บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. ขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 300 ml
2. โหลแก้วขนาด 8 ลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA)

เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งไฟฟ้า 0.001 g / HF-400
2. เครื่องชั่งไฟฟ้า 0.0001 g / HR-200
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อเพิ่มความดัน (Autoclave) (SANYO-MLS-3750)
4. เตาอบ (Hot Air Oven)
5. Refrigerated Centrifuge (3k-18 Sigma)
6. เครื่องบ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า INNOVA 4340
7. UV/VIS Spectrophotometer/ GBC CINTRA 40
8. Peristaltic Pump (EYELA-MP-3N, TOKYO RIKAKIKAI CO,LTD)
9. Air Pump
10. Rotameter

สารเคมี

1. Na_2CO_3
2. Sodium Potassium Tartrate
3. $CuSO_4.5H_2O$
4. NaOH
5. Folin-Ciocalteu Reagent

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6. Bovine Serum Albumin
7. Anhydrous Na_2SO_4
8. $NaHCO_3$
9. Ammonium Molybdate
10. H_2SO_4
11. D-Glucose
12. KCr_2O_7
13. K_2HPO_4
14. NH_4Cl
15. $(NH_4)_2 SO_4$

ยีสต์

1. *Saccharomyces cerevisiae* (S1) แยกจากยีสต์ขนมปังเครื่องหมายการค้า Fermipan
2. *Saccharomyces cerevisiae* (S2) แยกจากยีสต์ขนมปังไม่มีเครื่องหมายการค้าที่ซื้อมาจากร้านขายอุปกรณ์ทำเบเกอรี่
3. *Candida utilis* CBS 1517 (รหัส y-32) จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
4. *Candida utilis* ATCC 9226 (รหัส y-46) จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
5. ยีสต์ที่แยกได้จากน้ำเสียจากโรงงานผลไม้กระป๋องอาหารสยาม (W1) ซึ่งทำการแยกในห้องปฏิบัติการ BS 5206 อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา

น้ำเสีย

น้ำเสียที่ใช้ในการศึกษาได้จากกระบวนการผลิตผลไม้กระป๋องของโรงงานแห่งหนึ่งในจังหวัดชลบุรี ซึ่งโรงงานแห่งนี้มีการผลิตผลไม้กระป๋อง 4 ประเภท ได้แก่

1. Tropical Fruit Cocktail มีส่วนประกอบเป็นผลไม้หลาย ๆ ชนิดในแต่ละกระป๋อง เช่น สับปะรด แตงโม กล้วย เงาะ มะม่วง ลิ้นจี่
2. Single Fruit Pack เป็นผลไม้ในน้ำเชื่อมที่มีเพียงชนิดเดียวใน 1 กระป๋อง เช่น เงาะ สับปะรด มะม่วง ลิ้นจี่ และเงาะสอดไส้สับปะรด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. Pineapple Retail Pack ซึ่งจะเป็นสับปะรดกระป๋องชนิดต่าง ๆ เช่น ชนิดแว่น ชนิดชิ้น และชนิดบดละเอียด

4. น้ำสับปะรดกระป๋อง เป็นน้ำสับปะรดคั้น และน้ำสับปะรดเข้มข้น

เก็บน้ำเสียจากโรงงานไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำมาใช้ทดลองให้นำมาวางทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง

การวิเคราะห์น้ำเสียก่อนการทดลอง ดังนี้ (วิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข)

1. ซีโอดี
2. พีเอช
3. น้ำตาลรีดิวซ์
4. สารแขวนลอย (Suspended Solid)
5. สารทั้งหมด (Total Solid)

การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถลดค่าซีโอดีในน้ำเสียได้ดี

1. การเตรียมหัวเชื้อ

เพาะยีสต์แต่ละสายพันธุ์ 1 ลูป ลงในฟลาสก์ที่มีน้ำเสีย 50 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และเจือจางให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5

2. การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถลดค่าซีโอดีในน้ำเสียได้ดี

นำยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่ได้จากการเตรียมหัวเชื้อข้อ 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ที่บรรจุน้ำเสีย 50 มิลลิลิตรที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3. วิเคราะห์หาตัวแปร ดังนี้ (วิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข)

3.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง

3.2 ซีโอดี

3.3 น้ำตาลรีดิวซ์

3.4 พีเอช

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการลดค่าซีโอดีของยีสต์

1. ผลของพีเอช

1.1 เพาะเลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 โดยใช้วิธีการเดียวกับข้อ 1 (การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถลดค่าซีโอดีในน้ำเสียได้ดี) ลงในฟลาสก์ที่บรรจุน้ำทิ้งที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ที่ปรับพีเอชเป็น 3.5, 4.0 และ 4.5 ด้วย 1N NaOH และ 1N HCl

1.2 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

1.3 วิเคราะห์หาค่าต่าง ๆ ดังนี้ (วิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข)

1.3.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง

1.3.2 ซีโอดี

1.3.3 น้ำตาลรีดิวซ์

1.3.4 พีเอช

2. แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญ

2.1 เพาะยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 โดยใช้วิธีการเดียวกับข้อ 1 (การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถลดค่าซีโอดีในน้ำเสียได้ดี) ลงในฟลาสก์ที่บรรจุน้ำทิ้งที่ฆ่าเชื้อแล้ว ที่มีพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 1 โดยใส่แอมโมเนียมซัลเฟต หรือแอมโมเนียมคลอไรด์ หรือยูเรียในปริมาณ 0.05, 0.1 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

2.2 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.3 วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1.3

การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลไม้กระป๋องโดยยีสต์ในระบบบำบัดจำลอง

โดยนำยีสต์ที่สามารถลดค่าซีโอดีได้ดีในสภาวะที่เหมาะสมมาทำการทดลองหาอัตราเจริญจำเพาะสูงสุดในน้ำเสียที่นึ่งฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อเพิ่มความดันที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และทำการทดลองแบบเบ็ดเสร็จโดยใส่น้ำเสียลงในโหลแก้วขนาด 8 ลิตร ซึ่งบรรจุน้ำเสียปริมาตร 3 ลิตร ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์จากข้อ 1 (ผลของพีเอช) และเติมแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์จากในข้อ 2 โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้ คือ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1. การทดลองแบบเบ็ดเสร็จ

1.1 นำน้ำเสียมาบรรจุในโหลแก้วให้มีปริมาตร 3 ลิตร โดยน้ำเสียที่จะนำเข้ามาในโหลแก้วจะมีการปรับให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์

1.2 ใส่ยีสต์ที่ได้จากการเตรียมหัวเชื้อลงไปปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

1.3 ให้อากาศโดยใช้ Air Pump และวัดปริมาณอากาศโดยใช้ Rotameter

1.4 ทำการวิเคราะห์หาเช่นเดียวกับข้อ 1.3 (ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการลดค่าซีโอดีของยีสต์) โดยวัดพีเอชและน้ำตาลรีดิวซ์ ทุก 24 ชั่วโมง วัดค่าซีโอดีและน้ำหนักเซลล์แห้งทุก 12 ชั่วโมงในชุดควบคุม และวัดในชั่วโมงที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 ในชุดทดลอง

1.5 ทำการสเปรดเพลทนับจำนวนจุลินทรีย์ในอาหาร PCA และ PDA ในชั่วโมงที่ 0, 48 และ 96

ซึ่งสมการหาอัตราการเจริญจำเพาะได้จากสมการ ดังนี้

$$\mu = \frac{d \ln X}{dt} \qquad (1)$$

เมื่อ X = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (กรัมต่อลิตร)

t = เวลา มีหน่วยเป็นชั่วโมง

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific Growth Rate) มีหน่วยเป็นต่อชั่วโมง

ซึ่งสมการหาความเข้มข้นของสับสเตรทต่อความเข้มข้นของมวลเซลล์ มีสมการดังนี้

$$X = Y_{x/s} (S_0 - S) \qquad (2)$$

$Y_{x/s}$ = Yield Coefficient เป็นค่าคงที่หาได้โดย

สมการ $Y_{x/s} = \frac{X-X_0}{S-S_0}$

X_0 = ความเข้มข้นของมวลเซลล์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

S_0 = ความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

S = ความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)

2. การทดลองแบบต่อเนื่อง

2.1 นำน้ำเสียมาบรรจุในโหลแก้วให้มีปริมาตร 3 ลิตร โดยน้ำเสียที่จะนำเข้ามาในโหลแก้วจะมีการปรับให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ โดยใช้ผลการทดลองจากข้อ 1 (ผลของพีเอช) และข้อ 2 (ผลของแหล่งไนโตรเจน)

2.2 โดยเติมยีสต์ลงในโหลแก้ว ตามวิธีข้อ 1 (คัดเลือกยีสต์ที่ลดค่าซีโอดีได้ดี)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.3 ให้อากาศโดยใช้ Air Pump และวัดปริมาณอากาศโดยใช้ Rotameter

2.4 ทำการวิเคราะห์น้ำที่ถูกปล่อยออกมาจากภาชนะเช่นเดียวกับข้อ 1.3

2.5 ทำการสเปรดเพลทนับจำนวนจุลินทรีย์ในอาหาร PCA และ PDA ในชั่วโมงที่ 0 และ 24 ก่อนนำน้ำเสียเข้าระบบ และชั่วโมงที่ 48 และ 96 หลังนำน้ำเสียเข้าสู่ระบบ

โดยมีการหาอัตราการเจือจาง (Dilution Rate) โดยใช้สมการดังนี้

$$D = F/V \qquad (3)$$

เมื่อ D = อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง, h^{-1})

F = อัตราการไหล (ลิตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตร (ลิตร)

สภาวะคงที่ (Steady State) คือ การปล่อยน้ำเสียเก่าในภาชนะออกและเติมน้ำเสียใหม่เข้าสู่ภาชนะอย่างต่อเนื่อง ด้วยอัตราที่เหมาะสม โดยสมการดังนี้

$$S = \frac{Ks\ D}{\mu_{max}-D} \qquad (4)$$

เมื่อ S = ความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือที่สภาวะคงที่

Ks = ค่าคงที่ในการใช้สับสเตรท ซึ่งมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสับสเตรท เมื่อ μ มีค่าเท่ากับ 1/2 μ_{max}

μ_{max} = อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด

* อัตราการไหลที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการ Wash Out ค่า $D \leq \mu$ โดยปกติจะใช้ 1/3 ถึง 1/2 ของ μ_{max}

3. การเปรียบเทียบอัตราการใช้สารอาหาร

ซึ่งสมการอัตราการใช้สารอาหารหาได้จากสมการ ดังนี้

$$Rs = \frac{\mu X}{Y^{T}_{X/S}} \qquad (5)$$

Rs = อัตราการใช้สารอาหาร (mgCOD $l^{-1} h^{-1}$)

$Y^{T}_{X/S}$ = ผลผลิต (Yield) จริงหาได้จาก $\frac{\text{มวลเซลล์ที่เกิดขึ้น}}{\text{COD เริ่มต้น-COD สุดท้าย}}$

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific Growth Rate) มีหน่วยต่อชั่วโมง

ซึ่งหาได้จาก $\mu = \frac{\mu_{max} S}{Ks+S}$ ในการหมักแบบต่อเนื่อง

ส่วนในการหมักแบบเบ็ดเสร็จหาได้จากสมการ (1)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University