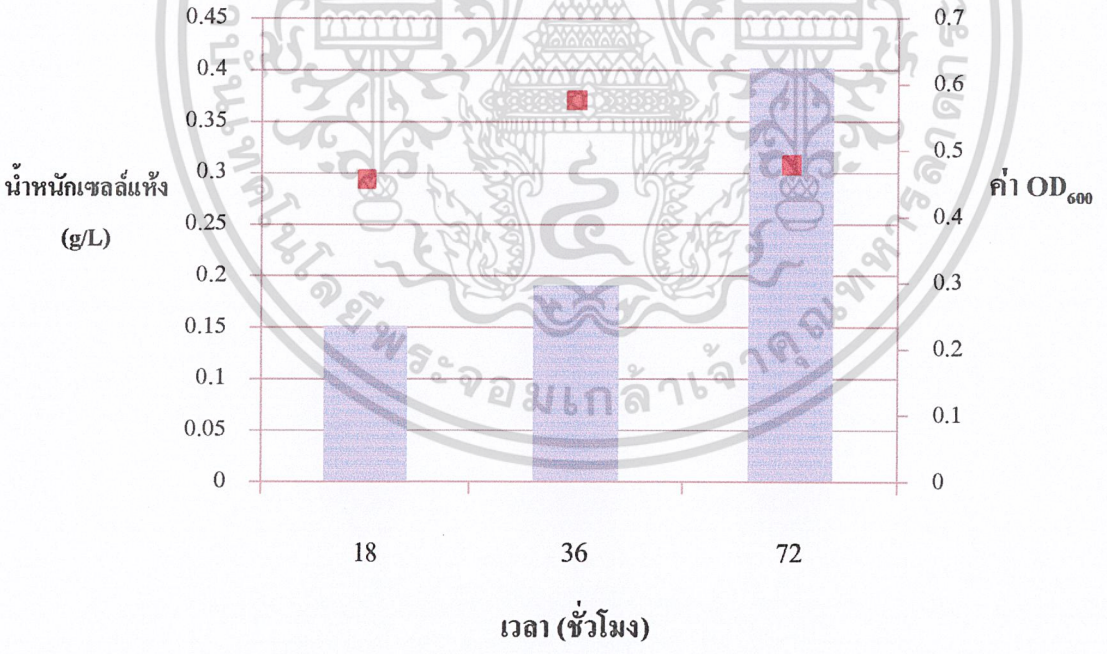
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มีค่าลดลง แสดงว่าแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์มีจำนวนลดลงหรือเข้าสู่ช่วงระยะการตาย (Death phase)

ดังนั้นระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 18, 36 และ 72 ชั่วโมง จึงถูกเลือกเป็นตัวแทนช่วงเวลาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในช่วงระยะแบ่งตัว (Log phase) ระยะพักตัว (Stationary phase) และระยะการตาย (Death phase) ตามลำดับ

4.3 ผลของช่วงเวลาการเจริญเติบโตต่อการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย

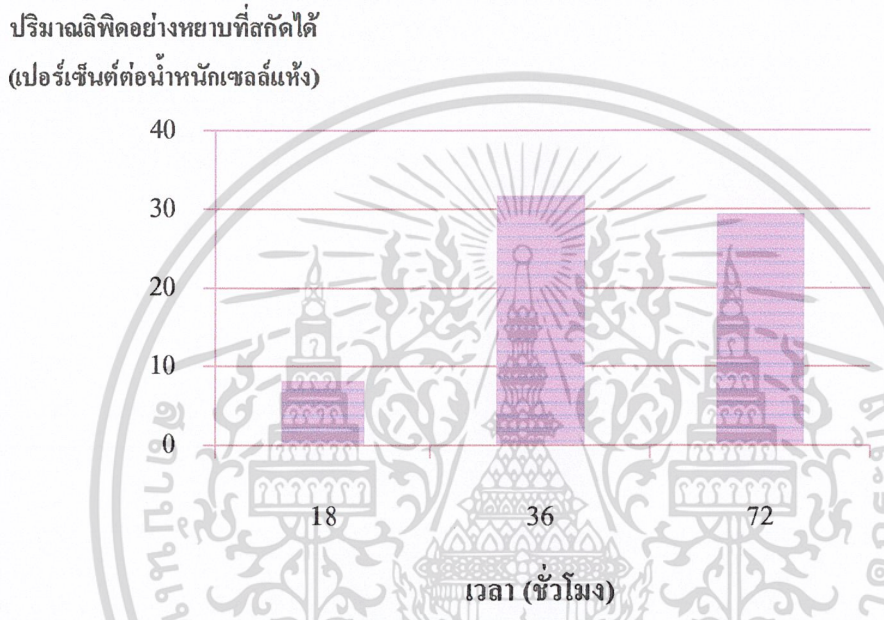
การศึกษาผลของช่วงเวลาการเจริญเติบโตต่อการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ทำได้โดย ถ่ายกล้าเชื้อของแบคทีเรียลงในน้ำเสียสังเคราะห์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำสารละลายเซลล์ไปบ่มด้วยการเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30°C ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลาต่างๆ กัน คือ เวลา 18, 36 และ 72 ชั่วโมง โดยเมื่อครบตามเวลาที่กำหนดจะนำสารละลายเซลล์ไปทำให้เซลล์แห้งด้วยเทคนิค Freeze drying และนำเซลล์แห้งมาสกัดเพื่อหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบ (crude lipid) ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายและการชั่งน้ำหนัก ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.3 และรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง (■) และค่า OD_{600} (■)ของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18, 36 และ 72 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.3 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียด้วยระยะเวลานานขึ้นจาก 18 ชั่วโมง เป็น 36 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียในปริมาณมากขึ้น โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 72 ชั่วโมงจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด (0.4015 กรัมต่อลิตร) ในขณะที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 18 และ 36 ชั่วโมง จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.1515 และ 0.1905 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.4 ปริมาณลิพิดอย่างหยาบ (crude lipids) ของเชื้อแบคทีเรีย Aeromonas sobria ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18, 36 และ 72 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ที่ระยะเวลาต่างๆของการเติบโต (รูปที่ 4.4) พบว่าแบคทีเรียจะมีการสะสมลิพิดได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หรืออีกนัยหนึ่งคือเมื่อเซลล์อยู่ในระยะพักตัว โดยมีปริมาณลิพิดที่สกัดได้ร้อยละ 31.81 โดยน้ำหนักแห้ง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเซลล์ 18 และ 72 ชั่วโมง จะได้ปริมาณลิพิดร้อยละ 8.27 และ 29.45 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

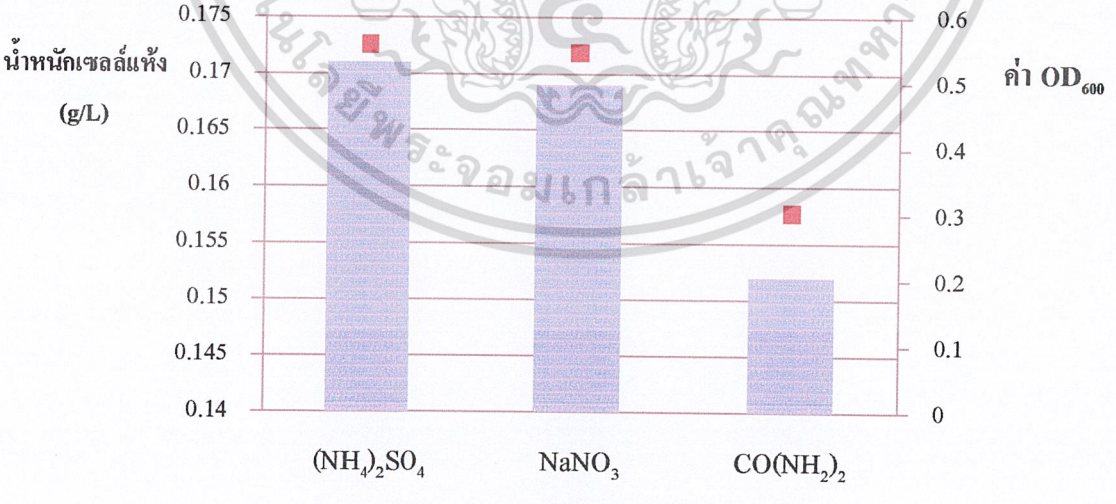
จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า เซลล์แบคทีเรียในช่วงระยะพักตัว (เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง) มีการสะสมลิพิดได้ในปริมาณสูงสุด ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการปรับตัวของเซลล์เข้าสู่ระยะพักนั้น ทำให้เชื้อแบคทีเรียนำอาหารที่เหลือไปสร้างไขมันและเก็บสะสมสารอาหารที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสะสมไว้ใช้ภายในเซลล์สำหรับอนาคต ในขณะที่การสะสมลิพิดของเซลล์แบคทีเรียในช่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะแบ่งตัว (เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง) จะมีค่าต่ำกว่าการสะสมลิพิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เนื่องจากในช่วงเวลาดังกล่าว แบคทีเรียยังมีการเจริญเติบโตอยู่สูงและแบ่งเซลล์ ทำให้สารอาหารถูกนำไปใช้ในการสร้างองค์ประกอบของเซลล์มากกว่าการสะสมในรูปของลิพิด ส่งผลให้มีปริมาณลิพิดที่สกัดได้มีค่าต่ำกว่า ในขณะที่การสะสมลิพิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก็ให้ค่าที่ต่ำกว่าการผลิตของเชื้อที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เนื่องจากที่ช่วงเวลาดังกล่าวแบคทีเรียเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะการตาย (Death phase) ที่แบคทีเรียบางส่วนเริ่มตายลงและปริมาณอาหารในน้ำเสียอาจมีจำนวนลดลง ทำให้เซลล์นำลิพิดที่เก็บสะสมไว้ออกมาสลาย เพื่อให้ได้พลังงานในการดำรงชีวิตต่อไป จากผลการศึกษาดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยเลือกเวลาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ 36 ชั่วโมง เป็นตัวแทนของช่วงเวลา ที่ใช้ในการศึกษาต่อไป

4.4 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย

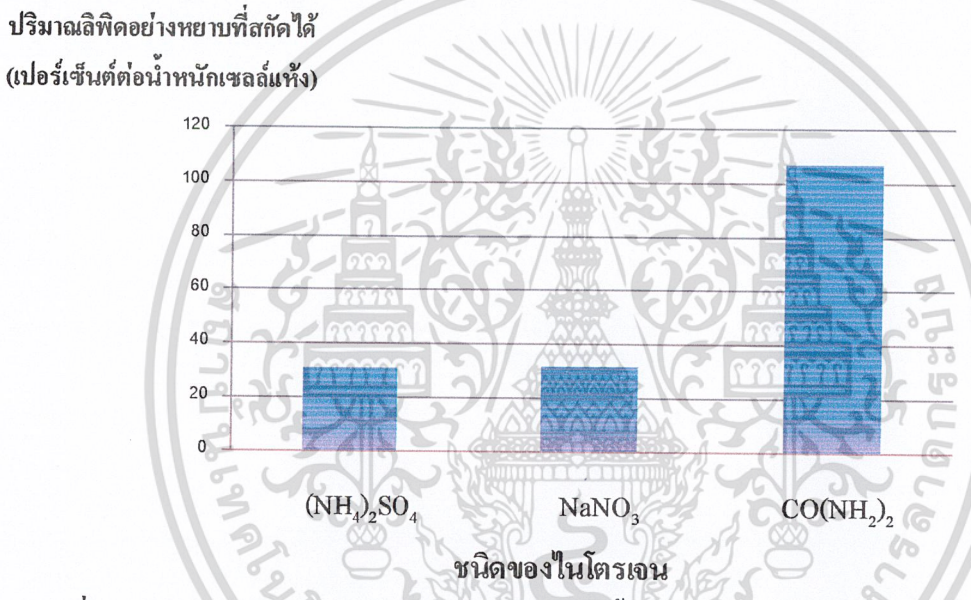
การศึกษาผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ทำได้โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต($(NH_4)_2SO_4$) โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) และยูเรีย($CO(NH_2)_2$) กำหนดความเข้มข้นของไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร และนำไปบ่มด้วยการเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ผลการศึกษาดังแสดงในรูป 4.5 และ 4.6



รูปที่ 4.5 น้ำหนักเซลล์แห้ง (■) และค่า OD_{600} (■) ของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ภายหลังการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ที่เวลา 36 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.5 พบว่า ชนิดของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดย แบคทีเรียสามารถเติบโตได้ดีที่สุดในน้ำเสียที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) รองลงมาคือโซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) เป็นแหล่งไนโตรเจน ดังจะเห็นได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่มีแหล่งไนโตรเจนทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกันคือมีค่าเท่ากับ 0.171 และ 0.169 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเสียที่มียูเรีย ($CO(NH_2)_2$) เป็นแหล่งไนโตรเจนมีการเจริญเติบโตต่ำที่สุด



รูปที่ 4.6 ปริมาณลิพิดอย่างหยาบ (crude lipids) ของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ภายหลังการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

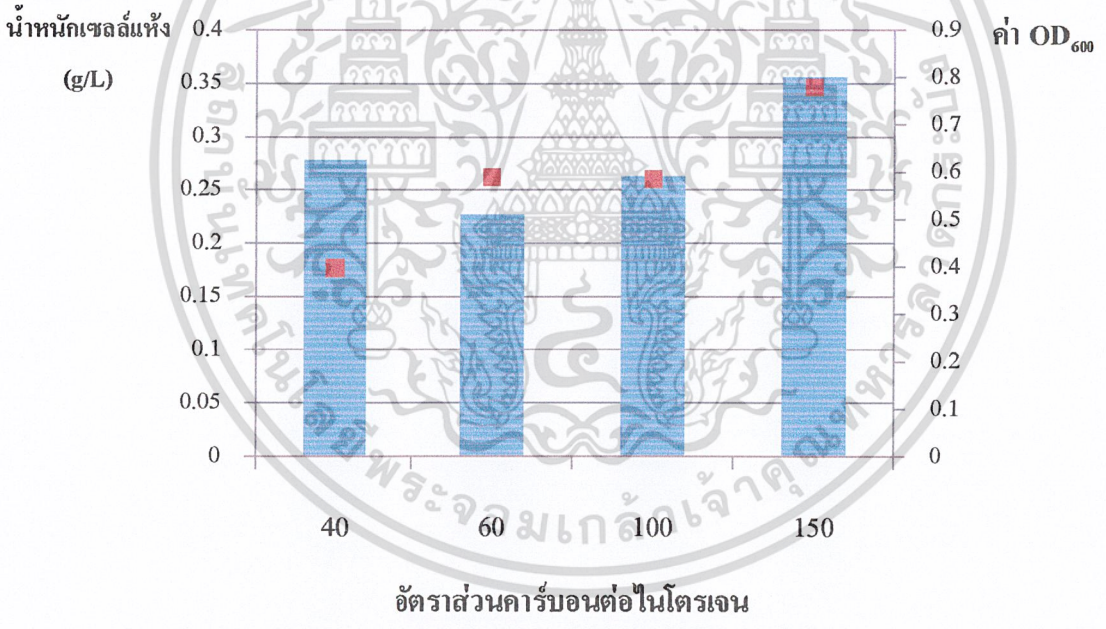
เมื่อพิจารณาการสะสมลิพิดในแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน(รูปที่ 4.6) ผลปรากฏว่าแบคทีเรียมีการสะสมลิพิดในปริมาณใกล้เคียงกันคือ ประมาณร้อยละ 31-32 โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต($(NH_4)_2SO_4$) และโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) เป็นแหล่งไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์ ในขณะที่การสะสมลิพิดของแบคทีเรียในน้ำเสียที่มียูเรีย ($CO(NH_2)_2$) เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่ามีค่าสูงเกิน 100 เปอร์เซนต์ สันนิษฐานว่าค่าที่ได้อาจจัดเป็นค่าที่ผิดปกติ (outlier) เนื่องจากแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะมีการสะสมน้ำมันจะมีค่าไม่เกินร้อยละ80 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ความผิดพลาดที่เกิดขึ้นอาจมีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากปริมาณเซลล์แห้งที่ใช้ในการสกัดอาจมีปริมาณน้อยเกินไป ส่งผลต่อความคลาดเคลื่อนของผลที่วัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองข้างต้น ผู้ทำการวิจัยได้เลือกแอมโนเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เนื่องจาก มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด(รูปที่ 4.5) และปริมาณลิพิดที่สกัดได้ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.6) อีกทั้งในน้ำเสียทั่วไปจะพบสารประกอบไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียม (NH_4^+) ได้มากกว่าไนเตรท (NO_3^-) (ธนพล,2553)

4.5 ผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษาผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ทำได้โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกัน คือ 40:1, 60:1, 100:1 และ 150:1 และนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30° เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ผลการศึกษาดังแสดงในรูป 4.7

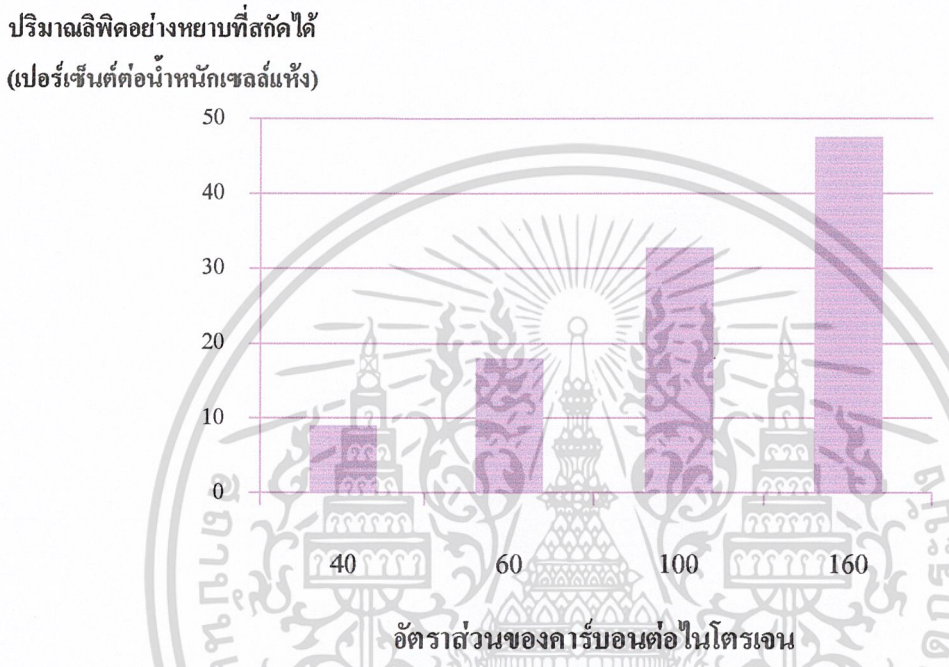


รูปที่ 4.7 น้ำหนักเซลล์แห้ง ( ) และค่า OD_{600} ( ) ของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ภายหลังการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกัน

จากรูปที่ 4.7 พบว่าแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* สามารถเจริญเติบโตได้ดี เมื่อเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) ในน้ำเสีย ดังจะเห็นได้จากค่าความขุ่นที่วัดที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วน C:N ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้เมื่อเพิ่มอัตราส่วน C:N จาก 100 เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

150 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าสูงขึ้น โดยแบคทีเรียเติบโตได้ดีที่สุดและมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 0.356 กรัมต่อลิตร สำหรับผลอัตราส่วน C:N ที่ 40 และ 60 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียควรมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยการทำซ้ำมากขึ้น



รูปที่ 4.8 ปริมาณลิพิดอย่างหยาบ (crude lipids) ของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ภายหลังการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกัน

เมื่อพิจาณาการสะสมลิพิดในแบคทีเรียภายหลังการเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างกัน (รูปที่ 4.8) พบว่าแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* มีการสะสมลิพิดได้เพิ่มขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอัตราส่วนสูงขึ้น โดยอัตราส่วน C:N เท่ากับ 150:1 เป็นสภาวะที่แบคทีเรียสะสมลิพิดได้สูงสุดถึงร้อยละ 47.52 โดยน้ำหนัก ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gouda, Omar, และ Aouad, (2008) ที่แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและลดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนลงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย *Gordonia* sp. DG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

โครงงานพิเศษนี้เป็นการศึกษาการสะสมลิพิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียของอุตสาหกรรมแปรรูปไก่ โดยแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาเป็นแบคทีเรียที่ชื่อว่า *Aeromonas sobria* แบคทีเรียดังกล่าวเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ มีลักษณะเป็นทรงกระบอกหรือท่อน(rod) ปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ผลของระยะเวลาการเจริญเติบโตของเซลล์ ผลของชนิดของไนโตรเจนต่อการสะสมลิพิด และผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ซึ่งมีสามารถสรุปผลได้ดังนี้คือ

1. การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ในน้ำเสียสังเคาะห์ มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในช่วง 18 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง และเข้าสู่ระยะพักตัว (Stationary phase) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 34 ชั่วโมง และเมื่อเพาะเลี้ยงถึง 63 ชั่วโมง แบคทีเรียจะมีจำนวนลดลงและเข้าสู่ระยะการตาย (Death phase)

2. ผลของช่วงเวลาการเจริญเติบโตต่อการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* พบว่าแบคทีเรียในช่วงระยะเวลาพักตัวสามารถสะสมลิพิดได้ในปริมาณสูงสุด โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง แบคทีเรียสามารถสะสมลิพิดได้ถึง ร้อยละ 31.81 โดยน้ำหนักแห้ง

3. ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* ผลปรากฏว่าแบคทีเรียสามารถสะสมลิพิดได้สูงถึงร้อยละ 32 ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต หรือโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

4. ผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* พบว่าแบคทีเรียสามารถสะสมลิพิดได้ดีขึ้น เมื่อเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน 150:1 ให้อัตราการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดที่สูงที่สุด คือมีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.356 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณลิพิด ร้อยละ 47.79 โดยน้ำหนักแห้ง

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษากราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเมื่อมีการแปรผันแหล่งไนโตรเจน
2. ควรศึกษาผลของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กุสุมา พรมสีดา. 2552. องค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตร์บัณฑิต. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ.2552

คณะผู้แทนไทยประจำประชาคมยุโรป. 2549 [Online]. แนวโน้มสถานการณ์พลังงานของโลก: สถานการณ์พึ่งพึงด้านพลังงานของยุโรปและเอเชีย. สืบค้นได้ที่ http://news.thaieurope.net/content/view/1023/170/ สืบค้นข้อมูลเมื่อ กันยายน 2553

จรัญ ปัตตาโน. 2551 [Online]. Bacteria Morphology, Structure and Function. สืบค้นได้ที่ http://www.medtechzone.com/data/bac/bacteria.php สืบค้นข้อมูลเมื่อ กันยายน 2553

ชิโนรส ศรีศิริ, ยิ่งยศ ลัมภู และ กันยรัตน์ โหละสุต. 2551. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของสาหร่ายท้องถิ่นเซลล์เดียว, การประชุมวิชาการวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทยครั้งที่ 18, โรงแรมจอมเทียน ปาล์ม บีช, ชลบุรี. จัดโดยมหาวิทยาลัยมหิดล 20-21 ตุลาคม 2551.

ตรี วาทกิต. 2553 [Online]. จุลชีววิทยา. สืบค้นได้ที่ http://agri.npu.ac.th/publication/Aj.TREE/2010/ สืบค้นข้อมูลเมื่อ กันยายน 2553

พจน์ ศรีบุญลือ, โสพิศ วงศ์คำ และพัชรี บุณศิริ. 2543. ตำราชีวเคมี. ภาควิชาเคมี คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ธนพล สามย่านฟาร์ม. 2553 [Online]. สมดุลของธรรมชาติในบ่อกุ้ง. สืบค้นได้ที่ http://www.shrimpcenter.com/page000495.html สืบค้นข้อมูลเมื่อ กุมภาพันธ์ 2554

แพทย์หญิงสายพิณ โชติวิเชียร. 2553 [Online]. กรดไขมัน. สืบค้นได้ที่ http://www.novabizz.com/Health/Supplement/Fatty_Acid.htm สืบค้นข้อมูลเมื่อ กันยายน 2553

ไพฑูรย์ สุขสถาวรพันธุ์. 2537. การสังเคราะห์กรดไขมันจำเป็นที่อยู่ตัวโดยยีสต์และทางเคมี. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ

ภัทร อุนยะวงษ์, นพวรรณ พิพัฒนานุกูล, กนกพร เจริญสุข และปรภาว์ ประเสริฐทิพย์ชัย. 2551 [Online]. สารชีวโมเลกุล. สืบค้นได้ที่ http://www.room601.ob.tc/Lipid.html สืบค้นข้อมูลเมื่อ กันยายน 2553

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2553 [Online]. Lipoprotein. สืบค้นได้ที่ http://en.wikipedia.org/wiki/Lipoprotein สืบค้นข้อมูลเมื่อ กันยายน 2553

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2553 [Online]. ไบโอดีเซล. สืบค้นได้ที่ http://th.wikipedia.org/wiki/ไบโอดีเซล สืบค้นข้อมูลเมื่อ กันยายน 2553

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2553 [Online]. โปรคาริโอต. สืบค้นได้ที่ http://th.wikipedia.org/wiki/โปรคาริโอต สืบค้นข้อมูลเมื่อ กันยายน 2553

สถาบันวิจัยวิทยาศาตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2551. เราไม่ง้อน้ำมัน, กรุงเทพฯ: นามมีบุ๊คส.

Alvarez, H., Steinbüchel, A. 2002. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology, 60, 367-376.

Angerbauer C., Siebenhofer M., Mittelbach M., and Guebitz G.M.,2008. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. Bioresource Technology. 99, 3051–3056

Bligh, E and Dyer, W. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. 37, 911-917

Brown, L.M. 1996. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. Energy Conversation Management.37,1363-1367

Chisti Y. 2007, Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advance. 25, 294 – 306

Fu, Y.F., Yang W., Jiang G.Z., Xu Y.N., and Kuang T.Y. 2004. Enhancement of fatty acid production of *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) by addition of glucose and sodium thiosulphate to culture medium. Journal Process Biochem. 40, 1315 – 1318

Kamlangdee, N. and Fan, K.W. Polyunsaturated fatty acids production by Schizochytrium sp. Isolated from mangrove. Songklanakarin Journal Science and Technology. 25(5), 643-650

Kenneth Todar,PhD. 2008 [Online]. The Growth of Bacteria Popolations. Available : http://textbookofbacteriology.net/growth.html Accessed date : September 2010

Mata, T.M., António, M.A. and Nidia, C.S. 2009. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14, 217-232

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. and Xian, M. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable Energy. 34, 1–5

Miao X., and Wu Q.2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil .Bioresource Technology. 97, 841–846

Gouda, M.K., Omar, S.H., Aouad, L.M. 2008. Single cell production by *Gordonia sp.* DG using agro-industrial wastes. World J Microbiol Biotechnol. 24, 1703-1711

Olukoshi, ER and Packter, NM. 1994. Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces:*possible carbon source for antibiotics. Microbiology. 140, 931-943

Ongmali, R., Thawornchaisit, U., Punphruch, S. 2010. Lipid-Accumulation Capacity of Bacteria Isolated from a Poulty Processing Wastewater. PROCEEDINGS OF ABSTRACT AND PROGRAM. King Mongkul's Institute of Technology Ladkrabang and Khon Kaen University, Nong Khai Campus, Thailand. 60

Papanikolaou, S. Panayotou, M.G-, Fakas, S., Komaitis, M. and Aggelis G. 2007. Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources: Europe Journal Lipid Science and Technology. 109, 1060-1070

Tsukahara, K. and Sawayama, S. 2005. Liquid fuel production using microalgae. Journal Japan Petroleum Instrument. 48(5), 251-259

Voet, D. and Voet, J.G. 1990. Biochemistry. New York:John Wiley & Sons.

Wapedia. 2010 [Online]. ไกล โคลิพิด. Available : http://wapedia.mobi/th/ไกล โคลิพิด Accessed date: September 2010

Widjaja, A., Chien, C.-C. and Ju Y. H.. 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris.* Taiwan Institute of Chemical Engineers. 40, 13-40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง

ตารางที่ 1 ผลของช่วงเวลาการเจริญเติบโตต่อการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย

เวลา(ชม.)	ขวดที่	OD_{600}		น้ำหนักขวดก้นกลม (กรัม)		น้ำหนักลิปิด (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/100mL)
		เริ่มต้น	สุดท้าย	ก่อนสกัดลิพิด	หลังสกัดลิพิด		
18	1	0.186	0.503	171.8190	171.8204	0.0014	0.0172
	2	0.113	0.410	172.6279	172.6290	0.0011	0.0131
36	1	0.091	0.549	49.3844	49.3894	0.0050	0.0156
	2	0.091	0.602	172.1084	172.1155	0.0071	0.0225
72	1	0.095	0.470	171.1496	171.1602	0.0106	0.0354
	2	0.095	0.486	47.3780	47.3910	0.0130	0.0449

ตารางที่ 2 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย

แหล่งไนโตรเจน	ขวดที่	OD_{600}		น้ำหนักขวดก้นกลม (กรัม)		น้ำหนักลิปิด (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/100mL)
		เริ่มต้น	สุดท้าย	ก่อนสกัดลิพิด	หลังสกัดลิพิด		
$(NH_4)_2SO_4$	1	0.113	0.535	172.4820	172.4859	0.0039	0.0128
	2	0.104	0.580	172.1081	172.1148	0.0067	0.0214
$NaNO_3$	1	0.114	0.520	171.1493	171.1537	0.0044	0.0137
	2	0.105	0.572	172.6280	172.6343	0.0063	0.0201
$(NH_2)_2CO$	1	0.113	0.233	105.4805	105.4923	0.0118	0.0123
	2	0.098	0.372	103.7736	103.7950	0.0214	0.0181

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ผลของอัตราส่วนของ C:N ต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของเชื้อแบคทีเรีย

ค่า C/N	ขวดที่	OD_{600}		น้ำหนักขวดก้นกลม (กรัม)		น้ำหนักลิพิด (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/100mL)
		เริ่มต้น	สุดท้าย	ก่อนสกัดลิพิด	หลังสกัดลิพิด		
40	1	0.102	0.398	170.7550	170.7570	0.0020	0.0217
	2	0.102	0.396	104.3448	104.3478	0.0030	0.0340
60	1	0.096	0.588	103.6650	103.6701	0.0051	0.0280
	2	0.096	0.589	102.8982	102.9013	0.0031	0.0174
100	1	0.104	0.584	49.7259	49.7327	0.0068	0.0216
	2	0.104	0.586	103.7738	103.7844	0.0106	0.0310
150	1	0.105	0.777	103.5063	103.5225	0.0162	0.0349
	2	0.105	0.781	172.4826	172.5002	0.0176	0.0362

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้