การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมผลิตปลาทูน่ากระป๋อง

ISOLATION OF LIPASE – PRODUCING MICROORGANISMS FROM WASTEWATER OF TUNA CANNING INDUSTRY

นางสาวทัตพร ชวาลสมบูรณ์

นางสาวธิดารัตน์ แก้วหญ

นายปรวุฒิ ณ ระนอง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2556

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมผลิตปลาทูน่ากระป๋อง

ISOLATION OF LIPASE – PRODUCING MICROORGANISMS FROM WASTEWATER OF TUNA CANNING INDUSTRY

นางสาวทัตพร ชวาลสมบูรณ์

นางสาวธิดารัตน์ แก้วหณุ

นายปรวุฒิ ณ ระนอง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION OF LIPASE – PRODUCING MICROORGANISMS FROM WASTEWATER OF TUNA CANNING INDUSTRY

TATTAPORN CHAVALSOMBOON

THIDARAT KEAWHANU

PORAWUT NA RANONG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN ENVIROMENTAL CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2013

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินของ [illegible] ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมผลิตปลาทูน่ากระป๋อง

ISOLATION OF LIPASE – PRODUCING MICROORGANISMS FROM WASTEWATER OF TUNA CANNING INDUSTRY

ชื่อนักศึกษา นางสาวทัตพร ชวาลสมบูรณ์ รหัสนักศึกษา 53051188

นางสาวธิดารัตน์ แก้วหณุ รหัสนักศึกษา 53051196

นายปรวุฒิ ณ ระนอง รหัสนักศึกษา 53051207

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังอนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อมประจำปีการศึกษา2556

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. สุวรรณี จรรยาพูน	
ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์	
ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมผลิตปลาทูน่ากระป๋อง
ชื่อนักศึกษา	นางสาวทัตพร ชวาลสมบูรณ์ นางสาวธิดารัตน์แก้วหญุ นายปรวุฒิ ณ ระนอง
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมีสิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา	2556
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อจุลินทรีย์เป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์และถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมและกระบวนการบำบัดน้ำเสีย ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าสามารถทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากน้ำเสียโรงงานผลิตปลาทูน่ากระป๋อง เนื่องจากน้ำเสียในอุตสาหกรรมดังกล่าวมีปริมาณไขมันในสัดส่วนที่สูง โครงงานพิเศษนี้จึงทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำเสียอุตสาหกรรมการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง โดยเก็บตัวอย่างน้ำเสียบริเวณบ่อพักไขมันของโรงงานผลิตปลาทูน่ากระป๋อง แล้วนำตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงในอาหาร screening medium ทำการถ่ายเชื้อไปยังอาหาร tributyrin agar เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่าแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายไขมันได้ 22 ไอโซเลทโดยแบคทีเรียที่ย่อยสลาย tributyrin ได้เป็นวงใส มี 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท7 และ 9 นอกจากนี้ในระหว่างการทดลองยังพบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อย tributyrin เป็นวงใสได้อีกจึงใช้ชื่อเป็นไอโซเลท 10 และเมื่อนำมาตรวจสอบโดยการวัดแอคทีวิตี้ ด้วยวิธี point inoculation บนอาหาร tributyrin agar พบว่าไอโซเลท KMITL TN7 KMITL TN9 และKMITL CT10 มีค่าอัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางส่วนใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีในชั่วโมงที่ 72 ของการบ่ม คือ 1.30 1.34 และ6.89 มิลลิเมตรตามลำดับ และเมื่อวัดแอคทีวิตี้ด้วยการวัดวงใสด้วยวิธี Agar disk diffusion และวิธี Agar diffusion plateพบว่าขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเจริญของเชื้อในอาหาร production medium เพิ่มขึ้นจาก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับซึ่งวิธี Agar diffusion plate ให้วงใสกว้างสุดที่ 15.50 มิลลิเมตร และวิธี Agar disk diffusionให้วงใสกว้างสุดที่12.00 มิลลิเมตร และเมื่อวัดแอคทีวิตี้ด้วยการไทเทรต พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสไม่มากพอที่จะสามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีการไทเทรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ: เอนไซม์ไลเปส แบคทีเรียย่อยสลายไขมัน แอคทีวิตี้

Title	ISOLATION OF LIPASE – PRODUCING MICROORGANISMS FROM WASTEWATER OF TUNA CANNING INDUSTRY
Students	TATTAPORN CHAVALSOMBOON
	THIDARAT KEAWHANU
	PORAWUT NA RANONG
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Environmental Chemistry
Academic Year	2013
Advisor	Dr. Tipachai Vatanavicharn

ABSTRACT

Lipase producing microorganism was used widely and has benefit for industries and wastewater treatment. It was reported earlier which this bacteria can be select from canned tuna wastewater which high proportion of fat component. Screening of lipase producing bacteria from canned tuna wastewater is interested in this special project. Wastewater samples were sampling from grease traps and cultured in screening medium then transferred to tributyrin agar for selecting lipolytic bacteria isolates. A total of 22 lipolytic isolates were found. Only two selected isolates from the canned wastewater has the clear zones from tributyrin agar digestion that designated as isolate KMITL TN7 and KMITL TN9. Moreover, one isolate was found during the experiment and designated as isolate KMITL CT10. Activities test on tributyrin agar was studied by point inoculation, Agar disk diffusion and Agar diffusion plate method. The result showed that clear zone/colony diameter ratio is 1.30, 1.34 and 6.89 mm of Isolate KMITL TN7, KMITL TN9 and KMITL CT10, respectively in the first method. In addition, diameter of clear zone was larger as the incubation time increase at 0, 24, 48 hours. The largest clear zone diameter was product from KMITL CT10 with of the size of 15.50 mm by Agar diffusion plate method and 12.00 mm by Agar disk diffusion method ,but activities test by titration method cannot detect because less of lipase producing ability.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keywords: lipase, lipolytic bacteria, activity,

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงมาได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาชี้แนะแนวทางและให้คำปรึกษาในการทำโครงงานพิเศษจากดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ นอกจากนี้ยังให้กำลังใจและการดูแลอย่างดีทำให้โครงงานพิเศษสำเร็จได้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน และ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ที่เข้าร่วมเป็นคณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ พร้อมทั้งให้คำแนะนำและเสนอข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์เพื่อนำไปแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับวิธีการทดลองที่เป็นประโยชน์ในการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบังทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาในระดับบัณฑิตศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมีทุกท่านได้แก่ พี่สาคร พี่ณัฐพล พี่ปราณี และพี่ชัชชัย ที่ให้คำปรึกษาและอำนวยความสะดวกในการทดลอง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาทุกท่านได้แก่ พี่วิทยา พี่ประสิทธิ์ที่อำนวยความสะดวกในการทดลอง และให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้อุปกรณ์การทดลองทางชีววิทยา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่โรงงานอุตสาหกรรมผลิตปลาทูน่ากระป๋องทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการตัวอย่างน้ำทิ้งเพื่อทำการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ทุกคน ที่เป็นกำลังใจและช่วยเหลือในด้านต่างๆ ให้คำปรึกษา ให้ข้อคิด ให้ความรู้สึกดีๆตลอดการวิจัย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาของเราทั้งสามคนตลอดจนครอบครัว ที่ให้กำลังใจและคอยสนับสนุนทางด้านการศึกษาตลอดมา จนทำให้การทำโครงงานพิเศษเล่มนี้ประสบความสำเร็จ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ลิพิด	3
2.1.1 กรดไขมัน	3
2.1.2 เอซิลกลีเซอรอล	4
2.1.3 ไตรบิวทิริน	5
2.2 เอนไซม์ไลเปส	6
2.2.1แหล่งของเอนไซม์ไลเปส	6
2.3 อุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋อง	11
2.3.1 กระบวนการผลิตปลาทูน่า	12
2.3.2 วัสดุเศษเหลือของโรงงานอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋อง	13
2.3.3 น้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋อง	14
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.1.1 อุปกรณ์	18
3.1.2 สารเคมี	18
3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย	19
3.2.1 ตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์	19
3.2.2 การวิเคราะห์ลักษณะน้ำตัวอย่าง	19
3.2.3 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน	19
3.2.4 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส	20
3.2.5 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย	20
3.2.6 การตรวจวัดความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลลินทรีย์	20
3.2.7การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ด้วยวิธีวัดวงใส	20
3.2.8 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ด้วยวิธีไทรเทรต	21
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	
4.1 การศึกษาลักษณะของตัวอย่างน้ำเสีย	22
4.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน	23
4.3การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส	25
4.4การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย	26
4.5 การตรวจวัดความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย	30
4.6 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ด้วยวิธีวัดวงใส	31
4.7 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ด้วยวิธีไทรเทรต	33
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย	35
5.2 ข้อเสนอแนะ	36
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก ก	42
ภาคผนวก ข	44
ภาคผนวก ค	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ชื่อโครงสร้างทางเคมี และสัญลักษณ์ของกรดไขมันชนิดต่างๆ	4
2.2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ทางการค้า	7
2.3 Characteristic of wastewater in tuna canning plant.	14
2.4 Characteristic of wastewater at different steps of canned tuna processing.	15
4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ลักษณะน้ำตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์	22
4.2 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางส่วนใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารแข็ง tributyrin agar ในเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	31
4.3 ค่าความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่วัดได้จาการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีAgar disk diffusion และวิธี Agar diffusion plate	32
4.4 ผลการไทเทรตเพื่อวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ปฏิกิริยาการเกิดไตรกลีเซอไรด์	3
2.2 สูตรโครงสร้างของ tributyrin	6
2.3 การสลายพันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ด้วยเอนไซม์ไลเปส	6
4.1 ลักษณะน้ำเสียจากแหล่งเก็บตัวอย่างน้ำ	23
4.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำตัวอย่างโดยใช้อาหารเหลวที่มีน้ำมันตับปลาเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน	24
4.3 ลักษณะของโคโลนีจากการ spread plate ที่เจริญบนอาหารแข็ง Methyl red	25
4.4 การแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี streak plate ลงบนอาหารแข็ง Methyl red	25
4.5 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย tributyrin โดยใช้วิธี streak plate technique	26
4.6 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ช่วงเวลา 0 2 4 6 8 10 24 และ 72 ชั่วโมง โดยใช้วิธี 6 x 6 drop plate method	27
4.7 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท KMITL TN7 ในช่วงเวลา0 2 4 6 8 10 24 และ 72 ชั่วโมง	27
4.8 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท KMITL TN9 ในช่วงเวลา 0 2 4 6 8 10 24 และ 72 ชั่วโมง	28
4.9 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท KMITL CT10 ที่พบระหว่างการทดลอง	29
4.10 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียจากการย้อมแกรม	29
4.11 ส่วนใสที่เกิดจากการย่อยสลาย tributyrin โดยเชื้อ ไอโซเลท KMITL TN7 KMITL TN9 และKMITL CT10 ที่เวลา 72 ชั่วโมง	30
4.12 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยวิธี Agar disk diffusion และวิธี Agar diffusion plate	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นน้ำที่เกิดจากกระบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งลักษณะของน้ำทิ้งจะขึ้นอยู่กับชนิดของผลผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมนั้น เช่น น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตรถยนต์ก็จะมีปริมาณโลหะหนักปนเปื้อนมาก น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมสิ่งทอและสีย้อมก็จะมีปริมาณสีย้อมในน้ำทิ้งมาก น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตอาหารก็จะมีปริมาณไขมันและน้ำมันมาก โดยเฉพาะไขมันและน้ำมันในน้ำเสียเป็นสิ่งที่บำบัดยากและก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อม เช่น ส่งกลิ่นเหม็น ขัดขวางการถ่ายเทออกซิเจนจากอากาศสู่แหล่งน้ำ เป็นแหล่งก่อให้เกิดพาหะนำโรค เป็นต้น

นอกจากนี้ไขมันและน้ำมันในน้ำเสียยังส่งผลให้เกิดการอุดตันของท่อระบายน้ำ และทำให้ค่าความต้องการออกซิเจนทางชีวเคมี (Biological oxygen demand, BOD) สูง อีกด้วย ซึ่งการแก้ไขสามารถทำได้ด้วยกระบวนการต่างๆ ทั้งวิธีการทางกายภาพ ทางเคมีและทางชีวภาพ สำหรับวิธีการทางกายภาพจะเป็นการใช้กลไกความแตกต่างระหว่างความหนาแน่นของไขมันและน้ำมันกับน้ำ เช่น การลอยตัวของไขมันบนผิวน้ำ โดยอุปกรณ์ในการบำบัดทางกายภาพ คือ ตะแกรงดักขยะ ถังดักไขมันและน้ำมันเป็นต้น กลไกทางเคมีนั้นทำโดยการเติมสารเคมี เช่น สารลดแรงตึงผิว ทำให้สามารถแยกไขมันและน้ำมันออกจากน้ำได้ ทั้งนี้อุปกรณ์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางเคมี ได้แก่ ถังกวนเร็ว ถังกวนช้า ถังตกตะกอนและถังกรองเป็นต้น กระบวนการทางชีวภาพ เป็นการอาศัยหลักการใช้จุลินทรีย์ ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเอนไซม์ไลเปส จะเข้าไปทำปฏิกิริยาย่อยสลายโมเลกุลของไขมันและน้ำมัน ในรูปไตรกลีเซอไรด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล ซึ่งจุลินทรีย์สามารถดูดซึมเพื่อนำไปใช้ในกิจกรรมของเซลล์ได้ โดยผ่านวิธีเบต้าออกซิเดชัน (β-Oxidation pathway) (Food Network Solution, 2010)

สำหรับกระบวนการทางกายภาพและทางเคมีนั้นเป็นการบำบัดขั้นต้น และมีประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันและน้ำมันน้อย ดังนั้นน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดทางกายภาพและทางเคมีจึงต้องผ่านการบำบัดด้วยกระบวนการทางชีวภาพเพื่อลดปริมาณไขมัน น้ำมันและสารอินทรีย์ที่ละลายอยู่ในน้ำ (MT&T, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ แสวงหาผลประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษนี้ได้ค้นคว้าเกี่ยวกับวิธีการบำบัดทางชีวภาพโดยการศึกษาและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยสลายไขมันและน้ำมันจากน้ำทิ้งอุตสาหกรรม ผลการศึกษาวิจัยที่ได้จะนำไปใช้ประโยชน์ในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้
2. เพื่อศึกษาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำเสียจากอุตสาหกรรมผลิตปลาทูน่ากระป๋อง
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาสมบัติของน้ำเสียอุตสาหกรรมอาหารผลิตปลาทูน่ากระป๋อง
2. คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส
3. ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) ที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน
2. ทราบแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส
3. เพื่อเป็นแนวทางในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรม
4. เพื่อเป็นแนวทางในการนำเชื้อจุลินทรีย์มาบำบัดน้ำเสียที่มีปริมาณไขมันและน้ำมันสูง

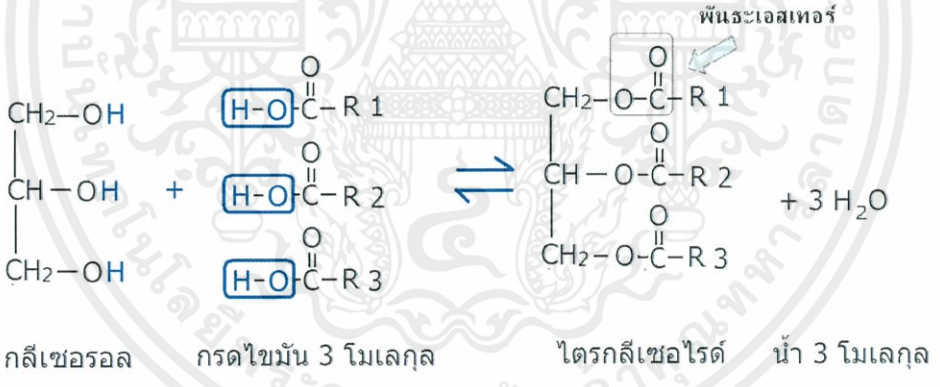
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลิพิด (Lipid)

ลิพิด (lipid)เป็นสารชีวโมเลกุลที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน จัดเป็นสารประเภทเอสเทอร์ชนิดหนึ่ง มีคุณสมบัติทางกายภาพคือไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้ไม่ดี แต่จะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เบนซีน อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เฮกเซน เป็นต้น ทั้งนี้เพราะโครงสร้างของลิพิดมักจะไม่มีขั้ว (nonpolar) หรือมีขั้วน้อยมาก ซึ่งไขมันก็เป็นลิพิดชนิดหนึ่ง ในทางเคมีไขมันคือไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน 3 โมเลกุลกับกลีเซอรอล 1 โมเลกุล โดยไขมันหมายถึงไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นของแข็ง ส่วนน้ำมันหมายถึงไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นของเหลวทั้งไขมันและน้ำมันมีค่าพลังงานเท่ากันน้ำมันที่อิ่มตัวมีค่าพลังงานมากกว่าน้ำมันที่มีพันธะคู่ไตรกลีเซอไรด์สามารถจำแนกได้ตามความอิ่มตัวซึ่งมีทั้งไขมันอิ่มตัว ไขมันไม่อิ่มตัวหนึ่งตำแหน่งและไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (ปิโยรส หงษาชาติ, 2546 ;พจน์ และคณะ, 2555)



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาการเกิดไตรกลีเซอไรด์

ที่มา : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/001001/triglyceride

2.1.1 กรดไขมัน

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ประเภทหนึ่ง มีหมู่คาร์บอกซิล (Carboxylic group, -COOH) ต่ออยู่กับสายไฮโดรคาร์บอน มีสูตรทั่วไปเป็น R-COOH ซึ่งไฮโดรคาร์บอนจะทำให้กรดไขมันไม่ละลายน้ำ ยิ่งจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลยิ่งมากการละลายน้ำยิ่งไม่ดี (อาภัสสรา, 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดไขมันที่พบในพืชและสัตว์ชั้นสูงจะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่อยู่ระหว่าง 14-22 คาร์บอนอะตอม โดยจะพบ C_{16} และ C_{18} มากที่สุด กรดไขมันแบ่งตามโครงสร้างของสายไฮโดรคาร์บอนได้เป็น 2 ชนิด คือกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่ไม่มีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุลพบได้มากในน้ำมันจากสัตว์ น้ำมันมะพร้าวและน้ำมันปาล์ม เช่น กรดบิวทีริก (butyric acid, C4) กรดพาล์มิติ (palmitic acid, C16) และกรดสเตียริก (stearic acid, C18) เป็นต้น และ กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุลตั้งแต่หนึ่งไปจนถึงหลายๆพันธะคู่ พบในถั่วลิสง น้ำมันพืชและในน้ำมันปลา เช่น กรดลิโนเลอิก (linoleic acid, 18:2 $\Delta^{9,12}$, ω-6 fatty acid) และกรดอะแรชิโดนิก (arachidonic acid, 20:4 Δ5,8,11,14 , ω-6 fatty acid) เป็นต้น (พจน์ และคณะ, 2555)

ตารางที่ 2.1 ชื่อโครงสร้างทางเคมี และสัญลักษณ์ของกรดไขมันชนิดต่างๆ

ชื่อสามัญ	ชื่อตามระบบ	โครงสร้างทางเคมี	สัญลักษณ์
กรดลอริก (Lauric acid)	Dodecanoic acid	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	12:0
กรดพาล์มิติก (Palmitic acid)	Hexadecanoic acid	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	16:0
กรดสเตียริก (Stearic acid)	Octadecanoic acid	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	18:0
กรดอะแรซิดิก (Arachidic acid)	Eicosanoic acid	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	20:0
กรดพาล์มิโทเลอิก (Palmitoleic acid)	9-Hexadecenoic acid	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$	16:1
กรดโอเลอิก (Oleic acid)	9-Octadecenoic acid	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	18:1
กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid)	9,12-Octadecadienoic acid	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_2(CH_2)_6COOH$	18:2
กรดอะแรชิโดนิก (Arachidonic acid)	5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_4(CH_2)_2COOH$	20:4

ที่มา: พจน์ และคณะ, 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 เอซิลกลีเซอรอล

เอซิลกลีเซอรอล เป็นเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับกลีเซอรอล ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ และเป็นส่วนประกอบสำคัญของเนื้อเยื่อ พบได้ทั่วไปในไขมันสัตว์เช่น ครีม เนย น้ำมันหมู เป็นต้น และในน้ำมันพืช เช่นในน้ำมันมะพร้าว น้ำมันรำข้าว เป็นต้น แบ่งออกเป็น

1) โมโนและไดเอซิลกลีเซอรอล

โมโนและไดเอซิลกลีเซอรอล หรือโมโนและไดเอซิลกลีเซอไรด์เป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลและกรดไขมันเพียงหนึ่งหรือสองโมเลกุล ตามลำดับ และมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ 2 หมู่ เอซิลกลีเซอรอลทั้งสองไม่ค่อยพบมากในธรรมชาติ แต่จะพบเมื่อไขมันหรือน้ำมันเกิดการไฮโดรไลซิสที่ไม่สมบูรณ์ โดยจะมีประโยชน์ในการนำไปใช้สังเคราะห์หรือดัดแปลงโครงสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ หรือนำโมโนเอซิลกลีเซอรอลใช้เป็นสารอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ยา และเครื่องสำอางชนิดต่างๆ (Rosu*et al.*, 1997)

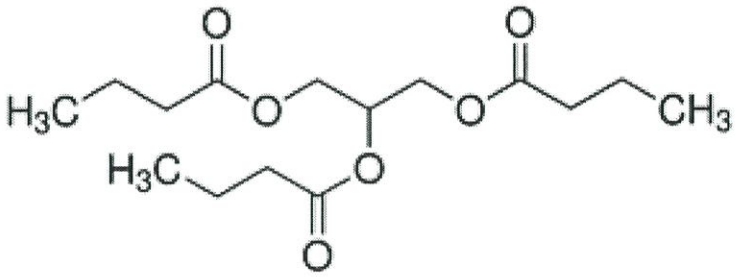
2) ไตรเอซิลกลีเซอรอล

ไตรเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรกลีเซอไรด์ เป็นเอซิลกลีเซอรอลที่พบมากที่สุด ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันที่มีพันธะเอสเทอร์กับหมู่ไฮดรอกซิลทั้งสามหมู่ของกลีเซอรอลถ้าเป็นกรดไขมันชนิดเดียวกันเรียกไตรกลีเซอรอลธรรมดา (simple triacylglycerol) เช่น ไตรปาล์มมิโต-อิลกลีเซอรอล (triplamitoyl glycerol) แต่โดยทั่วไปจะประกอบด้วยกรดไขมันตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป เรียกว่า ไตรเอซิลกลีเซอรอลผสม (mixed triacylglycerol) เช่น1-ปาล์มมิโตอิลไดสเตียโรอิลกลีเซอรอล (1-plamitoyl distearoyl glycerol) (อาภัสสรา, 2537)

2.1.3 ไตรบิวทิริน (tributyrin)

Tributyrin (Glycerol tributyrate หรือ 1,2,3-Tributyrylglycerolหรือ Glyceryltributyrate) เป็นเอสเทอร์ของกรดบิวทิริก 3 โมเลกุลกับ กลีเซอรอล1 โมเลกุล (รูป 2.1) คุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของไตรบิวทิริน(tributyrin)คือ มีลักษณะเป็นของเหลว ใส กลิ่นเหมือนเนยหรือฟรุ๊ตตี้ มีรสขม สูตรโครงสร้าง $C_{15}H_{26}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 302.37 g/mole จุดเดือด 305 ° C (581 ° F) จุดหลอมเหลว -75 ° C (-103 ° F) มีค่าความถ่วงจำเพาะ1.035 สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เอทานอล (ethanol) เบนซีน (benzene) ไดเอทิล อีเทอร์ (diethyl ether) และอะซีโตน (acetone)เป็นต้นละลายได้เล็กน้อยในน้ำร้อน แต่ไม่ละลายในน้ำเย็นซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้ไตรบิวทิริน (tributyrin) เป็นซับสเตรต(substrate)ที่ใช้ในการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส (Alpha,2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



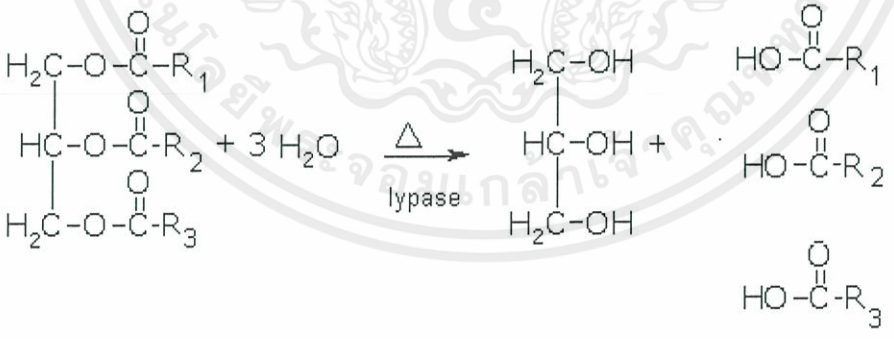
รูปที่2.2 สูตรโครงสร้างของ tributyrin

ที่มา : http://www.exporterlabchemicals.com/msds/AL1886.html

2.2 เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส มีชื่อในระบบ (Systematic name) ว่ากลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerolesterhydrolase) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอลเอซิลไฮโดรเลส (triacylglycerolacylhydrolase) มีรหัสตามระบบ คือ EC 3.1.1.3 จัดอยู่กลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) ที่ประกอบด้วย เอนไซม์โปรติเอส (protease) เอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) และเอนไซม์ฮาโลเพอรอกซิเดส (haloperoxidase) ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) สลายพันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ได้เป็นกลีเซอรอล (glycerol) และกรดไขมันอิสระ (free fatty acid)

ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ที่อยู่ระหว่างส่วนที่ไม่ละลายน้ำและส่วนที่สามารถละลายน้ำได้เอนไซม์ไลเปสจะทำปฏิกิริยาดังกล่าวได้เมื่อไตรกลีเซอไรด์อยู่ในสภาพ oil-water interface (Bornscheuer*et al.*, 2002)



รูปที่ 2.3 การสลายพันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ด้วยเอนไซม์ไลเปส

ที่มา : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/001001/triglyceride

2.2.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

แหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา (Jaeger et al., 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) เอนไซม์ไลเปสจากพืช (Plant lipase)

ไลเปสที่ได้จากพืช พบได้ทั้งในเนื้อเยื่อพืช ผัก ผลไม้และในเมล็ดพืช เช่น ผลปาล์มน้ำมัน เมล็ดข้าวโพด เมล็ดละหุ่ง เมล็ดยางพารา เมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดทานตะวัน มะกอก ข้าวโอ๊ต รำข้าว ข้าวสาลี และข้าวเจ้า เป็นต้น Huang (1984) รายงานว่าโดยธรรมชาติเมล็ดพืช (seed) จะสะสมไขมันไว้ใน lipid-bodies และ glyoxysomes เป็นเนื้อเยื่อที่สามารถพบเอนไซม์ไลเปส ในขณะที่เมล็ดธัญพืช (grain lipase) จะพบได้เอนไซม์ไลเปสได้ในรำ (bran) เช่น รำข้าวเจ้า และรำข้าวสาลี

2) เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ (Animal lipase)

เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากสัตว์ พบได้ทั้งในเนื้อเยื่อสัตว์และอวัยวะต่างๆ เช่นกระเพาะอาหาร ตับอ่อน หัวใจ ไต กล้ามเนื้อและสมอง เป็นต้น เอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน (pancreatic lipase) เป็นชนิดแรกที่พบ โดยมี 2 รูปแบบ คือ ไลเปส-เอ และ ไลเปส-บี ทำหน้าที่เร่งการย่อยสลายโมเลกุลไขมันในระบบย่อยอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเอนไซม์ไลเปสประเภทเอนไซม์เนื้อเยื่อ (tissue lipase)นี้มีบทบาทและมีความสำคัญต่อการนำไปใช้ในการรักษาโรคและในทางการแพทย์จึงมีความพยายามเสาะหาแหล่งเอนไซม์ประเภทนี้จากแหล่งใหม่ๆอยู่เสมอ

3) เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์(Microbial lipase)

เอนไซม์ไลเปสจากพืชถูกพบในเนื้อเยื่อที่ให้พลังงาน (energy tissue) ส่วนไลเปสจากสัตว์มักเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆของเมตตาบอลิซึมของไขมัน (lipid metabolism) ได้แก่ กระบวนการย่อยสลายไขมัน การดูดซึมไขมัน และกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไขมันและโปรตีน (lipoprotein metabolism) ทำให้เกิดความซับซ้อนในการสกัดอันเป็นข้อจำกัดในการนำมาทำเป็นแหล่งเอนไซม์ ด้วยเหตุนี้ไลเปสจากพืชและไลเปสจากสัตว์จึงยังไม่ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลาย ต่างกับจุลินทรีย์โดยเฉพาะรา ยีสต์ และแบคทีเรีย เนื่องจากจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้รวดเร็ว เลี้ยงง่าย ประหยัดพื้นที่ในการผลิต เก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ง่าย และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ได้สูงกว่าเอนไซม์ที่ได้จากพืชและสัตว์

จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสพบได้ในแหล่งต่างๆทางธรรมชาติ เช่น ในน้ำเสียหรือดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหรือไขมัน (GaO และคณะ, 2000; Fungthong, 2001) ในระบบบำบัดน้ำเสียขนาดใหญ่ เช่น activated sludge และน้ำเสียตามบ้านเรือน (Chappe และคณะ, 1995) เมล็ดพืชน้ำมันหรืออาหารที่เน่าเสีย (Sztajer และคณะ, 1988) กองปุ๋ยคอก (Wang และคณะ, 1995) แม้กระทั่งในน้ำพุร้อน (Boonsinthai และ Phutrakul, 1999)

ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ถูกใช้ทางการค้า 129 สายพันธุ์ โดยเป็นเชื้อรา 53 สายพันธุ์ยีสต์ 23 สายพันธุ์และแบคทีเรีย 53 สายพันธุ์ดังตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ทางการค้า

Bacteria	Fungi	Yeast
Achromobacter sp.	*Absidacorymbifera*	*Candida* sp.
A. lipolyticus	*A. hyalospora*	*C. antarcea*
Acinetobacter sp.	*Aspergillus* sp.	*C. auricularia*
A. calcoaceticus	*Arthrobacter* sp.	*C. curvata*
A. pseudoalcaligenes	*Aspergillusawamori*	*C. cylindracea*
Alcaligenes sp.	*A. flavus*	*C. lipolytica*
A. denitrificans	*A. fumigatus*	*C. deformans*
Amylomycesrouxii	*A. nidulans*	*C. foliorum*
Arthrobacter sp.	*A. niger*	*C. humicula*
Bacillus cereus	*A. oryzae*	*C. rugosa*
B. megaterium	*Chaetomiumthermofile*	*C. tsukubaensis*
B. laterosporus	*Coelomyceles*	*Pichia miso*
B. sphereicus	*Fusariumoxysporum*	*Proteus* sp.
B. stearothermophilus	*F. solari*	*S. fragilis*
B. thaiminolyticus	*Geotrichumcandidum*	*S. fibuligera*
B. thermocatenulatus	*Glomusversiforme*	*S. lipolytica*
B. thermolevacons	*Hansenulaanomala*	*S. cerevisae*
Burkholderiacepacia	*Humicolagrisea*	*Schizosaccharomycespombe*
Chromobacterium sp.	*H. insulens*	*Sporotrichum thermophile*
C. chocolatum	*H. lanuginose*	*Talaromyces thermophile*
C. viscosum	*Microthrixpavicella*	*Thielavia minor*
Corynebacterium acnes	*Mucor*sp.	*Torulathermophila*
CrytococcusLaurentii	*Mucorjavanicus*	*Ustilagomaydis*
EntercoccusFaecalis	*Mucorlipolyticus*	
Flavobacteriumarborescens	*Mucormiehei*	
F. ferrugiem	*Mucorpusillus*	
Lactobacillus sp.	*Neurosporasitophila*	
Leishmanisdonovani	*Nocardiaamarae*	
Malbrancheaepulcella	*Penicilliumcrustosum*	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Bacteria	Fungi	Yeast
Micrococcus frendenreichii	*P. camembertii*	
Mycobacterium chelonae	*P. cyclopium*	
Myxococusxantus	*P. roquefortii*	
Propionibacterium acnes	*P. candidum*	
P. granulosum	*P. citrinum*	
Protaminobacteralboflavus	*P. simplicissimum*	
Pseudomonas sp.	*P. solitum*	

ที่มา : Godtfredsen (1990); Pandey และคณะ (1999); Mayordomo และคณะ (2000)

- เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อรา

ราเป็นจุลินทรีย์ประเภทหนึ่งที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น เชื้อ *Rhizopus* sp. ที่คัดได้จากอุตสาหกรรมน้ำมันพืช พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 48 unit/L เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นซับสเตรท (Sztajarและ Maliszewska, 1988) Gluyamovaและ Davranov (1994) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Mucormiehei* พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ทั้งแบบ extracellular และ intracellular เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้กันแพร่หลายในทางการค้าได้แก่ *Mucorjavanicus*, *Humicolalaunginosa*, *Rhizopus*sp.,*Geotrichum* sp. และ *Aspergillus* sp. เป็นต้น

- เอนไซม์ไลเปสจากยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตขึ้น และศึกษาการผลิตจนถึงระดับการค้า เนื่องจากยีสต์ที่ใช้ในการศึกษาไม่ก่อให้เกิดโรคและใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ Ampon และคณะ (1989) และ Padt และคณะ (1992) ได้ศึกษาเชื้อ *Candida rugosa* โดยศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อดังกล่าวโดยศึกษาการเกิดปฏิกิริยาอัลคิลเลชั่นและอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชั่นในตัวทำละลายอินทรีย์ยีสต์ที่สามรถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้กันในทางการค้าได้แก่ *Candida lipolytica, C. antarctica, C. rugosa* และ *C. cylindracea* เป็นต้น

- เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย

เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียมีความสำคัญที่สุดในการวิจัยทางด้านเอนไซม์และทางการค้า เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณมากๆและมีความคงทนต่อความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิสูง และตัวทำละลายอินทรีย์ (Kim และ Oh, 2002) เอนไซม์จากแหล่งนี้มี 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 1 มี 2 ชนิด ชนิดแรกเป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonas aeroginsa* และ *Pseudomonas alcaligenes* เอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 285 โมเลกุล ส่วนชนิดที่สองเป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonasglumae* และ *Pseudomonascepacia* ซึ่งเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 320 โมเลกุล

กลุ่มที่ 2 ได้แก่เอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonasfluorescens* และ *enterobacterium*, *Serratiamarcescens* เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่ากลุ่มแรก และมีขนาดและลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึง (sequence homology) เล็กน้อย ยกเว้น ส่วนที่เป็น N-terminal และลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ใกล้กับบริเวณเร่งซีรีน (active site serine)

กลุ่มที่ 3 และ 4 ได้แก่เอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก*Bacillus* sp. และ*Staphylococcus*เอนไซม์กลุ่มที่3 นี้มีกรดอะมิโน alanine (Ala) เป็นกรดอะมิโนตัวแรกใน consensus pentapeptide sequence (Gly-X-Ser-X-Gly) แทนที่จะเป็น glycine (Gly) แบบเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ (Lee และคณะ, 2001)

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้2รูปแบบคือกับเอนไซม์ที่สร้างขึ้นและทำงานภายในเซลล์โดยทำปฏิกิริยากับสับสเตรทภายในเซลล์ เรียกว่า intracellular enzyme กับเอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แล้วถูกขับออกมาทำงานนอกเซลล์ เรียกว่า extracellular enzyme (นงลักษณ์และปรีชา, 2539) โดยจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ทั้งบนอาหารแข็ง (solid state) และในอาหารเหลว (submerge culture) Pandeyและคณะ (1999) รายงานว่า การผลิตเอน-ไซม์ไลเปสบนอาหารแข็งนั้นดีกว่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว เพราะจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ง่ายเอนไซม์ที่ได้มีปริมาณมากและความเข้มข้นสูง นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคในกระบวนการแยกและเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ง่ายกว่าและทำให้เกิดของเสียที่เป็นของเหลวในปริมาณต่ำ แต่ในปัจจุบันการผลิตไลเปสส่วนใหญ่จะผลิตในอาหารเหลวไม่ว่าจะเป็นการผลิตจากเชื้อรายีสต์ และแบคทีเรีย เพราะสามารถปรับสภาพการเลี้ยง สารอาหาร และปัจจัยต่างๆที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลวได้ง่าย ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ได้แก่ ความเข้มข้นและชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน สภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ และความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการผลิต (Elibol และ Ozer, 2001)

การย่อยสลายไขมันโดยจุลินทรีย์เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์และสภาวะในการเกิดปฏิกิริยา ส่วนใหญ่การย่อยสลายไขมันโดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้น จุลินทรีย์จะมีการสร้างเอนไซม์และหลั่งเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งการย่อยสลายไขมันหรือไตรกลีเซอไรด์โดยเอนไซม์ไลเปสอาจเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์หรือไม่สมบูรณ์ก็ได้

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ

ถ้าการย่อยสลายที่มาสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันและโมโนกลีเซอไรด์หรือไดกลีเซอไรด์ก็เป็นได้ เมื่อไตรกลีเซอไรด์ถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ กลีเซอรอลกับกรดไขมัน ในส่วนของกรดไขมันที่ได้จะเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายภายในเซลล์โดยผ่านวิถีเบต้า-ออกซิเดชั่น (beta-oxidation) จนกระทั่งได้เป็นอะซิทิลโคเอ (acetyl-CoA) และเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle) ต่อไป ส่วนกลีเซอรอลจะย่อยสลายจนกระทั่งเข้าสู่วิธีไกลโคไลซีสได้เป็นฟอสโฟอีนอลไพรูเวท (phosphoenol-pyruvate) และเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไป (Rehmและ Reed, 1981)

2.3อุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋อง

ปลาทูน่าจัดเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเนื้อปลาทูน่านั้นเป็นอาหารที่สามารถทดแทนเนื้อสัตว์ประเภทอื่นได้ มีโปรตีนที่ย่อยง่ายกว่าเนื้อสัตว์ชนิดอื่น ช่วยซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของร่างกาย มีกรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกายและกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดโอเมก้า3 ซึ่งมีความสามารถช่วยลดอัตราการเกิดโรคหลอดเหลือหัวใจและอัมพาต

ปัจจุบันประเทศไทยส่งออกปลาทูน่ากระป๋องมากที่สุดเป็นอันดับ 1 ของโลก แบ่งผลิตภัณฑ์ปลาทูน่ากระป๋องออกเป็น 2 รูปแบบหลัก คือ ปลาทูน่าในน้ำมันพืช (Tuna in oil) และปลาทูน่าในน้ำเกลือ (Tuna in brine) ประเทศไทยมีโรงงานผลิตอาหารทะเลกระป๋องควบคู่กับปลาทูน่ากระป๋องเพื่อการส่งออกจำนวน 29 ราย และที่เป็นโรงงานผลิตปลาทูน่ากระป๋องเพียงอย่างเดียว 24 ราย มีกำลังการผลิตรวม 230,000 ตันต่อปี คิดเป็นร้อยละ 40 ของกำลังการผลิตอาหารทะเลกระป๋องทั้งหมด(กรมการค้าต่างประเทศ,2554)

2.3.1 กระบวนการผลิตปลาทูน่า

การผลิตปลาทูน่าบรรจุกระป๋องมีกระบวนการผลิตในแต่ละขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมวัตถุดิบ (Raw material)

ตรวจสอบคุณภาพทางกายของปลาได้แก่ตาเหงือกผิวหนังความยืดหยุ่นของเนื้อปลาให้มีสภาพที่ดีเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพที่ดีและตรงตามมาตรฐาน

2) การละลาย (Thawing)

วัตถุดิบที่รับมาส่วนใหญ่อยู่ในรูปการแช่เยือกแข็งดังนั้นจำเป็นต้องทำการละลายน้ำแข็งก่อนโดยการทำในบ่อพักปลา ใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง เพื่อต้องการให้อุณหภูมิภายในตัวปลาเท่ากับ 5 °Cในขั้นตอนนี้หากอุณหภูมิของปลาหลังจากผ่านการทำละลายสูงกว่า 5°Cจะทำให้เกิดการเสื่อมเสียของปลาจากจุลินทรีย์และการทำงานของน้ำย่อย

3) การตัดปลา (Butchering)

ก่อนและหลังการควักไส้ของปลาออกควรมีการล้างปลาให้สะอาดเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ผิวของเนื้อปลา ทำการตัดส่วนที่ไม่ต้องการออกได้แก่หัวปลาหางปลาและไส้ปลา ส่วนที่เหลือจากการตัดแต่งจะถูกแยกไว้เพื่อนำไปขายหรือใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) การนึ่งปลา (Per-cooking)

การนึ่งปลาจะต้องใช้ความร้อนจากไอน้ำ เพื่อทำให้ผิวหนังและกระดูกแยกออกจากกล้ามเนื้อ นอกจากนั้นยังเพิ่มความเหนียวและตกตะกอนโปรตีนทำให้สะดวกในขั้นตอนการขูดเนื้อปลาการใช้ความร้อนจะทำให้หม้อนึ่งไอน้ำอุณหภูมิ 95 °C และต้องให้อุณหภูมิบริเวณจุดกึ่งกลางของตัวปลาเท่ากับ 95 °C ทั้งนี้ระยะเวลาการให้ความร้อนจะขึ้นอยู่กับขนาดและชนิดของปลา

5) การลดอุณหภูมิ (Cooling)

ใช้น้ำฉีดพ่นลงไปบนตัวปลา เพื่อให้ปลามีอุณหภูมิลดลง และมีผลทำให้น้ำหนักของปลาลดลงเนื่องจากน้ำระเหยเป็นไอออกจากตัวปลา ทำให้กล้ามเนื้อปลาเหนียวและน้ำมันในตัวปลามารวมตัวอยู่บริเวณผิวหนังปลา

6) การขูดปลา (Cleaning)

เป็นการขูดปลาเพื่อแยกเอาสิ่งที่ไม่ต้องการออก เช่น หนัง เลือด ก้าง ให้เหลือเพียงเนื้อปลา

7) การคัดปลา (Grading)

เป็นการแยกแบ่งระดับปลาโดยอาศัยความสะอาดและสีของเนื้อปลา

8) การบรรจุ (Packing)

เป็นการบรรจุเนื้อปลาด้วยเครื่องจักรหรือมือคนลงในกระป๋องขนาดต่างๆและบรรจุน้ำมันหรือน้ำเกลือลงไป

9) การปิดผนึก(Seaming)

ก่อนทำการปิดผนึกฝาต้องทำการไล่อากาศออกก่อนโดยใช้ไอน้ำทำให้เป็นสุญญากาศ

10) การฆ่าเชื้อ (Sterilizing)

เป็นขั้นตอนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ความดันของไอน้ำอย่างน้อย 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C

11) การหล่อเย็นและการทำให้แห้ง (Cooling and drying)

เพื่อป้องกันความร้อนที่สะสมทำให้เนื้อปลายุ่ยเกิดการเปลี่ยนแปลงรสชาติสีสันและคุณค่าทางอาหารของเนื้อปลารวมทั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิสูงที่เกิดขึ้นหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อดังนั้นจะต้องมีการลดอุณหภูมิกระป๋องลงอย่างรวดเร็วโดยในขณะที่ทำการลดอุณหภูมิจะเกิดเป็นภาวะสุญญากาศภายในกระป๋องซึ่งอาจทำให้ปลากระป๋องเสียได้น้ำที่ใช้ในการลดอุณหภูมิจึงต้องเป็นน้ำสะอาดที่มีการเติมคลอรีนเพื่อฆ่าเชื้อโรคโดยให้มีคลอรีนอิสระประมาณ 5 ppm ทำการลดอุณหภูมิกระป๋องลงจนกระทั่งมีอุณหภูมิประมาณ 35-40 °C เพื่อให้ความร้อนที่เหลืออยู่ทำให้กระป๋องแห้งเองหรือเป่าด้วยพัดลมเพื่อป้องกันการเกิดสนิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12) การปิดฉลากและบรรจุกล่อง (Labeling and packing)

เมื่ออุณหภูมิของกระป๋องลดลงจนเท่ากับอุณหภูมิห้องและแห้งสนิทแล้วหลังจากนั้นจะนำไปปิดฉลากบรรจุภัณฑ์และบรรจุกล่องกระดาษเพื่อการเก็บรักษาและการขนส่งต่อไป (ม.สงขลานครินทร์,2553)

2.3.2 วัสดุเศษเหลือของโรงงานอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋อง

กระบวนการผลิตปลาทูน่าบรรจุกระป๋องจะมีวัสดุเศษเหลือประกอบด้วย น้ำนึ่งปลาทูน่า เศษกระดูก หัว และเครื่องใน เป็นต้น Prasertsan และคณะ (1988) ทำการสำรวจปริมาณวัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล ในจังหวัดสงขลา พบว่าส่วนใหญ่มีการใช้วัตถุดิบสูงถึง 135 ตันต่อวัน และให้ผลผลิตร้อยละ 35 ของปริมาณวัตถุดิบเริ่มต้น ส่วนที่เหลือเป็นวัสดุเศษเหลือที่เป็นของแข็งมีประมาณร้อยละ 25-30 ของวัตถุดิบเริ่มต้น ได้แก่ เศษก้างปลา หัวปลา เครื่องในปลา หนังปลา ซึ่งสามารถส่งขายให้แก่โรงงานปลาป่น เพื่อทำเป็นอาหารสัตว์โดยตรง อีกส่วนหนึ่งคือวัสดุเศษเหลือที่เป็นของเหลวมีประมาณร้อยละ 30-35 ของวัตถุดิบ ได้แก่ เลือดปลา และน้ำนึ่งปลา ซึ่งยังไม่ได้มีการนำกลับมาใช้ประโยชน์ และปล่อยลงสู่ระบบบำบัดน้ำเสีย (อรัญ หันพงศ์กิตติกูล และคณะ,2536)

2.3.3 น้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋อง

น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋องจะมีลักษณะมีสีดำคล้ำ มีก้อนของไขมันขนาดเล็กปนอยู่ มีกลิ่นเหม็น และมีสารจำพวกเกลืออีกด้วยส่วนใหญ่จะมีค่าพีเอชของน้ำเสียค่อนข้างเป็นกลางอยู่ที่ 5.8 – 6.3 และจะมีการสะสมของสารอินทรีย์ปริมาณสูงซึ่งเป็นพวกเศษเนื้อปลา ไขมัน และน้ำมัน ทำให้มีค่าบีโอดีและซีโอดีสูง จากข้อมูลการสำรวจน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋อง (ตารางที่ 2.4) จะเห็นได้ว่ากระบวนการนึ่งปลาจะมีน้ำเสียที่มีค่า BOD(Biochemical Oxygen Demand)เป็นค่าที่แสดงถึงปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำและค่า COD (Chemical Oxygen Demand)ซึ่งเป็นการวัดปริมาณออกซิเจนเทียบเท่า (Oxygen Equivalent) ที่ใช้ในการออกซิไดซ์สารประกอบอินทรีย์ในตัวอย่างอย่างสมบูรณ์ด้วยตัวออกซิไดซ์อย่างแรง (Strong Chemical Oxidant) สูงกว่ากระบวนการอื่นๆ เนื่องจากในน้ำเสียจากกระบวนการนี้มีสารอินทรีย์ต่างๆอยู่ในปริมาณมากซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้ส่วนใหญ่เกิดจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต รวมทั้งค่าปริมาณไขมันและน้ำมันยังมีปริมาณที่มากกว่ากระบวนการอื่นๆ โดยน้ำเสียจากกระบวนผลิตทั้งหมดจะไหลรวมกันลงสู่บ่อบำบัดน้ำเสียบ่อแรกก็คือบ่อดักไขมันทำให้มีการกำจัดไขมันออกไปได้บ้าง แต่ถ้าหากเกิดการสะสมของไขมันเป็นเวลานานจะทำให้ไขมันและน้ำมันที่มีปริมาณมากส่งผลกระทบโดยตรงทางกายภาพ เช่น การบดบังแสง ขวางกั้นการเติมอากาศ อีกทั้งการที่มีค่า Total Kjeldahl Nitrogen (TKN) หรือปริมาณสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่สูง อาจทำให้น้ำเสียขาดออกซิเจนและยากแก่การบำบัด สารอินทรีย์ในน้ำเสียปริมาณสูงที่เกิดจากของเหลวที่ได้จากการนึ่งปลาในอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋อง ถ้ามีการ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้นำไฟล์นี้ไปเผยแพร่ต่อ ไม่ว่าจะเป็นการฝากในเว็บไซต์หรือช่องทางใดๆ

แยกน้ำนึ่งปลาและน้ำที่ใช้เป็นตัวถ่ายเทความร้อนออกจากน้ำเสียรวมแล้วจะพบว่าลักษณะของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตปลาทูน่าจะมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์ลดลง ดังข้อมูลในตารางที่2.3 แสดงลักษณะน้ำเสียจากกระบวนการผลิตปลาทูน่าเมื่อแยกน้ำนึ่งปลาและไม่แยกน้ำนึ่งปลา (พักต์พิมล อึ่งเจริญวิวัฒน์, 2552)

ตารางที่ 2.3 Characteristic of wastewater in tuna canning plant.

wastewater / parameter	Tuna per-cooking water	
	include	exclude
BOD (mg/L)	7,313	5,196
TKN (mg/L)	890	564
TSS (mg/L)	2,233	971
F&G (mg/L)	5,523	5,318

ที่มา: กรมโรงงานอุตสาหกรรม (2537) อ้างโดย พักต์พิมล, 2552

ตารางที่2.4 Characteristic of wastewater at different steps of canned tuna processing.

Parameter	Processes			
	Thawing	Butchering	Pre-cooking	Packing
pH	5.6-7.4	5.1-6.6	5.1-6.3	5.8-6.3
BOD (mg/L)	200-1,800	1,000-5,300	23,000-52,000	1,753
COD (mg/L)	400-3,200	2,400-7,200	41,000-74,000	2,573
F&G (mg/L)	100-5,100	1,000-9,400	4,000-56,000	6,504
TKN (mg/L)	20-250	90-600	4,800-8,200	290

ที่มา: กรมโรงงานอุตสาหกรรม (2537) อ้างโดย พักต์พิมล, 2552

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุวรรณา และคณะ (2540) ได้ศึกษาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อใช้ในการย่อยสลายไขมัน โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง 12 แหล่งในจังหวัดขอนแก่น จากนั้นทำการคัดแยกจุลินทรีย์พบว่าสามารถแยกได้ 221 ไอโซเลท โดยวิธี double layer technique พบว่าเชื้อ 33 ไอโซเลท มีการเปลี่ยนแปลงสี bromocresol purple อย่างรวดเร็วภายในเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์โดยนำมาไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าเชื้อ$1A_{24}$ และ $2C_8$มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยเชื้อสายพันธุ์$1A_{24}$ให้กิจกรรมไลเปสสูงสุดเมื่อเลี้ยงใน 2% sucrose, 0.15% yeast extract, 0.09% K_2HPO_4, 0.06% KH_2PO_4, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,0.5% $CaCO_3$, pH 8ที่อุณหภูมิ 30 °Cความเร็วรอบในการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง ส่วนเชื้อสายพันธุ์ $2C_8$ให้กิจกรรมไลเปสสูงสุดเมื่อเลี้ยงใน 2% dextrose, 0.15% beef extract, 0.09% K_2HPO_4, 0.06% KH_2PO_4, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,0.5% $CaCO_3$, pH 7ที่อุณหภูมิ26 °C ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สุรอรรถ และคณะ(2550) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตะกอนเร่งของโรงงานอุตสาหกรรมอาหารได้แก่ โรงงานเอสแอนด์พี ซินดิเคต จำกัด (มหาชน) โรงงานซีแอนด์เอสโปรดักส์ จำกัด โรงงานผลิตน้ำมันตราโอลีน และโรงงานผลิตน้ำมันตราพาโมลา โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเพิ่มพูน (enrichment culture technique) เป็นวิธคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฐมภูมิสามารถแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลท แยกเป็นเชื้อยีสต์ได้ 5 ไอโซเลท และเชื้อแบคทีเรีย 1 ไอโซเลท เมื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์และประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันพบว่ายีสต์ไอโซเลทSSB-12 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันมากที่สุด ซึ่งมีค่าดัชนีเอนไซม์ 5.00 U/ml กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 98.50 U/ml และเปอร์เซ็นต์การกำจัดไขมันเท่ากับ 85.76 %

นภัสพร (2551)ได้ศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายไขมันจากตัวอย่างดินและน้ำบริเวณรอบโรงงานผลิตปลาส้มโดยทำการคัดเลือกเชื้อโดยใช้อาหาร screening medium (SM)ที่มีไขมันปลาสด 1% สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียได้ 27 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบการย่อยสลาย tributyrinพบว่าไอโซเลท NP4 สามารถย่อยสลาย tributyrin ให้วงใสที่มีความกว้างสูงสุด 20.0 mm เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง *Rhodococcus* sp. TISTR1263 ที่ให้วงใส 11.0mm เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NP4 กับสายพันธุ์อ้างอิง *Rhodococcus* sp. TISTR1263 โดยวิธีไตเตรทมีค่าเท่ากันคือ 55.0 U/mlเมื่อนำมาตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาและทดสอบทางชีวเคมีบางประการพบว่าจัดอยู่ในสกุล*Bacillus*เมื่อทดสอบการย่อยสลายไขมันปลาในน้ำเสียโดยเติม *Bacillus*sp. NP4 และสายพันธุ์อ้างอิง *Rhodococcus* sp. TISTR1263 ลงไปพบว่าในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื่อสามารถย่อยสลายไขมันปลาได้ 40 % ส่วนกลุ่มที่นึ่งและไม่นึ่งฆ่าเชื้อน้ำเสียที่เติม *Bacillus*sp. NP4 และสายพันธุ์อ้างอิง *Rhodococcus* sp. TISTR1263 สามารถย่อยสลายไขมันปลาได้ 7.1% , 64.3%,60%และ20% ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียพบว่า *Bacillus*sp. NP4 สามารถลดปริมาณไขมันได้ 55.6%

พักต์พิมล (2552) ได้ทำการแยกแบคทีเรียทีผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินรอบๆบ่อดักไขมันและน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตปลากระป๋อง โดยใช้อาหารพื้นฐาน (basal medium agar) ที่ประกอบด้วยน้ำนึ่งปลาทูน่า 1% และ rhodamine B 0.001 % พบแบคทีเรียเจริญ 111 ไอโซเลทและเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารที่มี tributyrin 1% พบว่า 42 ไอโซเลทเกิดวงใสรอบโคโลนี โดยเชื้อ GT3(19)มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปลาที่สกัดจากน้ำนึ่งปลาทูน่า 1 % พบว่ามีแบคทีเรีย 11 ไอโซเลทที่มีค่ากิจกรรมในการย่อยสลายสูงสุด โดยอโซเลท EQ3 มีค่าการย่อยสลายสูงที่สุดคือ 15 U/ml และเมื่อนำมาจำแนกสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วย 16S rDNA พบว่ามีความเหมือนกับ*Burkholderia* sp.99% ในการศึกษา *Burkholderia* sp. EQ3 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปลาที่สกัดจากปลาทูน่า 1% เป็นแหล่งคาร์บอน และทริปโตน0.1 % เป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 1.77 U/ml

Bhumibhamon และคณะ(2003) ได้ทำการคัดจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำเสียปนเปื้อนไขมัน 2 แหล่ง สามารถแยกได้ 6 ไอโซเลทเป็นเชื้อแบคทีเรีย 3 ไอโซเลทคือ KLB1, KLB2และKLB3 เป็นเชื้อยีสต์ 3 ไอโซเลทคือ KLY1, KLY2 และKLY3 เมื่อนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์พบว่าไอโซเลท KLB1มีกิจกรรมไลเปสสูงสุด ซึ่งต่อมาได้รับการระบุว่าเป็น *Pseudomonas* sp. เอนไซม์ไลเปสของ*Pseudomonas* sp. KLB1มีการทำงานของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดที่ 50 ^{o}CและpH 9 ถึงแม้ว่าเอนไซม์ไลเปสจะมีความคงทนที่ pH7 และอุณหภูมิ 37 ^{o}C แต่เมื่อนำไปบ่มที่ pH8-10 และอุณหภูมิ 37,50,60 และ70พบว่าเอนไซม์ยังคงเหลือการกิจกรรมคือ76% ที่ pH 10 อุณหภูมิ 70^{o}C และ 76.23%ที่ pH 9 อุณหภูมิ 37^{o}C แสดงให้เห็นถึงเอนไซม์ไลเปสมีความคงทนที่ค่า pH 2 ช่วง ชี้ให้เห็นว่ามีเอนไซม์ไลเปส2 ชนิดใน *Pseudomonas* sp. KLB1 เอนไซม์ไลเปสจะเกิดกิจกรรมได้โดย Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+}, $(NH_4)_2S_2O_3$ และกรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid) แต่ถูกยับยั้งโดย Zn^{2+}. Mn^{2+}, Co^{2+}, KI และ EDTA สำหรับค่า Kmและ Vmax ในการย่อยสลาย tributyrin พบว่าได้ 110.9 mM และ 2.45 mM s^{-1}ในขณะที่การย่อยสลาย palmplein ได้ 1,188.8 mM และ 5.25 mM s^{-1}

Kanrayakrit และคณะ(2007) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำปลา บนอาหารSehgal and Gibbons Complex (SGC)-Tween 80ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 20 ไอโซเลท เมื่อนำไปศึกษากิจกรรมของเอนไซม์พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท PB233 มีกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุดและเมื่อนำไปจำแนกสายพันธุ์และนำไปเทียบลำดับเบส 16S rRNA กับแบคทีเรียอื่นๆพบว่าเป็นเชื้อ *Staphylococcus warneri* ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0-4 Mแต่เจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นเกลือ 0 M แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เป็นพวกชอบเกลือ (halotolerant bacteria)และเมื่อนำแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri*PB233 ไปเพาะเลี้ยงในถังหมักที่มีอาหาร SGC ที่เติมน้ำมันมะกอก 1 % และเกลือโซเดียมคลอไรด์3 M วัดความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด (90.12 U / ml) ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 40 ° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Mafakher และคณะ (2010) ได้ศึกษาการแยกจากยีสต์โรงบำบัดน้ำเสีย เพื่อช่วยลดปริมาณกลีเซอรอล พาราฟิน และน้ำมันดิบจากน้ำเสียอุตสาหกรรมเกษตร ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการคัดแยกยีสต์ได้ 300 ไอโซเลทจากน้ำเสียอุตสาหกรรมเกษตร เมื่อนำไปตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและกรดซิตริกพบว่ามี 2 ไอโซเลทคือ M1 และ M2ที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงสุด คือ11 และ 8.3 U / mlตามลำดับโดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้นและระดับกรดซิตริกมีค่า 27 และ 8 g/L ตามลำดับและเมื่อนำไปจำแนกสายพันธุ์พบว่าเป็นสายพันธุ์ *Yarrowialipolytica*

Daoud และคณะ (2013) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากสิ่งแวดล้อมต่างๆที่มีความเค็มเช่นดินและตะกอนทะเลจากทะเล Chott Eldjerid ประเทศตูนิเซีย น้ำทิ้งจากกระบวนการอุตสาหกรรมปลา เป็นต้น จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CJ3 และเมื่อมาจำแนกสายพันธุ์พบว่ามีความเหมือนกับ *Staphylococcus* sp. ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 5 U/mlเอนไซม์ไลเปสมีความบริสุทธิ์ 24 เท่า โดยวิธีตกตะกอนของแอมโมเนียซัลเฟต และวิธีโครมาโทรกราฟี SephacrylS-200 และได้มวลโมเลกุลของเอนไซม์ไลเปสประมาณ 38 kDa ด้วยวิธี SDS-PAGE และ gel filtrationและวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสประมาณมากที่สุด 802 U/mg โดยใช้ tributyrin เป็นสารตั้งต้นและ 260 U/mg โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้นที่ pH 8 และอุณหภูมิ 45 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ของบริษัท SANYO ประเทศญี่ปุ่น
2. หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) รุ่น Autoclave-325 ของบริษัท Tommy ประเทศญี่ปุ่น
3. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น CENTAUR 2 ของบริษัท SANYO ประเทศญี่ปุ่น
5. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaker Incubator) รุ่น WIS-30 ของบริษัท Daihan Scientific ของประเทศเกาหลี
6. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น 205A ของบริษัท Precisa ประเทศจีน
7. เครื่องวัดพีเอช (pH-meter) รุ่น C860 ของบริษัท Consort ประเทศเบลเยี่ยม
8. ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.1.2 สารเคมี

1. เปปโตน (Peptone) ของบริษัท Srichem ประเทศจีน
2. ยีสต์สกัด (Yeast extract) ของบริษัท HIMEDIA ประเทศอินเดีย
3. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) A.R.Grade ของบริษัท UNIVAR ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) A.R.Grade, ของบริษัท Labsystem ประเทศฟินแลนด์
5. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($Mg\ SO_4 \cdot 7H2O$) A.R.Grade, ของบริษัท UNIVAR ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. Tributyrin A.R.Grade for organic ของบริษัท ACROS ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) A.R.Grade, ของบริษัท Rankem ประเทศอินเดีย
8. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) A.R.Grade, ของบริษัท UNIVAR ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. น้ำมันตับปลา ของบริษัท MEGA LIFE ACESENT ประเทศไทย
10. Tween 80L.R.Grade, ของบริษัท LABCHEM
11. Methyl red A.R.Grade ของบริษัท Fisher Chemical ประเทศอังกฤษ
12. วุ้น (Agar) ของบริษัท BIOMARK ประเทศอังกฤษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. เอทิลแอลกฮอล์ (Ethyl alcohol) A.R.Grade, ของบริษัท Carlo Erba ประเทศฝรั่งเศส

14. ฟีนอล์ฟทาลีน

15. น้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionize water)

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1 ตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อพักน้ำเสียรวม และบ่อดักไขมัน ด้วยวิธีเก็บแบบจ้วง (grab sampling) ใส่ขวดแก้ว โดยเก็บทั้งน้ำเสียและชั้นไขมัน และทำการรักษาสภาพตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2 การวิเคราะห์ลักษณะน้ำตัวอย่าง

วิเคราะห์คุณลักษณะตัวอย่างของน้ำที่ทำการวิเคราะห์ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ซีโอดี บีโอดี ปริมาณไนโตรเจนรวม ไขมันและน้ำมัน (ภาคผนวก ข)

3.2.3 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน

นำอาหาร screening medium (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 180 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหาร screening medium ที่เตรียมไว้เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมงนำ culture ที่ได้มาทำ ten fold serial dilution โดยปิเปตตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ที่เจือจาง 10^{-4} 10^{-5}และ 10^{-6}ทำการ spread plate โดยทำความเจือจางละ 2 ซ้ำ บนอาหารแข็งMethyl red (ภาคผนวก ก) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาทำการ streak plate บนจานอาหารแข็ง Methyl red เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว

3.2.4 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้จากข้อ 3.2.3 มาทำการ streak plate บนอาหารแข็ง tributyrin agar (ภาคผนวก ก) ตรวจดูการเกิดวงใสของโคโลนีที่แยกได้ และทำการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ในอาหารแข็ง tributyrin agar และทำการ streak plate ใหม่ทุกๆ 1 สัปดาห์ ศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยวิธีการย้อมแกรม (ภาคผนวก ข)

3.2.5 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 3.2.4 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเหลว production medium (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 rpm ทำการตรวจนับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยดัดแปลงจากวิธี 6 x 6 drop

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

plate method ของ Chin-Yi Chen และคณะ ในช่วงเวลาดังนี้คือ 0 2 4 6 8 10 24 และ48 ชั่วโมง ตามลำดับ นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลาในหน่วย CFU/ml นำมาพล็อตกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยพล็อตระหว่างค่า log CFU/ml กับ เวลาในหน่วยชั่วโมง

3.2.6 การตรวจวัดความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากข้อ 3.2.4 เขี่ยเชื้อลงในอาหารแข็ง tributyrin agar ด้วยวิธี point inoculation บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และทำการตรวจวัดความกว้างของโคโลนีและวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ ความละเอียด 0.02 mm โดยวัดในชั่วโมงที่ 24 48 และ 72 ของการบ่ม บันทึกค่าความกว้างของโคโลนีและความกว้างของวงใส และนำมาคำนวณในรูปของค่าอัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางส่วนใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี

3.2.7 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ด้วยวิธีวัดวงใส

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 3.2.4 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเหลว production medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตรเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 100 rpm ปิเปต culture ที่ได้มา 1000 ไมโครลิตร โดยเก็บทันทีหลังการเพาะเลี้ยง และเก็บในชั่วโมงที่ 24 และ 48 ตามลำดับ ใส่ลงในหลอดเซนทริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้ กรองผ่านหัวกรอง syringe ขนาด 0.45 ไมครอน นำสารละลายที่ผ่านการกรองวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยใช้วิธี Agar disk diffusion และวิธี Agar diffusion plate ลงบนเพลตที่มีอาหาร tributyrin บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกค่าความกว้างของวงใสที่สังเกตได้ในหน่วย มิลลิเมตร

3.2.8 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ด้วยวิธีไทเทรต

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 3.2.4 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเหลว production medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตรเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 100 rpm วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่เวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยปิเปต culture ที่ได้มาประมาณ 15 มิลลิลิตร ใส่หลอดเซนทริฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสนำมากรองผ่านหัวกรอง syringe ขนาด 0.45 ไมครอน

เตรียม reaction mixture ดังนี้ เติมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร pH 7.3 น้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และ Tributyrin 200 ไมโครลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปั่นกวนเป็นเวลา 2 นาที เติมเอนไซม์ที่ผ่านการกรองปริมาตร 1000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยทำทั้งหมด 3 ขวด ขวดแรกนำไปไทเทรตทันที โดยหยุดปฏิกิริยาด้วย สารละลายเอทานอล ซึ่งเติมฟีนอล์ฟทาลีน เป็นอินดิเคเตอร์และปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยการไทเทรตกับโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M นำ reaction mixture ไปไทเทรตกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M จนถึงจุดยุติ ซึ่งได้สารละลายสีชมพูคงตัวนาน 15 วินาที บันทึกปริมาตรโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ อีก 2 ขวดตั้งทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาต่างกัน คือ 60 นาที และ 24 ชั่วโมง และนำมาไทเทรตหากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

โครงงานพิเศษนี้ทำการศึกษาการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันจากน้ำเสียโรงงานผลิตปลาทูน่ากระป๋อง รวมถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ และวัดการเจริญเติบโตของเชื้อในช่วงเวลาต่างๆพร้อมกับการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียในช่วงเวลาต่างๆกันซึ่งสามารถอธิบายได้ดังนี้

4.1 การศึกษาลักษณะของตัวอย่างน้ำเสีย

ตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ในการคัดแยกจุลินทรีย์ ทำการเก็บตัวอย่างจากบ่อพักน้ำเสียรวมก่อนเข้าระบบบำบัดและบ่อดักไขมันของโรงงานอุตสาหกรรมผลิตปลาทูน่ากระป๋อง ในจังหวัดสมุทรสาคร ซึ่งน้ำเสียจะเกิดจากกิจกรรมในกระบวนการผลิต โดยส่วนใหญ่เกิดจากขั้นตอนการล้างวัตถุดิบ รวมทั้งการทำความสะอาดพื้นและสายการผลิต โดยทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีของตัวอย่างน้ำเสียได้ผลการศึกษาแสดงดังตาราง 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ลักษณะน้ำตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์

ปัจจัยที่ทำการศึกษา	แหล่งเก็บตัวอย่าง	
	บ่อพักน้ำเสียรวม	บ่อดักไขมัน
1. อุณหภูมิ (°C)	30	28
2. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	8.0	8.0
3. ค่าความต้องการออกซิเจนทางเคมี(COD, mg/l)	9,374.93 ± 955.17	14,338.13 ± 779.88
4. ค่าความต้องการออกซิเจนทางชีวเคมี (BOD, mg/l)	5,175.00 ± 21.21	5,130.00 ± 42.43
5. ปริมาณไขมันและน้ำมัน (Oil & Greases, mg/l)	158.00 ± 3.00	202.50 ± 1.50
6. ปริมาณไนโตรเจนรวม(TKN, mg N/l)	402.45 ± 25.30	330.96 ± 35.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.1 พบว่าลักษณะตัวอย่างน้ำเสียมีความสกปรกมากเมื่อเทียบกับค่ามาตรฐานน้ำทิ้งอุตสาหกรรม (กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม 2539) เนื่องจากจุดเก็บตัวอย่างเป็นการเก็บจากน้ำเสียที่ยังไม่ผ่านการบำบัด ดังแสดงจุดเก็บตัวอย่างในรูปที่ 4.1 โดยพบค่าปริมาณไขมันและน้ำมันจากตัวอย่างน้ำในบ่อพักน้ำเสียรวม และบ่อดักไขมันมีค่าสูงถึง 155.0 และ 202.5 mg/l ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเกินจากค่ามาตรฐานน้ำทิ้งของกรมโรงงานอุตสาหกรรมที่กำหนดให้น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมีค่าปริมาณไขมันและน้ำมันไม่เกิน 5 mg/l

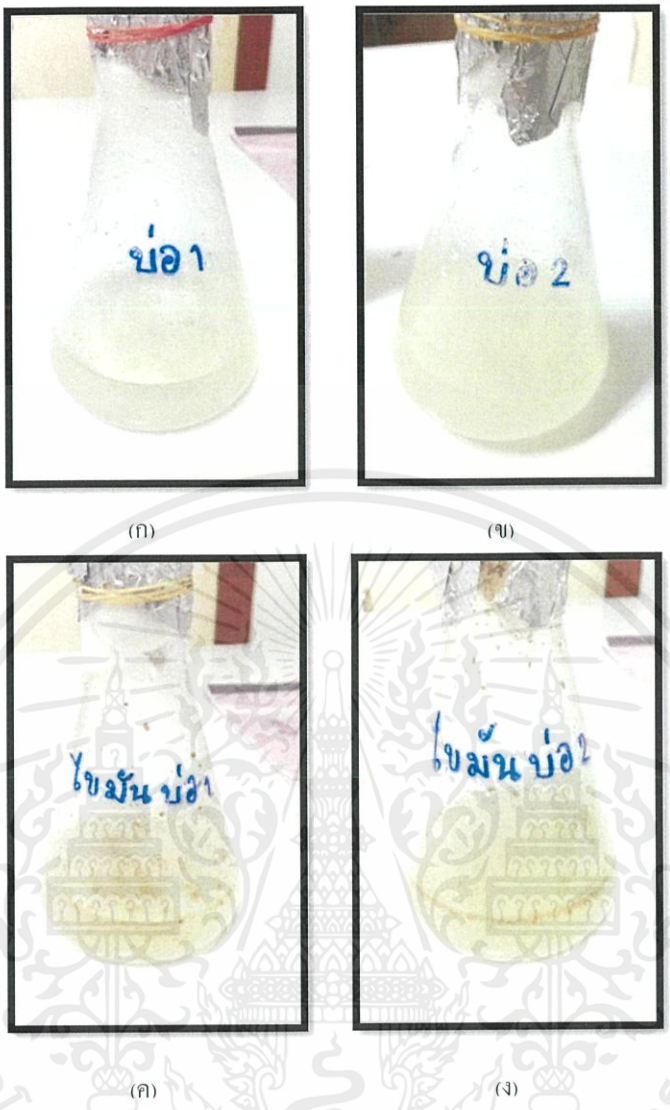
(ก) (ข)

รูปที่ 4.1 ลักษณะน้ำเสียจากแหล่งเก็บตัวอย่างน้ำ โดย (ก) น้ำเสียจากบ่อพักน้ำเสียรวม (ข) น้ำเสียจากบ่อดักไขมัน

4.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมผลิตปลาทูน่ากระป๋อง ทำการศึกษาโดยแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำตัวอย่างและจากชั้นไขมันในบ่อพักน้ำเสียรวม และ บ่อดักไขมัน โดยใช้อาหารเหลวที่มีน้ำมันตับปลาเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ดังรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

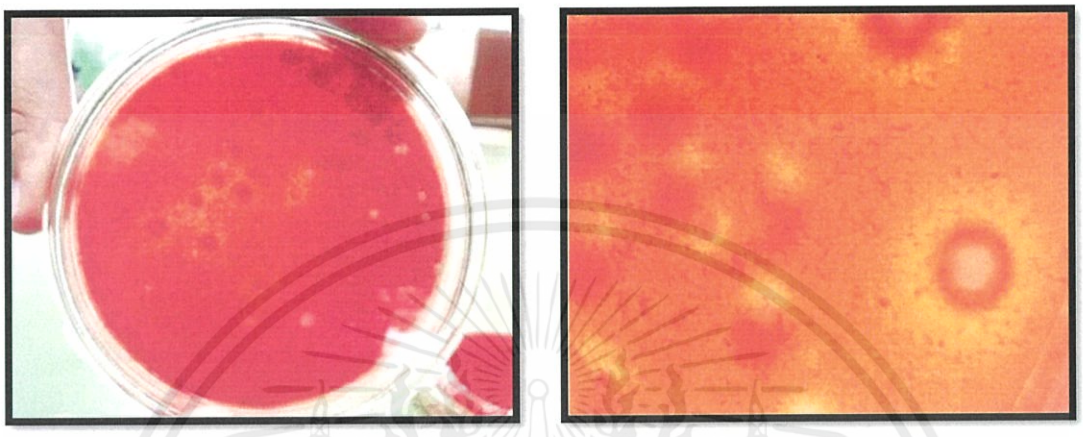
(ค) (ง)

รูปที่ 4.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำตัวอย่างโดยใช้อาหารเหลวที่มีน้ำมันตับปลาเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (ก) ตัวอย่างน้ำจากบ่อพักน้ำเสียรวม (ข) ตัวอย่างน้ำจากบ่อดักไขมัน (ค) ตัวอย่างชั้นไขมันจากบ่อพักน้ำเสียรวม (ง) ตัวอย่างชั้นไขมันจากบ่อดักไขมัน

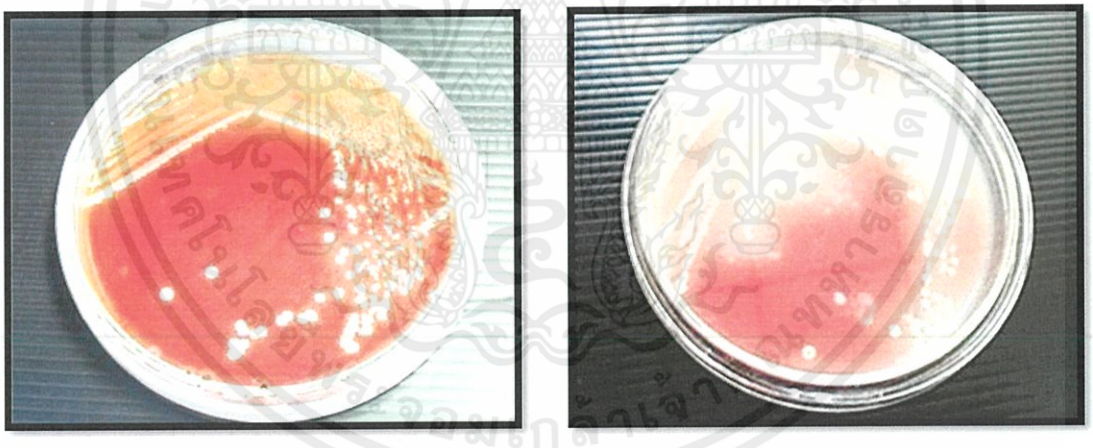
จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ตัวอย่างน้ำและตัวอย่างชั้นไขมันจากบ่อพักน้ำเสียรวมและบ่อดักไขมัน ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันตับปลาเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยใช้วิธี ten fold serial dilution และ spread plate technique ที่ความเจือจางที่ 10^{-4}, 10^{-5}และ 10^{-6} ลงในอาหารแข็ง Methyl red ซึ่งมีรายงานการพบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ดีบนอาหารแข็ง Methyl red โดยพบการเจริญของเชื้อหลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงซึ่งจะเปลี่ยนสีอาหารบริเวณรอบๆโคโลนีจากสีแดงเป็นสีเหลืองอมส้ม ดังรูปที่ 4.3 และทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้วิธี Streak plate ลงบนอาหารแข็ง Methyl red ดังรูปที่ 4.4 พบว่าคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำมันตับปลาเป็นแหล่งอาหารได้ทั้งหมด 22 ไอโซเลท ซึ่งโคโลนีที่สังเกตได้มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยพบเป็นโคโลนีขอบเรียบ สีเหลืองนวล



รูปที่ 4.3 ลักษณะของโคโลนีจากการ spread plate ที่เจริญบนอาหารแข็ง Methyl red



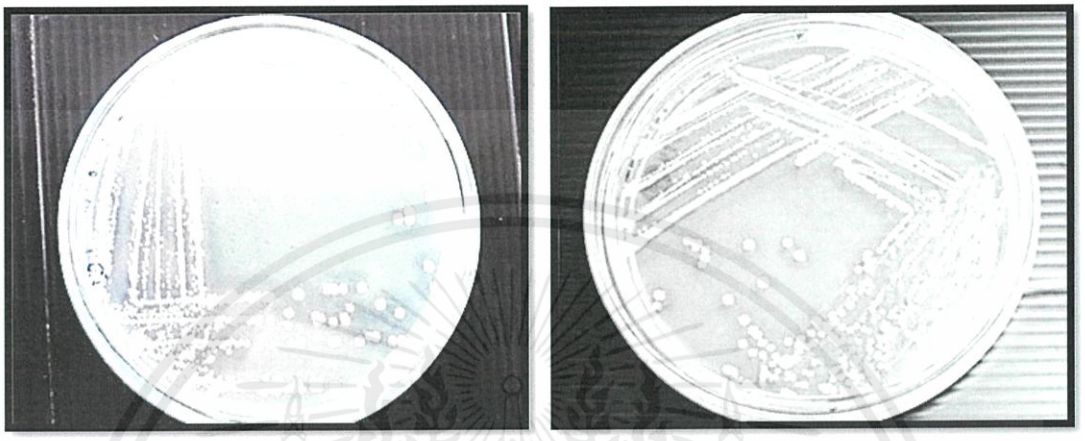
รูปที่ 4.4 การแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี streak plate ลงบนอาหารแข็ง Methyl red

4.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการนำแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหารที่มีน้ำมันตับปลาเป็นแหล่งอาหาร จำนวน 22 ไอโซเลทมาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี streak plate technique โดยใช้อาหารแข็ง tributyrin เป็นอาหารทดสอบ (Handbook of Microbiological Media) โดยพบว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย tributyrin ได้เป็นวงใสภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมงมีทั้งหมด 2 ไอโซเลทคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL TN7 และ KMITL TN9 ดังแสดงในรูปที่ 4.5 โดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงคือ *Staphylococcus aureus* และ *bacillus subtilis* ซึ่งพบการย่อยสลาย tributyrin และเกิดวงใสรอบโคโลนีเช่นเดียวกัน และทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีการย้อมสีแกรม



(ก) (ข)

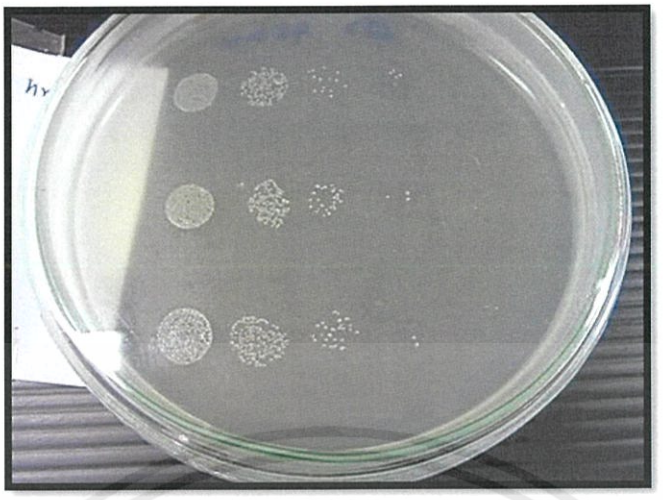
รูปที่ 4.5 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย Tributyrin โดยใช้วิธี streak plate technique โดย (ก) คือเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 7 และ (ข) คือเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 9

จากรูปที่ 4.5 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท KMITL TN7 และ ไอโซเลท KMITL TN9 สามารถย่อยสลาย tributyrin โดยเกิดเป็นวงใสรอบโคโลนี เนื่องจาก tributyrin ประกอบด้วยไตรเอซิลกลีเซอรอลที่มีกรดไขมันสายสั้น (short chain length fatty acid) และไม่ซับซ้อนซึ่งเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตขึ้นจากเซลล์ของแบคทีเรียสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับ Tributyrin ได้ดีส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้อย่างชัดเจน

4.4 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

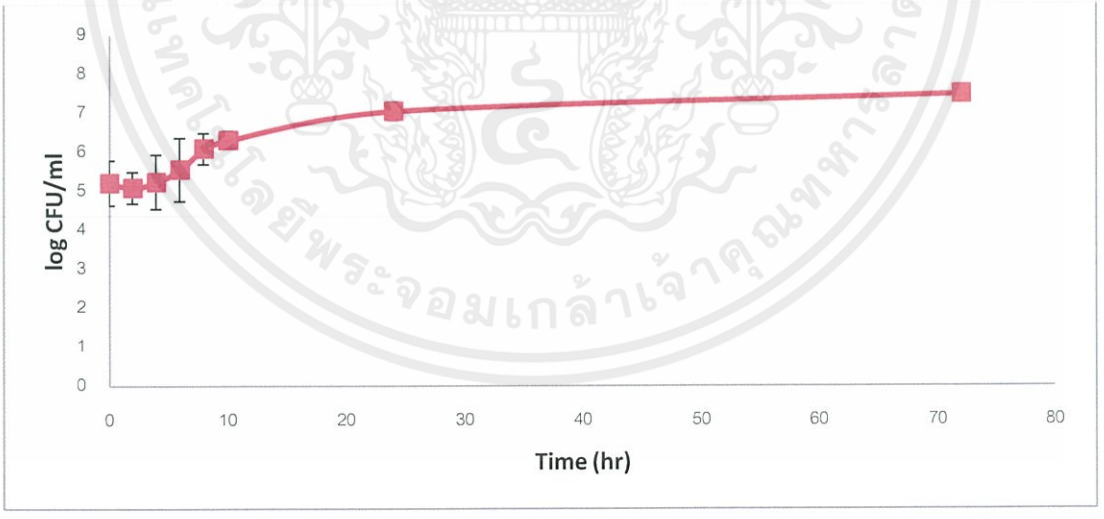
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพในผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้อาหารแข็ง tributyrin agar พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท KMITL TN7 และ KMITL TN9 จึงนำแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทมาวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในช่วงเวลาต่างๆโดยใช้วิธี 6 x 6 drop plate method ซึ่งเป็นการวัดในเชิงปริมาณ โดยนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลททำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว production medium ซึ่งเติมน้ำมันตับปลาเป็นแหล่งอาหาร และเก็บเชื้อแบคทีเรียในแต่ละช่วงเวลามาทำการหยดลงบนอาหารแข็ง tributyrin agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจนับจำนวนแบคทีเรียดังรูปที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



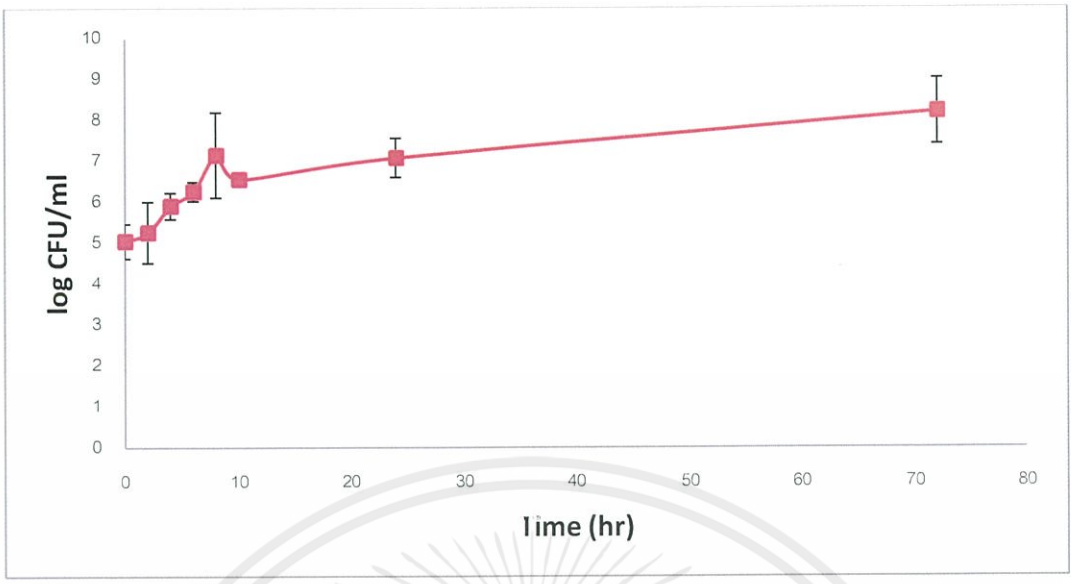
รูปที่ 4.6 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ช่วงเวลา 0 2 4 6 8 10 24 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับโดยใช้วิธี 6 x 6 drop plate method

จากรูปที่ 4.6 ทำการนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในหน่วย CFU/ml. จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลาจะถูกนำมาพล็อตกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยทำการพล็อตระหว่างค่า Logarithms ของ CFU/ml กับเวลา ดังรูปที่ 4.7 และ 4.8



รูปที่ 4.7b การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท KMITL TN7 ในช่วงเวลา10 2 4 6 8 10 24 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

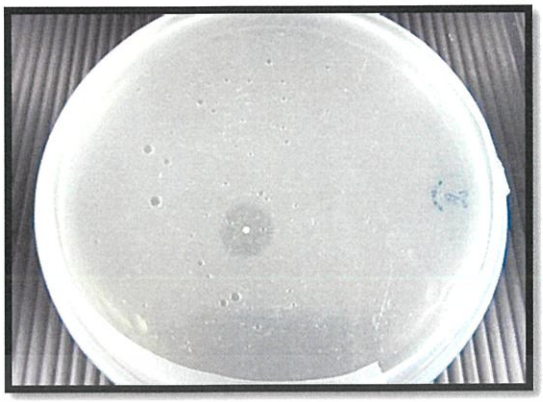


รูปที่ 4.8 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท KMITL TN9 ในช่วงเวลา 0 2 4 6 8 10 24 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ

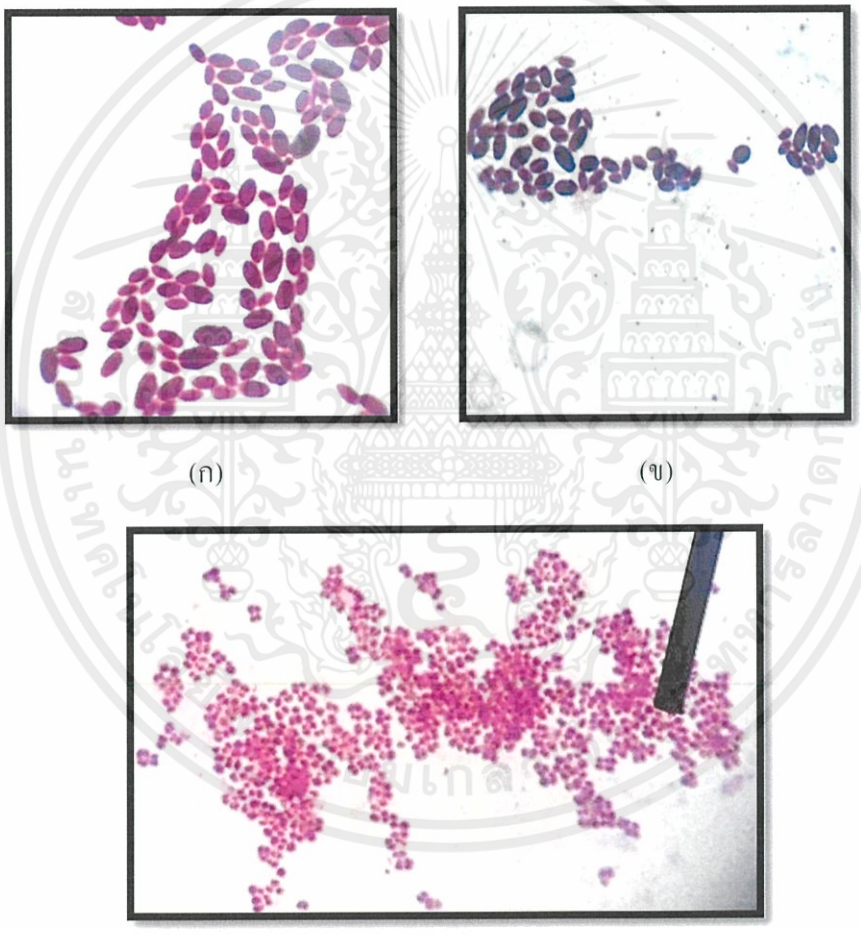
จากรูปที่ 4.7 และ 4.8 แสดงช่วงเวลาในการเจริญเติบโตของเชื้อ ไอโซเลท KMITL TN 7 และ ไอโซเลท KMITL TN 9 โดยพบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทมีช่วงเวลาในการเจริญเติบโตสูงที่สุดคือ ชั่วโมงที่ 24 และมีการเจริญเติบโตคงที่จนถึง ชั่วโมงที่ 72 โดยแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 10 (exponential phase) และพบการเพิ่มจำนวนอย่างคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 72 ของการเจริญเติบโต (stationary phase)

นอกจากนี้ยังพบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งเกิดขึ้นในระหว่างการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อซึ่งมีความสามารถในการย่อย tributyrin โดยพบวงใสรอบโคโลนีเกิดขึ้นบนอาหารแข็ง tributyrin agar ที่มีขนาดของวงใสเป็นบริเวณกว้าง ดังรูปที่ 4.9 จึงทำการแยกเชื้อลงบนอาหารแข็ง โดยใช้ชื่อว่า ไอโซเลท KMITL CT10 และทำการศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียโดยการย้อมสีแกรมซึ่งพบว่าเชื้อไอโซเลท KMITL CT10 มีลักษณะแตกต่างกับไอโซเลท KMITL TN 7 และ KMITL TN 9 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสีย ดังรูปที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท KMITL CT10 ที่พบระหว่างการทดลอง



(ก) (ข)

(ค)

รูปที่ 4.10 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียจากการย้อมแกรม (ก) ไอโซเลท KMITL TN7 (ข) ไอโซเลท KMITL TN9 (ค) ไอโซเลท KMITL CT10

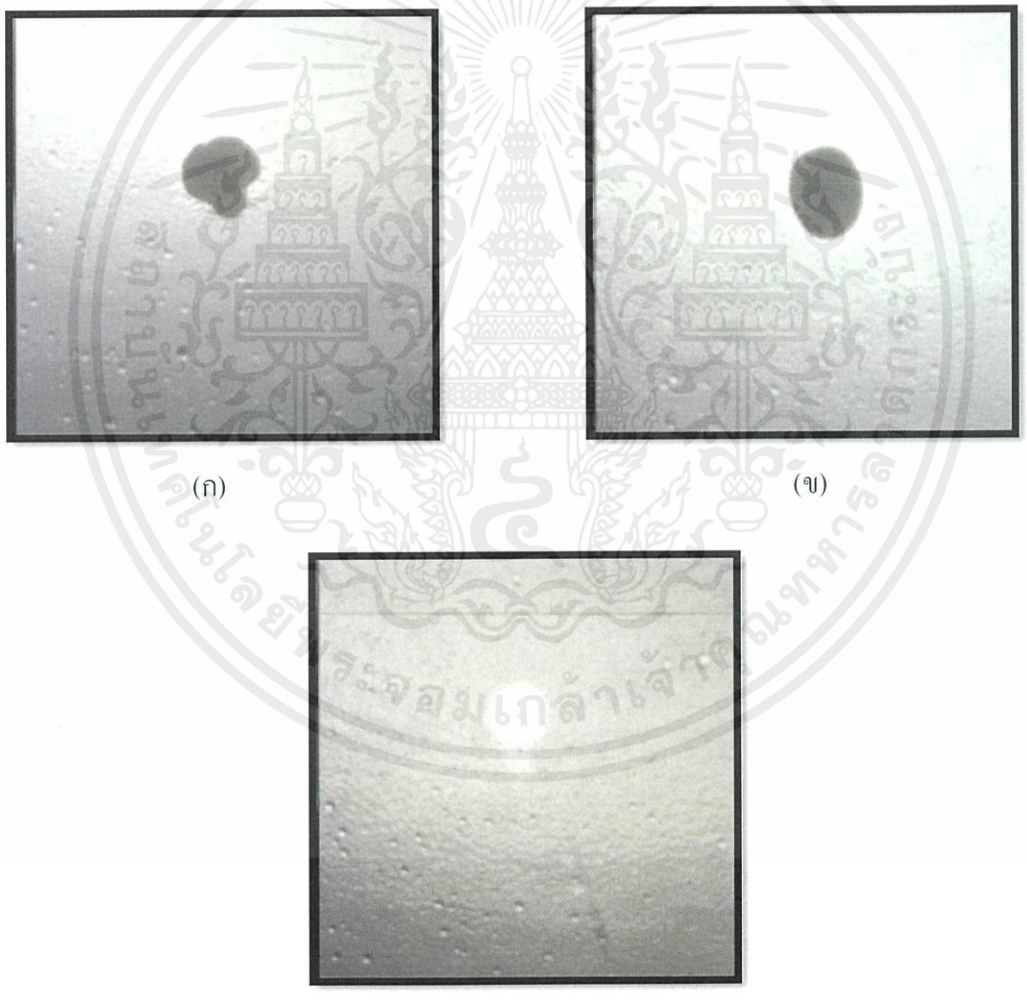
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.10 พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท KMITL TN 7 และ KMITL TN 9 มีความสามารถย้อมติดสี crystal violet และมีรูปร่างรียาวซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลท KMITL CT10 มีความสามารถย้อมติดสี Salfanin และมีรูปร่างกลมอยู่ติดกันเป็นพวงองุ่น จึงจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

4.5 การตรวจวัดความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลทคือ KMITL TN7 KMITL TN9 และ KMITL CT 10 มาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารแข็ง tributyrin agar เปรียบเทียบกับเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งมีรายงานว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้วิธี point inoculation และสังเกตผลจากการเกิดวงใสรอบๆ โคโลนีที่มีการเจริญ (รูปที่ 4.11) ในช่วงเวลาที่ต่างกันคือ 24 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับพบว่าค่าอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีแสดงดังตารางที่ 4.2



(ก) (ข)

(ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.11 ส่วนใสที่เกิดจากการย่อยสลาย Tributyrin โดยเชื้อ (ก) ไอโซเลท KMITL TN7 (ข) ไอโซเลท KMITL TN9 (ค) ไอโซเลท KMITL CT10 ที่เวลา 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.2 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางส่วนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารแข็ง tributyrin agar ในเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

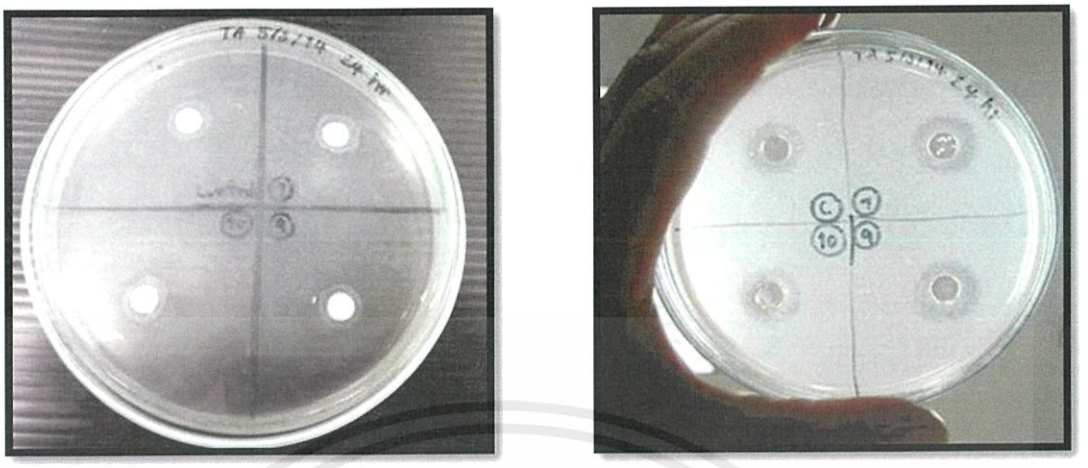
ไอโซเลท	อัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)		
	ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)		
	24	48	72
Bacillus subtilis	1.05	1.05	1.05
7	1.20	1.29	1.30
9	1.26	1.32	1.34
10	4.35	5.15	6.89

จากตารางที่ 4.2 พบว่า เชื้อไอโซเลท KMITL TN7 และ KMITL TN9 มีความสามารถในการย่อยสลาย tributyrin agar ตามระยะเวลาบ่มที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่าอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 ของการบ่ม คือ 1.30 และ 1.34 ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลท KMITL CT10 มีค่าอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในชั่วโมงที่ 72 สูงถึง 6.89 เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะกับสับสเตรทที่แตกต่างกัน เช่น *Acinetobacter radioresistens* CMC1 จะจำเพาะกับสับสเตรทที่เป็นกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวที่มีไฮโดรคาร์บอนสายยาว (long chain fatty acid) และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginisa* YS-7 จะจำเพาะกับกรดโอเลอิก (oleic acid) มากกว่าไตรโอเลอิน (triolein) (ทรัพย์ทวี. 2544)

4.6 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ด้วยวิธีวัดวงใส

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลทคือ KMITL TN7 KMITL TN9 และ KMITL CT10 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว production medium และทำการแยกส่วนใสของสารละลายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงและผ่านการกรอง ซึ่งส่วนใสที่แยกได้คือเอนไซม์ที่แบคทีเรียผลิตออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) โดยนำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยวิธี Agar disk diffusion และวิธี Agar diffusion plate มีลักษณะดังรูปที่ 4.12 (ก) และ 4.12 (ข) ตามลำดับ ทำการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้น ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

รูปที่ 4.12 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยวิธี Agar disk diffusion (ก) และวิธี Agar diffusion plate (ข)

ตารางที่ 4.3 ค่าความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่วัดได้จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Agar disk diffusion และวิธี Agar diffusion plate

วิธีวิเคราะห์	เวลาในการเก็บส่วนใส (ชั่วโมง)	ความกว้างของวงใส (มิลลิเมตร)			
		ชื่อไอโซเลท			
		ชุดควบคุม	KMITL TN 7	KMITL TN 9	KMITL CT 10
Agar disk diffusion	0	6.00	8.00	9.00	6.00
	24	10.00	12.00	12.00	12.00
	48	10.00	11.00	10.00	11.00
Agar diffusion plate	0	10.00	13.00	14.00	15.50
	24	13.00	14.00	14.00	14.00
	48	13.00	14.00	13.00	13.00

จากตารางที่ 4.3 พบว่า ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเจริญของเชื้อในอาหาร production medium เพิ่มขึ้นจาก 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Agar diffusion plate ให้วงใสกว้างสุดที่15.50 มิลลิเมตร และวิธี Agar disk diffusion ให้วงใสกว้างสุดที่ 12.00 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาในชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะพบว่ามีวงใสเกิดขึ้น ซึ่งอาจเกิดจาก tween 80 ที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟน์เออร์ในอาหารเหลวซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม และส่งผลให้เกิดวงใสที่สังเกตได้บนอาหารแข็งไตรบิวทีริน

4.7 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ด้วยวิธีไทเทรต

จากการทดลองเก็บส่วนใสของสารละลายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท คือ KMITL TN7 KMITL TN9 และ KMITL CT10 ในอาหาร production medium ซึ่งคือเอนไซม์ที่แบคทีเรียผลิตออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เก็บส่วนใสในช่วงเวลาการเจริญเติบโตที่ต่างกันคือ 0 24 48 และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีไทเทรตกับเอทิลแอลกอฮอล์ โดยใช้สับสเตรทคือ tributyrin และทิ้งให้เอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยากับสับสเตรทในช่วงเวลาต่างกันคือ 0 30 และ 60 นาที และ 24 ชั่วโมง ซึ่งได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการไทเทรตเพื่อวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์

เวลาในการเก็บส่วนใส (ชั่วโมง)	เวลาในการทำปฏิกิริยา (ชั่วโมง)	ปริมาตรที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)			
		ชื่อไอโซเลท			
		ชุดควบคุม	KMITL TN7	KMITL TN9	KMITL CT10
0	0	1.60	1.80	1.60	1.70
	0.5	1.60	1.70	1.70	1.70
	1.0	1.60	1.50	1.70	1.70
	24.0	3.35	2.70	4.00	3.60
24	0	1.50	1.60	1.70	1.55
	0.5	1.50	1.70	1.60	1.50
	1.0	1.50	1.70	1.70	1.50
	24.0	3.75	4.40	4.30	2.85
48	0	1.40	1.75	1.60	1.45
	0.5	1.40	1.70	1.70	1.50
	1.0	1.50	1.80	1.70	1.60
	24.0	4.70	4.55	4.60	3.85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.4 พบว่าปริมาตรเอทิลแอลกอฮอล์ที่ใช้ไทเทรตในชุดควบคุม มีค่าใกล้เคียงกับปริมาตรเอทิลแอลกอฮอล์ที่ใช้ไทเทรตกับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทคือ KMITL TN7 KMITL TN9 และ KMITL CT10 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสไม่มากพอที่จะสามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีการไทเทรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

โครงงานพิเศษนี้เป็นการศึกษาการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันจากน้ำเสียโรงงานผลิตปลาทูน่ากระป๋อง รวมถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อจุลลินทรีย์ที่แยกได้ และวัดการเจริญเติบโตของเชื้อในช่วงเวลาต่างๆพร้อมกับการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียในช่วงเวลาต่างๆกัน สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมผลิตปลาทูน่ากระป๋องโดยใช้อาหารเหลวที่มีน้ำมันตับปลาเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน และใช้วิธี ten fold serial dilution และทำการ spread plate ลงในอาหารแข็ง Methyl red เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าได้แบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำมันตับปลาเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ทั้งหมด 22 ไอโซเลท จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วย tributyrin agar เป็นอาหารทดสอบ พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย tributyrin ได้เป็นวงใสภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมงมีทั้งหมด 2 ไอโซเลท คือ KMITL TN7 และ KMITL TN9ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ช่วงเวลาในการเจริญเติบโต และกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่แบคทีเรียผลิตขึ้น

2. การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในช่วงเวลาต่างๆโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันตับปลาเป็นแหล่งอาหาร และทำการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียในแต่ละช่วงเวลาโดยดัดแปลงวิธี 6 x 6 drop plate method พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท KMITL TN7 และ KMITL TN9 มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนอย่างคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 72 นอกจากนี้ยังพบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท KMITL CT10 ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย tributyrin agar ได้เป็นวงกว้าง และหลังจากการศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท KMITL TN7 และ KMITL TN9 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ในขณะที่ KMITL 10 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ

3. การนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลททำการตรวจวัดความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้วิธี point inoculation ลงบนอาหาร tributyrin agar และวัดความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในรูปของอัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท KMITL TN7 KMITL TN9 และ KMITL CT10 มีค่าอัตราส่วนสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 ของการบ่ม คือ 1.30 1.34 และ 6.89 ตามลำดับ

4. การวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยการวัดวงใส โดยใช้วิธี Agar disk diffusion และวิธี Agar diffusion plate ซึ่งใช้เอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเจริญของเชื้อในอาหารเหลว เพิ่มขึ้นจาก 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยวิธี Agar diffusion plate ให้วงใสกว้างสุดที่ 15.50 มิลลิเมตร และวิธี Agar disk diffusion ให้วงใสกว้างสุดที่ 12.00 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังตรวจพบชุดควบคุมเกิดวงใสบนอาหาร tributyrin agar เช่นกันซึ่งอาจเกิดจาก tween 80 ที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟน์เออร์ในอาหารเหลว ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม และส่งผลให้เกิดวงใสที่สังเกตได้บนอาหารแข็งไตรบิวทีริน

5. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีไทเทรตกับเอทิลแอลกอฮอล์ โดยใช้สับสเตรทคือ tributyrin พบว่าปริมาตรเอทิลแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการไทเทรตในชุดควบคุม และปริมาตรเอทิลแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการไทเทรตเอนไซม์ มีปริมาตรใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทที่คัดแยกได้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสไม่มากพอที่จะสามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีการไทเทรต

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การตรวจวัดความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์โดยใช้วิธี point inoculation เป็นเพียงวิธีเบื้องต้น ควรศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม

2. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสควรศึกษาเทียบกับสับสเตรทตัวอื่นคู่กับ tributyrin เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะกอก เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมการค้าต่างประเทศ. 2554. **ปลาทูน่ากระป๋อง**. [Online]. เข้าถึงได้จาก http://www.dft.go.th/Portals/0/ContentManagement/Document_Mod785/ปลาทูน่ากระป๋องไตรมาส2-54@25541128-1436112211.pdf สืบค้น 1 มีนาคม 2557

กิจจา จิตรภิรมย์ และ ปธานิน แสงอรุณ.2555.**การตรวจหาแบคทีเรียย่อยไขมันจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม.** วารสารสาธารณสุขศาสตร์. คณะสาธารณสุขศาสตร์และเทคโนโลยีสุขภาพ วิทยาลัยนครราชสีมา วิทยาคาร กรุงเทพฯ. 42, 3-18.

ทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง. 2544. **การผลิตจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันสูง.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2539. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 76.

นภัสพร พันธุ์ทอง. 2551. **การสลายไขมันจากกระบวนการผลิตปลาส้มโดยแบคทีเรียที่สลายลิพิดและการประยุกต์เพื่อการบำบัดน้ำเสีย.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปิโยรส หงษาชาติ. 2546. **การใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในการเพิ่มกรดไอโคซะเพนทาอิโนอิคและกรดโดโคเฮกซะอิโนอิคจากน้ำมันปลา.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัญฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พจน์ ศรีบุญเหลือ, พัชรี บุญศิริ, ชฎามาศ พินิจสุนทร และ เปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์. 2555. **ตำราชีวเคมี**. พิมพ์ครั้งที่ 6. ขอนแก่น: คลังนานา

พักต์พิมล อึ่งเจริญวิวัฒน์. 2552. **การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียจากโรงงานผลิตปลากระป๋องและการประยุกต์ใช้.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัญฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2553. **อุตสาหกรรมแปรรูปทูน่ากระป๋อง.** [Online]. เข้าถึงได้จาก http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/4652/6/ch2.pdf สืบค้น 1 มีนาคม 2557

สุรอรรถ ศุภจัตุรส, วีระสิทธิ์ กัลยากฤต, วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา และ ศุภพงษ์ ภูวพัฒนะพันธุ์. **การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากตะกอนเร่งของโรงงาน อุตสาหกรรม.** หน้า 712-718. ใน.เอกสารการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุวรรณา เนียมสนิท, ประสาท โพธิ์นิ่มแดง, สุรศักดิ์ ศิริพรอดุลศิลป์, งามนิจ นนทโส, พล สัณห์ มหาขันธ์ และ นิยม กำลังดี. 2540. **การคัดเลือกจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไขมัน**. วรสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2(1):1-9

สุวัฒน์ศักดิ์ ด่านศักดิ์ดา. 2551. **การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในการกำจัดไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียของโรงงานปลาส้ม.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี และ ปิยะรัตน์ ธนโกเศศ. 2536. **การเลี้ยงยีสต์ในน้ำนึ่งปลาทูน่าหลังการแยกโปรตีนและไขมัน**. รายงานโครงงานวิจัย. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลังสงขลานครินทร์.

อาภัสรา ชมิดท์. 2537. **ชีวเคมี**. กรุงเทพฯ:เค.ยู.เพลส์.187-217

Alpha chemika. 2008. **Glycerol Tributyrate (for Biochemistry) (Tributyrin) MSDS**. [Online]. Available: http://www.exporterlabchemicals.com/msds/AL1886.html. สืบค้น 1 มีนาคม 2557

Atlas,R.M. 2010. **Handbook of Microbiological Media**

Chen,C.Y., Nace,G.W. and Irwin,P.L. 2003. **A 6×6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of Campylobacter jejuni, Listeria monocytogenes, and Escherichia coli.** Journal of Microbiological. 55, 475– 479.

Ampon, A., A.B. Salleh, W.M.Z.W. Yunus, C.N.A. Razak and M. Basri. 1991. Reductive alkylation of lipase. **Enzyme Microb. Technol**. 13:597-601.

Bhumibhamon, O. Jinda, J and Fungthong, S. 2003. "Isolation and Characterization of *Pseudomonas* sp.

Boonsinthai, B. and S. Phutrakul. 1999. "Effect of metal ions, inhibitor and denaturants on extracellular lipase from there thermophile isolates and their clones." **J. Sci. Fac. CMU**. 26:1-11.

Bornscheuer, U. T. 2002. "Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis." **FEMS Microbiol.** Rev. 26:73-81

Cappe, P., Mourey, A. and Kilbertus, G. 1994. "Variation of lipolytic activity in the genus *Acinetobactor* sp. J." **Gen. Appl. Microbiol**. 4:133-144.

Elibol, M. and D. Ozer. 2000. "Lipase production by immubilised *Rhizopus arrhizus*". **Process Biochem**. 36: 219-223.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fungthong, S. 2001. "Production of lipase-production microorganisms for high fat wastewater treatment." M.S. Thesis, Kasetsart University.

GaO, X.-G., Shu-Gui. CaO,and K.-C. Zhang.2000. "Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain".**Enzyme Microb.Technol**.27:74-82.

Godtfredsen, S.E. 1990. "Microbial Lipases." 255-274. In C. T. K. William M. Fogarty. **Microbial Enzymes and Biotechnology**, 2 ed. New York: Elsevier Science.

Gulyamova, K.A. and K.D. Davranov. 1994. "Effect of cellure condition on production of extra and intracellular lipase by the fungus *Mocor michei*". **Appl. Biochem. Microbiol**. 30(2): 524-526.

Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Heuvel, M. and Misset, O. 1994. "Bacterial lipases". **FEMS Microbiol.** Rev. 15:29-63.

Kanlayakrit, W. and Boonpan, A. 2007. "Screening of Halophilic Lipase-Producing Bacteria and Characterization of Enzyme for Fish Sauce Quality Improvement." **Kasetsart J. (Nat. Sci.).** 41 : 576 – 585.

Kim, I., and T-K., Oh. 2002. "Characterization of an alkaline lipase from *Proteus valgaris* K80 and the DNA sequence of the encoding gene". **Biotechnol**.346-349.

KLB1 Lipase from High Fat Wastewater " **Kasetsart J. (Nat. Sci.).** 37 : 176 – 185

Ladan, M. Maryam, M. Farshad, D. Iraj, N. Hamid, Z.-E. and Giti, E. 2010. "Isolation of lipase and citric acid producing yeasts form argo-industrial wastewater." **New Biotechnology**. Vol.27. 337-340.

Lee, D-W, H.-W.Kim ., K-W. Lee, B-C. Kim, E-A. Choe, H-S. Lee, D-S. Kim, Y-R. Pyun.2001. "Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1". **Enzyme Microb. Technol**. 29:363-371.

Lobna, D. Jannet, K. Madiha, B. A. Raida, J. Rim, B.Tahar, Mei. Youssef, G. Yassine, B. A. and Ahmed, A. 2013. "Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase." **International Journal of Biological Macromolecules**. 57:232– 237.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Noormohamadi, R., Tabandeh, F., Shariati, P.and Otadi, M. 2013. **Characterization of a lipase from a newly isolated *Pseudomonas* sp.** Iranial journal of microbiology. 5, 422-227

Padt, A.V., J.J.W. Sewalt., S.M.I. Agoston and K.V. Riet. 1992. "*Candida rugosa* lipase stability during acylglycerol systhesis. **Enzyme Microb. Technol**. 14: 802-812.

Pandey, A., S. Benjamin, C. R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger, and V.T. Soccol. 1999. "The realm Of microbial lipases in biotechnology". **Biotechnol. Appl. Biochem**. 29:119-131.

Prasertsan, P. and Choojit, W. 1988. "Problem and solution of the occurrence of red colour in wastewater of seafood processing plant". **Songklanakarin J. Sci.Technol.** 10:439-446.

Rehm, H. J. and Reed, G. 1984. **Biotechnology**. Vol I. pp.157-158. Verlag Chemic, Weinheim.

Rosu, R., Uozaki, Y., Iwasaki, Y. and Yamane, T. 1997. "Repeated use of lactic acid with straight-chain alcohols". **J. Am. Oil Chem.** Soc. 82:881-885.

Samad, M.Y.A., Razak, C.N.A., Salleh, A.B., Yunus,W.M.Z.W., Ampon, K. and Basri, M. 1989. **A plate assay for primary screening of lipase activity.** Journal of Microbiological. 9, 51- 56

Sztajer, H, H.Lunsdorf, H. Erdmann, U. Menge, and R.D. Schmid. 1988. "The effect of culture conditions on lipolytic productivity of microorganism". **Biotechnol**. Lett. 10:199-204.

Veerapagu, M. Narayanan, S., Ponmurugan,K. and Jeya,K.R. 2013. **Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oill spilled soil.** Asian journal of pharmaceutical and clinical research. 6, 62-27

Wang, Y., K. C. Srivastava, G. J shen, and H. Y. Wang.1995. "Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic Bacillus strain, A30-1 (ATCC 53841)". **J. Ferment. Bioeng**.79:433-438.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน

ก.1 Screening medium (เสาวนีย์, 2550)

น้ำมันตับปลา	10.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	0.5	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตรปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ทำให้ปลอดเชื้อโดยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อใช้นำมาแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ ขวดละ 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำมันตับปลา 1 กรัม ในสารละลาย 100 มิลลิลิตร

ก.2 อาหารแข็ง Methyl red (ดัดแปลงจากวิธีของ Chigusa และคณะ 1996)

น้ำมันตับปลา	10	มิลลิลิตร
Yeast extracts	0.3	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5.0	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3	กรัม
Tween 80	0.5	มิลลิลิตร
Methyl red	0.64	กรัม
Agar	20	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ทำให้ปลอดเชื้อโดยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทลงในจานเพาะเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3 อาหารแข็ง Tributyrin Agar (TA)

Agar	15.0	กรัม
Tributyrin (glyceryltributyrate)	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extracts	3.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตรปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 ± 0.2 ทำให้ปลอดเชื้อโดยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทลงในจานเพาะเชื้อ

ก.4 อาหารเหลว production medium

Peptone	2.0	กรัม
$NH_4H_2PO_4$	1.0	กรัม
NaCl	2.5	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.4	กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.4	กรัม
น้ำมันตับปลา	2.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตรปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 เติม tween 80 1-2 หยด เป็นอิมัลซิไฟน์เออร์ ทำให้ปลอดเชื้อโดยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์น้ำตัวอย่างและการศึกษารูปร่างของแบคทีเรีย

ข.1 ค่าความต้องการออกซิเจนทางเคมี (Chemical oxygen demand , COD) ด้วยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด

อุปกรณ์

1. หลอดแก้วขนาด 16 x 100 มิลลิเมตร
2. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 150 ± 2 องศาเซียลเซียส

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตสำหรับย่อยสลาย 0.1 นอร์มอล
2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่เติมซิลเวอร์ซัลเฟต
3. สารละลายมาตรฐานไอร์ออน (II) แอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.05 นอร์มอล ทำการหาความเข้มข้นที่แน่นอนกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตก่อนใช้งาน
4. สารละลายเฟอโรอีนอินดิเคเตอร์
5. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (KHP)

วิธีการทดลอง

เติมตัวอย่างน้ำและสารเคมีปริมาตรดังตาราง ข.1 ปิดฝาหลอดย่อยให้สนิท กลับหลอดไปมาหลายๆครั้งเพื่อให้สารเข้ากันดี นำหลอดทดสอบใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลานในหลอดย่อยลงในขวดรูปชมพู่ ติมเฟอโรอีนอินดิเคเตอร์ ใส่แท่งแม่เหล็กสำหรับกวน กวนอย่างเร็วบนเครื่องกวนแม่เหล็ก นำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน FAS ที่จุดยุติเปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสีน้ำตาลปนแดง ทำชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank และใช้ KHP เป็นสารมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.1 ปริมาตรสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ ซีโอดี

ขนาดหลอดย่อย (mm)	ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (ml)	ปริมาตร $K_2Cr_2O_7$ (ml)	ปริมาตร H_2SO_4	ปริมาตรรวม (ml)
16 x 100	2.5	1.5	3.5	7.5

ข.2 ค่าความต้องการออกซิเจนทางชีวเคมี (Biochemical oxygen demand, BOD)

อุปกรณ์

1. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
2. เครื่องเติมอากาศ
3. ตู้บ่ม
4. ขวดบีโอดีพร้อมฝาปิดขนาด 300 มิลลิลิตร
5. กระบอกตวงขนาด 1000 มิลลิลิตร
6. แท่งแก้วสำหรับเจือจางน้ำตัวอย่าง

สารเคมี

1. แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl)
2. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
3. บัฟเฟอร์ฟอสเฟต
4. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)
5. กลูโคสกลูตามิก
6. โซเดียมไทโอซัลเฟต
7. น้ำตัวอย่างที่ใช้เจือจาง

นำน้ำกลั่นมาแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 20±1 องศาเซลเซียส และปรับ pH เป็นกลาง ปรับคุณภาพให้เหมาะกับการดำรงชีวิตของจุลชีพ โดยเติมสารละลายอาหารฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ,แมกนีเซียมซัลเฟต,แคลเซียมคลอไรด์ และเฟอริกคลอไรด์ อย่างละ1 มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

8. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
9. โซเดียมไอโอไดน์ (NaI)
10. โซเดียมเอไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. สารละลายอัลคาไลน์ ไอโอไดน์ เอไซด์

ละลายโซเดียมไฮรอกไซด์ 500 กรัม โซเดียมไอโอไดน์ 135 กรัม ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเจือจางให้มีปริมาตร 950 มิลลิลิตร และค่อยๆเติมสารละลายโซเดียมเอไซด์ 40 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนได้ 1 ลิตร

12. แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)

13. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 98%

วิธีการทดลอง

1. กรณีที่น้ำตัวอย่างมีความสกปรกมากต้องทำการเจือจางอย่างน้อย 3 ความเข้มข้น โดยเลือกความเข้มข้นที่ต้องการ และความเข้มข้นที่น้อยกว่าและมากกว่าอีกอย่างละ 1 ความเข้มข้น ดังตาราง ข.2

ตาราง ข.2 การเลือกเจือจางน้ำตัวอย่างสำหรับหาค่าบีโอดี

Using percent mixtures	
% Dilution	Range of BOD mg/L
0.01	50,000 – 70,000
0.02	10,000 – 35,000
0.05	4,000 – 14,000
0.1	2,000 – 7,000
0.2	1,000 – 3,500
0.5	400 – 1,400
1.0	200 – 700
2.0	100 – 350
5.0	40 – 140
10.0	20 – 70
20.0	10 – 35
50.0	4 – 14
100.0	0 - 7

2. ปิเปตสารละลาย $MnSO_4$ 2 มิลลิลิตร และสารละลายอัลคาไลน์ ไอโอไดน์ โซเดียมเอไซด์ 2 มิลลิลิตร โดยทำการเติมใต้ผิวน้ำ ปิดจุกและเขย่าขวดหลายๆครั้ง ทิ้งไว้จนเกิดการตกตะกอน จึงทำการเขย่าอีกครั้งเขย่าขึ้นลง จนไอโอดีนกระจายตัวจนทั่วและตะกอนละลายหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ปิเปตน้ำตัวอย่าง 203 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่ และไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตเข้มข้น 0.025 นอร์มอลโดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์

การคำนวณค่าบีโอดี

$$BOD = \frac{DO_0 - DO_5}{P}$$

เมื่อ DO_0 คือ ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำตัวอย่างที่วัดหลังเจือจาง

DO_5 คือ ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำตัวอย่างที่วัดหลังจากบ่มเป็นเวลา 5 วัน

P คือ สัดส่วนการเจือจางน้ำ

ข.3 ปริมาณไขมันและน้ำมัน (FOG)

อุปกรณ์

1. กรวยแยก
2. ถ้วยระเหย
3. เครื่องอังไอน้ำ
4. กระดาษกรองเบอร์ 40
5. กรวยกรอง
6. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก
2. เฮกเซน
3. โซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ

วิธีการทดลอง

1. ตวงน้ำตัวอย่าง 500 มิลลิลิตร ใส่กรวยแยก เติมเฮกเซน 15 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้จนสารละลายเกิดการแยกชั้น

2. ถ่ายชั้นน้ำลงในบีกเกอร์เพื่อสกัดซ้ำ และถ่ายชั้นเฮกเซนลงบนถ้วยระเหย (ที่ทำการชั่งน้ำหนักแล้ว, B) ผ่านกระดาษกรองที่มีโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจาน้ำ

เอกสารนี้ [illegible] ได้รับอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำถ้วยระเหยไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และทำการชั่งน้ำหนักถ้วยระเหย(A)

วิธีการคำนวณ

$$\text{ไขมันและน้ำมัน (mg/L)} = \frac{(B-A)x10^6}{V}$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักถ้วยระเหยก่อนอบ

B คือ น้ำหนักถ้วยระเหยหลังอบ

V คือ ปริมาตรน้ำตัวอย่าง

ข.4 ปริมาณไนโตรเจนรวม (TKN)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดเครื่องย่อยสลาย (Digestion apparatus) ประกอบด้วยขวด Kjeldahl ขนาด 800 มิลลิลิตร และเตาให้ความร้อน (heating mental) ที่ให้ความร้อนขนาด 300-400 °C
2. ชุดเครื่องกลั่นหาแอมโมเนีย
3. ขวดวัดปริมาตร
4. ปิเปต
5. กระบอกตวง
6. ขวดรูปชมพู่

สารเคมี

1. น้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย
2. สารละลายอินดิเคเตอร์ผสม (Mixed indicator solution)

-สารละลายเมธิลเรด 200 มิลลิกรัมในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% หรือในไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร

- สารละลายเมธีลีนบูล 100 มิลลิกรัมในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% หรือในไอโซ-โพรพิลแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร

- นำสารละลายทั้งสองมาผสมกัน สารละลายนี้เก็บไว้ไม่เกิน 1 เดือน

3. สารละลายกรดบอริกที่เติมอินดิเคเตอร์ (indicating boric acid solution)

- ละลายกรดบอริก (H_3BO_3) 20 กรัม ในน้ำกลั่นเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ผสม 10 มิลลิลิตร เจือจางให้เป็น 1ลิตร ไม่ควรเก็บเกิน 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ (Borate buffer solution)

- เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัลจำนวน 88 มิลลิลิตร ลงในสารละลายโซเดียมเทตระบอเรต 0.025 โมลาร์ (เตรียมจาก $Na_2B_4O_7.10H_2O$ 9.5 กรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตร) ปริมาณ 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเจือจางให้เป็น 1 ลิตร

5. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอร์มัล

- ก่อนใช้ควรไทเทรตหาความเข้มข้นที่แน่นนอนกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต โดยเตรียมจากสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 1 นอร์มัล มา 20 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ 1ลิตรด้วยน้ำกลั่น

6. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4)

7. สารโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)

8. สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO4)

- ชั่งสารคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO4) จำนวน 25.1150 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1ลิตร

9.สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์-โซเดียมไทโอซัลเฟต (Sodium hydroxide-sodium thiosulfate reagent)

- ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 กรัมและโซเดียมไทโอซัลเฟต 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1ลิตร

10.สารละลาย Glutamic acid

- อบสาร Glutamic acid ที่อุณหภูมิ 103 – 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง (desiccators) ชั่งสารมา 1.0000 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1ลิตร สารละลายนี้เก็บไว้ในตู้เย็นได้นาน 3 สัปดาห์

11.สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 1 นอร์มัล

- นำสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นมา 28 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

12.สารโซเดียมคาร์บอเนต Na_2CO_3

การเทียบมาตรฐานสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 N

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต โดยอบสารโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ที่ 250°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ชั่งสารมา0.2500 กรัม เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้เก็บได้นาน 1 สัปดาห์

2. นำสารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนตที่เตรียมได้มา 10 มิลลิลิตร เจือจางให้เป็น 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เติมสารละลายกรดบอริกที่เติมอินดิเคเตอร์ (indicating boric acid solution) 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 N

การทดลอง

1. ใส่ Pumic Stone 1 ช้อนตักสารขนาดใหญ่ลงในขวด Kjeldahl ขนาด 800 มิลลิลิตร แล้วเติมโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 6.7 กรัม

2. เลือกตัวอย่างน้ำเสีย (ขึ้นกับปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจนที่คาดว่าปนเปื้อนในน้ำเสีย)

Organic-N ในน้ำเสีย (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ขนาดตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
0-1	500
1-10	250
10-20	100
20-50	50
50-100	25

3. กรณีที่ใช้น้ำตัวอย่าง 25-50 มิลลิลิตร ให้เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO4) 10 มิลลิลิตร

5. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) 10 มิลลิลิตร เขย่าให้สารเข้ากัน

6. นำไปย่อยสลายโดยการนำไปต้มให้เหลือปริมาตรประมาณ 10-20 มิลลิลิตร เมื่อนำระเหยออกไปแล้วจะเกิดควันขาวขุ่นให้ต้มต่อไปอีก 30 นาที ตัวอย่างที่มีสีหรือขุ่นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนหรือใส จึงปิดเตาทิ้งให้เย็น

7. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร

8. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์-โซเดียมไทโอซัลเฟต (Sodium hydroxide-sodium thiosulfate reagant) จำนวน 50 มิลลิลิตร ปิดปากด้วยจุกยางและยังไม่เขย่าขวดจากนั้นนำไปต่อกับเครื่องกลั่น

9. นำขวด Kjeldahl ที่มีตัวอย่างไปประกอบกับชุดกลั่น แกว่งขวดให้สารละลายเข้ากัน ทำการกลั่นโดยเก็บน้ำส่วนที่กลั่นได้อย่างน้อย 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีสารละลายกรดบอริกที่เติมอินดิเคเตอร์ (indicating boric acid solution) 50 มิลลิลิตร ปริมาตรรวมได้ 250 มิลลิลิตร และให้ปลายของแท่งแก้วที่นำน้ำที่กลั่นจุ่มอยู่ในสารละลายกรดบอริกที่เติมอินดิเคเตอร์

10. นำส่วนที่กลั่นได้ไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 N เมื่อถึงจุดยุติจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอ่อน โดยใช้น้ำกลั่น 200 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายกรดบอริกที่เติมอินดิเคเตอร์ (indicating boric acid solution) 50 มิลลิลิตร เป็นตัวเทียบสีจุดยุติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11.ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นแทนน้ำตัวอย่างและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำทุกขั้นตอน

ข.5 การศึกษารูปร่างของแบคทีเรียโดยการย้อมสี

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. สไลด์ลวดเขี่ยเชื้อ
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. กระดาษเช็ดเลนส์
5. ปากคีบ
6. ตะแกรงรองสไลด์

สารเคมี

1. สีย้อม Crystal violet
2. สีย้อม Safranin
3. แอลกอฮอล์ 95%
4. น้ำยาแกรมไอโอดีน

วิธีทำ

1. หยดสี Crystal violet ลงบนสไลด์ให้ท่วมรอยสเมียร์ของเชื้อแบคทีเรีย ทิ้งไว้ 1นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำยาแกรมไอโอดีน

2. หยดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำยาแกรมไอโอดีนด้วยน้ำและล้างอีกครั้งด้วยแอลกอฮอล์ จนน้ำยาที่ล้างไม่มีสีติด

3. ย้อมทับด้วยสี Safranin ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ ปล่อยให้สไลด์แห้งแล้วตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ขยาย 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง

ค.1 ผลค่าความต้องการออกซิเจนทางเคมี (Chemical oxygen demand, COD) ด้วยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด

ตาราง ค.1 ปริมาณ FAS ที่ใช้ในการไทเทรตค่าความต้องการออกซิเจนทางเคมี

ตัวอย่างน้ำ	ครั้งที่	ปริมาตร FAS ที่ใช้ (มิลลิลิตร)	ปริมาณ COD (มิลลิกรัม/ลิตร)	ค่า COD เฉลี่ย	ค่า SD
Blank	1	1.40	-	-	-
ขวด 1	1	1.10	9926.4	9374.93	995.17
	2	1.15	8272.0		
	3	1.10	9926.4		
ขวด 2	1	0.90	14889.6	14338.13	779.89
	2	1.00	13235.2		
	3	0.95	14889.6		

ตัวอย่างการคำนวณ ขวด 1 ครั้งที่ 1

$$\text{COD (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{(1.4 - 1.1)\text{x}0.1034\text{x}8000}{2.5}$$

= 99.264 มิลลิกรัมต่อลิตร (เจือจาง 100 เท่า)

= 9926.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.2 ผลค่าความต้องการออกซิเจนทางชีวเคมี (Biochemical oxygen demand, BOD)

ตาราง ค.2 ค่า DO เริ่มต้น และ ค่า DO เมื่อบ่มเป็นเวลา 5 วันของตัวอย่าง

ตัวอย่าง	สัดส่วนเจือเจือจาง	DO_0 (mg/l)	DO_5 (mg/l)		BOD (mg/l)		ค่าเฉลี่ย	ค่า SD
			ขวด 1	ขวด 2	ขวด 1	ขวด 2		
Blank	-	8.3	1.90	2.00	6.40	6.30	6.35	0.070711
Glucose -Glutamic	6.0	8.70	0.60	0.70	405.00	400.00	402.5	3.535534
บ่อ 1	0.2	8.85	0.90	1.00	11,925.00	11,775.00	11,850.00	106.066
	0.5	8.75	0.10	0.15	5,190.00	5,160.00	5,175.00	21.2132
	1.0	8.80	-	-	-	-	-	-
บ่อ 2	0.2	8.25	1.0	1.20	10,875.00	10,575.00	10,725.00	212.132
	0.5	8.80	0.2	0.30	5,160.00	5,100.00	5,130.00	42.42641
	1.0	8.65	-	-	-	-	-	-

ตัวอย่างการคำนวน

จากสูตร $BOD\ (mg\ O_2/l) = DO_0 - DO_5/P$; P คือ สัดส่วนที่ใช้เจือจาง

(บ่อ 1; 0.5/300) $= 8.75 - 0.10 / (0.5/300)$

$= 5,190.00\ mg\ O_2/l$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.3 ปริมาณไขมันและน้ำมัน (FOG)

ตาราง ค.3 น้ำหนักชามระเหยก่อนอบและหลังอบ

ตัวอย่าง	น้ำหนักก่อนอบ (mg)	น้ำหนักหลังอบ (mg)	ปริมาณไขมันและน้ำมัน (mg/L)	ค่าเฉลี่ย	S.D.
แบลงค์	55.6089	55.6105	8.00	-	-
น้ำบ่อ 1	63.8746	63.9056	155.00	158.00	3.00
	59.4325	59.4629	152.00		
	56.2029	56.2345	158.00		
น้ำบ่อ 2	54.6332	54.6737	202.50	202.50	1.50
	59.8431	59.8839	204.00		
	54.5643	54.6045	201.00		

ตัวอย่างการคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมันและน้ำมัน (mg/L)} = \frac{(B-A)*10^6}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง}}$$

$$= \frac{(63.9056 - 63.8746)*10^6}{200}$$

$$= 155.00 \text{ mg/L}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.4 ผลปริมาณไนโตรเจนรวม (TKN)

ตาราง ค.4 การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 N

ครั้งที่	ปริมาตรเริ่มต้น (ml)	ปริมาตรไตเตรทสุดท้าย (ml)	ปริมาตรที่ใช้ (ml)
1	0.00	21.20	21.20
2	21.20	42.30	21.10
3	0.00	21.20	21.20
			เฉลี่ย 21.17

การคำนวณ

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร มีโซเดียมคาร์บอเนต 0.2503 กรัม

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร มีโซเดียมคาร์บอเนต $\frac{0.2503 * 1000}{100}$ = 2.5030 กรัม

ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 N = $\frac{A * B}{53 * \text{ปริมาตรของ } H_2SO_4}$

$$= \frac{2.5030 * 10.0}{53 * 21.17}$$

$$= 0.0223 \text{ N}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค.5 ผลการไทเทรตหาปริมาณไนโตรเจนรวมโดยใช้กรดซัลฟิวริก 0.02 N

ตัวอย่าง	ปริมาตรเริ่มต้น (ml)	ปริมาตรสิ้นสุด (ml)	ปริมาตรที่ใช้ (ml)	ค่า TKN	ค่า SD
แบลงค์	0.00	0.10	0.10	-	-
น้ำบ่อ1	0.10	38.50	38.40	428.96	25.30143
	0.00	33.90	33.90	378.56	
	0.00	35.80	35.80	399.84	
น้ำบ่อ2	0.00	29.70	29.70	331.52	35.56331
	0.00	26.45	26.45	295.12	
	0.00	32.80	32.80	366.24	

ตัวอย่างการคำนวณ

จากสูตร TKNของน้ำบ่อ 1 (mg N/L) $= \frac{(A*B)*280}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (ml)}}$

$= \frac{(38.40 - 0.10)*280}{25}$

$= 428.96$ mg N/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้