



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

**ความเป็นไปได้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำทิ้ง
กระบวนการผลิตยางแผ่นเป็นองค์ประกอบ**

โดย นายไพโรจน์ วงศ์สุทธิสิน และคณะ

15 ตุลาคม 2556

บทสรุปรายงานสำหรับผู้บริหาร

ชื่อโครงการ ความเป็นไปได้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำทิ้ง
 กระบวนการผลิตยางแผ่นเป็นองค์ประกอบ
 Feasibility study of single cell protein production using effluent from rubber
 sheet production

ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน
 หน่วยงาน สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
 ที่อยู่ 63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
 โทรศัพท์ 053-873540 โทรสาร 053-878225
 E-mail pairote@mju.ac.th

นักศึกษา/ ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-สกุล นายวรวิทย์ ร่องหาญแก้ว
 หน่วยงาน คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
 ที่อยู่ 63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
 โทรศัพท์ 053-873540 โทรสาร 053-878225

ชื่อ-สกุล นางสาวอัจฉรารัตน์ คล่องแคล้ว
 หน่วยงาน สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
 ที่อยู่ 63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
 โทรศัพท์ 053-873540 โทรสาร 053-878225

งบประมาณทั้งโครงการ 130,000 บาท
 ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม 2555 ถึง 31 กรกฎาคม 2556

ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญ

คาดว่าในน้ำทิ้งที่เหลือภายหลังจากกระบวนการผลิตยางแผ่นของเกษตรกรน่าจะมีสารอินทรีย์ต่างๆ เป็นองค์ประกอบอยู่ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้งที่อุดมด้วยสารอาหารเหล่านี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์มากกว่าปล่อยให้สร้างปัญหามลภาวะแก่ชุมชนและสิ่งแวดล้อม โดยแนวทางการใช้ประโยชน์ที่นำเสนอครั้งนี้คือ นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single cell protein) สำหรับใช้เป็นอาหารเสริมของสัตว์เลี้ยงเศรษฐกิจ เช่น สุกร สัตว์ปีก โค และกระบือ เป็นต้น โดยโปรตีนเซลล์เดี่ยวที่สนใจผลิตขึ้นนี้ ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวทอง (*Spirulina platensis*) และยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae*

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดี่ยวด้วยสูตรอาหารที่มีส่วนประกอบเป็นน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางแผ่น

ผลการดำเนินงาน

ภายหลังจากรวบรวมน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่นของเกษตรกรในพื้นที่ อ.ภูเขา จ. พะเยา จำนวน 4 ราย น้ำทิ้งฯ ได้ถูกนำมาผสมรวมกัน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าความกระด้าง และกำจัดของแข็งแขวนลอย จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส น้ำทิ้งฯ ดังกล่าวจะถูกนำมาศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เตรียมเป็นอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สองชนิดได้แก่ สาหร่ายสไปรูลิน่า (*Spirulina platensis*) และยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารประเภทโปรตีนให้กับคนและสัตว์ได้ หรือที่เราเรียกว่าอาหารโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single cell protein) เบื้องต้นได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณสารอาหารในน้ำทิ้งฯ ตลอดจนการปนเปื้อนของโลหะหนักบางรายการ ผลการวิเคราะห์พบว่า น้ำทิ้งฯ ประกอบไปด้วย แอมโมเนีย ไนโตรเจน ไนเตรท ฟอสเฟต น้ำตาล และโปรตีนที่ละลายได้ ในปริมาณ 207.13, 0.045, 2.7, 0.94, 0.42 และ 3.64 มิลลิกรัม/ ลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบการปนเปื้อนของแคดเมียมและตะกั่ว ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นตอนปรับสภาพน้ำทิ้งฯ มีต้นทุนที่เพิ่มขึ้นประมาณ 0.16 บาทต่อ 1 ลิตรของน้ำทิ้งฯ (ไซตาแอช 0.1 บาท และปูนขาว 0.06 บาท) แม้จะมีราคาที่ไม่สูง แต่ขั้นตอนที่เพิ่มขึ้นนี้ก็จำเป็นปัจจัยที่กระทบต่อความน่าสนใจในการต่อยอดสู่เชิงพาณิชย์ได้

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าในอาหารสูตรมาตรฐานที่ผสมน้ำทิ้งฯ ในสัดส่วนต่างๆ ตั้งแต่ 0-100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าสาหร่ายไม่สามารถเจริญได้เลยหากผสมน้ำทิ้งฯ ในสัดส่วน 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป แต่หากผสมน้ำทิ้งฯ ในสัดส่วนที่น้อยลงแล้วก็พบว่าสาหร่ายสไปรูลิน่ายังสามารถเจริญได้บ้าง แต่ไม่ดีเท่าอาหารเพาะเลี้ยงสูตรมาตรฐาน แม้จะผสมน้ำทิ้งฯ ในสัดส่วนเพียง 20 เปอร์เซ็นต์แต่ก็พบว่าค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth) และค่าเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time) ยังคงน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐานมาก ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าน้ำทิ้งฯ ดังกล่าวนี้นั้นไม่เหมาะสมที่จะนำมาเป็นส่วนผสมของอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า ในขณะที่การศึกษานี้ยีสต์นั้นกลับพบว่าการผสมน้ำทิ้งฯ ในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรในอาหารสูตรมาตรฐาน (ลดต้นทุนลงได้ 24 บาทต่อลิตร) ให้ผลการผลิตเซลล์ยีสต์ใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐาน อีกทั้งยังมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ

และค่าเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าใกล้เคียงกันด้วย โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 2.27 ชั่วโมง⁻¹ และค่า Doubling time เท่ากับ 0.305 ชั่วโมง ดังนั้นน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่นนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* มากกว่าสาหร่ายสไปรูลิน่า อย่างไรก็ตาม แม้การผสมน้ำทิ้งฯ ลงอาหารสูตรมาตรฐานสำหรับเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดี่ยวแต่ละชนิดจะส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโต แต่กลับพบว่าปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์กลับมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลอง สามารถสรุปได้ว่าน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่นนี้ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* เนื่องจากมีความเป็นกรดที่ค่อนข้างสูง ทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งฯ เสียก่อน นอกจากนี้การทดแทนสูตรอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐานด้วยน้ำทิ้งฯ ก็ยังทำให้การเจริญของสาหร่ายลดลงอย่างชัดเจน แต่อาจมีความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้งฯ นี้มาใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยสามารถใช้ทดแทนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรมาตรฐานได้ในปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อย่างไรก็ตามการแม้จะลดค่าใช้จ่ายของสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปได้ 20 เปอร์เซ็นต์ (24 บาทต่อลิตร) แต่การที่ต้องเพิ่มขั้นตอนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งฯ นั้น ก็อาจจะไม่เป็นที่ยอมรับในทางปฏิบัติ แม้ค่าใช้จ่ายของสารเคมีที่ใช้ปรับสภาพน้ำทิ้งฯ จะมีเพียง 0.16 บาทต่อลิตร

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

เนื่องจากมีความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่นมาใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แต่กระบวนการนำน้ำทิ้งฯ มาใช้ยังคงซับซ้อน ดังนั้นควรศึกษาหาวิธีการปรับสภาพน้ำทิ้งฯ ให้ง่ายและมีประสิทธิภาพมากขึ้น รวมทั้งควรมีการศึกษาการขยายกำลังการผลิตมวลเซลล์ยีสต์ให้สูงขึ้นด้วย

ผลงานวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

บทความวิชาการระดับชาติและ/หรือนานาชาติ เรื่อง “Single cell protein production using effluent from rubber sheet production”

บทคัดย่อ

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่นของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในอำเภอภูซาง จังหวัดพะเยา มีองค์ประกอบทางเคมีมากมาย ได้แก่ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท ฟอสเฟส น้ำตาล โปรตีน และสารอินทรีย์ อื่นๆ ในปริมาณ 207.13, 0.045, 2.70, 0.94, 0.42, 3.64 และ 7,200 มิลลิกรัม/ลิตร ดังนั้นคาดว่าจะสามารถ ใช้เป็นสารอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ ภายหลังการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ความกระด้าง และกำจัด ของแข็งแขวนลอยของน้ำทิ้งดังกล่าวแล้วจึงนำมาศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียวสำหรับเลี้ยงสัตว์ ผล การศึกษาพบว่าการใช้น้ำทิ้งเป็นองค์ประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรมาตรฐานมีผลทำให้สาหร่ายสไปรูลิน่า ตาย คาดว่าเนื่องมาจากอนุโมลกรดที่หลงเหลือในน้ำทิ้ง ในขณะที่การผสมน้ำทิ้งในอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐาน สำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์นั้น พบว่าสามารถใช้ได้ที่สัดส่วนต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยมีค่าอัตราการ เจริญจำเพาะเท่ากับ 2.27 ชั่วโมง⁻¹ และค่า Doubling time เท่ากับ 0.305 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามปริมาณ โปรตีนหยาบของโปรตีนเซลล์เดียวแต่ละชนิดพบว่าไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐาน และอาหารสูตรมาตรฐานที่ผสมด้วยน้ำทิ้ง 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

ABSTRACT

Effluent obtained from para rubber sheet processing of rubber plantation farmers in Phusang District, Phayao, contains many chemical components; i.e. ammonia, nitrite, nitrate, phosphate, sugar, protein and other organic compounds at the concentration of 207.13, 0.045, 2.70, 0.94, 0.42, 3.64 and 7,200 mg/L. Thus, it might be applied as nutritional source in microbial media. After pH, hardness and suspended solids of effluent were treated; possibility of algal *Spirulina platensis* and yeast *Saccharomyces cerevisiae* production using this effluent was studied. The results revealed that no growth of *S. platensis* was observed when standard culture medium was supplemented by effluent. Remaining acid radicals in effluent might be the main effect. In case of yeast cultivation, it was shown that supplementation of effluent to standard culture medium at less than 20 percent by volume had no effect on yeast growth. Its maximum growth rate and doubling time were 2.27 hr^{-1} and 0.305 hr; respectively. However, crude protein content of each single cell protein was not different when cultured in standard culture medium and standard culture medium with effluent supplementation.

ความสำคัญและความเป็นมาของการวิจัย

น้ำยาราสตินนั้น นอกจากจะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อแล้ว ยังมีองค์ประกอบอื่นๆ อีกมากมาย ทั้งสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ลิพิด เป็นต้น ดังนั้นจึงคาดว่า ในน้ำทิ้งที่เหลือภายหลังจากกระบวนการผลิตยางแผ่นของเกษตรกร น่าจะมีสารประกอบเหล่านี้หลงเหลืออยู่ด้วย สารประกอบเหล่านี้จะเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในบ่อน้ำทิ้ง สังกเกตได้จากกลิ่นที่รุนแรงของบ่อ ซึ่งเกิดจากเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลายกลุ่ม ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้งที่อุดมด้วยสารอาหารเหล่านี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์มากกว่าปล่อยให้สร้างปัญหามลภาวะแก่ชุมชนและสิ่งแวดล้อม โดยแนวทางการใช้ประโยชน์ที่นำเสนอครั้งนี้คือ นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single cell protein) สำหรับใช้เป็นอาหารเสริมของสัตว์เลี้ยงเศรษฐกิจ เช่น สุกร สัตว์ปีก โค และกระบือ เป็นต้น โดยโปรตีนเซลล์เดี่ยวที่สนใจผลิตขึ้นนี้ ได้แก่ สาหร่ายแกเรียวทอง (*Spirulina platensis*) และยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* หากพบว่าสารอาหารในน้ำทิ้งเหล่านี้สามารถช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีของสูตรอาหารมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดี่ยวได้แล้ว ก็จะช่วยลดต้นทุนค่าสารเคมีในการเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดี่ยวลงได้ หรือแม้กระทั่งเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ในท้องถิ่นก็จะสามารถนำองค์ความรู้นี้ไปใช้ผลิตอาหารเสริมให้กับสัตว์เลี้ยงของตนได้เช่นกัน

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดี่ยวด้วยสูตรอาหารที่มีส่วนประกอบเป็นน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางแผ่น

ทฤษฎี แนวคิดในการวิจัย และผลงานที่เกี่ยวข้อง

โปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein; SPC) หมายถึงจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารคนและสัตว์ ซึ่งอาจอยู่ในรูปโปรตีนที่สกัดออกมาจากเซลล์แล้วหรืออาจอยู่ในรูปของเซลล์ก็ได้ (สมใจ, 2550) คำว่าโปรตีนเซลล์เดี่ยวนี้ ถูกบัญญัติขึ้นมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1966 โดยศาสตราจารย์ C.L. Wilson แห่ง Massachusetts Institute of Technology ได้ถูกศึกษากันอย่างกว้างขวางและได้รับความสนใจเป็นอย่างมากจากองค์การอนามัยโลก (WHO) ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนใหม่สำหรับคนและสัตว์ในภาวะที่มีการขาดแคลนอาหารในโลกปัจจุบัน (ดวงพร, 2530) จุลินทรีย์ที่นิยมนำมาผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดี่ยวนี้อาจเป็นได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ สาหร่าย หรือเชื้อราก็ได้ ซึ่งต้องมีปริมาณของโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่ค่อนข้างสูง ยกตัวอย่างเช่น กลุ่มสาหร่าย ได้แก่ *Chlorella spp.*, *Spirulina platensis* และ *Spirulina maxima* เป็นต้น กลุ่มยีสต์ ได้แก่ *Candida utilis*, *Kluyveromyces fragilis* และ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น ทั้งยีสต์และสาหร่ายเหล่านี้ มีปริมาณโปรตีนสูงถึง 40-60 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง (ดวงพร, 2530; สมใจ, 2550) จุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีการผลิตเพื่อใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดี่ยวนั้นได้แสดงไว้ดังตารางที่ 1

ในกรณีของการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากแบคทีเรียเพื่อเป็นอาหารสำหรับคนและสัตว์นั้น แม้ว่าจะมีปริมาณโปรตีนที่สูง แต่ก็พบว่ามีความปลอดภัยเป็นส่วนประกอบที่สูงถึง 8-12% โดยน้ำหนักแห้ง ดังรายงานของ Nasseri และคณะ (2011) ที่อ้างจากรายงานของ Miller และ Litsky (1976) กรดยูริกนี้กระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดยก่อให้เกิดโรคเก๊าท์และโรคไตได้ นอกจากนี้ทัศนคติของผู้บริโภคที่มีต่อแบคทีเรียนั้น

มักเข้าใจว่าเป็นเชื้อโรค (Dhanasekaran et al. 2010; Nasser et al., 2011) เชื้อราที่เช่นเดียวกันที่มักถูกมองว่าเป็นเชื้อโรค แม้ว่าจะมีปริมาณกรดนิวคลีอิกที่ต่ำกว่าแบคทีเรียก็ตาม ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงไม่ได้เสนอให้มีการศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเสนอให้มีการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากยีสต์และสาหร่ายแทน

ยีสต์ที่สนใจศึกษาครั้งนี้คือสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งก็คือยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) หรือยีสต์สำหรับหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (Brewer yeast) นั่นเอง ส่วนสาหร่ายที่จะนำมาศึกษาคือสาหร่ายเกลียวทองสายพันธุ์ *Spirulina platensis* จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้ ได้ถูกทำการศึกษากันอย่างกว้างขวางถึงคุณค่าทางโภชนาการในการใช้เป็นอาหาร (Parajó et al., 1995; Ojokoh and Uzeh, 2005; Habib and Parvin, 2008) กรณีของสาหร่ายเกลียวทองนั้น ณ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ก็ได้มีหน่วยวิจัยสำหรับการผลิตสาหร่ายเกลียวทองนี้จนกระทั่งได้มีการจัดตั้งเป็นฐานเรียนรู้สาหร่ายเกลียวทองขึ้นเพื่อเผยแพร่องค์ความรู้เกี่ยวกับสาหร่ายชนิดนี้ให้ผู้สนใจทุกภาคส่วน อย่างไรก็ตาม ในการผลิตยีสต์และสาหร่ายเกลียวทองเพื่อเป็นอาหารสำหรับมนุษย์นี้ วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้องได้รับการยอมรับว่าสะอาดและปลอดภัยซึ่งมีต้นทุนค่อนข้างสูง ดังเช่น จากข้อมูลสิทธิบัตรของประเทศสหรัฐอเมริกาสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ ในปี 1999 เลขที่ 5,916,609 ก็ได้มีการใช้โมลาสจากอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก แหล่งไนโตรเจนใช้ casamino acids, tryptone และ peptone และยังมีเสริมวิตามินและแร่ธาตุอื่นๆ อีกมากมาย ในขณะที่สิทธิบัตรเลขที่ 4,346,113 ในปี 1982 ก็มีการใช้แหล่งคาร์บอนหลักเป็นกากน้ำตาลจากหัวบีท ส่วนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทองนั้น โดยปกติจะใช้อาหารสังเคราะห์ที่เตรียมจากสารเคมีมากมาย เช่นอาหารสูตร Zarrouk medium หรืออาหารสูตรปรับปรุงที่ฐานการเรียนรู้สาหร่ายเกลียวทอง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ได้พัฒนาและนำมาใช้ ที่ประกอบไปด้วย NaHCO_3 , NaNO_3 , MgSO_4 , NaCl และปุ๋ยสูตร 16-16-16 ซึ่งแตกต่างจากการผลิตเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ที่ให้ความสำคัญกับประเด็นเหล่านี้น้อยกว่า ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต (Nasser et al., 2011) ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดียวเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์นี้ จึงได้มีผู้สนใจศึกษาการใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรในการใช้เพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดียว เช่น การเพาะเลี้ยงยีสต์จากน้ำหางนม (US. Patent No. 4,192,918) เศษอินทผลัม (Nancib et al., 1997) เศษเปลือกกล้วยและมะม่วงจากโรงงาน (Khan et al., 2010) เปลือกสับปะรด (Dhanasekaran et al., 2010) และน้ำเสียจากโรงงานนม (Singh et al., 2011) เป็นต้น ส่วนการลดต้นทุนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทอง ก็มีการศึกษาใช้น้ำหมักมูลสุกร มูลไก่ มูลม้า มูลวัว มูลแกะ และน้ำแช่ฟาง (ศิริพร และคณะ, 2553) และน้ำจากบ่อบำบัดน้ำเสีย (Kosaric et al., 2004) เป็นต้น แม้ว่าจะให้ผลผลิตไม่สูงเทียบเท่ากับการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารสังเคราะห์ แต่ก็ให้ผลเป็นที่น่าพอใจและคุ้มค่า

เมื่อกลับมาพิจารณาถึงข้อเสนอโครงการนี้ ซึ่งเสนอการใช้น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่นในการเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดียว ก็น่าจะเป็นการผลิตเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์เท่านั้น อันเนื่องมาจากเหตุผลที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นถึงการยอมรับของผู้บริโภค โดยในน้ำทิ้งดังกล่าวย่อมมีสารอาหารต่างๆ ที่พบในส่วนซีรัมของน้ำยางพาราสดหลงเหลืออยู่ เพราะในน้ำยางพาราสดมีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต neutral lipids, glycolipid และ phospholipid และสารอนินทรีย์อื่นๆ เป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 1.4, 1.6, 1.0, 0.6 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง (วรารณ, 2549) ส่วนน้ำทิ้งจากการผลิตยางแผ่นก็มีรายงานถึงองค์ประกอบอื่นเช่นกัน นั่นคือมีค่า BOD COD และไนโตรเจนทั้งหมดอยู่ในช่วงประมาณ 1500-7000, 3500-14000 และ 200-1800 มก./ลิตร ตามลำดับ (Mohammadi et al., 2010) มีปริมาณของแข็งแขวนลอย ฟอสฟอรัสทั้งหมด และซัลเฟตเท่ากับ 93-525, 14.9-21.6, 136-472.6 มก./ลิตร ตามลำดับ และค่าความเป็นกรดต่าง

อยู่ในช่วง 5.0-5.9 (Tekasakul and Tekasakul, 2006) องค์ประกอบเหล่านี้จะมีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้

มีรายงานมากมายที่กล่าวถึงคุณประโยชน์ของการเสริมยีสต์และสาหร่ายเกลียวทองลงในอาหารสัตว์นอกเหนือจากการใช้เป็นอาหารเสริมโปรตีน ยกตัวอย่างเช่น Bruno และคณะ (2009) ที่พบว่าการเสริมยีสต์ให้แก่วัวนมพันธุ์ Holstein ในปริมาณ 30 กรัม/วัน จะช่วยให้วัวผลิตน้ำนมเพิ่มขึ้น Li และ Gatlin (2003) ที่ศึกษาในปลา Striped bass (rockfish) ก็พบว่าการเสริม Baker yeast ในอาหารปลาดังกล่าว จะช่วยให้ปลาเมื่ออัตราการเจริญเติบโตดีขึ้น และยังต้านทานต่อการติดเชื้อ *Streptococcus iniae* อีกด้วย ในสุกรและสัตว์ปีกก็ได้มีการศึกษาแล้วเช่นกันว่ายีสต์มีส่วนช่วยการผลิตสัตว์เหล่านี้ เช่น Shen และคณะ (2009) พบว่าการเสริมยีสต์ที่มีชีวิตในปริมาณ 5 กรัม/กิโลกรัม ส่งผลดีต่อการเจริญของลูกสุกร โดยทำให้วิลไลของลำไส้เล็กมีขนาดใหญ่ขึ้น และยังช่วยให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของทางเดินอาหารดีขึ้นด้วย ส่วนในไก่กระต่ายก็ได้มีการศึกษาโดย Gao และคณะ (2008) ที่พบผลเช่นเดียวกับการศึกษาในสุกร และยังพบว่าค่าการย่อยได้ (Digestibility) ของแคลเซียมและฟอสฟอรัสดีขึ้นอีกด้วย เมื่อเสริมยีสต์ในปริมาณ 2.5 กรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ข้อดีของสาหร่ายเกลียวทองในแง่การใช้เป็นอาหารสัตว์นั้น ก็พบว่าสามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นและกากถั่วเหลืองได้ (Habib and Parvin, 2008) ช่วยเร่งสีในช่วงสีแดงและเหลืองของเนื้อไก่ (Toyomizu et al., 2001) ส่วนในปลานิลก็มีผู้ศึกษาไว้โดย Ungsethaphand และคณะ (2010) ซึ่งพบว่าสามารถใช้สาหร่ายเกลียวทองเสริมในอาหารปลานิลทดแทนการใช้ปลาป่นได้สูงถึง 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำให้น้ำหนักตัว อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการรอดชีวิตของปลาดีขึ้นได้

ด้วยข้อมูลและเหตุผลต่างๆ ที่ได้นำเสนอมาข้างต้น ผู้วิจัยจึงได้นำเสนอข้อเสนอโครงการนี้ขึ้น เพื่อวัตถุประสงค์ในการเพิ่มมูลค่าให้กับน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่น หากประสบความสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยก็มุ่งหวังที่จะทำการศึกษารูปแบบการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวด้วยน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตนี้ในระดับที่ใหญ่ขึ้นต่อไป

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

จุลินทรีย์

แบคทีเรีย

Cellulomonas spp.

Alcaligenes spp.

Methylophilus methylotrophus

Methylococcus capsulatus

ยีสต์

Candida utilis

Candida lipolytica

Kluyveromyces fragilis

Saccharomyces cerevisiae

เชื้อรา และ Higher fungi

Cephalosporium eichorniae

Paecilomyces varioti

Penicillium cyclopium

Chaetomium cellulolyticum

สาหร่าย

Scenedesmus acutus

Spirulina maxima

ที่มา: ดัดแปลงจาก สมใจ, 2550.

วัสดุและอุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

สาหร่าย: *Spirulina platensis*

ยีสต์: *Saccharomyces cerevisiae*

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. (สูตรดัดแปลงของคณะเทคโนโลยีประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้)

อาหารเพาะเลี้ยงยีสต์สูตร YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose)

3. น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่น

ได้รับความอนุเคราะห์จากเกษตรกรผู้ปลูกยางและผลิตยางแผ่นในพื้นที่อำเภอภูซาง จ.พะเยา จำนวน 4 ราย ซึ่งใช้กรดฟอร์มิกในกระบวนการจำนวน 3 ราย และใช้กรดซัลฟูริก 1 ราย

4. สารเคมี

NaHCO ₃	Fluka
K ₂ HPO ₄	Fluka
NaNO ₃	Fluka
ปุ๋ยสูตร 16:16:16	-
Yeast extract	HIMEDIA
Peptone	HIMEDIA
น้ำตาลกลูโคส	Fluka
ปูนขาว	-
โซดาแอซ	-
สารส้ม	-
ชุดสารเคมีวิเคราะห์ Nitrite nitrogen ด้วยวิธี Reddish purple azo dye	-
ชุดสารเคมีวิเคราะห์ Nitrate nitrogen ด้วยวิธี Cadmium reduction method	-
ชุดสารเคมีวิเคราะห์ Ammonia nitrogen ด้วยวิธี Nesslerization	-
ชุดสารเคมีวิเคราะห์ Orthophosphate ด้วยวิธี Ascorbic acid	-
ชุดสารเคมีวิเคราะห์ Chemical oxygen demand ด้วยวิธี Close reflux titrimetric	-
ชุดสารเคมีวิเคราะห์ total nitrogen ด้วยวิธี Kjeldahl	-
ชุดสารเคมีวิเคราะห์ค่าความกระด้าง ด้วยวิธี EDTA titrimetric	-

5. อุปกรณ์

เครื่องเขย่าชนิดแบบควบคุมอุณหภูมิได้	RATEK
ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar airflow)	FLUFRANCE
ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (Incubator)	MEMERT
เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิแบบตั้งโต๊ะ	HETTICH ZENTRIFUGER
เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	SPECTRONIC GENESYS 5
เครื่องกวนสารแบบใช้ความร้อน (Hot plate stirrer)	CLIFTON CERASTIR
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	BINDER
เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)	VORTEX GENIC 2
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	METTLER TOLEDO
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	METTLER TOLEDO
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	MEMMERT
ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 ml	PYREX
หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 50 ml	CORNING
ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)	PYREX
ขวดดูแรน (Laboratory bottle) ขนาด 500 ml, 1000 ml	DURAN
กระบอกตวง (Erlenmeyer flask) ขนาด 50 ml, 500 ml, 1000 ml	PYREX
หลอดทดลอง (Test tube)	PYREX
จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)	PYREX

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง

รวบรวมน้ำทิ้งจากตะกอนของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดพะเยาจำนวน 4 แหล่งๆ ละ 20 ลิตร จากนั้นนำมาผสมในถังพลาสติกขนาดใหญ่ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ทั้งนี้ในระหว่างการขนส่งและก่อนทำการวิจัยจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

2. การปรับสภาพน้ำทิ้ง

กำจัดของแข็งขนาดใหญ่ด้วยการกรองผ่านผ้าขาวบาง ส่วนตะกอนแขวนลอยขนาดเล็กกำจัดด้วยการเติมปูนขาวในอัตราส่วน 15 กรัมต่อน้ำทิ้ง 1 ลิตร จากนั้นปรับความกระด้างของน้ำด้วยการเติมโซดาแอซ ในปริมาณ 7 กรัมต่อน้ำทิ้ง 1 ลิตร หรือจนกว่าค่าความกระด้างอยู่ที่ 50-100 มก/ลิตร (วัดค่าความกระด้างด้วยวิธี EDTA titrimetric) และสุดท้ายตกตะกอนอีกครั้งด้วยสารส้ม (25-30 กรัม/ลิตร)

3. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำและองค์ประกอบทางเคมี

3.1 วิเคราะห์ไนไตรท์ ไนโตรเจน (Nitrite nitrogen; $\text{NO}_2\text{-N}$) โดยวิธีการวัดสี (Colorimetric method; Reddish purple azo dye method) (APHA-AWWA, 1998)

3.2 วิเคราะห์ไนเตรท ไนโตรเจน (Nitrate nitrogen; $\text{NO}_3\text{-N}$) โดยวิธีการ Cadmium Reduction method (Strickland and Parsons, 1972)

3.3 วิเคราะห์แอมโมเนีย ไนโตรเจน (Ammonia nitrogen; $\text{NH}_3\text{-N}$) โดยวิธีการ nesslerization method (APHA-AWWA, 1998)

3.4 วิเคราะห์ออร์โธฟอสเฟต ฟอสฟอรัส (Orthophosphate phosphorus; $\text{PO}_4\text{-P}$) โดยวิธีการ Ascorbic acid method (APHA-AWWA, 1998)

3.5 วิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม (Cd) โดยวิธี ASS, ICP - MS

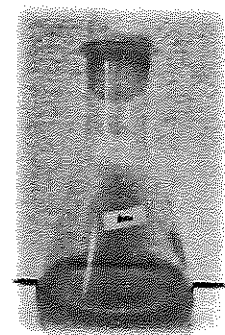
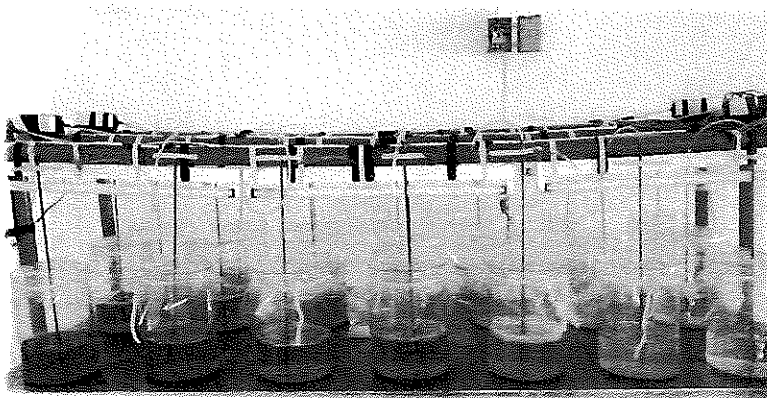
3.6 วิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว (Pb) โดยวิธี ASS, ICP - MS

3.7 วิเคราะห์ปริมาณ Chemical Oxygen Demand โดยวิธี Close Reflux Titrimetric Method (APHA-AWWA, 1998)

4. ความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า

4.1 การออกแบบระบบเพาะเลี้ยง

ภาชนะที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. และโหลแก้วทรงกระบอกขนาด 5 ลิตร ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ และให้อากาศผ่านปั๊มลมและหัวทราย ดังแสดงในภาพที่ 1 ระหว่างการเพาะเลี้ยงจะมีการบันทึกอุณหภูมิและความชื้นด้วยอุปกรณ์ Data logger และมีการบันทึกความสว่างด้วย Lux meter



ภาพที่ 1 ระบบการเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดียวในงานวิจัยนี้: (ซ้าย) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า (ขวา) การเพาะเลี้ยงยีสต์

4.2 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างน้ำทิ้งและอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า

ปรับค่า pH ของน้ำทิ้งให้มีค่าประมาณ 10 จากนั้นผสมน้ำทิ้งกับอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตรมาตรฐานในอัตราส่วนตั้งแต่ 0-100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เติมหิวเชื้อสาหร่ายลงไปจนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm เท่ากับ 0.8 ทำการเพาะเลี้ยงในระบบที่ออกแบบไว้ จากนั้นเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 14 วัน แล้วทำการวัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่าการดูดแสงที่ 560 nm นับจำนวนเซลล์สาหร่ายด้วยวิธี Drop microtransect วัดค่า pH ด้วยกระดาษลิตมัส วัดอุณหภูมิ data logger และวัดแสงด้วย Lux meter

ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง และคัดเลือกสัดส่วนของน้ำทิ้งที่เหมาะสมที่สุดในการทดลองต่อไป

4.3 การผลิตมวลเซลล์สาหร่ายและศึกษาไคเนติกส์การเจริญของสาหร่ายสไปรูลิน่า

ภายหลังได้สูตรอาหารที่คัดเลือกจากข้อ 4.2 ซึ่งมีการผสมน้ำทิ้งลงไปแล้ว ก็จะได้ทำการนำมาเพาะเลี้ยงในขนาดการผลิตที่ใหญ่ขึ้นระดับ 5 ลิตรเพื่อผลิตมวลเซลล์ เปรียบเทียบกับการผลิตมวลเซลล์ในอาหารสูตรมาตรฐาน ทั้งนี้ระหว่างการทำเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน จะมีการเก็บตัวอย่างอาหารเพื่อวัดการเจริญของสาหร่าย และคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; μ) และค่าระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า (Doubling time; t_d) โดยสมการดังต่อไปนี้

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate: μ)

$$\mu = \frac{\ln(X_i/X_0)}{T_i - T_0}$$

ระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า (Doubling Time: t_d)

$$t_d = 0.693/\mu$$

เมื่อ

$$\begin{aligned} X_i &= \text{น้ำหนักรวมเซลล์ในช่วงที่เพาะเลี้ยง} & X_0 &= \text{น้ำหนักรวมเซลล์เริ่มต้น} \\ T_i &= \text{ช่วงวันที่ทำการเพาะเลี้ยง} & T_0 &= \text{วันที่เริ่มต้น} \end{aligned}$$

มวลเซลล์ที่ผลิตได้จากทั้ง 2 ชุดการทดลองจะถูกนำไปทำแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส แล้วบดให้ละเอียดก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนหยาบ (Crude protein) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. ความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Sacharomyces cerevisiae*

5.1 การออกแบบระบบเพาะเลี้ยง

ภาชนะที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. มีการให้อากาศด้วยการเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 150 rpm และไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ

5.2 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างน้ำทิ้งและอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์

ผสมน้ำทิ้งกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPD ในอัตราส่วนตั้งแต่ 0-100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7.0 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที เติมหิวเชื้อยีสต์ลงไป ปริมาณ 10^8 เซลล์/ 100 มล. เพาะเลี้ยงด้วยระบบที่กำหนดไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น วัดการเจริญของยีสต์ด้วยการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์และ Heamacytometer

ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง และคัดเลือกสัดส่วนของน้ำทิ้งที่เหมาะสมที่สุดในการทดลองต่อไป

5.3 การผลิตมวลเซลล์ยีสต์สำหรับและศึกษาโคเนติกส์การเจริญของยีสต์

ภายหลังได้สูตรอาหารที่คัดเลือกจากข้อ 5.2 ซึ่งมีการผสมน้ำทิ้งลงไปแล้ว ก็จะได้ทำการนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตมวลเซลล์ เปรียบเทียบกับการผลิตมวลเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPD โดยจะทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ค่าการเจริญของยีสต์ ค่า pH และค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; μ) และค่าระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า (Doubling time; t_d)

มวลเซลล์ที่ผลิตได้จากทั้ง 2 ชุดการทดลองจะถูกนำไปทำแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส แล้วบดให้ละเอียดก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนหยาบ (Crude protein) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ผลการวิจัย

1. ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่น

พบว่าน้ำทิ้งที่รวบรวมได้จากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่นซึ่งมีซีรัมรวมอยู่ด้วยนั้นจะมีองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อนำมาผสมกับสูตรอาหารเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดียวทั้งสองสูตรแล้ว ก็พบว่าองค์ประกอบเหล่านี้ก็มีปริมาณแตกต่างกันไปตามสัดส่วนที่ผสมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งคาดว่าองค์ประกอบเหล่านี้สามารถใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญของทั้งสาหร่าย *S. platensis* และยีสต์ *S. cerevisiae* ได้

ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบทางเคมีชนิดต่างๆ ในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่น

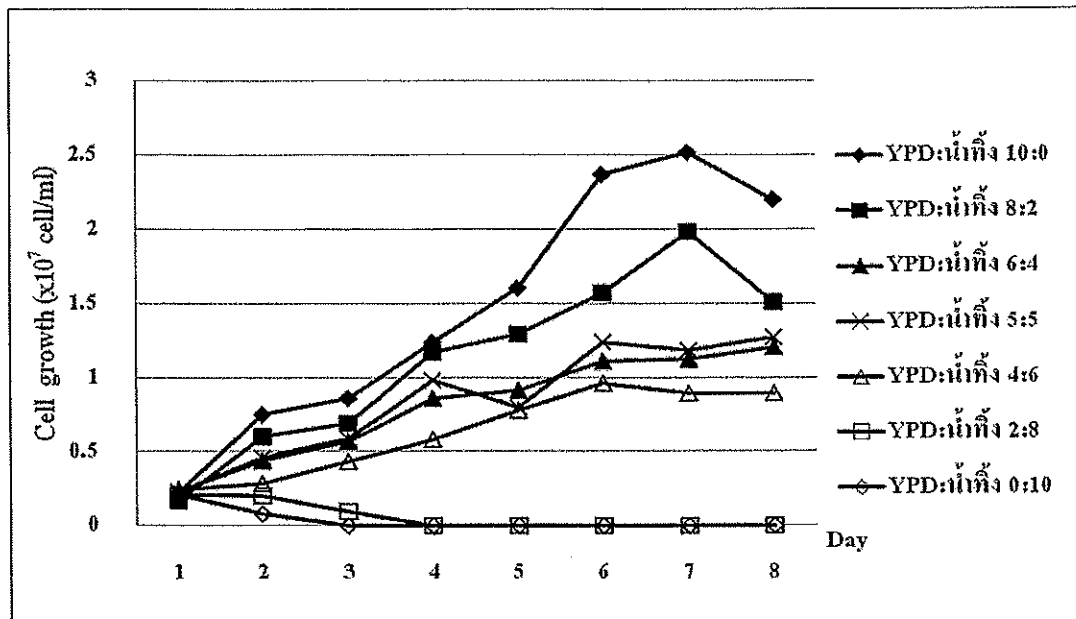
องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัม/ลิตร) \pm SD
แอมโมเนีย	207.13 \pm 9.26
ไนโตรเจน	0.045 \pm 0.00
ไนเตรท	2.70 \pm 0.36
ฟอสเฟต	0.94 \pm 0.02
น้ำรีดิวซ์ที่ละลายได้	0.018 \pm 0.01
น้ำตาลทั้งหมดที่ละลายได้	0.42 \pm 0.01
โปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด	3.64 \pm 0.03
ค่า COD	7,200
แคดเมียม	ไม่พบ*
ตะกั่ว	ไม่พบ*

*หมายเหตุ: ส่งตรวจวิเคราะห์ ณ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2. ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างน้ำทิ้งและอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

พบว่าอัตราการเจริญของสาหร่ายสไปรูลินาในอาหารที่ไม่เติมน้ำทิ้งมีค่าสูงสุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ ที่มีการผสมน้ำทิ้งฯ ลงไปอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ในขณะที่เมื่อแทนที่อาหารเพาะเลี้ยงด้วยน้ำทิ้งฯ ในปริมาณตั้งแต่ 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปก็จะไม่พบการเจริญของสาหร่ายเลย ดังแสดงในภาพที่ 2 และผลการวิเคราะห์ทางสถิติก็ได้แสดงในตารางที่ 3

แม้จะพบว่า การผสมน้ำทิ้งฯ ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาจะทำให้การเจริญของสาหร่ายลดลง แต่การทดแทนอาหารด้วยน้ำทิ้งฯ ในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์ก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษาต่อเป็นอย่างมาก เนื่องจากการเจริญของสาหร่ายลดลงไม่มากแต่สามารถประหยัดต้นทุนค่าสารเคมีในอาหารเพาะเลี้ยงลงไปได้บางส่วน จึงได้คัดเลือกอาหารสูตรนี้ในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 2 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลินาในอาหารเพาะเลี้ยงที่ผสมน้ำทิ้งๆ ในสัดส่วนต่างๆ

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่ายสไปรูลินาในอาหารเพาะเลี้ยงที่ผสมน้ำทิ้งๆ ในสัดส่วนต่างๆ

สัดส่วนของน้ำทิ้งๆ ในอาหารเพาะเลี้ยง	จำนวนเซลล์สาหร่ายสไปรูลินา ($\times 10^7$ เซลล์/ มล.)				
	วันที่ 0	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 12	วันที่ 14
0%	0.22±0.02 ^{Aa}	0.86±0.11 ^{Bc}	1.60±0.13 ^{Ce}	2.52±0.01 ^{Dc}	2.20±0.10 ^{Dc}
20%	0.17±0.01 ^{Aa}	0.69±0.03 ^{Abc}	1.29±0.05 ^{CDcd}	1.98±0.07 ^{Eb}	1.51±0.06 ^{CDab}
40%	0.23±0.01 ^{Aa}	0.57±0.02 ^{BCbc}	0.91±0.05 ^{Dbab}	1.12±0.04 ^{DEa}	1.20±0.08 ^{Eab}
50%	0.23±0.01 ^{Aa}	0.59±0.03 ^{ABbc}	0.80±0.02 ^{BCa}	1.18±0.08 ^{Ca}	1.27±0.12 ^{Cbb}
60%	0.24±0.02 ^{Aa}	0.43±0.04 ^{ABCb}	0.78±0.06 ^{CDEa}	0.89±0.10 ^{DEa}	0.89±0.07 ^{DEa}
80%	0.21±0.01 ^{Aa}	0.09±0.01 ^{Ba}	0	0	0
100%	0.21±0.02 ^{Aa}	0	0	0	0

หมายเหตุ

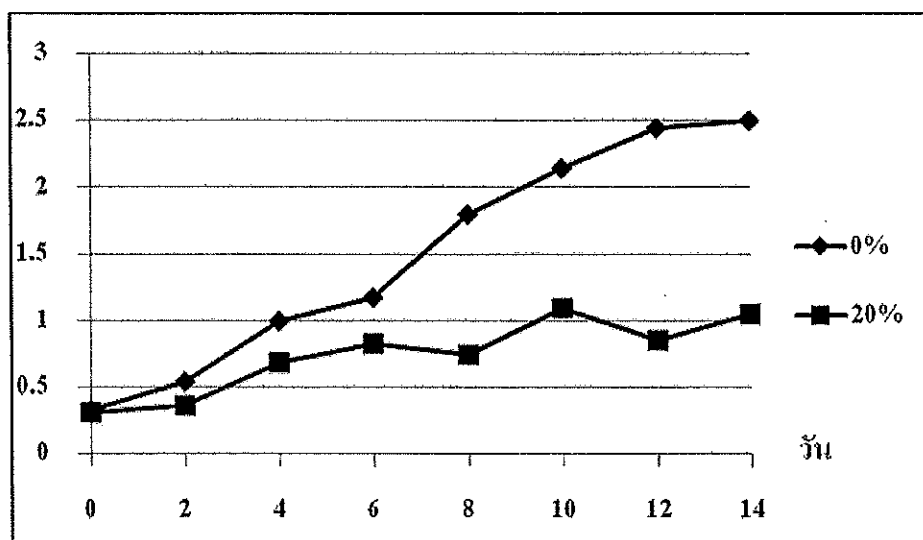
ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่เปรียบเทียบความแตกต่างในแนวนอน (เวลาการเพาะเลี้ยง) ($p < 0.01$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กเปรียบเทียบความแตกต่างในแนวตั้ง (อาหารแต่ละสูตร) ($p < 0.01$)

3. การผลิตมวลเซลล์สาหร่ายและศึกษาโคเนติกส์การเจริญของสาหร่าย

เมื่อทดสอบเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าในขนาดการผลิตระดับ 5 ลิตร โดยเปรียบเทียบระหว่างอาหารสูตรมาตรฐานที่ผสมด้วยน้ำทิ้งๆ ในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และอาหารสูตรมาตรฐานแล้ว ก็พบว่า การเจริญของสาหร่ายสไปรูลิน่าแสดงดังภาพที่ 3 ซึ่งมีการเพิ่มจำนวนขึ้นตามระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น โดยสูตรมาตรฐานที่ไม่เติมน้ำทิ้งๆ ก็ยังคงมีการเจริญที่สูงกว่าสูตรที่ผสมน้ำทิ้งๆ 20 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังแสดงผลการวิเคราะห์ที่ในตารางที่ 4

เมื่อเปรียบเทียบค่าอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายสไปรูลิน่าในอาหารทั้งสองสูตรแล้วก็ยังคงพบว่าสูตรอาหารที่ผสมน้ำทิ้งๆ 20 เปอร์เซ็นต์ สาหร่ายสไปรูลิน่ามีอัตราการเจริญจำเพาะที่ต่ำกว่าการเจริญในอาหารสูตรมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับค่า Doubling time ที่พบว่าสาหร่ายที่เจริญในสูตรอาหารที่ผสมน้ำทิ้งๆ 20 เปอร์เซ็นต์ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า นานกว่าที่เจริญในอาหารสูตรมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 แสดงโคเนติกส์การเจริญของสาหร่ายสไปรูลิน่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐานและสูตรที่มีการผสมน้ำทิ้งๆ กระบวนการผลิต

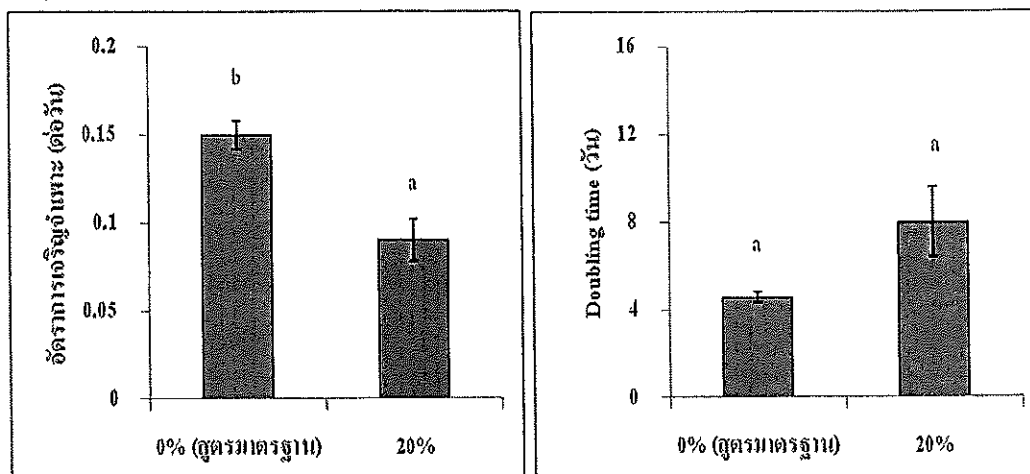
ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่ายสไปรูลิน่าเมื่อเพาะเลี้ยงในขนาดการผลิต 5 ลิตร

สัดส่วนของน้ำทิ้งๆ ในอาหารเพาะเลี้ยง	จำนวนเซลล์สาหร่ายสไปรูลิน่า ($\times 10^7$ เซลล์/ มล.)				
	วันที่ 0	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 12	วันที่ 14
0% (สูตรมาตรฐาน)	0.33 \pm 0.03 ^{Ea}	0.99 \pm 0.02 ^{Db}	1.79 \pm 0.02 ^{Cb}	2.44 \pm 0.03 ^{Bb}	2.73 \pm 0.07 ^{Ab}
20%	0.31 \pm 0.04 ^{Ba}	0.68 \pm 0.01 ^{Ba}	0.74 \pm 0.06 ^{Ba}	0.85 \pm 0.18 ^{Aa}	1.05 \pm 0.19 ^{Aa}

หมายเหตุ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่เปรียบเทียบความแตกต่างในแนวนอน (เวลาการเพาะเลี้ยง) ($p < 0.05$)

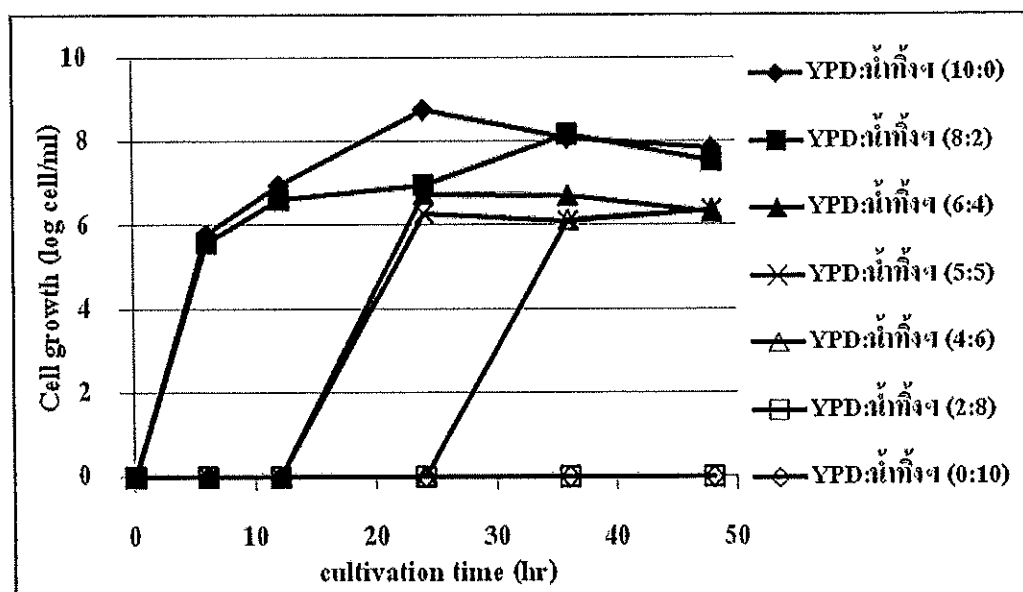
ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กเปรียบเทียบความแตกต่างในแนวตั้ง (อาหารแต่ละสูตร) ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4 แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะและค่า Doubling time ของสายร่ายสไปรูลิน่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐานและอาหารสูตรมาตรฐานที่ผสมน้ำทิ้งๆ 20 เปอร์เซ็นต์
 หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$)

4. ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างน้ำทิ้งและอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ในอาหารสูตร YPD ที่มีการผสมด้วยน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราในสัดส่วนต่างๆ นั้น ก็พบว่าการเจริญของยีสต์ก็มีความแตกต่างกันในอาหารแต่ละสูตรดังแสดงในภาพที่ 5 โดยสูตรที่ให้ผลดีที่สุดคืออาหาร YPD ที่ไม่เติมน้ำทิ้งๆ และอาหาร YPD ที่เติมน้ำทิ้งๆ ในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อย่างไรก็ตาม การเจริญในทั้งสองชุดการทดลองนี้อาจมีความแตกต่างกันบ้างเล็กน้อยในช่วงการเพาะเลี้ยงชั่วโมงที่ 12-24 หลังจากนั้นก็ไม่มีความแตกต่าง แต่การเติมน้ำทิ้งๆ ในสัดส่วนที่สูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจะไม่พบเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตซึ่งผลการทดลองนี้คล้ายกับการศึกษาในสายร่ายสไปรูลิน่า ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้คัดเลือกอาหาร YPD ที่มีส่วนผสมของน้ำทิ้งๆ ในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์สำหรับการศึกษาขั้นต่อไป



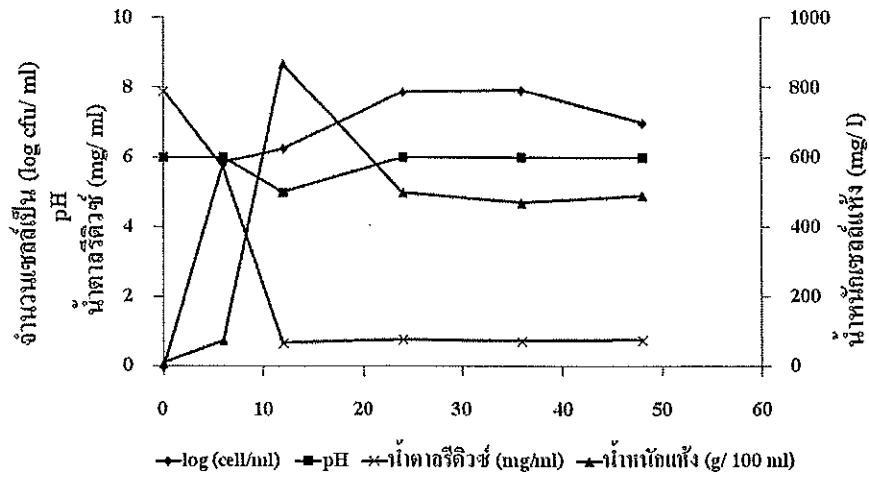
ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารสูตร YPD ที่ผสมน้ำทิ้งๆ ในสัดส่วนต่างๆ

5. การผลิตมวลเซลล์สาหร่ายและศึกษาโคเนติกส์การเจริญของยีสต์

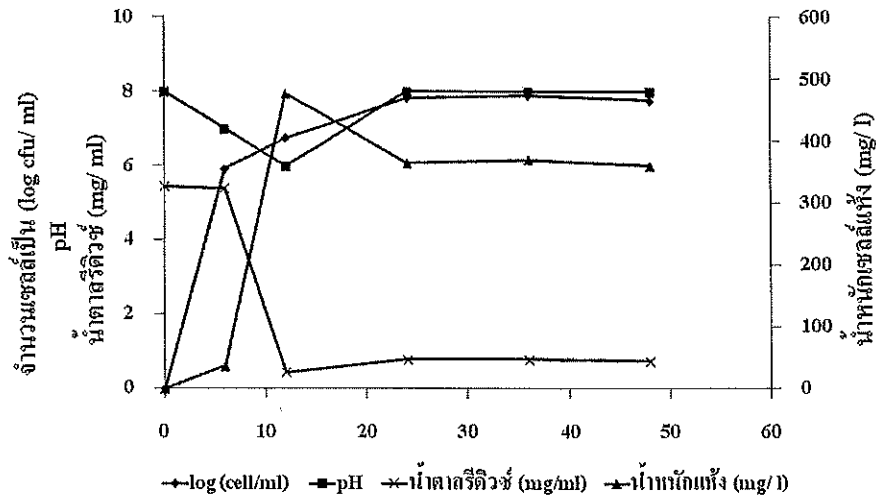
ในการศึกษาผลิตเซลล์ยีสต์ครั้งนี้ไม่ได้ขยายกำลังการผลิตเป็นระดับ 5 ลิตร ดังเช่นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า ยังคงเป็นการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการนั่นคือที่ working volume 200 มิลลิลิตร ซึ่งก็ได้ศึกษารูปแบบการเจริญและการใช้สารอาหารของยีสต์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร YPD (มาตรฐาน) และ YPD ผสมน้ำที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 6 และ 7 จะเห็นได้ว่าการเจริญของยีสต์ในอาหารทั้งสองสูตรมีรูปแบบคล้ายกันคือเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 จากนั้นจะเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของมวลเซลล์แห้ง ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่คงเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น พบว่าสูตรอาหาร YPD จะมีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นที่สูงกว่าประมาณ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แต่ทั้งสองสูตรก็จะพบว่ามีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก สอดคล้องกับการสะสมของมวลเซลล์ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกนี้เช่นกัน เมื่อคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะและค่า Doubling time ของยีสต์ที่เจริญในอาหารทั้งสองสูตร ก็ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 จะเห็นว่าแทบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ในรูปแบบการเจริญของยีสต์ในอาหารทั้งสองสูตร กล่าวคือสามารถใช้น้ำที่ 20 เปอร์เซ็นต์ทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPD ในการเลี้ยงยีสต์ได้ แต่ใช้ในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5 แสดงค่าพารามิเตอร์แสดงการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ

ค่าพารามิเตอร์	อาหาร YPD	อาหาร YPD ผสมน้ำที่ 20 เปอร์เซ็นต์
อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (h^{-1}) (Maximum specific growth rate; μ_{max})	2.24	2.27
Doubling time (h)	0.309	0.305



ภาพที่ 6 แสดงโคเนติกส์การเจริญของเซลล์ยีส *S. cerevisiae* ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรมาตรฐาน



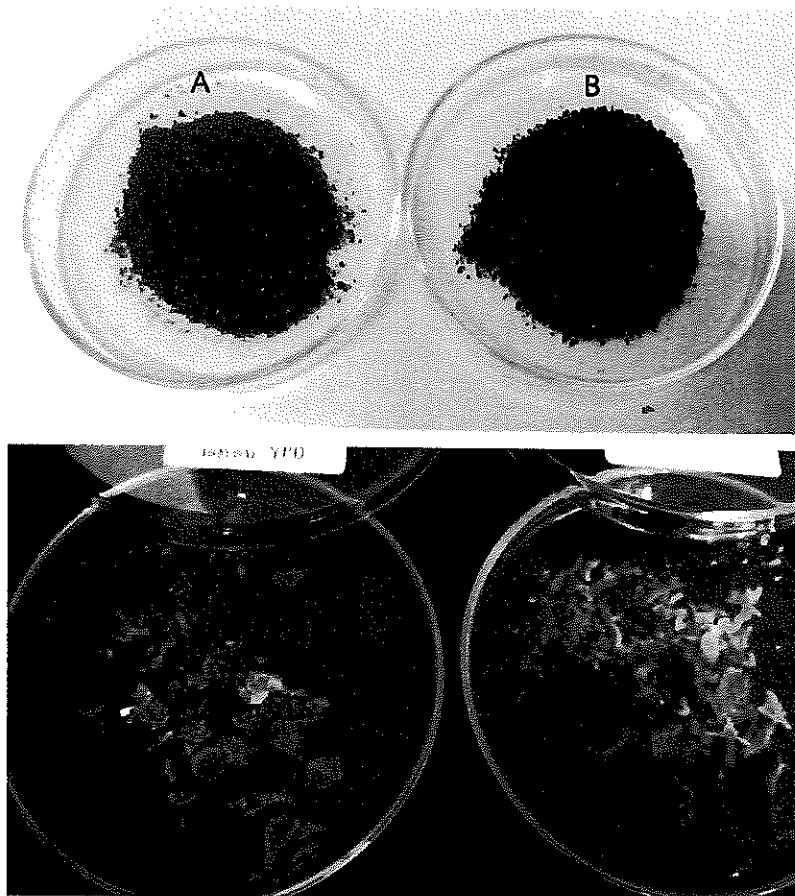
ภาพที่ 7 แสดงโคเนติกส์การเจริญของเซลล์ยีส *S. cerevisiae* ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรมาตรฐานผสมน้ำทิ้งๆ ในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์

6. คุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนเซลล์เดียว

มวลเซลล์ทั้งสาหร่ายสไปรูลิน่าและยีสต์ *S. cerevisiae* จะถูกล้างด้วยน้ำเกลือและทำแห้งก่อนนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนหยาบด้วยวิธี Kjeldahl ผลการทดลองก็ได้แสดงดังตารางที่ 6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการปริมาณโปรตีนหยาบในโปรตีนเซลล์เดี่ยวที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองสูตรแทบไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณโปรตีนหยาบในโปรตีนเซลล์เดี่ยวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรมาตรฐานและอาหารสูตรมาตรฐานที่ผสมน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่น

ชนิดอาหาร	ปริมาณโปรตีนหยาบ (%)	
	สาหร่ายสไปรูลิน่า	ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>
อาหารสูตรมาตรฐาน	43.2	67.8
อาหารสูตรมาตรฐานผสมน้ำทิ้งฯ 20 เปอร์เซ็นต์	42.2	66.2



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะของมวลเซลล์แห้งของสาหร่ายสไปรูลิน่า (บน) และยีสต์ *S. cerevisiae* (ล่าง) เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูตรมาตรฐาน (A) และอาหารสูตรมาตรฐานที่ผสมด้วยน้ำทิ้งฯ 20 เปอร์เซ็นต์ (B)

วิจารณ์ผลการทดลอง

ตัวอย่างน้ำทิ้งที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่นของเกษตรกรรายย่อย ซึ่งใช้กรดซัลฟูริกและกรดฟอสฟอริกในการตกตะกอนเนื้อยางพารา ดังนั้นแม้จะมีสารอาหารจากชั้นชีวมของน้ำยางพาราแล้วยังคงมีกรดปนอยู่ในปริมาณสูง ซึ่งความเป็นกรดที่สูงนี้จะส่งผลเป็นอย่างมากต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิต ซึ่งก็พบว่าโปรตีนเซลล์เดียวทั้งสองชนิดจะตายในทันทีหากไม่มีการปรับสภาพน้ำทิ้งฯ เสียก่อน คาดว่าเกิดจากอนุมลกรตในน้ำทิ้งฯ นั้นเอง จากผลงานวิจัยครั้งนี้ พบว่าสามารถลดต้นทุนค่าอาหารเลี้ยงยีสต์สูตรมาตรฐาน (YPD medium) ลงได้ 20 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นจำนวนเงินประมาณ 24 บาทต่อลิตร (ต้นทุนรวมทั้งสิ้นประมาณ 120 บาทต่อลิตร) ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นตอนปรับสภาพน้ำทิ้งฯ มีต้นทุนที่เพิ่มขึ้นประมาณ 0.16 บาทต่อ 1 ลิตรของน้ำทิ้งฯ (โซดาแอส 0.1 บาท และปูนขาว 0.06 บาท) ซึ่งก็ยังคงคุ้มค่า แต่อย่างไรก็ตาม แม้จะมีราคาที่ไม่สูง แต่ขั้นตอนที่เพิ่มขึ้นนี้ก็จำเป็นปัจจัยที่กระทบต่อความน่าสนใจในการต่อยอดสู่เชิงพาณิชย์ได้ กลิ่นของน้ำทิ้งฯ ก็เป็นอุปสรรคที่สำคัญในการนำน้ำทิ้งฯ มาใช้ประโยชน์ กล่าวคือจะมีกลิ่นที่รุนแรงคล้ายสารประกอบของกำมะถันเกิดขึ้นเมื่อมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ นอกจากนี้เมื่อทำการปรับค่า pH ให้เท่ากับ 10 เพื่อใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า กลับพบว่าเกิดตะกอนขุ่นสีน้ำตาลดำขึ้น ซึ่งกระทบต่อการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสไปรูลิน่าได้ ซึ่งทั้งหมดนี้มีรายงานว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตยางร่วมกับการเติมธาตุอาหารหลักบางตัว ณ ความเข้มแสงที่เหมาะสม คือ 3,500 Lux โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อความเข้มของแสงต่ำกว่า 2,000 Lux สาหร่ายและพืชชั้นสูงจะสามารถใช้พลังงานแสงได้เพียงร้อยละ 20 ของแสงที่ตกกระทบ (สุวรรณี, 2553 อ้างถึง สุมณฑิพย์, 2529) โดยการทดลองนี้มีความเข้มแสงสูงสุดเพียง 1,500 Lux เป็นผลทำให้จำนวนเซลล์ของสาหร่ายมีค่าน้อยกว่าที่ควรจะเป็น

ในการทดลองนี้พบว่ากระบวนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดียวทั้งสองชนิดนั้นจะมีความแตกต่างกัน กล่าวคืออาหารเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าไม่ต้องทำการฆ่าเชื้อในขณะที่อาหารเพาะเลี้ยงยีสต์ต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน ดังนั้นสารอาหารในน้ำทิ้งภายหลังการให้ความร้อนอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงได้ โดยพบว่าปริมาณโปรตีนที่ละลายได้และน้ำตาลรีดิวซ์ที่ละลายได้ลดลงไป 18 และ 83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้คาดว่าจะเกิดจากปฏิกิริยา Maillard โดยสังเกตจากน้ำทิ้งมีการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลภายหลังได้รับความร้อน สารอาหารที่ลดลงนี้จะส่งผลกระทบต่อเจริญของยีสต์ได้ เนื่องจากยีสต์มีการดำรงชีวิตแบบ heterotrophy นั่นคืออาศัยแหล่งอาหารที่เป็นสารอินทรีย์ ในขณะที่สาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตแบบ autotroph คือสามารถสร้างอาหารเองได้จากการสังเคราะห์แสงและใช้ประโยชน์สารประกอบอนินทรีย์ต่างๆ เมื่อพิจารณาการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าซึ่งทำการผสมน้ำทิ้งฯ ลงไปในอาหารด้วยสัดส่วนต่างๆ จึงทำให้ปริมาณธาตุอาหารอนินทรีย์มีความแตกต่างกันด้วยเช่นกันในอาหารแต่ละชุดการทดลอง โดยอาหารสูตรที่ผสมน้ำทิ้งฯ 20, 40, 50, 60, 80, และ 100% มี ปริมาณฟอสเฟต 115.90, 82.87, 71.25, 58.10, 46.18, 16.28 และ 0.94 mg/l ตามลำดับ ปริมาณไนโตรเจน 0.02, 0.03, 0.03, 0.03, 0.03, 0.04 และ 0.05 mg/l ตามลำดับ ปริมาณไนเตรท 23.87, 4.97, 7.00, 4.00, 5.10, 3.80 และ 2.70 mg/l และปริมาณแอมโมเนีย 13.98, 57.23, 86.70, 113.03, 126.73, 157.67 และ 207.13 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาแล้วพบว่าฟอสเฟต ไนโตรเจน และไนเตรทมีปริมาณค่อนข้างน้อย ยกเว้น แอมโมเนียในน้ำซึ่งมีปริมาณที่ค่อนข้างสูง ในอาหารสูตรที่ผสมน้ำทิ้งฯ 50% ขึ้นไปจะทำให้สาหร่ายสไปรูลิน่าไม่สามารถเจริญได้ โดยทั่วไปพบว่าสาหร่ายจะใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนก่อนการใช้ไนเตรท (Badia *et al.*, 1991; Ogonna *et al.*, 2000) แอมโมเนียปริมาณที่สูงเกินไป (200 mg/L) ทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่างก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตได้ถ้าในอาหารมีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงเกินไป (Ogonna *et al.*,

2000) ปริมาณไนโตรเจน ที่มีปริมาณความเข้มข้นสูงเกิน 1 mg/L จะไปมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา อาหารที่ใช้เลี้ยงควรมีไนโตรเจนประมาณ 1.4 -138.5 mg/L (สุวรรณณี, 2553 อ้างถึง Piorreck *et al.*, 1984; Zhenxia *et al.*, 2000) อีกทั้ง Jourdan (2001) รายงานว่า การขาด ฟอสฟอรัสของสาหร่ายมีผลใกล้เคียงกับการขาดไนโตรเจน คือทำให้ปริมาณโปรตีน คลอโรฟิลล์เอ RNA DNA และ ATP ในเซลล์ของสาหร่ายลดลง แต่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น ทำให้รูปร่างเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจาก เดิม เมื่อพิจารณาผลการศึกษาค้นคว้าพบว่า สาหร่ายสไปรูลินาที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ผสมน้ำทิ้งๆ 20% นั้น มีค่า ใกล้เคียงกับผลจากอาหารสูตรมาตรฐาน โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.01$) สอดคล้องกับ ศิริพร และ คณะ (2553) ที่การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาในสูตรอาหารน้ำหมักต้นทุ่นดำ โดยใช้สูตรอาหารน้ำหมักมูล สัตว์บางชนิด ได้แก่ น้ำหมักมูลไก่ น้ำหมักมูลวัว และน้ำหมักมูลม้า และสูตรอาหารน้ำหมักจากเศษพืชเหลือทิ้ง ทางการเกษตร ได้แก่ น้ำหมักฟางข้าว จะเห็นว่าเมื่อใช้สูตรอาหารที่มีอัตราเจือจางของน้ำหมัก 20% ของ ปริมาตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสามารถนำมาเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาได้ โดยมีค่าใกล้เคียงและไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับอาหารสูตร Zarrouk เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพ การเจริญเติบโต คือ จำนวนเซลล์เฉลี่ย ค่าความหนาแน่นของเซลล์เฉลี่ย และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ เฉลี่ยของสาหร่ายสไปรูลินา

เนื่องจากค่า pH ของน้ำทิ้งมีความเป็นกรดที่ค่อนข้างสูง แต่โดยธรรมชาติแล้วยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* มีความสามารถเจริญได้ที่สภาวะกรด ดังนั้นน้ำทิ้งๆ ดังกล่าวนี้น่าจะเหมาะสมที่จะนำมาเพาะเลี้ยง ยีสต์มากกว่าสาหร่ายสไปรูลินา นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายในการเจริญ ไม่ว่าจะเป็น น้ำตาลเฮกโซส เพนโตส และไฮโดรคาร์บอนต่างๆ (Dhanasekaran *et al.*, 2010) สารอาหารที่เป็น ส่วนผสมในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานแต่ละสูตร ล้วนจำเป็นและกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทั้งสิ้น ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ การทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานด้วยน้ำทิ้งๆ นั้นย่อมส่งผลให้สารอาหารที่ จำเป็นลดลงตามไปด้วย ดังนั้นผลผลิตมวลเซลล์ของยีสต์ที่ได้ควรต้องลดลงไปด้วย แต่ผลการทดลองที่ได้กลับ พบว่ามวลเซลล์ที่ผลิตได้นั้นไม่แตกต่างมากนักกับสูตรอาหารมาตรฐาน คาดว่าน่าจะเนื่องมาจากในน้ำทิ้งๆ ก็มี สารอาหารอื่นๆ ที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นองค์ประกอบด้วย ดังที่ได้รายงานไปแล้วข้างต้น ยีสต์ สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้อย่างหลากหลายรวมทั้งแอมโมเนีย ซึ่งพบในปริมาณมากในน้ำทิ้งๆ โดยจะใช้ สังเคราะห์เป็นโปรตีนในเซลล์ เกลือไนโตรเจนที่อยู่ในน้ำทิ้งๆ ก็มีรายงานว่าช่วยกระตุ้นการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ได้ โดยจากการศึกษาของ Akintomide and Antai (2012) ที่เพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์นี้ในเศษ เปลือกของหัวแยม แล้วมีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ แต่ในความเป็นจริงแล้วยีสต์ไม่ได้ใช้ในโตรเจน โดยตรง แต่จะมีการรีดิวซ์ให้เป็นไนโตรเจนและแอมโมเนียเพื่อใช้สังเคราะห์เป็นโปรตีนต่อไป

เป้าหมายของงานวิจัยนี้คือเพื่อผลิตอาหารที่เป็นแหล่งโปรตีนจากจุลินทรีย์สำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ ซึ่งยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* และสาหร่ายสายพันธุ์ *S. platensis* ก็เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ในงานวิจัยนี้ พบว่าสาหร่ายสไปรูลินาที่ผลิตได้จากอาหารสูตรมาตรฐานและสูตรที่ทดแทนด้วยน้ำทิ้งๆ มีโปรตีนเป็น องค์ประกอบประมาณ 42-43 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง แม้ทั้งสองตัวอย่างจะมีโปรตีนไม่แตกต่างกัน แต่ก็ พบว่ามีค่าน้อยกว่ากว่ารายงานวิจัยอื่นๆ เช่น งานวิจัยของศิริพรและคณะ (2553) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ ทดแทนด้วยน้ำหมักมูลสุกร 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วพบว่าสาหร่ายสไปรูลินามีโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูงถึง 55 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ในยีสต์แห้งกลับมีปริมาณสูงกว่ารายงานอื่นๆ เช่น ยีสต์ *Saccharomyces* sp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารตัดแปลงที่ผสมน้ำข้าวฟ่างจะมีปริมาณโปรตีนเพียง 45.25 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง (Konlani *et al.*, 1996) เป็นต้น ทั้งนี้สารอาหารและองค์ประกอบทางเคมีที่มี

ลักษณะเฉพาะของน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่นนี้ น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลอง สามารถสรุปได้ว่าน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่นนี้ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* เนื่องจากมีความเป็นกรดที่ค่อนข้างสูง ทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งฯ เสียก่อน นอกจากนี้การทดแทนสูตรอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐานด้วยน้ำทิ้งฯ ก็ยังทำให้การเจริญของสาหร่ายลดลงอย่างชัดเจน แต่อาจมีความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้งฯ นี้มาใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยสามารถใช้ทดแทนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรมาตรฐานได้ในปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อย่างไรก็ตามการแม้จะลดค่าใช้จ่ายของสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปได้ 20 เปอร์เซ็นต์ (24 บาทต่อลิตร) แต่การที่ต้องเพิ่มขั้นตอนการปรับคุณภาพน้ำทิ้งฯ นั้น ก็อาจจะไม่เป็นที่ยอมรับในทางปฏิบัติ แม้ค่าใช้จ่ายของสารเคมีที่ใช้ปรับสภาพน้ำทิ้งฯ จะมีเพียง 0.16 บาทต่อลิตรก็ตาม

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

เนื่องจากมีความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่นมาใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แต่กระบวนการนำน้ำทิ้งฯ มาใช้ยังคงซับซ้อน ดังนั้นควรศึกษาหาวิธีการปรับสภาพน้ำทิ้งฯ ให้ง่ายและมีประสิทธิภาพมากขึ้น รวมทั้งควรมีการศึกษาการขยายกำลังการผลิตมวลเซลล์ยีสต์ให้สูงขึ้นด้วย

เอกสารอ้างอิง

- วรภรณ์ ขจรไชยกูล. 2549. ยางธรรมชาติ: การผลิตและการใช้งาน. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ซีโน ดีไซน์ (หน้า 17). สมใจ ศิริโชค. 2550. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ (หน้า 286-308)
- สุวรรณณี ไทยอุดมทรัพย์. 2553. การเพาะเลี้ยงสไปรูไลนาในอาหารอินทรีย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 133 หน้า.
- ศิริพร ชูเชิด, ขจรเกียรติ ศรีนวลสม, สิทธิชัย พัฒนเกียรติชิวิน, จงกล พรหมยะ, บัญญัติ มนเทียรอาสน์ และศิริเพ็ญ ตรีโยชยาพร. 2553. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูไลนา (*Spirulina platensis*) ในสูตรอาหารน้ำหมักต้นทุนต่ำ. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง 4: 26-33.
- Akintomide, M.J. and Antai, S.P. 2012. Inorganic nitrogen supplementation and micro-fungal fermentation of white Yam peels (flour) into single cell protein. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2(3): 820-832.
- Baldia, S.F., Fukami, K. and Nishijima, T.Y. 1991. Growth characteristics of a blue green algal *Spirulina platensis* for nitrogen utilization. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57(4): 645-654.
- Bruno, R.G.S., Rutigliano, H.M., Cerri, R.L., Robinson, P.H. and Santos, J.E.P. 2009. Effect of feeding *Saccharomyces cerevisiae* on performance of dairy cows during summers heat stress. *Animal Feed Science and Technology* 150: 175-186.
- Dhanasekaran, D., Lawanya, S., Saha, S., Thajuddin, N. and Panneerselvam. A. 2011. Production single cell protein from pineapple waste using yeast. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 8: 26-32.
- Faust, U., Prave, P., Dorsemagen, B., Hofer, N. U.S.Patent 4,346,113 (1982).
- Gao, J., Zhang, H.J., Yu, S.H., Wu, S.G., Yoon, I., Quigley, J., Gao, Y.P. and Qi, G.H. 2008. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. *Poultry Science* 87: 1377-1384.
- Habib, M.A. and Parvin, T.C. 2008. A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*.
- Jourdan, J.P. 2001. Grow your own *Spirulina*. [Online]. Available : http://www.antenna.ch/en/documents/Jourdan_UK.pdf (accessed on March 6, 2013)
- Khan, M., Khan, S.S., Ahmed, Z. and Tanveer, A. 2010. Production of single cell protein from *Saccharomyces cerevisiae* by utilizing fruit wastes. *Nanobiotechnica Universale* 1: 127-132.
- Konlani, S., Delgenes, J.P., Moletta, R., Traore, A. and Doh, A. 1996. Optimization of cell yield of *Candida krusei* SO1 and *Saccharomyces* sp. LK3G cultured in sorghum hydrolysate. *Bioresource Technology* 57: 275-281.
- Kosaric, N., Nguyen, H.T. and Bergougou, M.A. 1974. Growth of *Spirulina maxima* algae

- in effluents from secondary waste-water treatment plants. *Biotechnology and Bioengineering* 16: 881-896.
- Li, P. and Gatlin, D.M. 2003. Evaluation of brewer yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *Aquaculture* 219: 681-692.
- Mohammadi, M., Man, H.C., Hassan, M. and Yee, P.L. 2010. Treatment of wastewater from rubber industry in Malaysia. *African Journal of Biotechnology* 9: 6233-6243.
- Nancib, N., Nancib, A. and Boudrant, J. 1997. Use of waste date products in the fermentative formation of baker's yeast biomass by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* 60: 67-71.
- Nasserí, A.T., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M.H. and Ghasemi, Y. 2011. Single cell protein: production and process. *American Journal of Food Technology* 6: 103-116.
- Ogbonna, J.C., Yoshizawa, H. and Tanaka, H. 2000. Treatment of high strength organic waste water by a mixed culture of photosynthetic microorganism. *Journal of Applied Physiology* 12(3-5): 277-284.
- Ojokoh, A.O. and Uzeh, R.E. 2005. Production of *Saccharomyces cerevisiae* biomass in papaya extract medium. *African Journal of Biotechnology* 4: 1281-1284.
- Parajo, J.C., Santos, V., Dominguez, H. Vazquez, M. and Alvarez, C. 1995. Protein concentrates from yeast cultured in wood hydrolysates. *Food Chemistry* 53: 157-163.
- Plmp, P.J.A.M., U.S. Patent 5,916,609 (1999).
- Shen, Y.B., Piao, X.S., Kim, S.W., Wang, L., Liu, P., Yoon, I. and Zhen, Y.G. 2009. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 87: 2614-2624.
- Singh, J.K., Meshram, R.L. and Ramteke, D.S. 2011. Production of single cell protein and removal of COD from dairy waste water. *European Journal of Experimental Biology* 1: 209-215.
- Stineman, T.L., Edwards, J.D., Grosskopf, J.C., U.S. Patent 4,192,918 (1980).
- Tekasakul, P. and Tekasakul, S. 2006. Environmental problems related to natural rubber production in Thailand. *J. Aerosol Res.* 21: 122-129.
- Toyomizu, M., Sato, K., Taroda, H., Kato, T. and Akiba, Y. 2001. Effects of dietary *Spirulina* on meat colour in muscle of broiler chickens. *British Poultry Science* 42: 197-202.
- Ungsethaphand, T., Peerapornpisal, Y., Whangchai, N. and Sardud, U. Effect of feeding *Spirulina platensis* on growth and carcass composition of hybrid red tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*). *Maejo International Journal of Science and Technology* 4: 331-336.

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผน กิจกรรมที่ดำเนินการ และผลที่ได้รับ

วัตถุประสงค์	กิจกรรม	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดี่ยวด้วยสูตรอาหารที่มีส่วนประกอบเป็นน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางแผ่น	1. สำรวจและรวบรวมน้ำทิ้ง	ดำเนินการแล้ว	ได้ตัวอย่างน้ำทิ้งสำหรับงานวิจัย
	2. วิเคราะห์องค์ประกอบสารอาหารในน้ำทิ้ง	ดำเนินการแล้ว	ทราบองค์ประกอบและสารอาหารเริ่มต้นในน้ำทิ้ง ดังแสดงในรายงาน
	3. วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของน้ำทิ้ง	ไม่ได้ดำเนินการ	-
	4. ศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของน้ำทิ้งและสูตรอาหารทั่วไปในการเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดี่ยว	ดำเนินการแล้ว	พบว่าการเติมน้ำทิ้งในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์เป็นปริมาณที่ส่งผลกระทบต่อการเติบโตของโปรตีนเซลล์เดี่ยวน้อยที่สุด
	5. ศึกษาโคเนติกส์การเจริญของโปรตีนเซลล์เดี่ยว	ดำเนินการแล้ว	การเจริญของสาหร่ายสไปรูลิน่าในอาหารที่เสริมด้วยน้ำทิ้ง พบว่าน้อยกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐาน ในขณะที่การเจริญของยีสต์นั้น ไม่แตกต่าง
	6. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนเซลล์เดี่ยว	วิเคราะห์เพียงโปรตีน	ปริมาณโปรตีนในโปรตีนเซลล์เดี่ยวทั้งสองชนิดที่เลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐานและที่เลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง พบว่าใกล้เคียงกัน
	7. จัดทำรายงาน	ดำเนินการแล้ว	ได้รายงาน

ภาคผนวก 3
ร่างบทความงานวิจัย

ความเป็นไปได้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี
น้ำทิ้งกระบวนการผลิตยางแผ่นเป็นองค์ประกอบ
Feasibility study of single cell protein production using effluent
from rubber sheet production

ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน^{1*}, วรวิทย์ รื่องหาญแก้ว², อัจฉรารัตน์ คล่องแคล้ว¹

¹ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

² คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

*Corresponding author: pairote@mju.ac.th

บทคัดย่อ

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่นของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในอำเภอภูซาง จังหวัดพะเยา มีองค์ประกอบทางเคมีมากมาย ได้แก่ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท ฟอสเฟส น้ำตาล โปรตีน และสารอินทรีย์อื่นๆ ในปริมาณ 207.13, 0.045, 2.70, 0.94, 0.42, 3.64 และ 7,200 มิลลิกรัม/ลิตร ดังนั้นคาดว่าจะสามารถใช้เป็นสารอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ ภายหลังจากปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ความกระด้าง และกำจัดของแข็งแขวนลอยของน้ำทิ้งดังกล่าวแล้วจึงนำมาศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียวสำหรับเลี้ยงสัตว์ ผลการศึกษาพบว่าการใช้น้ำทิ้งเป็นองค์ประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรมาตรฐานมีผลทำให้สาหร่ายสไปรูลิน่าตาย คาดว่าเนื่องจากอนุมูลกรดที่หลงเหลือในน้ำทิ้ง ในขณะที่การผสมน้ำทิ้งในอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐานสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์นั้น พบว่าสามารถใช้ได้ที่สัดส่วนต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 2.27 ชั่วโมง⁻¹ และค่า Doubling time เท่ากับ 0.305 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนหยาบของโปรตีนเซลล์เดียวแต่ละชนิดพบว่าไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐานและอาหารสูตรมาตรฐานที่ผสมด้วยน้ำทิ้ง 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

ABSTRACT

Effluent obtained from para rubber sheet processing of rubber plantation farmers in Phusang District, Phayao, contains many chemical components; i.e. ammonia, nitrite, nitrate, phosphate, sugar, protein and other organic compounds at the concentration of 207.13, 0.045, 2.70, 0.94, 0.42, 3.64 and 7,200 mg/L. Thus, it might be applied as nutritional source in microbial media. After pH, hardness and suspended solids of effluent were treated; possibility of algal *Spirulina platensis* and yeast *Saccharomyces cerevisiae* production using this effluent was studied. The results revealed that no growth of *S. platensis* was observed when standard culture medium was supplemented by effluent. Remaining acid radicals in effluent might be the main effect. In case of yeast cultivation, it was shown that supplementation of effluent to standard culture medium at less than 20 percent by volume had no effect on yeast growth. Its maximum growth rate and doubling time were 2.27 hr⁻¹ and 0.305 hr; respectively. However, crude protein content of each single cell protein was not different when cultured in standard culture medium and standard culture medium with effluent supplementation.

คำนำ

น้ำยางพาราสดนั้น นอกจากจะประกอบไปด้วย ส่วนที่เป็นเนื้อยางแล้ว ยังมีองค์ประกอบอื่นๆ อีกมากมาย ทั้งสารอินทรีย์และสารอินทรีย์อยู่ในชั้นชีรัม เช่น โพรตีน คาร์โบไฮเดรต neutral lipids, glycolipid, phospholipid และสารอินทรีย์อื่นๆ เป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 1.4, 1.6, 1.0, 0.6 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง (วารกรณ์, 2549) ดังนั้นจึงคาดว่าในน้ำทิ้งที่ได้ภายหลังจากกระบวนการผลิต ยางแผ่นของเกษตรกร ย่อมมีสารอาหารหลงเหลืออยู่ด้วย ส่วนน้ำทิ้งจากการผลิตยางแผ่นก็มีรายงานถึงองค์ประกอบ ต่างๆ นั่นคือมีค่า BOD COD และไนโตรเจนทั้งหมดอยู่ใน ช่วงประมาณ 1500-7000, 3500-14000 และ 200-1800 มก./ลิตร ตามลำดับ (Mohammadi et al., 2010) มี ปริมาณของแข็งแขวนลอย ฟอสฟอรัสทั้งหมด และซัลเฟต เท่ากับ 93-525, 14.9-21.6, 136-472.6 มก./ลิตร ตามลำดับ และค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 5.0-5.9 (Tekasakul and Tekasakul, 2006) องค์ประกอบเหล่านี้ น่าจะมีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโต ของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่ศึกษาความเป็นไป ได้ในการนำน้ำทิ้งที่อุดมด้วยสารอาหารเหล่านี้มาใช้ให้เกิด ประโยชน์มากกว่าปล่อยให้สร้างปัญหาภาวะแฉะขุมขนและ สิ่งแวดล้อม โดยแนวทางการใช้ประโยชน์ที่นำเสนอครั้งนี้คือ นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โพรตีนเซลล์เดี่ยว (Single cell protein) สำหรับใช้เป็น อาหารเสริมของสัตว์เลี้ยงเศรษฐกิจ เช่น สุกร สัตว์ปีก โค และกระบือ เป็นต้น โดยโปรตีนเซลล์เดี่ยวที่สนใจผลิตขึ้นนี้ ได้แก่ สาหร่ายสไปรูลิน่า (*Spirulina platensis*) และยีสต์ สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* หากพบว่า สารอาหารในน้ำทิ้งเหล่านี้สามารถช่วยลดปริมาณการใช้ สารเคมีของสูตรอาหารมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงโปรตีน เซลล์เดี่ยวได้แล้ว ก็จะช่วยลดต้นทุนค่าสารเคมีในการ เพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดี่ยวลงได้ หรือแม้กระทั่งเกษตรกรผู้ เลี้ยงสัตว์ในท้องถิ่นก็จะสามารถนำองค์ความรู้นี้ไปใช้ผลิต อาหารเสริมให้กับสัตว์เลี้ยงของตนได้เช่นกัน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์โปรตีนเซลล์เดี่ยว

ใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าสายพันธุ์ *Spirulina platensis* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเทคโนโลยี ประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ส่วนยีสต์ที่ ใช้คือสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* จาก

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2. ตัวอย่างน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่น

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างน้ำทิ้งๆ จากเกษตรกรผู้ ปลูกและผลิตยางแผ่นในพื้นที่ อ.ภูซาง จ.พะเยา จำนวน 4 ราย จากนั้นกำจัดของแข็งขนาดใหญ่ด้วยการกรองผ่านผ้า ขาวบาง ส่วนตะกอนแขวนลอยขนาดเล็กกำจัดด้วยการเติม ปูนขาวในอัตราส่วน 15 กรัมต่อน้ำทิ้ง 1 ลิตร จากนั้นปรับ ความกระด้างของน้ำด้วยการเติมโซดาแอช ในปริมาณ 7 กรัมต่อน้ำทิ้ง 1 ลิตร หรือจนกว่าค่าความกระด้างอยู่ที่ 50-100 มก./ลิตร (วัดค่าความกระด้างด้วยวิธี EDTA titrimetric) และสุดท้ายตกตะกอนอีกครั้งด้วยสารส้ม (25-30 กรัม/ลิตร)

3. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งๆ และองค์ประกอบทางเคมี

ทำการวิเคราะห์ไนโตรที่ ไนโตรเจน (Nitrite nitrogen; $\text{NO}_2\text{-N}$) โดยวิธีการวัดสี (Colorimetric method; Reddish purple azo dye method) (APHA-AWWA, 1998) วิเคราะห์ไนเตรท ไนโตรเจน (Nitrate nitrogen; $\text{NO}_3\text{-N}$) โดยวิธีการ Cadmium Reduction method (Strickland and Parsons, 1972) วิเคราะห์ แอมโมเนีย ไนโตรเจน (Ammonia nitrogen; $\text{NH}_3\text{-N}$) โดย วิธีการ nesslerization method (APHA-AWWA, 1998) วิเคราะห์ออร์โธฟอสเฟต ฟอสฟอรัส (Orthophosphate phosphorus; $\text{PO}_4\text{-P}$) โดยวิธีการ Ascorbic acid method (APHA-AWWA, 1998) วิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม (Cd) โดยวิธี ASS, ICP MS วิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว (Pb) โดยวิธี ASS, ICP MS วิเคราะห์ปริมาณ Chemical Oxygen Demand โดยวิธี Close Reflux Titrimetric Method (APHA-AWWA, 1998)

4. ความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า

ภาชนะที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มล. และโหลแก้วทรงกระบอกขนาด 5 ลิตร ให้ แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ และให้อากาศผ่านปั๊มลมและ หัวทราย ดังแสดงในภาพที่ 1 ระหว่างการเพาะเลี้ยงจะมีการ บันทึกอุณหภูมิและความชื้นด้วยอุปกรณ์ Data logger และ มีการบันทึกความสว่างด้วย Lux meter จากนั้นทำการศึกษา อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างน้ำทิ้งและอาหารเพาะเลี้ยง สาหร่ายสไปรูลิน่า โดยปรับค่า pH ของน้ำทิ้งให้มี ค่าประมาณ 10 จากนั้นผสมน้ำทิ้งกับอาหารเพาะเลี้ยง สาหร่ายสูตรมาตรฐานในอัตราส่วนตั้งแต่ 0-100 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เติมหิวเชื้อสาหร่ายลงไปจนกระทั่งมีค่าการ

ดูคลื่นแสงที่ 560 nm เท่ากับ 0.8 ทำการเพาะเลี้ยงในระบบที่ออกแบบไว้ จากนั้นเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 14 วัน แล้วทำการวัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่าการดูดแสงที่ 560 nm นับจำนวนเซลล์สาหร่ายด้วยวิธี Drop microtransect วัดค่า pH ด้วยกระดาษลิตมัส วัดอุณหภูมิ data logger และวัดแสงด้วย Lux meter ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง และคัดเลือกสัดส่วนของน้ำทิ้งที่เหมาะสมที่สุดในการทดลองต่อไป

ภายหลังจากได้สูตรอาหารที่คัดเลือกแล้ว ซึ่งมีการผสมน้ำทิ้งลงไป ก็จะได้ทำการนำมาเพาะเลี้ยงในขนาดการผลิตที่ใหญ่ขึ้นระดับ 5 ลิตรเพื่อผลิตมวลเซลล์ เปรียบเทียบกับการผลิตมวลเซลล์ในอาหารสูตรมาตรฐาน ทั้งนี้ระหว่างการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน จะมีการเก็บตัวอย่างอาหารเพื่อวัดการเจริญของสาหร่าย และคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; μ) และค่าระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า (Doubling time; t_d) โดยสมการดังต่อไปนี้

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate: μ)

$$\mu = \frac{\ln(X_i/X_0)}{T_i - T_0}$$

ระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า (Doubling Time: t_d)

$$t_d = 0.693/\mu$$

เมื่อ

X_i = น้ำหนักเซลล์ในช่วงที่เพาะเลี้ยง

X_0 = น้ำหนักจำนวนเซลล์เริ่มต้น

T_i = ช่วงวันที่ทำการเพาะเลี้ยง

T_0 = วันที่เริ่มต้น

มวลเซลล์ที่ผลิตได้จากทั้ง 2 ชุดการทดลองจะถูกนำไปทำแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส แล้วบดให้ละเอียดก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนหยาบ (Crude protein) ด้วยวิธี Kjeldahl ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. ความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Sacharomyces cerevisiae*

ภาชนะที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ ขวดรูปخمพู่ ขนาด 500 มล. มีการให้อากาศด้วยการเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 150 rpm และไม่มีการ

ควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นทำการศึกษ้อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างน้ำทิ้งและอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์โดยผสมน้ำทิ้งกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPD ในอัตราส่วนตั้งแต่ 0-100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7.0 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที เติมหิวเชื้อยีสต์ลงไปปริมาณ 10^8 เซลล์/ 100 มล. เพาะเลี้ยงด้วยระบบที่กำหนดไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น วัดการเจริญของยีสต์ด้วยการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์และ Heamacytometer ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง และคัดเลือกสัดส่วนของน้ำทิ้งที่เหมาะสมที่สุดในการทดลองต่อไป

ภายหลังจากได้สูตรอาหารที่คัดเลือกแล้ว ก็จะได้ทำการนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตมวลเซลล์ เปรียบเทียบกับการผลิตมวลเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPD โดยจะทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์ค่าการเจริญของยีสต์ ค่า pH และค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และค่าระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า

มวลเซลล์ที่ผลิตได้จากทั้ง 2 ชุดการทดลองจะถูกนำไปทำแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส แล้วบดให้ละเอียดก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนหยาบ (Crude protein) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ผลการวิจัย

1. ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่น

พบว่าน้ำทิ้งที่รวบรวมได้จากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่นซึ่งมีชีวมวลอยู่ด้วยนั้นจะมีองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อนำมาผสมกับสูตรอาหารเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดียวทั้งสองสูตรแล้ว ก็จะพบว่าองค์ประกอบเหล่านี้ก็จะมีปริมาณแตกต่างกันไปตามสัดส่วนที่ผสมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งคาดว่าองค์ประกอบเหล่านี้สามารถใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญของทั้งสาหร่าย *S. platensis* และยีสต์ *S. cerevisiae* ได้

2. ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างน้ำทิ้งและอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

พบว่าอัตราการเจริญของสาหร่ายสไปรูลินาในอาหารที่ไม่เติมน้ำทิ้งมีค่าสูงสุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ ที่มีการผสมน้ำทิ้งฯ ลงไปอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ในขณะที่เมื่อแทนที่อาหารเพาะเลี้ยงด้วยน้ำทิ้งฯ ในปริมาณ

ตั้งแต่ 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปก็จะไม่พบการเจริญของสาหร่ายเลย ดังแสดงในภาพที่ 2 และผลการวิเคราะห์ทางสถิติก็ได้แสดงในตารางที่ 2

แม้จะพบว่าการผสมน้ำทิ้งๆ ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าจะทำให้การเจริญของสาหร่ายลดลง แต่การทดแทนอาหารด้วยน้ำทิ้งๆ ในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์ก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษาต่อเป็นอย่างมาก เนื่องจากการเจริญของสาหร่ายลดลงไม่มากแต่สามารถประหยัดต้นทุนค่าสารเคมีในอาหารเพาะเลี้ยงลงไปได้บางส่วน จึงได้คัดเลือกอาหารสูตรนี้ในการศึกษาต่อไป

3. การผลิตมวลเซลล์สาหร่ายและศึกษาโคเนติกส์การเจริญของสาหร่าย

เมื่อทดสอบเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าในขนาดการผลิตระดับ 5 ลิตร โดยเปรียบเทียบระหว่างอาหารสูตรมาตรฐานที่ผสมด้วยน้ำทิ้งๆ ในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และอาหารสูตรมาตรฐานแล้ว ก็พบว่าการเจริญของสาหร่ายสไปรูลิน่าแสดงดังภาพที่ 3 ซึ่งมีการเพิ่มจำนวนขึ้นตามระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น โดยสูตรมาตรฐานที่ไม่เติมน้ำทิ้งๆ ก็ยังคงมีการเจริญที่สูงกว่าสูตรที่ผสมน้ำทิ้งๆ 20 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังแสดงผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 3

เมื่อเปรียบเทียบค่าอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายสไปรูลิน่าในอาหารทั้งสองสูตรแล้วก็ยังคงพบว่าสูตรอาหารที่ผสมน้ำทิ้งๆ 20 เปอร์เซ็นต์ สาหร่ายสไปรูลิน่ามีอัตราการเจริญจำเพาะที่ต่ำกว่าการเจริญในอาหารสูตรมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับค่า Doubling time ที่พบว่าสาหร่ายที่เจริญในสูตรอาหารที่ผสมน้ำทิ้งๆ 20 เปอร์เซ็นต์ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าใช้นานกว่าที่เจริญในอาหารสูตรมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 4

4. ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างน้ำทิ้งและอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ในอาหารสูตร YPD ที่มีการผสมด้วยน้ำทิ้งจากระบวนการผลิตยางพาราในสัดส่วนต่างๆ นั้น ก็พบว่าการเจริญของยีสต์ก็มีความแตกต่างกันในอาหารแต่ละสูตรดังแสดงในภาพที่ 5 โดยสูตรที่ให้ผลดีที่สุดคืออาหาร YPD ที่ไม่เติมน้ำทิ้งๆ และอาหาร YPD ที่เติมน้ำทิ้งในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อย่างไรก็ตาม การเจริญในทั้งสองชุดการทดลองนี้อาจมีความแตกต่างกันบ้างเล็กน้อยในช่วงการเพาะเลี้ยง ชั่วโมงที่ 12-24 หลังจากนั้นก็ไม่มีความแตกต่าง แต่การเติมน้ำทิ้งๆ ในสัดส่วนที่สูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจะไม่พบเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตซึ่งผลการทดลองนี้คล้ายกับการศึกษาใน

สาหร่ายสไปรูลิน่า ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้คัดเลือกอาหาร YPD ที่มีส่วนผสมของน้ำทิ้งๆ ในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์สำหรับการศึกษาขั้นต่อไป

5. การผลิตมวลเซลล์สาหร่ายและศึกษาโคเนติกส์การเจริญของยีสต์

ในการศึกษาผลิตเซลล์ยีสต์ครั้งนี้ไม่ได้ขยายกำลังการผลิตเป็นระดับ 5 ลิตร ดังเช่นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า ยังคงเป็นการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการนั่นคือที่ working volume 200 มิลลิลิตร ซึ่งก็ได้ศึกษารูปแบบการเจริญและการใช้สารอาหารของยีสต์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร YPD (มาตรฐาน) และ YPD ผสมน้ำทิ้ง 20 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 6 และ 7 จะเห็นได้ว่าการเจริญของยีสต์ในอาหารทั้งสองสูตรมีรูปแบบคล้ายกันคือเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 จากนั้นจะเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของมวลเซลล์แห้ง ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่คงเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น พบว่าสูตรอาหาร YPD จะมีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นที่สูงกว่าประมาณ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แต่ทั้งสองสูตรก็จะพบว่าปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก สอดคล้องกับการสะสมของมวลเซลล์ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกนี้เช่นกัน เมื่อคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะและค่า Doubling time ของยีสต์ที่เจริญในอาหารทั้งสองสูตร ก็ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4 จะเห็นว่าแทบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ในรูปแบบการเจริญของยีสต์ในอาหารทั้งสองสูตร กล่าวคือสามารถใช้น้ำทิ้งๆ ทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPD ในการเลี้ยงยีสต์ได้ แต่ใช้ในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์

6. คุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนเซลล์เดียว

มวลเซลล์ทั้งสาหร่ายสไปรูลิน่าและยีสต์ *S. cerevisiae* จะถูกล้างด้วยน้ำเกลือและทำแห้งก่อนนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนหยาบด้วยวิธี Kjeldahl ผลการทดลองก็ได้แสดงดังตารางที่ 5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการปริมาณโปรตีนหยาบในโปรตีนเซลล์เดียวที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองสูตรแทบไม่มีความแตกต่างกัน

วิจารณ์ผลการทดลอง

ตัวอย่างน้ำทิ้งที่นำมาใช้ในการศึกษาค้นครั้งนี้เป็นน้ำทิ้งจากระบวนการผลิตยางพาราแผ่นของเกษตรกรรายย่อย ซึ่งใช้กรดซัลฟูริกและกรดฟอสฟอริกในการตกตะกอนเนื้อยางพารา ดังนั้นแม้จะมีสารอาหารจากชั้นชีวมของน้ำยางพาราแล้วยังคงมีกรดปนอยู่ในปริมาณสูง ซึ่งความเป็นกรดที่สูงนี้จะส่งผลเป็นอย่างมากต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิต

ซึ่งก็พบว่าโปรตีนเซลล์เดียวทั้งสองชนิดจะตายในทันทีหากไม่มีการปรับสภาพน้ำทิ้งฯ เสียก่อน คาดว่าเกิดจากอนุโมลกรดในน้ำทิ้งฯ นั้นเอง จากงานวิจัยนี้ พบว่าสามารถลดต้นทุนค่าอาหารเลี้ยงยีสต์สูตรมาตรฐาน (YPD medium) ลงได้ 20 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นจำนวนเงินประมาณ 24 บาทต่อลิตร (ต้นทุนรวมทั้งสิ้นประมาณ 120 บาทต่อลิตร) ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นตอนปรับสภาพน้ำทิ้งฯ มีต้นทุนที่เพิ่มขึ้นประมาณ 0.16 บาทต่อ 1 ลิตรของน้ำทิ้งฯ (โซดาแอส 0.1 บาท และปูนขาว 0.06 บาท) ซึ่งก็ยังคุ้มค่า แต่อย่างไรก็ตาม แม้จะมีราคาที่ไม่สูง แต่ขั้นตอนที่เพิ่มขึ้นนี้ก็เป็นที่กังวลที่กระทบต่อความน่าสนใจในการต่อยอดสู่เชิงพาณิชย์ได้ กลับของน้ำทิ้งฯ ก็เป็นอุปสรรคที่สำคัญในการนำน้ำทิ้งฯ มาใช้ประโยชน์ กล่าวคือจะมีกลิ่นที่รุนแรงคล้ายสารประกอบของกำมะถันเกิดขึ้นเมื่อมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ นอกจากนี้เมื่อทำการปรับค่า pH ให้เท่ากับ 10 เพื่อใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา กลับพบว่าเกิดตะกอนขุ่นสีน้ำตาลดำขึ้น ซึ่งกระทบต่อการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสไปรูลินาได้ ซึ่งทั้งนี้มียางานว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตยางร่วมกับการเติมธาตุอาหารหลักบางตัว ณ ความเข้มแสงที่เหมาะสม คือ 3,500 Lux โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อความเข้มของแสงต่ำกว่า 2,000 Lux สาหร่ายและพืชชั้นสูงจะสามารถใช้พลังงานแสงได้เพียงร้อยละ 20 ของแสงที่ตกกระทบ (สุวรรณณี, 2553 อ้างถึง สุนนทพิทย์, 2529) โดยการทดลองนี้มีความเข้มแสงสูงสุดเพียง 1,500 Lux เป็นผลทำให้จำนวนเซลล์ของสาหร่ายมีค่าน้อยกว่าที่ควรจะเป็น

ในการทดลองนี้พบว่ากระบวนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดียวทั้งสองชนิดนั้นจะมีความแตกต่างกัน กล่าวคืออาหารเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาไม่ต้องการฆ่าเชื้อ ในขณะที่อาหารเพาะเลี้ยงยีสต์ต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน ดังนั้นสารอาหารในน้ำทิ้งภายหลังจากให้ความร้อนอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงได้ โดยพบว่าปริมาณโปรตีนที่ละลายได้และน้ำตาลรีดิวซ์ที่ละลายได้ลดลงไป 18 และ 83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้คาดว่าจะเกิดจากปฏิกิริยา Maillard โดยสังเกตจากน้ำทิ้งที่มีการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล ภายหลังได้รับความร้อน สารอาหารที่ลดลงนี้จะส่งผลกระทบต่อการเจริญของยีสต์ได้ เนื่องจากยีสต์มีการดำรงชีวิตแบบ heterotrophy นั่นคืออาศัยแหล่งอาหารที่เป็นสารอินทรีย์ ในขณะที่สาหร่ายสไปรูลินาเป็นสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตแบบ autotroph คือสามารถสร้างอาหารเองได้จากการสังเคราะห์แสงและใช้ประโยชน์สารประกอบอนินทรีย์ต่างๆ เมื่อพิจารณาการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาซึ่งทำการผสมน้ำทิ้งฯ ลงไปในอาหารด้วยสัดส่วนต่างๆ จึงทำให้ปริมาณธาตุอาหารอนินทรีย์มีความแตกต่างกันด้วยเช่นกันในอาหารแต่ละชุดการทดลอง โดยอาหารสูตรที่ผสมน้ำทิ้งฯ

20, 40, 50, 60, 80, และ 100% มี ปริมาณฟอสเฟต 115.90, 82.87, 71.25, 58.10, 46.18, 16.28 และ 0.94 mg/l ตามลำดับ ปริมาณไนโตรเจน 0.02, 0.03, 0.03, 0.03, 0.03, 0.04 และ 0.05 mg/l ตามลำดับ ปริมาณไนเตรท 23.87, 4.97, 7.00 ,4.00, 5.10, 3.80 และ 2.70 mg/l และปริมาณแอมโมเนีย 13.98, 57.23, 86.70, 113.03, 126.73, 157.67 และ 207.13 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาแล้วพบว่าฟอสเฟต ไนโตรเจน และไนเตรทมีปริมาณค่อนข้างน้อย ยกเว้น แอมโมเนียในน้ำซึ่งมีปริมาณที่ค่อนข้างสูง ในอาหารสูตรที่ผสมน้ำทิ้งฯ 50% ขึ้นไปจะทำให้สาหร่ายสไปรูลินาไม่สามารถเจริญได้ โดยทั่วไปพบว่าสาหร่ายจะใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนก่อนการใช้ไนเตรท (Badia et al., 1991; Ogbonna et al., 2000) แอมโมเนียปริมาณที่สูงเกินไป (200 mg/L) ทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่างก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตได้ถ้าในอาหารมีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงเกิน (Ogbonna et al., 2000) ปริมาณไนเตรท ที่มีปริมาณความเข้มข้นสูงเกิน 1 mg/L จะไปมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา อาหารที่ใช้เลี้ยงควรมีไนเตรทประมาณ 1.4 -138.5 mg/L (สุวรรณณี, 2553 อ้างถึง Piorreck et al., 1984; Zhenxia et al., 2000) อีกทั้ง Jourdan (2001) รายงานว่า การขาดฟอสฟอรัสของสาหร่ายมีผลใกล้เคียงกับการขาดไนโตรเจน คือทำให้ปริมาณโปรตีน คลอโรฟิลล์เอ RNA DNA และ ATP ในเซลล์ของสาหร่ายลดลง แต่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น ทำให้รูปร่างเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เมื่อพิจารณาผลการศึกษานี้จะพบว่า สาหร่ายสไปรูลินาที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ผสมน้ำทิ้งฯ 20% นั้น มีค่าใกล้เคียงกับผลจากอาหารสูตรมาตรฐาน โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.01$) สอดคล้องกับ ศิริพร และคณะ (2553) ที่การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาในสูตรอาหารน้ำหมักต้นทุนต่ำ โดยใช้สูตรอาหารน้ำหมักมูลสัตว์บางชนิด ได้แก่ น้ำหมักมูลไก่ น้ำหมักมูลวัว และน้ำหมักมูลม้า และสูตรอาหารน้ำหมักจากเศษพืชเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ น้ำหมักฟางข้าว จะเห็นว่าเมื่อใช้สูตรอาหารที่มีอัตราเจือจางของน้ำหมัก 20% ของปริมาณอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสามารถนำมาเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาได้ โดยมีค่าใกล้เคียงและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับอาหารสูตร Zarrouk เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการเจริญเติบโต คือ จำนวนเซลล์เฉลี่ย ค่าความหนาแน่นของเซลล์เฉลี่ย และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ยของสาหร่ายสไปรูลินา

เนื่องจากค่า pH ของน้ำทิ้งมีความเป็นกรดที่ค่อนข้างสูง แต่โดยธรรมชาติแล้วยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* มีความสามารถเจริญได้ที่สภาวะกรด ดังนั้นน้ำ

ทั้งนี้ ดังกล่าวนี้น้ำจะเหมาะสมที่จะนำมาเพาะเลี้ยงยีสต์มากกว่าสาหร่ายสไปรูลิน่า นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายในการเจริญ ไม่ว่าจะป็นน้ำตาลเฮกโซส เพนโตส และไฮโดรคาร์บอนต่างๆ (Dhanasekaran et al., 2010) สารอาหารที่เป็นส่วนผสมในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานแต่ละสูตร ล้วนจำเป็นและกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งสิ้น ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ การทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานด้วยน้ำทิ้งๆ นั้นย่อมส่งผลให้สารอาหารที่จำเป็นลดลงตามไปด้วย ดังนั้นผลผลิตมวลเซลล์ของยีสต์ที่ได้ควรต้องลดลงไปด้วย แต่ผลการทดลองที่ได้กลับพบว่ามวลเซลล์ที่ผลิตได้นั้นไม่แตกต่างกันกับสูตรอาหารมาตรฐาน คาดว่าน่าจะเนื่องมาจากในน้ำทิ้งๆ ก็มีสารอาหารอื่นๆ ที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นองค์ประกอบด้วย ดังที่ได้รายงานไปแล้วข้างต้น ยีสต์สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้อย่างหลากหลายรวมทั้งแอมโมเนีย ซึ่งพบในปริมาณมากในน้ำทิ้งๆ โดยจะใช้สังเคราะห์เป็นโปรตีนในเซลล์ เกลือไนเตรทที่อยู่ในน้ำทิ้งๆ ก็มีรายงานว่าช่วยกระตุ้นการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ได้ โดยจากการศึกษาของ Akintomide and Antai (2012) ที่เพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ในเศษเปลือกของหัวแยม แล้วมีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ แต่ในความเป็นจริงแล้วยีสต์ไม่ได้ใช้ในเตรทโดยตรง แต่จะมีการรีดิวซ์ให้เป็นไนเตรทและแอมโมเนียเพื่อใช้สังเคราะห์เป็นโปรตีนต่อไป

เป้าหมายของงานวิจัยนี้คือเพื่อผลิตอาหารที่เป็นแหล่งโปรตีนจากจุลินทรีย์สำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ ซึ่งยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* และสาหร่ายสายพันธุ์ *S. platensis* ก็เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ในงานวิจัยนี้พบว่าสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ผลิตได้จากอาหารสูตรมาตรฐานและสูตรที่ทดแทนด้วยน้ำทิ้งๆ มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 42-43 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง แม้ทั้งสองตัวอย่างจะมีโปรตีนไม่แตกต่างกัน แต่ก็พบว่ามิต้านน้อยกว่ากว่ารายงานวิจัยอื่นๆ เช่น งานวิจัยของศิริพรและคณะ (2553) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ทดแทนด้วยน้ำหมักมูลสุกร 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วพบว่าสาหร่ายสไปรูลิน่ามีโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูงถึง 55 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ในยีสต์แห้งกลับมีปริมาณสูงกว่ารายงานอื่นๆ เช่น ยีสต์ *Saccharomyces* sp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารตัดแปลงที่ผสมน้ำข้าวฟ่างจะมีปริมาณโปรตีนเพียง 45.25 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง (Konlani et al., 1996) เป็นต้น ทั้งนี้สารอาหารและองค์ประกอบทางเคมีที่มีลักษณะเฉพาะของน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่นนี้ น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

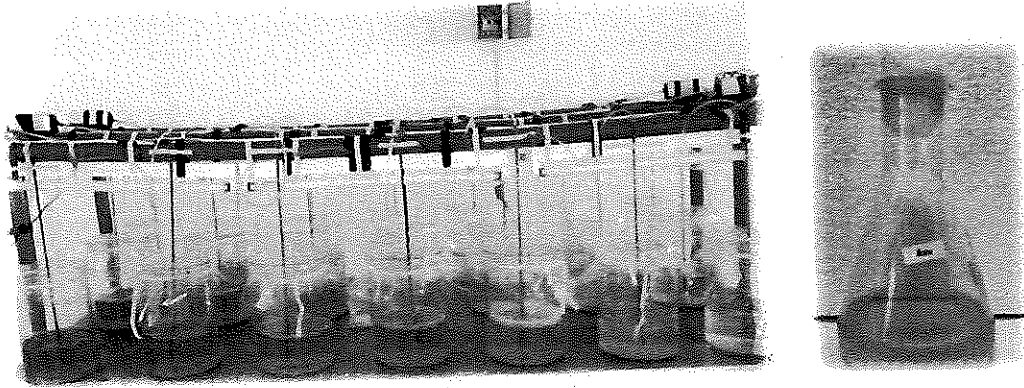
สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลอง สามารถสรุปได้ว่าน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่นนี้ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* เนื่องจากมีความเป็นกรดที่ค่อนข้างสูง ทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งๆ เสียก่อน นอกจากนี้การทดแทนสูตรอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐานด้วยน้ำทิ้งๆ ก็ยังทำให้การเจริญของสาหร่ายลดลงอย่างชัดเจน แต่อาจมีความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้งๆ นี้มาใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยสามารถใช้ทดแทนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรมาตรฐานได้ในปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อย่างไรก็ตามแม้จะลดค่าใช้จ่ายของสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปได้ 20 เปอร์เซ็นต์ (24 บาทต่อลิตร) แต่การที่ต้องเพิ่มขั้นตอนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งๆ นั้น ก็อาจจะไม่เป็นที่ยอมรับในทางปฏิบัติ แม้ค่าใช้จ่ายของสารเคมีที่ใช้ปรับสภาพน้ำทิ้งๆ จะมีเพียง 0.16 บาทต่อลิตรก็ตาม

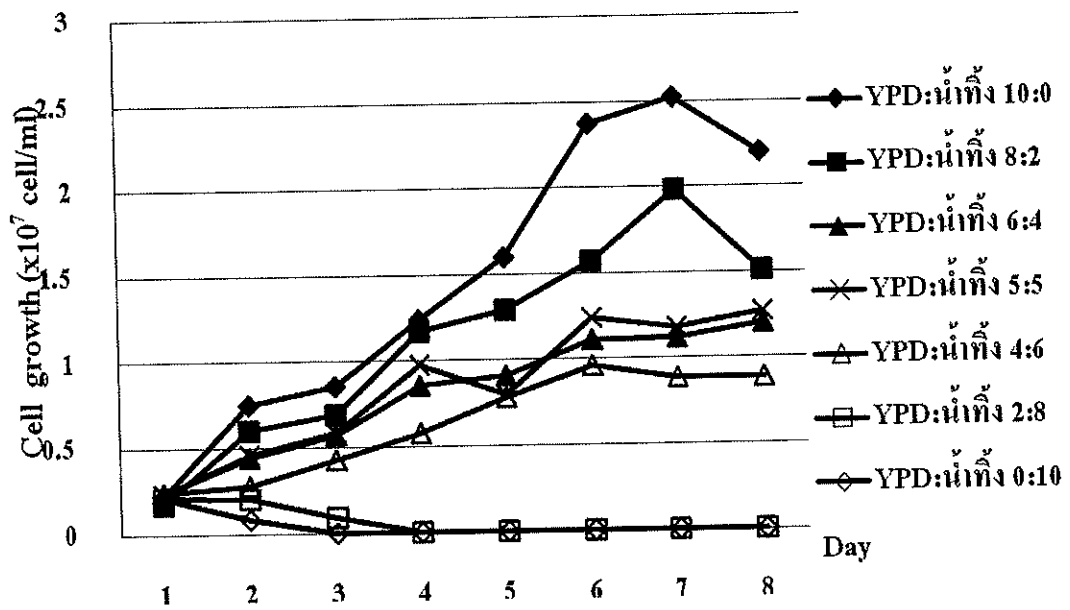
เอกสารอ้างอิง

- วารภรณ์ ขจรไชยกูล. 2549. ยางธรรมชาติ: การผลิตและการใช้งาน. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ซีโน ดีไซน์ (หน้า 17).
- สุวรรณณี ไทยอุดมทรัพย์. 2553. การเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่าในอาหารอินทรีย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 133 หน้า.
- ศิริพร ขูเชิด, ขจรเกียรติ ศรีนวลสม, ลีทธิชัย พัฒนเกียรติ ชีวิน, จงกล พรมยะ, บัญญัติ มนเทียรอาสน์ และศิริเพ็ญ ตริยไชยาพร. 2553. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า (*Spirulina platensis*) ในสูตรอาหารน้ำหมักต้นทุ่นดำ. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง 4: 26-33.
- Akintomide, M.J. and Antai, S.P. 2012. Inorganic nitrogen supplementation and micro-fungal fermentation of white Yam peels (flour) into single cell protein. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2(3): 820-832.
- Baldia, S.F., Fukami, K. and Nishijima, T.Y. 1991. Growth characteristics of a blue green algal *Spirulina platensis* for nitrogen utilization. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57(4): 645-654.

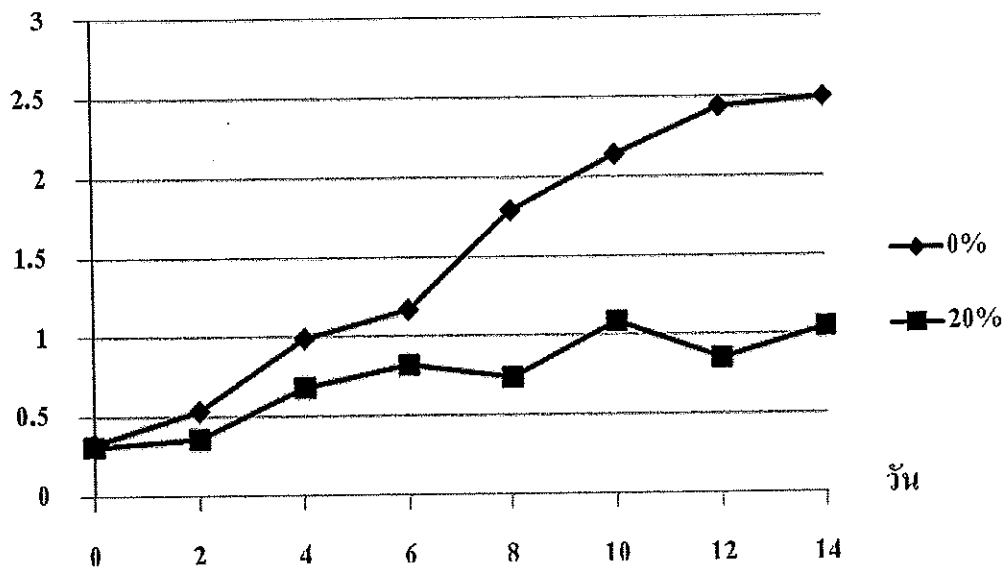
- Dhanasekasran, D., Lawanya, S., Saha, S., Thajuddin, N. and Panneerselvam, A. 2011. Production single cell protein from pineapple waste using yeast. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 8: 26-32.
- Jourdan, J.P. 2001. Grow your own *Spirulina*. [Online]. Available : http://www.antenna.ch/en/documents/Jourdan_UK.pdf (accessed on March 6, 2013)
- Konlani, S., Delgenes, J.P., Moletta, R., Traore, A. and Doh, A. 1996. Optimization of cell yield of *Candida krusei* SO1 and *Saccharomyces* sp. LK3G cultured in sorghum hydrolysate. *Bioresource Technology* 57: 275-281.
- Mohammadi, M., Man, H.C., Hassan, M. and Yee, P.L. 2010. Treatment of wastewater from rubber industry in Malaysia. *African Journal of Biotechnology* 9: 6233-6243.
- production and process. *American Journal of Food Technology* 6: 103-116.
- Ogbonna, J.C., Yoshizawa, H. and Tanaka, H. 2000. Treatment of high strength organic waste water by a mixed culture of photosynthetic microorganism. *Journal of Applied Physiology* 12(3-5): 277-284.
- Tekasakul, P. and Tekasakul, S. 2006. Environmental problems related to natural rubber production in Thailand. *J. Aerosol Res.* 21: 122-129.



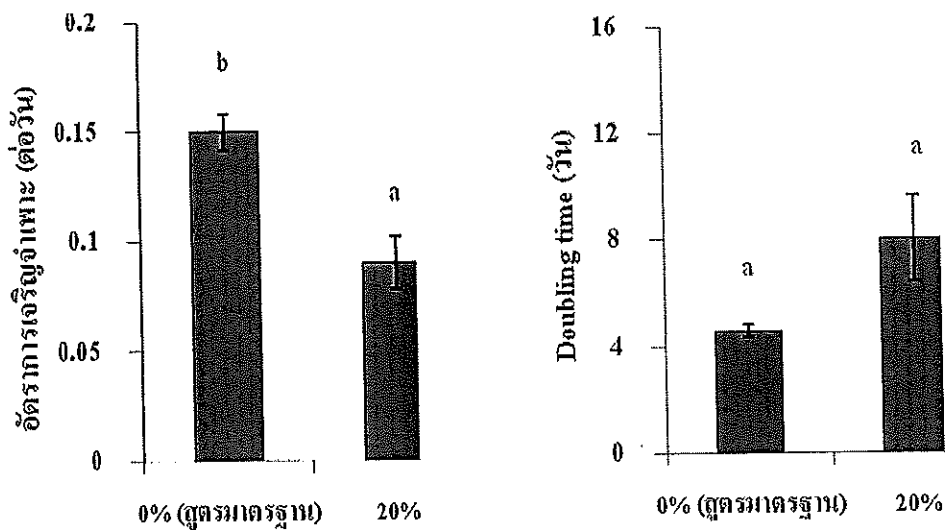
ภาพที่ 1 ระบบการเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดียวในงานวิจัยนี้: (ซ้าย) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า (ขวา) การเพาะเลี้ยงยีสต์



ภาพที่ 2 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลิน่าในอาหารเพาะเลี้ยงที่ผสมน้ำที่ต่างๆ ในสัดส่วนต่างๆ

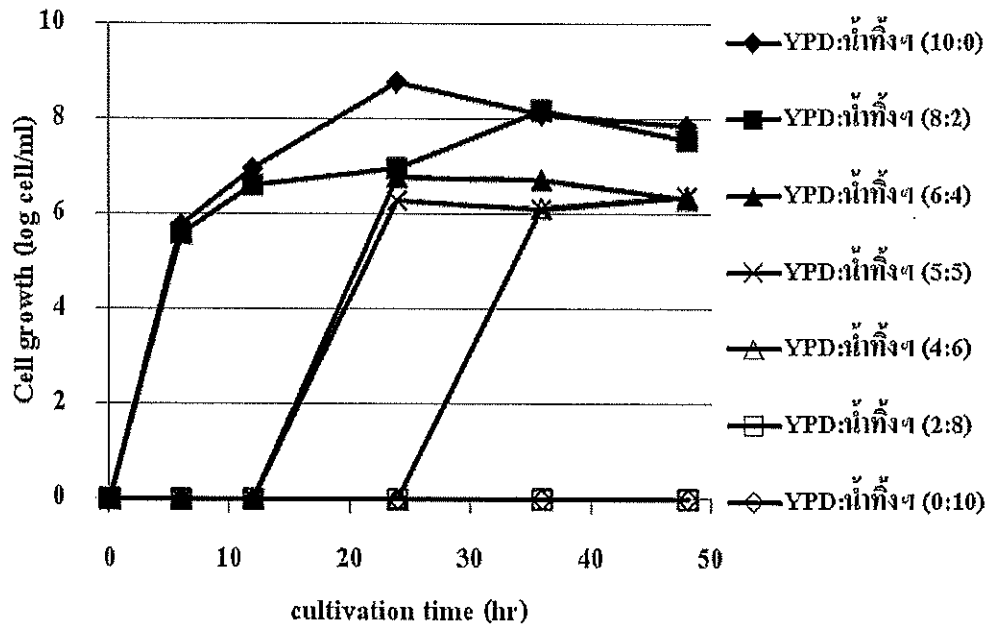


ภาพที่ 3 แสดงโคเนตส์การเจริญของสาหร่ายสไปรูลิनाเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐานและสูตรที่มีการผสมน้ำทิ้งกระบวนการผลิต

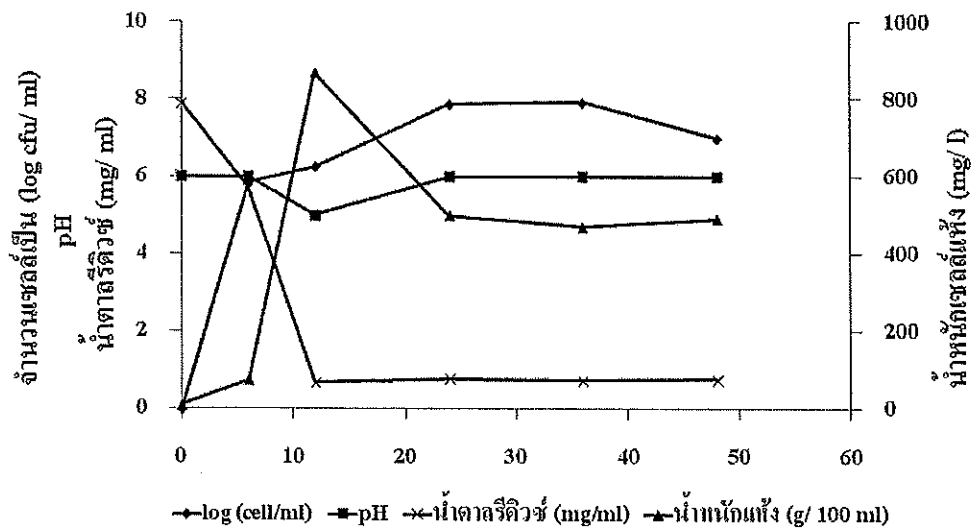


ภาพที่ 4 แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะและค่า Doubling time ของสาหร่ายสไปรูลิनाเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐานและอาหารสูตรมาตรฐานที่ผสมน้ำทิ้ง 20 เปอร์เซ็นต์

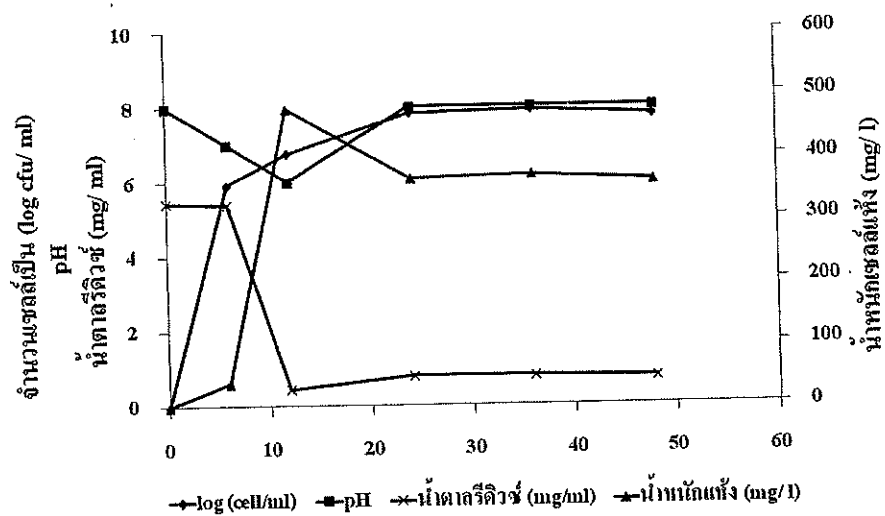
หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$)



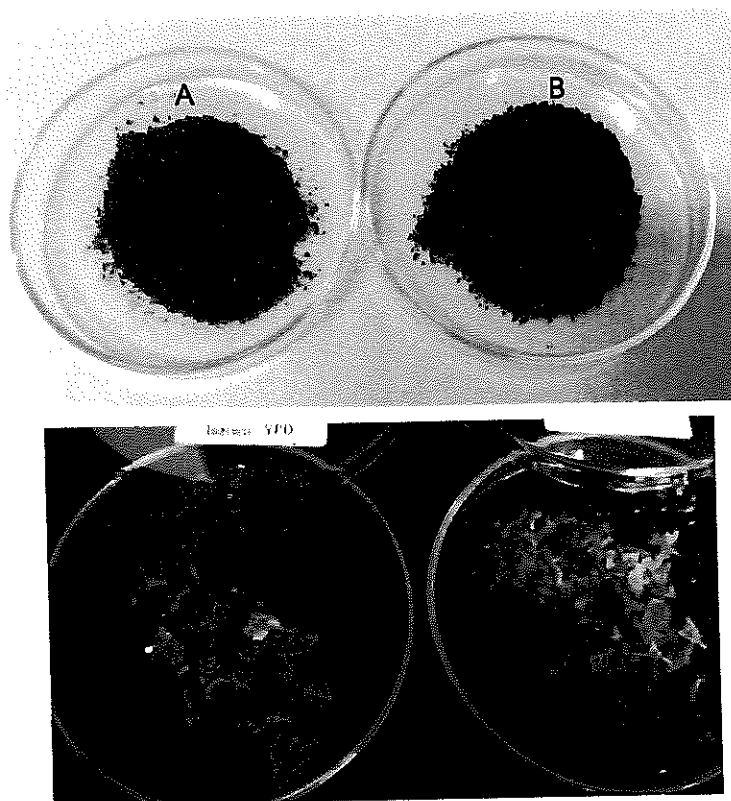
ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารสูตร YPD ที่มีสมส่วนน้ำที่งั้น ในสัดส่วนต่างๆ



ภาพที่ 6 แสดงไดเนตริกส์การเจริญของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรมาตรฐาน



ภาพที่ 7 แสดงโคเนติกส์การเจริญของเซลล์ยีส *S. cerevisiae* ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรมาตรฐานผสมน้ำที่จาง ในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะของมวลเซลล์แห้งของสาหร่ายสไปรูลินา (บน) และยีสต์ *S. cerevisiae* (ล่าง) เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูตรมาตรฐาน (A) และอาหารสูตรมาตรฐานที่ผสมด้วยน้ำที่จาง 20 เปอร์เซ็นต์ (B)

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีชนิดต่างๆ ในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่น

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัม/ลิตร) \pm SD
แอมโมเนีย	207.13 \pm 9.26
ไนโตรเจน	0.045 \pm 0.00
ไนเตรท	2.70 \pm 0.36
ฟอสเฟต	0.94 \pm 0.02
น้ำรีดิวซ์ที่ละลายได้	0.018 \pm 0.01
น้ำตาลทั้งหมดที่ละลายได้	0.42 \pm 0.01
โปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด	3.64 \pm 0.03
ค่า COD	7,200
แคดเมียม	ไม่พบ*
ตะกั่ว	ไม่พบ*

*หมายเหตุ: ส่งตรวจวิเคราะห์ ณ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่ายสไปรูลีนาในอาหารเพาะเลี้ยงที่ผสมน้ำทิ้งๆ ในสัดส่วนต่างๆ

สัดส่วนของน้ำทิ้งๆ ในอาหารเพาะเลี้ยง	จำนวนเซลล์สาหร่ายสไปรูลีนา ($\times 10^7$ เซลล์/ มล.)				
	วันที่ 0	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 12	วันที่ 14
0%	0.22 \pm 0.02 ^{Aa}	0.86 \pm 0.11 ^{Bc}	1.60 \pm 0.13 ^{Ce}	2.52 \pm 0.01 ^{Dc}	2.20 \pm 0.10 ^{Dc}
20%	0.17 \pm 0.01 ^{Aa}	0.69 \pm 0.03 ^{Abc}	1.29 \pm 0.05 ^{CDcd}	1.98 \pm 0.07 ^{Eb}	1.51 \pm 0.06 ^{CDab}
40%	0.23 \pm 0.01 ^{Aa}	0.57 \pm 0.02 ^{BCbc}	0.91 \pm 0.05 ^{Dbab}	1.12 \pm 0.04 ^{DEa}	1.20 \pm 0.08 ^{Eab}
50%	0.23 \pm 0.01 ^{Aa}	0.59 \pm 0.03 ^{ABbc}	0.80 \pm 0.02 ^{BCa}	1.18 \pm 0.08 ^{Ca}	1.27 \pm 0.12 ^{Cbb}
60%	0.24 \pm 0.02 ^{Aa}	0.43 \pm 0.04 ^{ABCb}	0.78 \pm 0.06 ^{COEa}	0.89 \pm 0.10 ^{DEa}	0.89 \pm 0.07 ^{DEa}
80%	0.21 \pm 0.01 ^{Aa}	0.09 \pm 0.01 ^{Ba}	0	0	0
100%	0.21 \pm 0.02 ^{Aa}	0	0	0	0

หมายเหตุ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่เปรียบเทียบความแตกต่างในแนวนอน (เวลาการเพาะเลี้ยง) ($p < 0.01$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กเปรียบเทียบความแตกต่างในแนวตั้ง (อาหารแต่ละสูตร) ($p < 0.01$)

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่ายสไปรูลีนาเมื่อเพาะเลี้ยงในขนาดการผลิต 5 ลิตร

สัดส่วนของน้ำทิ้งๆ ในอาหารเพาะเลี้ยง	จำนวนเซลล์สาหร่ายสไปรูลีนา ($\times 10^7$ เซลล์/ มล.)				
	วันที่ 0	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 12	วันที่ 14
0% (สูตรมาตรฐาน)	0.33 \pm 0.03 ^{Ea}	0.99 \pm 0.02 ^{Db}	1.79 \pm 0.02 ^{Cb}	2.44 \pm 0.03 ^{Bb}	2.73 \pm 0.07 ^{Ab}
20%	0.31 \pm 0.04 ^{Ba}	0.68 \pm 0.01 ^{Ba}	0.74 \pm 0.06 ^{Ba}	0.85 \pm 0.18 ^{Aa}	1.05 \pm 0.19 ^{Aa}

หมายเหตุ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่เปรียบเทียบความแตกต่างในแนวนอน (เวลาการเพาะเลี้ยง) ($p < 0.05$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กเปรียบเทียบความแตกต่างในแนวตั้ง (อาหารแต่ละสูตร) ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 แสดงค่าพารามิเตอร์แสดงการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ

ค่าพารามิเตอร์	อาหาร YPD	อาหาร YPD ผสมน้ำทิ้งๆ 20 เปอร์เซ็นต์
อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (h^{-1}) (Maximum specific growth rate; μ_{max})	2.24	2.27
Doubling time (h)	0.309	0.305

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณโปรตีนหยาบในโปรตีนเซลล์เดียวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรมาตรฐานและอาหารสูตรมาตรฐานที่ผสมน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางพาราแผ่น

ชนิดอาหาร	ปริมาณโปรตีนหยาบ (%)	
	สาหร่ายสไปรูลีนา	ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>
อาหารสูตรมาตรฐาน	43.2	67.8
อาหารสูตรมาตรฐานผสมน้ำทิ้งๆ 20 เปอร์เซ็นต์	42.2	66.2

ภาคผนวก 4
ร่างโปรสเตอร์งานวิจัย



ความเป็นไปได้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี
น้ำทิ้งกระบวนการผลิตยางแผ่นเป็นองค์ประกอบ
Feasibility study of single cell protein production using effluent
from rubber sheet production



ไฟโรจน์ วงศ์สุทธิสิน¹, วรวิทย์ รุ่งหาญแก้ว¹, อัจฉราวัฒน์ กตอ่อนกุลวิภา¹

(ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.))

เรื่องย่อ

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางแผ่นมีองค์ประกอบทางเคมีมากมาย ไม่ว่าจะเป็นอินทรีย์ โพลีคาร์โบไฮเดรต น้ำตาล โปรตีน และ สารอินทรีย์อื่นๆ ดังนั้นค่าความเค็มอาจสูงและเป็นสารอาหารเชื้อจุลินทรีย์ได้

การศึกษาถึงความเป็นไปได้ของ การเพาะเลี้ยง และกำจัด ของแบคทีเรียและของน้ำที่คัดค้านแล้วจึงนำมาศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ เทคโนโลยีชีวภาพ *Spirulina platensis* และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อให้เป็นโปรตีนเซลล์เดียวสำหรับเลี้ยงสัตว์

ผลการศึกษานี้พบว่าน้ำทิ้งเป็นองค์ประกอบอาหารที่เหมาะสมซึ่งถูก มาตรฐานมีผลทำให้สามารถนำไปใช้เพาะเลี้ยง สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ หมักหมมได้

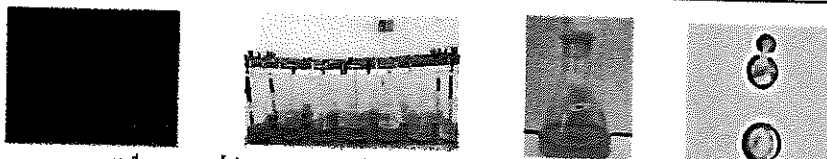
โปรตีนที่สกัดจากน้ำทิ้งในอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐานสำหรับเพาะเลี้ยง สัตว์เลี้ยง พบว่าสามารถใช้ได้ตั้งแต่ส่วนที่ 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

ปริมาณโปรตีนของสาหร่ายที่ผลิตขึ้นมีผลต่อสัตว์ทดลองไม่มีความ แตกต่างกับเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารมาตรฐานและอาหารมาตรฐานที่ หมักหมมที่ 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

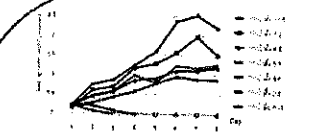
คำนำ

ปัญหาความเค็ม แลจากกระบวนการผลิตยางแผ่นเป็นเนื้อยางสด ซึ่งมีองค์ประกอบอื่นๆ อีกมากมาย ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ลิพิด เป็นต้น ดังนั้น จึงคาดว่า น้ำทิ้งที่ผลิตออกมาหลังจากกระบวนการผลิตยางแผ่นของภาคเกษตร น่าจะมี สารประกอบเหล่านี้เป็นผลดีต่อพืช สาหร่ายของน้ำทิ้งจะเป็นแหล่งอาหารที่ช่วยในการ เจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในน้ำทิ้ง ซึ่งกลไกได้จากการที่กลุ่มแบคทีเรีย ซึ่งผลิตจาก เจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในน้ำทิ้งกลุ่ม สัตว์เลี้ยง ซึ่งจะมีผลต่อค่าความเค็มในน้ำทิ้งในปริมาณ น้ำทิ้งที่อุดมด้วยสารอาหารเหล่านี้ทำให้ได้เกิดโปรตีนเซลล์เดียวซึ่งสามารถนำไปใช้เพื่อ ผลิตอาหารเลี้ยงสัตว์และเลี้ยงสัตว์ได้

โดยแบคทีเรียที่ใช้ประโยชน์ที่น้ำทิ้งของน้ำทิ้งเป็น โปรตีน เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โปรตีนเซลล์เดียว (Single cell protein) สามารถใช้เป็นอาหารเสริมของสัตว์เลี้ยงเศรษฐกิจ เช่น สุกร สัตว์ปีก ไก่ และ กระจับปี่ เป็นต้น โดยโปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตขึ้นนี้ มีทั้ง สารจากสาหร่าย (*Spirulina platensis*) และยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* พืชจากอาหารในน้ำ ทิ้งเหล่านี้สามารถช่วยเสริมการให้สารอาหารของมาตรฐานในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่ง ไปได้ในเซลล์เดียวได้ผล ก็จะช่วยลดต้นทุนค่าอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อโปรตีนเซลล์เดียว ได้ หรือเมื่อเกิดปัญหาการเลี้ยงสัตว์ในน้ำทิ้งที่มีองค์ประกอบน้ำทิ้งความเค็มไปใช้เพื่ออาหาร เลี้ยงสัตว์ที่ผลิตขึ้นจะส่งผลได้เช่นกัน



ภาพที่ 1 ระบบการเพาะเลี้ยงโปรตีนเซลล์เดียวในภาชนะ (ซ้าย) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังหมัก (ขวา) การเพาะเลี้ยงยีสต์



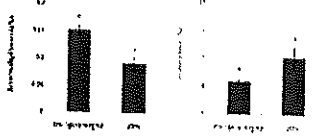
ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางแผ่น

ค่าที่วิเคราะห์	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ± SD
แอมโมเนีย	267.13 ± 9.28
ไนโตรเจน	0.943 ± 0.09
ไนโตรเจน	2.70 ± 0.36
ฟอสฟอรัส	0.94 ± 0.09
น้ำที่ละลายออกซิเจน	0.018 ± 0.01
ค่าความเค็มของน้ำ	0.42 ± 0.01
ไบคาร์บอเนตของโซเดียม	3.64 ± 0.03
ค่า COD	1,200
แคลเซียม	ไนโตรเจน

หมายเหตุ: ค่าความเค็มของน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตยางแผ่นสูงกว่าค่ามาตรฐานของน้ำทิ้งที่อนุญาตให้ใช้

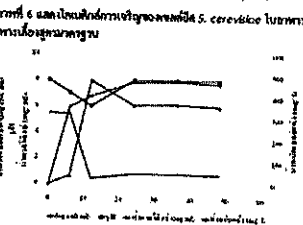
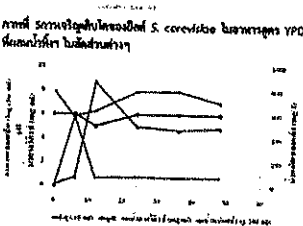


ภาพที่ 3 ผลการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของโปรตีนเซลล์เดียวในอาหารเพาะเลี้ยง ในอาหารมาตรฐานและอาหารที่หมักหมมที่ 20 เปอร์เซ็นต์



ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเซลล์เดียวในอาหารเพาะเลี้ยง

อาหารเพาะเลี้ยง	ปริมาณโปรตีนเซลล์เดียว (%)
อาหารมาตรฐาน	43.2
อาหารมาตรฐานที่หมักหมมที่ 20 เปอร์เซ็นต์	44.2



ภาพที่ 8 ผลการเพาะเลี้ยงของยีสต์ Saccharomyces cerevisiae (ซ้าย) และยีสต์ S. cerevisiae (ขวา) ในอาหารมาตรฐาน (A) และอาหารมาตรฐานที่หมักหมมที่ 20 เปอร์เซ็นต์ (B)

¹ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 1 อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ ² คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยมหิดล 1 อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

ภาคผนวก 5
ชี้แจงข้อคิดเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ

สรุปข้อคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิต่อรายงานความก้าวหน้าโครงการรอบ 8 เดือน
“ความเป็นไปได้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำทิ้ง
กระบวนการผลิตยางแผ่นเป็นองค์ประกอบ” สัญญาเลขที่ RDG5550068

ข้อคิดเห็น/ ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ชี้แจงโดยนักวิจัย
<p><u>ความเห็นด้านวิชาการ (Technical)</u></p> <p>1. ผู้วิจัยสามารถทำตามแผนได้ แม้ว่าผู้วิจัยไม่สามารถบอกได้ว่าคุ้มทุนหรือไม่ และผู้วิจัยยังประสบปัญหาในเรื่องความหลากหลายของน้ำทิ้งจากแหล่งต่างๆ และแม้ว่าผู้วิจัยจะสรุปผลวิจัยว่า สามารถใช้น้ำทิ้งได้ 20% โดยประมาณ แต่ในทางปฏิบัติต้องมีการ treat น้ำทิ้งก่อนนำมาผสม ซึ่งมีขั้นตอนพอสมควร และต้องใช้สารเคมี อาทิเช่น ปูนขาว ในการปรับสภาพความเป็นกรดของน้ำทิ้ง ซึ่งความเป็นไปได้ในการนำมาใช้งานจริงอาจจะมีเปอร์เซ็นต์น้อย ไม่มากพอที่จะนำไปใช้งานจริง จึงขอให้ผู้วิจัยทบทวนในประเด็นนี้ด้วย</p>	<p>ผู้วิจัยเห็นด้วยกับข้อเสนอแนะของผู้ทรงฯ ทุกประการ และเห็นว่าไม่น่าจะมีความเป็นไปได้ในทางปฏิบัติในการนำน้ำทิ้งฯ มาใช้เพื่อการนี้จึงได้สรุปผลการวิจัยดังปรากฏในร่างรายงาน แต่อย่างไรก็ตาม ในอนาคตหากได้มีการวิจัยเพื่อปรับสภาพน้ำทิ้งฯ ด้วยวิธีการที่ง่ายและประหยัดขึ้น ก็อาจจะมีการนำน้ำทิ้งฯนี้มาใช้ประโยชน์มากยิ่งขึ้นได้</p>

ภาคผนวก 6

ชี้แจงข้อคิดเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ

สรุปข้อคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิต่อร่างรายงานฉบับสมบูรณ์

“ความเป็นไปได้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำทิ้ง
กระบวนการผลิตยางแผ่นเป็นองค์ประกอบ” สัญญาเลขที่ RDG5550068

ข้อคิดเห็น/ ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ชี้แจงโดยนักวิจัย
<p><u>ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ ท่านที่ 1</u></p> <p>1. แก้ไขรูปแบบการนำเสนอในบทคัดย่อ กล่าวคือ บทคัดย่อเป็นการย่อการทำงานทั้งหมด ไม่ใช่การสรุปสั้นๆ นอกจากนี้จะต้องมีตัวเลขชัดเจน สามารถอ่านแล้วนำไปใช้อ้างอิงได้ โดยเขียนแยกเป็นประเด็น บทนำ การดำเนินงาน และสรุปผลการทดลอง</p> <p>2. ควรสรุปประเด็นให้ชัดเจนว่าสามารถทำได้หรือไม่ อย่างไร เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงให้ผู้อื่นนำไปใช้ต่อ และเพิ่มข้อมูลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียให้ชัดเจนถึงข้อดี-ข้อเสีย เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป</p>	<p>ได้ทำการแก้ไขดังปรากฏในบทคัดย่อแล้ว โดยเน้นการเพิ่มค่าตัวเลขการวัดผลที่สำคัญอันเป็นแก่นของผลงานวิจัยทั้งหมดตามข้อเสนอแนะ</p> <p>ได้มีข้อความสรุปถึงความเป็นไปได้ถึงความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้งฯ จากแหล่งนี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไปแล้ว โดยระบุว่าไม่เหมาะในการนำไปเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า แต่กรณีการเพาะเลี้ยงยีสต์นั้นสามารถใช้ได้เพียงในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น</p>
<p><u>ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ ท่านที่ 2</u></p> <p>ในการสรุปผลการวิจัย ควรกล่าวถึงค่าใช้จ่ายในการปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้ง และเปรียบเทียบว่าการลดค่าใช้จ่ายเรื่องสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ กับการเพิ่มค่าใช้จ่ายในปรับสภาพน้ำทิ้งนั้นคุ้มค่าหรือไม่</p>	<p>ได้มีการวิเคราะห์เชิงต้นทุน แล้วระบุในเนื้อหา รายงานส่วน “บทสรุปผู้บริหาร” “วิจารณ์ผลการทดลอง” และ “สรุปผลการทดลอง” โดยวิเคราะห์แล้วพบว่า อาหารเลี้ยงยีสต์สูตร YPD medium มีต้นทุนการผลิตอยู่ที่ 120 บาทต่อลิตร ดังนั้นการทดแทนด้วยน้ำทิ้ง 20 เปอร์เซ็นต์ทำให้ลดต้นทุนได้ 24 บาทต่อลิตร แต่การเพิ่มขั้นตอนการปรับสภาพน้ำทิ้งฯ มีต้นทุน 0.16 บาทต่อลิตร ดังนั้นโดยรวมแล้วยังคงคุ้มค่า แต่การเพิ่มขั้นตอนที่ยุ่งยากขึ้นนี้อาจจะทำให้กระทบต่อความน่าสนใจของกระบวนการผลิตโดยรวมได้</p>