บทที่ 5

ผลการทดลอง วิเคราะห์ และสรุปผลการทดลอง

5.1 การศึกษาลักษณะของเยื่อแผ่นไมโครฟิลเตรชัน

จากผลการทดลองสามารถหาค่าเพอมิเอชันฟลักซ์ ได้จากอัตราการไหลของเพอมิเอต หารด้วยพื้นที่การกรอง (0.2030 ตารางเมตร)

5.1.1 ผลของความดันขาเข้าต่อค่าเพอมิเอชันฟลักซ์

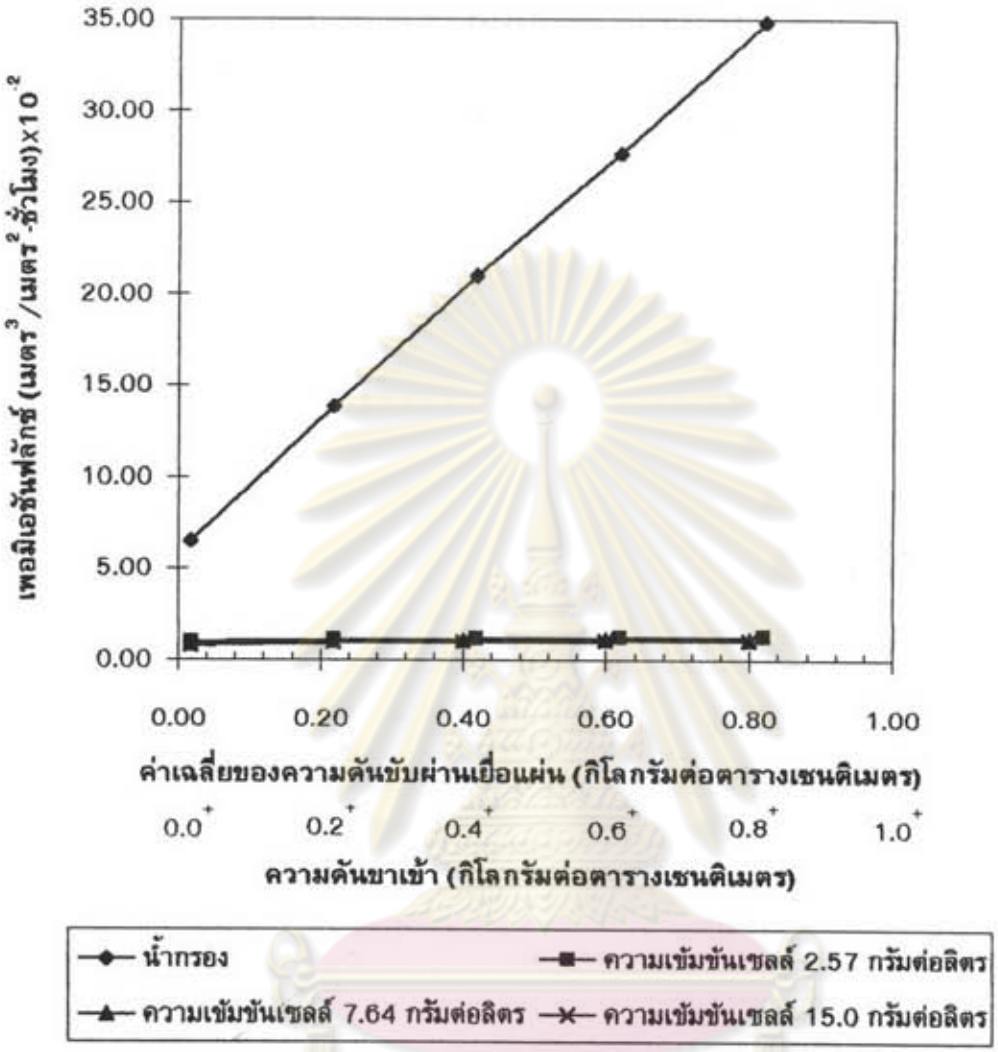
ในการทดลองกรองน้ำกรอง พบว่าค่าเพอมิเอชันฟลักซ์เพิ่มขึ้น โดยมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าเฉลี่ยของความดันขับผ่านเยื่อแผ่นที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 5.1

ส่วนในการกรองเซลล์ที่ความเข้มข้นต่ำ (2.57 กรัมต่อลิตร) พบว่าค่าเพอมิเอชันฟลักซ์เพิ่มขึ้น เมื่อค่าเฉลี่ยของความดันขับผ่านเยื่อแผ่นเพิ่มขึ้น แต่ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเพอมิเอชันฟลักซ์กับค่าเฉลี่ยของความดันขับผ่านเยื่อแผ่นไม่เป็นเส้นตรง เนื่องจากการเพิ่มความดันขาเข้า มีผลทำให้เกิดความต้านทาน จนเกิดเป็นความเข้มข้นโพลาไรเซชัน

ส่วนในการกรองเซลล์ที่ความเข้มข้น 7.64 และ 15.0 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพิ่มความดันขาเข้าถึง 0.6 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ค่าเพอมิเอชันฟลักซ์เริ่มมีค่าคงที่ ถึงแม้จะเพิ่มความดันขึ้นอีกก็ตาม ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากเกิดชั้นเจลขึ้นบนผิวหน้าของเยื่อแผ่น มีผลไปเพิ่มความต้านทานการกรอง ดังนั้นการเพิ่มความดันขึ้นอีก จึงเป็นการเพิ่มความหนาและความต้านทานของชั้นเจล ทำให้ค่าเพอมิเอชันฟลักซ์มีค่าคงที่ (ดังรูปที่ 5.2)

จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าในการกรองเซลล์ที่ความเข้มข้น 7.64 และ 15.0 กรัมต่อลิตร เมื่อมีการเพิ่มความดันขาเข้ามากกว่า 0.0^{+} กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ค่าเพอมิเอชันฟลักซ์ที่ได้ มีค่าไม่ไม่แตกต่างกันมาก อีกทั้งในการเพิ่มค่าความดันขาเข้าสูงมาก (0.6-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.1 แสดงผลของค่าเฉลี่ยของความดันขับผ่านเยื่อแผ่นต่อเพอมิเอชันฟลักซ์ของน้ำกรอง และน้ำหมักที่มีความเข้มข้นเซลล์ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราเร็วในกระแสเวียนเซลล์กลับ 0.4 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

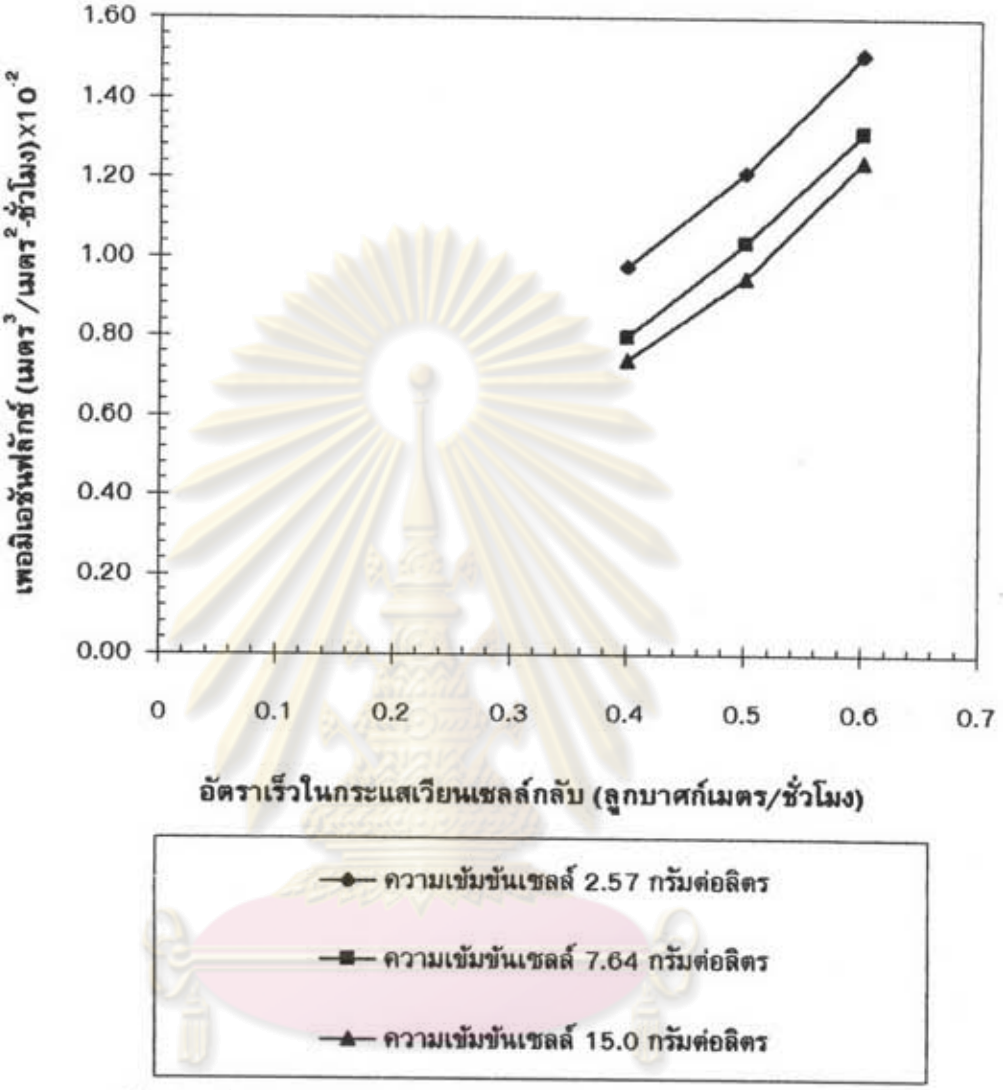
0.8 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร) มีผลทำให้เกิดชั้นเจลขึ้น จากผลเสียดังกล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงใช้ค่าความดันขาเข้าที่ 0.0^{+} กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ในระบบการเวียนเซลล์กลับ

5.1.2 ผลของอัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับต่อค่าเพอมิเอชันฟลักซ์

จากการทดลองรูปที่ 5.3 พบว่าเมื่ออัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ค่าเพอมิเอชันฟลักซ์เพิ่มขึ้นด้วย จากทฤษฎีค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล (k) เป็นสัดส่วนกับรากที่สองของอัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับในการไหลแบบราบเรียบ และเป็นสัดส่วนโดยตรงกับอัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับในการไหลแบบปั่นป่วน และการเพิ่มอัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับ เป็นการเพิ่มค่าแรงตัดเฉือน (shear force) ที่ผิวหน้าเยื่อแผ่น ทำให้ความหนาและความต้านทานของชั้นเจลลดลง แต่ในการทดลองพบว่าที่อัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับที่ 0.5 และ 0.6 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง ทำให้น้ำหมักเกิดฟองขึ้นมาก ซึ่งยากต่อการควบคุมในระหว่างการหมัก และหากเติมสารลดฟอง (antifoam) ในปริมาณมาก จะมีผลไปลดค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลของออกซิเจนในน้ำหมัก นอกจากนี้การเพิ่มอัตราการไหลอาจทำให้เซลล์จุลินทรีย์เสียหายได้ (Hemert และ Tiesjima,1986) ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับที่ 0.4 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง

5.1.3 ผลของความเข้มข้นเซลล์ต่อค่าเพอมิเอชันฟลักซ์

ในการศึกษานี้ใช้ค่าความดันขาเข้าที่ 0.0^{+} กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร และค่าอัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับที่ 0.4 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง จากการทดลองค่าเพอมิเอชันฟลักซ์ลดลง เมื่อค่าความเข้มข้นเซลล์เพิ่มขึ้น (ดังรูปที่ 5.4) จากทฤษฎีค่าเพอมิเอชันฟลักซ์มีความสัมพันธ์กับค่า C_b ตามสมการ $J = k\ln(C_g/C_b)$ เมื่อนำค่าเพอมิเอชันฟลักซ์



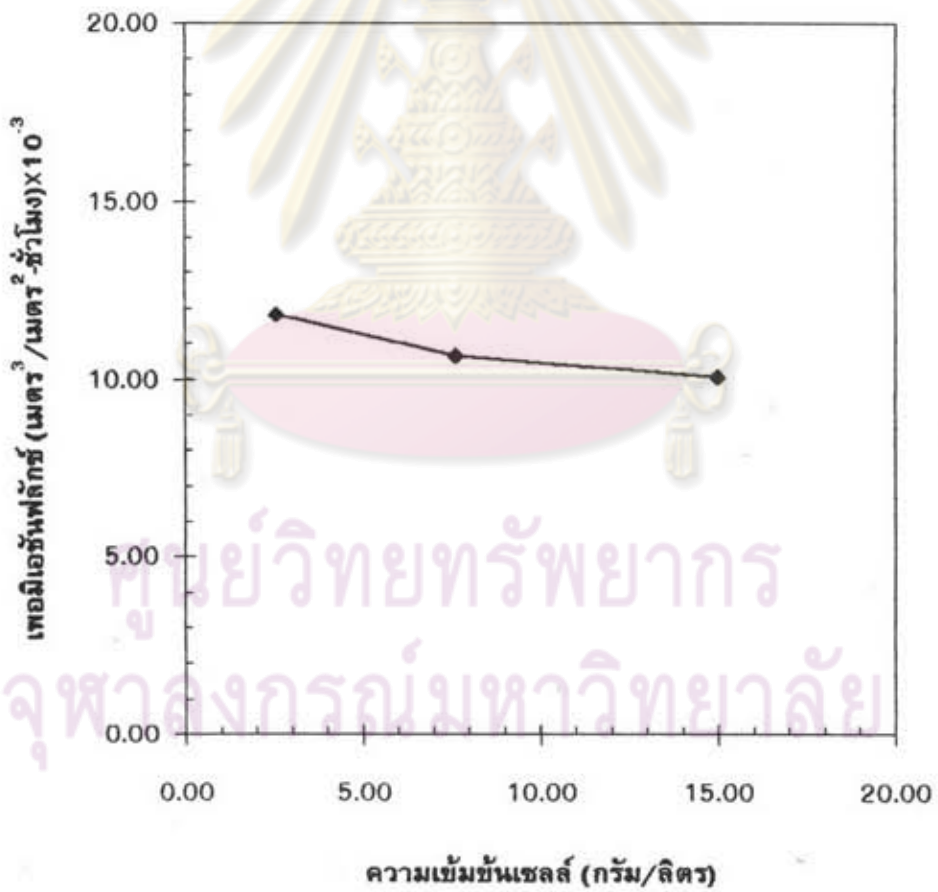
รูปที่ 5.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพอมิเอชันฟลักซ์กับอัตราเร็วในกระแสเวียนเซลล์กลับ ของน้ำหมักที่มีความเข้มข้นเซลล์ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความดันขาเข้า 0.0$^+$ กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กับค่า ln C_b จากตารางที่ 5.1 มาเขียนกราฟจะเห็นได้ว่าค่าเพอมิเอชันฟลักซ์ลดลง มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับ ln C_b ดังในรูปที่ 5.5

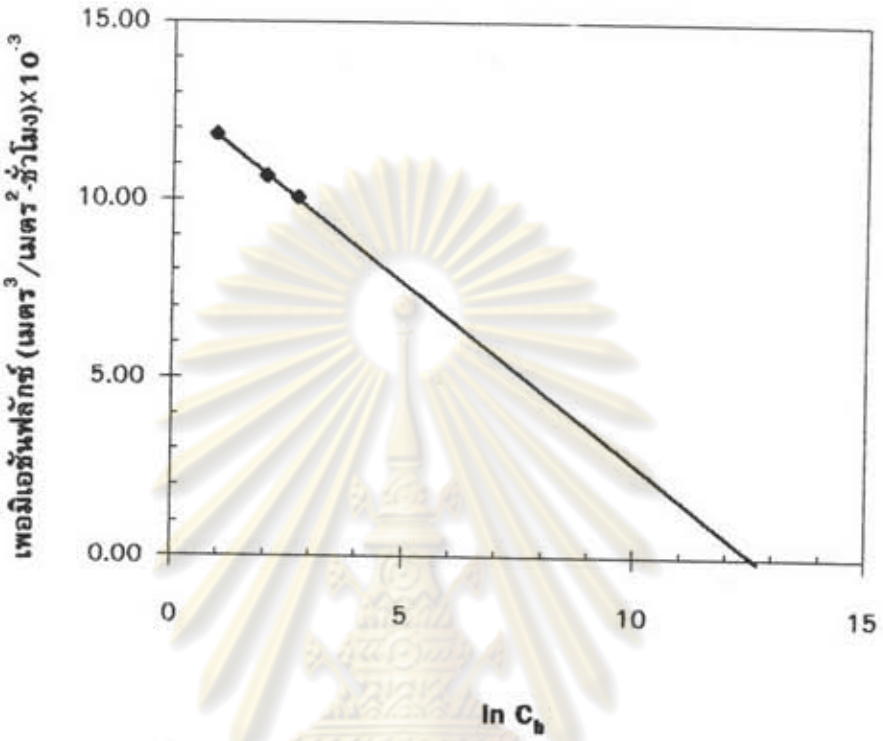
ตารางที่ 5.1 แสดงค่า ln C_b และค่าเพอมิเอชันฟลักซ์

ln C_b	0.9447	2.0334	2.7081
ค่าเพอมิเอชันฟลักซ์ (เมตร^3/เมตร^2-ชั่วโมง)	11.8227×10^{-3}	10.6404×10^{-3}	10.0493×10^{-3}



รูปที่ 5.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเพอมิเอชันฟลักซ์กับความเข้มข้นเซลล์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความดันขาเข้า 0.0^+ กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร และอัตราเร็วในกระแสเวียนเซลล์กลับ 0.4 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเพอมิเอชันฟลักซ์กับ ln C_b ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความดันขาเข้า 0.0$^+$ กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร และอัตราเร็วในกระแสเวียนเซลล์กลับ 0.4 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

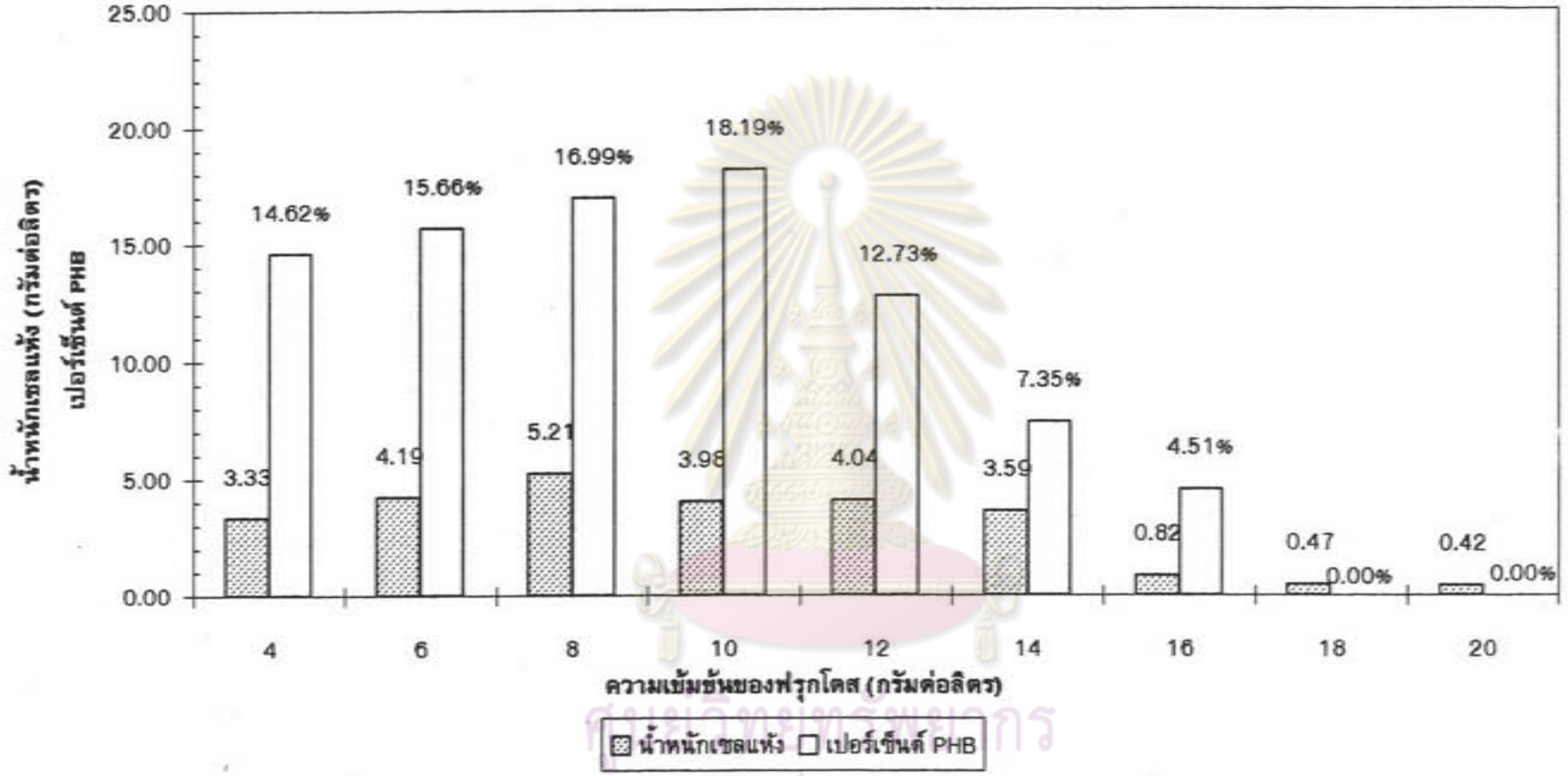
5.2 ผลของการเลี้ยงเชื้อในขวดแก้วทรงกรวย

การศึกษาในหัวข้อนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิต PHB ในระดับขวดแก้วทรงกรวย โดยเริ่มจากหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมก่อน หลังจากนั้นหาค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นหาค่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิต PHB

5.2.1 การศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิต PHB

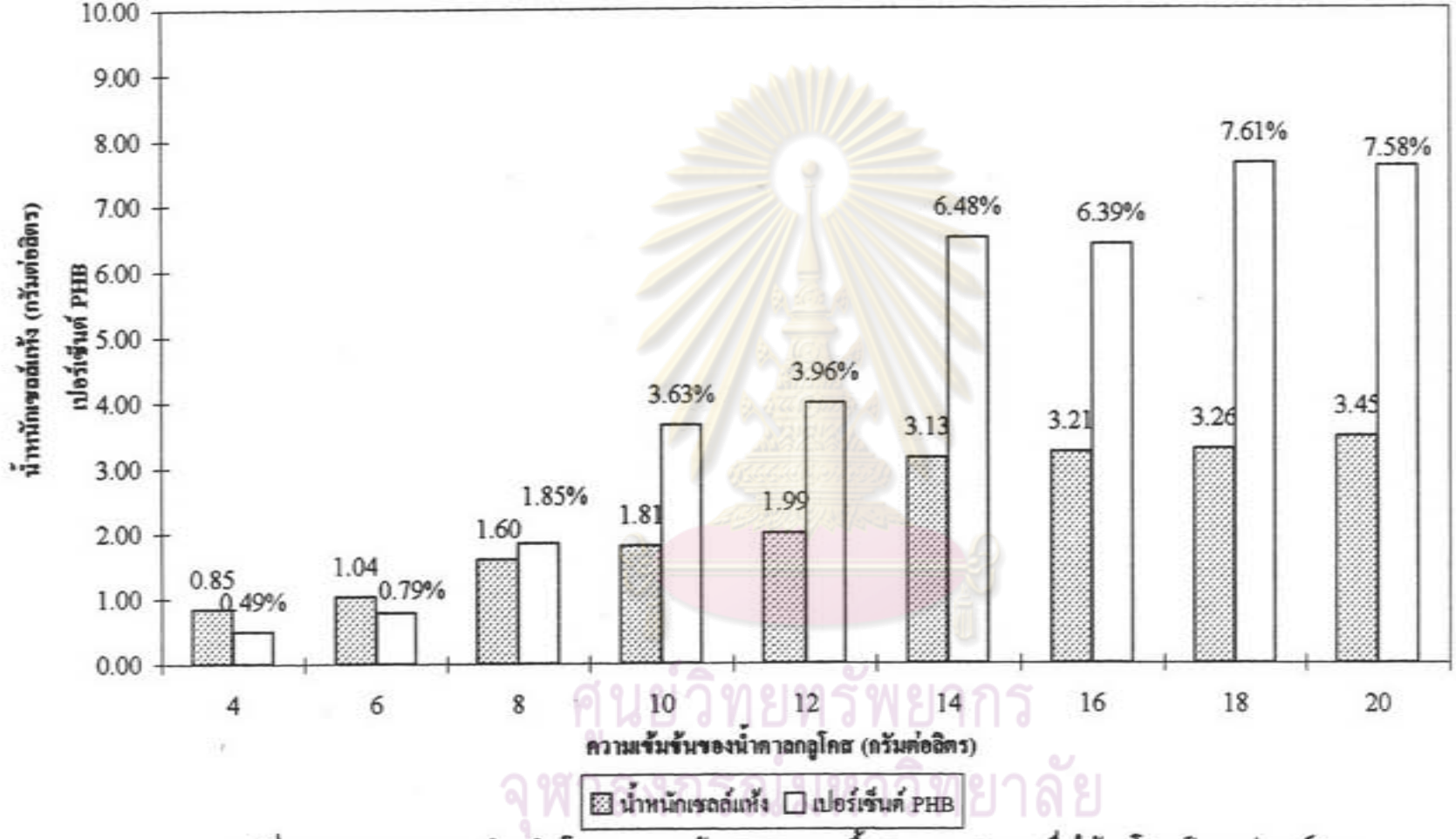
ในการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะต่อการเจริญเติบโตและผลิต PHB โดยเลี้ยงเชื้อ *A. eutrophus* ATCC 17697 (ตามข้อ 4.7.5) ซึ่งใช้กลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นของกลูโคสและฟรุกโตสเริ่มต้นตั้งแต่ 4 ถึง 20 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณแบคทีเรียที่ 600 นาโนเมตร และวิเคราะห์ปริมาณ PHB พบว่าเชื้อ *A. eutrophus* สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในกลูโคสและฟรุกโตส (ดังรูปที่ 5.6 และ 5.7) จากรูปที่ 5.6 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน การเจริญเติบโตของเชื้อจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฟรุกโตสเริ่มต้นที่เพิ่มขึ้น และมีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ความเข้มข้นของฟรุกโตสเริ่มต้น 8 กรัมต่อลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 5.21 กรัมต่อลิตร และเมื่อความเข้มข้นของฟรุกโตสเริ่มต้นมีค่ามากกว่า 8 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลง ส่วนการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มขึ้น จนกระทั่งการเจริญเติบโตของเชื้อเริ่มคงที่ ที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 14 กรัมต่อลิตร โดยที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.45 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์และปริมาณ PHB ที่เลี้ยงในฟรุกโตสและกลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในฟรุกโตสให้ปริมาณเซลล์และปริมาณ PHB สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในกลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกัน (ดังรูปที่ 5.8ก และ 5.8ข) นอกจากนี้เมื่อพิจารณา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



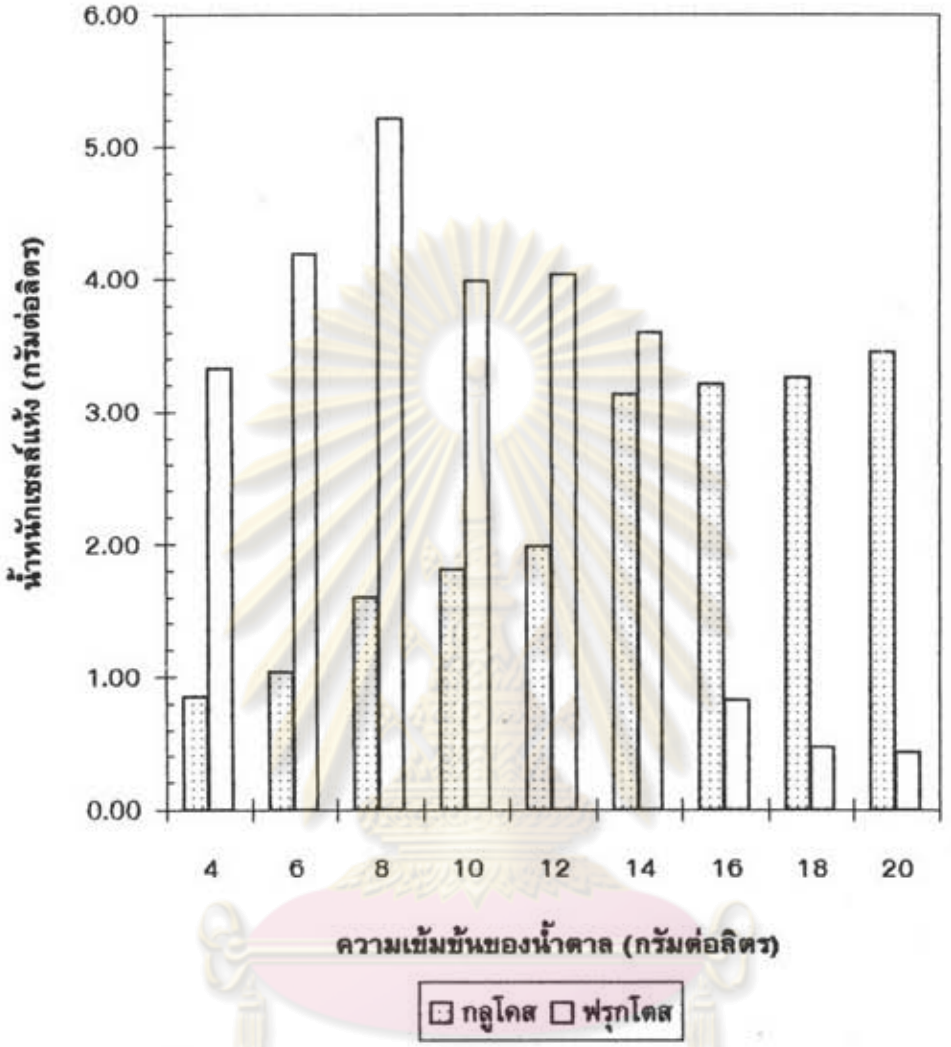
รูปที่ 5.6 แสดงผลการเจริญเติบโต และการสร้าง PHB ของเชื้อ *A. eutrophus* เมื่อใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



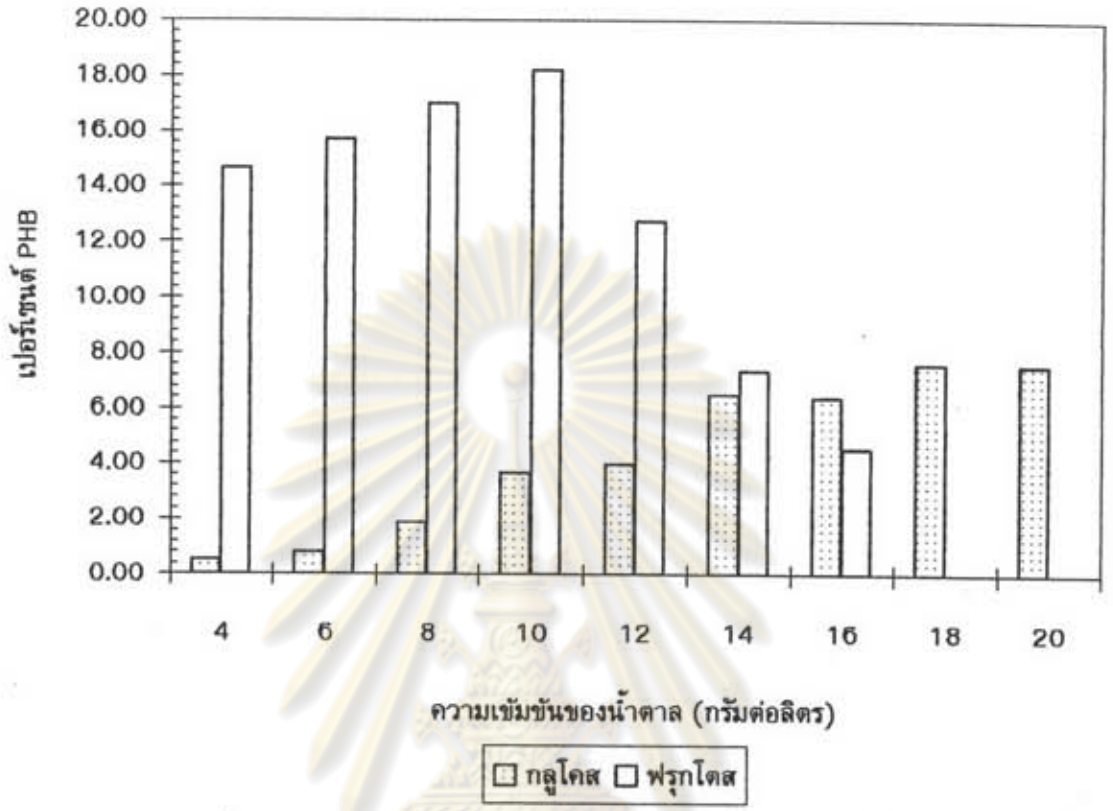
รูปที่ 5.7 แสดงผลการเจริญเติบโต และการสร้าง PHB ของเชื้อ *A. eutrophus* เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.8ก แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *A. eutrophus* เมื่อใช้กลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.8ข แสดงผลการเปรียบเทียบการสร้าง PHB ของเชื้อ *A. eutrophus* เมื่อใช้กลูโคส และฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

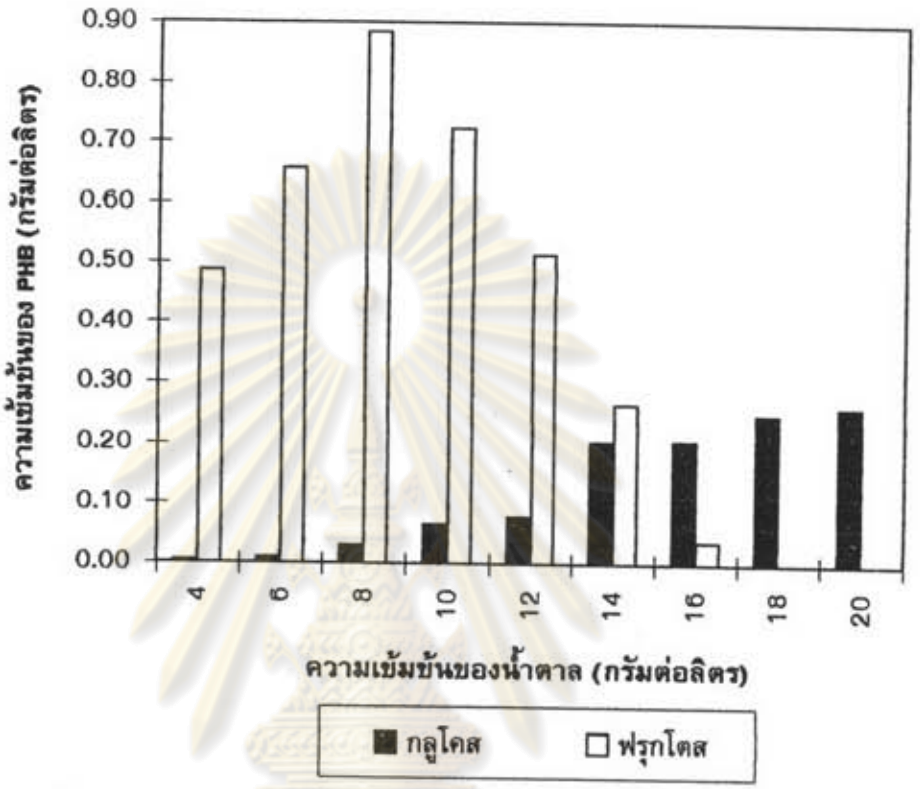
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถึงความเข้มข้นของ PHB ที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำตาลทั้งสองชนิด จะเห็นได้ว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในฟรุกโตสสามารถให้ความเข้มข้นของ PHB สูงกว่าเมื่อใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 4-14 กรัมต่อลิตร (ดังรูปที่ 5.8ค) ส่วนเมื่อเลี้ยงเชื้อในกลูโคสมีแนวโน้มที่ให้ความเข้มข้นของ PHB เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้น หากเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ PHB ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในกลูโคสต่ำ ดังนั้นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ ฟรุกโตส จากรูปที่ 5.6 เห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นฟรุกโตสเริ่มต้น 8 และ 10 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณ PHB ใกล้เคียงกัน คือ 16.99 และ 18.19 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ แต่ที่ความเข้มข้นฟรุกโตสเริ่มต้น 8 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์มากกว่าที่ความเข้มข้นฟรุกโตสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นฟรุกโตสเริ่มต้นที่ 8 กรัมต่อลิตรในการทำการทดลองต่อไป

5.2.2 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

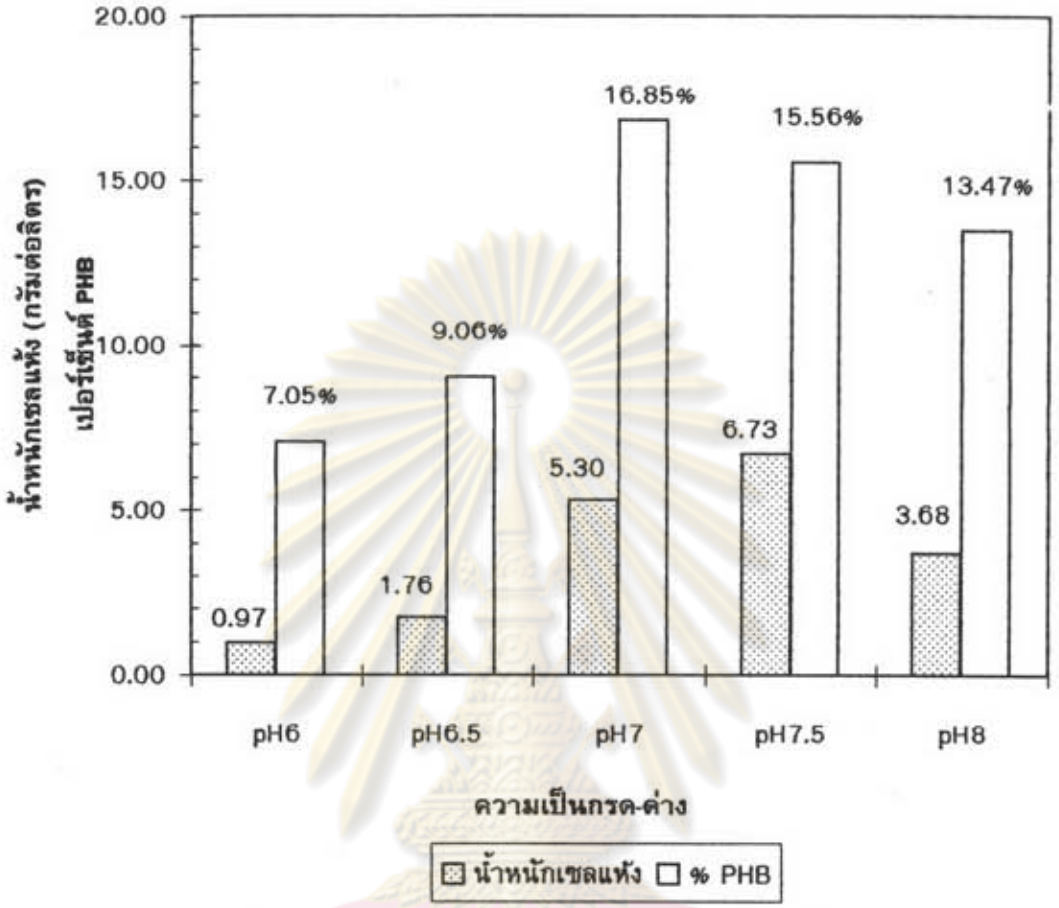
ในการหาค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ *A. eutrophus* ATCC 17697 (ตามข้อ 4.7.5) ใช้ฟรุกโตส 8 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 6 ถึง 8 เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ 48 ชั่วโมง มาวัดหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียและปริมาณ PHB พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อคือ 7.5 โดยให้ปริมาณเซลล์ 6.73 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ให้ปริมาณเซลล์เพียง 5.30 กรัมต่อลิตร แต่ที่ความเป็นกรด-ด่างทั้งสองค่านี้ให้ปริมาณ PHB ใกล้เคียงกัน โดยที่ความเป็นกรด-ด่าง 7 และ 7.5 ให้ปริมาณ PHB 16.85 และ 15.56 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (ดังรูปที่ 5.9) แต่เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของ PHB ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 ให้ความเข้มข้นของ PHB สูงกว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.5 (ดังรูปที่ 5.9) ดังนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



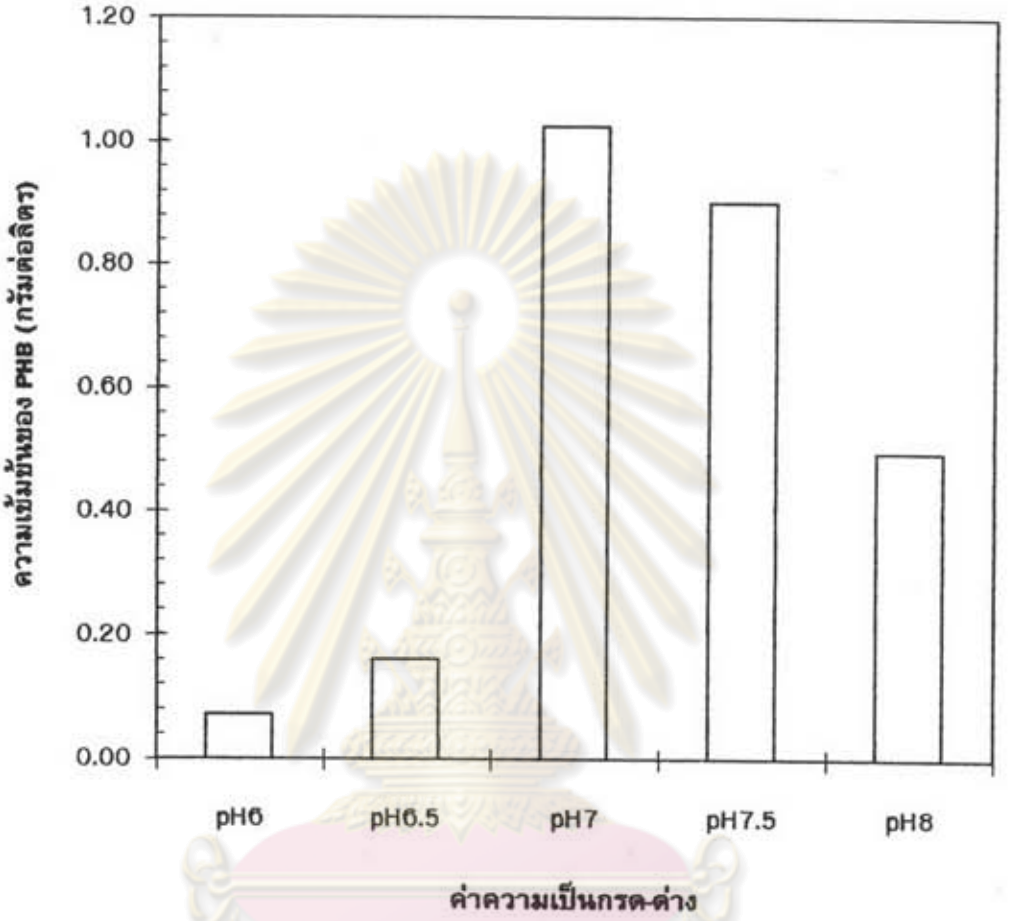
รูปที่ 5.8ค แสดงผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ PHB ของเชื้อ *A. eutrophus* เมื่อใช้กลูโคส และฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.9ก แสดงผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสร้าง PHB ของเชื้อ *A. eutrophus* เมื่อใช้ฟรุกโตสเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.9ข แสดงผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความเข้มข้นของ PHB ของเชื้อ *A. eutrophus* เมื่อใช้ฟรุกโตสเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร

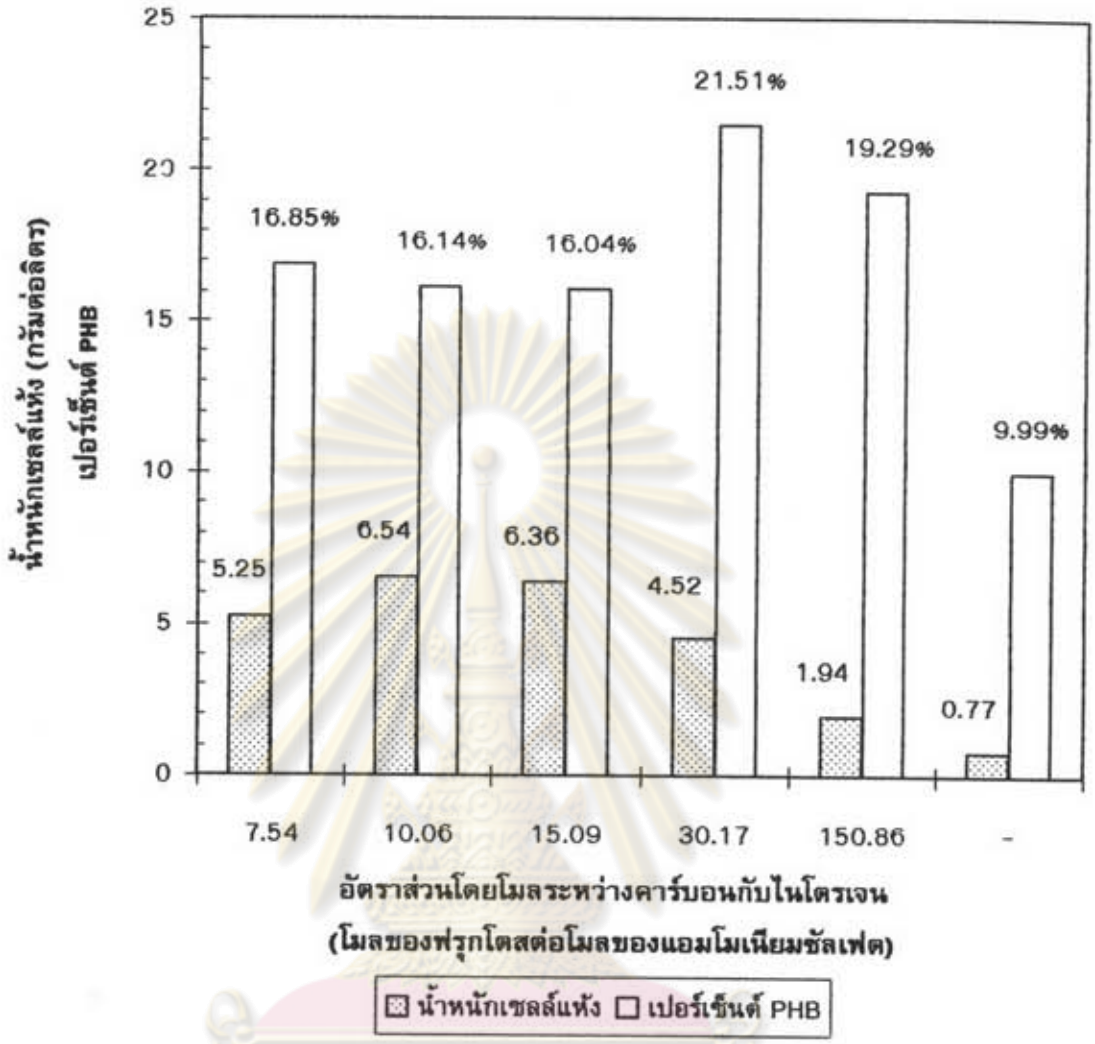
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2.3 ผลของอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญ และการผลิต PHB

เริ่มจากเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. eutrophus* ATCC 17697 (ตามข้อ 4.7.5) ใช้ฟรุกโตส 8 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วทำการแปรผันปริมาณไนโตรเจน โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตตั้งแต่ 0 ถึง 2 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ 48 ชั่วโมง มาวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียและปริมาณ PHB จากการทดลองพบว่าที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำๆมีผลกระตุ้นให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี โดยเฉพาะที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10.06 เซลล์สามารถเจริญได้ดี ได้น้ำหนักเซลแห้ง 6.54 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณ PHB 16.14 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงๆ มีผลกระตุ้นให้เซลล์มีการผลิต PHB มากขึ้น พบว่าที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 30.17 ให้ปริมาณ PHB สูงสุด 21.51 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ดังรูปที่ 5.10)

5.3 <u>ผลของการเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง</u>

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในหัวข้อนี้ เพื่อหาภาวะที่ *A. eutrophus* เจริญเติบโตสูงสุดในถังหมักขนาด 3 ลิตร ซึ่งมีการควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7, อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที และจากการทดลองเบื้องต้น (ข้อ 5.2.3) พบว่า ที่ค่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำๆ (ไนโตรเจนมากเกินพอ) จะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ดี ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7 ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. eutrophus* ATCC 17697 (ตามข้อ 4.7.6) โดยใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของฟรุกโตสที่ศึกษาคือ 6, 8, 10 และ 12 กรัมต่อลิตร ในแต่ละการทดลองใช้



รูปที่ 5.10 ผลของการแปรผันอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน ที่มีต่อการเจริญ และการสร้าง PHB ของเชื้อ *A. eutrophus* โดยใช้ฟรุกโตสเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร

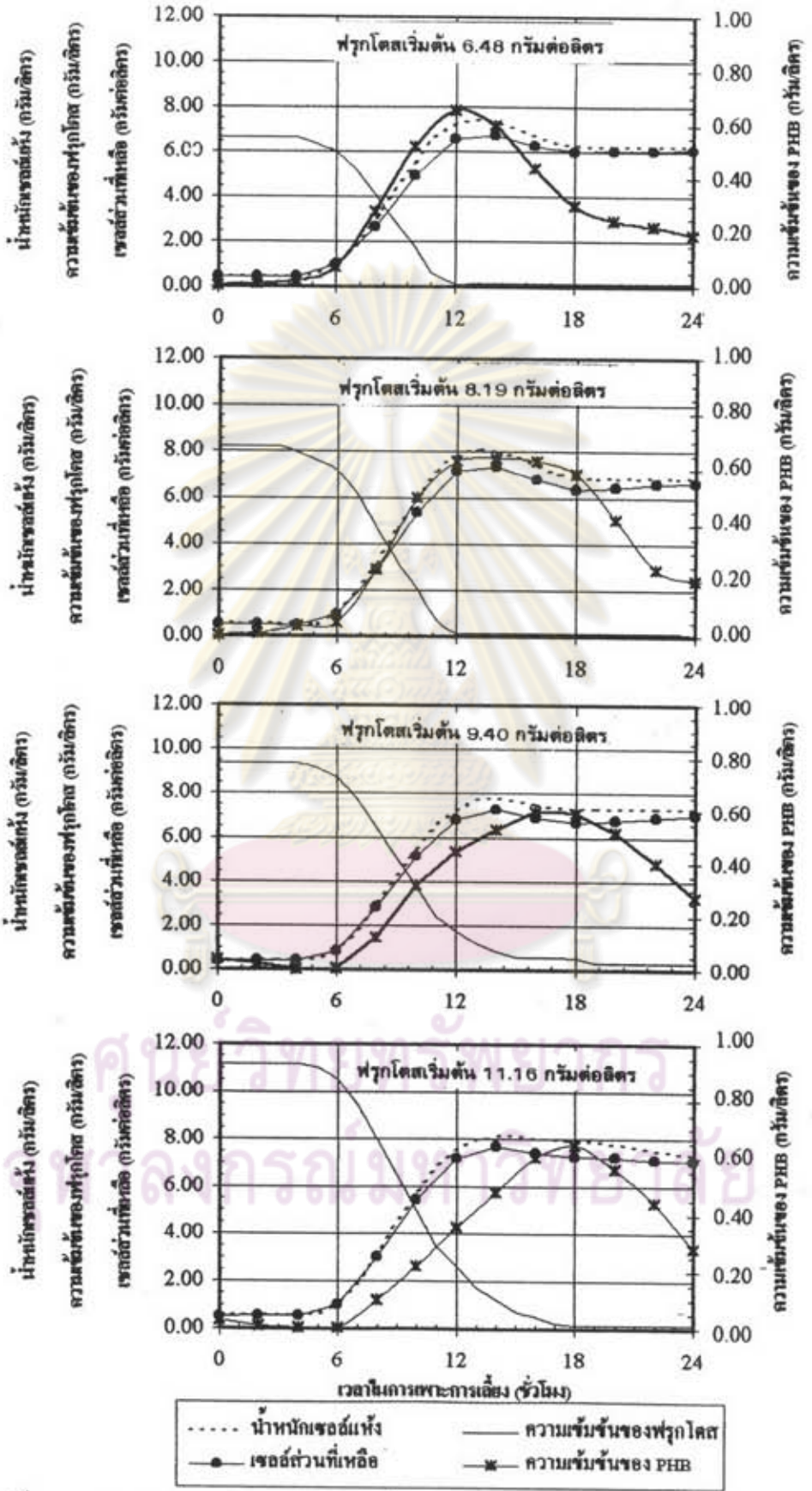
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวลาเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 28 เปอร์เซนต์ เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง มาวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย และวิเคราะห์ปริมาณ PHB รูปที่ 5.11 แสดงค่าน้ำหนักเซลแห้ง ปริมาณฟรุกโตส และปริมาณ PHB จากผลการทดลองพบว่า *A. eutrophus* มีระยะพักตัว (lag phase) ก่อนในช่วงแรก ต่อจากนั้นเริ่มมีการแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตที่ 6 ชั่วโมงของเวลาในการเพาะเลี้ยง และมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (log phase) จนกระทั่งถึง 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นปริมาณเซลล์เริ่มคงที่ (stationary phase) และหลังจาก 15 ชั่วโมงไปแล้วปริมาณเซลล์ค่อยๆ ลดลง (death phase) จากรูปที่ 5.12 แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร และอัตราผลผลิตเซลล์ ในแต่ละการทดลองที่ความเข้มข้นของฟรุกโตสต่างๆกัน พบว่าได้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากันทั้งสี่การทดลอง เมื่อพิจารณาค่าอัตราผลผลิตเซลล์ พบว่าอัตราผลผลิตเซลล์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของฟรุกโตสเพิ่มขึ้น และให้ค่าสูงสุดที่ความเข้มข้นของฟรุกโตสเท่ากับ 8.19 กรัมต่อลิตร และอัตราผลผลิตเซลล์ค่อยๆ ลดลงจนคงที่เมื่อความเข้มข้นของฟรุกโตสมากกว่า 9.40 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้จะว่าทั้งสี่การทดลองเซลล์สร้าง PHB น้อยมาก (ดังรูปที่ 5.11) ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของฟรุกโตสประมาณ 8-9 กรัมต่อลิตร ในเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องที่มีการเวียนเซลล์กลับ

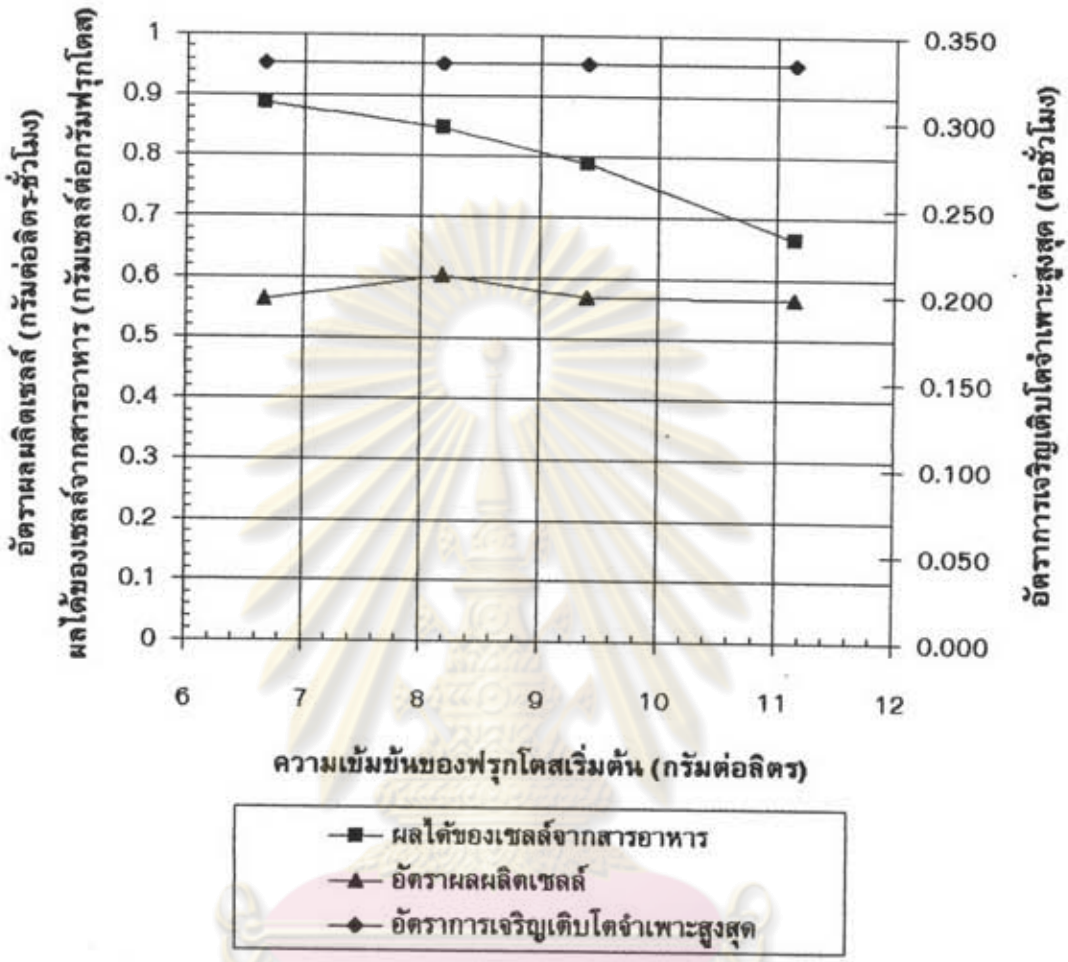
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.4 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องที่มีการเวียนเซลล์กลับ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในหัวข้อนี้ เพื่อหาภาวะในการเลี้ยง *A. eutrophus* ให้ได้ปริมาณเซลล์สูงสุด และหาภาวะการกระตุ้นให้สร้าง PHB โดยการป้อนสารอาหารที่ควบคุมค่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน ในระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีการเวียนเซลล์กลับ ซึ่งมีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 2.9 ลิตร (น้ำหมักในถังหมัก 1 ลิตร และในระบบไมโครฟิลเตรชันอีก 1.9 ลิตร) และมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส, ค่าความเป็นกรด-ด่าง



รูปที่ 5.11 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. eutrophus* ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันปริมาณฟรุกโตสเริ่มต้นต่าง ๆกัน



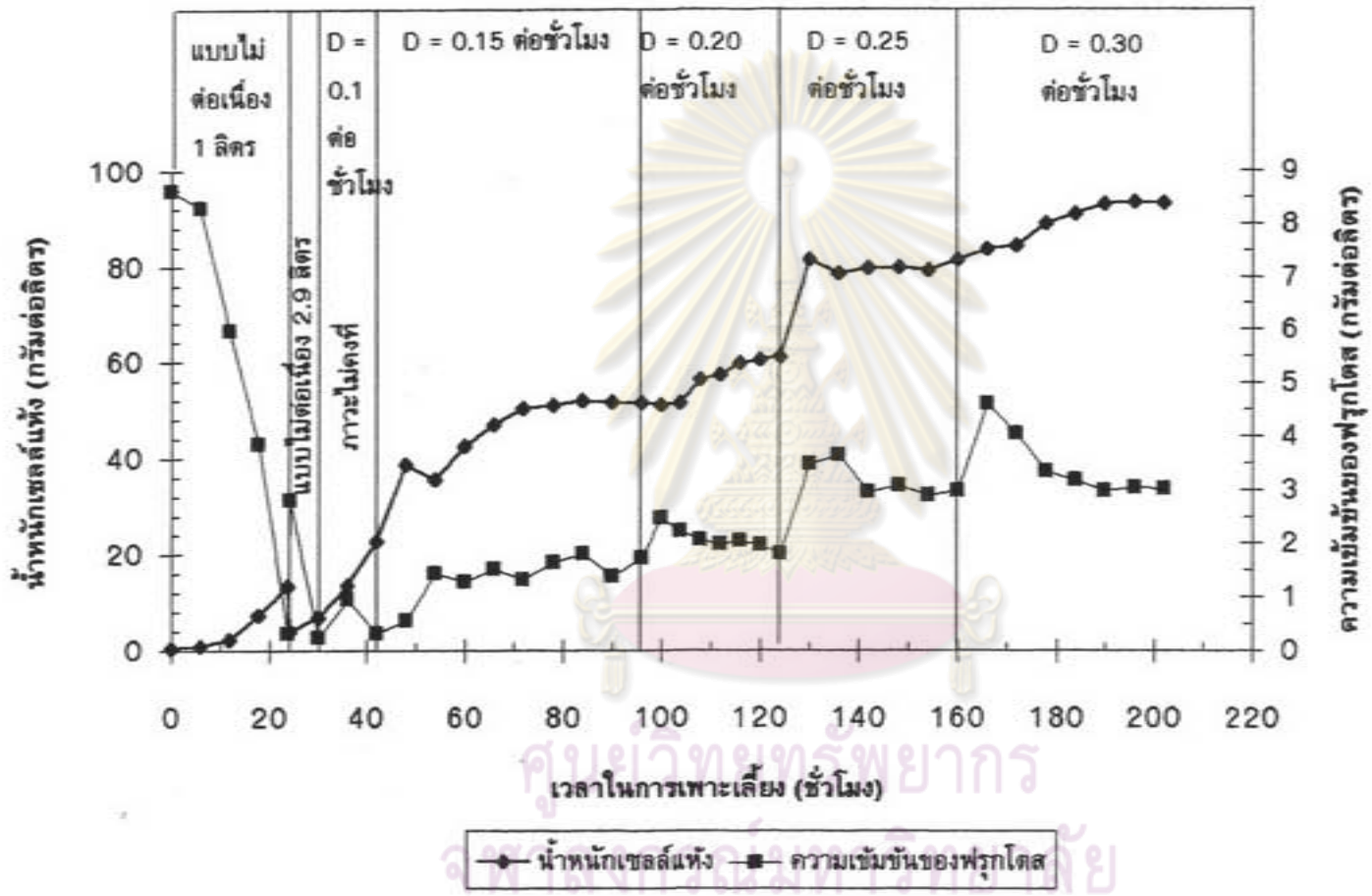
รูปที่ 5.12 แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ผลได้ของเซลล์จากสาร อาหาร และอัตราผลผลิตเซลล์ เมื่อแปรผันความเข้มข้นของฟรุกโตส เริ่มต้นต่างๆกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เท่ากับ 7, อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เริ่มทำการเลี้ยงเชื้อ *A. eutrophus* (ตามข้อ 4.7.7) โดยใช้ความเข้มข้นฟรุกโตสประมาณ 8-9 กรัมต่อลิตร ในช่วงแรกของการเจริญเติบโตปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย 1 โมลาร์ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ และในช่วงที่มีการกระตุ้นให้สร้าง PHB จะปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง มาวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย และวิเคราะห์ปริมาณ PHB

5.4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องที่มีการเวียนเซลล์กลับ ในช่วงที่มีการเจริญเติบโต

รูปที่ 5.13 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. eutrophus* ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่มีการเวียนเซลล์กลับ โดยเริ่มจากทำการเพาะเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่องที่ปริมาตร 1 ลิตร ก่อน (โดยที่ไม่มีการเวียนเซลล์กลับ) จากการทดลองพบว่า ได้ปริมาณเซลล์ 13.30 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมง และพบว่าความเข้มข้นของฟรุกโตสเหลืออยู่แค่ 0.33 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงทำการเพาะเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่องที่มีการเวียนเซลล์กลับ โดยการป้อนสารอาหารเข้าไปในถังหมักอีก 1.9 ลิตร เพื่อให้มีปริมาตรเต็มระบบ 2.9 ลิตร พบว่าที่ 30 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงได้เซลล์ 6.98 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฟรุกโตสเหลืออยู่แค่ 0.25 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเริ่มทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องที่มีการเวียนเซลล์กลับ โดยเริ่มต้นจากค่าอัตราการเจือจางที่ 0.1 ต่อ ชั่วโมง แต่ปริมาณฟรุกโตสยังต่ำกว่า 1 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงต้องเพิ่มค่าอัตราการเจือจางเป็น 0.15 ต่อชั่วโมง เมื่อเปลี่ยนอัตราการเจือจางเป็น 0.15 ต่อชั่วโมงแล้ว พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนกระทั่งเข้าสู่ภาวะคงที่ ได้เซลล์โดยเฉลี่ย 51.14 กรัมต่อลิตร อัตราการใช้สารอาหารเท่ากับ 1.17 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 0.2, 0.25 และ 0.3 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งสามารถสรุปผลการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. eutrophus* ที่อัตราการเจือจางต่างๆ ดังได้ตารางที่ 5.2 และรูปที่ 5.14

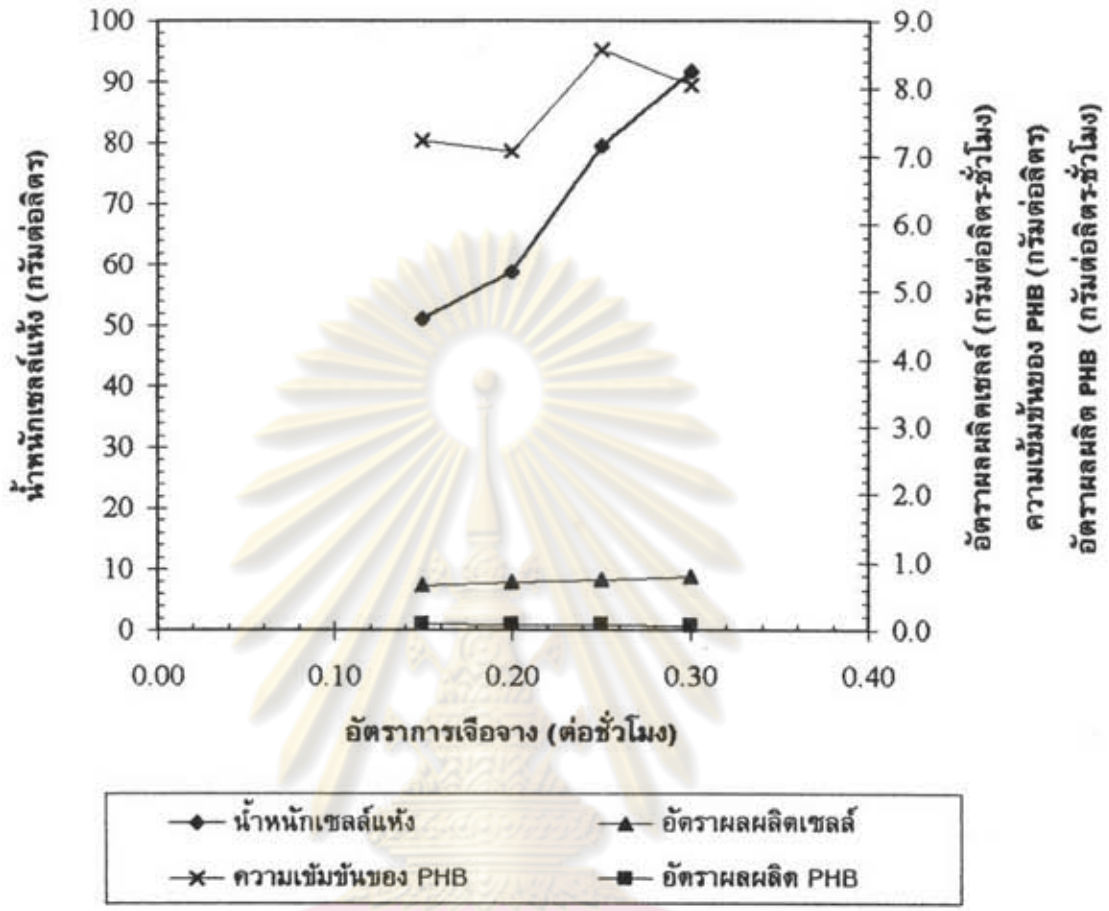


รูปที่ 5.13 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. eutrophus* ในถังหมักแบบต่อเนื่องที่มีการเวียนเซลล์กลับที่อัตราการเจือจางต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 5.14 จะเห็นได้ว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มอัตราการเจือจาง โดยที่อัตราการเจือจาง 0.3 ต่อชั่วโมง ได้เซลล์เข้มข้น 91.77 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราผลผลิตเซลล์ 0.78 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง (ตารางที่ 5.2) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงค่าอัตราผลผลิต PHB เพิ่มขึ้นตามค่าอัตราการเจือจาง และคงที่เมื่ออัตราการเจือจางมากกว่า 0.2 ต่อชั่วโมง ดังนั้นอัตราเจือจางที่เหมาะสมในการเจริญ เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์สูงสุด คืออัตราการเจือจาง 0.3 ต่อชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.14 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. eutrophus* อัตราผลผลิตเซลล์ อัตราผลผลิต PHB และความเข้มข้นของ PHB ที่อัตราการเจือจางต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.2 ผลการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. eutrophus* ในถังหมักแบบต่อเนื่องที่มีการเวียนเซลล์กลับ ที่อัตราการเจือจางต่างๆ

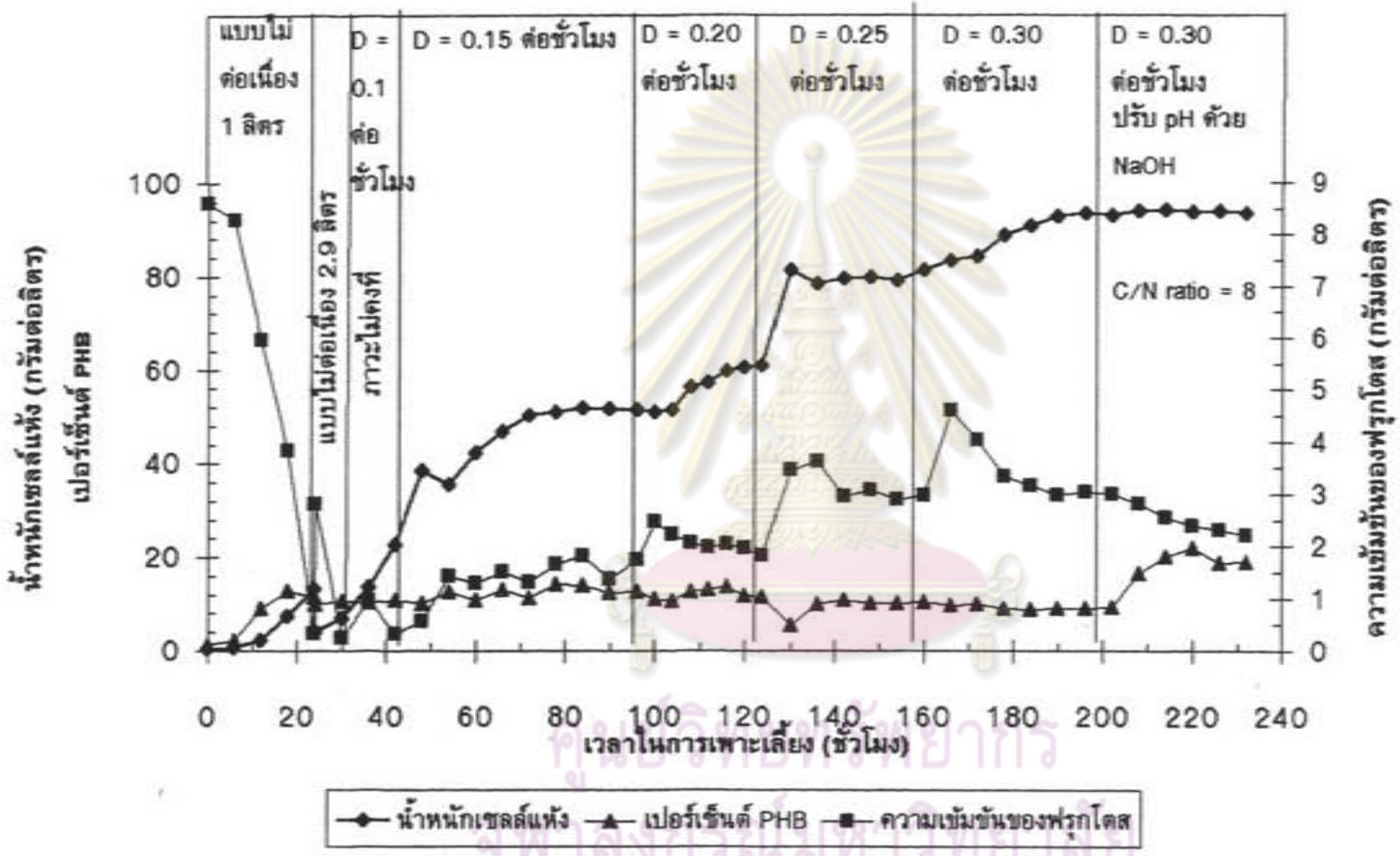
อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)	ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	อัตราผลผลิตเซลล์ (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	อัตราการใช้สารอาหาร (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของ PHB (กรัมต่อลิตร)	% PHB (% by cell dry wt.)	อัตราผลผลิต PHB (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	อัตราผลผลิต PHB จำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร
0.15	51.14	0.0057	0.67	1.17	7.23	14.23	0.095	0.0019	0.57
0.20	58.84	0.0068	0.71	1.71	7.08	11.74	0.083	0.0014	0.41
0.25	79.55	0.0098	0.75	0.91	8.57	10.77	0.081	0.0010	0.82
0.30	91.77	0.0035	0.78	0.93	8.05	8.87	0.069	0.0008	0.83

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

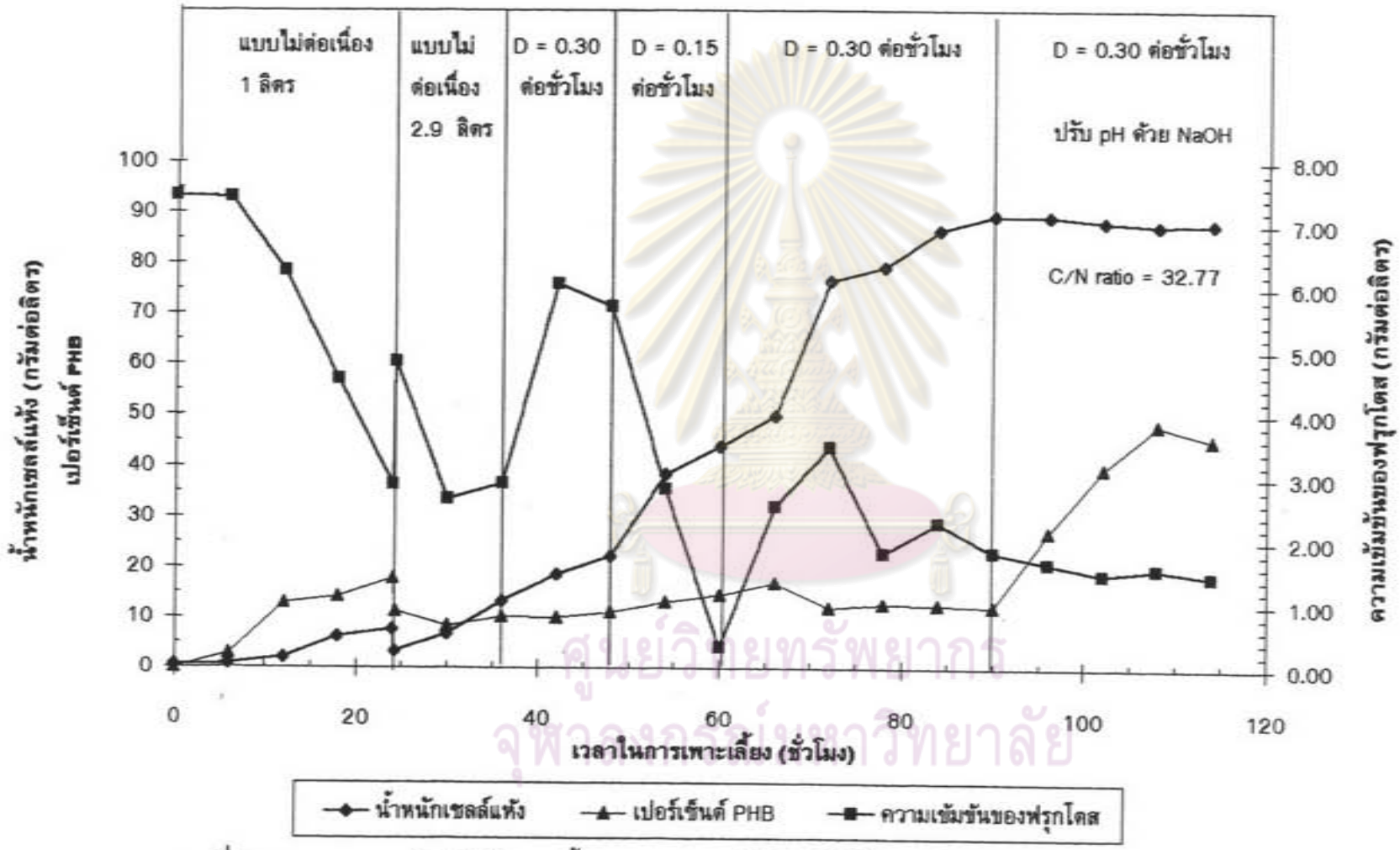
5.4.2 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องที่มีการเวียนเซลล์กลับ ในช่วงที่มีการกระตุ้นให้สร้าง PHB

ทำการทดลองตามข้อ 5.4.1 จนกระทั่งได้ปริมาณเซลล์คงที่แล้ว หลังจากนั้นกระตุ้นให้มีการสร้าง PHB โดยการแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 2, 0.5 และ 0.1 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 8.00 32.77 และ 159.82 ตามลำดับ (เปลี่ยนสารปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจาก 1 โมลาร์ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เป็น 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์) พบว่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสูตรอาหาร มีผลทำให้เซลล์จุลินทรีย์มีการสะสม PHB เพิ่มขึ้น (ดังรูปที่ 5.15, 5.16 และ 5.17) เมื่อเปรียบเทียบผลของอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ ต่อการผลิต PHB สามารถสรุปผลได้ดังรูปที่ 5.18 และตารางที่ 5.3 จากรูปที่ 18 จะเห็นได้ว่าที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 32.77 เซลล์มีอัตราผลผลิต PHB สูงถึง 0.66 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และสะสม PHB ได้สูงสุด 47.83 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ดังรูปที่ 5.19) จากผลการทดลองจะเห็นว่าในงานวิจัยนี้ได้นำไมโครฟิลเตรชันมาประยุกต์ในการเพิ่มอัตราผลผลิต PHB ขึ้นได้ ซึ่งเมื่อเปรียบการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* NCIMB 11599 แบบกึ่งต่อเนื่อง โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยไม่ได้นำไมโครฟิลเตรชันมาประยุกต์ใช้ พบว่ามีการสะสม PHB เพียง 18 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และคิดเป็นอัตราการผลิต PHB 0.25 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง (Kim และคณะ, 1993) ในทำนองเดียวกับผลการวิจัยของ Sonnleitener และคณะ (1979) ในการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* H16 แบบไม่ต่อเนื่อง ซึ่งไม่ได้ประยุกต์ใช้ไมโครฟิลเตรชัน มีการสะสม PHB 16 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็นอัตราผลผลิต PHB 0.23 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง หากเมื่อเปรียบเทียบผลของการเพาะเลี้ยง Recombinant *E coli* แบบกึ่งต่อเนื่อง มีการสะสม PHB 89 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็นอัตราการผลิต PHB ได้ถึง 2.11 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

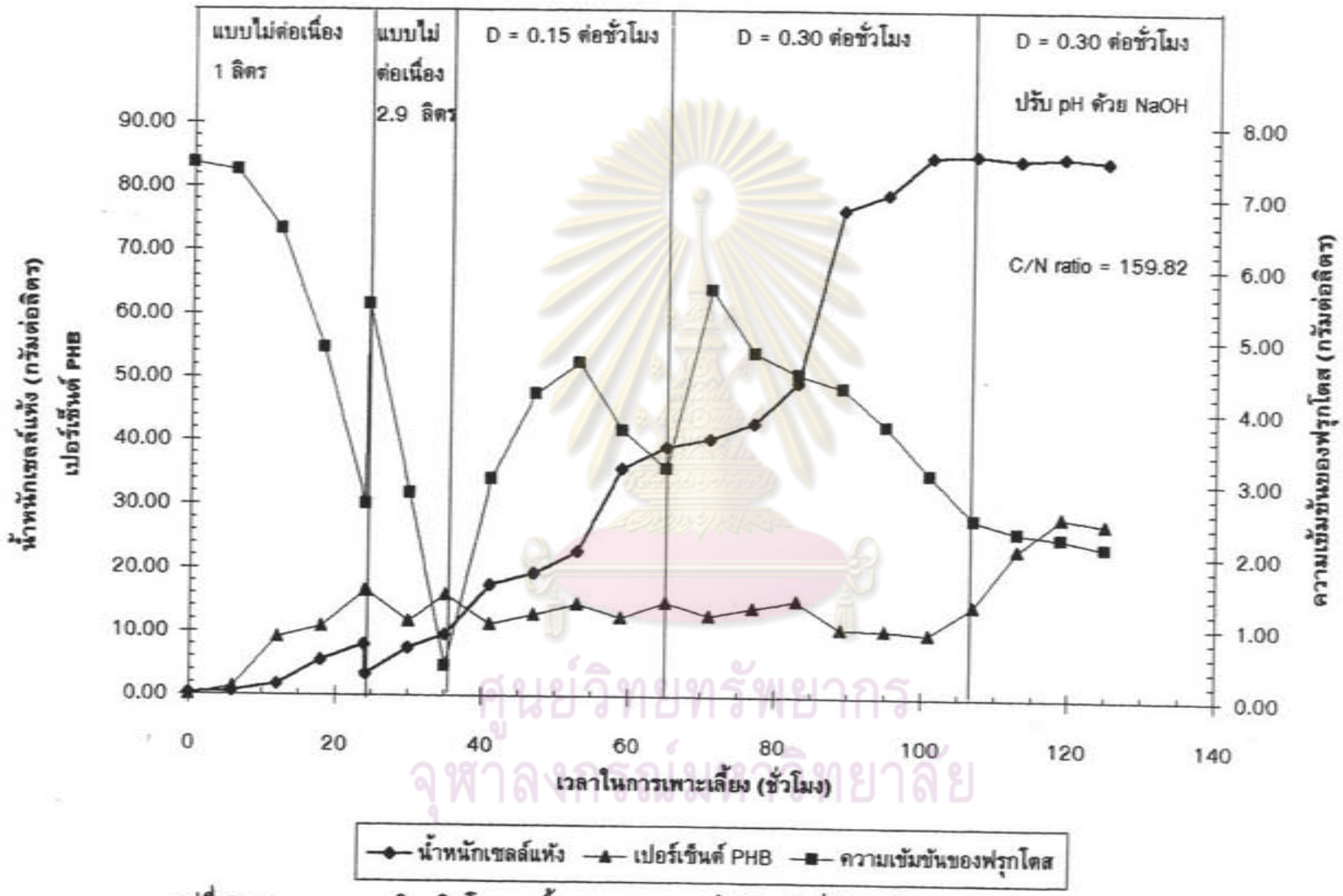


รูปที่ 5.15 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. eutrophus* ในถังหมักที่มีการเวียนเซลล์กลับ และการสะสม PHB ที่ C/N ratio เท่ากับ 8



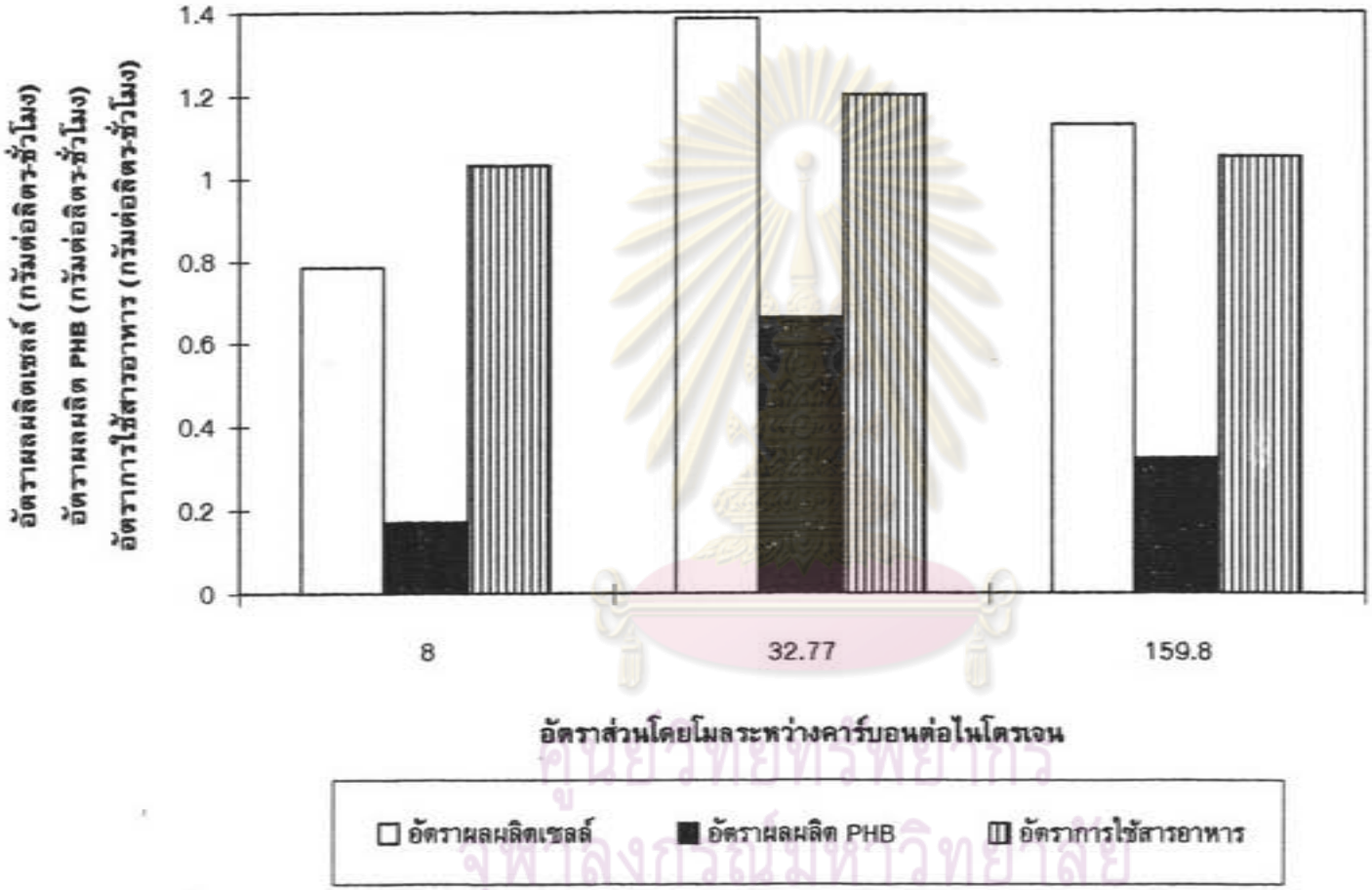
รูปที่ 5.16 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. eutrophus* ในถังหมักที่มีการเวียนเซลล์กลับ และการสะสม PHB ที่ C/N ratio เท่ากับ 32.77

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.17 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. eutrophus* ในถังหมักที่มีการเวียนเซลล์กลับ และการสะสม PHB ที่ C/N ratio เท่ากับ 159.82

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



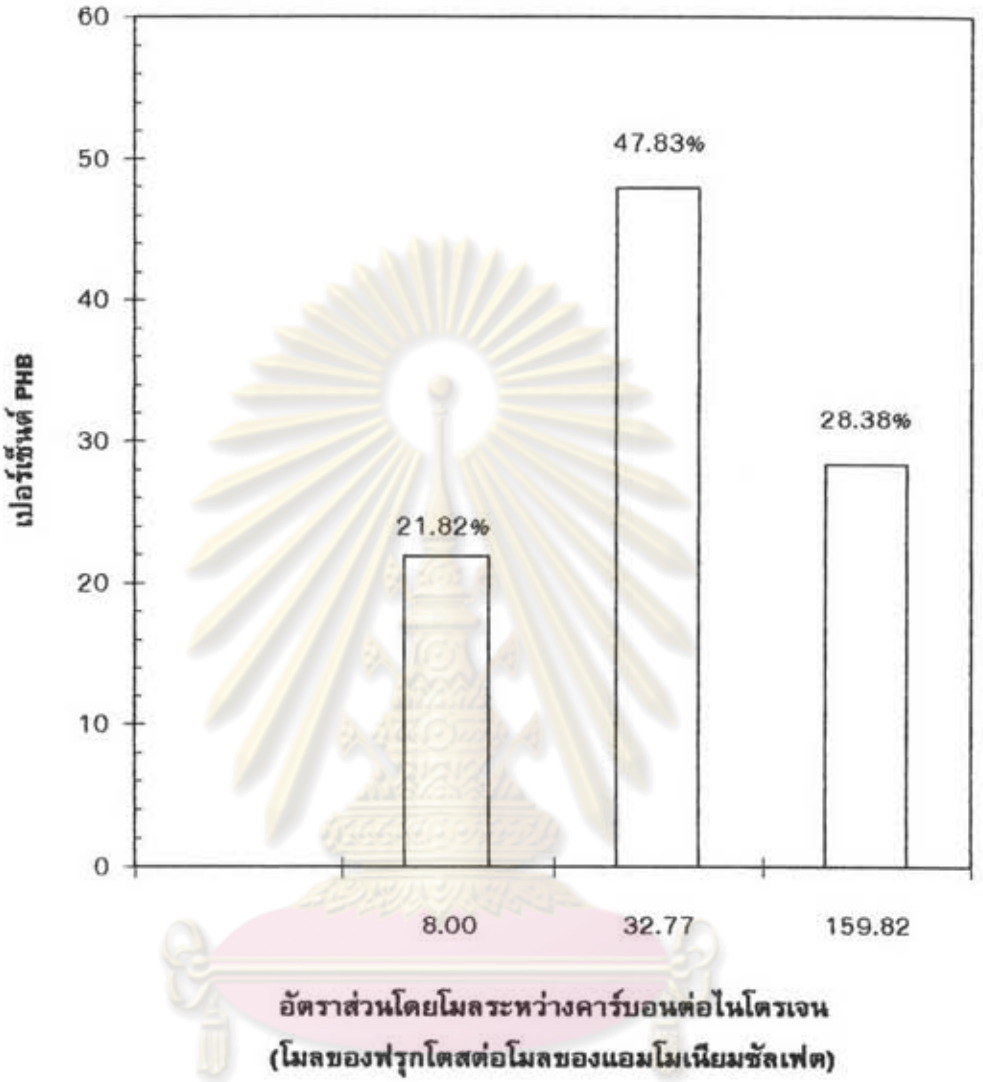
รูปที่ 5.18 ผลของอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ออัตราผลผลิตเซลล์ อัตราผลผลิต PHB และอัตราการใช้สารอาหาร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.3 ผลของอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ ที่มีต่อการผลิต PHB ในถังหมักแบบต่อเนื่องที่มีการเวียนเซลล์กลับ

อัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน	ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ PHB (กรัมต่อลิตร)	% PHB (by cell dry wt.)	อัตราผลผลิตเซลล์ (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	อัตราผลผลิต PHB (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	อัตราการใช้สารอาหาร (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	อัตราผลผลิต PHB จำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
8.00	93.58	20.47	21.82	0.785	0.17	1.03	0.0018
32.77	88.01	41.76	47.83	1.384	0.66	1.20	0.0075
159.82	84.74	24.08	28.38	1.127	0.32	1.05	0.0038

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.19 แสดงเปอร์เซ็นต์ PHB ที่สะสมในเซลล์ เมื่อทำการแปรผันอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จะเห็นได้ว่าในกรณีที่ใช้ Recombinant *E coli* มีการสะสม PHB สูงกว่าเชื้อ *A. eutrophus* ATCC 17697 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เนื่องมาจากการปรับปรุงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย มีผลทำให้มีการสะสม PHB ได้สูงขึ้น โดยไม่ได้ใช้เทคนิคไมโครฟิลเตรชันหรือเทคนิคด้านกระบวนการอื่นๆ เข้าช่วย

<u>สรุปผลการทดลอง</u>

1. จากการศึกษาผลของความดันขาเข้า และอัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับต่อค่าเพอมิเอชันฟลักซ์ ที่ความเข้มข้นเซลล์ต่ำๆ ค่าเพอมิเอชันฟลักซ์เพิ่มขึ้นเมื่อความดันขาเข้าและอัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับเพิ่มขึ้น ส่วนที่ความเข้มข้นเซลล์สูงๆ ค่าเพอมิเอชันฟลักซ์เพิ่มขึ้น เมื่ออัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับเพิ่มขึ้น แต่ค่าเพอมิเอชันฟลักซ์จะคงที่ เมื่อความดันเพิ่มขึ้น

จากการกรองเซลล์จะเห็นได้ว่า เมื่อความดันขาเข้ามากกว่า 0^{+} กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร มีผลทำให้เกิดความต้านทานของชั้นเจลขึ้น และในการกรองเซลล์ที่อัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับที่ 0.5 และ 0.6 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง โดยทั่วไปมักมีผลทำให้เซลล์แตก และน้ำหมักเกิดฟองขึ้นมาก ซึ่งยากต่อการควบคุมระบบ ดังนั้นจึงเลือกใช้ค่าความดันขาเข้า และอัตราการไหลในกระแสเวียนเซลล์กลับที่ 0^{+} กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร และ 0.4 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง

2. การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิต PHB ในระดับขวดแก้วทรงกรวย พบว่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก) ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ให้ปริมาณเซลล์ และ PHB สูงกว่ากลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่า ที่ความเข้มข้นฟรุกโตส 8 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์และ PHB สูงกว่าที่ฟรุกโตส 10 กรัมต่อลิตร

ข) ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการผลิต PHB อยู่ที่ 7 ให้ปริมาณ PHB 16.85 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 5.30 กรัมต่อลิตร

ค) ที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำๆ (เท่ากับ 10.06) เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดี ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.54 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อัตราส่วนโดยมวลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30.17 เซลล์สามารถสะสม PHB ได้มากถึง 21.15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

3. การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่าที่ปริมาณฟรุกโตสประมาณ 8-9 กรัมต่อลิตร ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ 0.333 ต่อชั่วโมง โดยได้ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร ประมาณ 80% และพบว่า PHB เกิดขึ้นน้อยมาก

4. ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบต่อเนื่องแบบที่มีการเวียนเซลล์กลับ ได้อัตราการเจือจางที่เหมาะสมที่ 0.30 ต่อชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 88.01 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราผลผลิตเซลล์เท่ากับ 1.384 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และหลังจากที่เซลล์ถูกกระตุ้นให้สร้าง PHB พบว่าที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 32.77 สามารถกระตุ้นให้เซลล์สะสม PHB ได้ 47.83 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้อัตราผลผลิต PHB เป็น 0.66 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง โดยสรุปการใช้ไมโครฟิลเตรชันจะช่วยปรับภาวะอาหารไม่สมดุลในถังหมักได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้เซลล์สะสม PHB ได้มากขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

1. การเพิ่มเพอมิเอชันฟลักซ์ สามารถทำได้โดยการเพิ่มพื้นที่ผิวการกรองของเยื่อแผ่นที่ใช้

2. ในการผลิต PHB จากเชื้อจุลินทรีย์ ควรหาเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก เช่น กากน้ำตาล น้ำมันพืช หรือกรดไขมันที่มีสายโซ่ยาวๆ เพื่อลดต้นทุนในการผลิต

3. ควรหากระบวนการผลิต PHB ในระบบต่อเนื่อง เพื่อลดต้นทุนการผลิต เช่น พัฒนาระบบการสร้างเซลล์ เพื่อป้อนเข้าระบบการสร้าง PHB เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย