บทที่ 5

วิเคราะห์ และสรุปผลการทดลอง

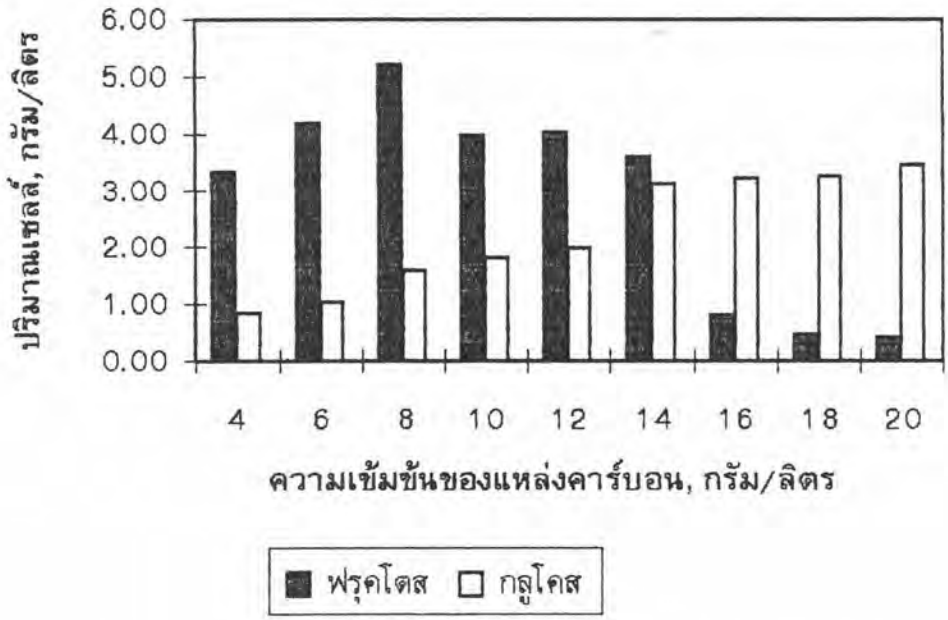
5.1 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC 17697 แบบไม่ต่อเนื่อง

การศึกษาในหัวข้อนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตในระดับขวดแก้วทรงกรวย โดยเริ่มจากการหาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมก่อน หลังจากนั้นจึงหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะกับการเจริญของเชื้อ ต่อจากนั้นหาอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อไป

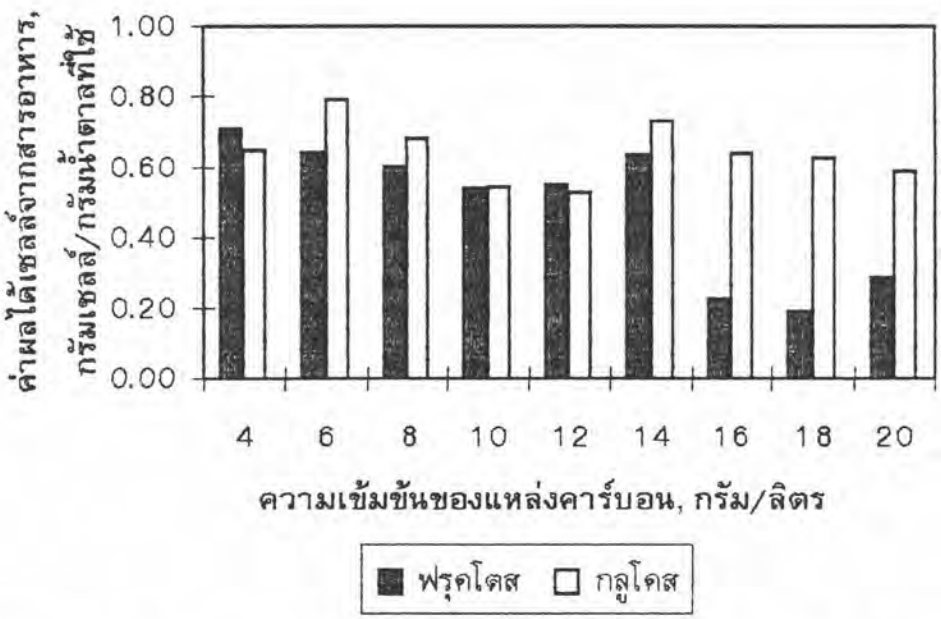
5.1.1 ผลการทดลองหาชนิด และปริมาณของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC 17697

ผลการทดลองในส่วนนี้ ดังได้แสดงในรูปที่ 5.1 และ รูปที่ 5.2 จากรูปที่ 5.1 จะเห็นได้ว่า ในช่วงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่ำๆ การเพาะเลี้ยงโดยใช้ฟรุคโตสจะให้ปริมาณเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ 48 ชั่วโมงมากกว่ากลูโคสในความเข้มข้นเท่าๆ กัน แต่เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนในปริมาณสูงขึ้น ในกรณีของฟรุคโตสการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จะถูกยับยั้งให้ช้าลง สังเกตุจากปริมาณเซลล์ที่ได้มีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกันเชื้อจะเจริญเติบโตได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้ขึ้นไปอีก อัตราการเจริญเติบโตมีแนวโน้มที่จะไม่เพิ่มขึ้นต่อไป หลังจากการเพาะเลี้ยงได้ 48 ชั่วโมงพบว่า ปริมาณเซลล์ค่าสูงสุดเมื่อใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน คือ 5.21 กรัม/ลิตร ที่น้ำตาลฟรุคโตสเริ่มต้นเข้มข้น 8.0 กรัม/ลิตร และเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณเซลล์ที่ได้ คือ 3.45 กรัม/ลิตร ที่น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเข้มข้น 20.0 กรัม/ลิตร

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าผลได้เซลล์จากสารอาหารในการเพาะเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิด ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 5.2 เห็นได้ว่า ค่าผลได้จากการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าสูงสุด 0.79 ที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 6.0 กรัม/ลิตร ในขณะที่เมื่อใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ค่าผลได้จะมีค่าสูงสุด 0.64 ที่ความเข้มข้นของฟรุคโตสเริ่มต้น 6.0 กรัม/ลิตร เช่นเดียวกัน ซึ่งจากการเปรียบเทียบนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อจุลินทรีย์มีความสามารถในการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตได้อย่างคุ้มค่ามากกว่าที่จะใช้ฟรุคโตส



รูปที่ 5.1 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอน ต่างๆที่อายุการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง



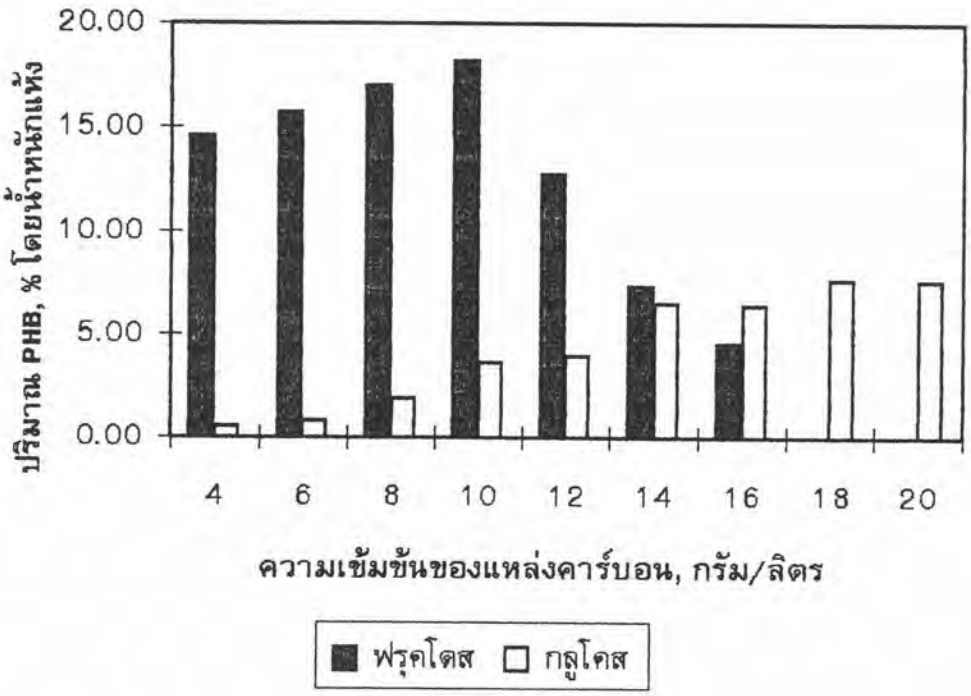
รูปที่ 5.2 เปรียบเทียบค่าผลได้ของเซลล์จากสารอาหารที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ที่อายุการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง

นอกจากนี้ยังได้เปรียบเทียบปริมาณ PHB หรือพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ได้เมื่ออายุการเพาะเลี้ยงครบ 48 ชั่วโมง ผลการเปรียบเทียบดังแสดงในรูปที่ 5.3 ในช่วงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนตั้งแต่ 4-10 กรัม/ลิตร เมื่อใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณ PHB จะสูงกว่าเมื่อใช้กลูโคส และปริมาณ PHB จะสูงขึ้นเรื่อยๆ ตามการเพิ่มความเข้มข้นของฟรุคโตส สูงสุดที่18.19% เมื่อใช้ฟรุคโตสเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร แต่หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มค่าความเข้มข้นต่อไป ปริมาณ PHB กลับจะมีค่าลดลงอย่างมาก ในขณะเดียวกันในกรณีที่ใช้กลูโคส ปริมาณ PHB ที่ได้จะมีค่าเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามหลังจากที่เพิ่มค่าความเข้มข้นของกลูโคสขึ้นไปมากกว่า 18 กรัม/ลิตร ปริมาณ PHB มีแนวโน้มที่จะไม่เพิ่มขึ้นต่อไป ปริมาณ PHB สูงสุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคสมีค่า 7.6 กรัม/ลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นมากกว่า 18 กรัม/ลิตร

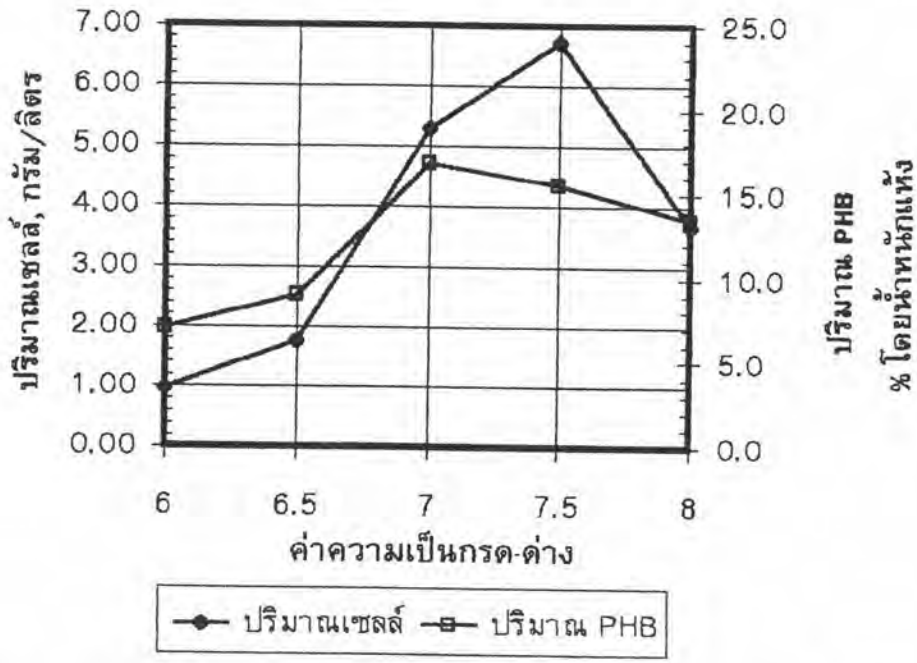
จากผลการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดดังกล่าว สามารถกล่าวได้ว่า เมื่อใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้ปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHB ที่มากกว่า โดยเมื่อใช้ฟรุคโตสด้วยความเข้มข้น 8 กรัม/ลิตร เชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC 17697 จะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด แต่เชื้อจุลินทรีย์จะสามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตได้อย่างคุ้มค่ามากกว่า แต่อย่างไรก็ตามสืบเนื่องจากการใช้กลูโคสส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ช้ากว่าเมื่อใช้ฟรุคโตสมาก ซึ่งจะส่งผลให้ค่าอัตราผลผลิตมีค่าต่ำลงไปด้วย ดังนั้นหากต้องการปรับปรุงกระบวนการผลิต เพื่อให้ได้ค่าอัตราผลผลิตที่ดี จึงจำเป็นจะต้องใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับในด้านการสร้าง PHB เชื้อจุลินทรีย์จะใช้น้ำตาลฟรุคโตสได้ดีกว่า โดยให้ปริมาณ PHB ที่สูงกว่า

5.1.2 ผลการทดลองหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์

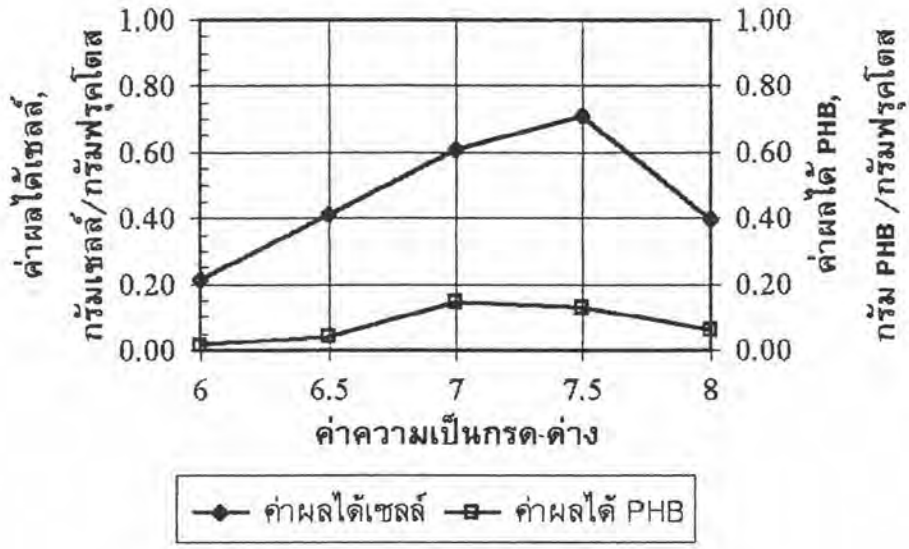
ผลการทดลองหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ Alcaligenes eutrophus ATCC 17697 ได้แสดงในรูปที่ 5.4 ถึงรูปที่ 5.5 ซึ่งพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยน้ำตาลฟรุคโตส ปริมาณ 8.0 กรัม/ลิตร ปริมาณเซลล์ที่ได้หลังจากอายุการเพาะเลี้ยงได้ 48 ชั่วโมงจะมีค่าสูงขึ้น เมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นให้สูงขึ้น จนกระทั่งค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 7.5 ปริมาณเซลล์ที่ได้ จึงเริ่มตกลงมาดังแสดงในรูปที่ 5.4 และการเปลี่ยนแปลงค่าผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร และค่าผลได้ผลิตภัณฑ์จากสารอาหารก็ดำเนินไปในลักษณะเดียวกัน ดังได้แสดงในรูปที่ 5.5 ดังนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างที่ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด และช่วยให้เชื้อจุลินทรีย์ใช้สารอาหารได้ดีที่สุด คือ 7.5 แต่สำหรับการสร้าง PHB พบว่าปริมาณ PHB ที่อายุการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง หรืออัตราการสร้าง PHB มีค่าสูงที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0



รูปที่ 5.3 เปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่อายุการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง



รูปที่ 5.4 แสดงปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHB ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC 17697 แบบไม่ต่อเนื่องในขวดแก้วทรงกรวยที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มตั้งแต่ 6.0 ถึง 8.0

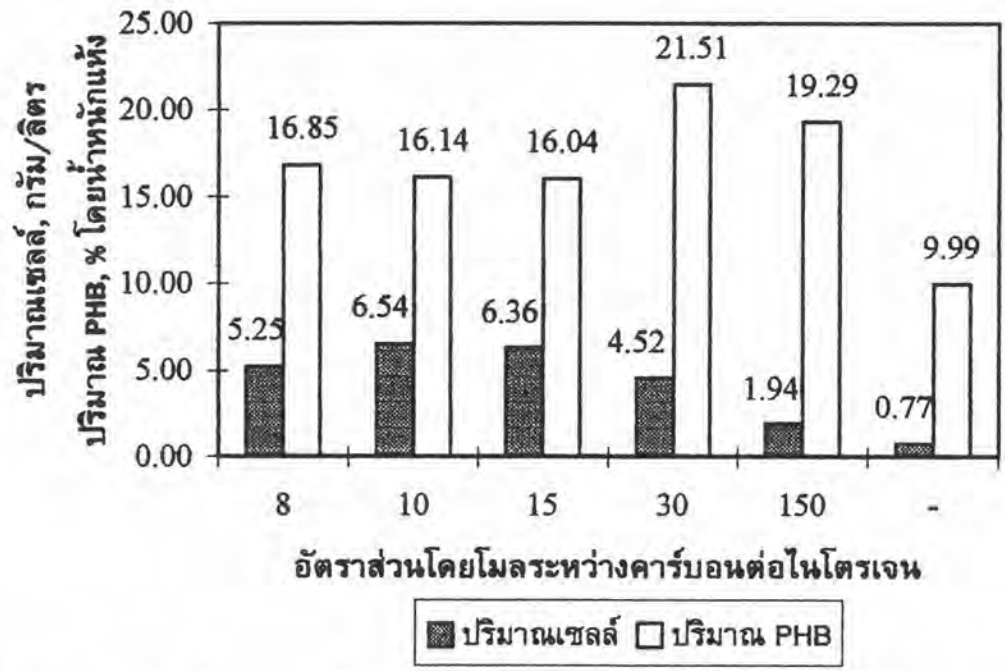


รูปที่ 5.5 แสดงผลได้เซลล์ และผลได้ PHB จากสารอาหารของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC 17697 แบบไม่ต่อเนื่องในขวดแก้วทรงกรวยที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มตั้งแต่ 6.0 ถึง 8.0

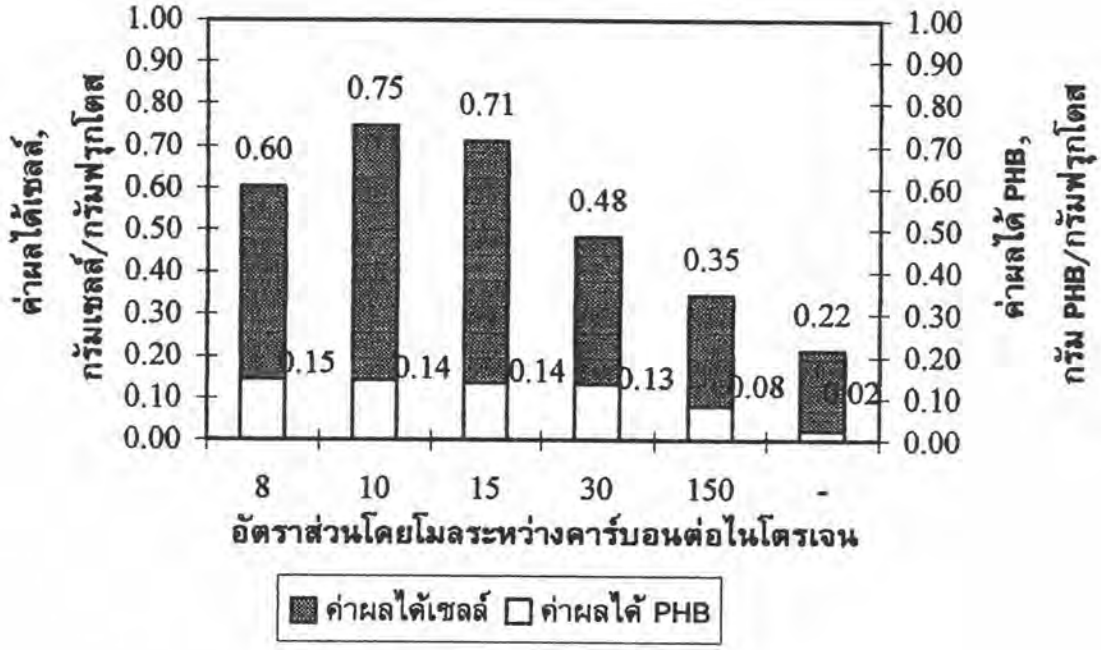
5.1.3 ผลการทดลองหาค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

รูปที่ 5.6-5.7 แสดงผลการเพาะเลี้ยงที่ใช้ค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยน้ำตาลฟรุคโตส ปริมาณ 8.0 กรัม/ลิตร เปลี่ยนแปลงค่าอัตราส่วนตั้งแต่ 8 จนถึงไม่มีไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเลย ผลการทดลองพบว่า เมื่อค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำๆ จะเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณเซลล์มากในระยะเวลาสั้นๆ โดยค่าอัตราส่วนที่ดีที่สุด คือ 10 โมลคาร์บอน/โมลไนโตรเจน หรือปริมาณคาร์บอนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสิบเท่าของปริมาณไนโตรเจน จากค่านี้เมื่อลดค่าอัตราส่วนลงไปอีกจะทำให้ได้ปริมาณเซลล์ลดลง แต่เมื่อต้องการเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณ PHB มากๆ ค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงๆ หรือมีไนโตรเจนในสารอาหารต่ำจะทำให้ได้ PHB มากกว่ามีไนโตรเจนมีปริมาณมาก โดยค่าอัตราส่วนที่ดีที่สุดอยู่ที่ 30 โมลคาร์บอน/โมลไนโตรเจน เมื่อเพิ่มค่าอัตราส่วนขึ้นไปอีกจะทำให้ได้ปริมาณเซลล์ลดลง

ในกรณีของค่าผลได้เซลล์ และผลได้ PHB ได้แสดงในรูปที่ 5.7 พบว่าสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ ค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลคาร์บอน/โมลไนโตรเจนให้ค่าผลได้เซลล์จากสารอาหารสูงสุดที่ 0.78 กรัมเซลล์/กรัมฟรุคโตส และในกรณีของการสร้าง PHB การเปลี่ยนแปลงค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในช่วง 8-30 โมลคาร์บอน/โมลไนโตรเจนไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าผลได้ PHB จากสารอาหารมากนัก ค่าผลได้ PHB จากสารอาหารที่ได้จะมีค่าอยู่ในช่วง 0.132-0.146 กรัม PHB/กรัมฟรุคโตส จากนั้นเมื่อเพิ่มค่าอัตราส่วนให้สูงขึ้นมากกว่า 30 โมลคาร์บอน/โมลไนโตรเจน ส่งผลให้ค่าผลได้ของ PHB จากสารอาหารมีค่าลดลง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงโดยใช้ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในช่วงสูง 30 โมลคาร์บอน/โมลไนโตรเจน จึงจะให้ผลดีต่อการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต



รูปที่ 5.6 แสดงปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHB ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC17697 แบบไม่ต่อเนื่องในขวดแก้วทรงกรวยที่มีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนตั้งแต่ 8 จนถึงไม่มีไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ



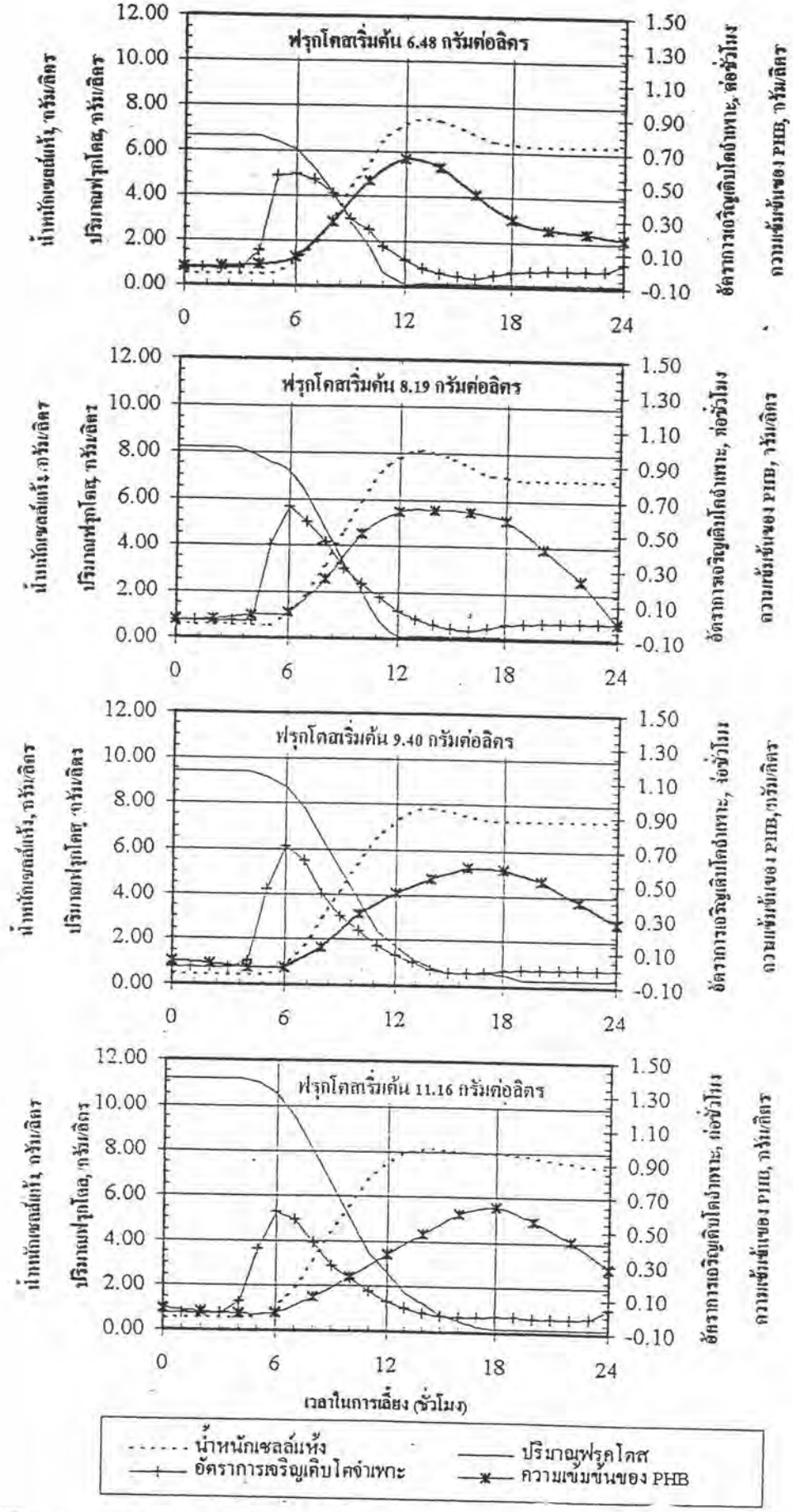
รูปที่ 5.7 แสดงค่าผลได้ของการเพาะเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่องในขวดแก้วทรงกรวยที่มีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนตั้งแต่ 8 จนถึงไม่มีไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.4 ผลการทดลองหาค่าพารามิเตอร์เบื้องต้นเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC 17697

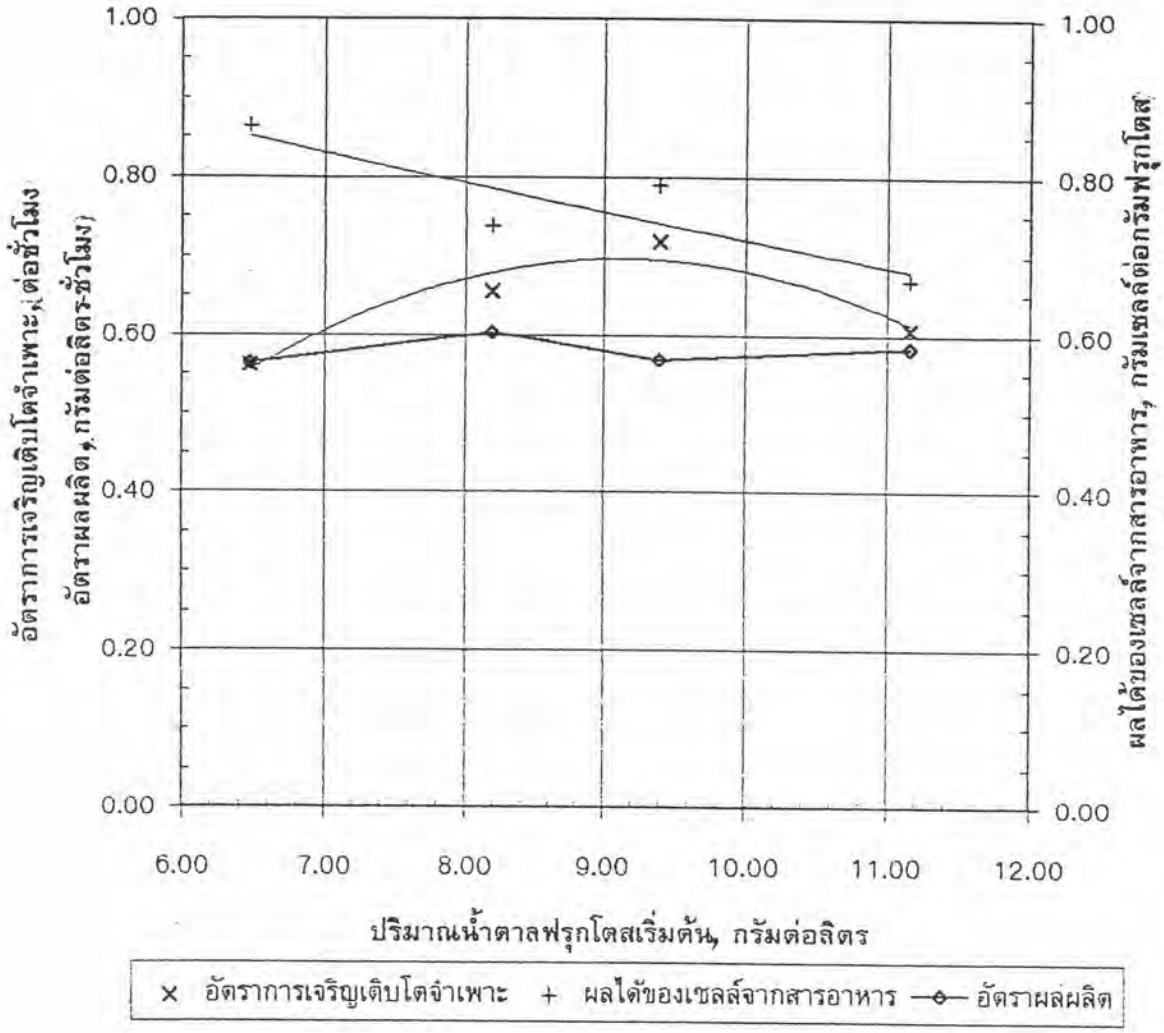
การทดลองในขั้นตอนนี้เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อในระดับถังหมักที่มีการควบคุมสภาวะต่าง ๆ และหาค่าพารามิเตอร์เบื้องต้นเกี่ยวกับการเจริญเติบโตเพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

ผลการเพาะเลี้ยง Alcaligenes eutrophus ATCC 17697 แบบไม่ต่อเนื่องในถังหมักที่มีการให้อากาศ ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่ และควบคุมไม่ให้สร้าง PHB ใช้ค่าความเข้มข้นน้ำตาลฟรุคโตสเริ่มต้นต่างๆ ได้แสดงในรูปที่ 5.8 และ 5.9

จากรูปที่ 5.8 ซึ่งแสดงข้อมูลการเพาะเลี้ยงสามารถบรรยายลักษณะทางจลนศาสตร์ของกระบวนการหมักได้ดังนี้ คือ จากช่วงเวลาล้าหลัง 5 ชั่วโมง จะเปลี่ยนเป็นช่วงเจริญเติบโตแบบเอ็กโปเนนเชียล 7 ชั่วโมง จึงเปลี่ยนเข้าสู่ช่วงสภาวะคงตัว และยังได้แสดงให้เห็นปริมาณเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้น้ำตาลฟรุคโตสเริ่มต้นต่างๆกัน ค่าความเข้มข้นน้ำตาลฟรุคโตสที่ลดลงตามเวลา และค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ นำค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด และค่าผลได้เซลล์จากสารอาหารของแต่ละการทดลองไปเปรียบเทียบกัน ดังได้แสดงไว้ในรูปที่ 5.9 จะเห็นได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์จะมีลักษณะการเจริญเติบโตแบบมีการยับยั้งด้วยน้ำตาลฟรุคโตส โดยค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าสูงสุด เมื่อใช้ปริมาณน้ำตาลฟรุคโตสเริ่มต้น 9 กรัม/ลิตร และเมื่อใช้ปริมาณน้ำตาลฟรุคโตสเริ่มต้นลดน้อยลงเชื้อจุลินทรีย์จะมีค่าผลได้เซลล์จากสารอาหารที่สูงขึ้น



รูปที่ 5.8 แสดงการเจริญของเชื้อ Alcaligenes eutrophus ATCC17697 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องเมื่อแปรผันปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นต่าง ๆ กัน



รูปที่ 5.9 แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ค่าผลได้จากสารอาหาร และค่าอัตราผลผลิต เมื่อใช้ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสเริ่มต้นต่างๆ กัน

5.1.5 การทดลองหาค่าพารามิเตอร์ที่จำเป็นต้องใช้ในการควบคุมการเติมสารป้อน

5.1.5.1 ค่าแสดงลักษณะจำเพาะของเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC 17697

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลค่าที่ได้จากผลได้ของเซลล์จากฟรุคโตส และค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากการทดลองต่างๆ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ถดถอยแบบไม่เชิงเส้นได้ผลดังนี้

- ค่าผลได้ของเซลล์จากฟรุคโตสที่ความเข้มข้นฟรุคโตสต่างๆ โดยใช้รูปแบบความสัมพันธ์แบบเส้นตรง สมการที่ได้ คือ

$$Y(S) = -0.036S + 1.084 \qquad 5.1$$

- ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ความเข้มข้นฟรุคโตสต่างๆโดยใช้รูปแบบความสัมพันธ์แบบมีการยับยั้งการเจริญด้วยสารอาหาร ซึ่งมีรูปแบบความสัมพันธ์ ดังสมการที่ 5.2 (Agrawal P., 1987) เมื่อวิเคราะห์โดยไม่กำหนดคอนสเตรนท์ใดๆ เลย ได้ค่าคงที่ต่างๆ ดังนี้

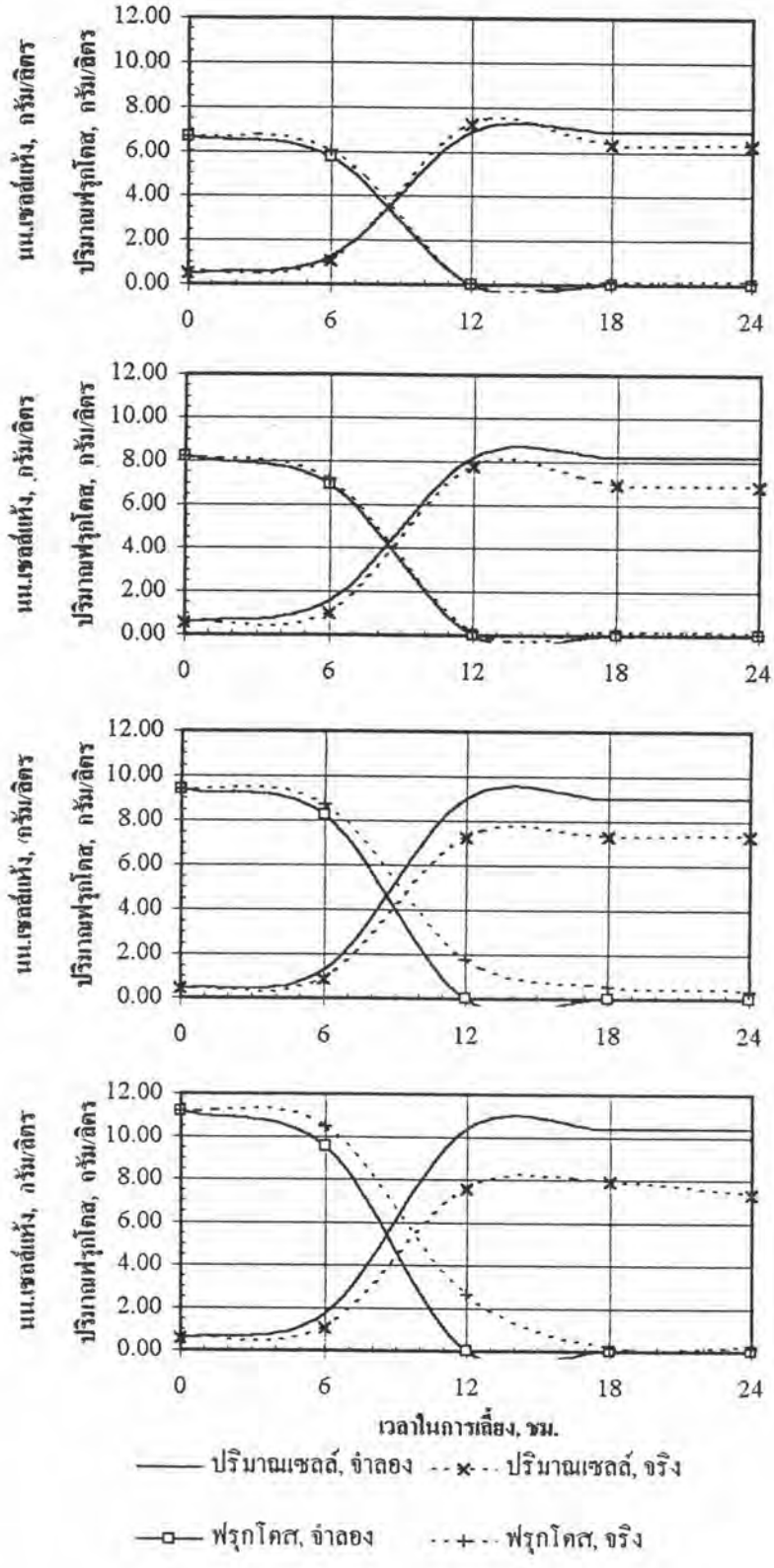
$$\mu = \frac{U_m S}{\left(K_M + S + \frac{S^2}{K_I}\right)} \qquad 5.2$$

1. U_m 22.485
2. K_m 100.307
3. K_I 1.171

5.1.5.2 ผลการจำลองกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC 17697 ในแบบไม่ต่อเนื่อง

ได้นำค่ากำหนดลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ดังกล่าวไปจำลองการเพาะเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่อง โดยใช้ค่าความเข้มข้นของฟรุคโตสเริ่มต้น และปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับการทดลองเพาะเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่องที่ได้ทำไปแล้วในหัวข้อ 4.2.3.4 จากนั้นนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกันดังแสดงไว้ในรูปที่ 5.10

จากรูปที่ 5.10 แบบจำลองที่สร้างขึ้นให้ผลการเพาะเลี้ยงที่ค่อนข้างแตกต่างจากข้อมูลจากการเพาะเลี้ยงจริง แบบจำลองจะให้ผลการเพาะเลี้ยงที่ใกล้เคียงกับผลการเพาะเลี้ยงจริงเฉพาะช่วงความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลฟรุคโตสต่ำๆ ในช่วง 6-8 กรัม/ลิตร



รูปที่ 5.10 เปรียบเทียบผลการจำลองการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC17697 แบบไม่ต่อเนื่องในถังหมักที่มีการให้อากาศ ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่ และควบคุมไม่ให้สร้างผลิตภัณฑ์ กับผลการเพาะเลี้ยงจริงในภาวะเดียวกัน

เท่านั้น เมื่อค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลฟรุคโตสมีค่าสูงขึ้น ปริมาณเซลล์ที่ได้จากแบบจำลองมีค่าสูงมากกว่าค่าจริง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่แบบจำลองทำนายขึ้นมีค่าสูงกว่าค่าจริง เมื่อค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาล ฟรุคโตสมีค่าสูงขึ้น

5.1.5.3 ผลการทดลองหาค่าความเข้มข้นฟรุคโตสในสารป้อน และค่า K_c ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการควบคุม

ผลการใช้แบบจำลองที่สร้างขึ้น เชื่อมต่อกับส่วนการควบคุมการเติมสารป้อนของโปรแกรม Model1.exe เมื่อใช้ค่า K_c เท่ากับ 0.25 และเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นสารอาหารในสารป้อนตั้งแต่ 50-500 กรัม/ลิตร ได้แสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 แสดงผลการใช้แบบจำลองการเพาะเลี้ยงในแบบกึ่งต่อเนื่องทดลองหาค่าความเข้มข้นสารอาหารในสารป้อนที่เหมาะสม

K_c	S_F (กรัม/ลิตร)	อายุ (ชั่วโมง)	ปริมาตร (ลิตร)	S_{min} (กรัม/ลิตร)	S_{max} (กรัม/ลิตร)
0.25	50	10.52	>5.0	-	-
	100	10.37	>5.0	-	-
	150	10.28	4.9	-	-
	200	9.97	3.7	-	-
	250	9.82	3.2	6.07	12.62
	300	9.72	2.9	6.14	12.98
	350	9.67	2.7	7.33	13.25
	400	9.62	2.6	6.09	13.68
	450	9.58	2.5	7.34	13.61
	500	9.60	2.5	6.22	15.85

จากตารางที่ 5.1 พบว่าค่าความเข้มข้นน้ำตาลฟรุคโตสในสารป้อนที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 250-450 กรัม/ลิตร เนื่องจากให้ปริมาตรหลังการเพาะเลี้ยงไม่มากเกิน 3.5 ลิตร สำหรับค่าความเข้มข้นฟรุคโตสในสารป้อนเท่ากับ 500 กรัม/ลิตรไม่เหมาะสม เนื่องจากจะทำให้ได้ค่าความเข้มข้นของฟรุคโตสภายในถังหมักสูงมากกว่าความเข้มข้นอื่นๆ มากเกินไป

หลังจากนี้ได้นำค่าความเข้มข้นน้ำตาลฟรุคโตสในสารป้อนช่วงดังกล่าว ทำการจำลองการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องโดยควบคุมการเติมเพื่อให้ได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดตลอดเวลา โดยใช้ค่า K_c ต่างๆ กัน หาค่า K_c ที่ดีที่สุดสำหรับแต่ละความเข้มข้นของสารป้อน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5.2 เมื่อเปรียบเทียบแต่ละกรณี พบว่า กรณีที่ให้ผลตรงตามเป้าหมายที่สุด คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตสในสารป้อนเท่ากับ 300 กรัม/ลิตร ใช้ค่า K_c เท่ากับ 2.0 สำหรับในกรณีนี้จะให้ช่วงความแตกต่าง

ค่อนข้างน้อยระหว่างความเข้มข้นฟรุคโตสภายในถังหมักสูงสุดและต่ำสุด เมื่อเทียบกับกรณีอื่นๆ นอกจากนี้ยังใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงน้อย และได้ปริมาตรหลังการเพาะเลี้ยงไม่สูงมากเกินไป

ตารางที่ 5.2 แสดงผลการใช้แบบจำลองการเพาะเลี้ยงในแบบกึ่งต่อเนื่องทดลองหาค่าพารามิเตอร์สำหรับการควบคุมที่เหมาะสม

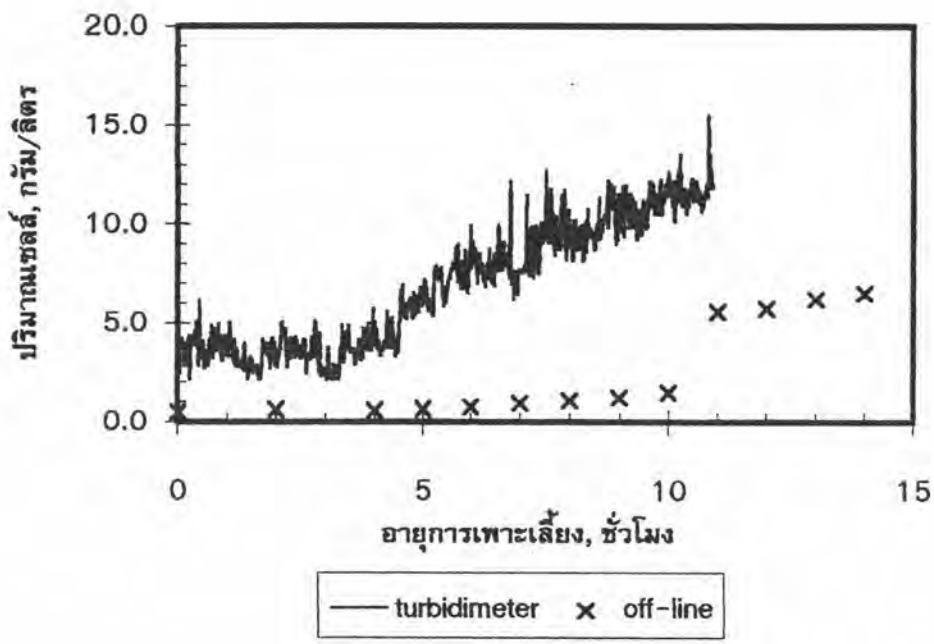
S_F (กรัม/ลิตร)	K_c	อายุ (ชั่วโมง)	ปริมาตร (ลิตร)	S_{min} (กรัม/ลิตร)	S_{max} (กรัม/ลิตร)	ช่วงความเข้มข้น
250	3.0	9.82	3.4	8.82	12.62	3.80
300	2.0	9.72	3.0	8.36	12.98	4.62
350	1.2	9.67	2.8	7.80	13.25	5.45
400	0.9	9.60	2.7	7.73	13.68	5.96
450	0.3	9.58	2.5	7.71	13.61	5.91

5.2 ผลการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่องโดยควบคุมความเข้มข้นสารอาหารเพื่อให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในช่วงเจริญเติบโตมีค่าสูงสุดตลอดเวลา

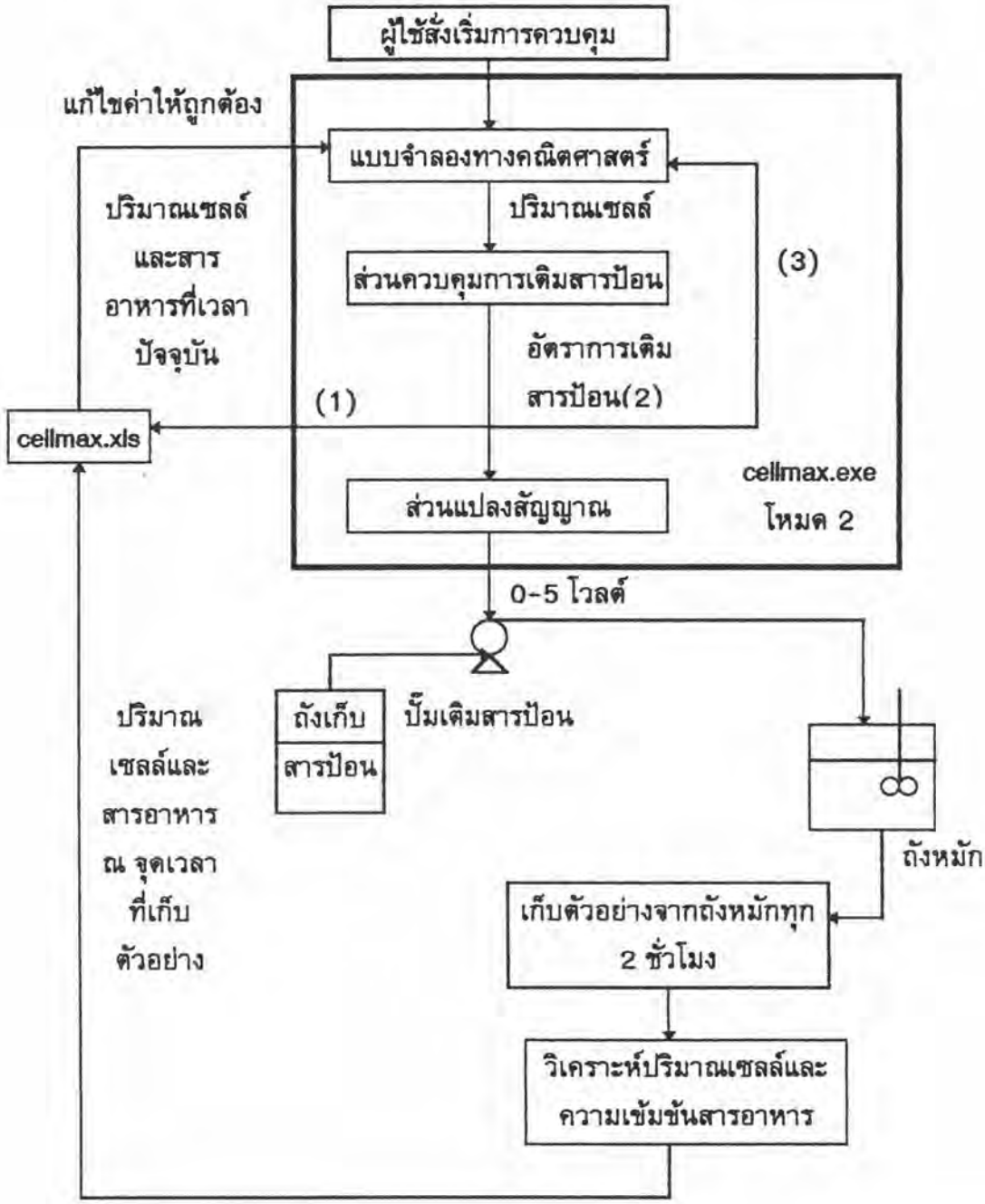
การทดลองในขั้นตอนนี้เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณมาก ๆ เพื่อกระตุ้นให้สร้าง PHB ในขั้นตอนถัดไป

เมื่อทดลองเพาะเลี้ยงในแบบควบคุมความเข้มข้นสารอาหาร เพื่อให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในช่วงเจริญเติบโตมีค่าสูงสุดตลอดเวลา ควบคุมการเติมสารป้อนด้วยโปรแกรม cellmax.exe พบว่าไม่สามารถควบคุมการเติมสารป้อนให้ถูกต้องได้ เนื่องจากอุปกรณ์ตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่ใช้ให้ผลการทดลองที่ไม่ตรงกับปริมาณเซลล์ในถังหมักจริง ภายในถังหมักมีการหมุนวนของของเหลวภายในสูง และมีการรบกวนสัญญาณจากฟองอากาศที่ใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ การใช้เครื่องมือจึงจำเป็นต้องสร้างกราฟมาตรฐานของเครื่องมือ หรือคาลิเบรตเครื่องมือภายในภาวะการใช้งานจริง ผลการวัดดังแสดงเปรียบเทียบในรูปที่ 5.11

อย่างไรก็ตามได้อาศัยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นเพื่อทดสอบความถูกต้องทางโปรแกรม ใช้ในการควบคุมการเติมสารป้อน ขั้นตอนการทำงานดังแสดงดังรูปที่ 5.12



รูปที่ 5.11 เปรียบเทียบค่าปริมาณเซลล์ที่ได้จากการวัดด้วยเครื่องเทอร์บิดิมิเตอร์ และค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บจากถังหมัก



รูปที่ 5.12 แสดงขั้นตอนการทำงานควบคุมการเติมสารป้อนโดยอาศัยข้อมูลจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

ขั้นตอนการทำงานเริ่มจากผู้ใช้สั่ง cellmax.exe ให้เริ่มทำการควบคุมการเติมสารป้อนในส่วนที่สอง ซึ่งเป็นการควบคุมการเติมสารป้อน โดยอาศัยค่าปริมาณเซลล์ตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ภายใน cellmax.exe เอง จากนั้นผู้ใช้เก็บตัวอย่างของปริมาณเซลล์และสารอาหารภายในถังหมัก ใช้เวลาวิเคราะห์ประมาณ 45-50 นาที จึงทราบค่า ผู้ใช้นำค่าที่ได้ใส่เข้าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในโปรแกรม cellmax.xls ซึ่งจะมีค่าอัตราการเติมสารป้อนที่ cellmax.exe เติมเข้าถังหมักในระหว่างที่รอผลการวิเคราะห์ตลอดเวลา แบบจำลองในเอกเซลจะ

ทำหน้าที่คำนวณหาค่าปริมาณเซลล์และปริมาณสารอาหารที่เวลาปัจจุบัน จากนั้นผู้ใช้นำค่าที่ได้ไปแก้ไขค่าใน cellmax.exe

ผลการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ด้วยวิธีดังกล่าวยังคงไม่ประสบผลสำเร็จ ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 5.13 ถึง 5.14

จากรูปที่ 5.13 จะพบว่า ค่าปริมาณเซลล์ที่ได้ถูกสั่งออกจาก cellmax.exe ยังคงสูงกว่าค่าจริงตลอดเวลา ถึงแม้ว่าจะมีการแก้ไขค่าทุกๆ ชั่วโมง ทำให้มีการเติมสารป้อนเข้าไปมากกว่าที่เชื้อจุลินทรีย์ภายในถังหมักต้องการจริง ทำให้เกิดการสะสมน้ำตาลฟรุคโตสภายในถังหมักมากขึ้นเรื่อยๆ ดังได้แสดงไว้ในรูปที่ 5.14 ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นช้าลงไปอีกทำให้ไม่สามารถเร่งการเจริญเติบโตให้เร็วขึ้นตามต้องการได้ จากรูปที่ 5.14 จะเห็นได้ว่า ในช่วงที่มีการควบคุมการเติมสารป้อนด้วยโปรแกรม ปริมาณน้ำตาลเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเพิ่มขึ้นจากประมาณ 10 กรัม/ลิตร ขึ้นไปถึง 40 กรัม/ลิตร ภายในเวลาเพียง 4 ชั่วโมง ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่กำลังเปลี่ยนเข้าสู่ภาวะการเจริญเติบโตแบบเอ็กโปเนนเชียลถูกยับยั้งให้กลับเข้าสู่ภาวะปรับตัว มีการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ อีกครั้ง จนกระทั่งเวลาผ่านไปถึง 34 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์จึงเปลี่ยนเข้าสู่ภาวะการเจริญเติบโตแบบเอ็กโปเนนเชียลอีกครั้ง ผลจากการเพาะเลี้ยงแบบนี้ในท้ายสุด ได้ปริมาณเซลล์ 53.8 กรัม/ลิตร ใช้เวลา 59 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราผลผลิต 0.90 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง

จากผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่ายังไม่สามารถเพาะเลี้ยง Alcaligenes eutrophus ในแบบเร่งให้มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดตามเวลาได้ เนื่องจากไม่สามารถใช้อุปกรณ์ตรวจวัดค่าปริมาณเซลล์ในเวลาจริงได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และขาดแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แสดงกระบวนการเจริญเติบโตของ Alcaligenes eurtophus ที่ถูกต้องสมเหตุสมผล

เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่มากตามจุดประสงค์ ได้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในแบบกึ่งต่อเนื่องใหม่โดยพยายามควบคุมค่าความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตสภายในถังหมักให้คงที่โดยให้คงที่ ที่ 9 กรัม/ลิตรซึ่งเป็นค่าที่เหมาะกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ การควบคุมทำโดยเก็บตัวอย่างภายในถังหมักวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลฟรุคโตสทุก ๆ 2 ชั่วโมง คำนวนหาค่าอัตราการใช้น้ำตาลตามสมการที่ 5.1 จากนั้นนำค่าที่ได้คำนวนหาค่าอัตราการเติมสารป้อน

$$q_{Fruc} = \frac{\left(S_{t-1}V_{t-1} - S_tV_t + FS_f\Delta t\right)}{\Delta t} \qquad 5.3$$

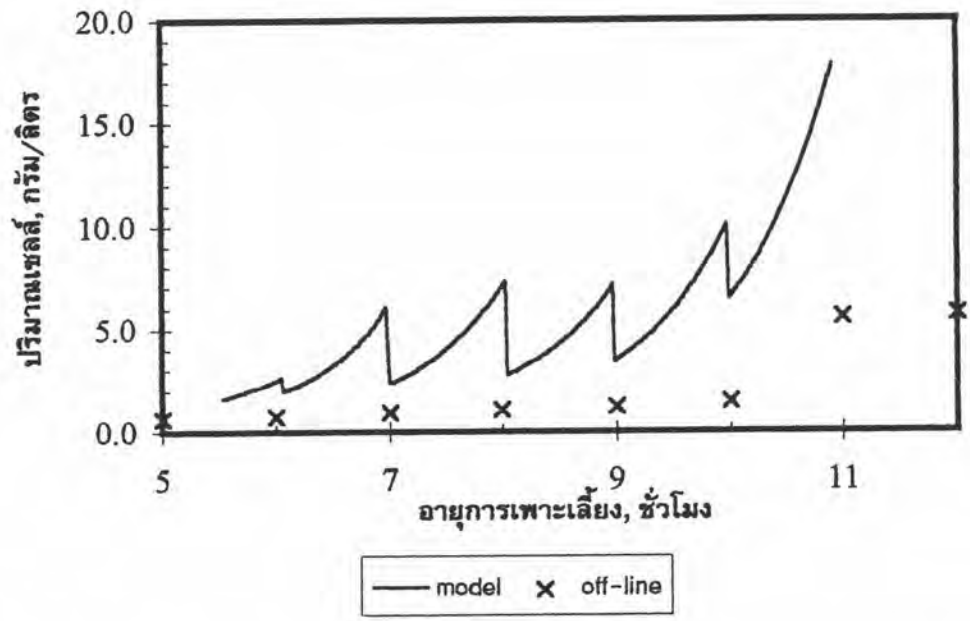
ผลจากการเพาะเลี้ยงโดยวิธีนี้ได้แสดงในรูปที่ 5.15 ถึง 5.17 ซึ่งแต่ละรูปแสดงผลการเพาะเลี้ยงแบบควบคุมความเข้มข้นให้คงที่ ที่ 9 กรัม/ลิตร ในช่วงอายุการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ 0 ชั่วโมงจนถึงก่อนเปลี่ยนชนิดสารปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง

การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้ในครั้งที่ดีที่สุด สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ขึ้นได้สูงถึง 53.28 กรัม/ลิตร ภายในระยะเวลา 31 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราผลผลิตเซลล์ 1.72 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง ค่าผลได้เซลล์จากสารอาหาร 0.66 กรัมเซลล์/กรัมฟรุคโตส ผลการเพาะเลี้ยงดังแสดงในตารางที่ 5.3 เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในแบบไม่ต่อเนื่องที่ได้จากหัวข้อ 5.1.4 พบว่าค่าผลได้เซลล์จากสารอาหารที่ค่าใกล้เคียงกัน โดยจาก 5.1.4 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มข้นน้ำตาลฟรุคโตสเริ่มต้น 9.4 กรัม/ลิตร ค่าผลได้เซลล์จากสารอาหารมีค่าเท่ากับ 0.77 กรัมเซลล์/กรัมฟรุคโตส

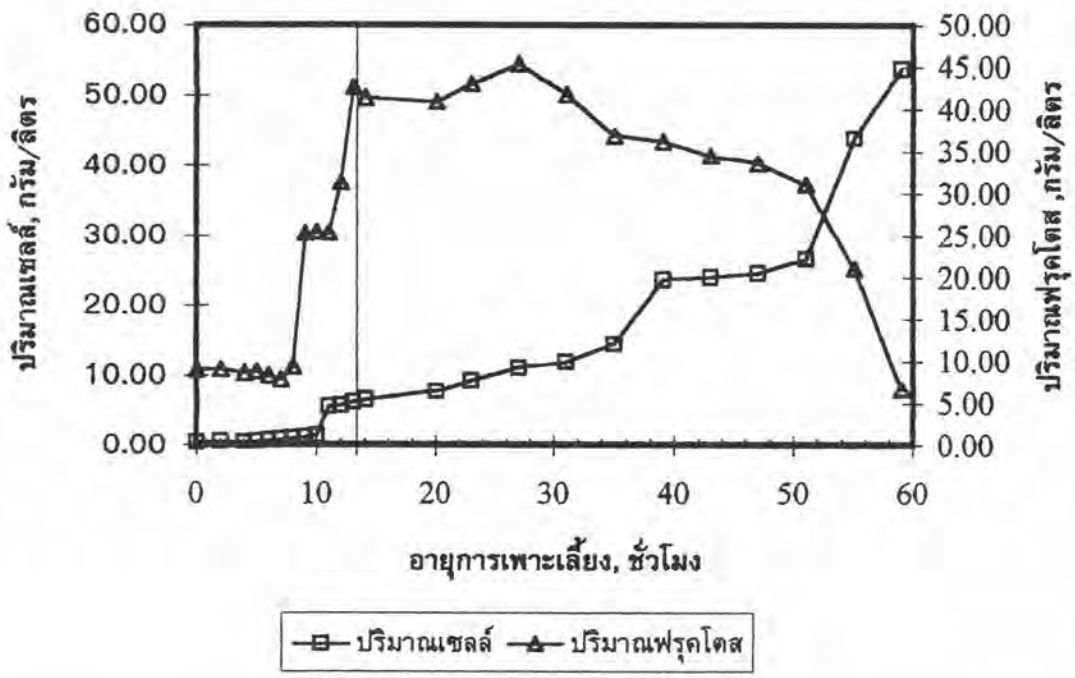
และในระหว่างช่วงเจริญเติบโตพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ยังคงมีการสังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตอยู่บ้างแต่ในอัตราที่ค่อนข้างต่ำ โดยปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่เกิดมีปริมาณแปรผันตามเวลา เพิ่มขึ้นตามปริมาณของชีวมวล

ตารางที่ 5.3 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC17697 ในแบบควบคุมให้ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตสคงที่ ที่ 9 กรัม/ลิตร

ครั้งที่	ปริมาณเซลล์ที่ได้ กรัม/ลิตร	ค่าผลได้เซลล์ กรัมเซลล์/กรัมฟรุคโตส	อัตราผลผลิตเซลล์ กรัม/ลิตร-ชั่วโมง
1	52.47	0.75	1.48
2	53.28	0.66	1.72
3	52.60	0.62	1.27

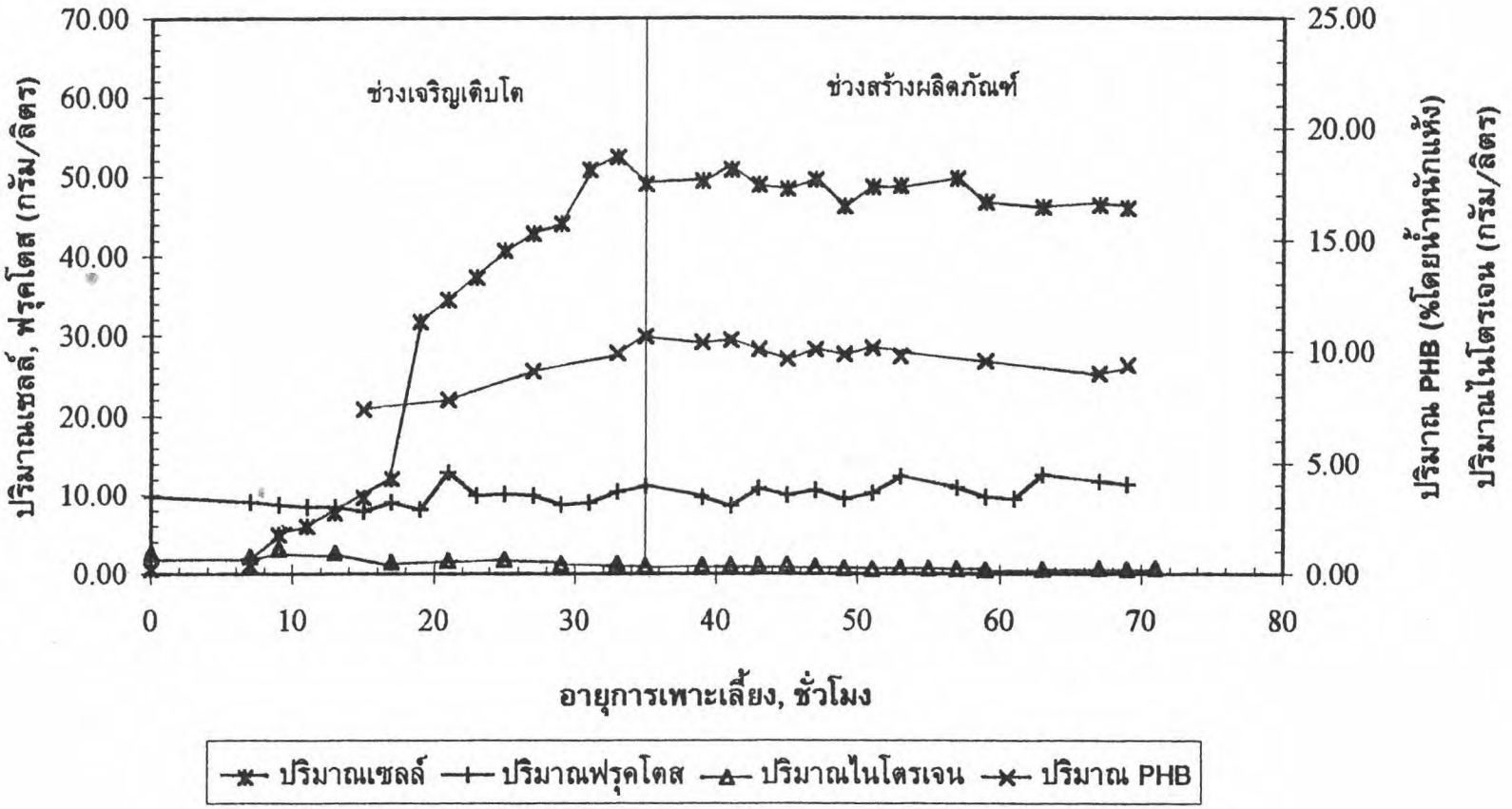


รูปที่ 5.13 แสดงข้อมูลปริมาณเซลล์จากโปรแกรม Cellmax.exe และปริมาณเซลล์ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง

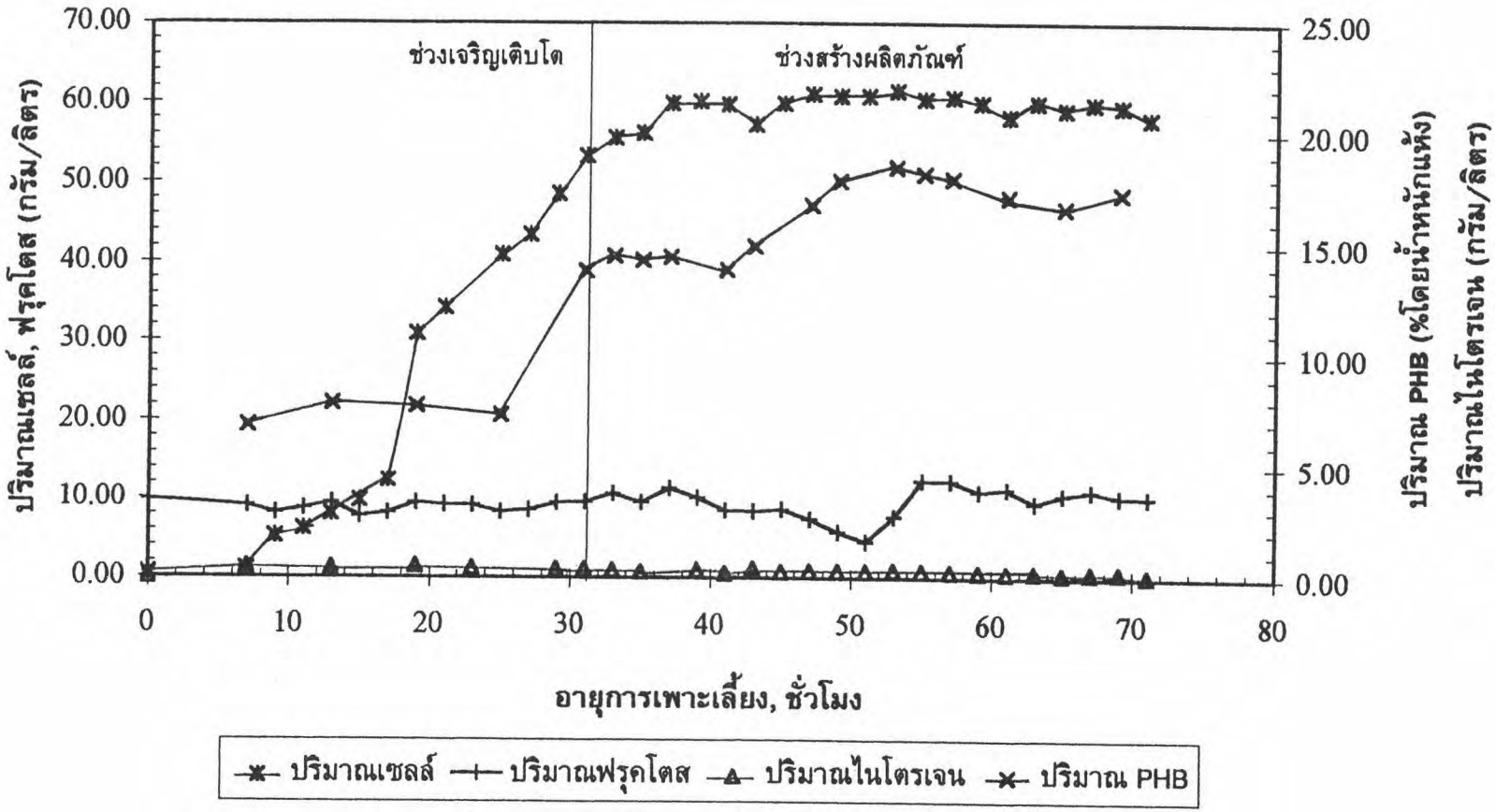


รูปที่ 5.14 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC17697 โดยใช้โปรแกรม Cellmax.exe ควบคุมการเติมสารป้อน

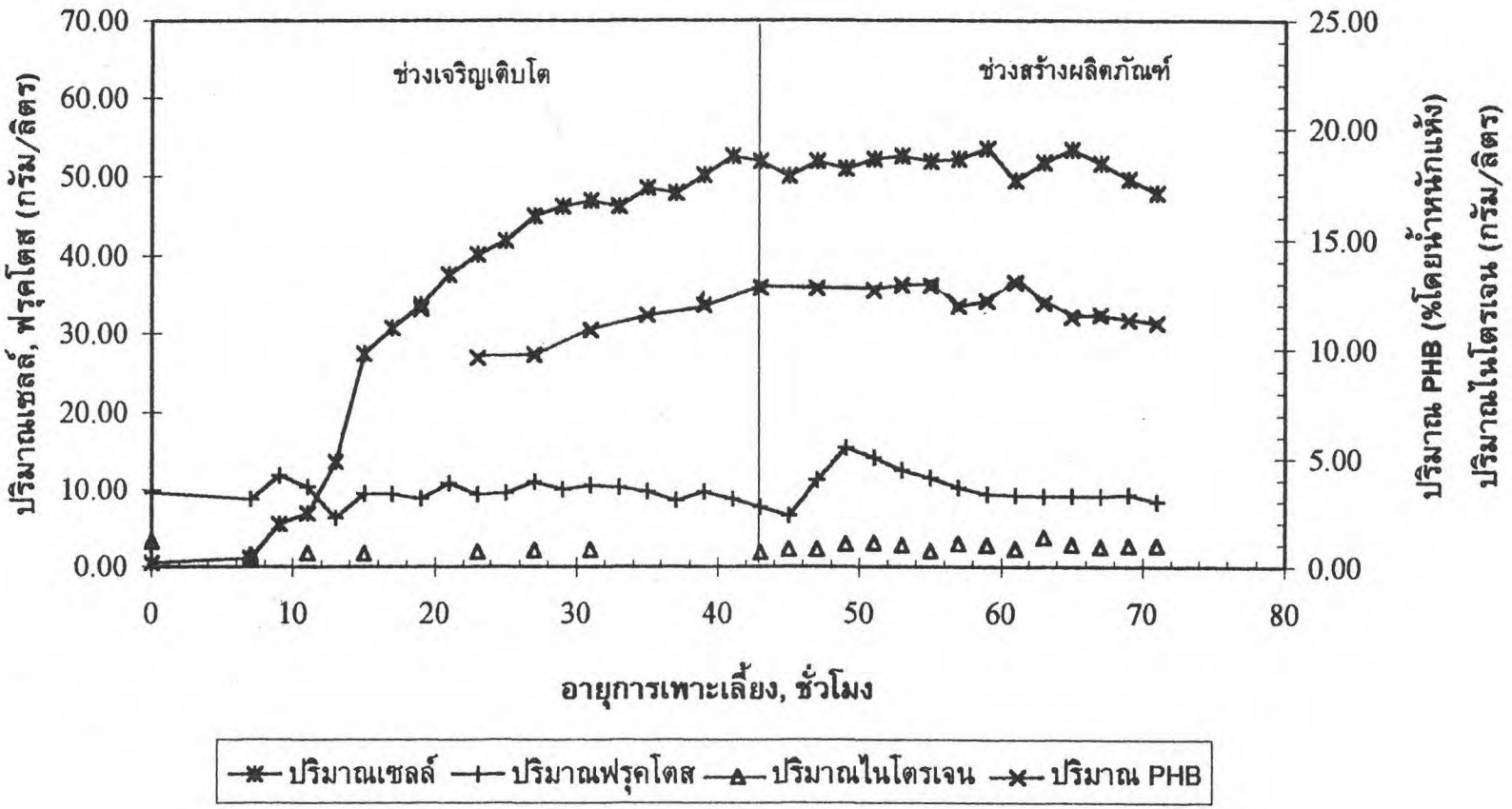
หมายเหตุ: หยุดการเติมสารป้อนด้วยโปรแกรม เมื่ออายุการเพาะเลี้ยงได้ 13 ชั่วโมง



รูปที่ 5.15 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC17697 แบบกึ่งต่อเนื่อง โดยให้คาร์บอนเพียงอย่างเดียวในสารป้อนในช่วงสร้างผลิตภัณฑ์



รูปที่ 5.16 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC17697 แบบกึ่งต่อเนื่อง โดยให้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของสารป้อนในช่วงสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 150



รูปที่ 5.17 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC17697 แบบกึ่งต่อเนื่อง โดยให้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของสารป้อนในช่วงสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 30

5.3 ผลการเพิ่มอัตราผลผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตในช่วงสร้างผลิตภัณฑ์โดยให้สารป้อนมีค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนคงที่

การทดลองในขั้นตอนนี้เพื่อหาทางเพิ่มค่าอัตราผลผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยการปรับเปลี่ยนค่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารป้อนที่ใช้ในช่วงสร้างผลิตภัณฑ์ โดยใช้สารป้อนที่ไม่มีไนโตรเจนอยู่เลย สารป้อนที่มีค่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 150 และ 30 ตามลำดับ

ผลการเพาะเลี้ยงโดยใช้สารป้อนดังกล่าวได้แสดงในรูปที่ 5.15 ถึง 5.17 เมื่อกระตุ้นให้เชื้อจุลินทรีย์สร้างพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเปลี่ยนชนิดของสารปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจากแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นซึ่งทำหน้าที่ป้อนปริมาณไนโตรเจนให้มากเกินพอในระหว่างช่วงการเจริญเติบโต เป็นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 โมลาร์ ใช้ค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนของสารป้อนคงที่ ที่ 30 ซึ่งเป็นค่าที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่มากที่สุดจากการเพาะเลี้ยงในแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่าจะเกิดการสะสมปริมาณไนโตรเจนมากขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งทำให้ค่าอัตราส่วนระหว่าคาร์บอนต่อไนโตรเจนภายในถังหมักมีค่าไม่เพิ่มขึ้น ทำให้ไม่เกิดสภาวะขาดแคลนไนโตรเจน ซึ่งดูได้จากค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนภายในถังหมักมีค่าไม่แตกต่างไปจากช่วงเจริญเติบโต ดังได้แสดงในรูปที่ 5.19 ผลจากการที่ปริมาณไนโตรเจนไม่ลดลง ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่สร้าง PHB ปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจึงไม่เพิ่มมากขึ้น ท้ายสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ไปได้ 71 ชั่วโมง ปริมาณ PHB มีแนวโน้มคงตัวที่ 10% โดยน้ำหนักแห้งของเซลล์

เมื่อใช้สารป้อนที่มีค่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนของสารป้อนคงที่ ที่ 150 พบว่าหลังจากที่เปลี่ยนเข้าสู่ช่วงสร้างผลิตภัณฑ์ที่อายุ 31 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์เริ่มสังเคราะห์ และสะสมพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตขึ้น ดังจะสามารถดูได้จากรูปที่ 5.20 ซึ่งจะเห็นได้ว่าหลังจากที่เปลี่ยนเข้าสู่ช่วงสร้างผลิตภัณฑ์ ปริมาณเซลล์ที่ไม่มี PHB (residual biomass) เพิ่มขึ้นช้ากว่าปริมาณเซลล์โดยรวมเล็กน้อย ซึ่งทำให้เส้นกราฟข้อมูลปริมาณเซลล์และปริมาณเซลล์ที่ไม่มี PHB แยกตัวจากกัน เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในถังหมักมีค่าสูงขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปซึ่งเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ใช้ไนโตรเจนไปปริมาณ PHB เพิ่มปริมาณมากขึ้น จนกระทั่งเพาะเลี้ยงไปได้ 50 ชั่วโมง จึงเริ่มคงตัว และมีแนวโน้มลดลง ปริมาณ PHB มากที่สุดที่ได้คือ 17.92 % โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการเพาะเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่องในขวดแก้วทรงกรวย จะเห็นได้ว่าปริมาณ PHB ที่สะสมภายในเซลล์ของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องมีค่าต่ำกว่าอยู่บ้าง แต่เมื่อคิดโดยรวมทั้งกระบวนการแล้วปริมาณ PHB ที่ได้มีค่าสูงกว่าอยู่มาก โดยจากการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องได้ปริมาณ PHB 10.90 กรัม/ลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในแบบไม่ต่อเนื่องได้ปริมาณ PHB สูงสุด(จากการใช้ค่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 30) เพียง 0.97 กรัม/ลิตรเท่านั้น ทั้งนี้สืบเนื่องจากการเพาะเลี้ยงในแบบกึ่งต่อเนื่องได้ปริมาณเซลล์ที่สูงกว่าอยู่มาก

ผลการเพาะเลี้ยงเมื่อใช้สารป้อนที่มีแต่แหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในช่วงสร้าง PHB พบว่าถึงแม้ค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในถังหมักมีค่าสูงขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป แต่เชื้อจุลินทรีย์กลับไม่สร้างพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตให้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกลับงานวิจัยของ Suzuki (Suzuki T. และคณะ, 1986b) ที่กล่าวว่าการทำให้ขาดแคลนไนโตรเจนจะส่งผลให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์ผิดปกติไป ส่งผลให้การสังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตเกิดขึ้นได้ไม่ดี ปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตมากที่สุดที่ได้ในกรณีนี้คือ 10.70 % โดยน้ำหนักแห้งของเซลล์

ปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ได้ในแต่ละกรณีได้แสดงไว้ในรูปที่ 5.18 และในตารางที่ 5.4

ตารางที่ 5.4 แสดงข้อมูลสรุปผลการเพิ่มอัตราผลผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตในช่วงสร้างผลิตภัณฑ์โดยให้สารป้อนมีค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนคงที่

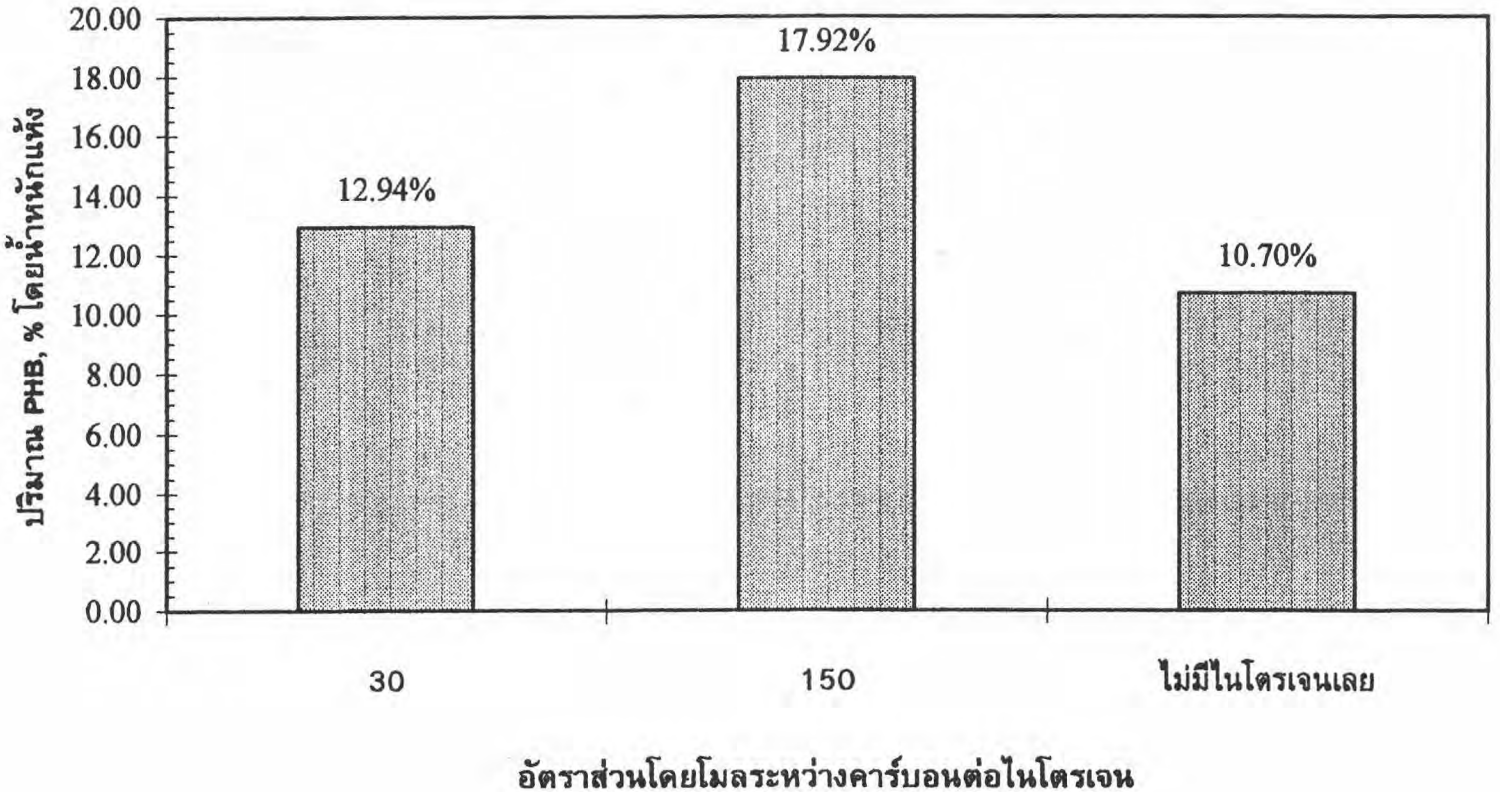
อัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารป้อน	ปริมาณเซลล์ที่ได้ (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (%โดยน้ำหนักแห้ง)	อัตราผลผลิต PHB (กรัม/ลิตร-ชั่วโมง)
30	52.605	6.81	12.94	0.129
150	60.818	10.9	17.92	0.222
มีเพียงคาร์บอนเพียงอย่างเดียว	46.277	4.95	10.70	0.115

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้ค่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารป้อนเท่ากับ 150 ได้เก็บค่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ไหลออกจากถังหมักในรูปของ % โดยปริมาตร ทั้งนี้เพื่อศึกษาดูว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างค่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากกระบวนการเผาผลาญอาหารของเชื้อจุลินทรีย์กับการสังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตอย่างใดหรือไม่

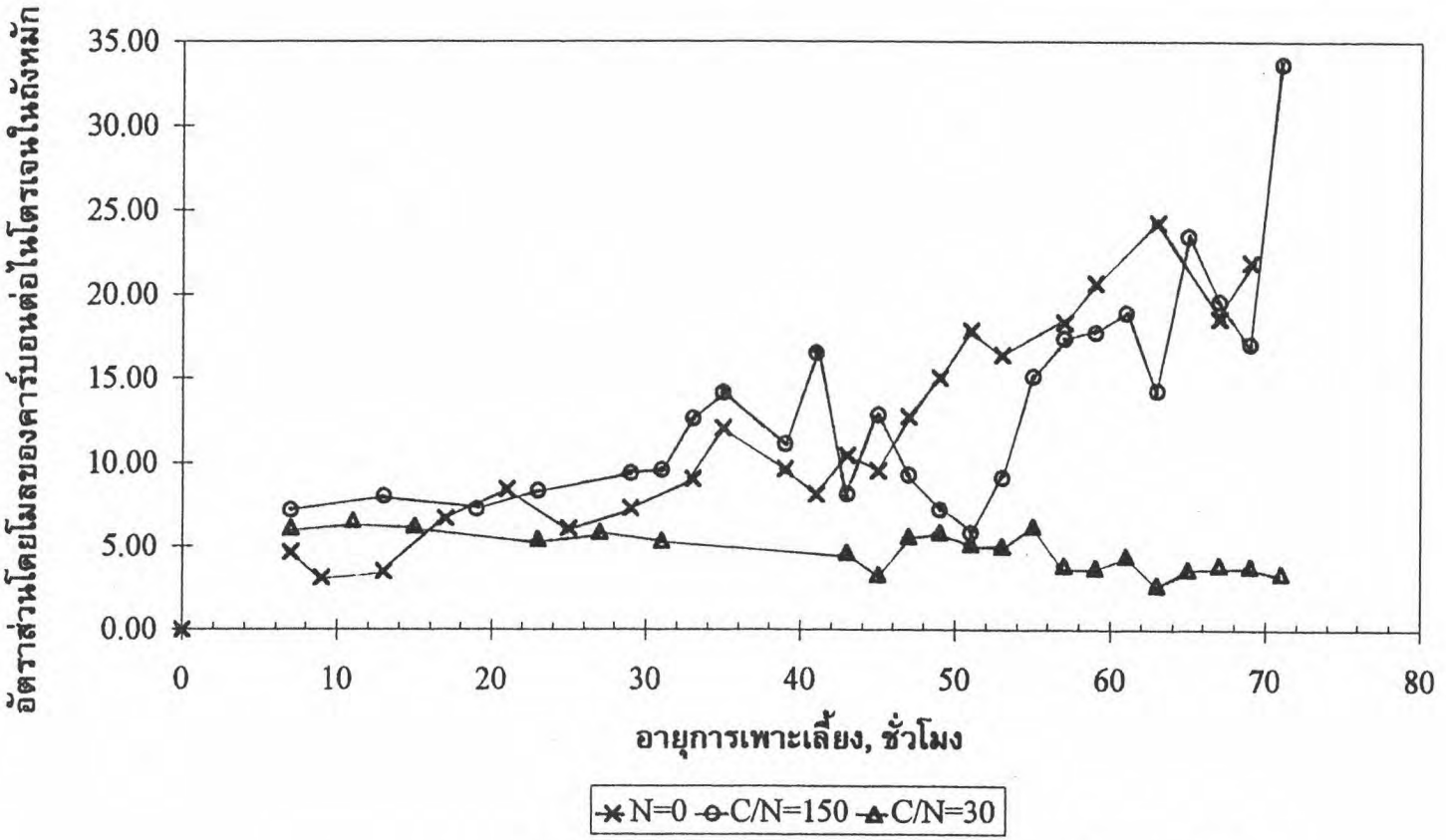
ผลจากการวัดได้แสดงในรูปที่ 5.21 ซึ่งแสดงค่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ไหลออกจากถังหมักกับปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่เวลาต่าง ๆ ซึ่งจะเห็นได้ว่าในช่วงเจริญเติบโต ซึ่งเชื้อมีการเจริญในแบบเอ็กโปเนนเชียล เกิดมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ปนออกมากับก๊าซที่ไหลออกจากถังหมักมาก จนถึง 1 %โดยปริมาตร แต่ในขณะที่เชื้อจุลินทรีย์อยู่ในช่วงสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีการสังเคราะห์และสะสมพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตขึ้นภายในเซลล์ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในก๊าซที่ไหลออกจากถังหมักมีค่าลดลงเรื่อยๆ สอด

คล้องกันกับผลการวิจัยของ Kim B. S.(Kim B.S. และคณะ, 1994) ที่แสดงให้เห็นว่าค่าอัตราการเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในช่วงสร้างผลิตภัณฑ์จะมีค่าค่อย ๆ ลดลงทีละน้อย

จากผลการทดลองในส่วนนี้ สามารถมองเห็นได้ว่ามีความสัมพันธ์กันอยู่บ้างระหว่างปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปนออกมากับก๊าซที่ไหลออกจากถังหมัก หรือปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึ่มของเชื้อจุลินทรีย์ และการสังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดสัมพันธ์แปรผันกันกับค่าปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต



รูปที่ 5.18 แสดงปริมาณ PHB ที่สะสมไว้ได้ภายในเซลล์เมื่อแปรผันค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของสารป้อน

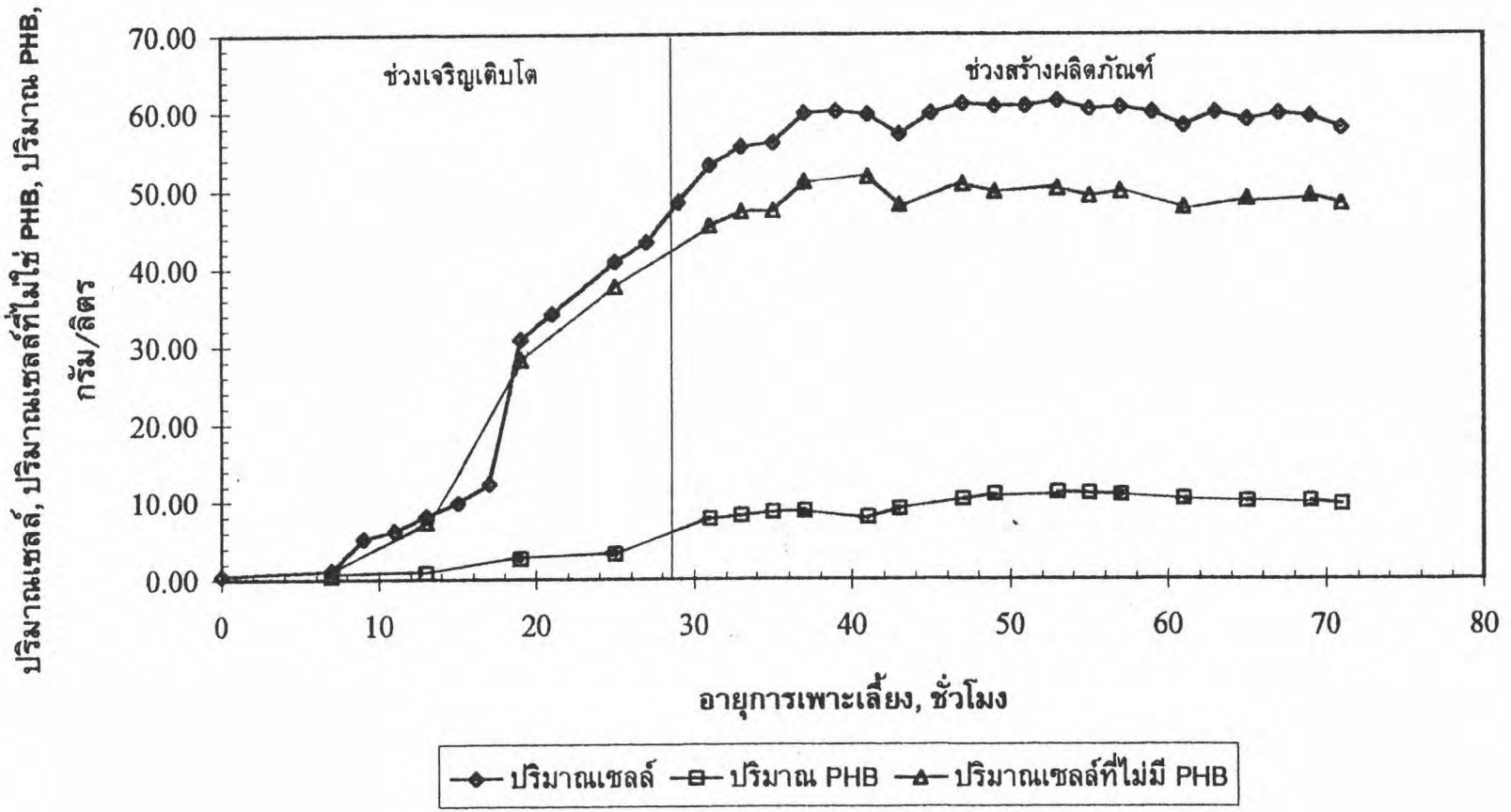


N = 0 เปลี่ยนเข้าสู่ช่วงสร้างผลิตภัณฑ์เมื่ออายุการเพาะเลี้ยง 35 ชั่วโมง

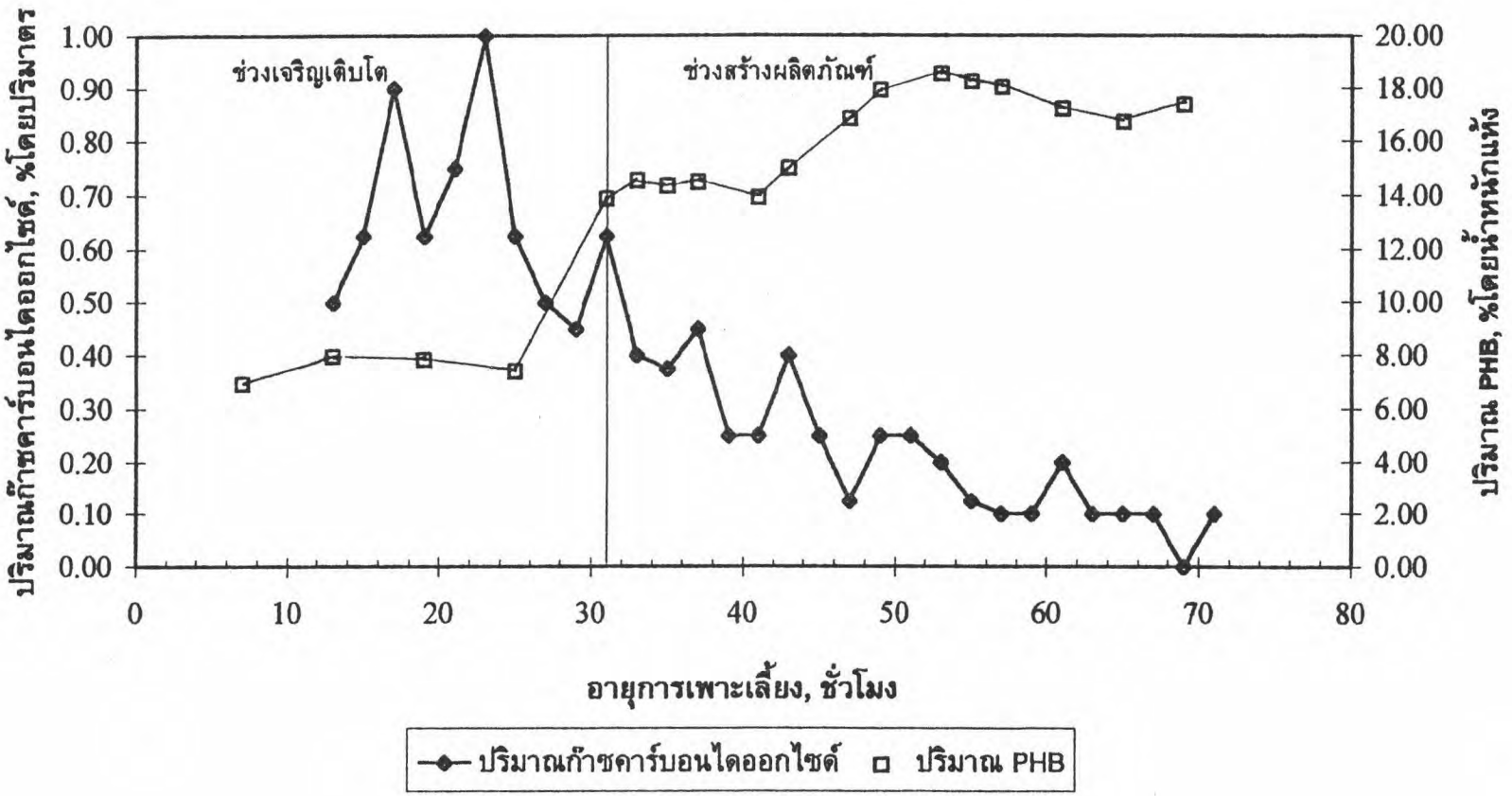
C/N = 150 เปลี่ยนเข้าสู่ช่วงสร้างผลิตภัณฑ์เมื่ออายุการเพาะเลี้ยง 31 ชั่วโมง

C/N = 30 เปลี่ยนเข้าสู่ช่วงสร้างผลิตภัณฑ์เมื่ออายุการเพาะเลี้ยง 43 ชั่วโมง

รูปที่ 5.19 แสดงค่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในถังหมักที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ



รูปที่ 5.20 แสดงปริมาณเซลล์, ปริมาณ PHB, และปริมาณเซลล์ที่ไม่มีPHB ที่อายุการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ



รูปที่ 5.21 แสดงปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในก๊าซที่ออกจากถังหมัก กับค่าปริมาณผลิตภัณฑ์ (% โดยน้ำหนักแห้ง)

5.4 สรุปการทดลอง

1 จากการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตในระดับขวดแก้วทรงกรวยพบว่า

ก) เชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC17697 สามารถใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่ากลูโคส โดยเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่า ปริมาณเซลล์ค่าสูงสุดเมื่อใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน คือ 5.21 กรัม/ลิตร ที่น้ำตาลฟรุคโตสเริ่มต้นเข้มข้น 8.0 กรัม/ลิตร และเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณเซลล์ที่ได้ คือ 3.45 กรัม/ลิตร ที่น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเข้มข้น 20.0 กรัม/ลิตร และเมื่อใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้ปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่มากกว่าเมื่อใช้กลูโคส

ข) ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้าง PHB คือ 7.0

ค) เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อใช้ค่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ ๆ (C/N = 10) โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.54 กรัม/ลิตร แต่จะสร้าง PHB ได้ดีเมื่อใช้ค่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง ๆ (C/N = 30) เชื้อจุลินทรีย์สามารถสะสมพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตได้มากถึง 21.15 % โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง

2 เมื่อใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC17697 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่าเชื้อจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตเมื่อใช้ฟรุคโตสที่ความเข้มข้นสูงๆ โดยเชื้อจุลินทรีย์จะโตได้ดีที่สุดเมื่อใช้ฟรุคโตสเข้มข้น 9 กรัม/ลิตร และเมื่อใช้ความเข้มข้นฟรุคโตสต่ำลง เชื้อจุลินทรีย์จะมีค่าผลได้เซลล์จากสารอาหารที่สูงมากยิ่งขึ้น

3 การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยควบคุมการเติมสารป้อนในแบบเพื่อให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดตลอดเวลา ด้วยวิธีวิเคราะห์หาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากข้อมูลปริมาณเซลล์ภายในถังหมักจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่สร้างกราฟมาตรฐานในภาวะการหมักจริง การเพาะเลี้ยงด้วยวิธีเดียวกันแต่ใช้ข้อมูลการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จากแบบจำลองทางคณิตศาสตรยังคงไม่สามารถกระทำได้เนื่องจากแบบจำลองที่สร้างขึ้นให้ค่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์สูงกว่าความเป็นจริง

4 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องโดยควบคุมให้ค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนภายในถังหมักเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ตลอดเวลาโดยปรับเปลี่ยนค่าอัตราการเติมสารป้อนเพื่อให้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตสคงที่ ที่ประมาณ 9 กรัม/ลิตร สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC17697 ได้ความเข้มข้นสูงถึงขึ้นได้สูงถึง

53.28 กรัม/ลิตร ภายในระยะเวลา 31 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราผลผลิตเซลล์ 1.72 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง

5 เมื่อปรับเปลี่ยนสภาวะการเพาะเลี้ยงให้เข้าสู่ช่วงสร้างผลิตภัณฑ์ ได้ใช้สารป้อนที่มีค่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 30, 150, และสารป้อนที่มีแต่เพียงคาร์บอนเพียงอย่างเดียว พบว่าสารป้อนที่มีค่าอัตราส่วนเท่ากับ 150 ให้ปริมาณ PHB ที่ดีที่สุด โดยได้ปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 10.9 กรัม/ลิตร ได้ปริมาณเซลล์ 60.8 กรัม/ลิตร คิดเป็นปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 17.92 % โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ด้วยอัตราผลผลิต 0.22 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง

5.5 ข้อเสนอแนะ

1. จัดหาวิธีวิเคราะห์หาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในแบบเวลาจริงที่ให้ค่าแม่นยำมากยิ่งขึ้น
2. หารูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตกับปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เชื้อจุลินทรีย์ปลดปล่อยออกมา เพื่อให้สามารถตรวจวัดติดตามอัตราการสังเคราะห์ PHB ให้สะดวกยิ่งขึ้น