

การผลิต 1,3 ไดไฮดรอกซีอะซิโตน จากเชื้อจุลินทรีย์ *Gluconobacter oxydans* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ  
แบบอากาศยกโดยใช้แหล่งไนโตรเจนจากของเสียอุตสาหกรรมการเกษตร



นายวีรพันธุ์ ไชยพันธ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF 1,3 DIHYDROXYACETONE FROM MICROBIAL *GLUCONOBACTER*  
*OXYDANS* IN AIRLIFT BIOREACTOR BY USING NITROGEN SOURCE FOR AGRO -  
INDUSTRIAL WASTE

Mr. Weerapan Chaikhan



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering  
Department of Chemical Engineering  
Faculty of Engineering  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2015  
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิต 1,3 ไตไฮดรอกซีอะซิโตน จากเชื้อจุลินทรีย์ <i>Gluconobacter oxydans</i> ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ อากาศยกโดยใช้แหล่งไนโตรเจนจากของเสียอุตสาหกรรม การเกษตร
โดย	นายวีรพันธุ์ ไชยจันทร์
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. กษิติศ หนูทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. ชุตินันท์ สิริพิพัฒน์กุล

---

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรเทพ เขียวทอม)  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร. กษิติศ หนูทอง)  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(อาจารย์ ดร. ชุตินันท์ สิริพิพัฒน์กุล)  
.....กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. พิมพ์พร พลเพชร)  
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรีเมฆ ชาวโพงพาง)

วีรพันธุ์ ไชยจันทร์ : การผลิต 1,3 ไดไฮดรอกซีอะซิโตน จากเชื้อจุลินทรีย์ *Gluconobacter oxydans* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกโดยใช้แหล่งไนโตรเจนจากของเสียอุตสาหกรรมเกษตร (PRODUCTION OF 1,3 DIHYDROXYACETONE FROM MICROBIAL *GLUCONOBACTER OXYDANS* IN AIRLIFT BIOREACTOR BY USING NITROGEN SOURCE FOR AGRO - INDUSTRIAL WASTE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. กษิตีศ หนูทอง, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร. ชูติมณฑน์ สิริพิพัฒน์กุล, 68 หน้า.

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Gluconobacter oxydans* แบบกะเพื่อผลิตสาร 1,3-ไดไฮดรอกซีอะซิโตน (ดีเฮกเซอ) สามารถแบ่งได้เป็นสองส่วนหลัก ส่วนแรกทำงานได้มุ่งเน้นในการศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร ซึ่งประกอบด้วยน้ำแ่ข้าวโพด น้ำกากผงชูรส และน้ำย่อยกากถั่วเหลือง เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมมีค่าเท่ากับ 80 กรัม/ลิตร โดยน้ำแ่ข้าวโพดเป็นของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตรให้การเจริญเติบโตสูงสุดซึ่งตรวจวัดได้โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนที่  $3.78 \pm 0.58$  กรัม/ลิตร และความเข้มข้นของดีเฮกเซอสูงสุดที่  $50.81 \pm 6.59$  กรัม/ลิตร ขณะที่ความเข้มข้นของดีเฮกเซอเมื่อใช้น้ำกากผงชูรสและน้ำย่อยกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ค่าเท่ากับ  $13.16 \pm 0.36$  และ  $16.47 \pm 1.39$  กรัม/ลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการทดลองยังระบุว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในน้ำแ่ข้าวโพดไว้ที่ 2.05 กรัม/ลิตร ให้การเจริญเติบโตและความเข้มข้นของดีเฮกเซอสูงสุด ในส่วนที่สองได้ทำการเพาะเลี้ยง *G. oxydans* แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (32 ลิตร ปริมาตรใช้งาน) เมื่อเทียบกับการใช้งานขวดรูปชมพูปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในส่วนแรก ผลการทดลองพบว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกแบบหมุนเวียนภายใน (IAB) มีสมรรถนะสูงกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกแบบแผ่นแบบ (FAB) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟองอากาศ (BC) ซึ่งยืนยันได้จากค่าความเข้มข้นของโปรตีนและดีเฮกเซอจาก IAB ที่มากกว่า FAB และ BC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) สภาวะเหมาะสมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB พบว่าสามารถผลิตดีเฮกเซอได้สูงสุด ( $40.89 \pm 1.20$  กรัม/ลิตร) เกิดขึ้นเมื่อใช้ความเร็วอากาศที่ 0.37 เซนติเมตร/วินาที และอัตราส่วนพื้นที่ Riser ต่อ Downcomer ที่ 1:1

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5670388021 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: DIHYDROXYACETONE / AIRLIFT BIOREACTOR / AGRO-INDUSTRIAL WAST / NITROGEN SOURCE / GLUCONOBACTER OXYDANS

WEERAPAN CHAIKHAN: PRODUCTION OF 1,3 DIHYDROXYACETONE FROM MICROBIAL *GLUCONOBACTER OXYDANS* IN AIRLIFT BIOREACTOR BY USING NITROGEN SOURCE FOR AGRO - INDUSTRIAL WASTE. ADVISOR: ASSOC. PROF. KASIDIT NOOTONG, Ph.D., CO-ADVISOR: CHUTIMON SATIRAPIPATHKUL, Ph.D., 68 pp.

Batch cultivation of microbial *Gluconobacter oxydans* to produce 1,3-dihydroxyacetone (DHA) was conducted in two parts. The first part focused on the feasibility of using agro-industrial wastes including corn steep liquor (CSL), glutamic mother liquor (GML) and soybean meal hydrolysate (SMH) as the substituted nitrogen source in the growth medium. The results indicated that the optimal initial glycerol concentrations obtained at 80 g/L. agro-industrial wastes chosen in this work were able to support cell growth and DHA formation with CSL yielded the maximum growth measured as protein concentrations at  $3.78 \pm 0.58$  g/L and maximum DHA concentrations at  $50.81 \pm 6.59$  g/L. DHA concentrations for GML and SMH were determined at  $13.16 \pm 0.36$  and  $16.47 \pm 1.39$  g/L, respectively. Moreover, maintaining nitrogen concentrations in CSL at 2.05 g/L, yielded the highest growth and DHA production as compared to other nitrogen concentrations. The second part involved the batch cultivation of *G. oxydans* in larger bioreactors (32 L working volume). The results indicated that the internal loop airlift bioreactor (IAB) outperformed the flat-panel airlift bioreactor (FAB) and bubble column bioreactor (BC) as suggested by the statistically ( $p < 0.05$ ) higher protein and DHA concentrations. Subsequent cultivation of *G. oxydans* in IAB revealed that the optimal condition that produced the highest DHA concentrations measured at  $40.89 \pm 1.20$  g/L were corresponded to the superficial velocity of 0.37 cm/s and the areal ratio of riser to downcomer of 1:1.

Department: Chemical Engineering	Student's Signature .....
Field of Study: Chemical Engineering	Advisor's Signature .....
Academic Year: 2015	Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์การผลิต 1,3 ไดไฮดรอกซีอะซิโตน จากเชื้อจุลินทรีย์กลูโคโนแบคเตอร์ ออกซิแด้นซ์ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกโดยใช้แหล่งไนโตรเจนจากของเสียอุตสาหกรรม การเกษตรสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยได้รับความอนุเคราะห์ช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณต่อผู้ที่ให้ความอนุเคราะห์ดังต่อไปนี้ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.กษิติศ หนูทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และอาจารย์ ดร.ชุตินันท์ สิริพิพัฒน์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางหลักการในการดำเนินงานวิจัยและแก้ไขในสิ่งที่บกพร่องมาตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัยขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วย รองศาสตราจารย์ ดร.สุรเทพ เขียวหอม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.พิมพ์พร พลเพชร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรีเมฆ ขาวโพงพาง กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัยที่ได้กรุณาชี้แนะแก้ไขวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาวิศวกรรมเคมีและเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ตลอดจนเพื่อน พี่และน้องๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีและท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ทุกคนในครอบครัว และท่านผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่ได้ให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าในการศึกษามาโดยตลอด

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ไคไฮดรอกซีอะซีโตน.....	5
2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต DHA.....	7
2.2.1. วิธีของจุลินทรีย์ <i>G. oxydans</i> .....	9
2.3 สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อและรูปแบบการหมักเพื่อใช้ในการผลิต DHA.....	11
2.3.1 การหมักแบบกะ (Batch).....	12
2.3.2 การหมักแบบเติมกะ (Fed Batch).....	13
2.4 ปัจจัยในการผลิต DHA ของ <i>G. oxydans</i> .....	14
2.4.1 อิทธิพลแหล่งคาร์บอน.....	14
2.4.2 อิทธิพลแหล่งไนโตรเจน.....	16
2.4.3 อิทธิพลอื่นๆ.....	22

2.5	ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ .....	23
บทที่ 3	วิธีการทดลองและการวิเคราะห์.....	28
3.1	จุลินทรีย์และการเตรียมหัวเชื้อ .....	28
3.2	การเตรียมของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร .....	28
3.3	ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหมาะสม .....	29
3.4	ชนิดของแหล่งไนโตรเจนจากอุตสาหกรรมเกษตร .....	29
3.5	ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ .....	30
3.6	ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ .....	31
3.7	การเลือกถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ .....	34
3.8	สภาวะที่เหมาะสมของถึงปฏิกรณ์.....	34
3.9	ตรวจสอบและวิเคราะห์ผล .....	35
3.10	คำนวณค่าทางจุลศาสตร์.....	35
บทที่ 4	ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	36
4.1	ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหมาะสม .....	36
4.2	ชนิดของแหล่งไนโตรเจนจากของเสียอุตสาหกรรมเกษตร .....	41
4.3	ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ .....	45
4.4	การเลือกถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ .....	49
4.5	ความเร็วอากาศในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	54
4.6	ผลของอัตราส่วนพื้นที่ป้อนอากาศและไม่ป้อนอากาศ (Ar/Ad).....	58
บทที่ 5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ .....	60
	รายการอ้างอิง .....	62
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	68



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	การใช้งานของ DHA ในรูปแบบต่างๆ.....	6
ตารางที่ 2.2	สายพันธุ์จุลินทรีย์แบบคที่เรียที่สามารถผลิต DHA.....	7
ตารางที่ 2.3	ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย <i>G. oxydans</i> .....	8
ตารางที่ 2.4	วิธีของการผลิตไดไฮดรอกซีอะซิโตนของ <i>G. oxydans</i> .....	9
ตารางที่ 2.5	วิธีของการเจริญเติบโตของเซลล์ของ <i>G. oxydans</i> .....	10
ตารางที่ 2.6	ความแตกต่างระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อแบบพื้นฐานและแบบกึ่งสังเคราะห์ .....	11
ตารางที่ 2.7	ผลได้ของไดไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอลในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบกะ .....	12
ตารางที่ 2.8	ปัจจัยแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง <i>G. oxydans</i> .....	15
ตารางที่ 2.9	ราคาแหล่งไนโตรเจน.....	16
ตารางที่ 2.10	องค์ประกอบแก้วเหลืองหลังจากปฏิกิริยาย่อยสลาย.....	17
ตารางที่ 2.11	องค์ประกอบของน้ำแช่ข้าวโพด (CSL).....	19
ตารางที่ 2.12	อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน .....	21
ตารางที่ 2.13	อิทธิพลอื่นๆ.....	22
ตารางที่ 2.14	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิต DHA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ.....	27
ตารางที่ 3.1	ชุดควบคุมและชุดทดลองในการศึกษาการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจากอุตสาหกรรม เกษตรสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>G. oxydans</i> เพื่อผลิต DHA.....	30

## สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1	โครงสร้างของไดไฮดรอกซีอะซิโตน	5
รูปที่ 2.2	วิถีเมทาบอลิซึมของกลีเซอรอลด้วย <i>G. oxydans</i>	10
รูปที่ 2.3	ปฏิกิริยาย่อยสลายของโปรตีน	18
รูปที่ 2.4	แผนผังกระบวนการผลิต Glutamic Mother Liquid (GML)	20
รูปที่ 3.1	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกแบบหมุนภายใน (Internal-loop airlift bioreactor: IAB)	31
รูปที่ 3.2	ถังปฏิกรณ์แบบฟองอากาศ (Bubble column bioreactor: BC)	32
รูปที่ 3.3	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกแบบแผ่นกั้น (Flat-panel airlift bioreactor: FAB)	33
รูปที่ 4.1	ความเข้มข้นของโปรตีนและ DHA ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ <i>G. oxydans</i> แบบกะ โดยปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 -120 กรัมต่อลิตร	39
รูปที่ 4.2	ความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ <i>G. oxydans</i> แบบกะโดยปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 -120 กรัมต่อลิตร	40
รูปที่ 4.3	ความเข้มข้นของโปรตีนและ DHA ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ <i>G. oxydans</i> แบบกะปรับชนิดแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ	43
รูปที่ 4.4	ความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ <i>G. oxydans</i> แบบกะปรับชนิดแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ	44
รูปที่ 4.5	ความเข้มข้นของโปรตีนและ DHA ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ <i>G. oxydans</i> แบบกะโดยปรับความเข้มข้นน้ำแข่วัวพืดที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน	47
รูปที่ 4.6	ความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ <i>G. oxydans</i> แบบกะโดยปรับความเข้มข้นน้ำแข่วัวพืดที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน	48
รูปที่ 4.7	ความเข้มข้นของโปรตีนและ DHA ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ <i>G. oxydans</i> แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB FAB และ BC	52

**รูปที่ 4 8** ความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans*  
แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB FAB และ BC..... 53

**รูปที่ 4 9** ความเข้มข้นของโปรตีนและ DHA ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans*  
แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB โดยปรับความเร็วอากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ..... 56

**รูปที่ 4 10** ความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans*  
แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB ปรับความเร็วอากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ..... 57

**รูปที่ 4 11** ความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans*  
แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB โดยปรับอัตราส่วนพื้นที่..... 59



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

1,3-ไดไฮดรอกซีอะซิโตน (1,3-Dihydroxyacetone,  $C_3H_6O_3$ ) (Erni et al., 2006) หรือ DHA เป็นสารเคมีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการผลิตเครื่องสำอางและการแพทย์ ยกตัวอย่าง เช่น ครีมบำรุงผิว ฝอยครีมป้องกันแดดและใช้ในกระบวนการรักษาผมแห้งผก นอกจากนี้ DHA มีการใช้ในการผลิตกรดแลคติกซึ่งสามารถนำไปผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ (Hu et al., 2010) ปัจจุบันการผลิต DHA นิยมใช้กระบวนการทางชีวภาพมากกว่ากระบวนการทางเคมี เนื่องจากกระบวนการทางเคมีใช้พลังงานสูงและก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมรวมถึงต้นทุนการผลิตสูง จากการค้นคว้าพบว่าจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์สามารถผลิต DHA ยกตัวอย่าง เช่น *Candida boidinii* 2201 (Streekstra et al., 1987) *Acetobacter xylinum* A-9 (Nabe et al., 1979) *Hansenula polymorpha* CBS 4732 (Kato et al., 1986) *Klebsiella aerogenes* (Neijssel et al., 1975) *Escherichia Coli* strain ECFS (Asnis & Brodie, 1953) *Pichia membranifaciens* (Liu et al., 2007) และ *Gluconobacter oxydans* (Hu et al., 2010) เป็นต้น ทั้งนี้จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์ DHA คือ *G. oxydans* เนื่องจากให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์ DHA สูง และมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ส่งผลให้ลดขั้นตอนและต้นทุนของการทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ขึ้น (Svitel & Senkal, 1994)

*G. oxydans* เป็นแบคทีเรียที่ต้องใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิตและต้องการออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนสุดท้ายในกระบวนการสังเคราะห์ DHA จากกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮโดรจีเนส (Hekmat et al., 2003a; Mishra et al., 2008; Svitel & Senkal, 1994) ดังนั้นการให้อากาศอย่างเพียงพอจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิต DHA การผลิต DHA นิยมใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน (Stirred Tank Bioreactor) เนื่องจากมีต้นทุนในการก่อสร้างและติดตั้งต่ำ อีกทั้งง่ายต่อการควบคุม อย่างไรก็ตามถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนมีข้อจำกัดด้านการถ่ายเทมวลออกซิเจนเมื่อทำการขยายและภายใต้สภาวะความเข้มข้นของเซลล์ที่หนาแน่นและอุณหภูมิสูง (Lee et al., 1992) นอกจากนี้การเพิ่มอัตราการปั่นกวนการไหลเพื่อช่วยกระจายตัวของออกซิเจนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพส่งผลให้ใช้พลังงานสูงมากขึ้นอีกทั้งอาจเกิดแรงเฉือนจากใบพัดกวนในระดับสูงซึ่งอาจเกิดผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์และการสังเคราะห์ DHA ได้

(Kaewpintong et al., 2007; Krichnavaruk et al., 2005; Lee, 1992) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ อากาศยก (Airlift Bioreactor) ได้ถูกเสนอเป็นทางเลือกในการผลิต DHA เนื่องจากสามารถถ่ายเท ออกซิเจนได้ดี เกิดแรงเฉือนในระดับต่ำเนื่องจากไม่มีชิ้นส่วนที่เคลื่อนที่ และมีค่าใช้จ่ายในการเดิน ระบบต่ำ (Hu et al., 2010; Krichnavaruk et al., 2005; Lee, 1992) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ อากาศยกมีหลายรูปแบบ เช่น แบบหมุนวนภายใน (Internal-loop column) แบบหมุนวนภายนอก (External-loop column) แบบแผ่นกั้น (Flat-panel) แบบกรวยตรง (Cone-shape) และ แบบไม่มี แผ่นกั้น (Non-baffle flat-pane) โดยการเลือกใช้งานขึ้นอยู่กับประเภทของจุลินทรีย์ ลักษณะอาหาร เลี้ยงเชื้อ การทำปลอดเชื้อ รวมถึงขั้นตอนการติดตั้งและต้นทุนดำเนินการ เป็นต้น จากงานวิจัยก่อน หน้านี้พบว่าการผลิต DHA โดยใช้งานถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกมีเพียงหนึ่งบทความเท่านั้น โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* ในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกแบบหมุนวนภายใน 2 ลิตร (Hu et al., 2011) และยังขาดข้อมูลการเปรียบเทียบรูปแบบของถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ รวมถึงการ หาสภาวะเหมาะสมในการผลิต DHA

จากการวิเคราะห์ค่าใช้จ่ายของกระบวนการผลิตเคมีภัณฑ์ด้วยกระบวนการทางชีวภาพพบว่าต้นทุน อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นค่าใช้จ่ายส่วนใหญ่ (Kaewrat, 2011) และจากการวิเคราะห์ค่าใช้จ่ายในการผลิต DHA จากจุลินทรีย์ *G. oxydans* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานพบว่าเปปโตน (Peptone) และสารสกัดยีสต์ (Yeast extract) ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนคิดเป็นค่าใช้จ่ายประมาณร้อยละ 55 ของ ราคาอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด จากการค้นคว้าพบว่าการใช้งานผลพลอยได้หรือของเสียจาก อุตสาหกรรมเกษตรสามารถนำมาใช้ทดแทนเปปโตนและสารสกัดยีสต์ได้ ในส่วนของประเทศไทย น้ำ แช่วัวโพด (Corn Steep Liquor: CSL) น้ำกากชูรส (Glutamic mother liquor: GML) และ น้ำย่อยเปลือกถั่วเหลือง (Soybean meal hydrolysate: SMH) เป็นของเสียที่พบได้ทั่วไปจากการ ผลิตทางอุตสาหกรรมเกษตร โดยมีราคาเท่ากับ 18 บาท/กิโลกรัม สำหรับ น้ำแช่วัวโพด 330 บาท/กิโลกรัม สำหรับน้ำกากชูรส และ 9 บาท/กิโลกรัม สำหรับน้ำย่อยเปลือกถั่วเหลือง ซึ่งน้อยกว่าราคาของสารสกัดยีสต์ (3,840 บาท/กิโลกรัม) และเปปโตน (3,600 บาท/กิโลกรัม) เป็นอย่างมาก (บริษัทซีทีเคมิคอล จำกัด) ดังนั้นการศึกษาถึงความเป็นไปได้ของการใช้น้ำแช่วัวโพด น้ำกากชู รสและน้ำย่อยเปลือกถั่วเหลือง เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ *G. oxydans* จึงเป็นสิ่งที่ น่าสนใจซึ่งหากประสบผลสำเร็จจะทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการผลิต DHA ลงได้อย่างมีนัยสำคัญ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.1.1. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้น้ำแช่ข้าวโพด น้ำกากผงซูรส และ น้ำย่อยเปลือกถั่วเหลือง เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ *G. oxydans* ในการผลิต DHA
- 1.1.2. เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกสำหรับเพาะเลี้ยง *G. oxydans* เพื่อผลิต DHA
- 1.1.3. เพื่อหาสภาวะเหมาะสมสำหรับใช้งานถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกในเพาะเลี้ยง *G. oxydans* เพื่อผลิต DHA

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ส่วนที่ 1 ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกลีเซอรอล ประเภทของแหล่งไนโตรเจนจากอุตสาหกรรมเกษตร ความเข้มข้นของไนโตรเจนในของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร โดยการศึกษาที่มีขอบเขตดังนี้

- ความเข้มข้นกลีเซอรอลในช่วงตั้งแต่ 20 ถึง 120 กรัม/ลิตร และมีองค์ประกอบอื่นๆ ซึ่งระบุไว้ในรายงานของ Kommanee (2010)
- ทำการทดลองหาความเป็นไปได้การใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร คือ น้ำแช่ข้าวโพด น้ำกากผงซูรส และ น้ำย่อยเปลือกถั่วเหลือง เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ *G. oxydans* ในการผลิต DHA
- โดยใช้ความเข้มข้นของ DHA อัตราการผลิต DHA และการเจริญเติบโตของ *G. oxydans* เป็นเกณฑ์หลักในการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสม

ส่วนที่ 2 ทำการศึกษาเปรียบเทียบถังปฏิกรณ์ชีวภาพประเภท (1) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกแบบหมุนวนภายใน (Internal-loop airlift bioreactor: IAB) (2) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกแบบแผ่นกั้น (Flat panel airlift bioreactor: FAB) และ (3) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟองอากาศ (Bubble column bioreactor: BC) ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* ในการผลิต DHA

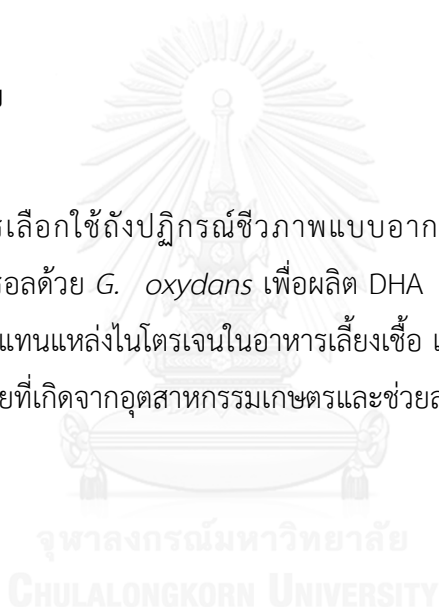
- ใช้ข้อมูลอาหารเลี้ยงเชื้อ *G. oxydans* ซึ่งเป็นผลการทดลองจากส่วนที่ 1
- ทำการควบคุมอัตราการให้อากาศ 0.1 เซนติเมตร/วินาที และอัตราส่วนพื้นที่ระหว่าง Riser ต่อ Downcomer ( $A_R/A_D$ ) ที่ 1:1 พิจารณาผลการทดลองโดยใช้ความเข้มข้นของ DHA อัตราการผลิต DHA และการเจริญเติบโตของเซลล์เป็นเกณฑ์

ส่วนที่ 3 ทำการทดลองเพื่อหาสภาวะเหมาะสมของถังปฏิกรณ์ชีวภาพในการเพาะเลี้ยง *G. oxydans* เพื่อผลิต DHA โดยการศึกษาที่มีขอบเขตดังนี้

- ทำการศึกษาถึงผลกระทบของการปรับค่าอัตราการให้อากาศในช่วงตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.6 เซนติเมตร/วินาที และผลกระทบของการปรับ  $A_p/A_D$  ในช่วงตั้งแต่ 3:1 ถึง 1:1 พิจารณาผลการทดลองโดยใช้ความเข้มข้นของ DHA อัตราการผลิต DHA และการเจริญเติบโตของเซลล์เป็นเกณฑ์
- ใช้ข้อมูลอาหารเลี้ยงเชื้อ *G. oxydans* ซึ่งเป็นผลการทดลองจากส่วนที่ 1
- ประเภทของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *G. oxydans* เป็นผลการทดลองจากส่วนที่ 2

#### 1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกและสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักกลีเซอรอลด้วย *G. oxydans* เพื่อผลิต DHA นอกจากนี้สามารถนำของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตรมาทดแทนแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อช่วยลดต้นทุนค่าใช้จ่ายของการผลิต เพิ่มมูลค่าของของเสียที่เกิดจากอุตสาหกรรมเกษตรและช่วยลดของเสียที่มีผลต่อสิ่งแวดล้อมได้

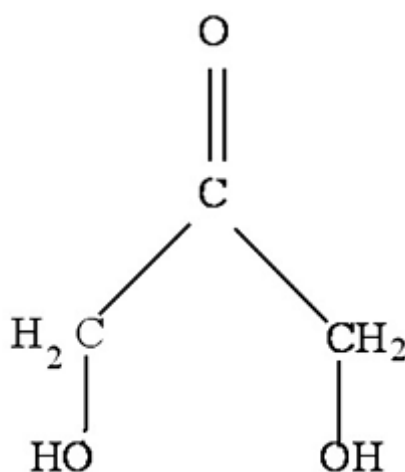


## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ไดไฮดรอกซีอะซิโตน

ไดไฮดรอกซีอะซิโตน (Dihydroxyacetone, DHA) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ  $(C_3H_6O_3)$  ถือเป็นน้ำตาลกลุ่มคีโตนที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน รูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไดไฮดรอกซีอะซิโตน

DHA เป็นสารเคมีที่สำคัญในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางโดยใช้งานอย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์ดูแลผิวหน้าและป้องกันแสงแดด ป้องกันรอยเหี่ยวย่นบนใบหน้าและผื่นภูมิแพ้บนผิวหน้ารวมถึงสภาวะตาต่อกระจก เป็นต้น โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์ป้องกันแสงแดดประกอบไปด้วย DHA ร้อยละ 2 ถึง 5 ของน้ำหนัก ยกตัวอย่าง เช่น ครีม โลชั่น เจล และมูส เป็นต้น ราคาในช่วง \$5 ถึง \$150 ต่อ 100 กรัม โดยปัจจุบันได้มีการใช้ DHA ร่วมกับสารประกอบอื่นๆเพื่อเพิ่มมูลค่าและการใช้งานที่หลากหลาย เช่น สารสกัดจากลูกวอลนัท สารป้องกันแสงแดด SPF สารป้องกันออกซิเดชันและวิตามิน เป็นต้น นอกจากนี้ DHA ใช้ในอุตสาหกรรมเคมีช่วยในการสังเคราะห์สารเคมีมากมาย (Hekmat et al., 2003b) ยกตัวอย่างเช่น กรดแลคติก (Bicker et al., 2005) และ 1,2-โพรพาลีนไกลคอล เนื่องจาก DHA เป็นสารไม่เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมจึงสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุที่สามารถย่อยสลายเองตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เพื่อการขนส่งยา (Drug delivery) ภายในร่างกาย อีกทั้ง DHA มีประโยชน์ในการทำให้รสชาติของไวน์มีรสหวาน อันเกิดจากกลไกของกลีเซอรอลที่อยู่ภายในช่องปาก



ถูกเปลี่ยนเป็น DHA ด้วยแบคทีเรียกรดอะซิติกที่อยู่ในไวน์ อีกทั้ง DHA สามารถช่วยในการกระตุ้นการคั้ดหลังของอินซูลิน และใช้เป็นยาถอนพิษไซยาไนด์ (Cyanide) โดยทางการแพทย์ถือว่ามึราคา ค่่อนข้างสูง

### ตารางที่ 2.1 การใช้งานของ DHA ในรูปแบบต่างๆ

ประเภทการใช้งาน	การใช้งาน	อ้างอิง
Cosmetic industry	Suntans	Brown, (2001)
Medical industry	Drug delivery	
	Weight augmentation	Stanko et al.(1990)
	Fat loss	Ivy,(1998) Schlifke,
	Antioxidant Activity	(1999)
	Increasing endurance capacity	
	Vitiligo treatment	Fesq et al. (2001)
	Antidotal effect towards cyanide poisoning	Niknahad and Ghelichkhani, (2002)
Chemical industry	Lactic acid	Bicker et al. (2005)
	1, 2 propylene glycol	
	Versatile building block	Hekmat et al., (2003)
	Biomaterials	
	Organic synthesis	

## 2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต DHA

ในปี ค.ศ. 1898 ถือเป็นยุคแรกของการผลิต DHA ด้วยจุลินทรีย์ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น จุลินทรีย์ชนิดนี้เรียกว่า *Sorbose bacillus* โดย DHA เกิดจากการออกซิเดชันของกลีเซอรอลด้วย เอนไซม์ Dihydroxyacetone synthase (DHAS) ต่อมาได้ค้นพบว่าจุลินทรีย์หลากหลายชนิด สามารถผลิต DHA ได้เช่นกัน เช่น *Carboxydobacterium Acinetobacter* sp. strains JC1 DSM 3803 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมทานอล (Young et al., 1997) นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ DHA ได้แสดงในตารางที่ 2.2

### ตารางที่ 2.2 สายพันธุ์จุลินทรีย์แบคทีเรียที่สามารถผลิต DHA

ลำดับที่	ชื่อของสายพันธุ์จุลินทรีย์แบคทีเรีย
1	<i>Sorbose bacillus/Bacillus xylinum</i>
2	<i>Acinetobacter</i> sp. strain JC1 DSM 3803
3	<i>Acetobacter xylinum</i> A-9
4	<i>Gluconobacter melanogenus</i> IFO 3293
5	<i>G. melanogenus</i> IFO 3294
6	<i>Hansenula polymorpha</i> CBS 4732
7	<i>Candida boidinii</i> 2201
8	<i>Klebsiella aerogenes</i>
9	<i>Escherichia coli</i> (strain ECFS)
10	<i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 621
11	<i>Pichia membranifaciens</i>
12	<i>Bacillus licheniformis</i> B-05571
13	<i>Acetomonas</i> sp.

ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็น DHA นั้น พบว่า *G. oxydans* เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจาก *G. oxydans* ผลิตได้ของ DHA ที่สูงกว่า ผลพลอยได้น้อยกว่า (Kato, 1986; Ma, 2010) *G. oxydans* เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยอย่างกว้างขวางในการผลิต DHA เป็นจุลินทรีย์ชนิดแกรมลบ ใช้ออกซิเจนในกระบวนการดำรงชีวิต และเป็นกลุ่มย่อยของแบคทีเรียสายพันธุ์อะซิโตนแบคเตอร์พบในดอกไม้และผลไม้ (Gupta et al., 2001) จุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถผลิต DHA ด้วยการออกซิเดชันแบบไม่สมบูรณ์ (Incomplex oxidation) กับกลีเซอรอลด้วยเอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮโดรจีเนส (Deppenmeier et al., 2002) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อกลีเซอรอลในการผลิต DHA ล่าสุดมีการนำจุลินทรีย์จากดินชื่อว่า *Pichia membranifaciens* สามารถผลิต DHA ได้เช่นกัน โดยมีสภาวะที่เหมาะสมเท่ากับ อุณหภูมิ 29.6 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.74 พบว่า ความเข้มข้นของ DHA เท่ากับ 12.96 กรัม/ลิตร ในเวลา 48.8 ชั่วโมงในการเพาะเลี้ยง (Liu et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดสามารถผลิต DHA ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.3

**ตารางที่ 2.3** ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย *G. oxydans* (De Ley and Swings, 1994)

ชนิดแบคทีเรีย	แบคทีเรียแกรมลบ
รูปร่าง	แท่งหรือทรงรีไข่
ความกว้าง (ไมโครเมตร)	0.5 ถึง 0.8
ความสามารถในการออกซิเดชัน	กลุ่มคาร์โบไฮเดรตและแอลกอฮอล์
สารที่ได้จากการออกซิเดชัน	วิตามินซี กรดดี-กลูตามิก ไตไฮดรอกซีอะซิโตน กรดคีโตกลูตามิก ซิลิโพล น้ำส้มสายชู
แหล่งที่พบ	ดอกไม้ ผลไม้ ดิน
สภาวะเจริญเติบโต	แหล่งน้ำตาลเข้มข้น
พีเอช	5.5 ถึง 6
อุณหภูมิ	25 ถึง 30 องศาเซลเซียส
เอนไซม์ในการผลิตไตไฮดรอกซีอะซิโตน	เอนไซม์กลูโคโนแบคเตอร์ดีไฮโดรจีเนส

### 2.2.1. วิธีของจุลินทรีย์ *G. oxydans*

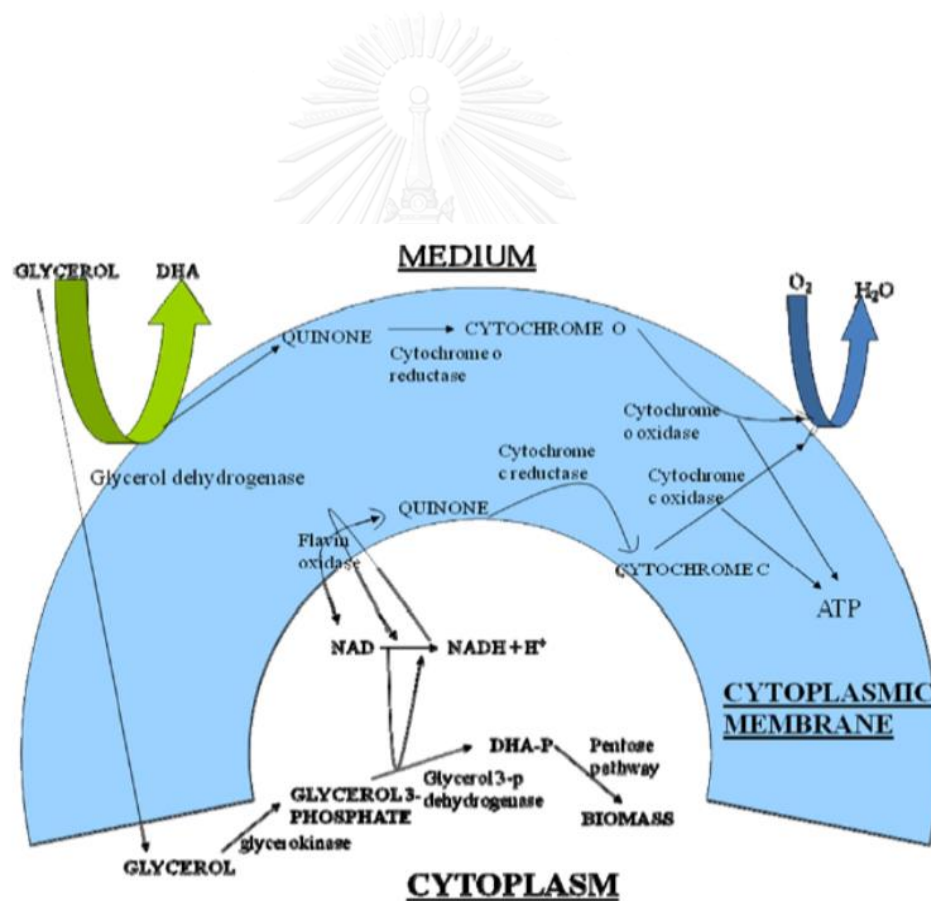
การสังเคราะห์ไดไฮดรอกซีอะซิโตนด้วยกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคโนแบคเตอร์ดีไฮโดจีเนสสามารถทำงานด้วยการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์แบคทีเรีย *G. oxydans* โดยลักษณะกิจกรรมที่เกิดขึ้นของจุลินทรีย์แบคทีเรีย *G. oxydans* กับกลีเซอรอล อธิบายได้จาก รูปที่ 2.2 (Ohrem and Voß, 1996a) กระบวนการแยกของไดไฮดรอกซีอะซิโตนที่เกิดขึ้นระหว่างที่กลีเซอรอลเกิดการเมทาบอลิซึมซึ่งอธิบายด้วยหลักการของ Claret (1992) แบคทีเรียชนิดนี้ใช้กลีเซอรอลเกิดกระบวนการ 2 เส้นทาง (Path way) ของ Catabolic pathway เส้นทางแรก (Pathway) คือ สร้างผลิตภัณฑ์ไดไฮดรอกซีอะซิโตน (DHA) ด้วยเอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮโดจีเนสบริเวณเมมเบรนบอนด์ (membrane bound) ถือเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวที่สร้าง DHA โดยการเกิดของไดไฮดรอกซีอะซิโตนจะไม่เกิดตัวกลาง NADH เนื่องจากมีออกซิเจนเป็นตัวรับประจุสุดท้าย (Claret et al., 1994) ทั้งนี้ DHA จะเกิดนอกเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นทางดังกล่าวจะมีผลเกี่ยวข้องกับเมมเบรนบอนด์ดีไฮโดจีเนสซึ่งใช้เป็นพลังงานในกระบวนการเมทาบอลิซึม เส้นทางที่ 2 คือเกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยวิถีไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic pathway) เริ่มต้นกระบวนการฟอสโฟรีเซชัน (Phosphorylation) ของกลีเซอรอลหรือกระบวนการสังเคราะห์ของ ATP ด้วยกระบวนการดีไฮโดจีเนชัน (Dehydrogenation) เป็น DHAP ซึ่ง DHAP ที่เกิดขึ้นเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาด้วยวิถีเพนโทสฟอสเฟส (Pentose phosphate pathway) เพื่อนำไปใช้ในเส้นทางเกิด DHA โดยเส้นทางทั้งสองจะทำงานร่วมกันเพื่อเกิด DHA และเซลล์ แสดงใน รูปที่ 2.2 และดังตารางที่ 2.4 และ 2.5

ตารางที่ 2.4 วิธีของการผลิตไดไฮดรอกซีอะซิโตนของ *Gluconobacter oxydans*

ผลิตภัณฑ์	ไดไฮดรอกซีอะซิโตน
วิถี	Catabolic pathway
เอนไซม์	กลีเซอรอลดีไฮโดจีเนส
ตำแหน่งเอนไซม์	Membrane bond
ประจุ	ไม่เกิดประจุหรือตัวกลาง NADH เพราะมีออกซิเจนเป็นตัวรับประจุ
ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น	นอกเซลล์

ตารางที่ 2.5 วิธีของการเจริญเติบโตของเซลล์ของ *G. oxydans*

ผลิตภัณฑ์	เซลล์
วิธี	Cytoplasmic pathway
ปฏิกิริยาเริ่มต้น	Phosphorylation หรือกระบวนการสร้างพลังงาน ATP
กระบวนการสร้างพลังงาน (ATP)	กำจัดไฮโดรเจนไปเป็น DHAP เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา Pentose phosphate pathway เพื่อผลิตไดไฮดรอกซีอะซิโตนในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 2.2 วิธีเมทาบอลิซึมของ *Gluconobacter oxydans* ด้วยกลีเซอรอล (Mishra et al., 2008)

### 2.3 สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อและรูปแบบการหมักเพื่อใช้ในการผลิต DHA

อาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิต DHA ส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยกลีเซอรอล กลีเซอรอล แร่และกรดอะมิโนหรือไนโตรเจน ปัจจัยของการเจริญเติบโตแบคทีเรียจากการศึกษาพบว่า กรดพานโทเทนิคหรือวิตามินบี 5 มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย นอกจากนี้ได้มีการนำแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เคซีนที่ได้จากการย่อยสลายร่วมกับกรดอะมิโนเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่า การนำเคซีนมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดใหม่ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนเดิม เป็นผลดีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Underkofler et al., 1943) ซึ่งถือเป็นข้อพิจารณาหนึ่งในการพัฒนาอาหารเพาะเลี้ยง *G. oxydans*

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งสังเคราะห์ที่ใช้ในการเจริญเติบโตและการผลิต DHA สามารถแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ที่จำเป็นในการเจริญเติบโตประกอบด้วย ส่วนที่ 1 คือ วิตามิน (pantothenate p-aminobenzoic acid และ nicotinic acid ) และส่วนที่ 2 และ 3 คือ กรดอะมิโน (ซีรีน กลูตามีน) ช่วยลดปริมาณของสารสกัดยีสต์ได้ร้อยละ 5 ถึง 10 เมื่อเทียบกับการใช้สารสกัดยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว (Wethmar & Deckwer, 1999) และพบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งสังเคราะห์แม้ว่าจะทำให้ผลได้ (Yield) มีค่าต่ำแต่อัตราการเกิด DHA มีค่าสูงเมื่อเทียบกับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานเห็นได้จากตารางที่ 2.6

**ตารางที่ 2.6** ความแตกต่างระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อแบบพื้นฐานและอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งสังเคราะห์

คุณสมบัติ	Complex media	Semi synthesis media		
ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	51	31	55	29.3
Y (dry biomass/glycerol)	0.039	0.052	0.016	0.02
$\mu_{max}$ (1/h)	0.3	0.38	0.24	0.38
$qDHA_{max}$ (g/(g.h))	6.3	7.8	10.3	10.4

### 2.3.1 การหมักแบบกะ (Batch)

การหมักแบบกะที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ DHA เกิดขึ้นครั้งแรกในปี 1904 ด้วยการแยก DHA ออกจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ ต่อมาได้มีการใช้ *A. suboxydans* ในการผลิตไดไฮดรอกซีอะซิโตนโดยใช้กลีเซอรอลร้อยละ 4 ถึง 5 ของสารละลายกับสารสกัดยีสต์ร้อยละ 3 โดยกำหนดให้ค่าความเป็นพีเอชเท่ากับ 5.2 และทำการเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 14 วัน พบว่าผลลัพธ์ดังแสดงในตารางที่ 2.7 นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยศึกษาการเปรียบเทียบให้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นตั้งแต่ 50 ถึง 100 กรัม/ลิตร (Wethmar & Deckwer, 1999) และอีกหนึ่งงานวิจัยพบว่าผลได้ของไดไฮดรอกซีอะซิโตน ในการหมักแบบกะ เท่ากับร้อยละ 87 และ 90 ตามลำดับ (Virtanen & Nordlund, 1933)

ตารางที่ 2.7 ผลได้ของไดไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอลในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบกะ

ลำดับ	pH	0.153 cc KMnO <sub>4</sub> /2.0 cc metabolism solution	Dihydroxyacetone g in 1000 cc.	Dihydroxyacetone % from glycerol
1	2.8	12.2	45.35	85.6
2	-	12.5	46.65	88.0
3	2.88	13.0	48.75	92.0
4	-	12.3	45.85	86.6
5	-	12.2	45.35	85.6

### 2.3.2 การหมักแบบเติมกะ (Fed Batch)

กระบวนการหมักในระบบนี้ใช้เพื่อผลิต DHA ที่ความเข้มข้นสูง โดยควบคุมความเข้มข้นของกลีเซอรอลในช่วงที่เหมาะสมและลดปัญหาการยับยั้งที่เกิดจากความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่สูงในกระบวนการหมัก เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลอยู่ในช่วง 25 - 30 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 40 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของ DHA เท่ากับ 108 กรัม/ลิตร ขณะที่การหมักแบบกะ (Batch) ใช้เวลา 60 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของ DHA เท่ากับ 92.5 กรัม/ลิตร (Bories et al., 1991) รวมถึงอัตราเจริญเติบโตจำเพาะและผลได้สูงสุดเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อเทียบกับการหมักแบบกะ

ต่อมาพบว่าการดำเนินการระบบแบบเติมกะอีกครั้ง (Repeated Fed Batch) พบว่ามีข้อดีมากกว่าระบบการเติมแบบกะ (Fed Batch) ซึ่งได้รับการศึกษาโดย Hekmat et al. (2003) รวมถึงระบบทำความสะอาด ปลอดภัยและการบ่มเชื้อได้รับการปรับปรุงมากกว่าเปรียบเทียบกับแบบ (Fed Batch) นอกจากนี้กระบวนการ (Repeated Fed Batch) ช่วยแก้ไขปัญหาการยับยั้งของกลีเซอรอลต่อเซลล์และลดปัญหาปริมาณกลีเซอรอลเหลือน้อยจนเกินไปไม่เพียงพอต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ได้ โดยระบบการหมักการเติมกะอีกครั้ง (Repeated Fed Batch) นั้นสามารถทำการเติมเป็นจำนวน 2 ขั้นตอน (Bauer et al., 2005) พบว่าความเข้มข้นของ DHA เท่ากับ 80 กรัม/ลิตร อีกทั้งยังสามารถหลีกเลี่ยงปัญหาการยับยั้งของกลีเซอรอลต่อเซลล์ได้

จุดมุ่งหมายหลักในกระบวนการอุตสาหกรรมการผลิต DHA ประกอบด้วย 2 จุดมุ่งหมาย คือ เพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และลดการยับยั้งที่เกิดจากความเข้มข้นกลีเซอรอลและ DHA ที่เกิดจากกระบวนการผลิต ในขณะเดียวกันต้องการผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติที่ดีและใช้ต้นทุนในการผลิตที่ต่ำ ทั้งนี้ปริมาณของเซลล์มีผลโดยตรงต่อเอนไซม์ยักตัวอย่างเช่น เอนไซม์กลีเซอรอลไดไฮโดรจีเนส เพื่อใช้ในการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็นไดไฮ-

ดรอกซีอะซิโตน ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของเซลล์เป็นผลดีต่อกระบวนการหมักไดไฮดรอกซีอะซิโตน โดยพบว่าความหนาแน่นสูงสุดของเซลล์มีค่าประมาณ  $6 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร (White and Claus, 1982) *G. oxydans* เป็นหนึ่งในสายพันธุ์ที่คัดเลือกจาก 10 สายพันธุ์ *Gluconobacter* เนื่องจากสายพันธุ์นี้ให้มวลของเซลล์ที่สูงเมื่อทำการทดลองในระดับขวดรูปชมพู่ นอกจากนี้มีหลายปัจจัยที่ทำให้มวลของเซลล์มีค่าสูงสุด จากการทดลองทำการเลี้ยงเชื้อปริมาณ 200 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียสและความเร็วปั่นเหวี่ยง 150 รอบ/นาที กำหนดใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส มอลโทส แมนิทอลและซอลบิทอล เป็นต้น ซึ่งพบว่าแหล่งคาร์บอนเหล่านี้ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโต อยู่ในช่วงระหว่าง 25 ถึง 200 กรัม/ลิตร พบว่าซอลบิทอลเป็น



แหล่งคาร์บอนที่ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด โดยมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ  $4.3 \times 10^{10}$  เซลล์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 43 ชั่วโมง ซึ่งมีค่ามากกว่า 7 เท่าของความหนาแน่นของเซลล์ที่ได้กล่าวมาแล้วก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการเจริญเติบโตนั้นสามารถยกตัวอย่าง เช่น ค่าพีเอช ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดของถังปฏิกรณ์ (Albin et al., 2007) แม้ว่าผลได้ของการทดลองข้างต้นจะให้ผลที่สูงแต่สิ่งที่สำคัญอย่างหนึ่งในกระบวนการคือต้นทุนการผลิตที่ต่ำ จากการศึกษาพบว่า การนำวัสดุราคาถูกลงหรือเหลือใช้จากการเกษตร ที่สามารถใช้แทนซอลบิทอลและสารสกัดยีสต์ด้วยน้ำข้าวโพดที่ได้จากการย่อยหรือน้ำข้าวโพดที่ได้จากการหมัก ซึ่งพบว่าผลได้ของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรมีค่าใกล้เคียงกับการใช้สารสกัดยีสต์และซอลบิทอลแต่จะสามารถลดต้นทุนได้ร้อยละ 15 ของอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม (Wei et al., 2007b) ดังนั้นกระบวนการลดต้นทุนด้วยการใช้วัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรถือเป็นสิ่งที่ดีที่สามารถนำไปใช้ได้

## 2.4 ปัจจัยในการผลิต DHA ของ *G. oxydans*

ปัจจัยหลักๆของการเจริญเติบโตและผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ *G. oxydans* สามารถแบ่งออกเป็นดังนี้ ส่งเสริมให้สามารถออกซิเดชันได้เป็น DHA โดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ลำดับต่อมาจุลินทรีย์ต้องการกลีเซอรอล เกลือแร่และแหล่งไนโตรเจน รวมถึงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของกลีเซอรอลและ DHA ซึ่งความเข้มข้นของกลีเซอรอลและ DHA ที่สูงจนเกินไปส่งผลให้เซลล์ถูกทำลาย ดังนั้นปัจจัยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและสภาวะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ดีย่อมส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตและผลิต DHA ได้มากขึ้นเช่นกัน

### 2.4.1 อิทธิพลแหล่งคาร์บอน

กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้สังเคราะห์ DHA ครั้งแรก หลากหลายงานวิจัยได้รายงานว่าการผลิต DHA ด้วยกลีเซอรอลมักพบในแบคทีเรียประเภทกรด (acetic acid bacteria) โดยแหล่งคาร์บอนเป็นส่วนหนึ่งของการเจริญเติบโตและการผลิตผลิตภัณฑ์ในกระบวนการวิธียของจุลินทรีย์ อีกทั้งแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตเช่นกัน จากงานวิจัย Hu และคณะ (Hu et al., 2010) ศึกษาความแตกต่างของแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการผลิต DHA ประกอบด้วย แมนนิทอล กลีเซอรอล กลูโคส ซูโครส กาแลกโตรส มอลโตส และฟรุกโตรส เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และกำหนดเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ พีเอชเท่ากับ 5 ปั่นเหวี่ยง 150 รอบ/นาที จากการทดลองพบว่ากลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการเจริญเติบโตต่อเซลล์ อย่างไรก็ตามแหล่งคาร์บอนจำพวก แมนนิทอล มอลโตรสและกลีเซอรอล ถือเป็นแหล่งคาร์บอน

ที่เหมาะสมกับการผลิต DHA ในลำดับรองลงมา โดยพบว่ากลีเซอรอลผลิต DHA เท่ากับ 34.1 กรัม/ลิตร ทำการตรวจวัดเป็น 2 เวลา คือ ช่วงเวลาแรกหรือช่วงเวลา 0 ถึง 24 ชั่วโมงพบว่าความเข้มข้น DHA เท่ากับ 6.2 กรัม/ลิตรและในช่วงเวลาหลัง 24 ชั่วโมงจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการ พบว่าความเข้มข้นของ DHA เท่ากับ 27.9 กรัม/ลิตร นอกจากนี้กลีเซอรอลพบว่าแหล่งคาร์บอนอื่นที่เหมาะสมลำดับต่อมา คือ แมนนิทอล ความเข้มข้นของ DHA เท่ากับ 30.2 กรัม/ลิตร มีค่าการเปลี่ยนแปลงของกลีเซอรอลเป็นไดไฮดรอกซีอะซิโตนร้อยละ 75.5 ทั้งนี้กลีเซอรอลถือเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญทั้งในด้านการเจริญเติบโตและการผลิต DHA โดยภายใน *G. oxydans* มีเอนไซม์ที่จำเพาะต่อกลีเซอรอลเพื่อผลิต DHA ได้โดยตรง ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งของการเลือกใช้กลีเซอรอล

ตารางที่ 2.8 งานวิจัยของแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *G. oxydans*

อิทธิพล	ช่วงในการทดลอง	ช่วงที่เหมาะสม	อ้างอิง
ความเข้มข้น	20 - 200	20 - 100	(Yu-Peng et al., 2013)
กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	5-15	5-15	(Zhong-Ce et al., 2011)
		25	(Hu et al., 2010)
ความเข้มข้นไดไฮ- ดรอกซีอะซิโตน (กรัม/ลิตร)	0 - 100	67	(Bauer et al., 2005; Claret et al., 1993)
ชนิดแหล่งคาร์บอน	แมนนิทอล กลีเซอรอล กลูโคส กาแลกโตส มอลโตส ฟรุคโตรส	กลีเซอรอล	(Hu et al., 2010)

## 2.4.2 อิทธิพลแหล่งไนโตรเจน

ในกระบวนการหมักของ *G. oxydans* ส่วนใหญ่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของสารสกัดยีสต์ ดี-ซอพิทอลและอื่นๆ ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่ที่ใช้ คือ สารสกัดยีสต์และเปปไทน์ แต่กลับมีราคาต้นทุนที่สูง ดังแสดงตารางที่ 2.9 จึงเป็นสาเหตุในการค้นคว้าหาแหล่งไนโตรเจนที่ได้มาจากอุตสาหกรรมเกษตร เพื่อลดต้นทุนการผลิต ยกตัวอย่างแหล่งไนโตรเจนจากงานวิจัยนี้ เช่น

ตารางที่ 2.9 ราคาแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน	ราคา (บาท)/กิโลกรัม	อ้างอิง
Yeast extract	3840	บริษัท ซีที เคมีคอล จำกัด
Peptone	3600	บริษัท ซีที เคมีคอล จำกัด
Corn steep liquid	18	บริษัท เฟรนด์ชิพ คอร์น สตาร์ช จำกัด
กากผงชูรส	330	บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ (ประเทศไทย) จำกัด
กากถั่วเหลือง	9	เกษตรกร จังหวัด สุพรรณบุรี

### เปลือกถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นธัญพืชชนิดหนึ่งมีส่วนประกอบหลักคือโปรตีน เปลือกถั่วเหลืองที่ได้จากการบดละเอียดนำมาใช้ในการทดลองสามารถให้โปรตีนด้วยการปฏิกิริยาย่อยสลาย (Hydrolysis) ภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสม ทั้งนี้ส่วนที่ได้จากปฏิกิริยาย่อยสลายสามารถนำมาเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อได้เมื่อปรับความเป็นสภาวะพีเอชที่เหมาะสมกับเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ทั้งนี้ข้อสนใจหนึ่งจากการปฏิกิริยาย่อยสลายสามารถนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อกับฟังไจ (fungi) และแบคทีเรียได้ นอกจากนี้การปฏิกิริยา

ย่อยสลายนอกจากมีองค์ประกอบของไนโตรเจนแล้วยังมีประกอบของคาร์โบไฮเดรตด้วยเช่นกัน จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของถั่วเหลืองดังตารางที่ 2.10

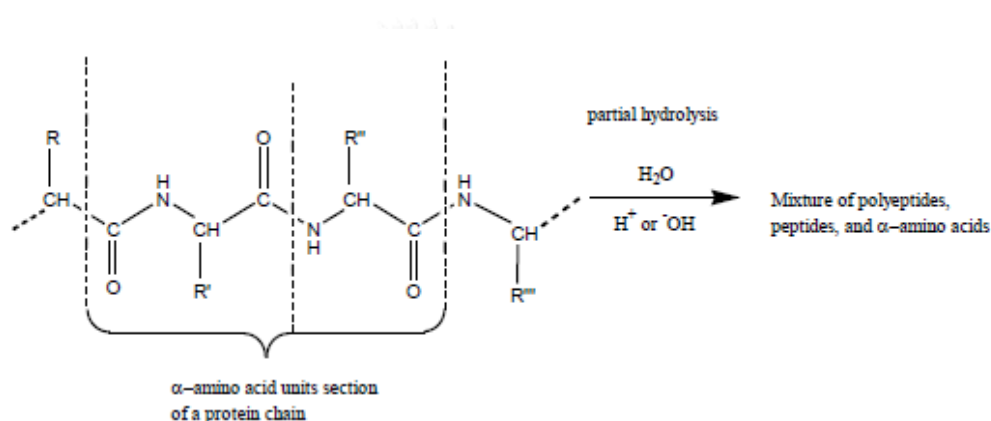
ตารางที่ 2.10 องค์ประกอบถั่วเหลืองจากการปฏิบัติการย่อยสลาย (Mohammed et al., 2009)

ผลการวิเคราะห์(กรัม/กรัม)	ผลการวิเคราะห์
ความชื้น (%)	4.1 - 5.8
เถ้า (%)	7.8 - 13.5
อะมิโน ไนโตรเจน (%)	3.1 - 2.3
ผลรวมไนโตรเจน (%)	10.2 - 9.1
สัดส่วนอะมิโนไนโตรเจนต่อผลรวมไนโตรเจน (%)	30 - 25
พีเอชของ 2 %สารละลาย (หลังการต้มนิ่ง)	7 - 7.2
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (%)	0.8 - 0.4

เปปโตนเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนเตรียมได้จากการใช้เอนไซม์หรือกรดในการย่อยสลายเพื่อให้โปรตีนจากพืชพันธุ์ต่างๆ ยกตัวอย่างเช่น พอลิเปปทอยด์ (polypeptides) ไดเปปทอยด์ (dipeptides) และกรดอะมิโน (amino acids) เป็นต้น โดยการย่อยโปรตีนของแต่ละแหล่งธัญพืชมีความแตกต่างกันและโปรตีนที่ถูกการย่อยสลายมีคุณสมบัติต้องละลายในน้ำได้และไม่สลายตัวเมื่อถูกความร้อน ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เป็นปัจจัยหลักนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เปปโตนแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท meat peptone (เปปโตนสกัดสังเคราะห์จากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เช่น ทริปโตน) เปปโตนจากธัญพืช (ถั่วเหลือง) และ เครซีน จากการสกัดจากนม (Bridson, 1995)

ปฏิบัติการย่อยสลายของโปรตีนเป็นการหยุดหรือตัดการทำปฏิกิริยาก่อตัวระหว่างของกรดอะมิโนและเปปโตน โดยใช้พีเอชความเข้มข้นสูงหรือเอนไซม์ ทั้งนี้ปฏิบัติการย่อยสลายด้วยกรดหรือด่างความเข้มข้นสูงเป็นวิธีการที่ไม่จำเพาะซึ่งกรดและด่างจะทำลายพันธะเปปไทด์ โดยทำการย่อยโปรตีนและสายเปปไทด์ให้เป็นสายพันธะที่สั้นลงจนกระทั่งเป็นกรดอะมิโน มีความเหมาะสมในการย่อยธัญพืช

และสัตว์ สามารถใช้ในการแต่งกลิ่นรสชาติ,ใช้ทอผ้าและมีความสามารถในการละลาย นอกจากนี้ ข้อดีของการใช้กรดหรือด่างจะไม่ทำลายอะมิโนทั้งหมดในระหว่างกระบวนการย่อยแต่จะถูกทำลายเพียงบางส่วนเท่านั้น เช่น ทริปโทฟาน (tryptophan) เคซีน เซซีนและโทโรมิน (threonine) เป็นต้น แต่พบว่าระยะเวลาในการย่อยสลายนานจะส่งผลให้ส่วนประกอบต่างๆถูกทำลายเป็นผลของพิษที่เรียกว่า ฮิวมิน ซึ่งเป็นสารดังกล่าวส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Friedman, 1985 : Hauowitz, 1970) โดยส่วนหนึ่งของการย่อยสลายของโปรตีนด้วยกรดหรือเบสจะได้ทั้งแอลฟาอะมิโน ( $\alpha$ -amino) เปปไทด์ (peptides) และโพลิเปปไทด์ (polypeptides) ซึ่งจะแสดงในรูปแบบที่ 2.5 ข้างล่างนี้



รูปที่ 2.3 ปฏิกริยาย่อยสลายของโปรตีนด้วยกรดหรือด่าง (Mohammed et al., 2009)

น้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor)

น้ำแช่ข้าวโพดเป็นของเสียจากกระบวนการบดแบบเปียกหรือกระบวนการแยกแป้ง จมูกข้าวโพด เส้นใยและกลูเตน เพื่อนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล แป้งข้าวโพด น้ำมันข้าวโพดและอาหารสัตว์ เป็นต้น ขั้นตอนการแช่ข้าวโพดในน้ำก่อนที่จะนำไปบดและทำการแยกส่วนต่างๆมีจุดประสงค์การนำไปใช้ประโยชน์ต่างกัน

โดยน้ำหมักแช่ข้าวโพดคือส่วนสุดท้ายของกระบวนการบดเปียกเพื่อนำไปใช้ในการผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงต่อไป และน้ำส่วนผลพลอยได้หรือส่วนที่เหลือให้นำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับสภาวะที่

เหมาะสมและเป็นแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ ทั้งนี้องค์ประกอบน้ำแช่ข้าวโพดแสดงดังตารางที่ 2.11

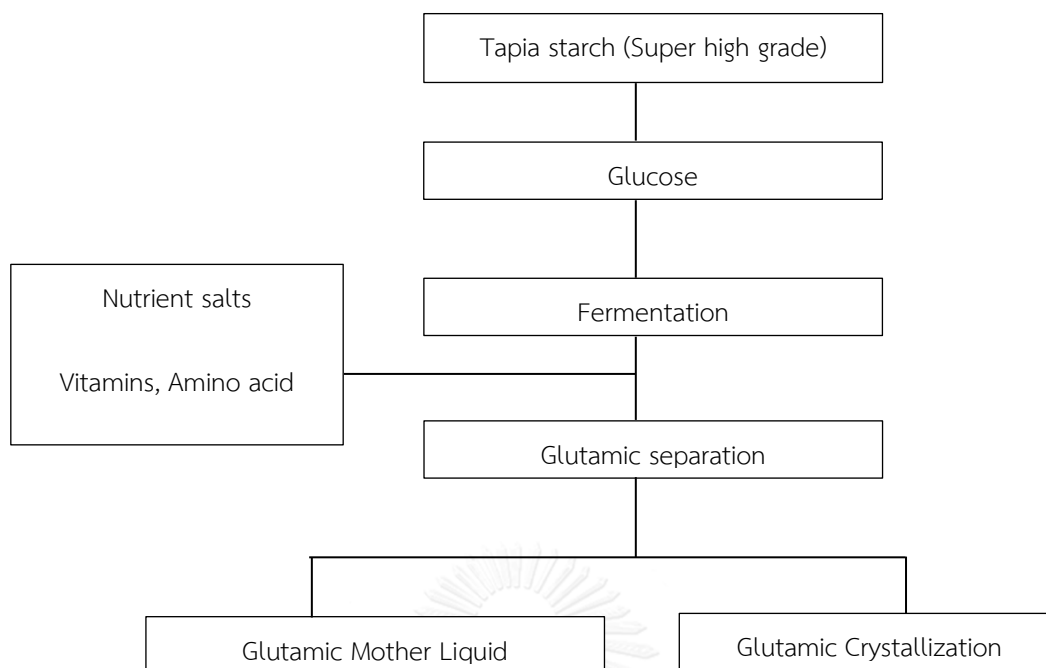
**ตารางที่ 2.11** องค์ประกอบของน้ำแช่ข้าวโพด (CSL) (Berger, 2014)

ตัวอย่าง	ไนโตรเจน%	คาร์บอน%	ไฮโดรเจน%
Corn Steep Liquor (CSL)	6.49	37.77	6.74

### กากผงชูรส

กากผงชูรส (Glutamic mother liquor) คือผลิตภัณฑ์พลอยได้มาจากอุตสาหกรรมทำผงชูรส ในประเทศไทยส่วนใหญ่ทำมาจากแป้งมันสำปะหลังมาหมักด้วยจุลินทรีย์แล้วจึงแยกส่วนหลักไปทำผงชูรส ส่วนของเหลวที่เหลือทำให้เข้มข้นเรียกส่วนนี้ว่ากากผงชูรส

กากผงชูรสมีลักษณะเป็นของเหลวข้นสีน้ำตาลประกอบด้วยโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนั้นเป็นองค์ประกอบอื่น เช่น แร่ธาตุวิตามินและกรดอะมิโนโดยเฉพาะกรดอะมิโนกลูตามิกบางส่วน ในกากผงชูรสประกอบด้วย โปรตีนร้อยละ 24 - 45 แร่ธาตุวิตามินและกรดอะมิโน เช่น ร้อยละ 0.65 ของมีไลซีน ร้อยละ 0.24 ของเมทไทโอนีน ของน้ำหนักรวม จากรูปที่ 2.4 แสดงการเกิดกากผงชูรสจากกระบวนการผลิตผงชูรส



รูปที่ 2 4 แผนผังกระบวนการเกิด Glutamic Mother Liquid (GML)

เป็นที่ทราบกันว่าแหล่งไนโตรเจนเป็นส่วนสำคัญในการเจริญเติบโตของ *G. oxydans* (Wethmar, 1999) จากงานวิจัยต่างๆ ได้ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่หลากหลาย จากงานวิจัยของ Liu et al., 2013 ศึกษาอิทธิพลชนิดแหล่งไนโตรเจนระหว่างอินทรีย์และอนินทรีย์ ทำการเปรียบเทียบกับสารสกัดยีสต์ (15 กรัม/ลิตร) ระดับการหมักขวดรูปชมพู่ แหล่งไนโตรเจนประกอบด้วย คาบาามิน 2.9 แอมโมเนียมซัลเฟต 6.3 โพแทสเซียมไนเตรต 9.6 เปปโตน 12 น้ำแช่ข้าวโพด 24 และสารสกัดยีสต์ 15 กรัม/ลิตร ตามลำดับ พบว่า แหล่งไนโตรเจนชนิดอนินทรีย์ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่ากวนน้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ผลิต DHA สูงสุด ในส่วนงานวิจัยของ Hu et al., (2009) ได้ศึกษาอิทธิพลแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิต DHA ของ *G. oxydans* ZJB-065 กำหนดให้ เปปโตน สารสกัดยีสต์ สารสกัดยีสต์ น้ำแช่ข้าวโพด แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟตและ แอมโมเนียมไนเตรต เป็นแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและประกอบไปด้วยกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 0.5 โพแทสเซียมไดฟอสเฟต 0.5 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.5 และแคลเซียมคาบอเนต 2 กรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยกำหนดแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิด 5 กรัม/ลิตร แมนนิทอล 22.5 กรัม/ลิตร กลีเซอรอล 2.5 กรัม/ลิตร ความเข้มข้นเท่ากับ 5 พบว่า สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ความเข้มข้นของ DHA สูงสุด เท่ากับ 34.1 กรัม/ลิตร แต่ความเข้มข้น DHA ไม่ต่างจากแหล่งไนโตรเจนเปปโตนและน้ำแช่ข้าวโพด จากงานวิจัยของ Shengua Wei., (2007) ได้ศึกษาเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนเพื่อลดต้นทุนอาหารเลี้ยง

เชื้อด้วยการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็น DHA ใช้เซลล์ที่ตรึงบน PVA ทำการเปรียบเทียบระหว่าง 2 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ระหว่าง สูตรที่ 1 ซอลบิทอลและสารสกัดยีสต์ พบว่าให้ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 4 กรัม/ลิตร, เอนไซม์กลีเซอรอลไดไฮโดรจีเนสเท่ากับ 5.35 U/ml และเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนที่จะนำทดแทนเพื่อลดต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลรีดิคซ์ที่ได้จากการย่อยข้าวโพดด้วยเอนไซม์และน้ำแช่ข้าวโพดคือ สูตรที่ 2 พบว่ามวลเซลล์ 4.22 กรัม/ลิตร กลีเซอรอลไดไฮโดรจีเนส 5.23 U/ml ซึ่งพบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเพื่อลดต้นทุนจะให้ผลลัพธ์หรือความเข้มข้นของไดไฮดรอกซีอะซิโตนใกล้เคียงกับแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนเดิม แต่จะสามารถลดต้นทุนได้ร้อยละ 15 ด้วยเหตุผลที่หลากหลายการเลือกแหล่งไนโตรเจนการเลือกแหล่งไนโตรเจนได้ได้จากของเสียของอุตสาหกรรมเกษตรในประเทศไทยจึงเป็นผลดีต่อการเพิ่มมูลค่าของของเสียและลดปริมาณของเสียโดยไม่ก่อให้เกิดประโยชน์ นอกจากนี้อิทธิพลต่างๆของแหล่งไนโตรเจนและปัจจัยต่างๆดังแสดงในตารางที่ 2.12 และ 2.13

**ตารางที่ 2.12** อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยง *G. oxydans* ต่อการผลิต DHA

อิทธิพล	ช่วงในการทดลอง	ช่วงที่เหมาะสม	อ้างอิง
	คาบามิน แอมโมเนีย โปแทสเซียม เปปไทน์ น้ำแช่ข้าวโพด สารสกัดบีฟ	น้ำแช่ข้าวโพด	(Yu-Peng et al., 2013)
ชนิดแหล่งไนโตรเจน	เปปไทน์ สารสกัดยีสต์ สารสกัดบีฟ น้ำแช่ข้าวโพด แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต	สารสกัดยีสต์ เปปไทน์ น้ำแช่ข้าวโพด	(Hu et al., 2010)
	เปรียบเทียบระหว่างซอลบิทอลและสารสกัดยีสต์กับน้ำตาลที่ย่อยจากข้าวโพดและน้ำแช่ข้าวโพด	น้ำตาลรีดิคซ์และน้ำแช่จากข้าวโพด	(Shenghua et al., 2006)



### 2.4.3 อธิพิพลอื่นๆ

นอกเหนือจากอิทธิพลของแหล่งอาหารแล้ว สภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีความสำคัญ ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิต DHA ได้เช่นกัน เห็นได้จากงานวิจัยต่างๆดัง ตารางที่ 2.13

ตารางที่ 2.13 อิทธิพลอื่นๆในการเพาะเลี้ยง *G. oxydans* ต่อการผลิต DHA

อิทธิพล	ช่วงในการทดลอง	ช่วงที่เหมาะสม	อ้างอิง
พีเอช	-	4.9	(Zhong-Ce et al., 2011)
	4-7	5	(Hu et al., 2010)
	4-5.5	5	(Liu et al., 2008)
	-	6	(Shenghua et al., 2006)
ปริมาณเซลล์	4-12	10	(Hu et al., 2010)
การตรึงเซลล์	เปรียบเทียบตรึงเซลล์บนโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVC) กับเซลล์อิสระ	ตรึงเซลล์บนโพลีไวนิลแอลกอฮอล์	(Adlercreutz et al., 1985)
	เปรียบเทียบตรึงเซลล์บนแคลเซียมแอลจีเนต กับเซลล์อิสระ	ตรึงเซลล์บนแคลเซียมแอลจีเนต	(Wei et al., 2006)
	เปรียบเทียบตรึงเซลล์บนโพลีไวนิลแบบแคปซูล กับเซลล์อิสระ	ตรึงเซลล์บนโพลีไวนิลแบบแคปซูล	(Tramper et al., 1983)

## 2.5 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีหลากหลายประเภทยกตัวอย่างเช่น ถังปฏิกรณ์แบบเขย่า (Shaking bioreactor) แพ็คเบด (Packed-bed bioreactor) ฟองอากาศ (Bubble column bioreactor) ไหวเวียนภายในและภายนอก (external/internal-loop airlift bioreactor) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน (Stirred tank bioreactor: STR) เป็นถังปฏิกรณ์ที่มักใช้กระบวนการหมักอย่างกว้างขวางทั้งในงานวิจัยและอุตสาหกรรม (Charles. & Marvin., 1985) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ STR มีข้อดีหลายประการขึ้นอยู่กับรูปแบบการใช้งาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเหมาะแก่ผลิตภัณฑ์ที่ใช้งานกับธรรมชาติและมนุษย์ หรือสภาวะที่ต้องการออกซิเจนสูง (Nienow, 1990) อาศัยหลักการกลศาสตร์ในกระบวนการและการใช้พลังงานต่อกระบวนการสูง ปัญหาที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการถ่ายเทมวลและความร้อนเมื่อขยายกระบวนการผลิต โดยเฉพาะกระบวนการที่เกิดจากความหนืดสูงเมื่อเซลล์หนาแน่นส่งผลเสียต่อค่าใช้จ่ายในกระบวนการกวนและการป้อนอากาศเข้าสู่ระบบมากขึ้น ส่งผลต่อค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นร้อยละ 20 ของกระบวนการผลิต จึงเป็นหนึ่งในเหตุผลของการพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อการลดพลังงานดำเนินการ (Nienow, 1990) ด้วยการออกแบบและพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ดังนั้น การนำถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกเพื่อใช้ทดแทนถังปฏิกรณ์แบบกวนเนื่องจาก ควบคุมทางกลน้อยกว่าลดการใช้พลังงาน, หลีกเลี่ยงใช้งานทางกลในการปั่นกวน ต้นทุนในกระบวนการต่ำ นอกจากนี้ถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกให้อัตราการถ่ายเทออกซิเจนมากกว่าถังกวน และแรงเฉือนต่อระบบต่ำกว่า ทั้งนี้จุดเริ่มต้นของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่สามารถถ่ายเทออกซิเจนได้สูงคือ ถังปฏิกรณ์แบบฟองอากาศ (Bubble column) เป็นถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในระบบทางวิศวกรรมชีวเคมีด้วยโครงสร้างไม่ซับซ้อนรวมถึงการเกิดแรงเฉือนที่ต่ำประกอบด้วยใช้พลังงานน้อย เพิ่มการหมุนวนของของเหลวภายในระบบ จึงเป็นด้วยเหตุผลข้างต้นจึงมีการคิดค้นถังปฏิกรณ์อากาศยกรูปแบบต่างๆ ยกตัวอย่างเช่น รูปแบบท่อกวาง แผ่นกั้น เป็นต้น ได้รับการพัฒนามาจากถังปฏิกรณ์แบบฟองอากาศ โดยอาศัยหลักการหมุนเวียนภายในของของเหลวเกิดจากแรงดันที่เกิดจากเส้นทางต่างกันระหว่างของเหลวในทิศทางน้ำขาขึ้นและลง แม้ว่าถังปฏิกรณ์แบบอากาศหมุนวนจะมีข้อดีในด้านการถ่ายเทมวล แต่ยังคงประสิทธิภาพน้อยกว่าถังปฏิกรณ์แบบฟองอากาศ (Bubble column) ดังนั้น จึงมีการพัฒนาและปรับปรุงถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกโดยเฉพาะกับกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ถือว่าการถ่ายเทอากาศเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็น ในกรณีที่เซลล์ต้องอาศัยอากาศในการสร้างพลังงาน (Aerobic fermentation) โดยสภาวะที่มีผลต่อการถ่ายเทอากาศภายในระบบยกตัวอย่างได้เช่น อัตราส่วนพื้นที่อากาศขึ้นและลง อัตราการป้อนอากาศ รูปแบบและลักษณะของถังปฏิกรณ์และขนาดฟองอากาศและจำนวนฟองอากาศ เป็นต้น

ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อการถ่ายเทมวลและออกซิเจนภายในระบบ นอกจากนี้ได้มีงานวิจัยหลากหลาย ศึกษาสภาวะต่างๆในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ยกตัวอย่าง

งานวิจัยเปรียบเทียบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกและแบบฟองอากาศของ Ostergaard., (1966) จากการศึกษาถังปฏิกรณ์แบบอากาศยก 4 ท่อกลวงในการเพาะเลี้ยง Baker's yeast พบว่าจำนวนฟองอากาศในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกมากขึ้น 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับถังปฏิกรณ์แบบฟองอากาศ รวมถึงสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลเพิ่มขึ้นในผลลัพธ์เดียวกับข้างต้น นอกจากนี้งานวิจัยของ Kim et al., 1977 พบว่าการถ่ายเทอากาศถือเป็นส่วนสำคัญเป็นอย่างมากต่อระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพในกระบวนการหมักที่มีจุลินทรีย์ที่จะต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตและการผลิตผลิตภัณฑ์ สัมประสิทธิ์ปริมาณการการถ่ายเทมวล ( $k_L$ ) คือ ตัวแปรที่ใช้ในการตรวจวัดประสิทธิภาพของการถ่ายเทของออกซิเจน ทั้งนี้ค่าของ  $k_L$  ขึ้นอยู่กับพื้นที่สัมผัสของฟองอากาศ ลักษณะทางกายภาพของของเหลว ขนาดฟองอากาศและจำนวนฟองอากาศภายในถังปฏิกรณ์ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพของการถ่ายเทของมวล

งานวิจัยของ Kim et al., (1977) ศึกษาการลักษณะฟองอากาศและการถ่ายเทมวลในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางท่อกลวง กำหนดถังปฏิกรณ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 29 เซนติเมตร และความสูง 300 เซนติเมตร 4 ท่อกลวง ตรวจวัดลักษณะของขนาดฟองอากาศ จำนวนฟองอากาศอากาศภายในระบบ (Gas holdup) สัมประสิทธิ์ปริมาณการถ่ายเทมวล ภายใต้อัตราการป้อนอากาศที่ต่างกัน พบว่า อัตราการป้อนอากาศไม่มีผลต่อขนาดของฟองอากาศ แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบรูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่า ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยก (Airlift reactor) มีอากาศภายในระบบและสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมากกว่าถังปฏิกรณ์แบบฟองอากาศ (Bubble column) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกหมุนวนภายในมีประสิทธิภาพที่สูงกว่า

จากงานวิจัยของ Tung et al., 2000 ทำการเปรียบเทียบระหว่างถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟองอากาศ (Bubble column) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยก (Airlift reactor) พบว่าขนาดฟองอากาศเฉลี่ยของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกขนาดเล็กกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟองอากาศภายใต้ความเร็วการป้อนอากาศ ( $U_{sg}$ ) เดียวกัน นอกจากนี้จำนวนฟองอากาศเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการป้อนอากาศขึ้นในทั้งสองถังปฏิกรณ์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกจะให้จำนวนฟองอากาศที่มากกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟองอากาศภายใต้อัตราการป้อนอากาศเดียวกัน ทั้งนี้ท่อกลวงภายในหรือแผ่นกั้นของถังปฏิกรณ์อากาศยกมีผลต่อการเพิ่มของจำนวนฟองอากาศ และปริมาณก๊าซภายในระบบ (Gas holdup) มีความเชื่อมโยงกับอัตราการป้อนอากาศ จากการทดลองพบว่า การเพิ่มอัตรา

การป้อนอากาศส่งผลให้ปริมาณก๊าซภายในถังปฏิกรณ์เพิ่มขึ้นทั้งถังปฏิกรณ์ แต่รูปแบบที่ตกลงภายในให้ปริมาณก๊าซภายในถังมากกว่าถังปฏิกรณ์แบบฟองอากาศ ถึงร้อยละ 67 ในส่วนของสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล (Volumetric mass transfer coefficient) พบว่า สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลขึ้นอยู่กับอัตราการป้อนอากาศทั้งในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกและฟองอากาศ แต่สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกมากกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพฟองอากาศภายใต้อัตราการป้อนอากาศเดียวกัน เนื่องจากจำนวนฟองอากาศภายในระบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกมากกว่าแบบฟองอากาศ

ทั้งนี้หลากหลายงานวิจัยสนับสนุนการใช้ถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกเห็นได้ชัดเจนงานวิจัยของ Zhong-Ce et al., 2011 พบว่า ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกระบบภายในเคลื่อนที่โดยอาศัยสัดส่วนพื้นที่ป้อนอากาศและไม่ป้อนอากาศ ( $Ar/Ad$ ) ภายในถังปฏิกรณ์ เมื่อฟองอากาศเคลื่อนที่สัมผัสระหว่างของเหลวจะก่อให้เกิดความแตกต่างของความดันทำของเหลวเกิดการเคลื่อนที่และหมุนวน ข้อดีของการใช้ถังปฏิกรณ์ชนิดนี้ ยกตัวอย่างเช่น การถ่ายเทมวลและความร้อนได้สูง ผลของแรงเฉือนที่ต่ำ ใช้พลังงานที่ต่ำ การควบคุมที่น้อย และต้นทุนในการควบคุมน้อย ยกตัวอย่างการประยุกต์ใช้ลักษณะการทำงานของถังปฏิกรณ์ชนิดนี้ เช่น กระบวนการหมัก ปฏิกริยาชีวภาพ และการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ (Kang et al., 2000; Klein et al., 2002; Sikula et al., 2007; Zheng et al., 2005, 2001)

ปัจจัยของอัตราการป้อนอากาศต่อการผลิต DHA ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ (Maryam. et al., 2003) ศึกษาผลของอัตราการป้อนอากาศ พบว่า เซลล์และ COD สูงสุดเมื่ออัตราการป้อนอากาศเท่ากับ 7.5 ถึง 8 vvm และเริ่มลดลงเมื่อเพิ่มอัตราการป้อนอากาศตามลำดับ โดยระยะเริ่มต้นเซลล์เกิดการเจริญเติบโตจนกระทั่งก่อนเกิดการไหลแบบ Churn – turbulent ทำให้เซลล์และ COD ลดลง ซึ่งก่อให้เกิดแรงเฉือนเพิ่มขึ้นและเกิดการเติมสารป้องกันโฟมมากขึ้น เนื่องจากผลจากสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลมีค่าลดลง

ในส่วนของถังปฏิกรณ์อากาศยกชนิดแบบแผ่นกั้นในงานวิจัยเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเป็นแนวทางการประยุกต์ใช้ในการผลิต DHA ในงานวิจัยของ Issarapayup et al. (2009) ศึกษาประสิทธิภาพของถังปฏิกรณ์อากาศยกแบบแผ่นกั้น ด้วยกำหนดปัจจัยอัตราการป้อนอากาศ อยู่ในช่วง 0.2 0.4 และ 0.8 เซนติเมตร/วินาที พบว่า อัตราการป้อนอากาศ เท่ากับ 0.4 เซนติเมตร/วินาที ส่งผลให้ความหนาแน่นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์สูงสุด ซึ่งแม้ว่าการเพิ่มอัตราการป้อนอากาศสูงขึ้นจะเพิ่มการถ่ายเทมวลและสัมประสิทธิ์ออกซิเจนของเซลล์มากขึ้นแต่ส่งผลให้การเจริญเติบโตเนื่องจากแรงเฉือน

ของระบบที่เพิ่มขึ้นเมื่ออัตราการป้อนอากาศสูงขึ้น (Gudin & Chaumont, 1991; Hata et al., 2001)

สำหรับการออกแบบการฟุ้งที่ป้อนอากาศ ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัย (Issarapayup et al., 2009) ศึกษาประสิทธิภาพของถังปฏิกรณ์อากาศยกแบบแผ่นกั้น โดยศึกษาทิศทางการไหลเวียนของอาหารเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ ( $Ar/Ad$ ) พบว่าเป็นวิธีการหนึ่งในระบบที่มีการไหลของทิศทางการไหลของเหลวในทิศทางขึ้นและลงกำหนดทิศทางการไหลผ่านพื้นที่แผ่นกั้นในถังลักษณะสี่เหลี่ยมพื้นผิววางขวางในทิศทางตามความยาวของถังปฏิกรณ์และกำหนดสัดส่วนของพื้นที่หน้าตัด ( $Ar/Ad$ ) เท่ากับ 0.4 ถึง 3 เมื่อทำการเปรียบเทียบกับถังปฏิกรณ์แบบพ่นอากาศในปริมาตรเท่ากับ 17 ลิตร กำหนดอัตราการป้อนอากาศ 0.4 เซนติเมตร/วินาที เช่นเดียวงานวิจัยของ Kaewpintong et al (2006) จากการศึกษาพบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ เท่ากับ  $4.1 \times 10^5$  เซลล์/มิลลิลิตรและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ  $0.52 \text{ วัน}^{-1}$  ในถังปฏิกรณ์อากาศยกแบบแผ่นกั้นที่สัดส่วน ( $Ar/Ad$ ) เท่ากับ 0.4 และมีค่าความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะลดลง เมื่อ ( $Ar/Ad$ ) เพิ่มขึ้น และพบว่า ถังปฏิกรณ์แบบพ่นอากาศ (ตัวแปรควบคุม) มีค่าความหนาแน่นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะน้อยที่สุด ค่า ( $Ar/Ad$ ) ที่น้อยที่สุด เท่ากับ 0.4 แสดงให้เห็นว่า ฟุ้งป้อนอากาศ ( $Ad$ ) น้อยทำให้ความเร็วในทิศทางขึ้นของระบบมากขึ้นส่งผลให้เซลล์เกิดการเคลื่อนที่และสัมผัสกับอากาศได้ดี ดังนั้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีเมื่อสัดส่วนพื้นที่ที่ทิศน้ำลงต่อทิศน้ำขึ้นน้อยที่สุด

สำหรับสัดส่วนการออกแบบถังปฏิกรณ์มีผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์พบในงานวิจัยของ Maryam. et al., (2003) ทำการศึกษาถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นอากาศ (Bubble column) การออกแบบขนาด  $L/D$  ความสูงต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของถังปฏิกรณ์ มีผลต่อค่าใช้จ่าย คุณสมบัติไฮโดรไดนามิก อัตราการเกิดปฏิกิริยา ปริมาตรถังปฏิกรณ์ที่ใช้ ความเข้มข้นของเซลล์และ COD ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นอากาศ โดยกำหนดอัตราการป้อนอากาศที่แตกต่างกันและความสูงที่แตกต่างกัน พบว่า  $L/D$  เพิ่มขึ้นจะลด gas hold ที่อัตราการป้อนอากาศ 4.5 vvm เซลล์เพิ่มขึ้นร้อยละ 28 และเมื่อเพิ่ม  $L/D$  จาก 2.5 เป็น 4.7 ที่อัตราการป้อนอากาศ 7.5 vvm พบว่า เซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเพิ่มความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทั่วไป การเพิ่ม  $L/D$  จะทำให้ Gas Holdup ลดลง มีผลให้การลดสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลเช่นกัน โดยการเพิ่มความเร็วก๊าซเป็นผลดีของ gas holdup และสัมประสิทธิ์การถ่ายเท มีผลให้เซลล์ในแง่การผลิตผลิตภัณฑ์และการถ่ายเทมวล ทั้งนี้สภาวะถังปฏิกรณ์ชีวภาพต่างๆสรุปได้ดังตารางที่ 2.14

ตารางที่ 2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิต DHA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ

Reactor	Condition	Reference
Stirred tank	<i>G. oxydans</i> DSM 2003 1.5 vvm 30 C 30 h 600 rpm Batch	Wei (2007a)
	<i>Pichia</i> ZJB 0009 0.8 vvm 29.6 C 48.8 h 300 rpm Batch	Liu et al., (2008)
	<i>G. frateurii</i> CGMCC 5397 1.5 vvm 30 C 48 h 350 rpm Fed Batch	Yu-Peng, (2013)
Airlift	<i>G. oxydans</i> DSM 2003 1.5 vvm 30 C 30 h 600 rpm Batch	Wei (2007a )
	<i>G. oxydans</i> ZJB09113 1.5 vvm 30 C 72 h Inter loop	Hu et al., (2011)
	<i>G. oxydans</i> ZJB09112 0.5 – 2.5 vvm 30 C 72 h Bubble column	Hu et al., (2010)

### บทที่ 3

#### วิธีการทดลองและการวิเคราะห์

##### 3.1 จุลินทรีย์และการเตรียมหัวเชื้อ

*Gluconobacter oxydans* PHD-59 ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หัวเชื้อบรรจุในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง คือ กลีเซอรอล 20 กรัม/ลิตร เปปโทน 10 กรัม/ลิตร กลูโคส 5 กรัม/ลิตร สารสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิลิตร/ลิตร และผงวุ้น 20 กรัม/ลิตร (Kommanee et al., 2010) จากนั้นถ่ายหัวเชื้อสู่อาหารเหลวปริมาณ 30 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีองค์ประกอบเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแต่ไม่มีผงวุ้น อาหารเลี้ยงเชื้อได้ผ่านการฆ่าเชื้อภายในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นในเครื่องเขย่า (115 รอบ/นาที) ที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

##### 3.2 การเตรียมของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร

การทดลองนี้ใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมการเกษตร ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด จากบริษัทเฟรนชิฟคอนสตีฟ จำกัด น้ำกากผงชูรส จากบริษัทอายโนะโมะโตะ (ประเทศไทย) จำกัด และเปลือกถั่วเหลืองซึ่งซื้อจากเกษตรกรจังหวัดสุพรรณบุรี นำน้ำแช่ข้าวโพดและน้ำกากผงชูรสมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกส่วนของเหลวใสด้านบนออกจากกากของแข็ง แล้วนำของเหลวใสไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในส่วนของการเตรียมน้ำย่อยกากถั่วเหลืองได้ดำเนินการตามวิธีการของ Al-Bahri et al (2009) เริ่มจากนำถั่วเหลืองไปแช่ในสารละลายกรด HCl (1 M) ในอัตราส่วนน้ำหนักของถั่วเหลืองต่อกรดเท่ากับ 1:6 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นกรองของแข็งออกจากของเหลว ปรับค่าพีเอชส่วนของเหลวให้เป็นกลางโดยเติม 2 M NaOH จากนั้นนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อคงคุณภาพ นำตัวอย่างของเหลวทั้ง 3 ชนิด ไปส่งวิเคราะห์เพื่อหาองค์ประกอบ CHN ที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่า ความเข้มข้นไนโตรเจนของน้ำแช่ข้าวโพด เท่ากับร้อยละ 4.28 น้ำกากผงชูรส เท่ากับร้อยละ 5.87 และน้ำย่อยเปลือกถั่วเหลือง เท่ากับ

ร้อยละ 3.2 โดยน้ำหนัก ซึ่งเทียบกับความเข้มข้นของไนโตรเจนในหน่วยกรัม/ลิตรเท่ากับ 42.8 58.7 และ 32 ตามลำดับ

### 3.3 ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหมาะสม

การทดลองในส่วนนี้ศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* เริ่มจากการเตรียมหัวเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากหัวข้อ 3.1 ถ่ายเชื้อสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 27 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อใช้ตามข้อมูลในงานวิจัยของ Kommanee (2010) กำหนดความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลในช่วงระหว่าง 20 ถึง 120 กรัม/ลิตร ควบคุมสภาวะการทดลองภายใต้ความเร็วรอบเหวี่ยง 115 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.5 โดยเติม 2 M NaOH ทำการเก็บตัวอย่างครั้งละ 1 มิลลิลิตร ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีน DHA และกลีเซอรอล

### 3.4 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนจากอุตสาหกรรมเกษตร

การทดลองในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเป็นไปได้ของการใช้แหล่งไนโตรเจนจากอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อทดแทนสารสกัดยีสต์และเปปโตน ทำการถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากหัวข้อ 3.1 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 27 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว กำหนดความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลจากผลการทดลอง ในหัวข้อ 3.3 ทำการควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และควบคุมค่าพีเอช เท่ากับ 4.5 ด้วย 2 M NaOH การทดลองประกอบด้วยชุดอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (C) ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนเป็นเปปโตนและสารสกัดยีสต์ ในส่วนชุดทดลองได้เติมแหล่งไนโตรเจนจากอุตสาหกรรมเกษตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยชุดควบคุม T1 เติมน้ำแช่ข้าวโพด ปริมาตร 1.44 มิลลิลิตร ชุดควบคุม T2 เติมน้ำกากผงชูรส ปริมาตร 1.48 มิลลิลิตร และชุดควบคุม T3 เติมน้ำย่อยเปลือกถั่วเหลือง ปริมาตร 1.92 มิลลิลิตร และกำหนดให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากับ 2.05 กรัม/ลิตร ในส่วนของชุดทดลอง T4 T5 และ T6 ใช้แหล่งไนโตรเจนจากอุตสาหกรรมเกษตรเหมือนกับชุดทดลอง T1 T2 และ T3 แต่ไม่มีการเติมกลีเซอรอล ตารางที่ 3.1 สรุปรายละเอียดของชุดควบคุมและชุดทดลอง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีน DHA และกลีเซอรอล



**ตารางที่ 3 1** รายละเอียดของชุดควบคุมและชุดทดลองในการศึกษาการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจากอุตสาหกรรมเกษตรสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *G. oxydans* เพื่อผลิต DHA

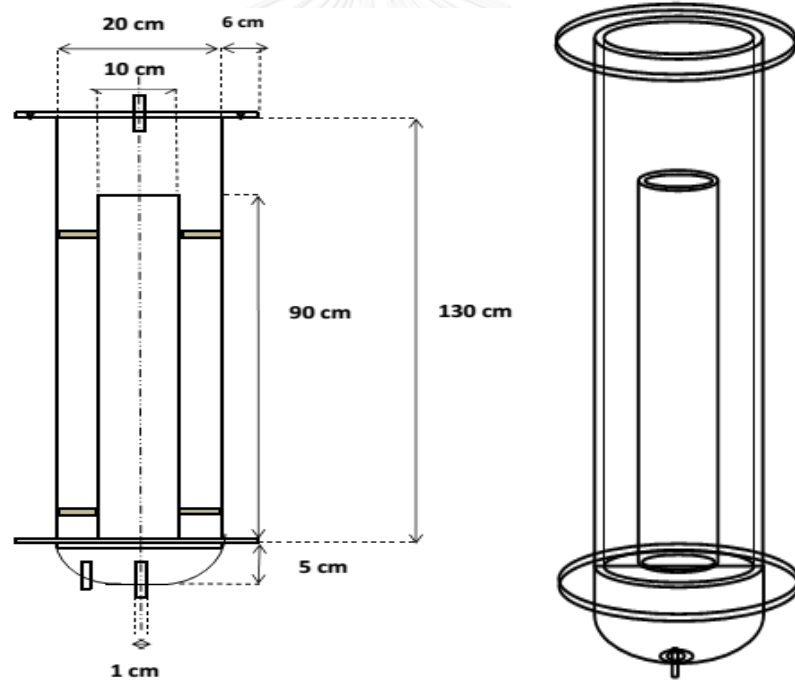
ชุดการทดลอง	องค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ		
	กลีเซอรอล	แหล่งไนโตรเจน	อื่นๆ
C	หัวข้อ 3.3	เปปโตน และ สารสกัดยีสต์	Kommanee (2010)
T1	หัวข้อ 3.3	น้ำแช่ข้าวโพด	Kommanee (2010)
T2	หัวข้อ 3.3	น้ำกากผงชูรส	Kommanee (2010)
T3	หัวข้อ 3.3	น้ำย่อยเปลือกถั่วเหลือง	Kommanee (2010)
T4	-	น้ำแช่ข้าวโพด	Kommanee (2010)
T5	-	น้ำกากผงชูรส	Kommanee (2010)
T6	-	น้ำย่อยเปลือกถั่วเหลือง	Kommanee (2010)

### 3.5 ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

หลังจากเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากการทดลองหัวข้อ 3.4 จึงทำการศึกษาหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต DHA สูงสุด ทำการถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากหัวข้อ 3.1 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 27 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว กำหนดความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลจากการทดลองในหัวข้อที่ 3.3 ทำการทดลองภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 ด้วย 2 M NaOH การทดลองประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชุดการทดลอง คือ T1 T2 T3 และ T4 ซึ่งมีความเข้มข้นของไนโตรเจนจากของเสียเท่ากับ 0.51 1.025 4.1 และ 8.2 กรัมไนโตรเจน/ลิตร ขณะที่ชุดควบคุมมีความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่า 2.05 กรัมไนโตรเจน/ลิตร ซึ่งเท่ากับความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีน DHA และกลีเซอรอล

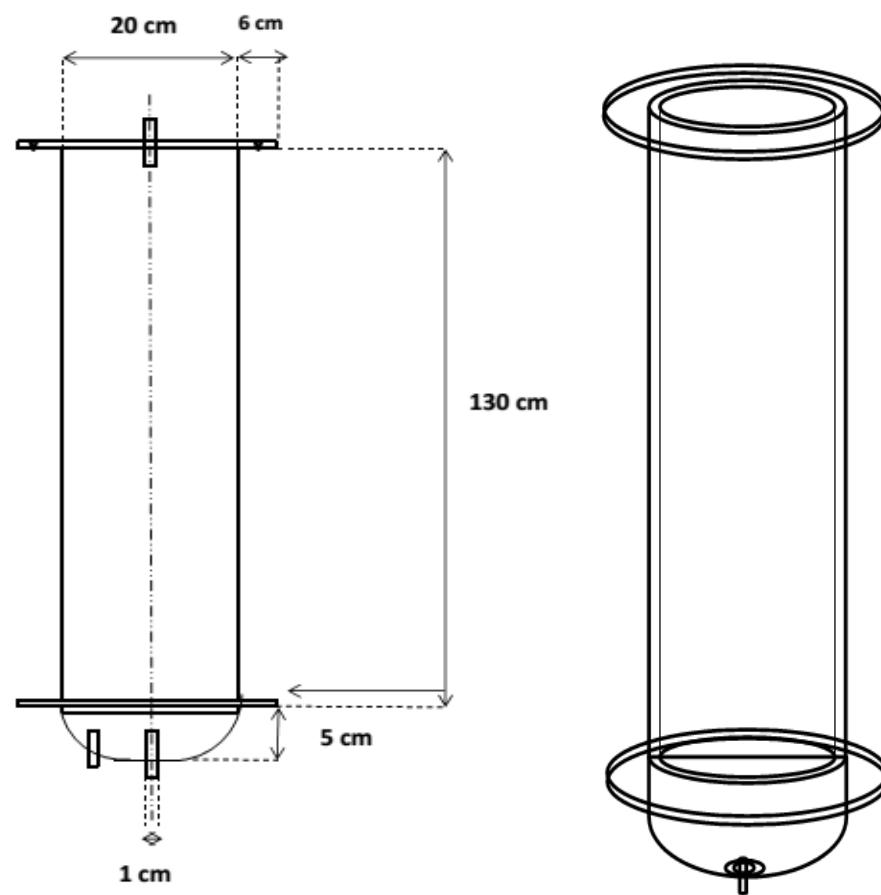
### 3.6 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกแบบหมุนวนภายใน (Internal-loop airlift bioreactor: IAB) มีลักษณะเป็นท่อกลางทรงกระบอกซ้อนกัน 2 ชั้น โดยทรงกระบอกด้านนอกมีเส้นผ่านศูนย์กลางด้านใน 20 เซนติเมตร ความหนา 0.5 เซนติเมตรและสูง 135 เซนติเมตร ขณะที่ทรงกระบอกด้านในมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ความหนา 0.5 เซนติเมตรและสูง 90 เซนติเมตร ถังปฏิกรณ์ทำจากอะคริลิกใสและมีปริมาตรใช้งาน 32 ลิตร ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วนคือ ส่วนให้อากาศ (Riser) และส่วนไม่ให้อากาศ (Downcomer) อากาศที่ป้อนเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะผ่านกระดาดทรงกรวยที่มีรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร และกระจายออกจากบริเวณส่วนฐานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยหัวทราย ภาพที่ 3.1 แสดงภาพจำลองของ IAB



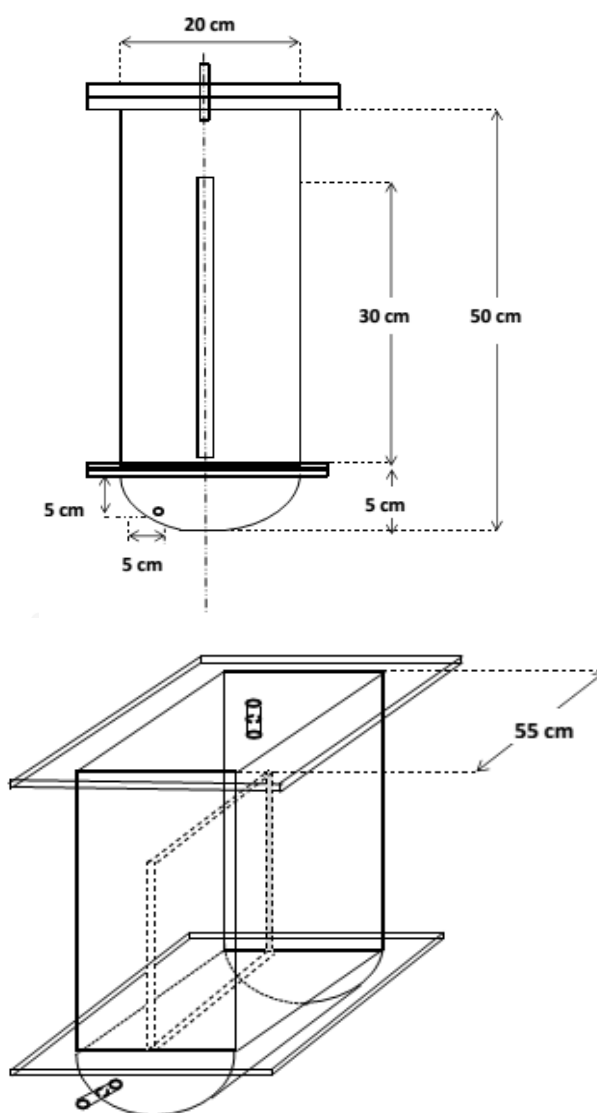
รูปที่ 3.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกแบบหมุนวนภายใน (Internal-loop airlift bioreactor: IAB) Ar/Ad เท่ากับ 1:1 (ไม่ตรงตามอัตราส่วน)

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟองอากาศ (Bubble column bioreactor: BC) สร้างจากอะคริลิกใส และมีปริมาตรใช้งาน 32 ลิตร BC มีเส้นผ่านศูนย์กลางด้านในของถังปฏิกรณ์ 20 เซนติเมตร ความหนา 0.5 เซนติเมตรและสูง 135 เซนติเมตร ทำการป้อนอากาศเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพผ่านตัวกรองฆ่าเชื้อขนาด 0.45 ไมโครเมตร และกระจายอากาศด้วยหัวทรายบริเวณส่วนฐานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ส่วนบนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพติดตั้งมอเตอร์และใบพัดทำลายโฟมที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ ภาพที่ 3.2 แสดงภาพจำลองของ BC



รูปที่ 3.2 ถังปฏิกรณ์แบบฟองอากาศ (Bubble column bioreactor: BC) (ไม่ตรงตามอัตราส่วน)

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกแบบแผ่นกั้น (Flat-panel airlift bioreactor: FAB) สร้างจากอะคริลิกใส ถังปฏิกรณ์ชีวภาพประกอบด้วยแผ่นอะคริลิกใส ความสูง 50 เซนติเมตร ความยาว 55 เซนติเมตร ความหนา 0.5 เซนติเมตร โดยความกว้างของถังปฏิกรณ์เท่ากับ 20 เซนติเมตร ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพกั้นด้วยแผ่นอะคริลิกสี่เหลี่ยมผืนผ้า ความสูง 30 เซนติเมตร ยาว 55 เซนติเมตร หนา 0.5 เซนติเมตร ส่วนฐานโค้งห่างจากแผ่นกั้น 5 เซนติเมตร ปริมาตรใช้งาน 32 ลิตร FAB แบ่งได้เป็นสองส่วนคือ ส่วนให้อากาศ (Riser) และส่วนไม่ให้อากาศ (Downcomer) ทำการกระจายอากาศด้วยหัวทรายที่มีลักษณะเป็นแถบยาวตามแนวความยาวของถังปฏิกรณ์ โดยอากาศจะผ่านกระดาศกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ภาพที่ 3.3 แสดงภาพจำลองของ FAB



รูปที่ 3.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกแบบแผ่นกั้น (Flat-panel airlift bioreactor: FAB)

Ar/Ad เท่ากับ 1:1 (ไม่ตรงตามอัตราส่วน)

### 3.7 การเลือกถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ในส่วนนี้จะทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้งานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ได้อธิบายในหัวข้อ 3.6 เริ่มจากเตรียมหัวเชื้อตามวิธีการในหัวข้อ 3.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ขนาด 4 ลิตร (ปริมาตรใช้งาน 3 ลิตร จำนวน 3 ใบ) และเพาะเลี้ยงเชื้อแบบกะ จากนั้นถ่ายของเหลวจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนลงใน IAB FAB และ BC อย่างละ 3 ลิตรต่อถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์ 10 กรัม/ลิตร จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร (ผลการทดลองจากส่วนที่ 3.3 3.4 และ 3.5) จนปริมาตรทั้งหมด 32 ลิตร ดำเนินการทดลองภายใต้อุณหภูมิห้อง ค่าพีเอช 4.5 อัตราส่วน  $A_r/A_d$  เท่ากับ 1:1 และความเร็วอากาศ (Superficial velocity) เท่ากับ 0.1 เซนติเมตร/วินาที ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทุก 6 หรือ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ DHA กลีเซอรอล และ โปรตีน

### 3.8 สภาวะที่เหมาะสมของถังปฏิกรณ์

หลังจากเลือกถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เหมาะสมจากหัวข้อที่ 3.7 ต่อมาจึงหาสภาวะที่เหมาะสมของการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยกำหนด 2 แปรที่จะทำการศึกษาคือ ความเร็วการป้อนอากาศและ สัดส่วนพื้นที่ระหว่าง Riser และ Downcomer ( $A_r/A_d$ ) เริ่มจากเตรียมหัวเชื้อความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 3 ลิตร ถ่ายลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ (ผลการทดลองส่วนที่ 3.3 ถึง 3.5) ปริมาตร 29 ลิตร ทำการแปรค่าอัตราการให้อากาศ ระหว่าง 0.015 ถึง 0.078 vvm หรือคิดเป็นความเร็วอากาศ (Superficial velocity) ระหว่าง 0.1 ถึง 0.53 เซนติเมตร/วินาที ดำเนินการทดลองภายใต้อุณหภูมิห้อง ค่าพีเอช 4.5 เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทุกๆ 6 หรือ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ DHA กลีเซอรอล และโปรตีน ค่าอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมจะพิจารณาจากความเข้มข้นของ DHA อัตราการผลิต DHA และอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์เป็นหลัก ในส่วนของอัตราส่วน  $A_r/A_d$  จะทำการแปรค่าอัตราส่วนในช่วงระหว่าง 3:1 ถึง 1:1 โดยควบคุมอัตราการให้อากาศตามผลการทดลองก่อนหน้านี้ ชนิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพตามผลการทดลองในส่วนที่ 3.7 และอาหารเลี้ยงเชื้อตามผลการทดลองในส่วนที่ 3.3 ถึง 3.5

### 3.9 ตรวจสอบและวิเคราะห์ผล

นำตัวอย่างเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากของเหลวที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำของเหลวใสด้านบนไปวิเคราะห์กลีเซอรอล โปรตีน และ DHA ตามลำดับ การวัดความเข้มข้นของกลีเซอรอลสามารถอ้างอิงด้วยวิธีการไตเตรทตามมาตรฐาน ASTM D7637-2010 การวัดความเข้มข้นของ DHA ใช้วิธีไดฟีนิลามีนโดยตรวจวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 615 นาโนเมตร (Karklinya et al., 1985) ในส่วนการวัดปริมาณโปรตีนสามารถอ้างอิงได้จากวิธีของ Lowry (1951) โดยตรวจวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบข้อมูลเชิงสถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และการทดสอบ HSD ของทูกีย์ ระดับนัยสำคัญ 0.05 (Montgomery and George, 2003)

### 3.10 คำนวณค่าทางจุลศาสตร์

ทำการคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{max}$ ) จากข้อมูลความเข้มข้นโปรตีน โดยใช้สมการที่ 3.1

$$\mu_{max} = (\ln N_1 - \ln N_2) / (t_1 - t_2) \quad (\text{สมการที่ 3.1})$$

เมื่อ  $N_1$  และ  $N_2$  คือความเข้มข้นโปรตีนของเซลล์ในระหว่างช่วงเวลา  $t_1$  และ  $t_2$  ของการเจริญเติบโตแบบ exponential phase

ผลได้ของการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็นโปรตีน ( $Y_{Pt/S}$ ) และ DHA ( $Y_{DHA/S}$ ) ตามสมการที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

$$Y_{Pt/S} = -\Delta P_{\text{Protein}} / \Delta S \quad (\text{สมการที่ 3.2})$$

$$Y_{DHA/S} = -\Delta DHA / \Delta S \quad (\text{สมการที่ 3.3})$$

เมื่อ  $\Delta S$  คือ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ (กรัม/ลิตร)  
 $\Delta P_{\text{protein}}$  คือ ความเข้มข้นของโปรตีนในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ (กรัม/ลิตร)  
 $\Delta DHA$  คือ ความเข้มข้น DHA ที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ (กรัม/ลิตร)

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

#### 4.1 ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหมาะสม

การทดลองนี้ต้องการศึกษาถึงความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* ซึ่งดำเนินการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานที่อ้างอิงจากรายงานของ Kommanee (2010) ระหว่างการทดลองสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จากรูปที่ 4.1A ซึ่งแสดงข้อมูลความเข้มข้นของโปรตีนในระหว่างการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน พบว่าจุลินทรีย์มีรูปแบบของการเจริญเติบโตของที่คล้ายคลึงกันในแต่ละความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ใช้ทดสอบ โดยเกิด Lag phase ประมาณ 6 ชั่วโมง ตามด้วย Exponential phase ที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเป็นเวลาประมาณ 18 ถึง 24 ชั่วโมง ก่อนเข้าสู่ Stationary phase ที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตคงที่ การคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{max}$ ) ในระยะ Exponential phase พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.82 0.39 0.54 0.84 0.45 และ 0.55 ชั่วโมง<sup>-1</sup> เมื่อกำหนดความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเริ่มเท่ากับ 20 40 60 80 100 และ 120 กรัม/ลิตร ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนในช่วง Stationary phase มีค่าเท่ากับ  $1.08 \pm 0.03$   $1.12 \pm 0.14$   $1.44 \pm 0.03$   $1.97 \pm 0.04$   $1.84 \pm 0.05$  และ  $1.28 \pm 0.12$  กรัม/ลิตร เมื่อปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเป็น 20 40 60 80 100 และ 120 กรัม/ลิตร ตามลำดับ จากรูปที่ 4.1 ซึ่งแสดงข้อมูลความเข้มข้นของ DHA ที่จุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้จะพบว่ามีรูปแบบไปในทิศทางเดียวกันกับการเจริญเติบโต โดยการสังเคราะห์ DHA เกิดขึ้นอย่างชัดเจนในช่วงที่มีการเจริญเติบโตสูง ผลการทดลองที่ได้รับเป็นสิ่งยืนยันว่า DHA เป็นผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ (Growth associated product) (Shuler และ Kargi, 1992; Wei et al., 2007) ความเข้มข้นเฉลี่ยของ DHA ในช่วง Stationary phase มีค่าเท่ากับ  $16.7 \pm 1.01$   $29.3 \pm 4.0$   $42.7 \pm 2.18$   $54.1 \pm 2.88$   $51.1 \pm 0.88$  และ  $25.82 \pm 2.32$  กรัม/ลิตร เมื่อกำหนดค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเป็น 20 40 60 80 100 และ 120 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ในส่วนความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่ามีค่าเท่ากับ  $19.85 \pm 5.36$   $11.34 \pm 5.36$   $21.91 \pm 4.29$   $33.42 \pm 9.84$   $26.01 \pm 2.9$  และ  $44.3 \pm 8.59$  กรัม/ลิตร เมื่อกำหนดความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเป็น 20 40 60 80 100 และ 120 กรัม/ลิตร ตามลำดับ จากข้อมูลในข้างต้นจึงสามารถคำนวณผลได้ของการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็นโปรตีน ( $Y_{P/S}$ ) ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 1.7 ถึง 6.3 และหากตั้งสมมติฐานให้โปรตีนมีสัดส่วนประมาณร้อยละ 50 ของน้ำหนักเซลล์

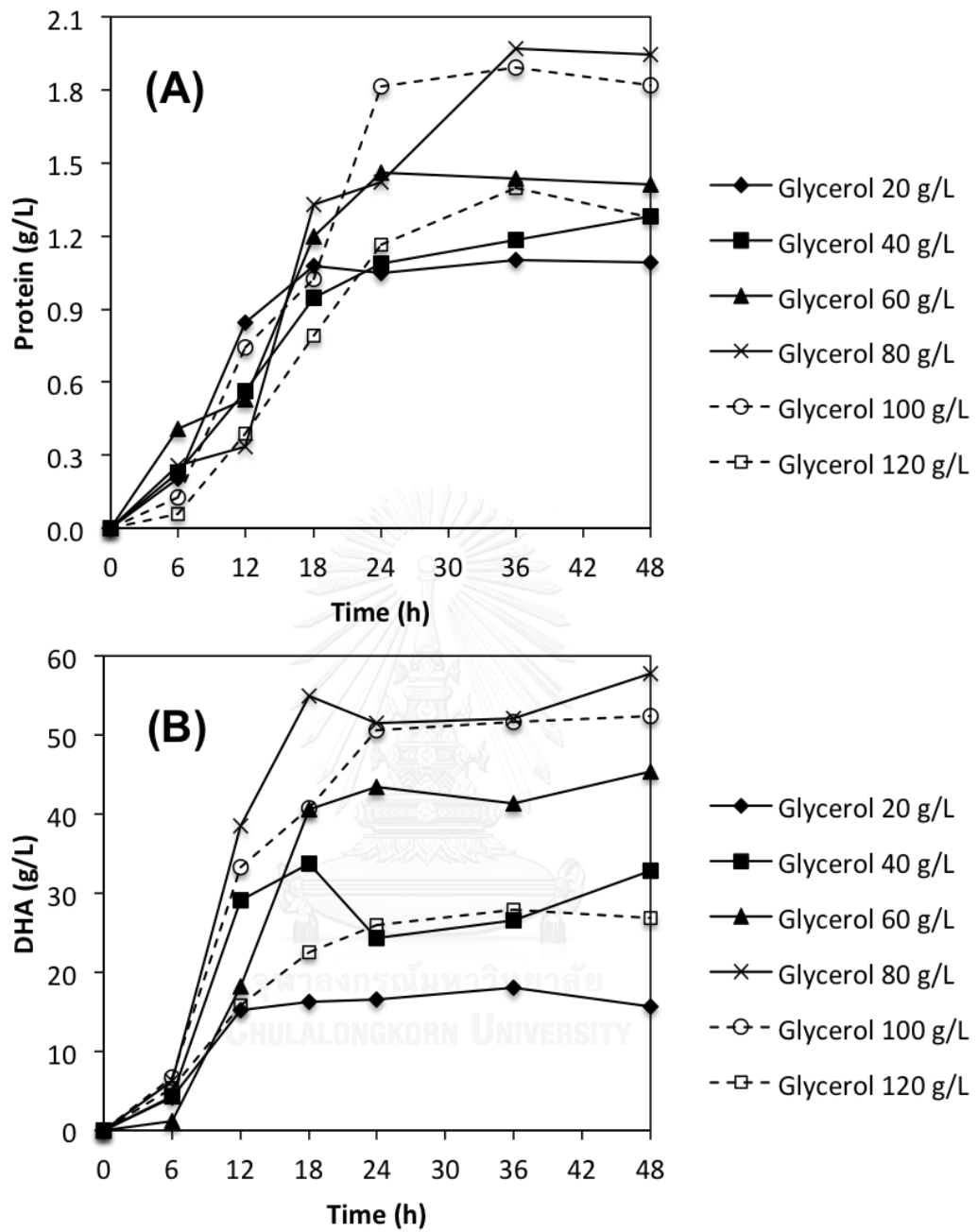
แห่งทั้งหมด (Lee, 1992) จะทำให้ค่าผลได้ของการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็นซีวามวล ( $Y_{x/s}$ ) อยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 3.4 ถึง 13 ซึ่งมากกว่าข้อมูลในงานวิจัยของ Claret et al. (1992) ที่รายงานค่า  $Y_{x/s}$  ระหว่างร้อยละ 2.6 ถึง 5.2 เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นระหว่าง 31 ถึง 129 กรัม/ลิตร สำหรับค่าผลได้ของการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็น DHA ( $Y_{DHA/s}$ ) พบว่าอยู่ระหว่างร้อยละ 92 ถึง 99 เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นตั้งแต่ 20 ถึง 80 กรัม/ลิตร แต่ค่า  $Y_{DHA/s}$  ลดลงอย่างมากเหลือเพียงร้อยละ 31 เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเพิ่มเป็น 120 กรัม/ลิตร นอกจากนี้คณะวิจัยโดย Claret et al. (1993) ยังพบการลดลงของ  $Y_{DHA/s}$  จากร้อยละ 90 เหลือเพียงร้อยละ 80 เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลมากกว่า 100 กรัม/ลิตร

จากรูปที่ 4.2 ซึ่งสรุปความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในช่วง Stationary phase พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก  $1.08 \pm 0.03$  ถึง  $1.97 \pm 0.04$  กรัม/ลิตร เมื่อปรับเพิ่มความเข้มข้นเริ่มต้นของ กลีเซอรอลจาก 20 ถึง 80 กรัม/ลิตร ความเข้มข้นของโปรตีนมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของ กลีเซอรอลมากกว่า 100 กรัม/ลิตร ในกรณีของ DHA พบว่าความเข้มข้นเฉลี่ยในช่วง Stationary phase มีแนวโน้มคล้ายคลึงกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ กล่าวคือเมื่อปรับเพิ่มความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลจาก 20 ถึง 80 กรัม/ลิตร จะพบว่าความเข้มข้นของ DHA มีค่ามากขึ้นจาก  $16.7 \pm 1.01$  ถึง  $54.1 \pm 2.88$  กรัม/ลิตร และจะเริ่มลดลงอย่างชัดเจนเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลมากกว่า 100 กรัม/ลิตร โดยความเข้มข้นของ DHA มีค่าเหลือเพียง  $25.82 \pm 2.32$  กรัม/ลิตร เมื่อกำหนดความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ 120 กรัม/ลิตร ในส่วนของอัตราการผลิต DHA พบว่าอัตราการผลิตสูงสุดที่ 0.62 กรัม-DHA/กรัม-โปรตีน/ชั่วโมง เกิดขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 80 กรัม/ลิตร การปรับเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 20 เป็น 80 กรัม/ลิตร เป็นการเพิ่มปริมาณสารตั้งต้นที่จำเป็นต่อจุลินทรีย์ ส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลิต DHA ของจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ขณะที่การปรับเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลให้มากกว่า 100 กรัม/ลิตร ซึ่งส่งผลกระทบต่อทางลบต่อการเจริญเติบโตและผลิต DHA อาจเป็นผลของกระบวนการยับยั้งโดยสารตั้งต้น (Substrate inhibition) งานวิจัยในอดีตได้รายงานถึงการยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิต DHA เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลมีค่ามากกว่า 100 กรัม/ลิตร (Bauer et al., 2005; Claret et al., 1994; Yamada et al., 1979) นอกจากนี้งานวิจัยโดย Liu et al. (2013) ยังพบการลดลงของซีวามวลและความเข้มข้นของ DHA ในจุลินทรีย์ *G. fraterii* ที่เพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่มีความเข้มข้นมากกว่า 100 กรัม/ลิตร นอกจากนี้รายงานในอดีตได้กล่าวถึงการยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิต DHA ในจุลินทรีย์ *G. oxydans* โดยผลิตภัณฑ์ DHA ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อ DHAH ความเข้มข้นมากกว่า 65 ถึง 85 กรัม/ลิตร (Bauer et al., 2005; Claret et al., 1993) จากข้อมูลดังกล่าวจึงอาจกล่าวได้ว่า

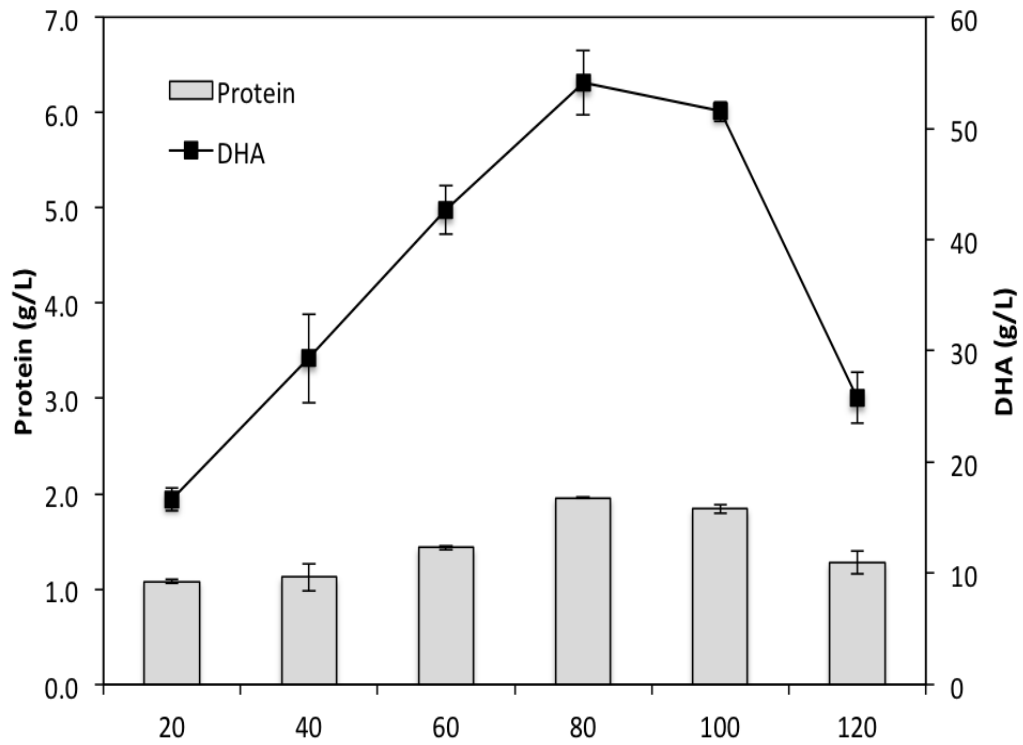


กลไกการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ DHA ไม่มีผลกระทบในงานวิจัยนี้ ดังนั้นหากเลือกใช้ความเข้มข้นของ DHA อัตราการผลิต DHA และความเข้มข้นของโปรตีน เป็นเกณฑ์หลักเพื่อคัดเลือกสภาวะเหมาะสม จะสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีค่าเท่ากับ 80 กรัม/ลิตร เพราะสภาวะดังกล่าวให้ความเข้มข้น DHA และความเข้มข้นของโปรตีนสูงสุด





รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นของโปรตีนและความเข้มข้นของ DHA ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะโดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 20 ถึง 120 กรัม/ลิตร



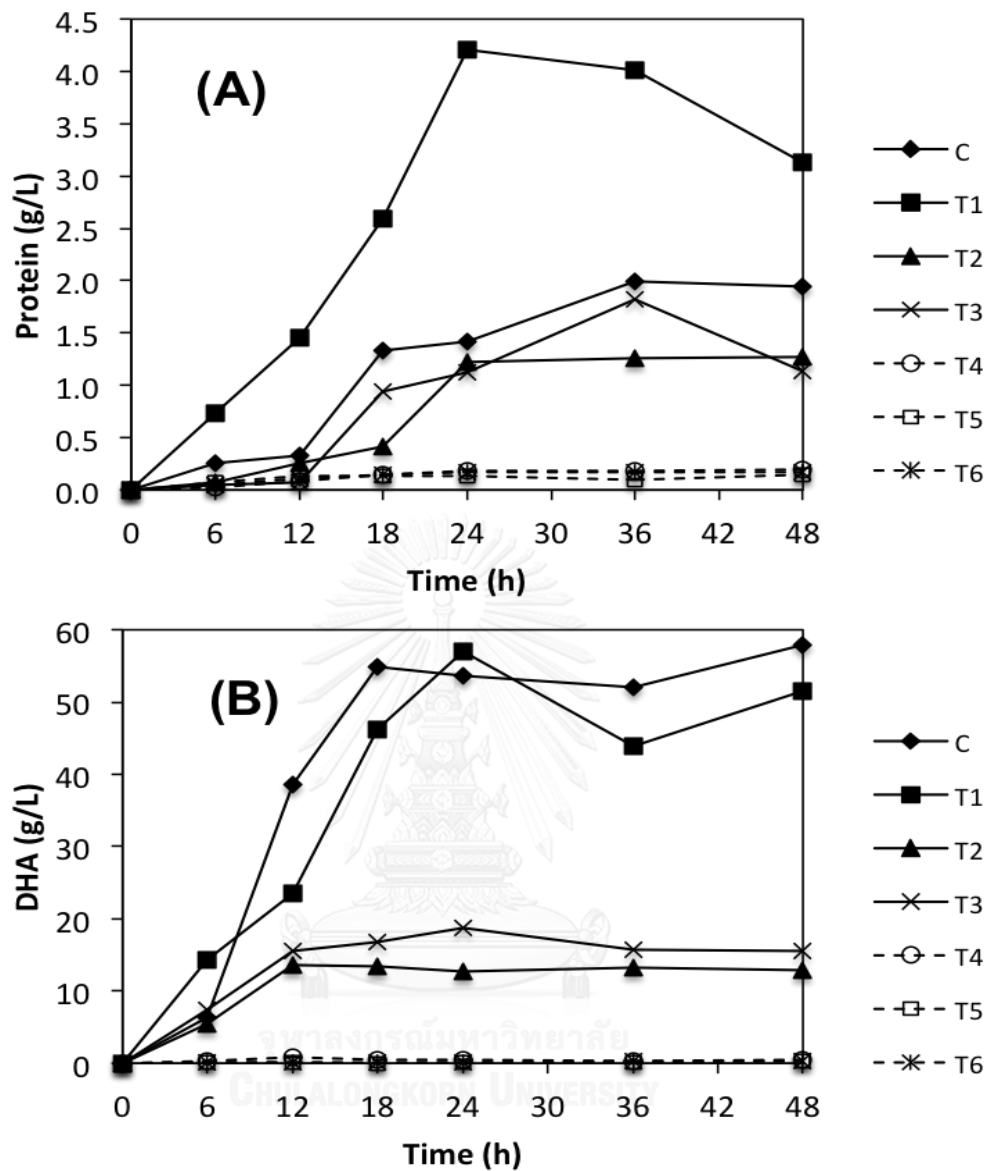
รูปที่ 4 2 ความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในช่วง Stationary phase ของการเพาะเลี้ยง เชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะโดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 20 ถึง 120 กรัม/ลิตร

## 4.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนจากของเสียอุตสาหกรรมเกษตร

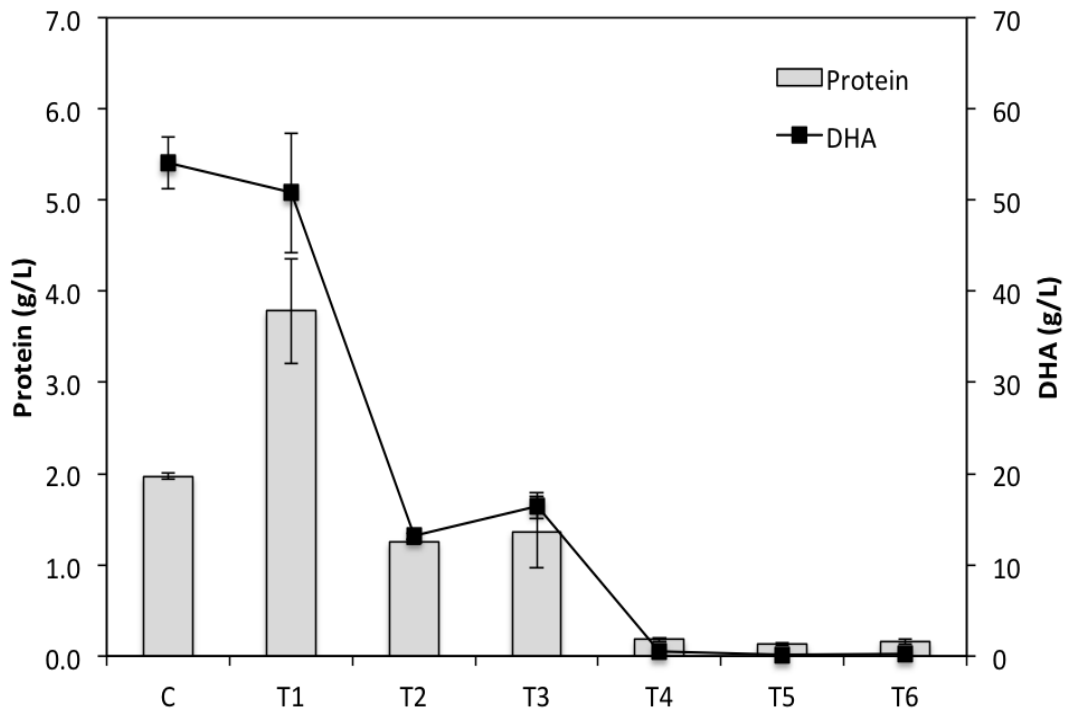
การทดลองนี้ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. oxydans* โดยของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตรที่เลือกใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด น้ำกากผงชูรส และ น้ำย่อยกากถั่วเหลือง ระหว่างการทดลองได้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 4.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับแก่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *G. oxydans* จากรูปที่ 4.3A ซึ่งแสดงข้อมูลความเข้มข้นของโปรตีนระหว่างการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะ ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ในชุดควบคุม (C) และชุดทดลอง T1 T2 และ T3 ซึ่งมีการเติมกลีเซอรอล 80 กรัม/ลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการเกิด Lag phase (1 – 6 ชั่วโมง) ตามด้วย Exponential phase (6 – 36 ชั่วโมง) และตามด้วย Stationary phase (36 – 48 ชั่วโมง) โดยความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนจะแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นกับประเภทของเสียที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ในส่วนของการสังเคราะห์ DHA นั้นพบว่าเกิดขึ้นอย่างชัดเจนในช่วง Exponential phase ซึ่งผลการทดลองที่ได้รับเป็นการยืนยันอีกครั้งว่า DHA เป็นผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ (รูปที่ 4.3B) ในทางตรงข้ามผลการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะโดยใช้แหล่งไนโตรเจนจากของเสียอุตสาหกรรมเกษตร แต่ไม่เติมกลีเซอรอล (ชุดทดลอง T4 T5 และ T6) พบว่าจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตและผลิต DHA ได้ โดยความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ตลอดการทดลองมีค่าน้อยกว่า 0.1 กรัม/ลิตร (รูปที่ 4.3B) ผลการทดลองที่ได้รับเป็นสิ่งที่ไม่เหนือความคาดหมาย เนื่องจากกลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นหลักในการเจริญเติบโตและการผลิต DHA ของจุลินทรีย์ *G. oxydans* (Hekmat et al., 2003; Svitel and Senkal, 1994)

รูปที่ 4.4 แสดงข้อมูลความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในช่วง stationary growth ของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งที่มาของไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของโปรตีนในชุดควบคุม C ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ  $1.97 \pm 0.04$  กรัม/ลิตร ขณะที่ในชุดทดลอง T1 ที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพด ชุดทดลอง T2 ที่ใช้น้ำกากผงชูรส และชุดทดลอง T3 ที่ใช้น้ำย่อยกากถั่วเหลือง มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ  $3.78 \pm 0.56$  กรัม/ลิตร  $1.25 \pm 0.02$  กรัม/ลิตร และ  $1.36 \pm 0.39$  กรัม/ลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของโปรตีนในชุดทดลอง T1 มีค่ามากกว่าความเข้มข้นของโปรตีนในชุดทดลอง T2 และ T3 อย่างชัดเจน และมากกว่าความเข้มข้นของโปรตีนในชุดควบคุมซึ่งใช้เปปโตเนและสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเกินกว่า 2 เท่า สำหรับความเข้มข้นของ DHA นั้นพบว่ามีค่าเท่ากับ  $54.1 \pm 2.88$  กรัม/ลิตร ในชุดควบคุม (C)  $50.8 \pm 6.58$  กรัม/ลิตร ในชุดทดลอง T1  $12.9 \pm 0.24$  กรัม/ลิตร ในชุดทดลอง T2 และ  $16.7 \pm 1.83$  กรัม/ลิตร ในชุดทดลอง T3 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า

จุลินทรีย์ *G. oxydans* สามารถใช้งานแหล่งไนโตรเจนจากน้ำแช่ข้าวโพดได้ดีกว่าน้ำกากผงชูรสและน้ำย่อยกากถั่วเหลือง และแม้ว่าค่าความเข้มข้นของ DHA ในชุดควบคุม C และชุดทดลอง T1 จะไม่แตกต่างกันมากนัก แต่พบว่าจุลินทรีย์ในชุดควบคุมมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็น DHA ได้ดีกว่าจุลินทรีย์ในชุดทดลอง T1 ซึ่งแสดงได้จากค่าอัตราการผลิต DHA ของชุดควบคุม (0.76 กรัม-DHA/กรัม-โปรตีน/ชั่วโมง) ซึ่งมากกว่าในชุดทดลอง T1 ประมาณ 2 เท่า สำหรับชุดทดลองที่เหลือ (T2 และ T3) พบว่าอัตราการผลิต DHA เมื่อใช้น้ำกากผงชูรสและน้ำย่อยกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน มีค่าเท่ากับ 0.29 และ 0.34 กรัม-DHA/กรัม-โปรตีน/ชั่วโมง ตามลำดับ อย่างไรก็ตามผลการทดลองจากงานวิจัยนี้มีความแตกต่างจากผลการทดลองก่อนหน้านี้ คณะวิจัยโดย Hu et al. (2010) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. oxydans* โดยใช้เปปโทน สารสกัดยีสต์และน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิต DHA ได้ในระดับความเข้มข้นที่ไม่แตกต่างกันมากนัก นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการใช้งานน้ำแช่ข้าวโพดสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. frateurii* ซึ่งสามารถผลิต DHA ได้ถึง 70 กรัม/ลิตร แม้ว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลจะอยู่ที่ประมาณ 100 กรัม/ลิตร (Liu et al., 2013) และ Liu et al (2002) ได้แนะนำการใช้งานน้ำแช่ข้าวโพดสำหรับเป็นแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ จากผลการทดลองที่ได้รับจึงได้คัดเลือกน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อทดแทนเปปโทนและสารสกัดยีสต์ซึ่งมีราคาสูง



รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นของโปรตีนและ DHA ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะโดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน: ชุดควบคุม (C) ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานที่มีเปปโตนและสารสกัดยีสต์; ชุดทดลอง T1 T2 และ T3 เติมกลีเซอรอลและแหล่งไนโตรเจนจากน้ำแช่ข้าวโพด น้ำกากผงซุรส และน้ำย่อยกากถั่วเหลือง ตามลำดับ; ชุดควบคุม T4 T5 และ T6 ไม่เติมกลีเซอรอลแต่ใช้แหล่งไนโตรเจนจากน้ำแช่ข้าวโพด น้ำกากผงซุรส และน้ำย่อยกากถั่วเหลือง ตามลำดับ



**รูปที่ 4 4** ความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในช่วง Stationary phase ของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะโดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน: ชุดควบคุม (C) ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานที่มีเปปโตินและสารสกัดยีสต์; ชุดทดลอง T1 T2 และ T3 เติมกลีเซอรอลและแหล่งไนโตรเจนจากน้ำแช่ข้าวโพด น้ำกากผงชูรส และน้ำย่อยกากถั่วเหลือง ตามลำดับ; ชุดควบคุม T4 T5 และ T6 ไม่เติมกลีเซอรอลแต่ใช้แหล่งไนโตรเจนจากน้ำแช่ข้าวโพด น้ำกากผงชูรส และน้ำย่อยกากถั่วเหลือง ตามลำดับ

### 4.3 ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

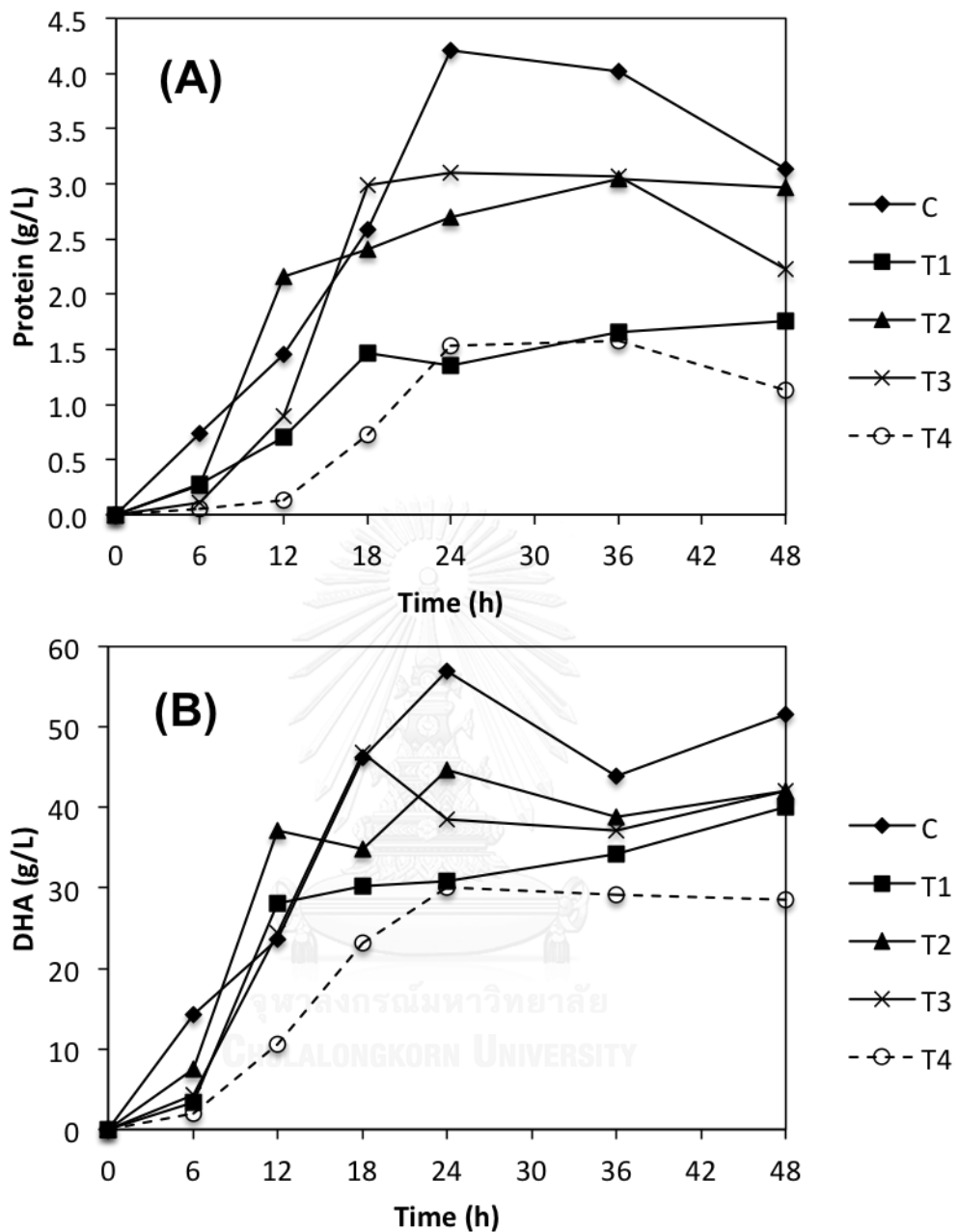
การทดลองส่วนนี้ศึกษาถึงความเข้มข้นของไนโตรเจนในน้ำแช่ข้าวโพดที่ควรคงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* ในการทดลองได้กำหนดความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ 80 กรัม/ลิตร ชุดควบคุม (C) เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานใช้น้ำแช่โพดเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนเปปโตเนและสารกลัยซีสต์ โดยมีความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 2.05 กรัม-ไนโตรเจน/ลิตร ขณะที่ในชุดควบคุม T1 T2 T3 และ T4 ได้ปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนให้มีค่าเท่ากับ 0.51 1.03 4.1 และ 8.2 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ระหว่างการทดลองควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 4.5 ซึ่งเหมาะแก่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จากรูปที่ 4.5A แสดงความเข้มข้นของโปรตีนในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* พบว่ารูปแบบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีความคล้ายคลึงกันในแต่ละความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ทดสอบ โดยแสดงช่วง Lag phase (1 – 6 ชั่วโมง) ตามด้วย Exponential phase (6 – 30 ชั่วโมง) และ Stationary phase (30 – 48 ชั่วโมง) และความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนจะแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของไนโตรเจนในน้ำแช่ข้าวโพด ในส่วนของการสังเคราะห์ DHA พบว่าเกิดขึ้นอย่างชัดเจนในช่วง Exponential phase เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ (รูปที่ 4.5B)

รูปที่ 4.6 แสดงความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในช่วง Stationary phase ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนในน้ำแช่ข้าวโพดที่แตกต่างกัน ผลการทดลองทั้งในส่วนของโปรตีนและ DHA พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงค่าสูงสุดเมื่อปรับเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนในน้ำแช่ข้าวโพดจาก 0.51 ถึง 2.05 กรัม/ลิตร ก่อนที่จะเริ่มลดลง ความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนในช่วง Stationary phase มีค่าเท่ากับ  $4.11 \pm 0.13$  กรัม/ลิตร ในชุดควบคุม C  $1.56 \pm 0.16$  กรัม/ลิตร ในชุดทดลอง T1  $2.78 \pm 0.29$  กรัม/ลิตร ในชุดทดลอง T2  $2.85 \pm 0.42$  กรัม/ลิตร ในชุดทดลอง T3 และ  $1.41 \pm 0.25$  กรัม/ลิตร ในชุดทดลอง T4 และความเข้มข้นเฉลี่ยของ DHA ในช่วง Stationary phase มีค่าเท่ากับ  $51.15 \pm 4.29$  กรัม/ลิตร ในชุดควบคุม C  $32.68 \pm 4.71$  กรัม/ลิตร ในชุดทดลอง T1  $39.5 \pm 3.85$  กรัม/ลิตร ในชุดทดลอง T2  $40.91 \pm 4.29$  กรัม/ลิตร ในชุดทดลอง T3 และ  $29.25 \pm 0.83$  กรัม/ลิตร ในชุดทดลอง T4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติได้ชี้ว่าความเข้มข้นของ DHA ในชุดควบคุมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลในชุดทดลอง T1 ถึง T4 ( $p < 0.05$ ) และเป็นที่น่าสนใจว่าอัตราการผลิต DHA มีค่าอยู่ระหว่าง 0.26 ถึง 0.51 กรัม-DHA/กรัม-โปรตีน/ชั่วโมง โดยอัตราการผลิต DHA สูงสุดไม่ได้เกิดขึ้นในชุดควบคุม แต่เกิดขึ้นในชุดทดลอง T1 ซึ่งปรับค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในน้ำแช่ข้าวโพดเป็น 0.51 กรัม-ไนโตรเจน/ลิตร อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ให้ความสนใจต่อระดับความเข้มข้นของ DHA ที่จุลินทรีย์ *G. oxydans* สามารถสังเคราะห์ได้เป็นหลัก ดังนั้นจึงได้เลือก

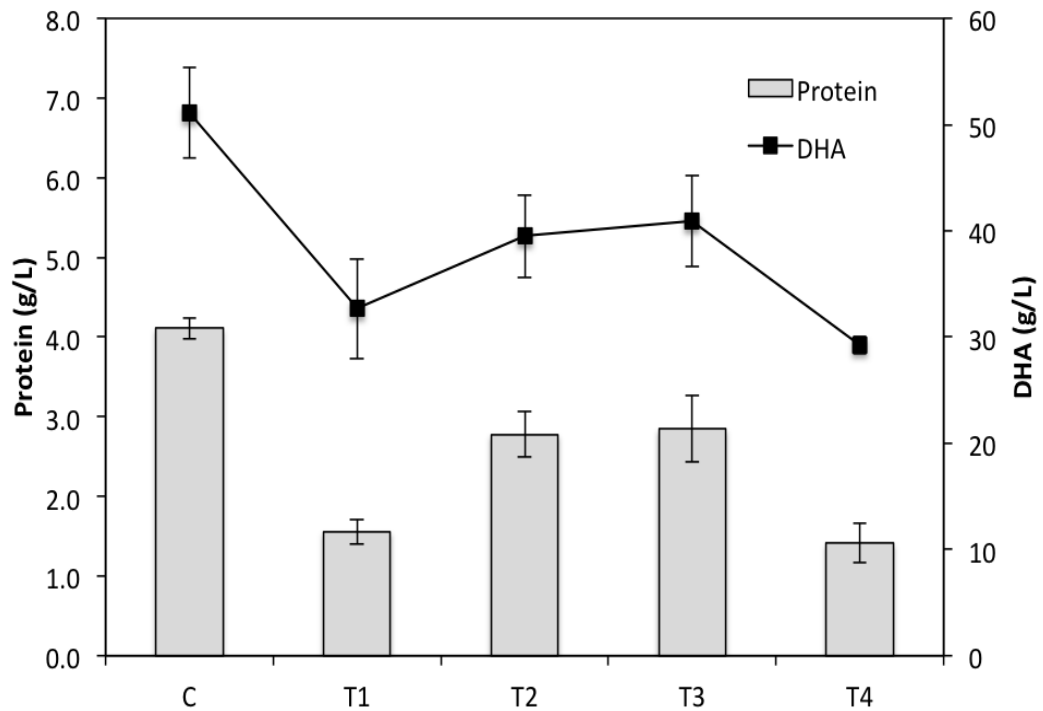


ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมในน้ำแช่ข้าวโพดเป็น 2.05 กรัม-ไนโตรเจน/ลิตร เพราะเป็นสภาวะที่ให้ความเข้มข้นของ DHA ได้สูงสุด ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่มากกว่า 2.05 g-N/L ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื่องจากตัวบ่งชี้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของน้ำแช่ข้าวโพด เช่น กรดแลคติก ซัลไฟด์ และโลหะหนักเป็นต้น ดังนั้นความเข้มข้นที่เจือจางจึงเหมาะสมสำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ





รูปที่ 4.5 ความเข้มข้นของโปรตีนและ DHA ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะโดยใช้ น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยจุลินทรีย์ในชุดทดลอง T1 T2 T3 และ T4 ได้รับไนโตรเจนในปริมาณ 0.25 0.5 2 และ 4 เท่าของไนโตรเจนในชุดควบคุม (C) ที่มีไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2.05 กรัม-ไนโตรเจน/ลิตร



**รูปที่ 4 6** ความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในช่วง Stationary phase ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะโดยใช้น้ำแ่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยจุลินทรีย์ในชุดทดลอง T1 T2 T3 และ T4 ได้รับไนโตรเจนในปริมาณ 0.25 0.5 2 และ 4 เท่าของไนโตรเจนในชุดควบคุม (C) ที่มีไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2.05 กรัม-ไนโตรเจน/ลิตร

#### 4.4 การเลือกถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การทดลองนี้ได้เปรียบเทียบและคัดเลือกรูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ควรใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. oxydans* เพื่อผลิต DHA โดยมีถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 3 แบบ ที่ใช้ทดสอบ คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกแบบหมุนวนภายใน (Internal-loop airlift bioreactor: IAB) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกแบบแผ่นกั้น (Flat-panel airlift bioreactor: FAB) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟองอากาศ (Bubble column: BC) อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 กรัม/ลิตร และ แหล่งไนโตรเจนเป็นน้ำแช่ข้าวโพดที่ความเข้มข้น 2.05 กรัม-ไนโตรเจน/ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในแบบกะเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยควบคุมอัตราการความเร็วของอากาศที่ 0.1 เซนติเมตร/วินาที อัตราส่วนพื้นที่  $A_R/A_D$  ที่ 1:1 สำหรับ IAB และ FAB และปริมาตรใช้งานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ 32 ลิตร ระหว่างการทดลองพบว่าอุณหภูมิของเหลวในแต่ละถังปฏิกรณ์ชีวภาพแกว่งในช่วงแคบระหว่าง 30 ถึง 32 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO) มากกว่า 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร

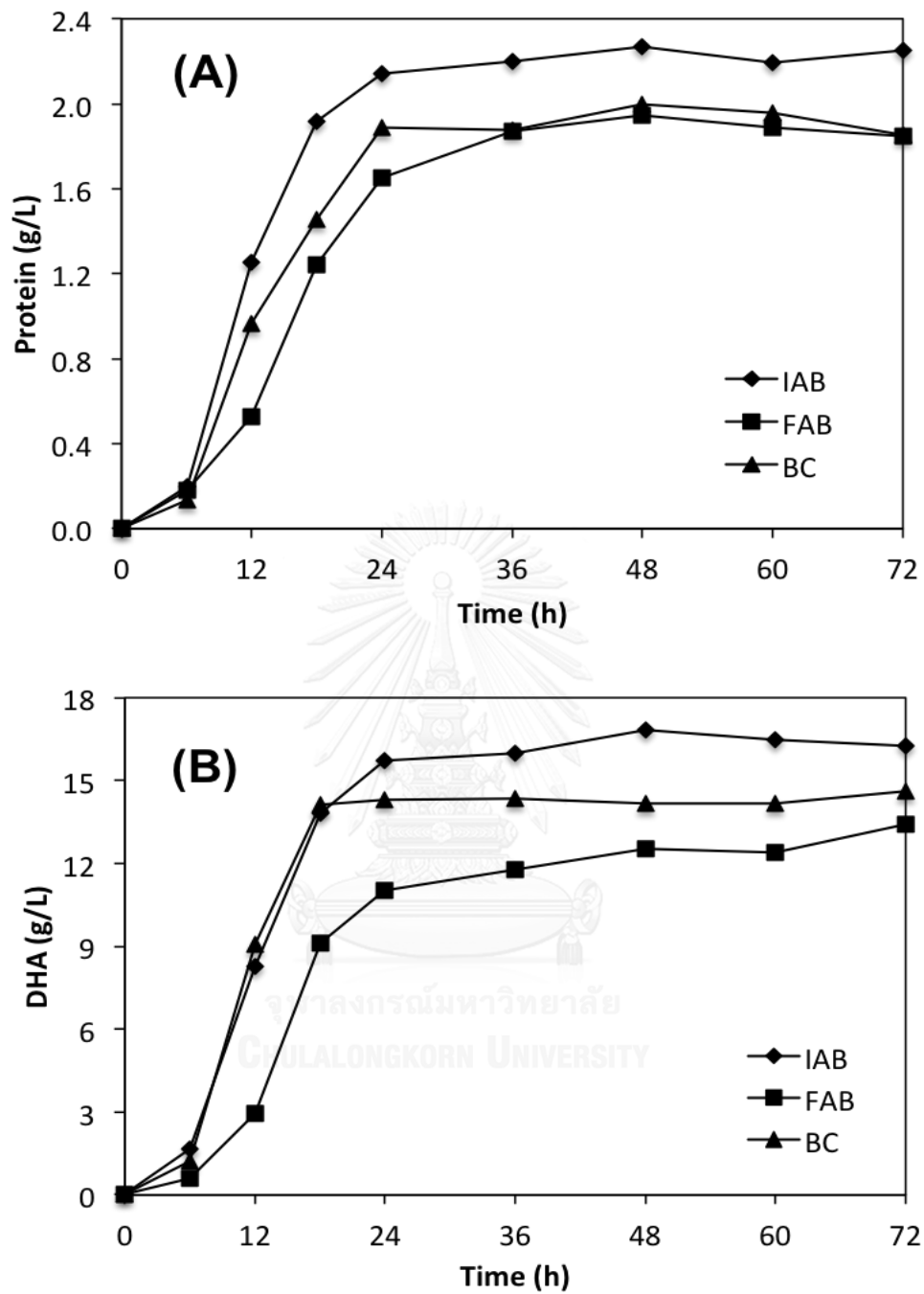
จากรูปที่ 4.7A ซึ่งแสดงข้อมูลความเข้มข้นของโปรตีนระหว่างการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. oxydans* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าลักษณะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในแต่ละถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีความคล้ายคลึงกัน กล่าวคือเกิด Lag phase ในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการทดลอง ตามด้วยช่วง Exponential phase ระหว่าง 6 ถึง 36 ชั่วโมง และสุดท้ายเข้าสู่ช่วง Stationary phase จนสิ้นสุดการทดลอง โดยค่าเฉลี่ยของระดับความเข้มข้นโปรตีนในช่วง Stationary phase มีค่าเท่ากับ  $2.23 \pm 0.04$  กรัม/ลิตร สำหรับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB  $1.89 \pm 0.04$  กรัม/ลิตร สำหรับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ FAB และ  $1.91 \pm 0.06$  กรัม/ลิตร สำหรับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ BC สำหรับ DHA ซึ่งแสดงข้อมูลในรูปที่ 4.7B นั้น พบว่าการผลิตเกิดขึ้นอย่างชัดเจนในช่วงที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดีซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้รับก่อนหน้านี้ และความเข้มข้นของ DHA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB และ BC มีค่าใกล้เคียงกันจนสิ้นสุดช่วง Exponential phase ก่อนที่ความเข้มข้นของ DHA จะเริ่มเข้าสู่ค่าคงที่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ BC แต่มีค่าเพิ่มขึ้นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB ในส่วนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ FAB นั้นพบว่าความเข้มข้นของ DHA น้อยกว่าใน IAB และ BC อย่างชัดเจน ซึ่งลักษณะการเคลื่อนที่ภายในของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB และ FAB มีลักษณะการเคลื่อนที่ของอาหารเลี้ยงเชื้อในทั้งสองทิศทางทั้งในส่วนป้อนอากาศและไม่ป้อนอากาศ โดยส่วนไม่ป้อนอากาศมีลักษณะการเคลื่อนที่แบบไหลตามกัน (Plug flow) ขนาดของฟองอากาศขนาดเล็กกว่าถังปฏิกรณ์แบบพ่นอากาศ สำหรับถังปฏิกรณ์แบบพ่นอากาศ (BC) มีการเคลื่อนที่ของของอาหารเลี้ยงเชื้อและจุลินทรีย์ *G. oxydans*

บางส่วนด้วยฟองอากาศที่ป้อนให้กับถังปฏิกรณ์ชีวภาพและเกิดการหมุนวนแบบปั่นป่วน (Turbulent flow) ภายในถังปฏิกรณ์ในส่วนของการเลี้ยงเชื้อที่เหลือ

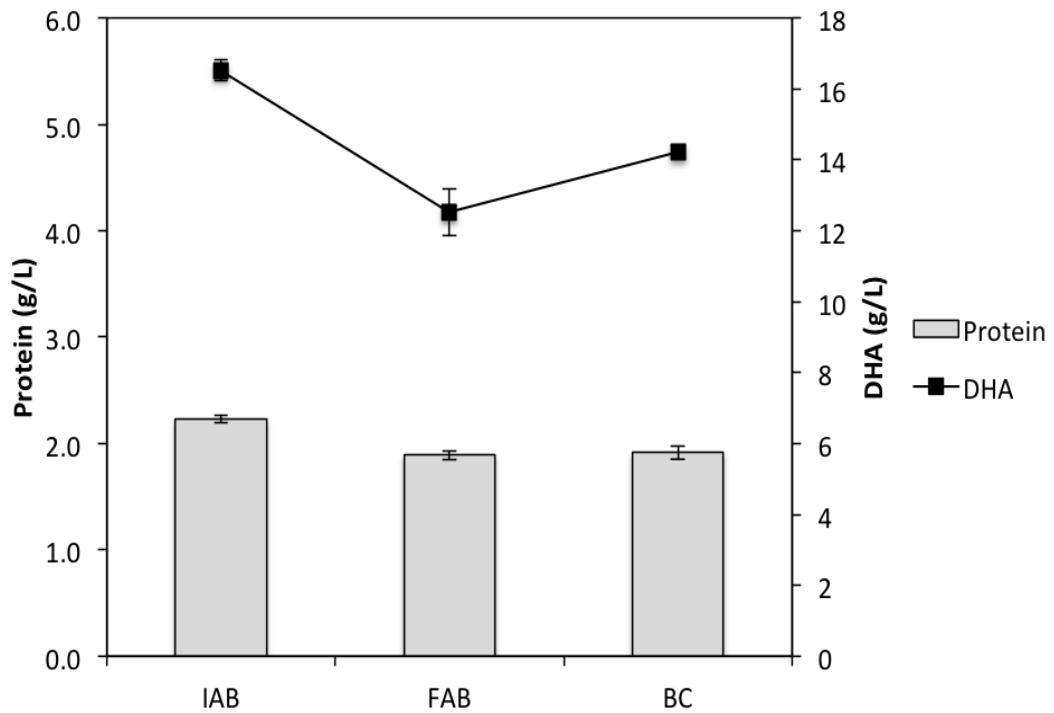
จากรูปที่ 4.8 ซึ่งแสดงค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในช่วง Exponential phase พบว่าความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนมีค่าเท่ากับ  $2.23 \pm 0.04$  กรัม/ลิตร สำหรับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB  $1.89 \pm 0.04$  กรัม/ลิตร สำหรับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ FAB และ  $1.91 \pm 0.06$  กรัม/ลิตร สำหรับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ BC ในส่วนของ DHA นั้น ความเข้มข้นเฉลี่ยในช่วง Exponential phase มีค่าเท่ากับ  $16.53 \pm 0.30$  กรัม/ลิตร สำหรับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB  $12.52 \pm 0.66$  กรัม/ลิตร สำหรับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ FAB และ  $14.24 \pm 0.17$  กรัม/ลิตร สำหรับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ BC จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้รับจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. oxydans* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 32 ลิตร มีค่ามากกว่าเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขณะที่ความเข้มข้นของ DHA จากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 32 ลิตร น้อยกว่าความเข้มข้นจากการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ถึงประมาณ 3 เท่า จากการสืบค้นวรรณกรรมยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับผลของการขยายขนาดถังปฏิกรณ์ชีวภาพต่อการเจริญเติบโตและการผลิต DHA ของจุลินทรีย์ *G. oxydans* แต่พบรายงานที่ให้ผลขัดแย้งกันในจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น งานวิจัยโดย Issapayup et al. (2011) พบว่าการขยายขนาดถังปฏิกรณ์ชีวภาพ FAB จาก 17 ลิตร เป็น 200 ลิตร ส่งผลให้จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ *Haematococcus pluvialis* ลดลงจาก  $290 \times 10^4$  เหลือเพียง  $147 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร ขณะที่งานวิจัยโดย Liu et al. (2006) ซึ่งเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhizopus* sp. เพื่อผลิตกรดแลกติกพบว่าการขยายขนาดถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกจากปริมาตร 3 ลิตร เป็น 5,000 ลิตร ไม่ส่งผลต่อความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ผลิตได้หากมีอัตราการถ่ายเทมวลออกซิเจนเพียงพอ เป็นต้น ข้อมูลจากรูปที่ 4.8 ยังพบว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. oxydans* เพื่อผลิต DHA ได้มากกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ FAB และ BC การวิเคราะห์ทางสถิติแสดงว่าความเข้มข้นของโปรตีนและ DHA จากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ FAB และ BC นอกจากนี้ผลการคำนวณอัตราการผลิต DHA พบว่าค่าสูงสุดเกิดขึ้นเมื่อใช้งานถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB เช่นกัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.22 กรัม-DHA/กรัม-โปรตีน/ชั่วโมง ขณะที่อัตราการผลิต DHA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ FAB และ BC มีค่าเท่ากับ 0.18 และ 0.20 กรัม-DHA/กรัม-โปรตีน/ชั่วโมง ตามลำดับ ระหว่างการทดลองเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. oxydans* ได้สังเกตเห็นว่าฟองอากาศสามารถกระจายตัวได้ดีและเต็มพื้นที่ของส่วน Riser ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB เมื่อเปรียบเทียบกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ FAB ซึ่งพบว่าฟองอากาศไม่สามารถกระจายตัวไปได้ถึงทุกส่วนของ Riser โดยเฉพาะในบริเวณมุมและขอบด้านล่าง ซึ่งข้อสังเกตดังกล่าวอาจใช้ในการอธิบายถึงประสิทธิภาพที่

ต่ำกว่าของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ FAB นอกจากนี้ทิศทางการไหลที่แน่นอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ  
อากาศยก อาจมีข้อดีต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะ  
การเพาะเลี้ยง (เช่น แรงเฉือนจากของเหลว ฟองอากาศและการกระจายตัวของสารอาหาร) ได้  
ค่อนข้างคงที่ ซึ่งตรงกันข้ามกับจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟองอากาศ ซึ่งมีทิศ  
ทางการไหลไร้ทิศทางที่แน่นอน ส่งผลให้จุลินทรีย์อาจได้รับขนาดของแรงเฉือนเปลี่ยนแปลงและ  
ปริมาณของสารอาหารเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา (Kaewpintong et al., 2007) ดังนั้นจากข้อมูลที่ได้  
นำเสนอในข้างต้น จึงเลือกถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* ต่อไป





รูปที่ 4 7 ความเข้มข้นของโปรตีนและ DHA ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB FAB และ BC โดยควบคุมความเร็วอากาศที่ 0.1 เซนติเมตร/วินาที



รูปที่ 4 8 ความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในช่วง Stationary phase ของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB FAB และ BC โดยควบคุมความเร็วอากาศที่ 0.1 เซนติเมตร/วินาที



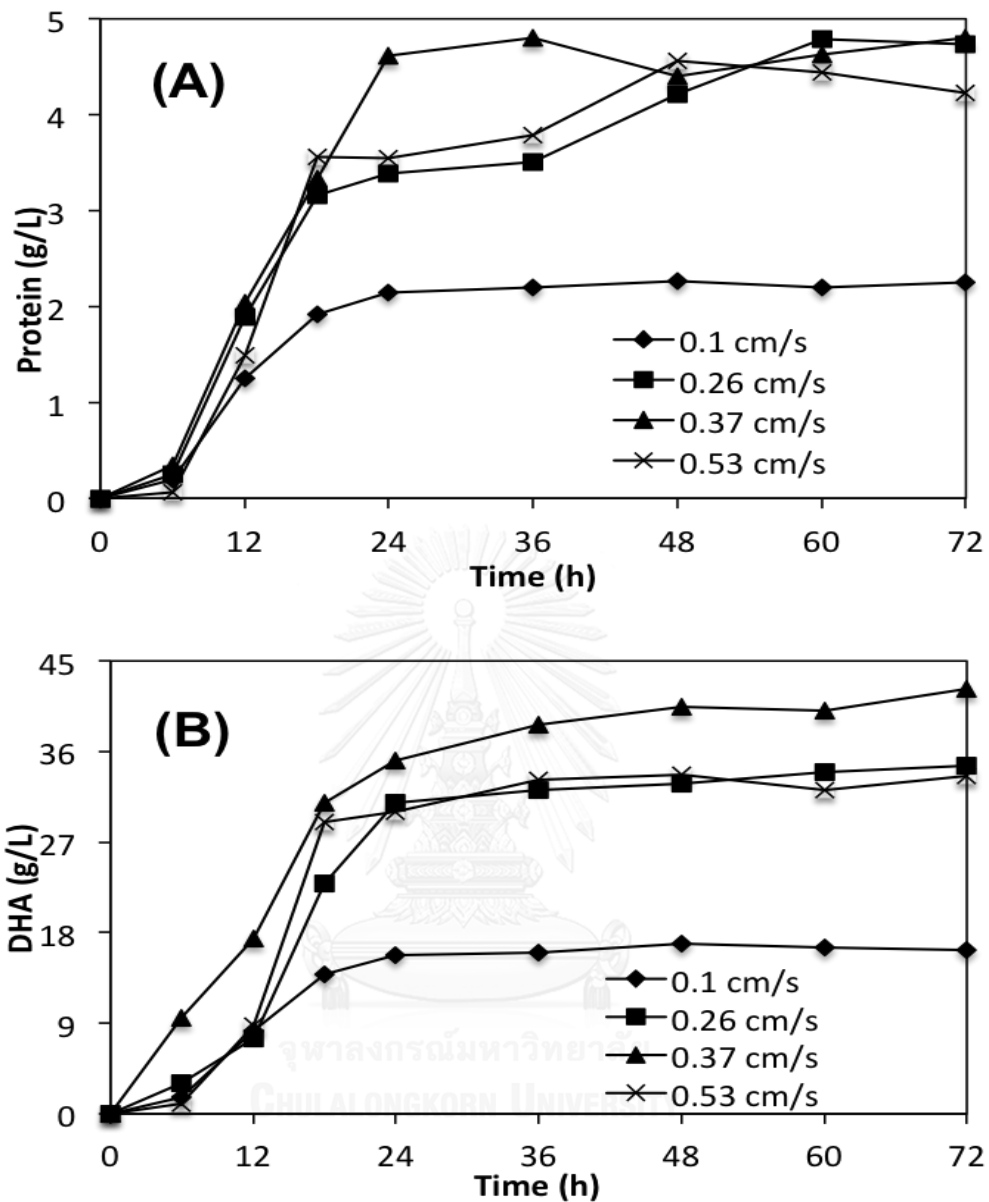
#### 4.5 ความเร็วอากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การทดลองส่วนนี้ศึกษาถึงอิทธิพลของความเร็วอากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB ขนาด 32 ลิตร ต่อการเจริญเติบโตและการผลิต DHA ของจุลินทรีย์ *G. oxydans* โดยปรับอัตราไหลของอากาศซึ่งเทียบเท่ากับความเร็วอากาศในช่วงตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.53 เซนติเมตร/วินาที ในระหว่างการทดลองพบว่าอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในช่วงระหว่าง 30 ถึง 31 องศาเซลเซียส และพีเอชที่ 4.5 ซึ่งเหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จากรูปที่ 4.9 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ผ่านการตรวจวัดโปรตีน พบการเกิด Lag phase ในช่วง 6 ชั่วโมงแรก ตามด้วยช่วง Exponential phase ตั้งแต่เวลา 6 ถึง 36 ชั่วโมง และสุดท้ายเป็นช่วง Stationary phase จนสิ้นสุดการทดลอง โดยความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนขึ้นอยู่กับความเร็วอากาศที่ใช้ทดสอบ สำหรับความเข้มข้นของ DHA นั้นจะเห็นได้ว่ามีค่าสูงขึ้นอย่างชัดเจนในช่วง Exponential phase ซึ่งเป็นการยืนยันอีกครั้งว่า DHA เป็นผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ

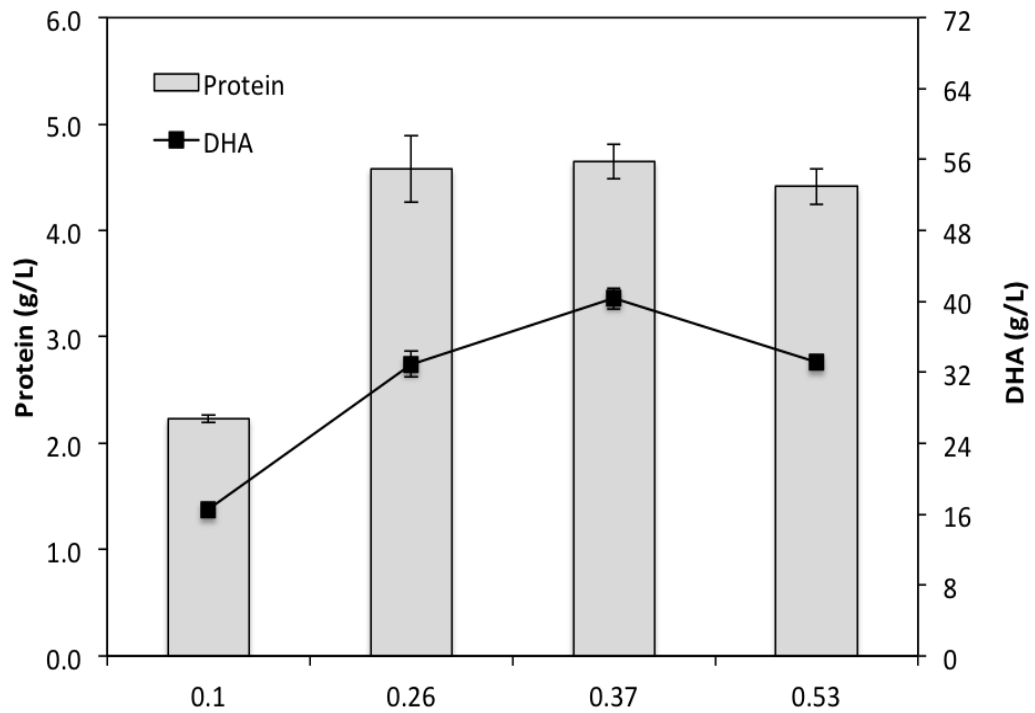
รูปที่ 4.10 แสดงค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในช่วง Exponential phase ในแต่ละความเร็วอากาศที่ทำการทดสอบ ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นสูงสุดของโปรตีนที่  $4.65 \pm 0.16$  กรัม/ลิตร เกิดขึ้นเมื่อควบคุมความเร็วอากาศที่เข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ 0.37 เซนติเมตร/วินาที ความเข้มข้นของโปรตีนที่ความเร็วอากาศอื่นๆ มีค่าเท่ากับ  $2.23 \pm 0.04$   $4.58 \pm 0.32$  และ  $4.41 \pm 0.17$  กรัม/ลิตร เมื่อควบคุมความเร็วอากาศที่ 0.1 0.26 และ 0.53 เซนติเมตร/วินาที ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อปรับเพิ่มความเร็วอากาศที่เข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้อยู่ในช่วง 0.26 ถึง 0.53 เซนติเมตร/วินาที โดยออกซิเจนที่เพิ่มมากขึ้นจะมีส่วนช่วยในกระบวนการหายใจและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้รับไม่ได้แสดงถึงค่าความเร็วอากาศที่เทียบเท่ากับค่าความเข้มข้นออกซิเจนวิกฤต (Critical oxygen concentration) ซึ่งโดยทั่วไปจะพบว่าจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนจะมีอัตราการเจริญเติบโตคงที่ (Zero order) เมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนในน้ำมากกว่าค่าความเข้มข้นออกซิเจนวิกฤต และมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (First order) เมื่อปริมาณออกซิเจนในน้ำน้อยกว่าค่าความเข้มข้นออกซิเจนวิกฤต อย่างไรก็ตามค่าความเข้มข้นออกซิเจนวิกฤตอาจทำการประมาณได้ โดยมีค่าประมาณร้อยละ 5 ถึง 10 ของความเข้มข้นออกซิเจนอิ่มตัวที่สภาวะการเพาะเลี้ยง (Shuler and Kargi, 1992)

การปรับความเร็วอากาศที่เข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีผลต่อความเข้มข้นของ DHA ที่จุลินทรีย์ *G. oxydans* สามารถสังเคราะห์ได้ ผลการตรวจวัดความเข้มข้นของ DHA ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.10 พบว่า

มีค่าเท่ากับ  $16.53 \pm 0.30$   $32.9 \pm 1.44$   $40.89 \pm 1.20$  และ  $33.16 \pm 0.71$  กรัม/ลิตร เมื่อควบคุมความเร็วอากาศที่เข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ 0.1 0.26 0.37 และ 0.53 เซนติเมตร/วินาที ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นสูงสุดของ DHA เกิดขึ้นเมื่อควบคุมความเร็วอากาศ การปรับเพิ่มความเร็วอากาศที่ 0.37 เซนติเมตร/วินาที การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของ DHA เมื่อปรับเพิ่มความเร็วอากาศ (0.1 ถึง 0.37 เซนติเมตร/วินาที ในการทดลองนี้) อาจอธิบายได้จากกระบวนการสังเคราะห์ DHA จากเอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮโดรจีเนสซึ่งต้องการออกซิเจนในปฏิกิริยา ดังนั้นการเพิ่มความเร็วอากาศซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จึงส่งผลให้ปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มความเร็วอากาศยังช่วยให้การผสมของเหลวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเกิดขึ้นได้ดีขึ้น และช่วยให้การกระจายตัวของสารอาหารที่จำเป็นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเกิดขึ้นได้ดี อย่างไรก็ตามการควบคุมความเร็วอากาศที่มากเกินไป ( $> 0.37$  เซนติเมตร/วินาที ในการทดลองนี้) อาจส่งผลให้จุลินทรีย์เกิดความเครียดจากแรงเฉือนที่เกิดขึ้นและส่งผลให้ความสามารถในการผลิต DHA ลดลง เมื่อทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นสูงสุดของ DHA ในงานวิจัยนี้ ( $40.89 \pm 1.20$  กรัม/ลิตร) พบว่ามีค่ามากกว่าผลการทดลองในอดีตที่เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. oxydan* ด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB ขนาด 2 ลิตร ซึ่งปรับความเร็วอากาศในช่วงระหว่าง 1.89 ถึง 4.40 เซนติเมตร/วินาที และให้ผลิตภัณฑ์ DHA ที่มีความเข้มข้นประมาณ 28 ถึง 35 กรัม/ลิตร (Hu et al., 2011) รายงานวิจัยดังกล่าวยังพบว่าอิทธิพลของความเร็วอากาศต่อความเข้มข้นของ DHA มีลักษณะคล้ายคลึงกับผลการทดลองที่ได้รับในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ กล่าวคือความเข้มข้นของ DHA เพิ่มขึ้นจนถึงค่าสูงสุดเมื่อปรับเพิ่มความเร็วอากาศที่เข้าสู่ถังปฏิกรณ์ แต่มีค่าลดลงเมื่อยังคงปรับเพิ่มความเร็วอากาศขึ้นไป (Hu et al., 2011) นอกจากนี้ระหว่างการทดลองเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. oxydans* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB พบว่าได้เกิดโพลีเมอร์ขึ้นเล็กน้อยเมื่อควบคุมความเร็วอากาศที่ 0.1 เซนติเมตร/วินาที และมีปริมาณโพลีเมอร์เพิ่มมากขึ้นเมื่อปรับเพิ่มความเร็วอากาศ จนมีความเสี่ยงที่จะเกิดการรั่วไหลของโพลีเมอร์และของเหลวจากภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งอาจนำไปสู่การปนเปื้อนและสูญเสียผลิตภัณฑ์ตามมา ดังนั้นจึงได้ทำการติดตั้งใบพัดซึ่งต่อไว้กับมอเตอร์ที่ส่วนบนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อทำลายโพลีเมอร์ที่เกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าของเหลว ผลการดำเนินงานหลังจากติดตั้งอุปกรณ์ทำลายโพลีเมอร์พบว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพสามารถใช้งานได้อย่างปกติ



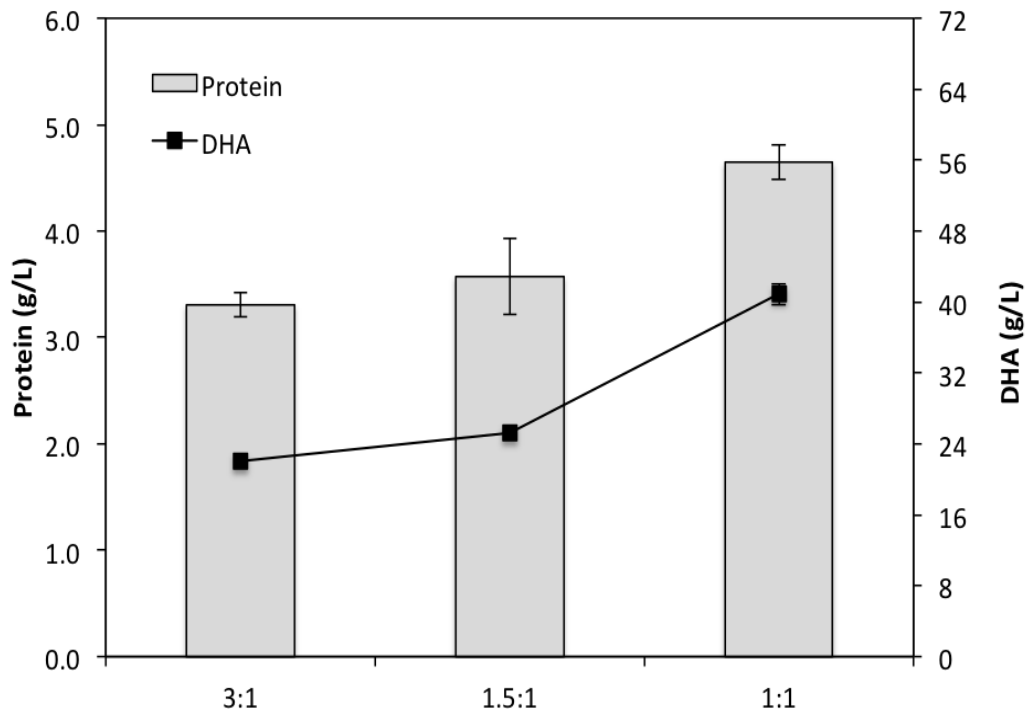
รูปที่ 4 9 ความเข้มข้นของโปรตีนและ DHA ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB โดยปรับความเร็วอากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในช่วงตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.53 เซนติเมตร/วินาที



รูปที่ 4 10 ความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในช่วง Stationary phase ของการเพาะเลี้ยง เชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB โดยควบคุมความเร็วอากาศในถัง ปฏิกรณ์ชีวภาพในช่วงตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.53 เซนติเมตร/วินาที

#### 4.6 ผลของอัตราส่วนพื้นที่ป้อนอากาศและไม่ป้อนอากาศ ( $A_r/A_d$ )

ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB ซึ่งควบคุมความเร็วอากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ 0.37 เซนติเมตร/วินาที และปรับค่าอัตราส่วนพื้นที่  $A_r/A_d$  จาก 3:1 ถึง 1:1 ระหว่างการทดลองอุณหภูมิของเหลวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเปลี่ยนแปลงในช่วงแคบระหว่าง 30 ถึง 32 องศาเซลเซียส และมีค่าพีเอช 4.5 ซึ่งสภาวะดังกล่าวเหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* ข้อมูลการเจริญเติบโตซึ่งตรวจวัดในรูปความเข้มข้นของโปรตีนพบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกับการทดลองก่อนหน้านี้ โดยแสดงการเกิด Lag phase ในช่วง 1 ถึง 6 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงตามด้วย Exponential phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 7 ถึง 36 และสุดท้ายเป็นช่วง Stationary phase จนสิ้นสุดการทดลอง ในส่วนของ DHA พบว่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในช่วง Exponential phase เช่นเดียวกับผลของการทดลองอื่นๆ ก่อนหน้านี้ จากรูปที่ 11 ซึ่งแสดงค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นโปรตีนและ DHA ในช่วง Stationary phase เมื่อปรับ อัตราส่วนพื้นที่  $A_r/A_d$  จาก 3:1 ถึง 1:1 พบว่าความเข้มข้นสูงของโปรตีน ( $4.41 \pm 0.17$  กรัม/ลิตร) และ DHA ( $40.89 \pm 1.20$  กรัม/ลิตร) เกิดขึ้นเมื่อใช้งานอัตราส่วนพื้นที่  $A_r/A_d$  เท่ากับ 1:1 ขณะที่ความเข้มข้นของโปรตีนและ DHA มีค่าเท่ากับ  $3.31 \pm 0.11$  และ  $22.04 \pm 0.61$  กรัม/ลิตร เมื่อใช้งานอัตราส่วนพื้นที่  $A_r/A_d$  เท่ากับ 3:1 และเท่ากับ  $3.57 \pm 0.36$  และ  $25.19 \pm 0.45$  กรัม/ลิตร เมื่อใช้งานอัตราส่วนพื้นที่  $A_r/A_d$  เท่ากับ 1.5:1 ตามลำดับ การปรับค่าอัตราส่วนพื้นที่  $A_r/A_d$  มีความสัมพันธ์กับการปรับความเร็วอากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในระดับหนึ่ง เนื่องจากค่าความเร็วอากาศสามารถเขียนได้ดังสมการ  $v = Q/A$  เมื่อ  $v$  คือความเร็วอากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ  $Q$  คืออัตราไหลเชิงปริมาตรของอากาศเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และ  $A$  คือพื้นที่หน้าตัดของส่วน Riser อย่างไรก็ตามการปรับความเร็วอากาศด้วยวิธีการนี้อาจดำเนินการได้ยากกว่าการปรับอัตราไหลของอากาศโดยตรง ความเข้มข้นสูงสุดของโปรตีนและ DHA ที่ได้รับในการทดลองส่วนนี้เกิดขึ้นเมื่อใช้อัตราส่วนพื้นที่  $A_r/A_d$  ที่ 1:1 และความเร็วอากาศที่ 0.37 เซนติเมตร/วินาที ซึ่งเหมือนกับสภาวะที่เหมาะสมของการทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของการให้อากาศ (ผลการทดลองของส่วนที่ 4.5)



รูปที่ 4 11 ความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนและ DHA ในช่วง Stationary phase ของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB โดยปรับอัตราส่วนพื้นที่  $A_v/A_d$  จาก 3:1 ถึง 1:1 โดยควบคุมความเร็วอากาศเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเท่ากับ 0.37 เซนติเมตร/วินาที

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตและผลิต DHA ได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตรเป็นแหล่งไนโตรเจน งานวิจัยนี้พบว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตและผลิต DHA ได้สูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ 80 กรัม/ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน และเมื่อทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบระหว่างของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร 3 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยน้ำแช่ข้าวโพด น้ำกากผงชูรส และน้ำย่อยกากถั่วเหลือง พบว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตและสังเคราะห์ DHA จากของเสียอุตสาหกรรมเกษตรที่ใช้ทดสอบได้ โดยน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ความเข้มข้นของ DHA สูงสุดเท่ากับ  $50.81 \pm 6.59$  กรัม/ลิตร ขณะที่ความเข้มข้นของ DHA เมื่อใช้น้ำกากผงชูรส ( $13.16 \pm 0.36$  กรัม/ลิตร) และน้ำย่อยกากถั่วเหลือง ( $16.47 \pm 1.39$  กรัม/ลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน มีค่าน้อยกว่าการใช้งานน้ำแช่ข้าวโพดอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ผลการทดลองเพิ่มเติมยังพบว่าควรคงค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในน้ำแช่ข้าวโพดไว้ที่ 2.05 กรัม/ลิตร ซึ่งเทียบเท่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน
2. ผลการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *G. oxydans* แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 32 ลิตร ซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล 80 กรัม/ลิตร และน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 2.05 กรัม/ลิตร และมีอัตราการให้อากาศที่ 0.1 เซนติเมตร/วินาที พบว่าการเจริญเติบโตและการผลิต DHA ของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB มีค่ามากกว่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ FAB และ BC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการทดลองปรับค่าความเร็วอากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB เท่ากับ 0.37 เซนติเมตรต่อวินาทีและอัตราส่วนพื้นที่  $A_1/A_0$  ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB เท่ากับ 1:1 จะได้ความเข้มข้นของโปรตีนและ DHA สูงสุดที่  $4.41 \pm 0.17$  และ  $40.89 \pm 1.20$  กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้รับจากงานวิจัยนี้ ได้ยืนยันถึงความเป็นไปได้ของการใช้งานของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร โดยเฉพาะน้ำแช่ข้าวโพดเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *G. oxydans* และวิทยานิพนธ์นี้ยังเป็น

รายงานฉบับแรกที่ได้กล่าวถึงการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและนอกเหนือจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน รวมถึงการเปรียบเทียบสมรรถนะระหว่างถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปแบบต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง *G. oxydans* เพื่อผลิต DHA

3. การศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตสามารถดำเนินการได้ในหลายประเด็น อาทิ (1) การศึกษาถึงรูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ IAB ที่มีความสามารถในการถ่ายเทออกซิเจนที่สูงขึ้น รวมถึงผลของการขยายขนาดในแนวดิ่ง (2) การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างรูปแบบของการใช้งาน เช่น แบบกะ แบบต่อเนื่อง หรือกึ่งต่อเนื่อง เป็นต้น รวมถึงการคำนวณความเป็นไปได้ในทางเศรษฐศาสตร์ และ (3) การประยุกต์ใช้งานจุลินทรีย์ *G. oxydans* ที่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์ DHA





## รายการอ้างอิง

- Adlercreutz, P. Holst, O., & Mattiasson, B. (1985). Characterization of *Gluconobacter oxydans* immobilized in calcium alginate. Applied Microbiology and Biotechnology, 22(1), 1-7.
- Albin, A. Bader, J. Gerlach, E., & Stahl, U. (2007). Improving fermentation and biomass formation of *Gluconobacter oxydans*. Biotechnology, 131(2), 160-161.
- Asnis, R. E., & Brodie, A. F. (1953). A glycerol dehydrogenase from *Escherichia coli*. Biological Chemistry, 203(1), 153-159.
- Bauer, R. Katsikis, N. Varga, S., & Hekmat, D. (2005). Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. Bioprocess and Biosystems Engineering, 28(1), 37-43.
- Berger, L. R. Stamford, T. C. Stamford-Arnaud, T. M. De Oliveira Franco, L. Do Nascimento, A. E. Cavalcante, H. M. Macedo, R. O., & De Campos-Takaki, G. M. (2014). Effect of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CW) on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity. Molecules, 19(3), 2771-2792.
- Bicker, M. Endres, S. Ott, L., & Vogel, H. (2005). Catalytical conversion of carbohydrates in subcritical water: A new chemical process for lactic acid production. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 239(1-2), 151-157.
- Bories, A. Claret, C., & Soucaille, P. (1991). Kinetic study and optimisation of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*. Process Biochemistry, 26(4), 243-248.
- Brown, D. (2001). Skin pigmentation enhancers. Photochem Photobiol B Biol, 63.
- Charles., & Marvin. (1985). Fermentation scale-up: Problems and possibilities. Trends in Biotechnology, 3(6), 134-139.

- Claret, C. Bories, A., & Soucaille, P. (1993). Inhibitory effect of dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans*: Kinetic aspects and expression by mathematical equations. Journal of Industrial Microbiology, *11*(2), 105-112.
- Claret, C. Salmon, J. M. Romieu, C., & Bories, A. (1994). Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. Applied Microbiology and Biotechnology, *41*(3), 359-365.
- De Ley, J., & Swings, J. (1994). Genus *Gluconobacter*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, *1*, 275-278.
- Deppenmeier, U. Hoffmeister, M., & Prust, C. (2002). Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. Applied Microbiology and Biotechnology, *60*(3), 233-242.
- Fesq, H. Brockow, K. Strom, K. Mempel, M. Ring, J., & Abeck, D. (2001). Dihydroxyacetone in a new formulation—a powerful therapeutic option in vitiligo. Dermatology, *203*.
- Gudin, C., & Chaumont, D. (1991). Algal biotechnology Cell fragility — The key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors. Bioresource Technology, *38*(2), 145-151.
- Hata, N. Ogbonna, J. C. Hasegawa, Y. Taroda, H., & Tanaka, H. (2001). Production of *astaxanthin* by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. Journal of Applied Phycology, *13*(5), 395-402.
- Hekmat, D. Bauer, R., & Fricke, J. (2003). Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. Bioprocess and Biosystems Engineering, *26*(2), 109-116.
- Hekmat, D. Bauer, R., & Fricke, J. (2003b). Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. Bioprocess and Biosystems Engineering, *26*.
- Hu, Z.-C. Zhi-Qiang, L. Yu-Guo, Z., & Yin-Chu, S. (2010). Production of 1,3-Dihydroxyacetone from Glycerol by *Gluconobacter oxydans* ZJB09112. Journal of Microbiology and Biotechnology, *20*(2), 340-345.

- Hu, Z.-C. Zheng, Y.-G., & Shen, Y.-C. (2011). Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor. Bioresource Technology, 102(14), 7177-7182.
- Issarapayup, K. Powtongsook, S., & Pavasant, P. (2009). Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*. Journal of Biotechnology, 142(3-4), 227-232.
- Kaewpintong, K. Shotipruk, A. Powtongsook, S., & Pavasant, P. (2007). Photoautotrophic highdensity cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. Bioresource Technology, 98, 288-295.
- Kaewrat, C. (2011). Production of 1,3-propanediol from biodiesel-based glycerol by *Clostridium butyricum* DSM 5431 and reduction of production expense by modifying the composition of culture medium. (Master Thesis), Chulalongkorn University.
- Kato, N. Kobayashi, H. Shimao, M., & Sakazawa, C. (1986). Dihydroxyacetone production from methanol by a dihydroxyacetone kinase deficient mutant of *Hansenula polymorpha*. Applied Microbiology and Biotechnology, 23(3), 180-186.
- Kim, S. D. Baker, C. G. J., & Bergougnou, M. A. (1977). Bubble characteristic in three phase fluidized beds. Chemical Engineering Science, 32(11), 1299-1306. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0009-2509\(77\)85024-0](http://dx.doi.org/10.1016/0009-2509(77)85024-0)
- Kommanee, J. Tanasupawat , S., & Yukphan, P. (2010). TAXONOMY OF ACETIC ACID BACTERIA AND OXIDATIVE PRODUCTS OF ACETOBACTER AND *GLUCONOBACTER* STRAINS. Chulalongkorn University.
- Krichnavaruk, S. Loataweesup, W. Powtongsook, S., & Pavasant, P. (2005). Optimal growth conditions and the cultivation of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactor. Chem. Eng 105, 91-98.
- Lee, J. (1992). *Biochemical Engineering*. Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall.

- Liu, Z. Hu, Z. Zheng, H., & Shen, Y. (2007). Optimization of cultivation conditions for the production of 1,3-dihydroxyacetone by *Pichia membranifaciens* using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal, 38, 285-291.
- Liu, Z. Hu, Z. Zheng, Y., & Shen, Y. (2008). Optimization of cultivation conditions for the production of 1,3-dihydroxyacetone by *Pichia membranifaciens* using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal, 38(3), 285-291.
- Maryam. Hosseini. Seyed, A. Shojaosadati., & Jafar, T. (2003). Application of a Bubble-Column Reactor for the Production of a Single-Cell Protein from Cheese Whey. Ind. Eng. Chem., 42, 764-766.
- Mishra, R. Jain, S. R., & Kumar, A. (2008). Microbial production of dihydroxyacetone. Biotechnol.Adv, 26, 293-303.
- Mohammed, B. A. G. A.-B. Safa, A., AL-Naimi. , & Sundush., A. (2009). The Optimum Conditions for Production of Soya Peptone by Acidic Hydrolysis of Soya Proteins. Al-Khwarizmi Engineering, 5.
- Nabe, K. Izuo, N. Yamada, S., & Chibata, I. (1979). Conversion of Glycerol to Dihydroxyacetone by Immobilized Whole Cells of *Acetobacter xylinum*. Applied and Environmental Microbiology, 38(6), 1056-1060.
- Neijssel, O. Hueting, S. Crabbendam, K., & Tempest, D. (1975). Dual pathways of glycerol assimilation in *Klebsiella aerogenes* NCIB 418. Archives of Microbiology, 104(1), 83-87.
- Nienow, A. W. (1990). Agitators for mycelial fermentations. Trends in Biotechnology, 8, 224-233.
- Leonhard Ohrem, H., & Voß, H. (1996). Process model of the oxidation of glycerol with *Gluconobacter oxydans*. Process Biochemistry, 31(3), 295-301.
- Shenghua, W. Qingxun, S., & Dongzhi, W. (2006). Repeated Use of Immobilized *Gluconobacter oxydans* Cells for Conversion of Glycerol to Dihydroxyacetone. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 37.
- Streekstra, H. Teixeira, D. Mattos, M. Neijssel, O., & Tempestz, D. (1987). Overflow metabolism during anaerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on

- glycerol and dihydroxyacetone in chemostat culture. Archives of Microbiology, 147(3), 268-275..
- Švitel, J., & Šturdík, E. (1994). Product yield and by-product formation in glycerol conversion to dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 78(5), 351-355.
- Tramper, J. Luyben, K. C. A. M., & Van Den Tweel, W. J. J. (1983). Kinetic aspects of glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans* cells immobilized in calcium alginate. European journal of applied microbiology and biotechnology, 17(1), 13-18.
- Tung, H.-L. Tu, C.-C. Chang, Y.-Y., & Wu, W.-T. (2000). Bubble characteristics and mass transfer in an airlift reactor with multiple net draft tubes. Bioprocess Engineering, 18(5), 323-328.
- Underkofler, L. A. Bantz, A. C., & Peterson, W. H. (1943). Growth Factors for Bacteria: XIV. Growth Requirements of *Acetobacter suboxydans*. Journal of Bacteriology, 45(2), 183-190.
- Virtanen, A. I., & Nordlund, M. (1933). An improved method for the preparation of dihydroxyacetone. Biochemical Journal, 27(2), 442-444.
- Wei, S. Song, Q., & Wei, D. (2007). Production of *Gluconobacter oxydans* Cells from Low-cost Culture Medium for Conversion of Glycerol to Dihydroxyacetone. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 37(2), 113-121.
- Wethmar, M., & Deckwer, W. D. (1999). Semisynthetic culture medium for growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. Biotechnology Techniques, 13(4), 283-287.
- White, S. A., & Claus, G. W. (1982). Effect of Intracytoplasmic Membrane Development on Oxidation of Sorbitol and Other Polyols by *Gluconobacter oxydans*. Journal of Bacteriology, 150(2), 934-943.
- Young, T. Eom, C. Song, T. Cho, J., & Kim, Y. (1997). Dihydroxyacetone synthase from a methanol-utilizing *carboxydobacterium*, *Acinetobacter* sp. strain JC1 DSM 3803. Journal of Bacteriology, 179(19), 6041-6047.
- Yu-Peng, L. Yang, S. Cong, T. Hua, L. Xiao-Juan, Z. Kui-Qi, J., & Gang, W. (2013). Efficient production of dihydroxyacetone from biodiesel-derived crude

glycerol by newly isolated *Gluconobacter frateurii*. Bioresource Technology, 142, 384-389.

Zhong-Ce, H. Yu-Guo, Z., & Yin-Chu, S. (2011). Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor. Bioresource Technology, 102(14), 7177-7182.



### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย วีรพันธุ์ ไชยจันทร์ เกิดเมื่อวันที่ 7 พฤศจิกายน พ.ศ. 2532 ในจังหวัดเชียงราย สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนเทศบาล 6 นครเชียงราย จังหวัดเชียงราย หลักจากนั้นได้รับปริญญาวิศวกรรมบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ.2555 และได้ศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2556



