

การขยายส่วนการผลิตพอลิไฮดรอกซีบีโวลิตโดย *Bacillus megaterium* BA-019

นายบุญฤทธิ์ เมฆศิริพร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCALING UP OF POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION BY *Bacillus megaterium* BA-019

Mr. Bunyarit Meksiriporn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

บุญฤทธิ์ เมฆศิริพร : การขยายส่วนการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดย *Bacillus megaterium* BA-019 (SCALING UP OF POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION BY *Bacillus megaterium* BA-019) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
 รศ. ดร. ส่งศรี กุลปรีชา, อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. ณัฏฐา ทองจุล, 122 หน้า.

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาเกณฑ์และปัจจัยที่สำคัญต่อการขยายส่วนการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) โดย *B. megaterium* BA-019 โดยใช้ข้อมูลจากการทดลองในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยศึกษาผลของอัตราการกวน (400 600 และ 800 รอบต่อนาที) และอัตราการให้อากาศ (0.5 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที) ที่มีต่อค่า K_{La} การเติบโตของเซลล์ และการผลิต PHB ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ผลการทดลองพบว่าที่อัตราการกวนเดียวกันค่า K_{La} มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราการให้อากาศมากขึ้นและอัตราการกวนมีผลต่อค่า K_{La} มากกว่าอัตราการให้อากาศ ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณ PHB $Y_{X/S}$ $Y_{P/S}$ และอัตราการผลิต PHB มีค่ามากที่สุดเมื่ออัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ดังนั้นจึงใช้อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในการผลิต PHB แบบ fed-batch โดยการป้อนอาหารด้วยวิธี exponential feeding ในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้ค่าทางจลนศาสตร์ที่คำนวณได้จากภาวะดังกล่าวคำนวณอัตราการป้อนอาหารเข้า จากการศึกษาผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้า (7 10 และ 25 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) ที่มีต่อการเติบโตของเซลล์และการผลิต PHB ในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่าที่ C/N เท่ากับ 7 ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของ PHB และอัตราการผลิต PHB มีค่าเท่ากับ 90.42 กรัมต่อลิตร 35.45 กรัมต่อลิตร และ 1.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 27 ของการเลี้ยงเชื้อ งานวิจัยนี้ศึกษาการขยายส่วนการผลิต PHB จากถังหมักขนาด 10 ลิตร ไปสู่ถังหมักขนาด 300 ลิตร โดยใช้เกณฑ์คงที่ ได้แก่ อัตราส่วนของกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเร็วรอบปลายใบพัด และค่าเรย์โนลด์ส์นัมเบอร์ เมื่อพิจารณาเกณฑ์คงที่ทั้ง 3 เกณฑ์พบว่าอัตราส่วนของกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเกณฑ์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการขยายส่วนการผลิต PHB จากถังหมักขนาด 10 ลิตร มาสู่ถังหมักขนาด 300 ลิตร

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อ.....
 สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา.....2551.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4872571723: MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORDS: SCALE-UP/ PHB / *Bacillus megaterium* BA-019

BUNYARIT MEKSIRIPORN: SCALING UP OF POLYHYDROXYBUTYRATE
 PRODUCTION BY *Bacillus megaterium* BA-019. THESIS PRINCIPAL ADVISOR:
 ASSOC. PROF. SONGSRI KULPREECHA, Ph.D. THESIS COADVISOR: NUTTHA
 THONGCHUL, Ph. D., pp.122.

The research is aimed to investigate the criteria and important factors for scaling up the production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *B. megaterium* BA-019 using the data obtained from the process in 10-L fermentor. The effect of different agitation speed (400, 600 and 800 rpm) and aeration rate (0.5, 1.0 and 1.5 vvm) on $K_L a$ value, cell growth and PHB yield were investigated in 10-L fermentor. At the same agitation speed, $K_L a$ was increased with the increasing aeration rate. The results show that the agitation rate had a stronger influence on $K_L a$ than the aeration rate. The highest cell mass, PHB production, $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ and PHB productivity were obtained at 600 rpm and 1.0 vvm, respectively. Fed-batch fermentation in 10-L fermentor was operated at 600 rpm and 1.0 vvm using an exponential feeding strategy. The feed rate during fed-batch culture was calculated from the kinetic data obtained in batch culture at 600 rpm and 1.0 vvm in 10-L fermentor. The effect of the different C/N (7, 10 and 25 g sugar/g urea) in the feeding solution containing molasses and urea as the carbon and nitrogen sources on cell growth and PHB production was investigated. C/N ratio of 7 gave the maximum cell growth and the highest PHB production. In fed-batch culture, the highest cell density (90.42 g/l) and PHB concentration (35.45 g/l) were obtained at 27 h and PHB productivity was significantly increased up to 1.31 g/l-h. Compared with other PHB producing strains, the result in this study suggested that nitrogen limitation was not required in PHB synthesis in *B. megaterium* BA-019. Scale-up process was performed from 10-L to 300-L fermentor using the constant power input per unit volume (P/V), the constant impeller tip speed and the constant Reynolds number as scaling-up criteria. Among the three criteria, it was found that power input per unit volume is the most suitable criteria for scaling up of PHB production in 300-L fermentor.

Department Microbiology Student's Signature.....
 Field of Study Industrial Microbiology Principal Advisor's Signature.....
 Academic Year 2008 Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร. ณีฎฐา ทองจุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ท่านทั้งสองได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำอันมีค่า สอนให้ข้าพเจ้ารู้จักการคิดอย่างมีระบบ และสอนให้วางแผนงานวิจัยอย่างรอบคอบ รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ดียิ่งขึ้น ศิษย์ขอกราบขอพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ประภคิต์สิน สีहनนท์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โหมยิตานนท์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ดียิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ วาสนา โตเลียง ที่กรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณ นายอลงกรณ์ เหลืองทวีสุข และนางสาวสมฤติ ชุณหโรจน์ฤทธิ ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆเรื่องและให้กำลังใจในการทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ ในห้องวิจัย 462 ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยตลอดมา และสร้างความรู้สึที่ดีๆตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาคอุตสาหกรรมชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ และน้องๆ ที่ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้อง ที่ให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำย่อ.....	ณ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
PHA.....	2
โครงสร้างของ PHAs.....	5
การจัดจำแนกชนิดของ PHAs.....	5
พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ PHB.....	6
โครงสร้างและสมบัติของ PHB.....	7
วิธีการสังเคราะห์ PHB.....	9
ประโยชน์ของ PHA.....	10
การผลิต PHB จาก <i>Bacillus</i> sp.....	12
ปัจจัยที่มีผลต่อต้นทุนการผลิต PHB.....	13
กระบวนการผลิต PHB.....	18
กระบวนการหมักแบบ batch.....	21
กระบวนการหมักแบบ fed-batch.....	23
การผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม.....	27
การขยายส่วนการผลิต (scale-up of production scale).....	29
บทที่	
2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	36
อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์.....	36
จุลินทรีย์.....	39
อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	39
การผลิต PHB ในถังหมัก 10 ลิตร โดย <i>B. megaterium</i> BA-019.....	41

บทที่	หน้า
2 การผลิต PHB ในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ที่มีการเติม แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน เป็นสารอาหารป้อนเข้า.....	42
การผลิต PHB ในถังหมัก 300 ลิตร โดย <i>B. megaterium</i> BA-019.....	42
วิธีการวิเคราะห์.....	44
บทที่	
3 ผลการทดลอง.....	46
การผลิต PHB ในถังหมัก 10 ลิตร โดย <i>B. megaterium</i> BA-019.....	46
การผลิต PHB โดยการเติมสารอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง.....	64
การผลิต PHB ในถังหมัก 300 ลิตร โดย <i>B. megaterium</i> BA-019.....	72
บทที่	
4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	87
รายการอ้างอิง	94
ภาคผนวก.....	101
ภาคผนวก ก.....	102
ภาคผนวก ข.....	103
ภาคผนวก ค.....	104
ภาคผนวก ง.....	107
ภาคผนวก จ.....	120
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	122

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างและสะสม PHA	3
2	สมบัติบางประการทางกายภาพและความร้อนของพอลิเมอร์	8
3	เปรียบเทียบการผลิต PHB โดยกระบวนการหมักและต้นทุนการผลิตโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ	14
4	ผลของต้นทุนซับสเตรทและผลผลิต PHB ที่มีต่อราคา PHB	15
5	ราคาค่าต้นทุนการผลิต PHB เมื่อกำลังการผลิต และ ผลผลิตของ PHB แตกต่างกัน.....	16
6	การประยุกต์ใช้ดัชนีควบคุมสำหรับกระบวนการหมักแบบ fed-batch	25
7	ผู้ผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม จุลินทรีย์ และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต PHA	28
8	ความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์เมื่อขยายส่วนการผลิต	34
9	การเติบโตของ <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ.....	47
10	ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร	50
11	ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร	51
12	ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร	52
13	ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร	54
14	ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร	55

ตารางที่	หน้า
15 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร	56
16 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร	58
17 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร	59
18 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร	60
19 เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมัก 10 ลิตร เมื่อแปรค่าอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ.....	63
20 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 350 กรัมต่อลิตร ยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 25 กรัมต่อกรัม) เป็นสารอาหารป้อนเข้า.....	66
21 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 350 กรัมต่อลิตร ยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 10 กรัมต่อกรัม) เป็นสารอาหารป้อนเข้า.....	68

ตารางที่	หน้า
22 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 350 กรัมต่อลิตร ยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 7 กรัมต่อกรัม) เป็นสารอาหารป้อนเข้า.....	70
23 เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าต่างกัน.....	71
24 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 5 % ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น ให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร.....	75
25 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 280 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 300 ลิตร (กำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน)	77
26 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 190 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 300 ลิตร (กำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (tip speed) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน).....	80
27 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 60 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 300 ลิตร (กำหนดให้ค่าเรย์โนลด์ส์นัมเบอร์ (N_{RE}) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน)	83
28 การเปรียบเทียบค่าทางจลนศาสตร์ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมัก 300 ลิตร เพื่อผลิต PHB เมื่อทำการผลิตที่กำหนดเกณฑ์การขยายส่วนคงที่เหมือนในถังหมักขนาด 10 ลิตร.....	86

ตารางที่	หน้า
29	เปรียบเทียบการผลิต PHB โดยใช้จุลินทรีย์และเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน..... 93
30	การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที เมื่อ อัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร..... 108
31	การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที เมื่อ อัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร..... 109
32	การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที เมื่อ อัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร..... 110
33	การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที เมื่อ อัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร..... 111
34	การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที เมื่อ อัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร..... 112
35	การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที เมื่อ อัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร..... 113
36	การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที เมื่อ อัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร..... 114
37	การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที เมื่อ อัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร..... 115
38	การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที เมื่อ อัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร..... 116

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1	5
2	7
3	10
4	17
5	28
6	47
7	53
8	57
9	61
10	66
11	68
12	70

รูปที่	หน้า
13 การเจริญเติบโตของ <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเหลว MSM Rich medium และ Rich medium (x1/2).....	73
14 อัตราการเติบโตจำเพาะของ <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารเหลว MSM Rich medium และ Rich medium (x1/2).....	73
15 การผลิต PHB โดย <i>B. megaterium</i> BA-019 เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 5% ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น ให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที.....	75
16 การผลิต PHB โดย <i>B. megaterium</i> BA-019 เมื่อให้อัตราการกวนที่ 280 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (กำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (Pg/V) ของถังหมัก 300 ลิตร และ ถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน).....	78
17 การผลิต PHB โดย <i>B. megaterium</i> BA-019 เมื่อให้อัตราการกวนที่ 190 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (กำหนดให้ ความเร็วรอบของปลายใบพัด (tip speed) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน).....	81
18 การผลิต PHB โดย <i>B. megaterium</i> BA-019 เมื่อให้อัตราการกวนที่ 60 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (กำหนดให้ค่า เรย์โนลด์ส์นัมเบอร์ (N_{RE}) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน).....	84
19 การบันทึกปริมาณออกซิเจนละลายเมื่อปิดและเปิดการให้อากาศเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> BA-019 ในชั่วโมงที่ 12 โดยใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และ อัตราอากาศมีค่าเท่ากับ (ก) 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ข) 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ค) 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร.....	117
20 การบันทึกปริมาณออกซิเจนละลายเมื่อปิดและเปิดการให้อากาศเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> BA-019 ในชั่วโมงที่ 12 โดยใช้อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และ อัตราอากาศมีค่าเท่ากับ (ก) 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ข) 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ค) 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร.....	118

รูปที่

หน้า

- 21 การบันทึกปริมาณออกซิเจนละลายเมื่อปิดและเปิดการให้อากาศเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในชั่วโมงที่ 12 โดยใช้อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที และ อัตราอากาศมีค่าเท่ากับ (ก) 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ข) 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ค) 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร..... 119

คำย่อ

ตัวย่อ	คำอธิบาย
DCW	น้ำหนักเซลล์แห้ง
g/l	กรัมต่อลิตร
g/l-h	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
h	ชั่วโมง
OUR	อัตราการใช้ออกซิเจน
PHB	พอลิไฮดรอกซีบีวทิเรต
PHB conc.	ความเข้มข้นของ PHB
PHB prod.	อัตราการผลิต PHB
$Y_{X/S}$	ผลของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป
$Y_{P/S}$	ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป
$Y_{P/X}$	ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหนึ่งหน่วยเซลล์
% by wt.	เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
μ	อัตราการเติบโตจำเพาะ

บทที่ 1

บทนำ

ผลิตภัณฑ์พลาสติกเป็นผลิตภัณฑ์ที่หาได้ง่าย ราคาถูก สะดวก และทนทาน และผลิตภัณฑ์หลายประเภทถูกออกแบบสำหรับการใช้งานครั้งเดียว ดังนั้นปัจจัยเหล่านี้จึงทำให้เกิดการทิ้งเป็นขยะเป็นจำนวนมากในแต่ละปีและส่งผลกระทบต่อด้านการกำจัด ถึงแม้ว่าจะมีการรณรงค์ทั้งการลดปริมาณการใช้พลาสติก การนำกลับมาใช้ใหม่และการเรียกกลับคืนเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ แต่ปัญหาด้านมาตรการที่ไม่สามารถดำเนินการได้อย่างเต็มที่ ค่าใช้จ่ายในการจัดการนำมาใช้ใหม่ที่ค่อนข้างสูง ทำให้การรณรงค์ด้านการเก็บรวบรวม การทิ้ง และการนำมาใช้ใหม่ไม่บรรลุผล จึงทำให้ปริมาณขยะพลาสติกของโลกยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Reddy และคณะ, 2003) อย่างไรก็ตามด้วยปัญหาด้านมาตรการที่ไม่สามารถดำเนินการได้อย่างเต็มที่และค่าใช้จ่ายในการดำเนินการที่ค่อนข้างสูง ทำให้การรณรงค์ด้านการเก็บรวบรวม การทิ้ง และการนำมาใช้ใหม่ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ส่งผลให้ปริมาณขยะพลาสติกของโลกยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง มีการประมาณว่าขณะนี้ปริมาณการใช้พลาสติกทั่วโลก มีมากกว่า 2 หมื่นล้านตันต่อวัน และก่อให้เกิดขยะพลาสติกจำนวนมาก โดยขยะพลาสติกกว่า 20% มาจากพลาสติกจำพวกบรรจุภัณฑ์ต่างๆ โดยในประเทศไทยในแต่ละวันมีขยะพลาสติกมากถึง 15 ล้านตัน และเมื่อพิจารณาด้านวัตถุดิบ ได้แก่ น้ำมันปิโตรเลียมหรือเชื้อเพลิงจากฟอสซิล ที่มีปริมาณจำกัด และได้มีการประมาณว่าจะหมดไปใน 90 ปีข้างหน้า ดังนั้นประมาณร้อยละ 5 ของปิโตรเลียมที่นำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกนั้น นอกจากจะมีแนวโน้มของราคาสูงขึ้นตามราคาน้ำมันแล้ว ยังอาจเกิดวิกฤตด้านการขาดแคลนวัตถุดิบด้วย

นอกจากนี้ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นเรื่องมลภาวะอากาศ (เช่น สภาวะโลกร้อนจากการเพิ่มขึ้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ การลดลงของโอโซน หมอกควันจากการเผาผลาญเชื้อเพลิง) ปัญหาทรัพยากรน้ำ (เช่น แหล่งน้ำมีความเป็นกรดหรือมีแร่ธาตุมากเกินไปซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ) ปัญหาทรัพยากรดินและน้ำ (เช่น การสะสมของพลาสติกที่ไม่ย่อยสลาย) จัดว่าเป็นอีกประเด็นหนึ่งที่ต้องการหาแนวทางแก้ไขเพื่อให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุด ผลกระทบดังกล่าวจึงเป็นแรงผลักดันในการค้นหาแหล่งพลังงานที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและแหล่งวัตถุดิบที่ทดแทนใหม่ได้ (renewable resources) สำหรับพลาสติกนั้น พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพเป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถนำมาใช้เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวได้ นอกจากนี้ความต้องการและเงื่อนไขด้านสิ่งแวดล้อมเป็นแรงผลักดันที่ดีให้เกิดเทคโนโลยีและนวัตกรรมสู่การ

พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้โดยชีวภาพสามารถแบ่งออกได้ 3 ประเภทคือ (Khanna และคณะ, 2005) พลาสติกที่สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางเคมี (Chemically synthesized polymers) พลาสติกประเภทนี้ ได้แก่ พอลิไกลคอลลิกเอซิด พอลิแลคติกเอซิด พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และ พอลิเอทิลีนออกไซด์ พลาสติกประเภทนี้ง่ายต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์ และ จุลินทรีย์ แต่ พลาสติกประเภทนี้มีข้อด้อยคือมีคุณสมบัติที่ด้อยกว่าพลาสติกที่ได้จากปิโตรเคมีจึงไม่เป็นที่ ต้องการในทางการค้า พลาสติกที่มีการเติมแป้งเข้าไปเป็นองค์ประกอบ (Starch-based biodegradable plastics) สำหรับพลาสติกประเภทนี้มีการเติมแป้งลงไปเพื่อทำหน้าที่เป็น filler และ cross linking agent เช่น starch-polyethylene อย่างไรก็ตามพลาสติกประเภทนี้มีข้อเสียคือ เป็น พลาสติกที่ย่อยสลายได้เป็นบางส่วนเท่านั้น โดยเมื่อทิ้งพลาสติกประเภทนี้ลงสู่สิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมจะย่อยสลายเฉพาะส่วนที่เป็นแป้งเท่านั้น ส่วนที่เป็นพลาสติกจะไม่ถูกย่อย สลายและคงอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน และพลาสติกในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates หรือ PHAs) พลาสติกในกลุ่มนี้มีข้อดีคือ สามารถย่อยสลายได้โดย สมบูรณ์และมีสมบัติที่คล้ายกับพลาสติกที่ได้จากกระบวนการปิโตรเคมี เช่น พอลิโพรพิลีน (polypropylene หรือ PP) และ พอลิเอทิลีน (polyethylene หรือ PE) พลาสติกประเภทนี้เป็นพอลิ เอสเทอร์ของไฮดรอกซีอัลคาโนเอตซึ่งถูกสังเคราะห์และสะสมภายในเซลล์จุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่ง ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานภายในเซลล์

PHA

สิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอต (Prokaryote) มีการสร้างและสะสม PHA ภายในเซลล์ จาก การศึกษาพบว่ามีจุลินทรีย์มากกว่า 80 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 สามารถสร้างและสะสม PHA ใน สภาวะที่ถูกจำกัดสารอาหารอื่นๆ และมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปเพื่อใช้สำหรับเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงานของเซลล์ รวมทั้งใช้สำหรับการสร้างสปอร์ (sporulation) ใน *Bacillus* (Williamson และ Wilkinson, 1958) และการสร้างซีสต์ (encystment) ใน *Azotobacter* (Dawes, 1973) เช่นเดียวกับการสะสมแป้งในพืชและการสะสมไกลโคเจนในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Bloembergen และ คณะ, 1986) PHA จะถูกสะสมอยู่ในรูปของแกรนูล ขนาดและจำนวนของแกรนูลต่อเซลล์จะ แตกต่างกันในแต่ละชนิดของจุลินทรีย์ เช่น *Alcaligenes eutrophus* มีแกรนูลขนาด 0.24 - 0.50 μm จำนวน 8 -13 แกรนูลต่อเซลล์ จุลินทรีย์ที่มีการสะสม PHA สามารถตรวจสอบเบื้องต้นได้โดยการ ย้อมสีชูดานแบล็คบี หรือ ไนล์บลู (Byrom, 1994)

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างและสะสม PHA (Brandl และคณะ, 1990)

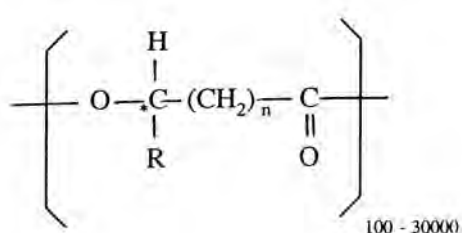
การจำแนกสายพันธุ์โดย Bergey's Manual	จีโนม	ปริมาณ PHA สูงสุด (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	แหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต PHA
Group 1	<i>Chloroflexus</i>	<1	yeast extract /glycylglycine
Phototrophic bacteria	<i>Chromatium</i>	20	acetate
	<i>Ectothiorhodospira</i>	ND	NS
	<i>Lamprocystis</i>	ND	NS
	<i>Rhodobacter</i>	80	acetate
	<i>Rhodospirium</i>	47	acetate
	<i>Thiocapsa</i>	ND	NS
	<i>Thiocystis</i>	ND	NS
	<i>Thiodictyon</i>	ND	NS
	<i>Thiopedia</i>	ND	NS
	<i>Thiosphaera</i>	ND	acetone/CO ₂
	Group 2 Gliding bacteria	<i>Beggiatia</i>	57
<i>Leptothrix</i>		67	pyruvate
<i>Sphacrotilus</i>		45	glucose/peptone
Group 3 Sheathed bacteria	<i>Caulbacter</i>	36	glucose/glutamate
Group 4 Budding and/or curved bacteria	<i>Azospirillum</i>	75	malate
	<i>Oceanospirillum</i>	ND	NS
	<i>Spirillum</i>	40	lactate
Group 7 Gram-negative aerobic rods and cocci	<i>Alcaligenes</i>	96	fructose
	<i>Azotobacter</i>	73	glucose
	<i>Beijerinckia</i>	38	glucose
	<i>Derxia</i>	26	glucose
	<i>Methylobacterium</i>	47	glucose
	<i>Methylosinus</i>	25	methanol
	<i>Pseudomonas</i>	67	methanol
	<i>Rhizobium</i>	57	methanol
	<i>Xanthobacter</i>	ND	NS
	<i>Zoogloea</i>	ND	yeast extract/casamino

การจำแนกสายพันธุ์โดย Bergey's Manual	จีโนส	ปริมาณ PHA สูงสุด (%ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	แหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต PHA
Group 8 Gram-negative facultative anaerobic rods	<i>Chromobacterium</i>	37	glucose/peptone
	<i>Escherichia</i>	ND	tryptone/yeast extract
	<i>Haemophilus</i>	ND	yeastextract/glucose
	<i>Photobacterium</i>	ND	brain heart infusion
	<i>Vibrio</i>	ND	NS
Group 9 Gram-negative anaerobic bacteria	<i>Syntrophomonas</i>	30	gluconate
Group 10 Gram- negative cocci and cocibacilli	<i>Acinetobacter</i>	<1	glucose
	<i>Lampropedia</i>	ND	NS
	<i>Moraxella</i>	ND	NS
Group 12 Gram- negative chemolithotrophic	<i>Paracoccus</i>	ND	NS
	<i>Nitrobacter</i>	ND	NS
Group 13 Archaeobacteria	<i>Nitrococcus</i>	ND	NS
	<i>Thiobacillus</i>	ND	Glucose
Group 14 Gram-possitive cocci	<i>Halobacterium</i>	38	glucose
Group 15 Endospore- forming rods and cocci	<i>Micrococcus</i>	28	peptone/tryptone
Group 17 Actinomycetes	<i>Bacillus</i>	25	glucose
	<i>Clostridium</i>	13	trptone/peptone/glucose
Cyanobacteria	<i>Mycoplana</i>	ND	methanol
	<i>Nocardia</i>	14	butane
	<i>Streptomyces</i>	4	glucose
	<i>Aphanothece</i>	<1	NS
	<i>Chlorogloea</i>	10	acetate, CO ₂
	<i>Gamphosphaeria</i>	ND	ND
	<i>Microcoleus</i>	<1	ND
	<i>Microcystis</i>	ND	ND
	<i>Spirulina</i>	6	CO ₂

หมายเหตุ ND = ปริมาณ PHA สูงสุดไม่ได้ทำการวิเคราะห์ NS = แหล่งคาร์บอนไม่จำเพาะ

โครงสร้างของ PHAs

PHAs มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (linear polyester) ของโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวหนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์อีกตัวหนึ่ง ตรงตำแหน่งปีต้าคาร์บอนจะเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) แสดงโครงสร้างเป็น D(-)configuration (Wang และ Bakken, 1998) และแต่ละโมโนเมอร์จะเชื่อมต่อกันแบบหัวต่อหาง (head to tail configuration) เช่นเดียวกับ พอลิโพรพิลีน (Byrom, และคณะ, 1994)



* แสดงตำแหน่งปีต้าคาร์บอน

n = 1	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต) หรือ P(3HP)
	R = เมทิล (CH ₃)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB)
	R = เอทิล (C ₂ H ₅)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) หรือ P(3HV)
	R = โพรพิล (C ₃ H ₇)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีคาโปรเอต) หรือ P(3HC)
	R = บิวทิล (C ₄ H ₉)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) หรือ P(3HH)
	R = เพนทิล (C ₅ H ₁₁)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต) หรือ P(3HO)
	R = โนนิล (C ₉ H ₁₉)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีโดเดคะโนเอต) หรือ P(3HD)
n = 2	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ (4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(4HB)
n = 3	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ (5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) หรือ P(5HV)

รูปที่ 1 โครงสร้างของโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Madison และ Huisman, 1999)

การจัดจำแนกชนิดของ PHAs

PHAs สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มตามชนิดของโมโนเมอร์ที่มาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ ดังนี้

1. โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) จะประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียว ได้แก่ พอลิ บิวทไฮดรอกซีบิวทิเรต [Poly (β - hydroxybutyrate) หรือ P(3HB)]
2. เฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) จะประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิด ตัวอย่าง เช่น โคพอลิเมอร์ (copolymer) จะประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ พอลิ(3-ไฮดรอกซี

นอกจากนี้ PHAs สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในหน่วยโมโนเมอร์ (Sun และคณะ, 2007)

1 short-chain-length (SCL) PHAs คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 3-5 อะตอม

2 medium-chain-length (MCL) PHAs คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 6-14 อะตอม

3 long-chain-length (LCL) PHAs คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมมากกว่า 14 อะตอม

พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ PHB

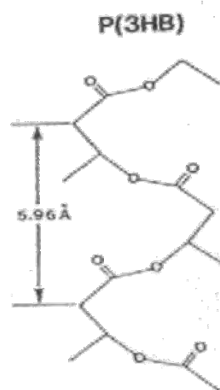
PHB เป็นโฮโมพอลิเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต สามารถสังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด สูตรเคมีของ PHB คือ $(C_4H_6O_2)_n$ PHB ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นถูกเก็บไว้ในแกรนูลภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ แกรนูล PHB ถูกหุ้มด้วยเยื่อเซลล์ที่มีไขมันและโปรตีนหนาประมาณ 2 นาโนเมตร โดยแต่ละแกรนูลมีสายโซ่พอลิเมอร์อย่างน้อย 1000 โมเลกุล PHB ที่แยกได้จากเซลล์แบคทีเรียมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากประมาณ $10^5 - 10^6$ Da และมีระดับความเป็นผลึกสูง (degree of crystallinity) มากกว่า 50 % มีอุณหภูมิหลอมเหลวประมาณ 180 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างจากพอลิเมอร์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น โพรตีน และ โพลีแซคคาไรด์ (Byrom, 1987; Doi, 1990) แบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถสะสม PHB ได้ 30-80 % ของความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเติบโตภายใต้ภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปและมีการจำกัดปริมาณสารอาหารจำเป็น (Lee, 1996a; Madison และ Huisman, 1999)

สาเหตุที่ PHB ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์เนื่องจากมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพคล้ายกับ PP และ PE แต่ PHB สามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์โดยชีววิธี นอกจากนี้ยังมีสมบัติเป็นไพโซอิเล็กทริก (piezoelectric) ที่เข้ากับเนื้อเยื่อคนได้ มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก และสามารถนำไปผสมกับพอลิเมอร์อื่นๆเพื่อให้มีสมบัติตามต้องการได้ ดังนั้นจึงสามารถนำ PHB ไป

โครงสร้างและสมบัติของ PHB

1. โครงสร้างผลึก (crystal structure)

Cornibert และ Marchessault (1972) (อ้างถึงใน Dawes และ Senior, 1973; อ้างถึงใน Doi, 1990) ทำการศึกษาโครงสร้างผลึกของ PHB โดยใช้เทคนิค X-ray diffraction พบว่าโครงสร้าง (conformation) ของโมเลกุล PHB เป็นแบบอัดตัวแน่นและแบบเกลียวเวียนขวา (right-handed helix) และมีหน่วยซ้ำ fiber repeat เท่ากับ 0.596 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 โครงสร้างผลึกของ PHB (Doi, 1990)

2. สมบัติทางกายภาพและความร้อน (physical and thermal properties)

PHB มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติกโดยมีอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature) ประมาณ 180 องศาเซลเซียส เมื่อผลึกเย็นตัวอย่างช้าๆหลังการหลอมเหลวจะได้เป็นสเฟียรูไลต์ (spherulites) ขนาดใหญ่ PHB มีสถานะเป็นของแข็งคล้ายแก้ว (glassy state) โดยมีอุณหภูมิการทรานซิชันประมาณ 4 องศาเซลเซียส เมื่อตกตะกอน PHB ด้วยสารละลายเจือจางจะได้ผลึกเป็นชั้นบางๆซึ่งความหนาของชั้นผลึกขึ้นกับอุณหภูมิการตกผลึกและน้ำหนักโมเลกุลของ PHB ค่าโมดูลัสของยัง และ Tensile strength ของแผ่นฟิล์ม PHB มีค่าใกล้เคียงกับ PP สมบัติบางประการของ PHB เปรียบเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีแสดงได้ดังตารางที่ 2

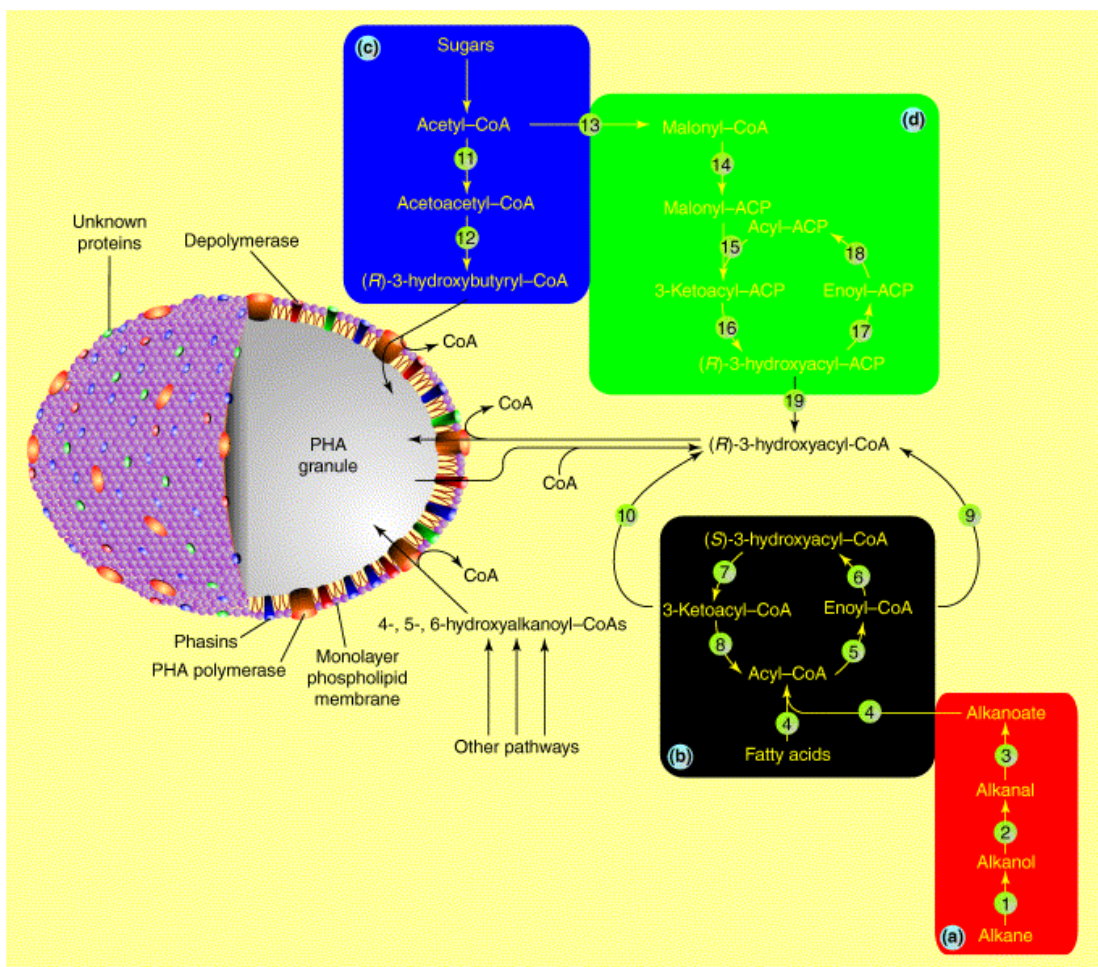
ตารางที่ 2 สมบัติบางประการทางกายภาพและความร้อนของพอลิเมอร์ (Doi, 1990)

คุณสมบัติ	PP	PHB
จุดหลอมเหลว (° C)	171 – 186	171 – 182
ความสามารถเป็นผลึก (%) (crystallinity)	65 – 70	65 – 80
ความหนาแน่น (g/cm ³)	0.94 – 0.95	1.23 – 1.25
น้ำหนักโมเลกุล (x 10 ⁵)	2.2 – 7	1 – 8
การกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution)	5 – 12	2.2 – 3
ความแข็ง (GPa) (flexural modulus)	1.7	3.5 – 4
ความสามารถในการต้านแรงดึง (MPa) (tensile strength)	39	40
ความสามารถในการขยายตัว (%) (extension to break)	400	6-8
ความทนทานต่อแสงอุลตราไวโอเลต (UV resistance)	ไม่ดี	ดี
ความทนทานต่อตัวทำละลาย (solvent resistance)	ดี	ไม่ดี
ความสามารถให้ออกซิเจนผ่าน (cm ³ m ⁻² atm ⁻¹ d ⁻¹) (oxygen permeability)	1700	45

น้ำหนักโมเลกุลเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์โดยจะส่งผลต่อคุณสมบัติการสลายตัว ความสามารถในการละลาย และความหนืด เป็นต้น PHB ที่ผลิตได้จะมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไปทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (Doi, 1990) Yeom และ Yoo (1995) รายงานศึกษาผลของความเข้มข้นกรดต่างต่อน้ำหนักโมเลกุลของ PHB ซึ่งผลิตได้จาก *Alcaligenes* sp.K-912 พบว่าเมื่อใช้ค่าความเป็นกรดต่างในการเลี้ยงเชื้อสูงจะได้ PHB ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงโดยที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0 6.5 7.0 และ 8.0 ทำให้ได้ PHB ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 150,000 250,000 580,000 และ 650,000 Da ตามลำดับ

วิธีการสังเคราะห์ PHB

การสังเคราะห์ PHB และการควบคุมการสังเคราะห์ PHB เกิดขึ้นโดยผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งสารตั้งต้นของวิธีการสังเคราะห์ PHB คือ อะเซทิลโคเอ (acetyl-CoA) โดยปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์ 3 ตัว ได้แก่ β -ketothiolase โดยเอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวกันของอะเซทิลโคเอ 2 โมเลกุล ให้เป็นอะเซโตอะเซทิลโคเอ (acetoacetyl-CoA) จากนั้นสารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์เป็น ดี(-)-3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ (D(-)-3-hydroxybutyryl CoA) โดยการเร่งของเอนไซม์ NADH/NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductase และเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB synthase วิธีการสังเคราะห์ PHB จากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ แสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 วิธีการสังเคราะห์ PHB โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (Luengo และคณะ, 2003)

ประโยชน์ของ PHA (Zinn และ Hany, 2005; Madison และ Huisman, 1999)

1 ประโยชน์ทางการเกษตรกรรม และปศุสัตว์

1.1 ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุปุ๋ย สารโหมน growth factors ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช แคปซูลจะค่อย ๆ สลายทีละน้อยโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินพร้อมกับสารที่บรรจุข้างในถูกปล่อยออกมาให้สารดังกล่าวคงอยู่ในดินหรือตำแหน่งที่ต้องการใช้งานได้เป็นเวลานาน จึงเป็นการช่วยประหยัดเวลา แรงงาน และลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้ยังใช้เป็นพลาสติกคลุมดินรักษาความชื้น ซึ่งเมื่อหมดเวลาการใช้งานจะค่อย ๆ ถูกสลายไปโดยธรรมชาติ

1.2 ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุยารักษาโรคและวัคซีนต่าง ๆ ในสัตว์เลี้ยง เช่น วัคซีนป้องกันโรคระบาด ยาถ่ายพยาธิ และบรรจุยาประเภทที่มีกลไกการออกฤทธิ์นาน และสามารถกำจัดเมื่อเลิกใช้โดยทิ้งลงได้ทะเลได้เนื่องจากสามารถย่อยสลายอย่างรวดเร็ว

2. ประโยชน์ทางการแพทย์

เนื่องจาก PHB มีสมบัติในการเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) และสามารถย่อยสลายได้ในสิ่งมีชีวิต โดยนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น วัสดุเส้นเป็ลื่องในงานด้านศัลยกรรม เช่น ใช้ทำหลอดเลือดเทียม เข็มเย็บแผล ไหมเย็บแผล ผ้าซับเลือด และผ้าสนามแผล เป็นต้น วัสดุเพื่อการบำบัดโรค ได้แก่ แคปซูลบรรจุยาหรือวัคซีนที่ต้องการให้ด้วยาค่อย ๆ ถูกปล่อยออกมาปริมาณน้อย ๆ เป็นเวลานาน ใช้กระดูกเทียมโดยอาศัยสมบัติเป็น piezoelectric ของ PHA ซึ่งคล้ายกับสมบัติที่มีในกระดูกธรรมชาติ จึงใช้เป็นแผ่นยึดกระดูกมีผลต่อการสร้างกระดูกขึ้นมาทดแทน

3. การใช้เป็นวัสดุประเภทบรรจุภัณฑ์ หรือส่วนประกอบของอุปกรณ์บางประเภท

ใช้ PHB เป็นวัสดุในการผลิตขวดแชมพู ใช้ทำบรรจุภัณฑ์ บรรจุอาหารประเภทถุง ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป แผ่นฟิล์มถนอมอาหาร ใช้ทำหมวกนิรภัยสำหรับจักรยาน ใช้ทำวัสดุที่ใช้ครั้งเดียวทิ้ง ใช้ทำวัสดุอื่น ๆ เช่น ที่วางลูกกอล์ฟ วัสดุเส้นใย กาวที่ละลายด้วยความร้อน สารเคลือบผิวแผ่นฟิล์ม เป็นต้น

จากประโยชน์ต่าง ๆ ของ PHA ที่กล่าวมาแล้ว แสดงให้เห็นว่า PHA สามารถนำมาใช้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีในการใช้งานด้านต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังเป็นวิธีการแก้ปัญหาขยะตกค้างในสิ่งแวดล้อม ถึงแม้ว่า PHA จะมีประโยชน์มากทางด้านสิ่งแวดล้อม แต่ยังไม่เป็นที่นิยมแพร่หลาย เนื่องจากต้นทุนในการผลิตสูงเมื่อเทียบกับพลาสติกที่ได้จากปิโตรเคมี (Byrom, 1987) จึงทำให้พลาสติกชีวภาพมีราคาแพง ในอนาคตอันใกล้ถ้าสามารถลดต้นทุนค่าใช้จ่ายในขั้นตอนต่าง ๆ ลงได้ ก็จะทำให้พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพนี้เป็นที่นิยมของคนทั่วโลก และเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่ง

PHB ซึ่งผลิตได้โดย Biomer[®] บริษัท Biomer มีราคาประมาณ 20 ยูโร/กิโลกรัม และ PHBV ซึ่งผลิตได้โดย Biopol[®] จากบริษัท Metabolix มีราคาประมาณ 10 - 12 ยูโร/กิโลกรัม² ซึ่งแพงกว่าพอลิเมอร์ที่มีแปงเป็นองค์ประกอบพื้นฐานหรือพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดอื่นอยู่มาก เนื่องจากวัตถุดิบมีราคาแพง เป็นผลให้ราคาต้นทุนการผลิตสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำให้บริสุทธิ์ (product recovery) และกำลังการผลิตที่น้อย ปัจจุบันค่าใช้จ่ายจากวัตถุดิบคิดเป็นร้อยละ 40 - 50 ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด การใช้แหล่งคาร์บอนที่ต้นทุนต่ำช่วยทำให้ราคาของ PHA ต่ำลงได้

การผลิต PHB จาก *Bacillus* sp.

หลังจากการค้นพบ PHB จาก *Bacillus megatarium* โดย Lemoigne ในปี 1926 เป็นต้นมา มีการวิจัยการผลิต PHB โดยจุลินทรีย์ชนิดนี้ แต่ไม่มากเท่ากับการศึกษาใน *Alcaligenes eutrophus* ในปี 1958 Williamson และ Wilkinson ได้แยกและประมาณค่า PHB inclusions ของ *Bacillus* สปีชีส์ต่างๆ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายอัลคาไลน์โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ซึ่งทำให้เซลล์เกิดการย่อยสลายและปล่อย intracellular lipid inclusion ออกมา เมื่อวิเคราะห์ inclusion ของ *B. cereus* ที่แยกได้และทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่าประกอบด้วย PHB 89% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และไขมันที่ละลายได้ในอีเทอร์ 11% โดยปริมาตร Kominek และ Halvorson (1965) ทำการศึกษาเมตาบอลิซึมของ PHB และอะซีโตอิน (acetoin) ในเชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ T พบการสังเคราะห์ PHB เริ่มต้นขึ้นหลังจากเชื้อหยุดการเติบโต และสามารถสะสม PHB ได้สูงสุดก่อนเกิดการสร้างสปอร์ ซึ่งในระหว่างกระบวนการสร้างสปอร์ PHB จะถูกย่อยสลาย ผลการศึกษาของ Wakisaka และคณะ (1982) สรุปได้ว่า *Bacillus thuringiensis* จะสร้าง PHB เมื่อมีความเข้มข้นของโปแตสเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ และแอมโมเนียมซัลเฟตจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างแกรนูล PHB เพิ่มมากขึ้นในสายพันธุ์ 290-1 ต่อมา Chen และคณะ (1991) รายงานผลการศึกษาการสร้างพอลิ-3-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในแบคทีเรียจีส *Bacillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้ *B. megatarium* DSM90 *B. laterosporus* DSM335 *B. subtilis* DSM10 *B. sphaericus* DSM20 *B. cereus* DSM31 *B. amyloliquifaciens* DSM7 *B. licheniformis* DSM394 *B. macerans* DSM2892 *B. circulans* DSM1529 *B. thuringiensis* DSM 2046 *B. mycoides* DSM2048 ใช้วิธีการเพาะเลี้ยง 2 ขั้นตอน โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ขั้นตอนแรกให้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆเติบโตในอาหารที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วของเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที บ่มเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์แห้งมาล้างด้วยน้ำ จากนั้นนำเซลล์ที่ล้างแล้วถ่ายลงในอาหารที่ขาดไนโตรเจน เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์พอลิเอสเทอร์ เมื่อจุลินทรีย์เติบโตในอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ สายพันธุ์ต่าง ๆ สามารถสังเคราะห์ PHB ได้ในปริมาณเล็กน้อย ซึ่งปริมาณ PHB ภายในเซลล์ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเชื่อดังกล่าวขึ้นอยู่กับช่วง 5-20 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เมื่อควบคุมการหมักให้อยู่ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินไปและจำกัดปริมาณไนโตรเจน แบคทีเรียสามารถผลิตพอลิเมอร์ได้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งปริมาณ PHB ที่ผลิตได้แตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมอะซีเตตและ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรตลงไปมีผลให้การสังเคราะห์ PHB เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสาอาหารที่เติมเพิ่มลงไปทำให้ปริมาณของอะเซติล-โค-เอ และ 3-ไฮดรอกซีบิวทิริล-โค-เอภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น

รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) สามารถคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อผลิต PHB ชนิดใหม่จากจุลินทรีย์ 30 ชนิดที่แยกได้จากตัวอย่างต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus megatarium* BA-019 สามารถสร้างและสะสม PHB ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ จากนั้นศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB

ปัจจัยที่มีผลต่อต้นทุนการผลิต PHB

1. อัตราการผลิต PHB

อัตราการผลิต PHB คือ ปริมาณ PHB ต่อหนึ่งหน่วยหน่วยปริมาตรต่อหนึ่งหน่วยเวลา สำหรับการผลิต PHB ในปริมาณที่เท่ากันในอัตราการผลิตต่อปี พบว่าในกระบวนการผลิตที่อัตราการผลิต PHB ต่ำจะต้องใช้ขนาดถังหมักที่ใหญ่ขึ้น ยกตัวอย่างเช่นถ้าต้องการผลิต PHB ในปริมาณ 10 ตัน ภายใน 250 ชั่วโมง สำหรับระบบที่สามารถผลิต PHB ได้ 100 กรัม ในเวลา 50 ชั่วโมง (อัตราการผลิต PHB เท่ากับ 2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) จะต้องการถังหมักขนาด 20 ลูกบาศก์เมตร แต่ถ้าระบบผลิต PHB ได้ 50 กรัม ในเวลา 50 ชั่วโมง (อัตราการผลิต PHB 1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ถังหมักที่ใช้จะต้องมีขนาด 40 ลูกบาศก์เมตร (Choi และ Lee, 1999)

เมื่อเปรียบเทียบกระบวนการผลิต PHB จาก recombinant *E.coli* โดย 2 กระบวนการที่มีอัตราการผลิต PHB แตกต่างกัน พบว่าเมื่ออัตราการผลิต PHB เพิ่มขึ้นจาก 1.98 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงเป็น 3.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ต้นทุนการผลิต PHB ลดลงจาก 5.37 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัมเหลือ 4.91 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการผลิต PHB โดยกระบวนการหมักและต้นทุนการผลิตโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ (Choi และ Lee, 1999)

Parameter	<i>A. latus</i> ^a	<i>A. latus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. organophilum</i>
Fermentation performance					
Culture time (h)	18	20	41	49	70
Cell concentration (g/l)	143	111.7	112	204.3	250
P(3HB) concentration (g/l)	71.4	98.7	81	157.1	130
P(3HB) content (%)	50	88	72.3	77	52
P(3HB) productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹)	3.97	4.94	1.98	3.2	1.86
P(3HB) yield (g P(3HB)/g carbon)	0.17	0.42	0.29	0.27	0.19
Economic evaluation					
Directed-fixed-capital-dependent cost	1.42	0.73	1.31	1.00	1.57
Labor-dependent cost	0.23	0.12	0.21	0.16	0.23
Administration and overhead	0.09	0.05	0.09	0.08	0.11
Raw materials cost	4.94	1.26	2.99	2.97	3.31
Utilities	0.49	0.29	0.42	0.36	0.46
Waste treatment/disposal	1.13	0.15	0.35	0.34	1.01
Total production cost [US\$/kg P(3HB)]	8.3	2.6	5.37	4.91	6.69

^a A high inoculum concentration (13.7 g dry cell weight/l) was used

2. ปริมาณ PHB ภายในเซลล์

ปริมาณ PHB ส่งผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการ recovery เช่นเดียวกับผลได้ PHB (PHB yield) โดยส่งผลต่อ recovery yield และความบริสุทธิ์ของ PHB ปริมาณการใช้สารที่ใช้สำหรับย่อยเซลล์ (digesting agent) เพื่อแยกแกรนูล PHB จากเซลล์ที่มีปริมาณ PHB สูงจะน้อยกว่าเซลล์ที่ปริมาณ PHB ต่ำ Mudliar และคณะ (2007) รายงานว่าเมื่อปริมาณ PHB ภายในเซลล์มีค่ามากขึ้นพบว่าราคาการผลิต PHB (ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม) มีค่าลดลง โดยถ้าเซลล์สามารถสะสม PHB ได้ 44 %ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ราคาการผลิตจะเท่ากับ 11.806 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม แต่ถ้าเซลล์สามารถสะสม PHB ได้ 70 %ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ราคาการผลิตจะลดลงเหลือ 7.42 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม เมื่อพิจารณาที่กำลังการผลิต 100 ลูกบาศก์เมตรต่อวัน

3. ราคาแหล่งคาร์บอนและการผลิต PHB

ราคาของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อต้นทุนการผลิต PHB อย่างมากในบรรดาสารอาหารทั้งหมดที่ใช้ในกระบวนการผลิต PHB (Yamane, 1992, 1993) แหล่งคาร์บอนส่งผลต่อต้นทุนการผลิตมากที่สุด โดยแหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้มีมากมายหลายชนิดขึ้นอยู่กับความสามารถของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต น้ำมัน แอลกอฮอล์ ไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น นอกจากนี้ประสิทธิภาพของการเปลี่ยนซัสเตรทไปเป็น PHB ก็มีความสำคัญต่อต้นทุนการผลิตเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 4 ผลของต้นทุนซับสเตรทและผลผลิต PHB ที่มีต่อราคา PHB (Lee, 1996b)

Substrate	Approximate price (US \$ kg ⁻¹)	P(3HB) yield [g P(3HB) (g substrate) ⁻¹]	Substrate cost {US \$ [kg P(3HB)] ⁻¹ }
Glucose	0.493 ^a (0.220 ^c)	0.38 ^b	1.30 (0.58)
Sucrose	0.290 ^d	0.40	0.72
Methanol	0.180 ^e	0.43	0.42
Acetate	0.595 ^e	0.38	1.56
Ethanol	0.502 ^a	0.50	1.00
Cane molasses	0.220 ^a	0.42	0.52
Cheese whey	0.071 ^a	0.33	0.22
Hemicellulose hydrolysate	0.069 ^a	0.20	0.34

^aData taken from Hocking and Marchessault (1994)

^bCalculated by multiplying the theoretical yield by 0.8 (assuming 80% polymer accumulation) (Yamane 1992, 1993)

^cEstimate of the value of hydrolyzed corn starch

^dInternational market price of raw sugar

^eInternational market price from Chemical Journal (Korea)

เมื่อเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต PHB พบว่าเมื่อใช้ recombinant *E. coli* (ตารางที่ 3) ในการผลิต PHB โดยแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิต PHB ได้ 157.1 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิต PHB 3.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ราคาของแหล่งคาร์บอนจะเท่ากับ 38 %ของราคาทั้งหมด เมื่อพิจารณาที่ระดับการผลิต 100,000 ดันต่อปี แต่ถ้าเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นไฮโดรไลเซตของแป้งข้าวโพดราคาการผลิตของ PHB จะลดลงเหลือ 3.72 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ซึ่งต่ำกว่าราคาการผลิตเมื่อใช้กลูโคส (4.91 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม) ตารางที่ 4 แสดงการสรุปราคาของแหล่งคาร์บอนและผลผลิต PHB ตามทฤษฎี (theoretical yield) ซึ่งส่งผลต่อราคาของ PHB

4. ปัจจัยอื่น ๆ

4.1 อากาศ

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงเพื่อการผลิต PHB พบว่าปริมาณออกซิเจนเป็นปัจจัยที่จำกัด ดังนั้นการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอต่อระบบเพื่อรักษาสภาพการมีอากาศ (aerobic condition) จะส่งผลต่อต้นทุนการผลิต PHB ด้วย การป้องกันการจำกัดออกซิเจนจำเป็นต้องมีภาชนะที่ทนแรงดันได้ ใช้พลังงานในการปั่นกวนที่สูง และมีการเติมอากาศที่มีออกซิเจนมาก ปัจจัยเหล่านี้ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ (Choi และ Lee, 1999) ปัญหานี้แก้ไขได้ถ้าสามารถค้นพบแบคทีเรียซึ่งสามารถผลิต PHB ได้ดีในภาวะที่มีออกซิเจนน้อย Wang และ Lee (1997b) รายงานว่าภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอในถังหมักไม่เป็นปัญหาต่อการผลิต PHB โดย recombinant *E. coli* ซึ่ง

4.2 แหล่งไนโตรเจน

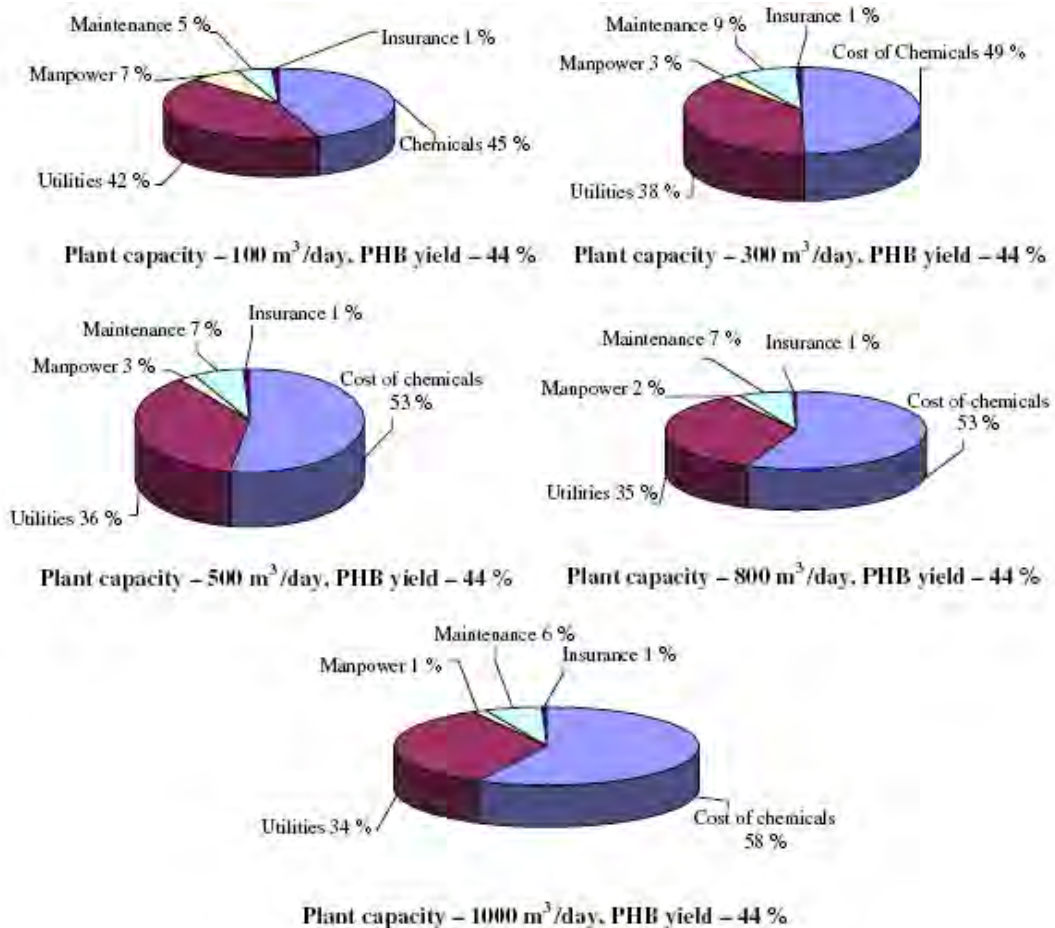
นอกจากแหล่งคาร์บอนแล้วแหล่งไนโตรเจนก็มีผลต่อราคาการผลิต PHB เช่นกัน โดยแหล่งไนโตรเจนที่นิยมนำมาใช้ในการผลิต PHB ได้แก่ NH_4Cl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ NH_4NO_3 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ โมโนโซเดียมกลูตาเมต และยูเรีย (Groom และคณะ, 1998; Quillaguamán และคณะ, 2008) โดยในบรรดาแหล่งไนโตรเจนที่กล่าวมาพบว่ายูเรียมีราคาถูกที่สุด Loo และ Sudesh (2007) รายงานว่านอกจากยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับการผลิต PHB เนื่องจากมีราคาถูกและยังส่งเสริมการสร้าง PHB ดังนั้นถ้าสามารถหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHB โดยใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ จะทำให้ราคาการผลิตลดลงได้

4.3 ขนาดการผลิต

ราคาของ PHB จะลดลงเมื่อขนาดการผลิตเพิ่มขึ้นดังแสดงในตารางที่ 5 และจากตารางที่ 5 พบว่าเมื่อขนาดการผลิตสูงขึ้นราคาการผลิต PHB จะลดลง เมื่อขนาดการผลิตเปลี่ยนแปลงต้นทุนการผลิตต่างๆ จะเปลี่ยนแปลงไปด้วย โดยราคาของแหล่งคาร์บอนจะเพิ่มขึ้นมากที่สุด คิดเป็นปริมาณ 50 % ของต้นทุนทั้งหมด ดังนั้นต้นทุนด้านวัตถุดิบจึงมีความสำคัญมากต่อการผลิต PHB ดังรูปที่ 4

ตารางที่ 5 ราคาต้นทุนการผลิต PHB เมื่อกำลังการผลิต และ ผลผลิตของ PHB แตกต่างกัน (Mudliar และคณะ, 2007)

Serial no.	Plant capacity (fermentation capacity m3/day)	Production cost US\$/kg			
		% PHB yield			
		44	50	60	70
1	100	11.806	10.388	8.658	7.42
2	200	10.51	9.249	7.708	6.606
3	300	9.906	8.716	7.264	6.226
4	400	9.548	8.402	7.002	6.002
5	500	9.29	8.176	6.814	5.84
6	600	9.086	7.996	6.663	5.711
7	700	8.929	7.858	6.548	5.612
8	800	8.772	7.72	6.433	5.514
9	900	8.656	7.617	6.348	5.441
10	1,000	8.56	7.534	6.278	5.38



รูปที่ 4 แสดงต้นทุนด้านต่างๆในการผลิต PHB เมื่อขนาดการผลิต PHB เท่ากับ 100 – 1,000 ลูกบาศก์เมตรต่อวัน (Mudliar และคณะ, 2007)

4.4 กระบวนการ recovery

ภายหลังจากการผลิต PHB โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยกระบวนการหมักแบบที่เร็วต้องถูกแยกออกจากรูน้ำหมักโดยการ centrifuge จากนั้นมีการแยก PHB ออกจากเซลล์แบคทีเรีย วิธีการ recovery และสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการนี้ส่งผลต่อสมบัติบางประการและความบริสุทธิ์ของ PHB รวมทั้งยังส่งผลต่อต้นทุนการผลิต PHB อีกด้วย โดยทั่วไปผู้วิจัยส่วนใหญ่นิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัด PHB ออกจากเซลล์แบคทีเรียโดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้กัน ได้แก่ คลอโรฟอร์ม ไคคลอโรอีเทน ไตรคลอโรเอทิลีน ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ เมทิลีนคลอไรด์ อะซีโตน (Terada และ Marchessaut, 1999) วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีข้อดีคือ PHB ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงเหมาะที่จะนำไปใช้ในทางการแพทย์ (Chen และ Wu, 2005) อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีข้อเสียคือ ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมและตัวทำละลายอินทรีย์มีราคาสูงทำให้ราคาการผลิต PHB สูง นอกจากนี้หากต้องติดตั้งระบบ recovery ตัวทำละลายอินทรีย์ก็ทำให้ราคา PHB สูงขึ้นอีก ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการสกัด PHB แบบไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น การใช้เอนไซม์ในการสกัด (Kapritchkoff และคณะ, 2006; Lakshman และ Shamala, 2006) การใช้แอมโมเนีย (Page และ Cornish, 1993) การใช้ surfactant-hypochlorite

กระบวนการผลิต PHB

มีการวิจัยจำนวนมากที่รายงานถึงการปรับปรุงหรือการพัฒนากระบวนการผลิต PHB ให้มีความเหมาะสม เพิ่มประสิทธิภาพการผลิต รวมทั้งการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก และการใช้แบคทีเรียชนิดใหม่ ทั้งนี้เพื่อให้สามารถลดต้นทุนการผลิต PHB ให้ต่ำสุด อันจะส่งผลต่อการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งทำให้สามารถแข่งขันด้านราคากับพลาสติกสังเคราะห์ที่ใช้ในปัจจุบันได้ (Lee, 1996b ; Brauneegg และ คณะ, 1998) การเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch เป็นกระบวนการเลี้ยงเชื้อ PHB ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งหลักการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบนี้คือ มีการเติมสารอาหารในระหว่างการหมัก มีผลทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูง และได้ผลผลิตสูง Suzuki และคณะ (1986a) ใช้การเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch 2 ขั้นตอน เลี้ยงเชื้อ *methylogroph* เพื่อการผลิต PHB การป้อนแหล่งคาร์บอนซึ่งใช้เมทานอลทำให้โดยการใช้ระบบควบคุมด้วย porous Teflon tubing sensor ในขั้นตอนแรกของการเลี้ยงเชื้อมีการเติมสารอาหารชนิดอื่นๆ รวมทั้งแหล่งคาร์บอน เพื่อให้เซลล์มีการเติบโตสูงสุด จากนั้นจึงหยุดการเติมสารอาหารชนิดอื่นแล้วเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอนในขั้นตอนการสะสม PHB ภายในเซลล์ การเพาะเลี้ยงแบบนี้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงถึง 206 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้น PHB เท่ากับ 136 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB 66 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ต้องใช้ระยะเวลา 175 ชั่วโมง Suzuki และคณะ (1986b) ศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้า พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนคงที่ส่งผลควบคุมทั้งปริมาณ PHB และอัตราการผลิต PHB จำเพาะ การควบคุมอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนแบบอัตโนมัติโดยให้อัตราส่วนเพิ่มขึ้นในช่วงการสะสม PHB ทำให้การผลิต PHB เกิดได้สูงที่สุด เมื่อเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนในโตรเจนที่ระดับความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร สามารถผลิต PHB ได้ความเข้มข้นสูงถึง 149 กรัมต่อลิตร ที่ 170 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ Kim และ คณะ (1992) รายงานการผลิต PHB โดยการเพาะเลี้ยง recombinant *E. coli* แบบ fed-batch โดยใช้เทคนิค pH-stat ควบคุมการป้อนสารอาหารซึ่งประกอบด้วยกลูโคส yeast extract และ tryptone การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้ด้วยวิธีการดังกล่าวสามารถผลิต PHB ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 88.8 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB 76.2 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง Shimizu และคณะ (1993) ศึกษาการผลิต PHB โดยการเลี้ยงเชื้อ *A.*

กระบวนการหมักจะสิ้นสุดเมื่อใดเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณาให้เหมาะสม บางกรณีการหมักควรหยุดเมื่ออัตราการผลิตสูงที่สุด เนื่องจากอาจสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงกว่าเดิม แต่อัตราการผลิตทั้งหมดอาจต่ำลง กรณีเช่นนี้กระบวนการหมักจะมีประสิทธิภาพ ถ้าปริมาณ PHB ที่ได้เพิ่มขึ้นด้วย เพราะมีผลให้กระบวนการ recovery และทำให้พอลิเมอร์บริสุทธิ์ทำได้ง่ายขึ้น (Lee, 1996b)

กระบวนการหมักแบบ batch

กระบวนการหมักแบบ batch เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เติบโตในระบบปิด ซึ่งส่วนใหญ่ทำในขวดเขย่าหรือถังหมักที่มีสารอาหารเหมาะสมต่อการเติบโต และเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสม กระบวนการหมักแบบนี้ไม่มีการเติมสารอาหาร เซลล์จะเติบโตจนกระทั่งองค์ประกอบของสารอาหารที่จำเป็นหมดไป หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม เนื่องจากสะสมสารพิษหรือ pH เปลี่ยนแปลง เป็นต้น การเติบโตของเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ batch แบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้

1. ระยะพักตัว (lag phase) ระยะนี้เริ่มต้นเมื่อใส่จุลินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นระยะที่เซลล์ยังไม่มีการเติบโต เนื่องจากเป็นระยะที่จุลินทรีย์กำลังปรับตัว เพื่อให้สามารถเติบโตได้ใน

2. ระยะการเติบโตแบบทวีคูณ (log หรือ exponential phase) เป็นระยะที่เซลล์มีการเติบโตเพิ่มขึ้นตามลำดับจนกระทั่งคงที่ ระยะนี้เซลล์มีอัตราการเติบโตแบบทวีคูณ

3. ระยะการเติบโตคงที่ (stationary phase) เมื่อสิ้นสุดระยะการเติบโตแบบทวีคูณ อัตราการเติบโตจะลดลงจนกระทั่งเป็นศูนย์ ระยะนี้ความหนาแน่นของเซลล์ค่อนข้างคงที่ และไม่มีการเติบโตของเซลล์ ซึ่งถึงแม้ว่าเซลล์จะมีการเติบโต แต่อัตราการเติบโตเท่ากับอัตราการตาย การที่เซลล์หยุดการเติบโตเนื่องจากสารอาหารจำเป็นหมดไป การสะสมสารพิษ หรือสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลง เช่น ค่า pH เซลล์ที่ดำรงชีพได้ระยะนี้ เนื่องจากเหตุผลหลายประการ คือ ภายในเซลล์มีพอลิเมอร์บางประเภทสะสมอยู่ ซึ่งเซลล์สามารถนำมาใช้เป็นขั้วสเตรทได้ หรือมีการพัฒนารูปแบบเซลล์ให้ทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น การสร้างสปอร์

4. ระยะการเติบโตแบบลดลง (decline หรือ death phase) เป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการตายมากกว่าอัตราการเติบโต (Scragg,1991; Snape และคณะ,1995; Asenjo และ Merchuk,1995)

การเติบโตของจุลินทรีย์ในระยะ log phase สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

เซลล์ที่สะสม = เซลล์เติบโต-เซลล์ออก-เซลล์ตาย

$$dX/dt = \mu X - (F/V)X - aX \quad (1)$$

เมื่อเซลล์ไม่ถูกนำออกจากระบบ และ a น้อยกว่า μ มาก เขียนสมการ (1) ใหม่ได้

$$dX/dt = \mu X \quad (2)$$

เมื่อ X = ความเข้มข้นมวลชีวภาพ (g/l)

t = เวลา (h)

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) (h^{-1})

F = อัตราการป้อนอาหารเข้า (l/h)

V = ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (l)

a = อัตราการตายจำเพาะ (h^{-1})

เมื่ออินทิเกรตสมการ (2) จะได้

$$X_t = X_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

เมื่อ X_0 = ความเข้มข้นมวลชีวภาพเริ่มต้น (g/l)

X_t = ความเข้มข้นมวลชีวภาพหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ ณ เวลา t ชั่วโมง (g/l)

e = ฐานของ natural logarithm

เมื่อใส่ natural logarithm ในสมการ (3) จะได้

$$\mu = [\ln (X_t/X_0)]/t \quad (4)$$

$Y_{p/s}$ คือผลผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อซับสเตรทที่ใช้ไป เป็นพารามิเตอร์สำคัญที่แสดงถึงประสิทธิภาพการเปลี่ยนซับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ $Y_{p/s}$ สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$Y_{p/s} = \Delta P / \Delta S$$

เมื่อ ΔP = ผลต่างของผลิตภัณฑ์

ΔS = ผลต่างของซับสเตรทที่ถูกใช้ไป

อัตราการผลิต (productivity) ของกระบวนการหมักแบบ batch แสดงค่าในเทอมของกรัมผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นต่อหน่วยปริมาตรต่อหน่วยเวลา หรือ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

กระบวนการหมักแบบ fed-batch

กระบวนการหมักแบบ fed-batch คือกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยมีการเติมสารอาหาร 1 ครั้ง หรือมากกว่าลงภาชนะที่ใช้ในการหมักในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่มีการนำของเหลวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อออกจากระบบจนถึงสิ้นสุดการหมัก ปริมาตรของของเหลวในกระบวนการหมักแบบนี้จะเพิ่มขึ้น ในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้กระบวนการหมักแบบนี้ความเข้มข้นของสารอาหารป้อนเข้าในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถควบคุมได้โดยการเปลี่ยนอัตราการป้อนเข้า ดังนั้นกระบวนการหมักแบบ fed-batch จึงได้เปรียบกว่ากระบวนการหมักแบบ batch เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของสารอาหารเปลี่ยนแปลง มีผลทำให้ผลผลิตที่ได้ หรือ อัตราการผลิตของเมตาโบไลต์ที่ต้องการให้เพิ่มสูงขึ้น (Asenjo และ Merchuk, 1995)

ปัจจัยที่ส่งผลให้กระบวนการหมักแบบ fed-batch มีประสิทธิภาพมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ batch

1. สามารถใช้สาร เช่น เมทานอล เอทานอล กรดอะซิติก และสารประกอบอะโรมาติก ซึ่งยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์แม้ว่าใช้ที่ความเข้มข้นต่ำเป็นสารอาหารเลี้ยงเชื้อได้ กระบวนการหมักแบบ fed-batch สามารถลดผลการยับยั้งได้โดยการเติบสารอาหารดังกล่าวครั้งละน้อยๆ ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารไม่สูงเกินไป
2. สามารถเพาะเลี้ยงแบบให้ความหนาแน่นของเซลล์สูง เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบบ batch ที่มีความเข้มข้นของซับสเตรทสูง อาจจะไปยับยั้งการเติบโตของเซลล์ ทำให้ได้ความเข้มข้นเซลล์ต่ำ
3. เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยแหล่งคาร์บอนที่ให้พลังงานอย่างรวดเร็ว เช่น กลูโคส อาจจะทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ เป็นสาเหตุให้เมตาบอลิซึมของแหล่งพลังงานเกิดขึ้นได้ช้าลง ซึ่งเรียกว่าการยับยั้งแบบนี้ว่า catabolite repression ดังนั้นกระบวนการหมักแบบ fed-batch สามารถควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารให้ต่ำได้โดยการควบคุมการป้อนเข้า มีผลให้กระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ไม่ถูกยับยั้ง

4. สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์กลายไม่สามารถสังเคราะห์สารจำเป็นบางชนิดได้ (autotrophic mutants) ให้เติบโตภายใต้การควบคุมการป้อนสารอาหารที่จำเป็น เพื่อให้สามารถสะสมเมตาบอไลต์ที่ต้องการในปริมาณมากได้ ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวนี้ การให้สารอาหารที่จำเป็นในปริมาณมากเกินไปส่งผลให้มีการเติบโตสูงแต่การสะสมผลิตภัณฑ์ต่ำ เนื่องจากการยับยั้งแบบ feedback inhibition และ /หรือ end-product repression

5. สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารที่ต้องการเมื่อเปลี่ยนภาวะการเลี้ยงเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch 2 ขั้นตอน

การจัดจำแนกกระบวนการหมักแบบ fed-batch โดยอาศัยเทคนิคการป้อนสารอาหาร

จุดประสงค์หลักของการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch คือการควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นวิธีการป้อนสารอาหารที่เหมาะสมจะมีผลต่อประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงสามารถแบ่งกระบวนการหมักแบบนี้ออกเป็น 2 ประเภท คือแบบ with feedback control และ without feedback control

1. แบบ without feedback control

กระบวนการหมักแบบนี้อัตราการป้อนเข้าจะเปลี่ยนแปลงระหว่างการเพาะเลี้ยงตามข้อมูลที่ได้มีการศึกษามาก่อน ส่วนใหญ่การเพาะเลี้ยงแบบนี้ในยุคเริ่มต้นจะมีการป้อนสารอาหารเป็นช่วง ๆ เนื่องจากเป็นวิธีการง่าย การป้อนสารอาหารเป็นช่วงที่มีความถี่ให้ผลที่มีลักษณะใกล้เคียงกับการป้อนสารอาหารแบบต่อเนื่อง

2. แบบ with feedback control

กระบวนการหมักแบบ fed-batch ที่ใช้เทคนิคแบบนี้ แบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

2.1 with indirect feedback control

กระบวนการหมักแบบนี้ ใช้พารามิเตอร์ที่สามารถสังเกตได้ซึ่งมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับลักษณะของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ พารามิเตอร์ที่ใช้เช่น ค่าออกซิเจนละลาย ค่า pH ความเข้มข้นเมตาบอไลต์ และความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ในกรณีของ pH แบ่งออกได้เป็น 2 วิธีการคือ low limit เมื่อ pH มีแนวโน้มลดลงระหว่างการเพาะเลี้ยงและ high limit เมื่อ pH มีแนวโน้มสูงขึ้นในระหว่างการหมัก จะมีการป้อนสารอาหารเข้าสู่ระบบ

2.2 with direct feedback control

ความเข้มข้นของสารอาหารป้อนเข้าในอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกวัดแบบต่อเนื่องหรือแบบเป็นช่วง ๆ ซึ่งข้อมูลที่ได้ใช้เป็น feedback parameter โดยตรง กระบวนการหมักแบบนี้จำเป็นต้องมีการตรวจวัดความเข้มข้นของสารป้อนเข้าที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยระบบการวัดด้วยเซนเซอร์ (sensor detector system) ซึ่งมีการวิจัยและคิดค้นไป โอเซนเซอร์หลายชนิดเพื่อนำมาประยุกต์ใช้กับ

กระบวนการหมักแบบ fed-batch ระดับอุตสาหกรรมจะประยุกต์ใช้การป้อนสารอาหารแบบต่าง ๆ ตารางที่ 6 สรุปการประยุกต์ใช้เทคนิคแบบต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับการควบคุมการป้อนเข้า

ตารางที่ 6 การประยุกต์ใช้ดัชนีควบคุมสำหรับกระบวนการหมักแบบ fed-batch

Index	C source		N source	
	Single (nonvolatile)	Complex (nonvolatile)	Single (volatile)	Complex (volatile)
DO	A	B	A	B
Turbidity method	D	D	A	A
pH (low limit)	C	D	C	D
pH (high limit)	B	A	B	A
Turbidity method	A	A	A	A

A = excellent; B = good; C = not bad; D = inapplicable (Asenjo และ Merchuk, 1995)

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความหนาแน่นของเซลล์

สำหรับเซลล์ :

เซลล์ที่สะสม = เซลล์ที่เจริญ ที่ dt ใดๆ

$$VdX = \mu VX \quad (5)$$

หารด้วย Vdt ตลอด:

$$dX/dt = (\mu - F/V)X \quad (6)$$

$$dX/dt = (\mu - D)X \quad (7)$$

เมื่อ F = อัตราการไหลของสารอาหารที่ป้อนเข้า (l/h)

V = ปริมาตรของน้ำหมักในเครื่องปฏิกรณ์ (l)

X = ความหนาแน่นของเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ (g/l)

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (h^{-1})

ณ จุดที่ อัตราการเจือจาง (D) น้อยกว่า μ_{max} สารอาหารที่เติมลงไปถูกใช้จนสมบูรณ์ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพคงที่ ($dX/dt = 0$) ทำให้ $\mu = D$ แต่เมื่อเวลาผ่านไปปริมาตรของน้ำหมักจะเพิ่มขึ้น เพราะไม่มีการดึงน้ำหมักออกจากระบบ ทำให้อัตราการเจือจางลดลง เนื่องจาก $D = F/V$ และเมื่อเวลาผ่านไป $V = V_0 + Ft$

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความเข้มข้นของสารอาหาร

สำหรับสารอาหาร:

สารอาหารที่สะสม = สารอาหารที่เติม - สารอาหารที่ถูกใช้ไป

ที่ dt ใด ๆ:

$$Vds = F \cdot S_R - V\mu \cdot X/Y_{x/s} \quad (8)$$

หารด้วย Vdt ตลอด

$$dS/dt = F \cdot S_R - \mu X/Y_{x/s} \quad (9)$$

เมื่อ

S = ความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้นในถังหมัก (g/l)

S_R = ความเข้มข้นของสารอาหารที่เติมลงไป (g/l)

$Y_{x/s}$ = สัมประสิทธิ์ผลผลิตมวลชีวภาพเมื่อเทียบกับสารอาหารที่ใช้

(Biomass yield coefficient) (g cell/g substrate)

เมื่อสารอาหารที่ใช้เต็มหมด ($dS/dt = 0$) จะได้

$$F \cdot S_R = \mu X/Y_{x/s} \quad (10)$$

การผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม

ปี 1976 บริษัท Imperial Chemical Industries (ICI) ประเทศอังกฤษเริ่มให้ความสนใจการวิจัยเกี่ยวกับ PHB เนื่องจากสมบัติของ PHB ที่สามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติและมีความสามารถเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต การพัฒนาการผลิตเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีการจดสิทธิบัตรการผลิต PHB ช่วงต้นของทศวรรษที่ 80 (Braunegg และคณะ, 1988) บริษัท ZENCA Bio Products ซึ่งเป็นบริษัทในเครือ ICI ผลิต PHB และ PHBV ทางการค้าโดยการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* แบบ fed-batch

หน่วยวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพของ Biotechnology Forschungsgesellschaft (btf, Austria) ได้พัฒนากระบวนการผลิต PHB ปริมาณ 1 ตัน ภายในเวลา 1 สัปดาห์ ในถังหมักขนาด 15 ลูกบาศก์เมตร (Lee, 1996b) โดยการเพาะเลี้ยง *A. latus*





บริษัท Chemie Linz ประเทศออสเตรียผลิต PHB ทางการค้าโดยการเพาะเลี้ยง *A. latus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้รวดเร็วและสามารถสังเคราะห์ PHB ได้ปริมาณสูงในระหว่างการเติบโตตามปกติ (Lee, 1996b; Braunegg และคณะ, 1998)

บริษัท Metabolix ผลิต Biopol® ในโรงหมักขนาด 50 ลูกบาศก์เมตร ด้วยกรรมวิธีที่ประหยัดเวลาหมัก (เวลาในการหมักน้อยกว่า 40 ชั่วโมง และมีความเข้มข้นสุดท้าย 100 กรัม/ลิตร) ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้สำหรับประสิทธิภาพของแบคทีเรีย และให้กำลังการผลิตประมาณ 1,100 ตัน/ปี และเพื่อจะผลักดันให้ Biopol® อยู่ในตลาดการค้าได้ Metabolix ได้รับเงินทุนจาก Department of Commerce's Advance Technology Program ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีโครงการ Reengineering the Central Metabolism ของ *E. coli* ให้มีประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็น PHAs ให้เพิ่มมากขึ้น ปี ค.ศ. 2001 บริษัท Metabolix เริ่มโครงการร่วมกับกระทรวงพลังงาน สหรัฐอเมริกา ด้วยเงินทุนสนับสนุน 15 ล้านดอลลาร์สหรัฐในเวลา 5 ปีในการศึกษาวิจัยการผลิต PHAs ในเนื้อเยื่อของพืช เช่น ยาสูบ Alfalfa Switchgrass สัญลักษณ์ที่แสดงถึงพลาสติกที่ย่อยสลายได้แสดงได้ดังรูปที่ 5

ตารางที่ 7 ผู้ผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม จุลินทรีย์ และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต PHA (Reddy และคณะ, 2003)

Microorganism/raw material	Manufacturer
<i>Alcaligenes eutrophus</i> (HI6)	ZENECA Bio-products, UK (formerly ICI Ltd.)
<i>A. latus</i>	Biotechnologische Forschungs gesellschaft mbH (Austria) Petrochemia Danubia
Transgenic plants	Metabolix Inc. (USA) Monsanto (USA) ZENECA Seeds (UK)
Recombinant <i>Escherichia coli</i>	Bio Ventures Alberta Inc. (Canada)
Starch	Warner's Lambert (USA) Fertec, Italy (Ferruzzi e Tecnologia) Biotec (Melitta) Emmerich (Germany) BASF Ludwigshafen (Germany) Bayer/Wolf Walsrode Leverkusen (Germany) Novamont Novara (Italy)
Cheap substrates	Polyferm Inc. (Canada)
Bacteria	Biocorp (USA) Asahi Chemicals and Institute of Physical and Chemical Research (Japan)

รูปที่ 5 สัญลักษณ์ที่บ่งถึงพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพและมาตรฐานรับรองการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Reddy และคณะ, 2003)

สัญลักษณ์	สถาบันรับรอง/ประเทศ	มาตรฐานรับรอง
	AIB-Vincotte International (AVI) เบลเยียม	ผลิตภัณฑ์ต้องผ่านสมบัติตามมาตรฐาน EN 13432:2000
	DIN CERTCO เยอรมนี	ผลิตภัณฑ์ต้องผ่านสมบัติตามมาตรฐาน ASTM 6400 DIN EN 13432
	BPI (Biodegradable Product Institute) สหรัฐอเมริกา	ผลิตภัณฑ์ต้องผ่านสมบัติตามมาตรฐาน ASTM 6400 ASTM 6868
	PBS (Biodegradable Plastics Society) ญี่ปุ่น	ผลิตภัณฑ์ต้องผ่านสมบัติตามมาตรฐาน OECD301C JIS K 6950 (ISO 14851) JIS K 6951 (ISO 14852) JIS K 6953 (ISO 14855)

การขยายส่วนการผลิต (scale-up of production scale)

เนื่องจากปัจจุบันความต้องการสารทางชีวภาพมีมากขึ้น ทำให้ต้องมีการเพิ่มผลผลิตซึ่งทำได้โดยการขยายส่วนกำลังการผลิตการผลิตที่ได้จากกระบวนการหมัก ในการขยายส่วนกำลังการผลิตต้องอาศัยความรู้ เทคนิค และข้อมูลจากการทำงานในระดับห้องปฏิบัติการที่ได้ผลผลิตในระดับที่น่าพอใจ อย่างไรก็ตามการนำข้อมูลจากห้องปฏิบัติการไปใช้ในการขยายส่วนการผลิตนั้นพบว่าเกิดปัญหาหลายอย่าง แต่ปัญหาหนึ่งที่สำคัญคือ ผลผลิตที่ได้ในระดับขยายส่วนนั้นมักไม่ดีเท่ากับในระดับห้องปฏิบัติการ (Van Brunt, 1985) ซึ่งสาเหตุเกิดจากความแตกต่างในด้านต่างๆ ได้แก่ เทคนิคการให้อากาศและการกวน การทำให้อาหารปลอดเชื้อ การเตรียมหัวเชื้อ การกำจัดฟอง ชนิดของวัสดุ และวัตถุดิบที่ใช้ โดยปัจจัยที่มีผลต่อการขยายส่วนมี 3 ปัจจัย คือ ปัจจัยทางกายภาพ ปัจจัยทางเคมี และปัจจัยทางชีวภาพ

ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะทางเรขาคณิตของถังหมัก การให้อากาศ การปั่นกวน การทำให้อาหารปลอดเชื้อ การควบคุมอุณหภูมิ ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการควบคุม pH (ชนิดและความเข้มข้นของกรดและเบส) คุณภาพของอาหารและน้ำที่ใช้ ปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่ การเตรียมกล้าเชื้อ (inoculum development) เนื่องจากในระดับการผลิตขนาดใหญ่มีขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อหลายขั้นจึงอาจเกิดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่น และการกลายพันธุ์

โดยทั่วไปแล้วลำดับขั้นในการขยายขนาดควรจะน้อยที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ อย่างไรก็ตามถ้าทำเช่นนี้จะเป็นการขยายขนาดโดยที่ปริมาตรต่างกันมากเกินไปซึ่งอาจทำให้การขยายส่วนการผลิตผิดพลาดได้มาก โดยทั่วไปแล้วจำนวนลำดับขั้นที่เหมาะสมควรเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้ ขวดเขย่า (shake flask) ปริมาตรระหว่าง 50-1000 มิลลิลิตร ถังหมักแบบกวนในระดับห้องปฏิบัติการ (Lab stirred fermentor) ปริมาตรระหว่าง 5-20 ลิตร ถังหมักขนาดต้นแบบ (Pilot-scale fermentor) ปริมาตรระหว่าง 50-5000 ลิตร ถังหมักขนาดเพื่อการผลิต (Production fermentor) ปริมาตรระหว่าง 25-1000 ลิตร ลูกบาศก์เมตร โดยจะต้องทำการขยายขนาดจากระดับห้องปฏิบัติการไปสู่ระดับเพื่อการผลิตเพียง 3 ครั้งเท่านั้น ได้แก่ (Wiseman, 1983)

1. ขวดเขย่า (shake flask)

ในการเริ่มต้นงานวิจัยจะเริ่มจากขวดเขย่าเสมอเพราะจะสามารถทราบตัวแปรในการทดลองมากมายในเวลาอันสั้น โดยสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อยและสามารถหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์ได้ในการทดลองระดับนี้

2. ถังหมักแบบกวนในระดับห้องปฏิบัติการ (lab stirred fermentor)

การขยายขนาดการผลิตจากระดับขวดเขย่าไปสู่ระดับโรงงานต้นแบบหรือระดับเพื่อการผลิตโดยตรงในขั้นตอนเดียวนั้นไม่เป็นที่ยอมรับเนื่องจากมีความแตกต่างกันมากเกินไปในส่วนของการกล้าเชื้อ การฆ่าเชื้ออาหาร การให้อากาศ และการกวน และมีเหตุผล 2 อย่างที่สนับสนุนการ

3. ถังหมักระดับโรงงานต้นแบบ (pilot-scale fermentor)

การทดลองในถังหมักระดับนี้เป็นขั้นตอนหนึ่งในกระบวนการขยายขนาด ในขั้นตอนนี้จะศึกษาการเตรียมกล้าเชื้อที่เหมาะสม และหาภาวะในการฆ่าเชื้อใหม่ที่พอเหมาะก่อนที่จะเริ่มทำการหมักในระดับต้นแบบเพื่อการผลิตต่อไป

เกณฑ์ทางกายภาพที่เป็นพารามิเตอร์ที่มีประโยชน์ในการขยายส่วน

เกณฑ์ทางกายภาพที่นิยมใช้กำหนดการขยายส่วนของถังหมัก ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร ($K_L a$) ความเร็วรอบของปลาตไบพัด ($\pi n D_i$) ค่าเรย์โนลด์ (Reynolds number; N_{RE}) และอัตราการไหลของของเหลวภายในถังหมัก (liquid circulation rate)

1. อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V)

นิยมใช้ในระบบที่มีการกวนเพื่อให้ระบบที่ขยายส่วนการผลิตนั้นมีอัตราการถ่ายเทออกซิเจน (oxygen transfer rate) เท่ากับระบบต้นแบบ โดยทั่วไปค่า P/V ที่ใช้ในการขยายขนาดจะมีค่าอยู่ในช่วง 1.5-2.0 กิโลวัตต์ต่อลูกบาศก์เมตร สำหรับการขยายส่วนโดยการกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักคงที่โดยที่ภายในถังหมักมีการไหลแบบปั่นป่วน (turbulent flow) สามารถแสดงได้ดังสมการ

$$P \propto n^3 D_i^5 \quad (11)$$

$$V \propto D_i^3 \quad (12)$$

ดังนั้น $P/V \propto n^3 D_i^2 \quad (13)$

และเมื่อให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักคงที่จะได้

$$n_2 = n_1 (D_{i1}/D_{i2})^{2/3} \quad (14)$$

เมื่อ n = ความเร็วรอบของการกวน (s^{-1})

D_i = เส้นผ่าศูนย์กลางของไบพัด (m)

P = กำลังของมอเตอร์ที่ใช้ในการปั่นกวน (W)

V = ปริมาตรในถังหมัก (m^3)

2. สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร (K_La)

สำหรับการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศปัญหาที่สำคัญ คือ การละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องควบคุม เนื่องจากจุลินทรีย์ต้องการออกซิเจนในกระบวนการเมทาบอลิซึมสำหรับการสร้างพลังงาน ซึ่งประสิทธิภาพของการถ่ายเทออกซิเจนของถังหมักนั้นสามารถแสดงได้ดังสมการ

$$OTR = K_La (C_L^* - C_L) \quad (15)$$

เมื่อ OTR = อัตราการถ่ายเทออกซิเจน (mmol/l-h)

K_La = สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร (h^{-1})

C_L^* = ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายที่สมดุลย์ (mmol/l)

C_L = ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (mmol/l)

เนื่องจากรูปแบบและขนาดของถังหมักมีความสัมพันธ์กับการกำหนดสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ได้ดังสมการ

$$K_La = f([P_g/D_Q^3]^a [V_s]^b [B/6]^{0.8} [J/D_i]^{0.3}) \quad (16)$$

เมื่อ P_g = กำลังที่ใช้ในการกวน (hp)

V_s = ความเร็วของอากาศ (m/s)

D_i = เส้นผ่าศูนย์กลางของใบพัด (m)

B = จำนวนใบพัด

J = ความกว้างของครีป (baffle) (m)

D_Q^3 = ปริมาตรในถังหมัก (m^3)

สำหรับการขยายส่วนการกำหนดให้ลักษณะทางเรขาคณิตของถังหมักมีลักษณะเหมือนกัน จะได้ความสัมพันธ์ใหม่เป็น

$$K_La = f([P_g/D_Q^3]^a [V_s]^b) \quad (17)$$

จากสมการนี้ค่า a และ b นั้นจะเปลี่ยนตามขนาดของถังหมักและลักษณะทางเรขาคณิตซึ่ง Bartholomew (1960) แสดงให้เห็นค่าของ a และ b เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงขนาดของถังหมัก

Vessel size (l)	a	b
5	0.95	0.667
500	0.6-0.7	0.667
50,000	0.4-0.5	0.5

K_{La} นิยมใช้ในกระบวนการหมักที่มีการให้อากาศแก่เชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ระบบที่ทำการขยายขนาดมีอัตราการถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับระบบต้นแบบเช่นเดียวกับการใช้ค่า P/V ซึ่งสามารถทำได้โดยหาภาวะอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศในถังหมักแต่ละขนาดที่เหมาะสมและให้ค่า K_{La} ที่ต้องการ จากสมการที่ 17 พบว่าค่า K_{La} มีความสัมพันธ์กับ P/V ดังนั้นจึงสามารถใช้แทนกันได้ในการขยายขนาดเนื่องจากทั้ง 2 เกณฑ์ต่างมีผลโดยตรงกับอัตราการถ่ายเทออกซิเจนเหมือนกัน (Aiba และคณะ, 1973)

3. ความเร็วรอบของปลายใบพัด (πnD_i)

เครื่องหมักแบบถังกวนจะเกิดแรงเฉือนขึ้นภายใน ซึ่งแรงเฉือนนี้มีผลต่อการละลายของออกซิเจน การกระจายของสารอาหารและเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีผลกระทบต่อเซลล์เป็นอย่างมาก เนื่องจากแรงเฉือนอาจทำอันตรายต่อเซลล์ได้โดยเฉพาะเซลล์สัตว์และเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีสายใย เช่น รา *streptomyces* sp. ซึ่งอันตรายที่เกิดจากแรงเฉือนนั้นจะเกิดที่บริเวณปลายใบพัด ซึ่งสามารถแสดงได้ดังสมการ (Aiba และคณะ, 1973)

$$\text{Tip speed} \propto nD_i \quad (18)$$

เมื่อ

$$n = \text{ความเร็วรอบของการกวน (s}^{-1}\text{)}$$

$$D_i = \text{เส้นผ่าศูนย์กลางของใบพัด (m)}$$

ซึ่งสมการนี้เกิดขึ้นในกรณีที่ถังหมักมีขนาดเล็ก โดยมีค่า N_{RE} อยู่ในช่วง $10^4 - 10^5$ ส่วนในถังหมักขนาดใหญ่ที่มีค่า N_{RE} สูงกว่า 10^5 คือมีลักษณะการกวนเป็นแบบปั่นป่วน (turbulent) จะได้ความสัมพันธ์เป็น

$$\text{Turbulent head} = (nD_i^2) \quad (19)$$

ซึ่งการขยายส่วนการผลิตที่กำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัดมีค่าคงที่นั้นเนื่องจากคำนึงถึงอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์โดยเฉพาะเชื้อราที่มีความไวต่อแรงเฉือนมาก

4. ค่าเรย์โนลด์ (Reynolds number; N_{RE})

ค่าเรย์โนลด์ เป็น ค่าที่แสดงถึงความรุนแรงในการกวน โดยที่ค่าเรย์โนลด์ แสดงในสมการที่ 23 สำหรับการขยายส่วนการผลิตที่กำหนดให้ค่าเรย์โนลด์คงที่ในการผลิตที่มีขนาดแตกต่างกัน แสดงได้ดังสมการที่ 24

$$\begin{aligned} \text{Reynolds number} &= \text{Inertial force/Viscous force} \\ &= D_i^2 n \rho / \mu \end{aligned} \quad (20)$$

เมื่อ $D_i = \text{เส้นผ่าศูนย์กลางของใบพัด (m)}$

$$n = \text{ความเร็วรอบของการกวน (sec}^{-1}\text{)}$$

$$\rho = \text{ความหนาแน่นของน้ำหมัก (kg/m}^3\text{)}$$

$$\mu = \text{ความหนืดของน้ำหมัก (Pa s)}$$

$$\text{Reynolds number} \propto nD_i^2$$

$$n_1 D_{i1}^2 = n_2 D_{i2}^2 \quad (21)$$

5. อัตราการไหลของของเหลวภายในถังหมัก (liquid circulation rate)

การขยายส่วนการผลิตโดยใช้อัตราการไหลของของเหลวภายในถังหมักที่แสดงได้ดังสมการที่ 25 อัตราการไหลของของเหลวจะใช้ในการขยายส่วนการผลิตเมื่อต้องการให้เวลาในการกวนผสมของทั้งระบบต้นแบบและระบบที่ขยายขนาดเท่ากัน ซึ่งจะทำให้ทั้งสองระบบมีระดับการผสมที่เท่ากัน

$$F/V \propto n \quad (22)$$

เมื่อ n = ความเร็วรอบของการกวน (s^{-1})

ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์เมื่อขยายส่วนการผลิต (Charles, 1965)

พารามิเตอร์	ถังหมักขนาดเล็ก	ถังหมักขนาดใหญ่			
	(80 ลิตร)	(10,000 ลิตร)			
P	1.0	125	3125	25	0.2
P/V	1.0	1.0	25	0.2	0.0016
n	1.0	0.34	1.0	0.2	0.04
D_i	1.0	5.0	5.0	5.0	5.0
F	1.0	42.5	125	25	5.0
F/V	1.0	0.34	1.0	0.2	0.04
nD_i	1.0	1.7	5.0	1.0	0.2
$nD_i^2 \rho/\mu$	1.0	8.5	25	5.0	1.0

จากตารางที่ 8 แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์สำหรับการขยายขนาดของถังหมัก 80 ลิตร ไปสู่ถังหมักขนาด 10,000 ลิตร โดยมีอัตราส่วนในการขยายขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางเป็น 5 เท่า หรือมีอัตราส่วนการขยายขนาดของปริมาตรเป็น 125 เท่า

ถ้าขยายขนาดโดยให้กำลังมอเตอร์ต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรน้ำหมักคงที่ความเร็วปลายใบพัดจะเพิ่มขึ้น ขณะที่ F/V หรืออัตราเฉือน (shear rate) ของของเหลวจะลดลง และการลดลงของค่า F/V ทำให้เวลาในการผสม (mixing time) เพิ่มขึ้น

เมื่อทำการขยายขนาดโดยควบคุมให้ค่า F/V คงที่ จะทำให้อัตราการกวนคงที่ แต่จะมีค่า P/V และความต้องการกำลังงาน (P) สูงมาก ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากเกินไปจึงไม่เหมาะสม

ส่วนการขยายขนาดโดยการควบคุมให้ค่าค่าเรย์โนลด์คงที่ในทั้งสองระบบนั้น พบว่าค่า P/V ลดลงอย่างมาก ซึ่งหมายถึงระบบที่ทำการขยายขนาดต้องการกำลังงานให้กับใบกวนน้อยมาก ทำให้พารามิเตอร์เกือบทุกชนิดมีค่าลดลงด้วย ซึ่งเป็นการขยายขนาดที่ไม่ประสบความสำเร็จและไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการปฏิบัติจริง

จะเห็นได้ว่าการขยายขนาดโดยเลือกพารามิเตอร์ที่เหมาะสมให้มีค่าคงที่ระหว่างระบบ ต้นแบบและระบบที่ขยายขนาดจะทำให้พารามิเตอร์บางชนิดเกิดการเปลี่ยนแปลงเกินกว่าที่จะสามารถยอมรับได้และไม่สามารถนำมาใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นการจะเลือกพารามิเตอร์ใดในการขยายขนาดนั้นต้องพิจารณาอย่างรอบคอบเพื่อให้ผลที่ได้จากการขยายขนาดตรงกับวัตถุประสงค์ที่ต้องการ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะขยายส่วนการผลิต PHB จากถังหมัก 10 ลิตร ไปสู่ถังหมักขนาด 300 ลิตร โดยศึกษาหาภาวะของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร (K_La) และการผลิต PHB จาก *Bacillus megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ต่อจากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในถังหมักขนาด 10 ลิตร ไปผลิต PHB ในถังหมัก 10 ลิตร โดยวิธี fed-batch ต่อจากนั้นนำข้อมูลที่ศึกษาได้นำไปขยายส่วนการผลิต PHB ในถังหมัก 300 ลิตร เพื่อให้ได้ PHB ปริมาณมากสำหรับนำไปศึกษาสมบัติทางกายภาพ และปรับปรุงสมบัติทางเคมีต่อไป

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี (gas chromatography) รุ่น 3400CX	Varian, USA
แคปพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ชนิด CP-WAX 52CB เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 60 ม.	Varian, USA
เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen generator) รุ่น 9200	Packard, USA
เครื่องผลิตอากาศ (air compressor) รุ่น WL505000AJ	Campbell Hausfeld, USA
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (psychotherm incubator shaker) รุ่น G27 แบบหมุน (rotary)	New Brunswick Scientific, USA
เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S	Sartorius, Germany
เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P	Sartorius, Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P	Kubota, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ รุ่น Centrikon T-42K	Kubota, Japan
เครื่องระเหิดแห้ง (lyophilizer) รุ่น Eyela FD1	Tokyo Rikakikai, Japan
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (VIS spectrophotometer) รุ่น Novaspec II	Pharmacia Biotech, England
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 2000	Cyberscan, Singapore
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124	ISSCO, USA
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL-60	Memmert, Germany
ตู้อบแห้ง (dryer oven) รุ่น UL-80	Memmert, Germany
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325	Tomy, Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W760	Memmert, Germany
เครื่องให้ความร้อน (hot plate stirrer) รุ่น DS201HS	DMS, Japan
ถังหมัก (fermentor) ขนาด 10 ลิตร และ 300 ลิตร	B.E. Marubishi, Japan

1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
กรดบิวทริก [$C_3H_{10}O_2$]	E.Merck Damstadt, Germany
กรดซัลฟูริกเข้มข้น [H_2SO_4]	Reidel, England
กรดซิตริก [$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$]	E.Merck Damstadt, Germany
กรดบอริก [H_3BO_3]	E.Merck Damstadt, Germany
กรดเบนโซอิก [$C_7H_6O_2$]	Nacalai Tesque, Japan
กากน้ำตาล	มิตรผล, ไทย
คลอโรฟอร์ม [$CHCl_3$]	E.Merck Damstadt, Germany
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต [$CuSO_4 \cdot 5H_2O$]	J.T.Baker, USA
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต [$CaCl_2 \cdot 2H_2O$]	E.Merck Damstadt, Germany
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต [$CoCl_2 \cdot 6H_2O$]	Carlo Erba, Italy
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต [$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$]	Carlo Erba, Italy
น้ำตาลทราย	มิตรผล, ไทย
โซเดียมคลอไรด์ [$NaCl$]	ปรุงทิพย์, ไทย
โซเดียมไฮดรอกไซด์ [$NaOH$]	Carlo Erba, Italy
โซเดียมไฮโปคลอไรท์ [$NaOCl$]	Clorox, USA
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [Na_2HPO_4]	Fluka, Germany
นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต [$NiCl_2 \cdot 6H_2O$]	E.Merck Damstadt, Germany
พอลิปีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต	Siama Chemical, USA
แบคทีเรียทริปโตส (bactotryptose)	Difco, USA
โพแทสเซียมคลอไรด์ [KCl]	Carlo Erba, Italy
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต [KH_2PO_4]	Univar, Australia
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต [$FeSO_4 \cdot 7H_2O$]	Unilab, USA

1.2 เคมีภัณฑ์ (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
เมทานอล [CH ₃ OH]	E.Merck Damstadt,Germany
ยูเรีย [N ₂ H ₆ CO]	E.Merck Damstadt,Germany
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	Difco,USA
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	Difco,USA
เอทานอล [C ₂ H ₅ OH]	E.Merck Damstadt,Germany
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต [(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O]	J.T. Baker,USA
เอนไซม์อินเวอร์เทส (EC3.2.1.26 grade V)	Siama Chemical,USA

2. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Bacillus megaterium* BA-019 ซึ่งคัดเลือกโดยรัตนศิริ มุทิตากุล (2538) เก็บรักษาเชื้อโดยถ่ายเชื้อจุลินทรีย์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทกลิเซอร์อลความเข้มข้น 20 % โดยปริมาตร บนอาหารแข็งเอียง นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

beef extract	3 กรัม
bactotryptose	5 กรัม
วุ้นผง	15 กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

3.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) ใช้สูตรของ Doi และคณะ (1986) ซึ่งศึกษาปรับปรุงโดย สุดา สุภาขวินสวัสดิ์ (2542) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

yeast extract	10 กรัม
bactotryptose	10 กรัม
beef extract	5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5 กรัม
น้ำตาลทราย	10 กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายน้ำตาลนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการสร้างและสะสม PHB

คืออาหาร MSM (Mineral salt medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

กากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar)	20.0	กรัม
ยูเรีย	0.8	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
กรดซิตริก	0.75	กรัม
โซเดียมอะซิเตต	2.0	กรัม

yeast extract	0.1	กรัม
กรดบิวทริก	0.8	มิลลิลิตร
สารละลาย trace element	1.0	มิลลิลิตร

แยกละลายเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรตและ สารละลาย trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับ pH 7.0 และนำมาเชื้อแบบมาตรฐาน ส่วนของสารละลายน้ำตาล แยกมาเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

สารละลาย trace element ใน 1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	20.0	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตไฮเดรต	1.30	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตไฮเดรต	0.20	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต	0.60	กรัม
กรดบอริก	0.60	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เทตระคลอไรด์	0.08	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะคลอไรด์	0.50	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	0.05	กรัม
นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์	0.02	กรัม

4. การผลิต PHB ในถังหมัก 10 ลิตร โดย *B. megaterium* BA-019

4.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับทำเป็นกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 2 มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % โดยปริมาตร เพื่อทำเป็นเซลล์แขวนลอย ปรับความเข้มข้นให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 0.5

4.2 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต

ถ่ายเซลล์แขวนลอย จากข้อ 4.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (4 % ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าโดยควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาหาค่าหน้าหนักเซลล์แห้ง และคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ)

4.3 การหาค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร (Volumetric oxygen transfer coefficient) โดยวิธี Dynamic gassing out ในถังหมัก 10 ลิตร

เลี้ยงกล้าเชื้อตามข้อ 4.2 ให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10 % ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ โดยการ เซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อลงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 5 ลิตร ประกอบด้วยสารอาหารตามข้อ 3.3 ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 7 ± 0.1 โดยแปรค่าอัตราการกวนที่ 400 600 และ 800 รอบต่อนาที และแปรอัตราการให้อากาศที่ 0.5 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ตามลำดับ เก็บตัวอย่างแต่ละช่วงเวลาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาหน้าหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ PHB ปริมาณยูเรีย และ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อทำการเลี้ยงจนถึงชั่วโมงที่ 12 ปิดการให้อากาศ และลดอัตราการกวนให้เท่ากับ 80 รอบต่อนาที บันทึกปริมาณออกซิเจนละลายโดยใช้หัววัดออกซิเจน (dissolved oxygen probe) จากนั้นเปิดให้อากาศอีกครั้ง โดยเพิ่มอัตราการกวนให้เท่ากับตอนเริ่มต้น (400 600 และ 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที) บันทึกปริมาณออกซิเจนละลายที่เพิ่มขึ้นจนคงที่ จากนั้นนำค่าออกซิเจนละลายที่บันทึกได้ไปคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร (ภาคผนวก ง) ที่ภาวะการกวนและการให้อากาศต่างๆ

5. การผลิต PHB ในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน เป็นสารอาหารป้อนเข้า

เลี้ยงกล้าเชื้อตามข้อ 4.2 ให้ได้ปริมาณ 400 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10% ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ) จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ โดยการ เซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อลงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ซึ่งมีปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 4 ลิตร ประกอบด้วยสารอาหารตามข้อ 3.3 ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 7±0.1 โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ตามลำดับ (ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อที่ 4.3) เลี้ยงแบบ batch เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงเริ่มมีการป้อนอาหารเข้าและหยุดป้อนอาหารเมื่อปริมาณในถังหมักเท่ากับ 6 ลิตร ซึ่งตรงกับชั่วโมงที่ 21 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยแปรอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้า 3 ค่า คือ 7 10 และ 25 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย อัตราการป้อนอาหารคำนวณได้จากสมการคือ

$$F(t) = [1/Y_{X/S} + Y_{P/X}/Y_{P/S}] (V_0 \mu X_0 e^{\mu t}) / S_F$$

เมื่อ $F(t)$ = อัตราการป้อนอาหารที่ชั่วโมงใดๆ (l/h)

$Y_{X/S}$ = ผลของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป

$Y_{P/S}$ = ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป

$Y_{P/X}$ = ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหนึ่งหน่วยเซลล์

V_0 = ปริมาตรเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (l)

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (h^{-1})

X_0 = ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น (g/l)

S_F = ความเข้มข้นของน้ำตาลในสารอาหารป้อนเข้า (g/l)

t = เวลา (h)

ค่า $Y_{X/S}$ $Y_{P/S}$ $Y_{P/X}$ V_0 μ X_0 และ S_F มีค่าเท่ากับ 0.98 0.45 0.44 4 ลิตร 0.27 ชั่วโมง⁻¹ 15.38 กรัมต่อลิตร และ 350 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

6. การผลิต PHB ในถังหมัก 300 ลิตร โดย *B. megaterium* BA-019

6.1 การหาอายุของกล้าเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร สำหรับการผลิต PHB ในถังหมักขนาด 300 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่แตกต่างกัน

หาอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมในถังหมัก 10 ลิตร โดยเตรียมเซลล์แขวนลอยตามหัวข้อ 4.1 ให้ได้ปริมาณ 600 มิลลิลิตร (10 % ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ) จากนั้นถ่ายเซลล์แขวนลอยลงอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้อาหาร 3 ชนิดคือ สูตรอาหาร rich medium (หัวข้อ 3.2) สูตรอาหาร rich medium ที่มีการลดองค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง (หัวข้อ 3.2) และอาหารเหลว MSM ที่ใช้ในการผลิต PHB เตรียมอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อแต่ละสูตรปริมาณอาหารเท่ากับ 6

6.2 การผลิต PHB จาก *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้ปริมาณ กล้าเชื้อ 5% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากหัวข้อ 6.1 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร (5 % ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหารเหลวที่ใช้ในการผลิต PHB ซึ่งบรรจุในถังหมัก 10 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหารเท่ากับ 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 7±0.1 ให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำ หมักต่อนาที อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างแต่ละช่วงเวลาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ PHB ปริมาณยูเรีย และ ปริมาณน้ำตาล ทั้งหมด

6.3 การผลิต PHB จาก *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 300 ลิตร

6.3.1 การผลิต PHB เมื่อกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ของถังหมักขนาด 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตร มีค่าเท่ากัน

ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากหัวข้อ 6.1 ปริมาตร 8 ลิตร (5 % ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหารเหลวที่ใช้ในการผลิต PHB ซึ่งบรรจุในถังหมัก 300 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหารเท่ากับ 160 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 7.0 ทำการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อ ปริมาตรน้ำหมักต่อนาที อัตราการกวน 280 รอบต่อนาที (ได้จากการคำนวณตามภาคผนวก จ) เก็บตัวอย่างแต่ละช่วงเวลาจนถึง 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาล ปริมาณยูเรีย และปริมาณ PHB

6.3.2 การผลิต PHB เมื่อกำหนดให้ค่าความเร็วรอบของปลายใบกวน (impeller tip speed) ของถังหมักขนาด 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตร มีค่าเท่ากัน

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาในข้อที่ 6.3.1 แต่อัตราการกวนมีค่าเท่ากับ 190 รอบต่อนาที (ได้จากการคำนวณตามภาคผนวก จ)

6.3.3 การผลิต PHB เมื่อกำหนดให้ค่าเรย์โนลด์ส์ของถังหมักขนาด 300 ลิตร และถัง หมัก 10 ลิตร มีค่าเท่ากัน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 6.3.1 แต่อัตราการกวนมีค่าเท่ากับ 60 รอบ ต่อนาที (ได้จากการคำนวณตามภาคผนวก จ)

7. วิธีการวิเคราะห์

7.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหนักปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ โดยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปใส่ในถ้วย อลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์อบแห้ง คำนวณปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข) ในหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

7.2 การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปน้ำตาลรีดิวซ์

นำน้ำหนักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอนไฮม์อินเวอร์เทส 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่ม ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Bernfeld (1955) โดยเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid, DNSA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำตาลซูโครสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

7.3 การหาปริมาณยูเรียในน้ำหมัก

ตามวิธีของ AOAC (1995) โดยนำน้ำหมักที่ทำการปั่นแยกเซลล์ออกแล้วมาเจือจางด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายพาราไดเอธิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ (DMAB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในส่วนใสปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ได้จากการปั่นน้ำหมักที่ใส่ในหลอดทดลอง นำไปบ่มในอ่างน้ำ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณยูเรียกับค่าการดูดกลืนแสง หน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

7.4 การวิเคราะห์ปริมาณ PHB โดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography: GC)

ตามวิธีของ (Comeau และคณะ, 1988) โดยการปั่นเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์มาละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เทใส่ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปประเหิดแห้งภายใต้สุญญากาศ ซึ่งเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียวเติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 3 (3% กรดซัลฟูริก) 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา

ชนิดของคอลัมน์	: แคปพิลารีคอลัมน์ ชนิด CP WAX 52-CB เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 60 เมตร
อุณหภูมิของ injector	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของคอลัมน์	: 130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ detector (FID)	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
Split ratio	: 50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา	: ก๊าซไนโตรเจนอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาณที่ฉีด	: 1 ไมโครลิตร

บทที่ 3

ผลการทดลอง

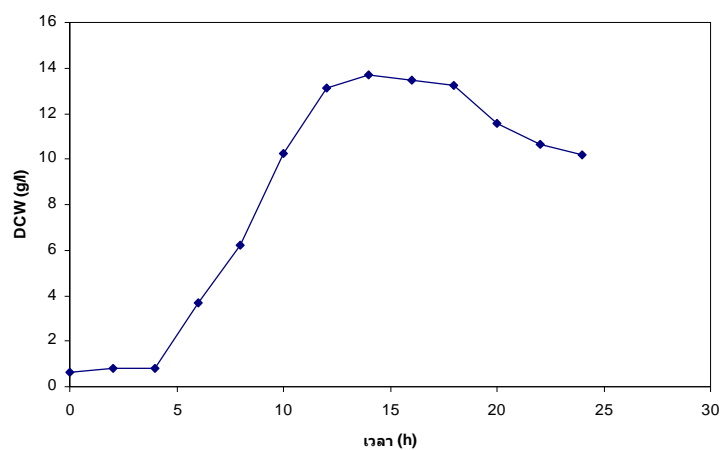
3.1 การผลิต PHB ในถังหมัก 10 ลิตร โดย *B. megaterium* BA-019

3.1.1 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตในระดับขวดเขย่า

จากการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 จากนั้นติดตามการเจริญเติบโตของ *B. megaterium* BA-019 โดยการเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง โดยการหาความหนาแน่นของเซลล์และคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ผลการทดลองสามารถแสดงได้ดังตารางที่ 9 และรูปที่ 6 พบว่าเซลล์อยู่ใน lag phase เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเข้าสู่ exponential phase จนถึงชั่วโมงที่ 12 และเข้าสู่ stationary phase โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 13.71 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 14 และเริ่มเข้าสู่ death phase ในชั่วโมงที่ 18 เชื้อมีอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) สูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ $0.743 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ ดังนั้นจึงเลือกกล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมง นำไปใช้ในงานวิจัยในการผลิต PHB ในถังหมัก 10 ลิตร ต่อไป

ตารางที่ 9 การเติบโตของ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

time (h)	DCW (g/l)	μ (h ⁻¹)
0	0.61	-
2	0.81	0.139
4	0.83	0.012
6	3.67	0.743
8	6.21	0.263
10	10.23	0.125
12	13.10	0.124
14	13.71	0.023
16	13.44	-0.009
18	13.24	-0.007
20	11.55	-0.074
22	10.64	-0.041
24	10.20	-0.021



รูปที่ 6 การเจริญเติบโตของ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

3.1.2 การหาค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร (Volumetric oxygen transfer coefficient) โดยวิธี Dynamic gassing out ในถังหมัก 10 ลิตร

การวิจัยขั้นตอนนี้ได้ศึกษาผลของค่าการถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร (Volumetric oxygen transfer coefficient) ต่อการเติบโตและการผลิต PHB โดยการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 โดยแปรค่าอัตราการปั่นกววนเท่ากับ 400 600 และ 800 รอบต่อนาที และแปรค่าอัตราการให้อากาศ 0.5 1 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และหาค่า K_{La} ที่ชั่วโมงที่ 12 โดยทำการหยุดการให้อากาศแล้ววัดค่าปริมาณออกซิเจนละลายที่ลดลงเมื่อปริมาณออกซิเจนลดลงจนถึงระดับหนึ่งจึงมีการให้อากาศอีกครั้งวัดค่าปริมาณออกซิเจนที่เพิ่มขึ้น (ผลที่ได้แสดงในภาคผนวก ง) ผลการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 โดยควบคุมอัตราการกววนที่ 400 รอบต่อนาที และแปรอัตราการให้อากาศ 0.5 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาทีตามลำดับ แสดงในตารางที่ 10 11 และ 12 และรูปที่ 7 พบว่าเซลล์มีการเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราการให้อากาศสูงขึ้น โดยที่อัตราการกววนที่ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ได้ความหนาแน่นของเซลล์และ PHB สูงสุดที่ 20 12 และ 16 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ PHB มีค่าสูงสุดเท่ากับ 11.24 กรัมต่อลิตร และ 4.36 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ 42.21 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่อัตราการกววนที่ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เนื่องจากเซลล์มีการเติบโตเร็วดังนั้นการใช้น้ำตาลและยูเรียโดย *B. megaterium* BA-019 จึงสูง โดยปริมาณยูเรียหมดที่ชั่วโมงที่ 12

ตารางที่ 13 14 และ 15 และรูปที่ 8 เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการกววนเป็น 600 รอบต่อนาที และแปรอัตราการให้อากาศ 0.5 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่าเซลล์มีการเติบโตมากกว่าเดิม โดยปริมาณเซลล์และปริมาณ PHB เท่ากับ 15.38 กรัมต่อลิตร และ 6.22 ตามลำดับ ที่ 600 รอบต่อนาที 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่ 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ เมื่ออัตราการให้อากาศเป็น 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่าปริมาณเซลล์และปริมาณ PHB เริ่มมีค่าลดลง เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการกววนเป็น 800 รอบต่อนาที และแปรอัตราการให้อากาศ 0.5 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ดังตารางที่ 16 17 และ 18 และรูปที่ 9 ผลปรากฏว่าปริมาณเซลล์และปริมาณ PHB มีค่าลดลงจากเดิมที่ให้อัตรากววนเป็น 600 รอบต่อนาที โดยที่อัตราการกววนเท่ากับ 800 รอบต่อนาที 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 4.57 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 53.64 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ดังนั้นการควบคุมอัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เพื่อผลิต PHB ทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 15.38 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ PHB 6.22 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB 40.44 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนการให้ความเร็วรอบ 800 รอบต่อนาที ทำให้ปริมาณเซลล์และ PHB ลดลงทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเกิด shear rate ที่สูงจนเกิดอันตรายต่อเซลล์ หรืออาจเกิดจากภาวะ oxidative stress เนื่องจากระบบมีปริมาณออกซิเจนละลายมากเกินไป

ตารางที่ 10 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบ batch

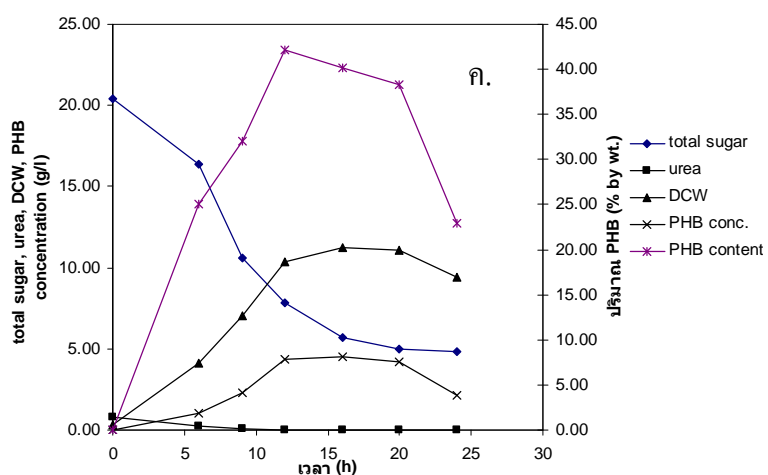
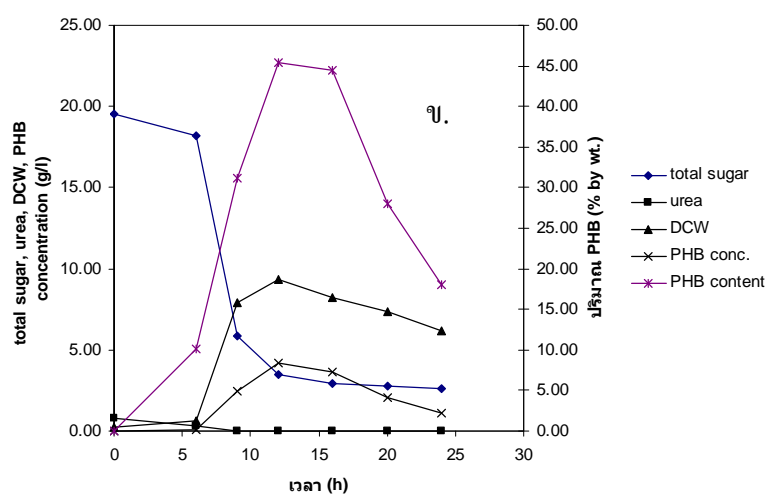
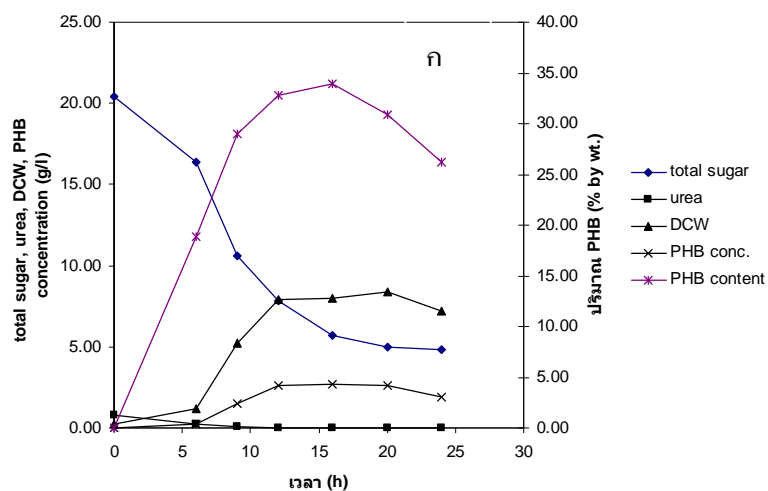
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)
0	20.40	0.82	0.20	0.00	0.00
6	16.37	0.25	1.22	0.23	18.85
9	10.58	0.05	5.25	1.52	28.95
12	7.81	0.01	7.94	2.60	32.75
16	5.73	0.00	7.98	2.71	33.98
20	4.97	0.00	8.41	2.60	30.91
24	4.84	0.00	7.21	1.89	26.21

ตารางที่ 11 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)
0	19.55	0.81	0.20	0.00	0.00
6	18.21	0.31	0.67	0.07	10.15
9	5.89	0.05	7.94	2.48	31.23
12	3.46	0.00	9.30	4.23	45.48
16	2.93	0.00	8.20	3.64	44.39
20	2.79	0.00	7.34	2.06	28.07
24	2.60	0.00	6.21	1.12	18.04

ตารางที่ 12 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)
0	20.40	0.80	0.34	0.00	0.00
6	16.37	0.25	4.14	1.04	25.13
9	10.58	0.04	7.07	2.26	31.97
12	7.81	0.00	10.33	4.36	42.21
16	5.73	0.00	11.24	4.52	40.21
20	4.97	0.00	11.05	4.23	38.28
24	4.84	0.00	9.43	2.16	22.91



รูปที่ 7 การผลิต PHB โดย *B. megaterium* BA-019 ในถังหมัก 10 ลิตรเมื่อใช้อัตราการกวนที่ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ (ก) 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ข) 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ค) 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

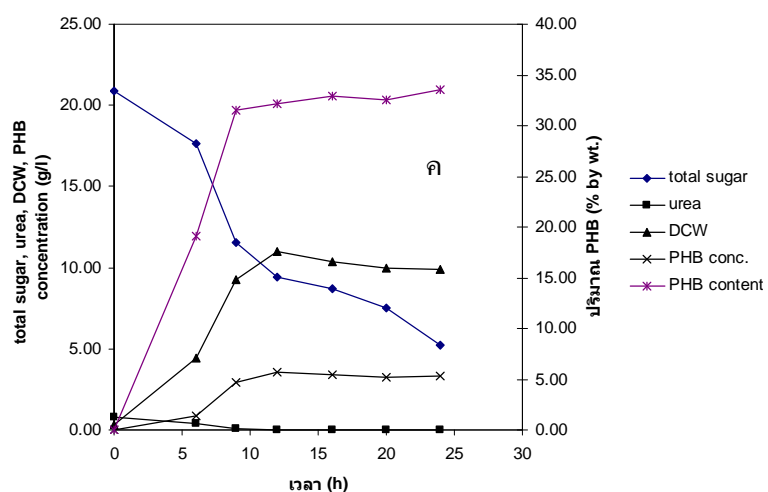
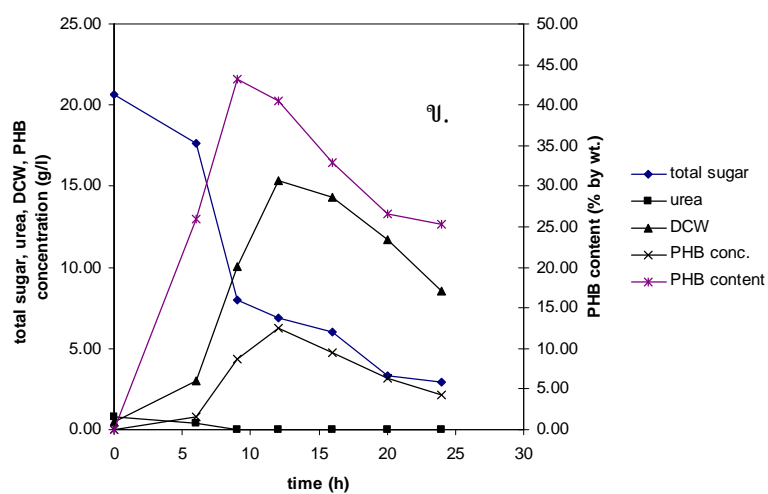
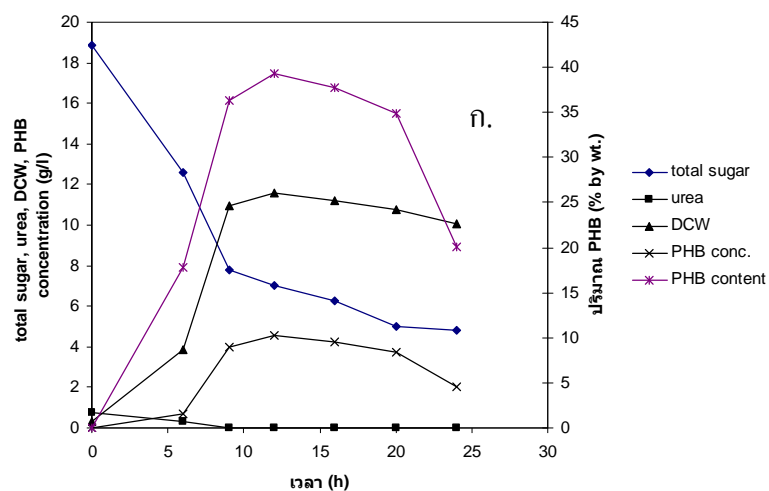
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)
0	18.89	0.78	0.34	0	0
6	12.59	0.34	3.89	0.69	17.74
9	7.81	0.01	10.94	3.98	36.38
12	7.05	0.00	11.57	4.54	39.24
16	6.29	0.00	11.23	4.24	37.76
20	5.03	0.00	10.78	3.76	34.88
24	4.84	0.00	10.04	2.01	20.02

ตารางที่ 14 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบ

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)
0	20.65	0.79	0.45	0.00	0.00
6	17.63	0.36	3.04	0.79	25.99
9	7.97	0.01	10.04	4.33	43.13
12	6.85	0.00	15.38	6.22	40.44
16	6.03	0.00	14.32	4.71	32.89
20	3.32	0.00	11.74	3.13	26.66
24	2.96	0.00	8.58	2.17	25.29

ตารางที่ 15 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)
0	18.89	0.78	0.33	0.00	0.00
6	17.63	0.37	4.40	0.84	19.09
9	11.59	0.07	9.22	2.91	31.56
12	9.44	0.02	10.99	3.54	32.21
16	8.69	0.00	10.35	3.40	32.85
20	7.51	0.00	9.94	3.23	32.49
24	5.23	0.00	9.88	3.31	33.50



รูปที่ 8 การผลิต PHB โดย *B. megaterium* BA-019 ในถังหมัก 10 ลิตร เมื่อใช้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ (ก) 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ข) 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ค) 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

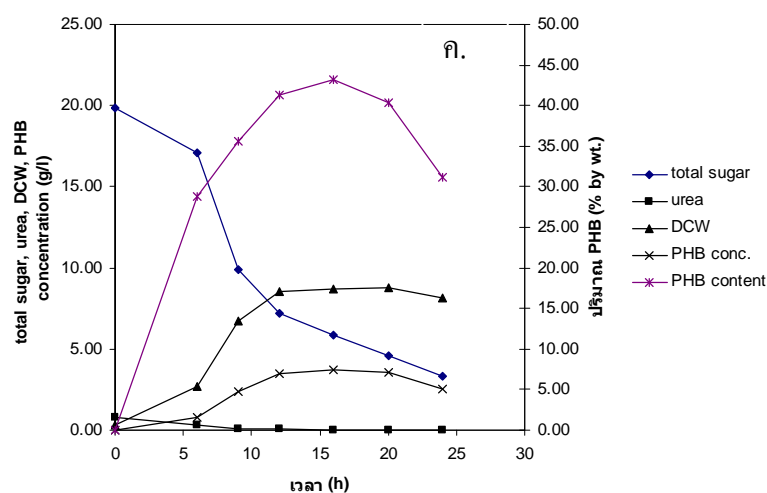
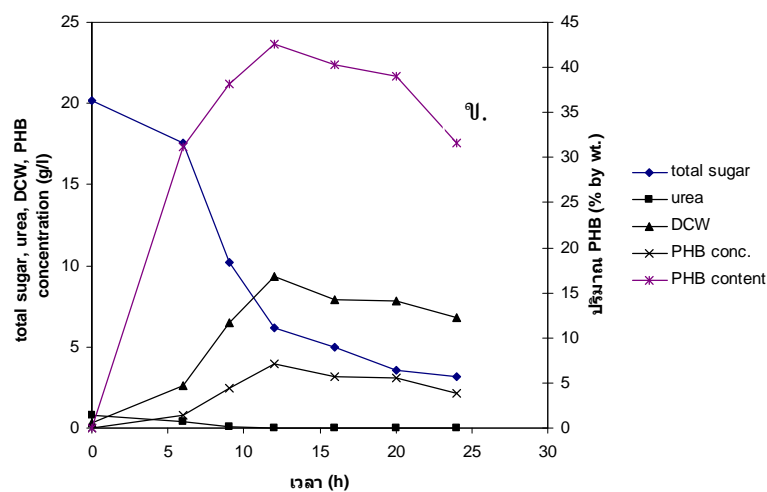
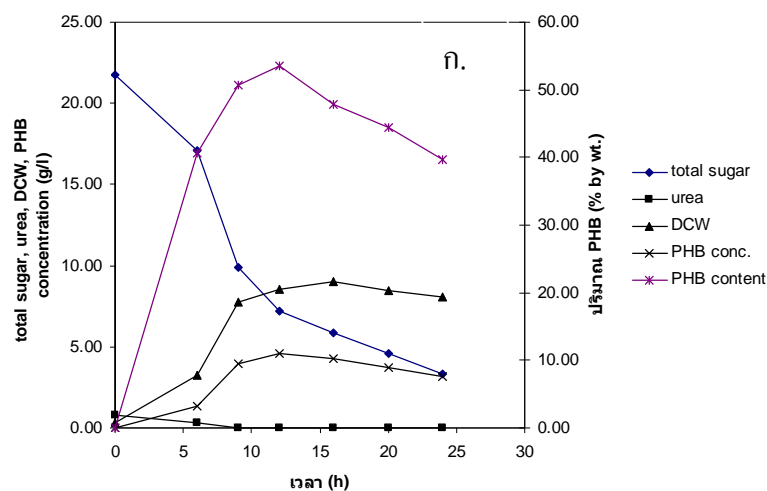
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)
0	21.77	0.82	0.31	0.00	0.00
6	17.12	0.29	3.23	1.31	40.56
9	9.89	0.03	7.72	3.92	50.78
12	7.19	0.00	8.52	4.57	53.64
16	5.83	0.00	8.98	4.30	47.88
20	4.55	0.00	8.43	3.74	44.37
24	3.35	0.00	8.07	3.20	39.65

ตารางที่ 17 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)
0	20.14	0.78	0.32	0.00	0.00
6	17.58	0.38	2.63	0.82	31.18
9	10.22	0.08	6.45	2.46	38.14
12	6.19	0.02	9.35	3.98	42.57
16	4.96	0.00	7.91	3.19	40.33
20	3.55	0.00	7.82	3.05	39.00
24	3.20	0.00	6.77	2.14	31.61

ตารางที่ 18 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)
0	19.88	0.83	0.30	0.00	0.00
6	17.12	0.35	2.67	0.77	28.84
9	9.89	0.09	6.74	2.40	35.60
12	7.19	0.04	8.51	3.51	41.25
16	5.83	0.00	8.69	3.75	43.15
20	4.55	0.00	8.78	3.54	40.32
24	3.35	0.00	8.11	2.53	31.20



รูปที่ 9 การผลิต PHB โดย *B. megaterium* BA-019 ในถังหมัก 10 ลิตร เมื่อใช้อัตราการกวนที่ 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ (ก) 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ข) 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ค) 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมัก 10 ลิตร เมื่อแปรค่าอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ

agitation rate (rpm)	aeration rate (vvm)	$K_L a$ (s^{-1})	OUR (mM/s)	PHB conc. (g/l)	PHB productivity (g/l-h)	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	PHB content (% by wt.)
400	0.5	0.0376	0.032	2.71	0.17	0.61	0.21	33.98
	1.0	0.0387	0.032	4.23	0.35	0.57	0.26	45.48
	1.5	0.0404	0.038	4.52	0.28	0.79	0.35	42.21
600	0.5	0.0458	0.021	4.54	0.38	0.95	0.34	39.23
	1.0	0.0503	0.019	6.22	0.52	1.10	0.46	40.44
	1.5	0.0509	0.023	3.54	0.30	0.93	0.33	32.85
800	0.5	0.0514	0.025	4.57	0.38	0.88	0.40	53.64
	1.0	0.0637	0.026	3.98	0.33	0.63	0.46	54.36
	1.5	0.0676	0.028	3.74	0.17	0.62	0.20	31.19

3.2 การผลิต PHB โดยการเติมสารอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง

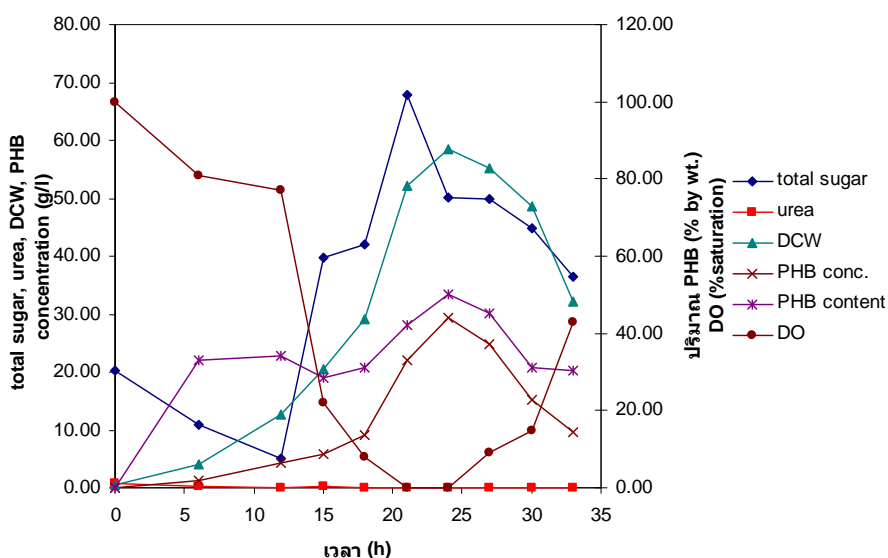
การผลิตสารผลิตภัณฑ์ในระดับอุตสาหกรรมใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบมีการเติมสารอาหารเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้เนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคดังกล่าวนี้ ทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูง และมีอัตราการผลิตสารผลิตภัณฑ์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมสารอาหาร นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และความไม่เสถียรของสายพันธุ์น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง การเพาะเลี้ยงแบบนี้ยังมีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถประยุกต์ใช้กับสารอาหารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ป้องกันการยับยั้งการเติบโตจากผลของการใช้สารที่มีความเข้มข้นสูง เป็นต้น การพัฒนากระบวนการเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิคการป้อนสารอาหารแบบต่างๆ เพื่อการผลิต PHB ได้มีการศึกษาโดยผู้วิจัยคณะต่างๆ มาอย่างต่อเนื่อง

3.2.1 การศึกษาการเพาะเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 25 กรัมต่อกรัม

เลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 4 ลิตร โดยใช้อาหาร MSM โดยมีกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7.0 ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 350 กรัมต่อลิตร และยูเรียเป็นสารป้อนเข้า โดยมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 25 กรัมต่อกรัม ควบคุมอัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ซึ่งเป็นภาวะที่ให้ค่า $K_L a$ ที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการสร้าง PHB ได้ดีที่สุด เริ่มมีการป้อนอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 12 เนื่องจากเป็นช่วงที่ความเข้มข้นของน้ำตาลและยูเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างมาก และเป็นช่วงเวลาที่ค่า Y_{XS} และอัตราการเติบโตจำเพาะสูงที่สุด มีการป้อนอาหารเข้าทุกครั้งชั่วโมงโดยใช้การป้อนอาหารแบบ exponential โดยควบคุมอัตราการป้อนอาหารเข้าตามสมการในหัวข้อที่ 5 ซึ่งสมการดังกล่าวมีสมมติฐานว่าอาหารที่ป้อนเข้าไปจะถูกนำไปใช้ในการสร้างเซลล์และผลิตภัณฑ์เท่านั้น ผลการวิจัยแสดงได้ดังตารางที่ 20 และรูปที่ 10 พบว่า *B. megaterium* BA-019 จะมีการเติบโตเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วนับตั้งแต่เริ่มมีการเติมสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ คือความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 12.74 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 เป็น 20.53 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 15 จากนั้นเซลล์มีการเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 58.47 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่าการผลิต PHB เกิดขึ้นพร้อมกับการเติบโตของเซลล์ ดังนั้นรูปแบบการผลิต PHB จึงเพิ่มขึ้นในรูปแบบเดียวกับการเติบโตของเซลล์ โดยได้ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 29.40 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 50.28 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดพบว่าน้ำตาลเริ่มมีการสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่สูง โดยสูงถึง 67.89 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 21 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อพิจารณาปริมาณยูเรียพบว่า

ตารางที่ 20 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 350 กรัมต่อลิตร ยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 25 กรัมต่อกรัม) เป็นสารอาหารป้อนเข้า

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt)	PHB productivity (g/l-h)
0	20.22	0.77	0.38	0.00	0.00	0.00
6	10.78	0.24	3.99	1.32	33.08	0.22
12	4.98	0.05	12.74	4.36	34.21	0.36
15	39.69	0.15	20.53	5.86	28.55	0.39
18	42.13	0.09	29.13	9.03	31.00	0.50
21	67.89	0.04	52.07	22.00	42.25	1.05
24	50.23	0.00	58.47	29.40	50.28	1.22
27	49.85	0.00	55.30	24.92	45.06	0.92
30	44.69	0.00	48.62	15.08	31.02	0.50
33	36.33	0.00	32.05	9.75	30.41	0.30



รูปที่ 10 การผลิต PHB โดย *B. megaterium* BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน เป็นสารอาหารป้อนเข้า (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 25 กรัมต่อกรัม)

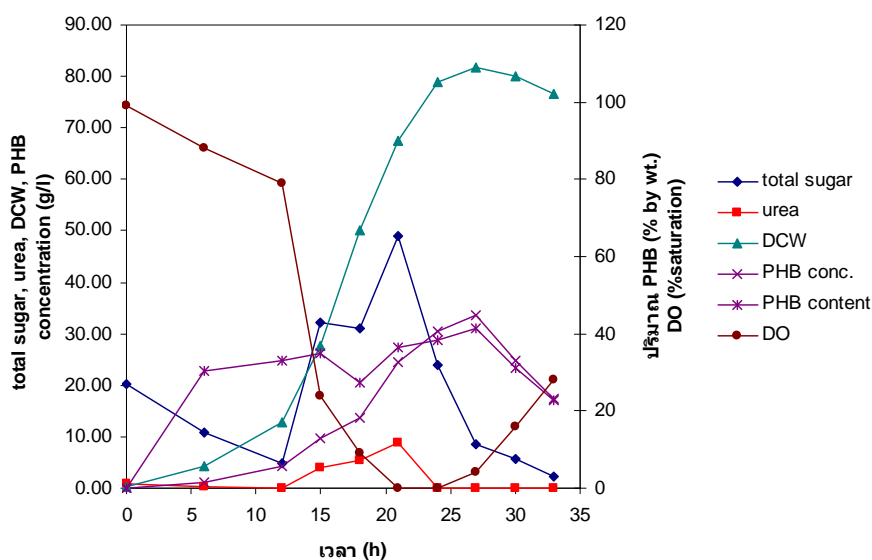
3.2.2 การศึกษาการเพาะเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อ

ไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 10 กรัมต่อกรัม

เลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่มีปริมาณอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 4 ลิตร โดยใช้อาหารเหลว MSM โดยมีกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7.0 ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 350 กรัมต่อลิตร และยูเรียเป็นสารป้อนเข้า โดยมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 10 กรัมต่อกรัม ควบคุมอัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที ซึ่งเป็นภาวะที่ให้ค่า $K_L a$ ที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการสร้าง PHB ได้ดีที่สุด เริ่มมีการป้อนอาหารเข้าที่ ชั่วโมงที่ 12 เนื่องจากเป็นช่วงที่ความเข้มข้นของน้ำตาลและยูเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างมาก และเป็นช่วงเวลาที่ค่า $Y_{X/S}$ และอัตราการเติบโตจำเพาะสูงที่สุด ควบคุมการป้อนสารอาหารโดยใช้เทคนิค exponential feeding ผลการวิจัยแสดงได้ดังตารางที่ 21 และรูปที่ 11 เมื่อเพิ่มปริมาณยูเรียโดยลดอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าจาก 25 กรัมต่อกรัม เป็น 10 กรัมต่อกรัม พบว่า *B. megaterium* BA-019 มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 81.68 กรัมต่อลิตร และได้ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 33.72 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็น 41.28 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกใช้ไปมากกว่าการใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 25 กรัมต่อกรัม ในสารอาหารป้อนเข้า ทั้งนี้เนื่องมาจากการทดลองนี้ *B. megaterium* BA-019 มีการเติบโตมากกว่าเมื่อพิจารณาถึงการใช้ยูเรียของเซลล์พบว่าปริมาณของยูเรียลดลงเหลือ 0 ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยในการทดลองนี้ปริมาณออกซิเจนละลายลงจนถึง 0 % ของอากาศอิ่มตัวตั้งแต่วันที่ ชั่วโมงที่ 21 ของการเลี้ยงเชื้อ จากการทดลองนี้พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณยูเรียในอาหารป้อนเข้าแล้วทำให้ได้ความหนาแน่นเซลล์มากขึ้น ดังนั้นความหนาแน่นของเซลล์จึงแปรตามปริมาณยูเรียที่ใช้

ตารางที่ 21 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 350 กรัมต่อลิตร ยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 10 กรัมต่อกรัม) เป็นสารอาหารป้อนเข้า

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)	PHB productivity (g/l-h)
0	20.18	0.81	0.41	0.00	0.00	0.00
6	10.78	0.24	4.20	1.28	30.47	0.21
12	4.98	0.05	12.74	4.22	33.12	0.35
15	32.11	4.12	27.64	9.69	35.07	0.65
18	31.02	5.27	50.06	13.64	27.25	0.76
21	49.03	8.69	67.44	24.54	36.39	1.17
24	23.98	0.11	78.84	30.34	38.48	1.26
27	8.47	0.00	81.68	33.72	41.28	1.25
30	5.74	0.00	79.94	24.80	31.02	0.83
33	2.16	0.00	76.63	17.34	22.63	0.53

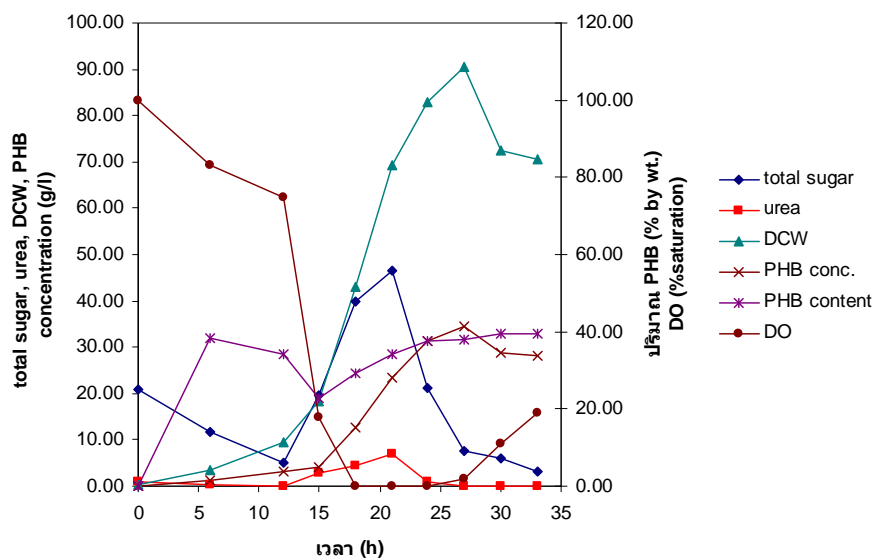


รูปที่ 11 การผลิต PHB โดย *B. megaterium* BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารป้อนเข้า (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 10 กรัมต่อกรัม)

3.2.3 การศึกษาการเพาะเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 7 กรัมต่อกรัม

เลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่มีปริมาณอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 4 ลิตร โดยใช้อาหาร MSM โดยมีกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7.0 ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 350 กรัมต่อลิตร และยูเรียเป็นสารป้อนเข้า จากการทดลองที่แล้วพบว่าความหนาแน่นของเซลล์แปรตามปริมาณยูเรียที่ใช้ ดังนั้นเพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์และ PHB ให้สูงขึ้นจากการทดลองที่ใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 10 กรัมต่อกรัม จึงได้มีการเพิ่มปริมาณยูเรียในสารอาหารป้อนเข้า โดยใช้สารอาหารป้อนเข้าที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 7 กรัมต่อกรัม ผลการวิจัยแสดงได้ดังตารางที่ 22 และรูปที่ 12 พบว่าความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มสูงขึ้นจากเดิม 81.68 กรัมต่อลิตร เป็น 90.42 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 27 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ PHB เท่ากับ 34.45 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็น 38.10 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการจำกัดปริมาณไนโตรเจนไม่จำเป็นต่อการผลิต PHB สำหรับ *B. megaterium* BA-019 เนื่องจากว่าแม้ปริมาณยูเรียจะเพิ่มขึ้นแต่เซลล์ยังสามารถสร้าง PHB ได้

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)	PHB productivity (g/l-h)
0	20.86	0.82	0.38	0.00	0.00	0.00
6	11.82	0.42	3.43	1.32	38.48	0.22
12	5.21	0.09	9.36	3.21	34.29	0.27
15	19.53	2.69	18.44	4.23	22.94	0.28
18	39.84	4.38	43.16	12.65	29.31	0.70
21	46.52	6.89	69.26	23.54	33.99	1.12
24	21.34	1.06	82.84	31.26	37.74	1.30
27	7.45	0.01	90.42	35.45	39.21	1.31
30	5.91	0.00	72.62	28.67	39.48	0.96
33	3.08	0.00	70.72	28.01	39.61	0.85



รูปที่ 12 การผลิต PHB โดย *B. megaterium* BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน เป็นสารอาหารป้อนเข้า (อัตราส่วนคาร์บอนต่อนิโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 7 กรัมต่อกรัม)

เมื่อนำผลการวิจัยการเพาะเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ที่ใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าที่แตกต่างกัน มาคำนวณหาอัตราการผลิต PHB และนำมาเปรียบเทียบกันแสดงดังตารางที่ 23 พบว่าการใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 7 กรัมต่อกรัม ให้ผลของความหนาแน่นเซลล์และปริมาณ PHB สูงกว่าการใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 10 และ 25 กรัมต่อกรัม เนื่องจากมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่มากขึ้นเพียงพอต่อการเติบโตของ *B. megaterium* BA-019 โดยมีอัตราการผลิต PHB เพิ่มสูงขึ้นเป็น 1.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามแม้ความหนาแน่นของเซลล์จะเพิ่มสูงขึ้นแต่ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้นไม่มากนักเมื่อเทียบกับการเพิ่มของเซลล์ และปริมาณ PHB content ลดลงเมื่อปริมาณยูเรียเพิ่มขึ้น

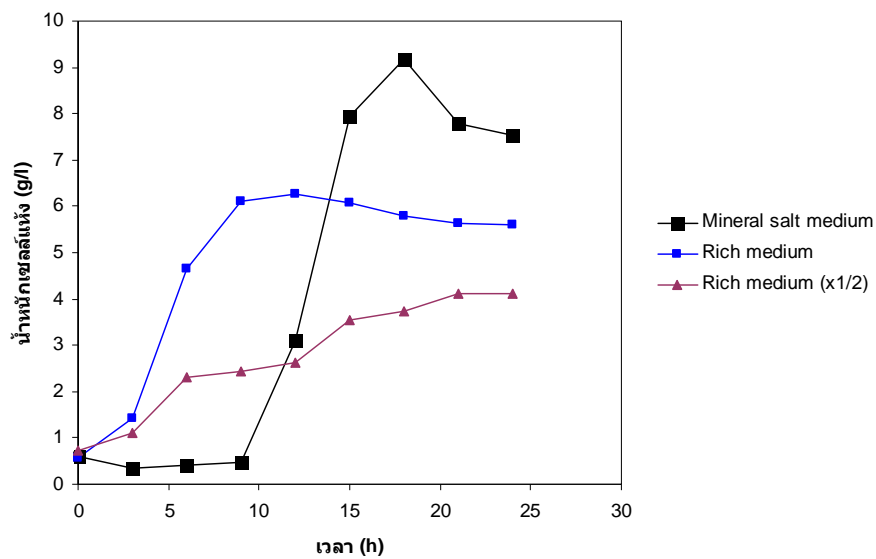
ตารางที่ 23 เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าต่างกัน

C/N ratio (g sugar/ g urea)	time (h)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)	PHB productivity (g/l-h)
7	27	90.42	35.45	39.21	1.31
10	27	81.68	33.72	41.28	1.25
25	24	58.47	29.40	50.28	1.22

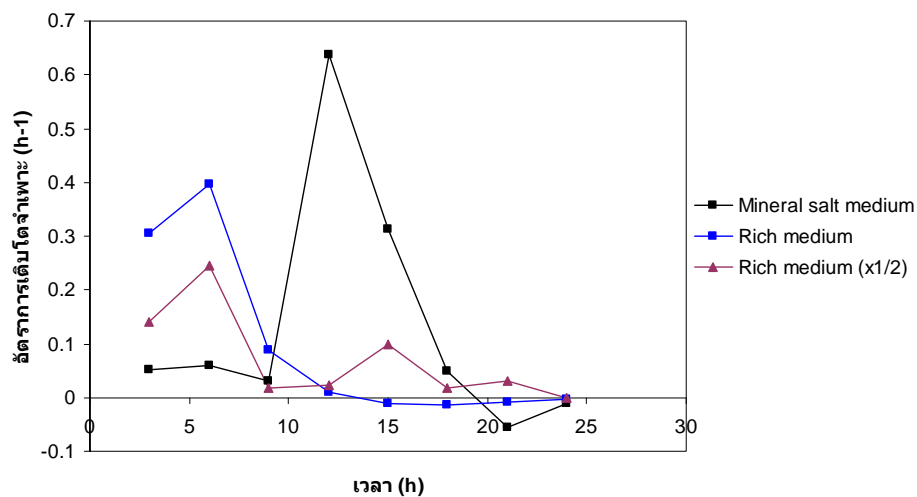
3.3 การผลิต PHB ในถังหมัก 300 ลิตร โดย *B. megaterium* BA-019

3.3.1 การหาอายุของกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 10 ลิตร สำหรับการผลิต PHB ในถังหมักขนาด 300 ลิตร ของเชื้อ *B. megaterium* BA-019 โดยใช้อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่แตกต่างกัน

การทดลองนี้ศึกษาหาอายุของกล้าเชื้อที่จะนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อ ในถังหมัก 300 ลิตร ในการทดลอง ทำการทดลองโดยใช้ถังหมักขนาด 10 ลิตร ให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ สูตรอาหาร rich medium (หัวข้อ 3.2) สูตรอาหาร rich medium ที่มีการลดองค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง (หัวข้อ 3.2) และอาหารเหลว MSM ที่ใช้ในการผลิต PHB ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 13 และรูปที่ 14 พบว่าสูตรอาหาร rich medium และสูตรอาหาร rich medium ที่มีการลดองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนลงครึ่งหนึ่ง เซลล์มีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 4.66 กรัมต่อลิตร และ 2.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่ในอาหารเหลว MSM เซลล์มีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 3.11 กรัมต่อลิตร จากผลการศึกษาพบว่าอาหารที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อคือ อาหาร rich medium เนื่องจากใช้เวลาสั้นในการเลี้ยงกล้าเชื้อและให้ความหนาแน่นของเซลล์สูง แต่เมื่อพิจารณาราคาของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อพบว่าอาหารเหลว MSM มีราคาถูกที่สุด และให้ความหนาแน่นเซลล์ในปริมาณที่แตกต่างจากอาหาร rich medium ไม่มากนัก ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารชนิดนี้เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อสำหรับการผลิต PHB ในถังหมักขนาด 300 ลิตร



รูปที่ 13 การเจริญเติบโตของ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเหลว MSM Rich medium และ Rich medium (x1/2)



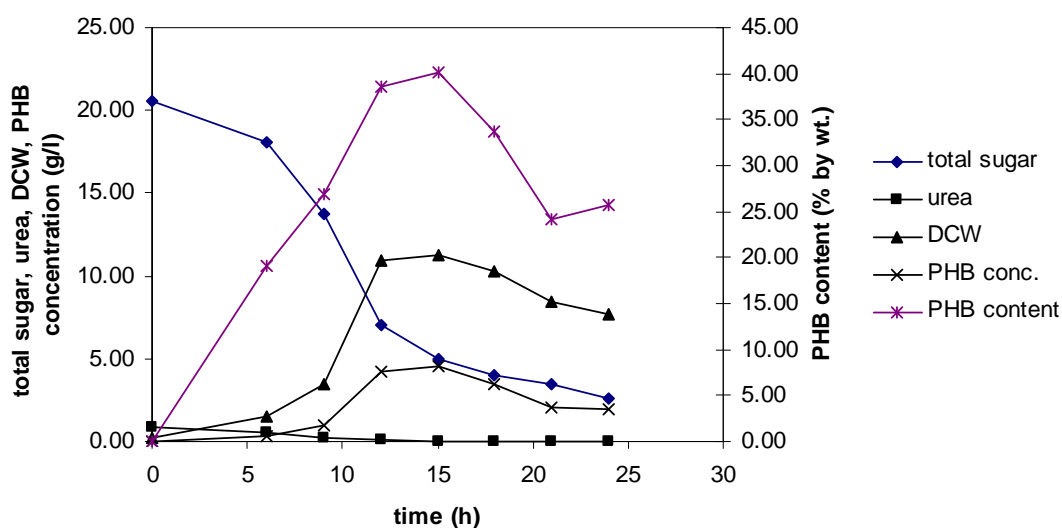
รูปที่ 14 อัตราการเติบโตจำเพาะของ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเหลว MSM Rich medium และ Rich medium (x1/2)

3.3.2 การศึกษาผลิต PHB ในถังหมัก 10 ลิตร โดยลดปริมาณกล้าเชื้อ

เนื่องจากราคาการผลิต PHB ส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณของกล้าเชื้อที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนการผลิต ถ้าใช้กล้าเชื้อปริมาณมากจะส่งผลให้ราคาการผลิต PHB สูงขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากต้องใช้ปริมาณอาหารในการเลี้ยงกล้าเชื้อมากขึ้น ต้องใช้ถังหมักจำนวนมาก ซึ่งเหตุดังกล่าวทำให้ราคาการผลิตสูงขึ้น ดังนั้นถ้าลดปริมาณกล้าเชื้อที่ใช้ได้จะทำให้ต้นทุนในการผลิตต่ำลง และในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพส่วนใหญ่มักใช้ปริมาณกล้าเชื้อเพียง 5 % ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทดลองใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 5 % ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการผลิต PHB ในถังหมัก 10 ลิตร เพื่อทดสอบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างไรในแง่ของปริมาณเซลล์ และการผลิต PHB ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 24 และรูปที่ 15 ผลการทดลองพบว่าความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้น PHB มีปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB เท่ากับ 11.22 กรัมต่อลิตร และ 4.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตเมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 10 % ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าปริมาณเซลล์ และ PHB มีปริมาณลดลงไม่มากนัก

ตารางที่ 24 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 5 % ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น ให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบ batch

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)
0	20.54	0.82	0.18	0.00	0.00
6	18.02	0.54	1.50	0.29	19.15
9	13.79	0.21	3.44	0.91	26.87
12	7.02	0.07	10.93	4.21	38.56
15	5.03	0.00	11.22	4.50	40.13
18	3.96	0.00	10.28	3.47	33.72
21	3.51	0.00	8.43	2.03	24.11
24	2.64	0.00	7.67	1.97	25.65



รูปที่ 15 การผลิต PHB โดย *B. megaterium* BA-019 เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 5% ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น ให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที

3.3.3 การขยายส่วนการผลิต PHB เมื่อกำหนดเกณฑ์การขยายส่วนให้คงที่ในถังหมักขนาด 300 ลิตร

สำหรับการพิจารณาการขยายส่วนนั้นจะมีเกณฑ์คงที่ที่ใช้ในการขยายส่วนถังหมักแบบดังกล่าวในการทดลองนี้ ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) และค่าเรย์โนลด์ส์นัมเบอร์ (N_{RE})

3.3.2.1 การขยายส่วนการผลิต PHB เมื่อกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน

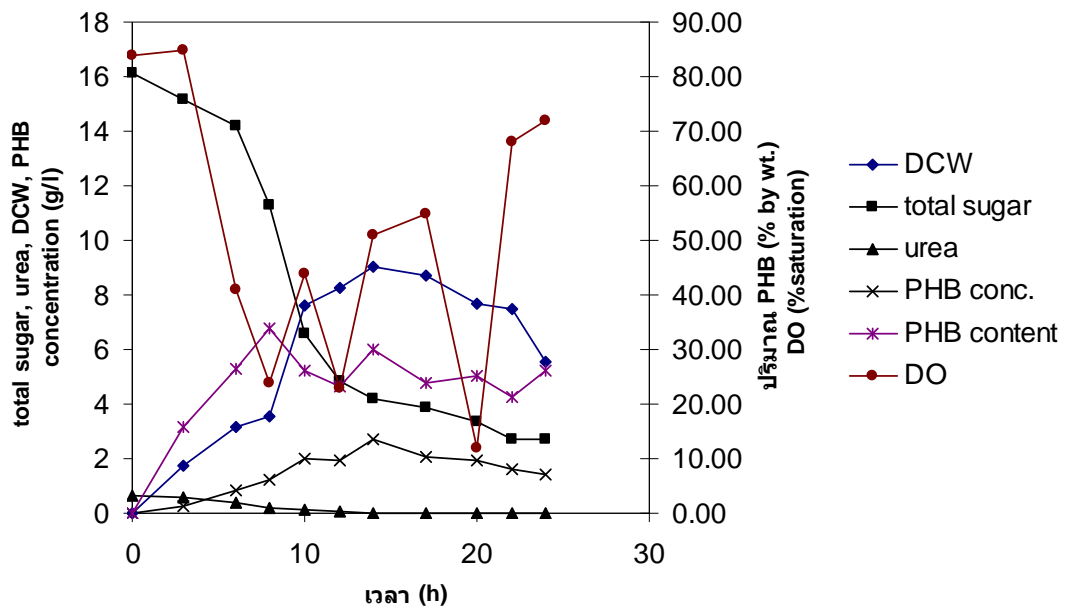
การทดลองนี้ทำการทดลองตามวิธีที่ 6.2.1 ซึ่งการกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) มีค่าเท่ากัน ทำการคำนวณให้อยู่ในรูปของอัตราการกวน โดยใช้อัตราการกวน 280 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ทำการเลี้ยงเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากตารางที่ 25 และรูปที่ 16 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 9.03 กรัมต่อลิตร และ 2.71 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 30.01 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ชั่วโมงที่ 14 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อพิจารณาปริมาณออกซิเจนละลายพบว่ามีค่าลดลงตั้งแต่เริ่มเลี้ยงเชื้อจนถึงชั่วโมงที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเซลล์มีการนำออกซิเจนไปใช้ในการเจริญของเซลล์ และในการทำกิจกรรมต่างๆ หลังจากชั่วโมงที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะ late log phase ซึ่งในระยะนี้เซลล์มีกิจกรรมน้อยลงเมื่อเทียบกับ mid log phase ทำให้ต้องการออกซิเจนน้อยลงส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนละลายในระบบมีค่าเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามที่ชั่วโมงที่ 12 และชั่วโมงที่ 20 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณออกซิเจนละลายลดลงเหลือ 23 % ของอากาศอิ่มตัว และ 20 % ของอากาศอิ่มตัว เนื่องจากระบบไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ทำให้อุณหภูมิในระบบสูงขึ้นถึง 40 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนละลายลดลงอย่างมากทั้งนี้เนื่องมาจากออกซิเจนละลายในน้ำน้อยลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

เมื่อเทียบกับการผลิต PHB ในถังหมัก 10 ลิตร ที่มีการใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 5 % ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าปริมาณเซลล์และปริมาณ PHB ลดลงแต่ไม่มากนัก ซึ่งการที่ได้ปริมาณเซลล์และปริมาณ PHB น้อยลงนั้นอาจเกิดจากเทคนิคการเตรียมอาหารและการทำปลอดเชื้อในถังหมัก 300 ลิตร เนื่องจากพบว่าที่ชั่วโมงที่ 0 นั้น ความเข้มข้นของน้ำตาลและยูเรียมีค่าเท่ากับ 16.12 กรัมต่อลิตร และ 0.63 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งลดลงจากปริมาณที่ต้องการคือ 20 กรัมต่อลิตร และ 0.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 25 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 280 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 300 ลิตร (กำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน)

time (h)	DCW (g/l)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)	DO (% saturation)
0	0.00	16.12	0.63	0.00	0.00	84
3	1.71	15.16	0.55	0.27	15.79	85
6	3.16	14.19	0.39	0.84	26.58	41
8	3.56	11.29	0.21	1.21	33.99	24
10	7.62	6.58	0.10	1.99	26.12	44
12	8.29	4.84	0.09	1.92	23.16	23
14	9.03	4.19	0.01	2.71	30.01	51
17	8.74	3.87	0.00	2.09	23.91	55
20	7.67	3.35	0.00	1.92	25.03	12
22	7.46	2.71	0.00	1.59	21.31	68
24	5.52	2.68	0.00	1.44	26.09	72



รูปที่ 16 การผลิต PHB โดย *B. megaterium* BA-019 เมื่อให้อัตราการกวนที่ 280 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมักขนาด 300 ลิตร (กำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน)

3.3.2.2 การขยายส่วนการผลิต PHB เมื่อกำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน

การทดลองนี้ทำการทดลองเหมือนในหัวข้อ 6.2.2 ซึ่งการกำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) มีค่าเท่ากัน จึงทำการคำนวณให้อยู่ในรูปของอัตราการกวน โดยใช้อัตราการกวน 190 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ทำการเลี้ยงเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุม pH 7.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

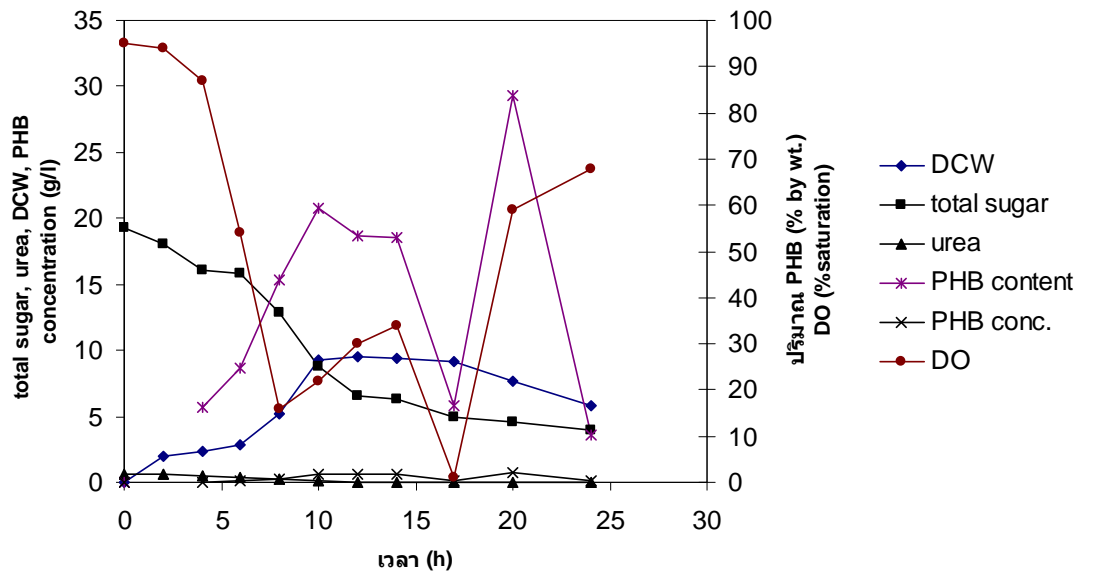
จากตารางที่ 26 และรูปที่ 17 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้ง สูงสุดเท่ากับ 9.50 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ขณะที่ปริมาณ PHB สูงสุดที่ 1.91 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ คิดเป็น 20.72 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งลดลงเมื่อเทียบกับการผลิต PHB ในถังหมัก 300 ลิตร ในกรณีที่ใช้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักเป็นเกณฑ์คงที่ เมื่อพิจารณาปริมาณออกซิเจนละลายพบว่ามีการลดลงตั้งแต่เริ่มเลี้ยงเชื้อจนถึงชั่วโมงที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเซลล์มีการนำออกซิเจนไปใช้ในการเจริญของเซลล์ หลังจากชั่วโมงที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะ late log phase ซึ่งในระยะนี้เซลล์มีกิจกรรมน้อยลงเมื่อเทียบกับระยะ mid log phase ทำให้ต้องการออกซิเจนน้อยลงส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนละลายในระบบมีค่าเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามที่ชั่วโมงที่ 17 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณออกซิเจนละลายลดลงเหลือ 1 % ของอากาศอิ่มตัว แม้ว่าเซลล์จะเข้าสู่ระยะ stationary phase แล้วก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากระบบไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ทำให้อุณหภูมิในระบบสูงขึ้นถึง 45 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนละลายลดลงอย่างมาก

จากผลการทดลองสามารถสรุปการใช้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) ให้คงที่ไม่สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการขยายส่วนการผลิต PHB ในถังหมัก 300 ลิตร ซึ่งการทดลองต่อไปจะกำหนดให้ค่าเรย์โนลด์ส์นัมเบอร์ (N_{RE}) มีค่าคงที่เป็นเกณฑ์ในการขยายส่วนต่อไป

ตารางที่ 26 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 190 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 300 ลิตร (กำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน)

time (h)	DCW (g/l)	sugar conc (g/l)	urea conc. (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)	DO (% saturation)
0	0.00	19.35	0.67	0.00	0.00	95
2	1.99	18.06	0.57	-	-	94
4	2.29	16.12	0.53	0.13	5.68	87
6	2.87	15.8	0.40	0.25	8.71	54
8	5.21	12.9	0.23	0.8	15.36	16
10	9.22	8.8	0.13	1.91	20.72	22
12	9.50	6.61	0.00	1.77	18.63	30
14	9.40	6.29	0.00	1.74	18.51	34
17	9.16	4.93	0.00	0.53	5.79	1
20	7.71	4.56	0.00	2.26	29.31	59
24	5.78	3.99	0.00	0.21	3.63	68

- หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง



รูปที่ 17 การผลิต PHB โดย *B. megaterium* BA-019 เมื่อให้อัตราการกวนที่ 190 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมักขนาด 300 ลิตร (กำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน)

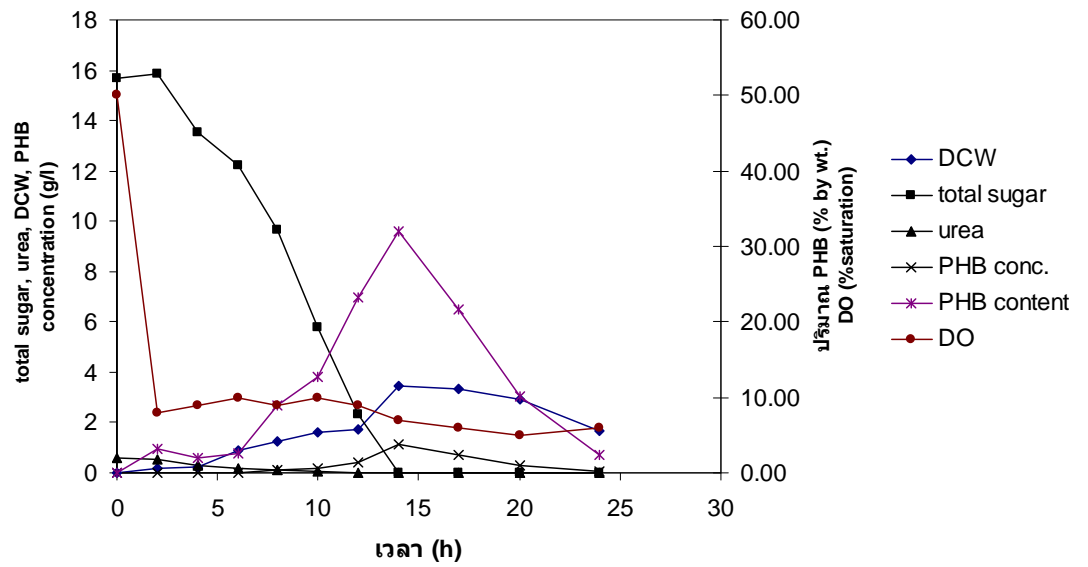
3.3.2.2 การขยายส่วนการผลิต PHB เมื่อกำหนดให้ค่าเรย์โนลด์์นัมเบอร์ (N_{RE}) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน

การทดลองนี้ทำการทดลองเหมือนในหัวข้อ 6.3.3 ซึ่งการกำหนดให้ค่าเรย์โนลด์์นัมเบอร์ (N_{RE}) มีค่าเท่ากัน จึงทำการคำนวณให้อยู่ในรูปของอัตราการกวน โดยใช้อัตราการกวน 60 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ทำการเลี้ยงเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากตารางที่ 27 และรูปที่ 18 พบว่าเซลล์และ PHB ที่ได้มีปริมาณลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับเมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) และความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) เป็นเกณฑ์คงที่ โดยปริมาณเซลล์และ PHB มีค่าเท่ากับ 3.46 กรัมต่อลิตร และ 1.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากใช้อัตราการกวนเพียงแค่ 60 รอบต่อนาที ทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายในระบบมีค่าต่ำดังแสดงในตารางที่ 35 ส่งผลให้ไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการเติบโตและสร้าง PHB จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าค่าเรย์โนลด์์นัมเบอร์ (N_{RE}) ไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นเกณฑ์คงที่ในการขยายส่วนการผลิต PHB ในถังหมัก 300 ลิตร

ตารางที่ 27 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้อัตราการกวนที่ 60 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 300 ลิตร (กำหนดให้ค่าเรย์โนลด์์นัมเบอร์ (N_{RE}) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน)

time (h)	DCW (g/l)	sugar conc. (g/l)	urea conc. (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)	DO (% saturation)
0	0.00	15.67	0.57	0.00	0.00	50
2	0.20	15.86	0.56	0.00	1.56	8
4	0.25	13.54	0.29	0.01	2.03	9
6	0.87	12.19	0.16	0.02	2.56	10
8	1.26	9.67	0.11	0.11	8.95	9
10	1.62	5.80	0.06	0.21	12.69	10
12	1.70	2.32	0.02	0.40	23.33	9
14	3.46	0.00	0.00	1.11	32.02	7
17	3.32	0.00	0.00	0.72	21.59	6
20	2.90	0.00	0.00	0.30	10.21	5
24	1.68	0.00	0.00	0.04	2.35	6



รูปที่ 18 การผลิต PHB โดย *B. megaterium* BA-019 เมื่อให้อัตราการกวนที่ 60 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมักขนาด 300 ลิตร (กำหนดให้ค่าเรย์โนลด์ส์นัมเบอร์ (N_{RE}) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน)

เมื่อนำผลที่ได้จากการขยายส่วนโดยใช้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) และค่าเรย์โนลด์์นัมเบอร์ (N_{RE}) เป็นเกณฑ์ คงที่ มาเปรียบเทียบกับการผลิต PHB ในถังหมักขนาด 10 ลิตร สามารถสรุปได้ในตารางที่ 28 ซึ่งพบว่าค่าทางจลนศาสตร์ ได้แก่ $Y_{X/S}$ $Y_{P/S}$ และ PHB productivity มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับการผลิต PHB ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ในกรณีที่ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10 % ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที แต่เมื่อเทียบกับกรณีที่ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 5 % ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าค่าทางจลนศาสตร์ เมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการผลิต PHB ในถังหมัก 10 ลิตร มากที่สุด ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) เหมาะสมมากที่สุดที่จะนำไปใช้เป็นเกณฑ์คงที่ในการขยายส่วนการผลิต PHB ในถังหมัก 300 ลิตร

ตารางที่ 28 การเปรียบเทียบค่าทางจลนศาสตร์ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในถังหมัก 300 ลิตร เพื่อผลิต PHB เมื่อทำการผลิตที่กำหนดเกณฑ์การขยายส่วนคงที่เหมือนในถังหมักขนาด 10 ลิตร

fermentor (l)	culture medium	inoculum size (% v/v)	agitation rate (rpm)	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	cell productivity (g/l-h)	PHB productivity (g/l-h)
10	Rich medium	10	600	1.10	0.46	1.28	0.52
	MSM	5	600	0.71	0.29	0.75	0.30
300	MSM	5	280 ^a	0.76	0.23	0.65	0.19
	MSM	5	190 ^b	0.75	0.18	0.79	0.19
	MSM	5	60 ^c	0.21	0.07	0.25	0.08

a คือ ความเร็วรอบของใบกวนเมื่อกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน

b คือ ความเร็วรอบของใบกวนเมื่อกำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน

c คือ ความเร็วรอบของใบกวนเมื่อกำหนดให้ค่าเรย์โนลด์ส์นัมเบอร์ (N_{RE}) ของถังหมัก 300 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยแปรค่าอัตราการกวนที่ 400 600 และ 800 รอบต่อนาที และแปรอัตราการให้อากาศที่ 0.5 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกคือ กากน้ำตาล และ ยูเรียตามลำดับ จากนั้นนำภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB มาใช้ในการผลิต PHB แบบ fed-batch ในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยแปรค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้า คือ 7 10 และ 25 โดยใช้การป้อนอาหารแบบ exponential feeding และนำมาใช้ในการขยายส่วนการผลิต PHB ในถังหมัก 300 ลิตร โดยใช้เกณฑ์คงที่ 3 ค่า ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) และค่าเรย์โนลด์ส์นัมเบอร์ (N_{RE}) ผลปรากฏว่าในการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch สามารถเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ได้สูงขึ้นเป็นอย่างมาก แต่ปริมาณ PHB ค่อนข้างคงที่ และอัตราการผลิต PHB มีค่าไม่ค่อยแตกต่างกัน ขณะที่การขยายส่วนการผลิต PHB ในถังหมัก 300 ลิตร โดยการเพาะเลี้ยงแบบ batch โดยใช้เกณฑ์คงที่ที่กล่าวมาข้างต้น พบว่า ปริมาณเซลล์ ปริมาณ PHB และค่าทางจลนศาสตร์ มีค่าลดลง เมื่อเทียบกับการผลิต PHB ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ในกรณีที่ใช้ปริมาณ 5 % ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเทคนิคการเตรียมอาหาร และเทคนิคการฆ่าเชื้อ

4.1 การศึกษาการผลิต PHB ในถังหมัก 10 ลิตร โดยแปรค่าอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ

ผลการวิจัยพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อในระดับขวดเขย่า แบบที่เรียดังกล่าวมีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ 6 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกใช้กล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเพื่อการผลิต PHB ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

การศึกษารเปรียบเทียบการผลิต PHB โดยใช้อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศที่แตกต่างกันในถังหมัก 10 ลิตร พบว่า เมื่อพิจารณาที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และแปรค่าอัตราการให้อากาศที่แตกต่างกัน คือ 0.5 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณ PHB และค่าทางจลนศาสตร์ ได้แก่ $Y_{X/S}$ และ $Y_{P/S}$ มีค่าสูงสุดที่อัตราการให้อากาศที่ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และเมื่อพิจารณาค่า K_{La} พบว่ามีค่ามากขึ้นเมื่ออัตราการให้อากาศสูงขึ้น ซึ่งค่า K_{La} เป็นค่าที่บอกถึงอัตราการถ่ายเท

เมื่อพิจารณาที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และแปรค่าอัตราการให้อากาศ 0.5 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่าค่า K_{La} มีค่ามากขึ้นเมื่อเทียบกับอัตราการกวนที่ 400 รอบต่อนาที ทุกๆอัตราการให้อากาศ และที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที ทุกอัตราการให้อากาศพบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณ PHB มีค่ามากขึ้นเมื่อเทียบกับอัตราการกวนที่ 400 รอบต่อนาที ทุกอัตราการให้อากาศ ทั้งนี้เนื่องมาจากค่า K_{La} สูงขึ้น ทำให้ในระบบมีปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ และการสังเคราะห์ PHB โดยพบว่าที่อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณ PHB และค่าทางจลนศาสตร์ ได้แก่ $Y_{X/S}$ $Y_{P/S}$ และ PHB productivity มีค่าสูงที่สุด

และเมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 800 รอบต่อนาที และแปรอัตราการให้อากาศ 0.5 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่า K_{La} มีค่าสูงขึ้นตามลำดับ และมีค่าสูงกว่าการทดลองที่ให้อัตราการกวน 400 และ 600 รอบต่อนาที ทุกอัตราการให้อากาศ แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณเซลล์ ปริมาณ PHB และค่าทางจลนศาสตร์มีค่าลดลงทั้งที่ K_{La} มีค่าเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที เป็นภาวะที่รุนแรงเกินไปสำหรับ *B. megaterium* BA-019 ทำให้เกิดภาวะความกดดันขึ้นต่อเซลล์ เช่น ภาวะที่มีแรงเฉือนมากเกินไปทำให้เกิดอันตรายต่อตัวเซลล์ (shear stress) และภาวะ Oxidative stress ซึ่งเกิดจากในระบบมีปริมาณออกซิเจนละลายมากเกินไปทำให้เกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species) ซึ่งสามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ Junker (2004) รายงานว่าเมื่อความเร็วรอบปลายใบพัดมีค่าเกิน 3.2 เมตรต่อวินาที จะเกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ที่อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที มีค่าความเร็วรอบปลายใบพัดเท่ากับ 3.95 เมตรต่อวินาที งานวิจัยของ Belo และคณะ (2005) รายงานว่าเมื่อให้ปริมาณออกซิเจนในถังหมักมากขึ้นโดยการเพิ่มความดันในระบบ 1.5 MPa ทำให้เกิดการยับยั้งระบบเมแทบอลิซึม และทำให้เซลล์มีปริมาณลดลง

สรุปได้ว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB โดย *B. megaterium* BA-019 ในระดับถังหมักขนาด 10 ลิตร คือ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 25 โดยให้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน คือ กากน้ำตาล และ ยูเรีย ตามลำดับ อุณหภูมิควบคุมที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 และควบคุมอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่ 600

4.2 การศึกษาการผลิต PHB โดยการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 แบบมีการป้อนสารอาหาร

จากการทดลองที่แล้วพบว่าที่อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ให้ค่า K_{La} ที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB มากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกภาวะนี้มาใช้ในการศึกษาการผลิต PHB โดยการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 แบบมีการป้อนสารอาหารในถังหมัก 10 ลิตร โดยใช้เทคนิค exponential feeding ผลการทดลองพบว่าเมื่อค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 25 เซลล์มีการเติบโตที่มากขึ้น และมีการสร้าง PHB มากขึ้นเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบไม่มีการเติมอาหารเข้าไปในระบบ โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 58.47 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB 29.40 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 50.28 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณารูปแบบการใช้น้ำตาลพบว่า น้ำตาลปริมาณมากสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่ปริมาณของยูเรียหมดลงอย่างรวดเร็วจึงเป็นสาเหตุให้เกิดการสะสมน้ำตาลในระบบเป็นปริมาณมาก ดังนั้นจึงได้มีการเพิ่มปริมาณยูเรียในสารอาหารป้อนเข้าเพื่อให้เพียงพอต่อการเติบโตของเซลล์และการสร้าง PHB โดยใช้สารอาหารป้อนเข้าที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 พบว่าความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณ PHB เพิ่มมากขึ้น โดยได้ความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 81.68 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB 33.72 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 41.28 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHB เพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการใช้ปริมาณยูเรียมากขึ้น จากการทดลองที่ใช้ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 10 แสดงให้เห็นว่าปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHB แปรผันโดยตรงกับปริมาณยูเรียที่ใช้ ดังนั้นเพื่อเพิ่มปริมาณ PHB จึงเพิ่มปริมาณยูเรียในสารอาหารป้อนเข้าโดยลดอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเป็น 7 ผลที่ได้คือความหนาแน่นของเซลล์สูงขึ้นกว่าเดิมโดยเท่ากับ 90.42 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ PHB 35.45 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 39.21 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีอัตราการผลิต PHB เท่ากับ 1.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลที่ได้สามารถสรุปว่า *B. megaterium* BA-019 จำเป็นต้องได้สารอาหารครบถ้วนเพื่อใช้ในการเติบโตและการผลิต PHB เนื่องจากผลการวิจัยที่ได้พบว่า *B. megaterium* BA-019 เป็นจุลินทรีย์ที่มีการผลิต PHB ไปพร้อมกับขณะที่เซลล์มีการเติบโต โดยไม่จำเป็นต้องมีการจำกัดสารอาหาร ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวแบบ fed-batch จึงไม่จำเป็นต้องใช้การเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนเหมือนจุลินทรีย์ที่จำเป็นต้องมีการจำกัดสารอาหารบางชนิดและมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป จึงจะเกิดการสะสม PHB ในปริมาณมาก ผลการวิจัยที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ อติพล บุญเรืองถาวร (2543) ผู้วิจัยดังกล่าวได้ทำการเพาะเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ที่มีการใช้เทคนิค pH-stat ควบคุมการ

สรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *B. megaterium* BA-019 โดยวิธี fed-batch ที่มีการป้อนอาหารเข้าโดยใช้เทคนิค exponential feeding และใช้กากน้ำตาลและยูเรีย ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ราคาถูกเป็นสารอาหารหลัก โดยควบคุมอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่ 600 รอบต่อนาที และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้า 7 เป็นผลให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้น PHB และอัตราการผลิต PHB เพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับหมักแบบไม่มีการป้อนสารอาหาร คือได้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 15.38 กรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยงแบบไม่มีการเติมสารอาหารในถังหมัก 10 ลิตร เป็น 90.42 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นจาก 6.22 กรัมต่อลิตร จากการเพาะเลี้ยงแบบไม่มีการป้อนสารอาหาร เป็น 35.45 กรัมต่อลิตร

4.3 การขยายส่วนการผลิต PHB ในถังหมัก 300 ลิตร โดยใช้เกณฑ์คงที่เช่นเดียวกับในถังหมัก 10 ลิตร

เนื่องจากปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อราคาการผลิตในระดับการขยายส่วน คือ ราคาของแหล่งคาร์บอน ดังนั้นในการทดลองขั้นนี้จึงศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับใช้เลี้ยงกล้าเชื้อเพื่อนำไปใช้ในการผลิต PHB ในถังหมักขนาด 300 ลิตร โดยในขั้นตอนนี้ใช้สูตรอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ 3 ชนิด คือ สูตรอาหาร rich medium สูตรอาหาร rich medium ที่มีการลด

จากการทดลองที่ใช้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) เป็นเกณฑ์คงที่ โดยใช้อัตราการกวนเท่ากับ 280 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่าเซลล์มีการเติบโตสูงสุดที่ 14 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และมีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 9.03 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB 2.71 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 30.01 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อพิจารณาการใช้ความเร็วรอบปลายใบพัด (impeller tip speed) เป็นเกณฑ์คงที่พบว่า ปริมาณ PHB ลดลงจากเดิมที่ใช้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) โดย ปริมาณ PHB ลดลงเหลือเพียง 1.91 กรัมต่อลิตร จึงสรุปได้ว่าความเร็วรอบปลายใบพัด (impeller tip speed) ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเกณฑ์ในการผลิต PHB ในถังหมัก 300 ลิตร โดย *B. megaterium* BA-019 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการใช้ความเร็วรอบปลายใบพัดเป็นเกณฑ์คงที่มีข้อเสียคือจะทำให้ประสิทธิภาพการให้อากาศมีค่าลดลงซึ่งอาจแก้ปัญหาโดยการเพิ่มจำนวนใบพัดในถังหมัก (Brown, 1982) และเมื่อใช้ค่าเรย์โนลด์ส์นัมเบอร์ (N_{RE}) เป็นเกณฑ์คงที่ในการผลิต PHB ปริมาณเซลล์และ ปริมาณ PHB ลดลงอย่างมาก โดยเท่ากับ 3.46 กรัมต่อลิตร และ 1.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำค่าทางจลนศาสตร์จากการผลิต PHB ในถังหมัก 300 ลิตร มาเปรียบเทียบกับการผลิต PHB ในถังหมัก 10 ลิตร ดังตารางที่ 28 พบว่าในกรณีที่ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเท่ากัน ค่า $Y_{X/S}$ $Y_{P/S}$ และ อัตราการผลิต PHB มีค่าลดลงจากเดิม ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากเทคนิคการให้อากาศและการกวน และการทำให้อาหารปลอดเชื้อโดยในการฆ่าเชื้อในถังหมัก 300 ลิตร ใช้วิธีการอัดไอน้ำ (steam injection) เข้าไปในถังหมัก เป็นเวลา 30 นาที ขณะที่ถังหมักขนาด 10 ลิตร ฆ่าเชื้อในหม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำโดยใช้เวลาเพียง 15 นาที การฆ่าเชื้อโดยวิธีการอัดไอน้ำทำให้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการเดือด และการฆ่าเชื้อเป็นเวลานานถึง 30 นาที อาจทำให้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อบางอย่างเสื่อมคุณภาพได้จึงส่งผลให้การ ผลิต PHB ลดลง เมื่อพิจารณาเกณฑ์การขยาย ส่วนทั้ง 3 เกณฑ์พบว่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ให้ผลการผลิต PHB ดีที่สุด เนื่องจากที่ภาวะนี้ค่า $Y_{P/S}$ $Y_{X/S}$ และอัตราการผลิต PHB มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการ ผลิต PHB ในถังหมัก 10 ลิตร ในกรณีที่ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากัน

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเกณฑ์คงที่ในการผลิต PHB ในถังหมัก 300 ลิตร โดย *B. megaterium* BA-019 อย่างไรก็ตามถ้าต้องการขยายส่วนการผลิต PHB ขึ้นไปจากถังหมัก 300 ลิตร ไปสู่ถังหมัก ขนาดใหญ่ขึ้น เช่น ถังหมัก 1000 ลิตร หรือ 5000 ลิตร การใช้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อ ปริมาตรน้ำหมัก (P/V) เป็นเกณฑ์คงที่ในการขยายส่วนมีข้อจำกัดหลายประการ คือ ต้องใช้กำลัง งานมอเตอร์ และกำลังป้อนเข้าต่อปริมาตรน้ำหมักค่อนข้างสูง ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่าการขยาย ขนาดของถังหมัก 80 ลิตร ไปสู่ถังหมักขนาด 10,000 ลิตร โดยใช้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) เป็นเกณฑ์คงที่ พบว่ากำลังงานมอเตอร์ และกำลังมอเตอร์ป้อนเข้าต่อ ปริมาตรน้ำหมัก มีค่าสูงขึ้น 3,125 เท่า และ 25 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ข้อจำกัดดังกล่าวแล้วยังมี สิ่งที่ต้องพิจารณา คือ ข้อจำกัดของการปั่นกวนของถังหมัก และขนาดของมอเตอร์ที่ใช้ (Junker, 2004)

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- รัตนศิริ มุทิตากุล. 2538. การผลิตพอลิบีต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ที่แยกได้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- สุดา สุภาวสินสวัสดิ์. 2542. ผลของซับสเตรตต่อสัดส่วนของของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตในพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ซึ่งผลิตจาก Bacillus sp. BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- อดิพล บุญเรืองถาวร. 2543. การผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดยการเพาะเลี้ยง Bacillus sp BA-019 แบบป้อนเป็นงวดภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

- Aiba, S., Humphrey, A. E., and Millis, N. F. 1973. Biochemical Engineering. Japan: Academic Press. Inc.
- Asenjo, A.J., and Dawes, E.A. 1990. Occurance, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol. Rev. 54:450-472.
- Asenjo, J.A., and Merchuk, J.C. (ed). 1995. Bioreactor system design. Marcel Dekkar. Inc.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1984. Official Method of Analysis. 14th ed. Virginia.
- Belo, I., Pinheiro, R., and Mota, M. 2005. Morphological and physiological changes in *Saccharomyces cerevisiae* by oxidative stress from hyperbaric air. J. Biotechnol. 115:397-404.
- Bartholomew, W.H. 1960. Scale-up of submerged fermentations. J. Appl. Microbiol. 2:289.
- Bernfeld, F. 1955. Amylase, α and β . In Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.(eds.) Method in Enzymology. Academic Press. New York. Vol.3 pp.149-150.
- Bloembergen, S., Holden, D.A., Hamer, G.K., Bluhm, T.L. and Marchessault, R.H. 1986. Study of bacterial poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). Macromolecules. 19:2865-2871.

- Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W. and Fuller, R.C. 1990. Plastic from bacterial: Poly(β -hydroxyalkanoates) as natural biocompatible and biodegradable polymers. Adv. Biochem. Eng. 41:78-79.
- Braunegg, G., Lefebvre, G., and Genser, K.F. 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources : physiology and engineering aspects. J. Biotechnol. 65:127-161.
- Brown, D.E. 1982. Industrial-scale operation of microbial process. J. Chem. Technol. Biotechnol. 32:34-36.
- Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms : technology and economics. Tibtech. 5:246-250.
- Byrom, D. 1994. Polyhydroxyalkanoates, pp.5-13. In: D.P. Mobley (ed.), *Plastics from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors*. Hanser Munich.
- Charles, M., 1965. Fermenter Design and Scale-up, Comprehensive Biotechnology. New York: Pergamon Press Ltd.
- Chen, G.Q., Konig, K.H., and Lafferty, R.M. 1991. Occurance of poly-(D)-3-hydroxyalkanoates in the genus Bacillus. FEMS Microbiol. Lett. 84:173-176.
- Chen, G.Q. and Wu, Q. 2005. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Biomaterials. 26:6565-6578
- Choi, J., and Lee, S.Y. 1997. Process analysis and economic evaluation for poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation. Bioprocess Engineering. 17:335-342.
- Choi, J., and Lee, S.Y. 1999. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate evaluation for production by fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51:13-21.
- Comeau, Y., Hall, K.J., and Oldham, W.K. 1998. Determination of poly- β -hydroxybutyrate and poly- β -hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography. Appl. Environ. Microbiol. 54:2325-2327.
- Dawes, E.A., and Senior, P.J. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. Adv. Microbiol. Physio. 10:203-206.
- Doi, Y. (ed). 1990. Microbial polyesters. VCH. New York.
- Einsele, A. 1978. Scaling-up bioreactors. Process Biochem. 7:13-14.
- Groom, C.A., Luong, J.H.T., and Mulchandani, A. 1998. On-line culture fluorescence measurement during the batch cultivation of poly- β -hydroxybutyrate producing *Alcaligenes eutrophus*. J. Biotechnol. 8:271-278
- Hejazi, P., Vasheghani-Farahani, E. and Yamini, Y. 2003. Supercritical fluid disruption of

- Ralstonia eutropha* for poly(beta-hydroxybutyrate) recovery. Biotchnol. Prog. 19: 1519–1523.
- Jackson, F.A., and Dawes, E.A. 1976. Regulation of tricarboxylic acid cycle and poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation. J.Gen Microbiol. 97:303-312.
- Juni, E., and Heym, G.A. 1956. A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2, 3-butanediol, acetylmethylcarbinol, and diacetyl. General aspects of the 2, 3-butanediol cycle. J. Bacteriol. 71:425-432.
- Junker, B.H. 2004. Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation process. J. Biosci. Bioeng. 97:347-364.
- Kapritchkoff, F.M., Viotti, A.P., Alli, R.C.P., Zuccolo, M., Pradella, J.G.C., Maiorano, A.E., Miranda, E.A. and Bonomi, A. 2006. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. J. Biotechnol. 122:453–462.
- Khanna, S., and Srivastava, A.K. 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Proc. Biochem. 40:609-619.
- Khosravi-Darani, K., Vasheghani-Farahani, E., Shojaosadati, S.A. and Yamini, Y. 2004. Effect of process variables on supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* cells for poly(R-hydroxybutyrate) recovery. Biotchnol. Prog. 20:1757–1765.
- Kim, B.S., Lee, S.Y., and Chang, H.N. 1992. Production of poly- β -hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol. Lett. 14:811-816.
- Kim, B.S., Lee, S.C., Lee, S.Y., Chang, H.N., Chang, Y.K., and Woo, S.I. 1994. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. Biotechnol. Bioeng. 43:892-898.
- Kim, S.W., Kim, P., Lee, H.S., and Kim, J.H. 1996. High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from *Methylobacterium organophilum* under potassium limitation. Biotechnol.Lett.18:25-30.
- Kominek, L.A., and Halvorson, H.O. 1965. Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. 90:1251-1259.
- Lakshman, K. and Shamala, T.R. 2006. Extraction of polyhydroxyalkanoate from *Sinorhizobium meliloti* cells using *Microbispora* sp. culture and its enzymes. Enzyme. Microb. Technol. 39:1471–1475.
- Lee, J.H., Hong, J., and Lim, H.C. 1997. Experimental optimization of fed-batch culture for poly-

- β -hydroxybutyric acid production. Biotechnol. Bioeng. 56:697-705.
- Lee, S.Y. 1996(a). Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnol Bioeng. 49:1-14.
- Lee, S.Y. 1996(b). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Tibtech. 16:419-426.
- Lee, S.Y., and Chang, H.N. 1995. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* strains: genetics and fermentation studies. Can. J. Microbiol. 41(suppl.1):207-215.
- Lee, S.Y., Lee, Y., and Wang, F. 1999. Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals. Biotechnol. Bioeng. 65:363-368.
- Lee, S.Y., Middelberg, A.P.J., and Lee, Y.K. 1997. Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol. Lett. 19:1033-1035.
- Liu, F., Li, W., Ridgway, D., and Gu, T. 1998. Production of poly- β -hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol. Lett. 20:345-348.
- Loo, C.Y., and Sudesh, K. 2007. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. Malays. Polym. J. 2:31-57.
- Luengo, J.M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharo, G., and Olivera, E.R. 2003. Bioplastics from microorganisms. Curr. Opin. Microbiol. 6:251-260.
- Madison, L.L., and Huisman, G.W. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates) : from DNA to plastic. Microbiol. Mole. Biol. Rev. 63:21-53.
- Mudliar, S.N., Vaidya, A.N., Suresh Kumar, M., Dahikar, S., and Chakrabarti, T. 2007. Techno-economic evaluation of PHB production from activated sludge. Clean Tech. Environ. Policy. 77:444-448.
- Nakata, H.M. 1963. Effect of pH on intermediates produced during growth and sporulation of *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. 86:577-580.
- Page, W.J., and Cornish, A. 1993. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate. Appl. Environ. Microbiol. 59:4236-4244.
- Quillaguamán, J., Doan-Van, T., Guzmán, H., Guzmán, D., Martín, J., Everest, A., and Hatti-Kaul, R. 2008. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch culture. Appl. Environ. Biotechnol. 78:227-232
- Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi, and Kalia, V.C. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresour. Technol. 87:137-146.

- Ryu, H.W., Hahn, S.K., Chang, Y.K., and Chang, H.N. 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. Biotechnol. Bioeng. 55:28-32.
- Ryu, H.W., Cho, K.-S., Lee, E.G. and Chang, Y.K. 2000. Recovery of Poly(3-hydroxybutyrate) from coagulated *Ralstonia eutropha* using a chemical digestion method. Biotechnol. Prog. 16:676-679.
- Scragg, H.H. 1991. Bioreactors in biotechnology. London: Ellis Horwood pp. 26-85.
- Shimizu, H., Tamura, S., Shioya, S., and Suga, K.I. 1993. Kinetic study of poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid (PHB) production and its molecular weight distribution control in a fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus*. J. Ferment. Bioeng. 76:465-469.
- Snape, J.B., Dunn, I.J., Ingham, J., and Prenosil, J.E. 1995. Dynamics of environmental bioprocesses. VCH. New York. pp. 52-56.
- Steinbuechel, A., and Fuchtenbusch, B. 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. Tibtech. 16:419-426.
- Stevenson, L.H., and Socolofsky, M.D. 1996. Cyst formation and poly- β -hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. J. Bacteriol. 91:304-310.
- Sun, Z., Ramsay, J.A., Guay, M., and Ramsay, B.A. 2007. Carbon-limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440. App. Microbiol. Biotechnol. 74:69-77.
- Suzuki, T., Yamane, T., and Shimizu, S. 1986(a). Mass production of poly- β -hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch of methylotroph. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23:322-329.
- Suzuki, T., Yamane, T., and Shimizu, S. 1986(b). Mass production of poly- β -hydroxybutyric acid by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24:370-374.
- Tanaka, K., Katamune, K., and Ishizaki, A. 1995. Fermentative production of poly(β -hydroxybutyric acid) from xylose via L-lactate by a two-stage culture method employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*. Can. J. Microbiol. 41(supp.1): 257-261.
- Terada, M., and Marchessaut, R.H. 1999. Determination of solubility parameters for poly(3-hydroxyalkanoates). Int. J. Biol. Macromol. 25:207-215.
- Tokiwa, Y., and Ugwu, C.U. 2007. Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric

- acid monomer. J. Biotechnol. 132:264-72.
- Tsuge, T., Tanaka, K., Shimoda, M., and Ishizaki, A. 1999. Optimization of L-lactic feeding for the production of poly-D-3-hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in fed-batch culture. J. Biosci. Bioeng. 88:404-409.
- Van Brunt, J. 1985. Scale-up: the next hurdle. Bio/Technology. 3:419-423
- Van Hee, P., Elumbaring, A.C.M.R., van der Lans, R.G.J.M. and Van der Wielen, L.A.M. 2006. Selective recovery of polyhydroxyalkanoate inclusion bodies from fermentation broth by dissolved-air flotation. J. Colloid Interface Sci. 297:595-606.
- Wakisaka, Y., Masaki, E., and Nishimoto, Y. 1982. Formation of crystalline δ -endotoxin or poly- β -hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 43:1473-1480.
- Wang, F., and Lee, S.Y. 1997(a). Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. Appl. Environ. Microbiol. 63:3703-3706.
- Wang, F., and Lee, S.Y. 1997(b). Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentous-suppressed recombinant *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 63:4765-4769.
- Wang, J.G., and Bakken, L.R. 1998. Screening of soil bacteria for poly-beta-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. Microb. Ecol. 35:94-101.
- Whitaker, A. 1980. Fed-batch culture. In Stanbury, P.F., and Whitaker, A.(eds.). Principles of Fermentation Technology. Oxford: Pergamon Press pp. 1-25.
- Williamson, D.H., and Wilkinson, J.K. 1958. The isolation and estimation of poly- β -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. J. Gen. Microbiol. 19: 198-209.
- Wiseman, A. 1983. Topic in Enzyme and Fermentation Biotechnology. Chichester, Ellis Horwood Limited, pp. 170-226.
- Wong, H.H., and Lee, S.Y. 1998. Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50:30-33.
- Yamane, T. 1992. Cultivation engineering of microbial bioplastics production. FEMS. Microbiol. Rev. 103:257-264.
- Yamane, T. 1993. Yield of poly-D-(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. Biotechnol. Bioeng. 41:165-170.

- Yamane, T., Fukunaga, M., and Lee, Y.W. 1996. Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB produced. Biotechnol. Bioeng. 50:197-202.
- Yeom, S.H., and Yoo, Y.J. 1995. Effect of pH on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyric acid produced by *Alcaligenes* sp. Biotechnol. Lett. 17:389-394.
- Yu, J. and Chen, L.X.L. 2006. Cost-effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mass. Biotechnol. Prog. 22:547–553.
- Zinn, M. and Hany, R. 2005. Tailored material properties of polyhydroxyalkanoates through biosynthesis and chemical modification. Adv. Eng. Mater. 7:408–411.

ภาคผนวก

การเตรียมสารที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)

1.1 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์

เตรียมจากการละลายโซเดียมอะซิเตต 9.10 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร
เติมกรดอะซิติก 1.9 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 4.5 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.2 สารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส

เตรียมจากการละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส 0.15 กรัม ในสารละลายอะซิเตต
บัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

2. การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก เตรียมจากการละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1.0 กรัม
ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น
ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมโปแตสเซียมโซเดียมคาร์บอเนต 30 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร
เก็บในขวดสีชา

3. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณยูเรีย

3.1 สารละลายพาราไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์

เตรียมจากการละลายพาราไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ปริมาณ 16.00 กรัม ในเมทานอล 1
ลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริก 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ได้นาน 1 เดือน

3.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เตรียมจากการละลายโพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส 3.403 กรัม ในน้ำ
กลั่นปลอดประจุ 100 มิลลิลิตร และละลายไดโพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส 4.355
กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายทั้งสองรวมกันแล้วปรับปริมาตร
ให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

ภาคผนวก ข

สูตรคำนวณ

1. การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์} - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า}}{10} \times 1000$$

10

2. การคำนวณปริมาณ PHB จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี

การคำนวณปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร ต่อ lyophilized cell 20 มิลลิกรัม)

$$\text{ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าจากการวิเคราะห์ (กรัมต่อลิตร)} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)}}{20}$$

20

3. การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} = \text{OD}_{540} \times \text{ความชัน}^{-1} \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

4. การหาปริมาณยูเรียในน้ำหมัก

$$\text{ปริมาณยูเรีย (กรัมต่อลิตร)} = \text{OD}_{420} \times \text{ความชัน}^{-1} \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

5. การคำนวณหา μ $Y_{X/S}$ $Y_{P/S}$ และ Productivity

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t}$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$$

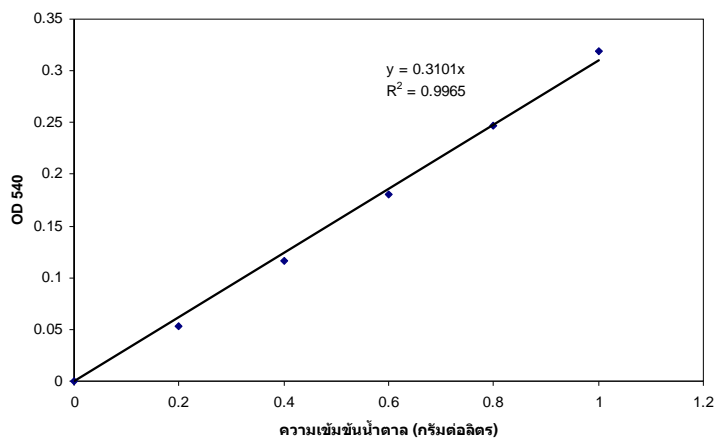
$$Y_{P/S} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S_t}$$

$$\text{Productivity} = \frac{P_t - P_0}{t}$$

ภาคผนวก ค

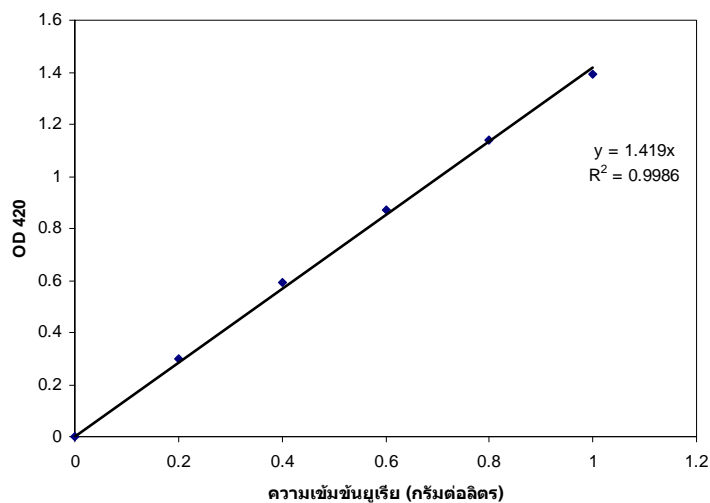
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์



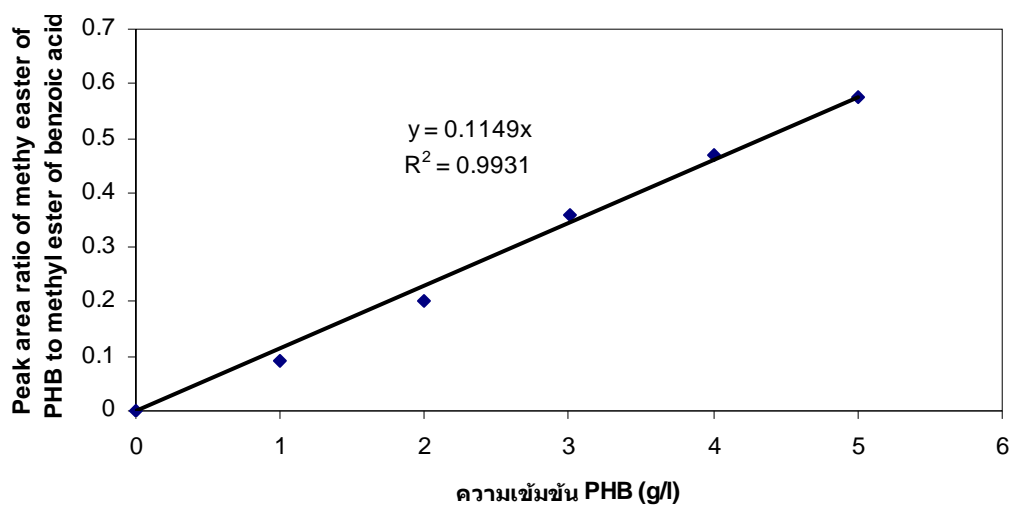
กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วง 0 - 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.2529

2. กราฟมาตรฐานยูเรีย



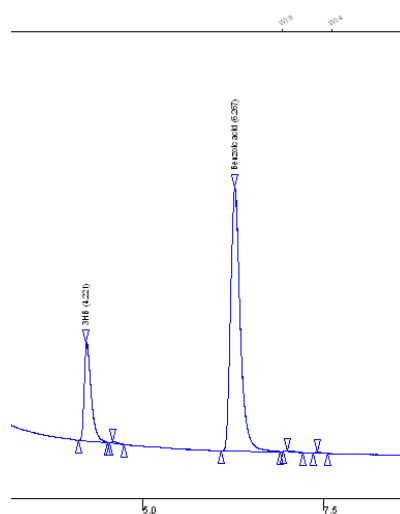
กราฟมาตรฐานของยูเรียในช่วง 0 - 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 1.419

3. กราฟมาตรฐาน PHB วิเคราะห์ด้วยวิธี GC

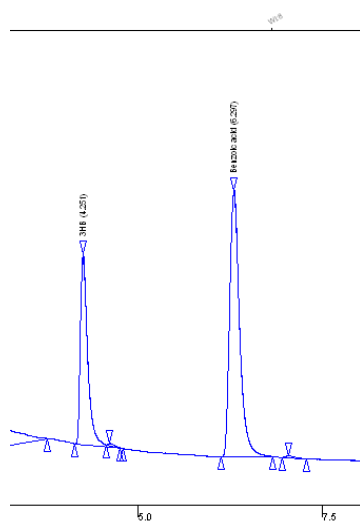


กราฟมาตรฐาน PHB ความเข้มข้น 0 - 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความชันเท่ากับ 0.0914

ตัวอย่างโครมาโทแกรม



ตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน PHB วิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน



ตัวอย่างโครมาโทแกรมของ PHB จาก *B. megaterium* BA-019 วิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน

ภาคผนวก ง

การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน ($K_L a$) โดยวิธี Dynamic gassing-out

อัตราการถ่ายเทออกซิเจน สามารถอธิบายได้โดยใช้สมการดังนี้

$$dC_L/dt = K_L a (C_L^* - C_L) - OUR \quad (26)$$

เมื่อ	OTR	=	อัตราการถ่ายเทออกซิเจน
	OUR	=	อัตราการใช้ออกซิเจนของเซลล์
	$K_L a$	=	สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร (h ⁻¹)
	C_L^*	=	ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายที่สมดุล (mmol/l)
	C_L	=	ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (mmol/l)

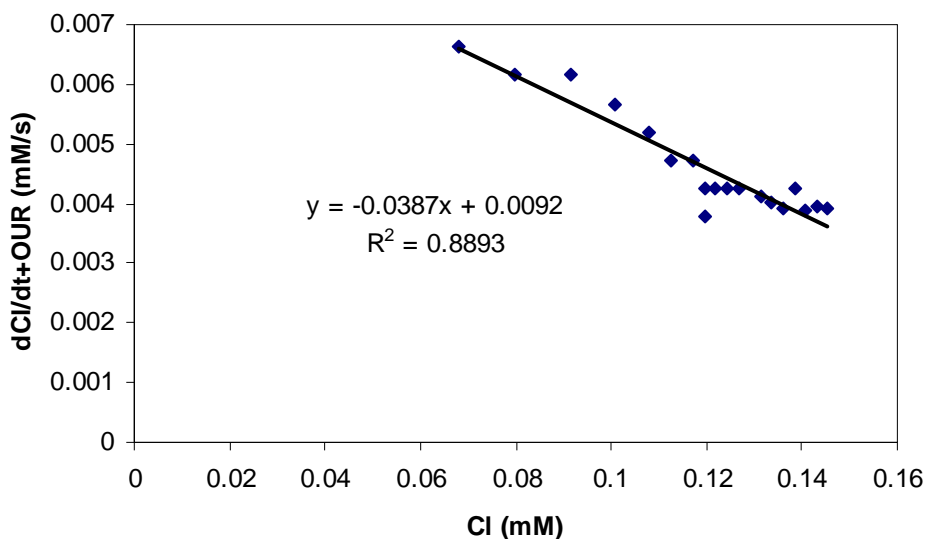
จากสมการที่ 26 สามารถจัดรูปแบบได้ดังนี้

$$dC_L/dt + OUR = K_L a C_L^* - K_L a C_L \quad (27)$$

จากสมการที่ 27 ถ้าเขียนกราฟระหว่าง $dC_L/dt + OUR$ และ C_L โดยให้ $dC_L/dt + OUR$ เป็นแกนตั้ง และ C_L เป็นแกนนอน ดังรูป

$$\text{จะได้ความชัน} = -K_L a$$

$$\text{จุดตัดแกน Y} = K_L a C_L^*$$



จากรูปได้ค่า $K_L a = 0.0387 \text{ s}^{-1}$

ตารางที่ 30 การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที เมื่ออัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร

time (s)	DO (%)	C_L (mM)	dC_L/dt (mM/s)	$dC_L/dt+OUR$ (mM/s)
0 (เปิดอากาศ)	66	0.160776		
5	64	0.155904	0.0009744	
10	60	0.14616	0.0019488	
15	53	0.129108	0.0034104	
20	45	0.10962	0.0038976	
25	38	0.092568	0.0034104	
30	29	0.070644	0.0043848	
35	22	0.053592	0.0034104	
40	16	0.038976	0.0029232	
45	12	0.029232	0.0019488	
60	6	0.014616	0.0009744	0.0041744
70 (เปิดอากาศ)	4	0.009744	0.0004872	0.0036872
80	6	0.014616	0.0009744	0.0041744
85	9	0.021924	0.0014616	0.0046616
90	14	0.034104	0.002436	0.005636
95	20	0.04872	0.0029232	0.0061232
100	26	0.063336	0.0029232	0.0061232
105	32	0.077952	0.0029232	0.0061232
110	38	0.092568	0.0029232	0.0061232
115	42	0.102312	0.0019488	0.0051488
120	45	0.10962	0.0014616	0.0046616
125	47	0.114492	0.0009744	0.0041744
130	49	0.119364	0.0009744	0.0041744
135	50	0.1218	0.0004872	0.0036872
140	52	0.126672	0.0009744	0.0041744
145	53	0.129108	0.0004872	0.0036872
155	54	0.131544	0.0002436	0.0034436
160	55	0.13398	0.0004872	0.0036872
165	56	0.136416	0.0004872	0.0036872
175	57	0.138852	0.0002436	0.0034436
180	58	0.141288	0.0004872	0.0036872
190	59	0.143724	0.0002436	0.0034436
205	60	0.14616	0.0001624	0.0033624
225	61	0.148596	0.0001218	0.0033218
270	63	0.153468	8.12E-05	0.0032812
285	64	0.155904	0.0001624	0.0033624

ตารางที่ 31 การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที เมื่ออัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร

time (s)	DO (%)	C_L (mM)	dC_L/dt (mM/s)	$dC_L/dt+OUR$ (mM/s)
0 (เปิดอากาศ)	68	0.159528		
5	67	0.157182	0.0004692	
10	65	0.15249	0.0009384	
15	58	0.136068	0.0032844	
20	54	0.126684	0.0018768	
25	47	0.110262	0.0032844	
30	37	0.086802	0.004692	
35	29	0.068034	0.0037536	
40	20	0.04692	0.0042228	
45	15	0.03519	0.002346	0.005546
50	10	0.02346	0.002346	0.005546
75 (เปิดอากาศ)	1	0.002346	0.00084456	0.00404456
90	6	0.014076	0.0009384	0.0041384
95	9	0.021114	0.0014076	0.0046076
100	14	0.032844	0.002346	0.005546
105	20	0.04692	0.0028152	0.0060152
110	26	0.060996	0.0028152	0.0060152
115	32	0.075072	0.0028152	0.0060152
120	38	0.089148	0.0028152	0.0060152
125	42	0.098532	0.0018768	0.0050768
130	45	0.10557	0.0014076	0.0046076
135	48	0.112608	0.0014076	0.0046076
140	50	0.1173	0.0009384	0.0041384
145	52	0.121992	0.0009384	0.0041384
150	53	0.124338	0.0004692	0.0036692
155	54	0.126684	0.0004692	0.0036692
160	55	0.12903	0.0004692	0.0036692
165	56	0.131376	0.0004692	0.0036692
180	57	0.133722	0.0001564	0.0033564
190	58	0.136068	0.0002346	0.0034346
195	59	0.138414	0.0004692	0.0036692
215	60	0.14076	0.0001173	0.0033173
230	61	0.143106	0.0001564	0.0033564
240	62	0.145452	0.0002346	0.0034346
270	63	0.147798	7.82E-05	0.0032782

ตารางที่ 32 การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที เมื่ออัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร

time (s)	DO (%)	C_L (mM)	dC_L/dt (mM/s)	$dC_L/dt+OUR$ (mM/s)
0 (ปิดอากาศ)	68	0.159528		
5	67	0.157182	0.0004692	
10	65	0.15249	0.0009384	
15	58	0.136068	0.0032844	
20	54	0.126684	0.0018768	
25	47	0.110262	0.0032844	
30	37	0.086802	0.004692	
35	29	0.068034	0.0037536	
40	20	0.04692	0.0042228	
45	15	0.03519	0.002346	0.005546
50	10	0.02346	0.002346	0.005546
75 (เปิดอากาศ)	1	0.002346	0.00084456	0.00404456
85	4	0.009384	0.0009384	0.0041384
90	6	0.014076	0.0009384	0.0041384
95	9	0.021114	0.0014076	0.0046076
100	14	0.032844	0.002346	0.005546
105	20	0.04692	0.0028152	0.0060152
110	26	0.060996	0.0028152	0.0060152
115	32	0.075072	0.0028152	0.0060152
120	38	0.089148	0.0028152	0.0060152
125	42	0.098532	0.0018768	0.0050768
130	45	0.10557	0.0014076	0.0046076
135	48	0.112608	0.0014076	0.0046076
140	50	0.1173	0.0009384	0.0041384
145	52	0.121992	0.0009384	0.0041384
150	53	0.124338	0.0004692	0.0036692
155	54	0.126684	0.0004692	0.0036692
160	55	0.12903	0.0004692	0.0036692
165	56	0.131376	0.0004692	0.0036692
180	57	0.133722	0.0001564	0.0033564
190	58	0.136068	0.0002346	0.0034346
195	59	0.138414	0.0004692	0.0036692
215	60	0.14076	0.0001173	0.0033173
230	61	0.143106	0.0001564	0.0033564
240	62	0.145452	0.0002346	0.0034346
270	63	0.147798	7.82E-05	0.0032782

ตารางที่ 33 การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที เมื่ออัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร

time (s)	DO (%)	C_L (mM)	dC_L/dt (mM/s)	$dC_L/dt+OUR$ (mM/s)
0 (ปิดอากาศ)	80	0.19488		
5	79	0.192444	0.000487	
10	77	0.187572	0.000974	
15	77	0.187572	0	
20	75	0.1827	0.000974	
25	73	0.177828	0.000974	
30	70	0.17052	0.001462	
35	67	0.163212	0.001462	
40	62	0.151032	0.002436	
45	57	0.138852	0.002436	
50	52	0.126672	0.002436	
55	46	0.112056	0.002923	
60	40	0.09744	0.002923	
65	34	0.082824	0.002923	
70	28	0.068208	0.002923	
75	23	0.056028	0.002436	
80	20	0.04872	0.001462	
120(เปิดอากาศ)	12	0.029232	0.000487	0.002987
125	21	0.051156	0.004385	0.006885
130	31	0.075516	0.004872	0.007372
135	39	0.095004	0.003898	0.006398
140	46	0.112056	0.00341	0.00591
145	51	0.124236	0.002436	0.004936
150	55	0.13398	0.001949	0.004449
155	59	0.143724	0.001949	0.004449
160	62	0.151032	0.001462	0.003962
165	63	0.153468	0.000487	0.002987
170	65	0.15834	0.000974	0.003474
175	66	0.160776	0.000487	0.002987
180	67	0.163212	0.000487	0.002987
185	68	0.165648	0.000487	0.002987
195	69	0.168084	0.000244	0.002744
200	70	0.17052	0.000487	0.002987
210	71	0.172956	0.000244	0.002744
225	72	0.175392	0.000162	0.002662

ตารางที่ 34 การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที เมื่ออัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร

time (s)	DO (%)	C_L (mM)	dC_L/dt (mM/s)	$dC_L/dt+OUR$ (mM/s)
0 (ปิดอากาศ)	79	0.192444		
5	78	0.190008	0.000487	
10	77	0.187572	0.000487	
15	75	0.1827	0.000974	
20	71	0.172956	0.001949	
25	67	0.163212	0.001949	
30	63	0.153468	0.001949	
35	57	0.138852	0.002923	
40	51	0.124236	0.002923	
45	45	0.10962	0.002923	
50	37	0.090132	0.003898	
55	28	0.068208	0.004385	
60	19	0.046284	0.004385	
65	12	0.029232	0.00341	
85 (เปิดอากาศ)	2	0.004872	0.001218	
90	2	0.004872	0	0.0033
95	4	0.009744	0.000974	0.004274
100	9	0.021924	0.002436	0.005736
105	18	0.043848	0.004385	0.007685
110	30	0.07308	0.005846	0.009146
115	41	0.099876	0.005359	0.008659
120	50	0.1218	0.004385	0.007685
125	58	0.141288	0.003898	0.007198
130	62	0.151032	0.001949	0.005249
135	64	0.155904	0.000974	0.004274
140	66	0.160776	0.000974	0.004274
145	68	0.165648	0.000974	0.004274
150	69	0.168084	0.000487	0.003787
155	70	0.17052	0.000487	0.003787
160	71	0.172956	0.000487	0.003787
165	72	0.175392	0.000487	0.003787
180	73	0.177828	0.000162	0.003462
215	74	0.180264	6.96E-05	0.00337
290	75	0.1827	3.25E-05	0.003332
305	76	0.185136	0.000162	0.003462

ตารางที่ 35 การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที เมื่ออัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร

time (s)	DO (%)	C_L (mM)	dC_L/dt (mM/s)	$dC_L/dt+OUR$ (mM/s)
0 (เปิดอากาศ)	81	0.197316		
5	80	0.19488	0.000487	
10	78	0.190008	0.000974	
15	75	0.1827	0.001462	
20	73	0.177828	0.000974	
25	70	0.17052	0.001462	
30	66	0.160776	0.001949	
35	61	0.148596	0.002436	
40	56	0.136416	0.002436	
45	51	0.124236	0.002436	
50	45	0.10962	0.002923	
55	37	0.090132	0.003898	
60	28	0.068208	0.004385	
65	18	0.043848	0.004872	
70	13	0.031668	0.002436	
90 (เปิดอากาศ)	2	0.004872	0.00134	
105	5	0.01218	0.000974	0.003974
110	8	0.019488	0.001462	0.004462
115	17	0.041412	0.004385	0.007385
120	28	0.068208	0.005359	0.008359
125	40	0.09744	0.005846	0.008846
130	49	0.119364	0.004385	0.007385
135	57	0.138852	0.003898	0.006898
140	61	0.148596	0.001949	0.004949
145	64	0.155904	0.001462	0.004462
150	66	0.160776	0.000974	0.003974
155	68	0.165648	0.000974	0.003974
160	69	0.168084	0.000487	0.003487
165	70	0.17052	0.000487	0.003487
170	71	0.172956	0.000487	0.003487
180	72	0.175392	0.000244	0.003244
185	73	0.177828	0.000487	0.003487
190	74	0.180264	0.000487	0.003487
195	75	0.1827	0.000487	0.003487
215	77	0.187572	0.000244	0.003244

ตารางที่ 36 การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที เมื่ออัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร

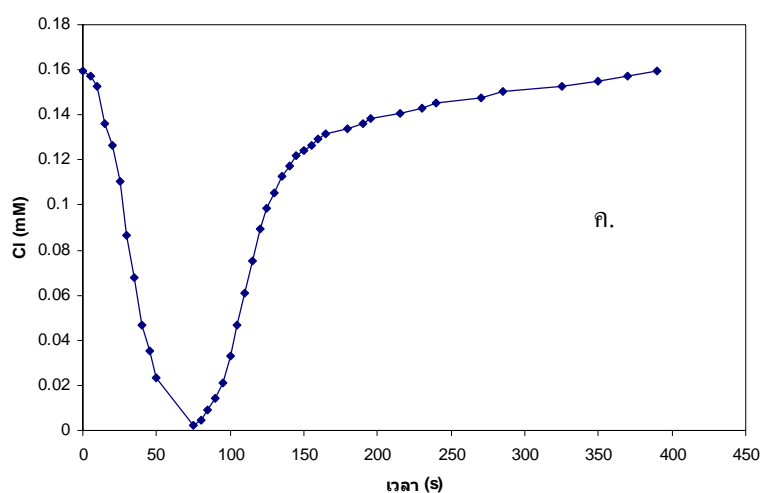
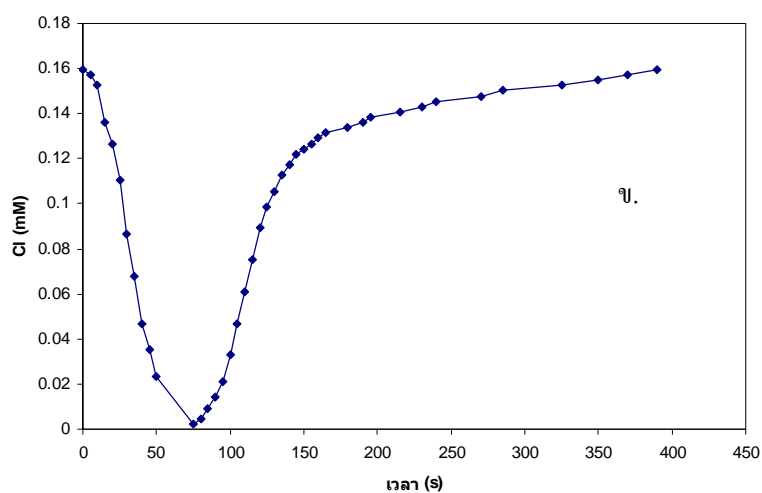
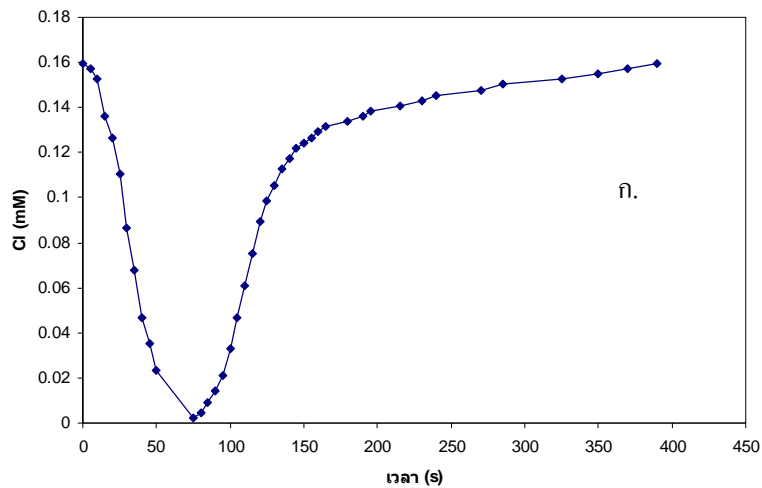
time (s)	DO (%)	C_L (mM)	dC_L/dt (mM/s)	$dC_L/dt+OUR$ (mM/s)
0 (เปิดอากาศ)	82	0.199752		
5	81	0.197316	0.0004872	
15	80	0.19488	0.0004872	
20	79	0.192444	0.0004872	
30	78	0.190008	0.0004872	
40	76	0.185136	0.0004872	
45	75	0.1827	0.0004872	
50	74	0.180264	0.0004872	
55	72	0.175392	0.0009744	
60	69	0.168084	0.0014616	
65	66	0.160776	0.0014616	
70	63	0.153468	0.0014616	
75	59	0.143724	0.0019488	
80	54	0.131544	0.002436	
85	50	0.1218	0.0019488	
90	43	0.104748	0.0034104	
95	37	0.090132	0.0029232	
100	29	0.070644	0.0038976	
105	23	0.056028	0.0029232	
110	16	0.038976	0.0034104	
135 (เปิดอากาศ)	4	0.009744	0.0008526	0.0033526
140	7	0.017052	0.0014616	0.0039616
145	16	0.038976	0.0043848	0.0068848
150	28	0.068208	0.0058464	0.0083464
155	39	0.095004	0.0053592	0.0078592
160	49	0.119364	0.004872	0.007372
165	55	0.13398	0.0029232	0.0054232
170	59	0.143724	0.0019488	0.0044488
175	62	0.151032	0.0014616	0.0039616
180	65	0.15834	0.0014616	0.0039616
185	67	0.163212	0.0009744	0.0034744
190	68	0.165648	0.0004872	0.0029872
195	69	0.168084	0.0004872	0.0029872
200	70	0.17052	0.0004872	0.0029872
205	71	0.172956	0.0004872	0.0029872
215	72	0.175392	0.0002436	0.0027436

ตารางที่ 37 การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที เมื่ออัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร

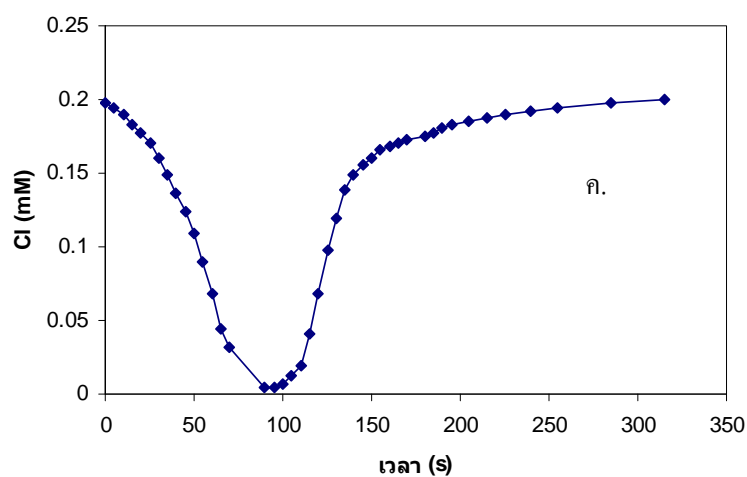
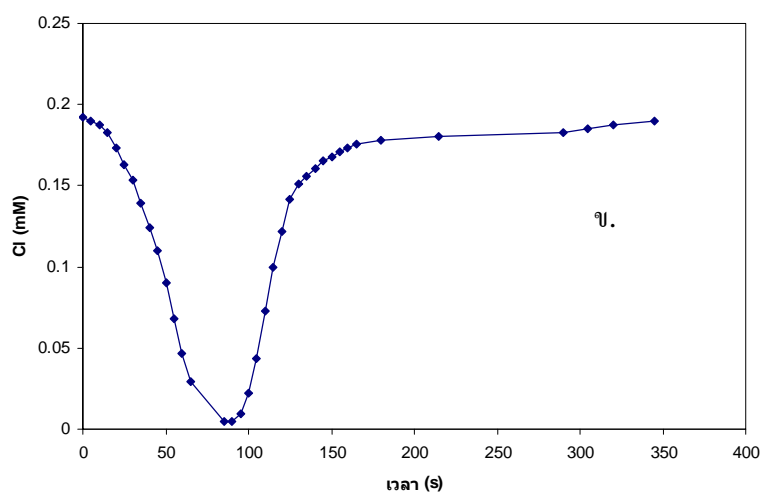
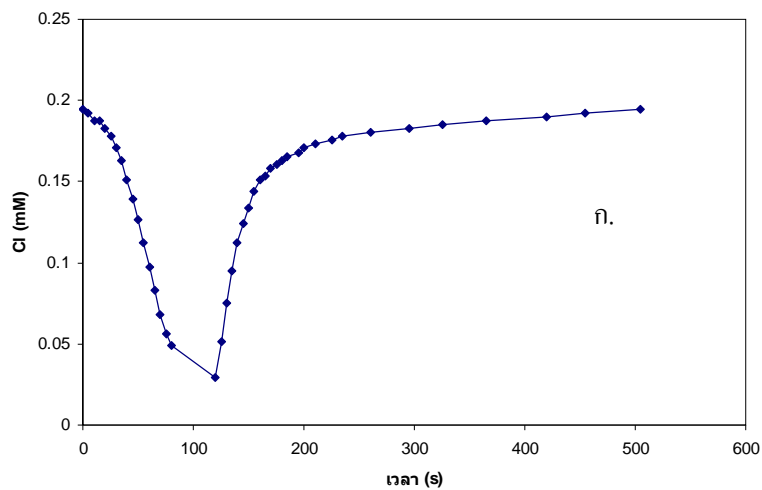
time (s)	DO (%)	C_L (mM)	dC_L/dt (mM/s)	$dC_L/dt + OUR$ (mM/s)
0 (เปิดอากาศ)	80	0.19488		
5	79	0.192444	0.0004872	
15	78	0.190008	0.0004872	
20	76	0.185136	0.0009744	
30	73	0.177828	0.0009744	
35	72	0.175392	0.0004872	
40	70	0.17052	0.0009744	
45	68	0.165648	0.0009744	
50	67	0.163212	0.0004872	
55	64	0.155904	0.0014616	
60	61	0.148596	0.0014616	
65	57	0.138852	0.0019488	
70	53	0.129108	0.0019488	
75	48	0.116928	0.002436	
80	43	0.104748	0.002436	
85	35	0.08526	0.0038976	
90	28	0.068208	0.0034104	
95	22	0.053592	0.0029232	
115 (เปิดอากาศ)	4	0.009744	0.0021924	0.0046924
120	5	0.01218	0.0004872	0.0029872
125	11	0.026796	0.0029232	0.0054232
130	19	0.046284	0.0038976	0.0063976
135	29	0.070644	0.004872	0.007372
140	40	0.09744	0.0053592	0.0078592
145	48	0.116928	0.0038976	0.0063976
150	54	0.131544	0.0029232	0.0054232
155	60	0.14616	0.0029232	0.0054232
160	63	0.153468	0.0014616	0.0039616
165	65	0.15834	0.0009744	0.0034744
170	67	0.163212	0.0009744	0.0034744
175	68	0.165648	0.0004872	0.0029872
180	70	0.17052	0.0009744	0.0034744
185	71	0.172956	0.0004872	0.0029872
190	72	0.175392	0.0004872	0.0029872

ตารางที่ 38 การละลายของออกซิเจน (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที เมื่ออัตราอากาศมีค่าเท่ากับ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร

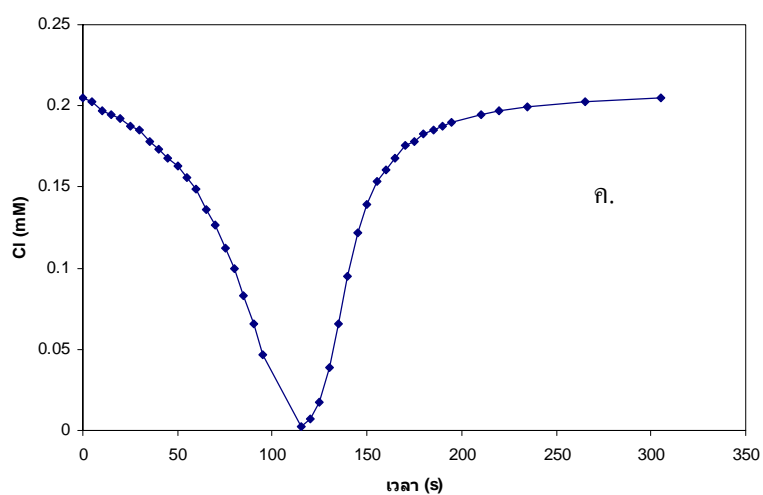
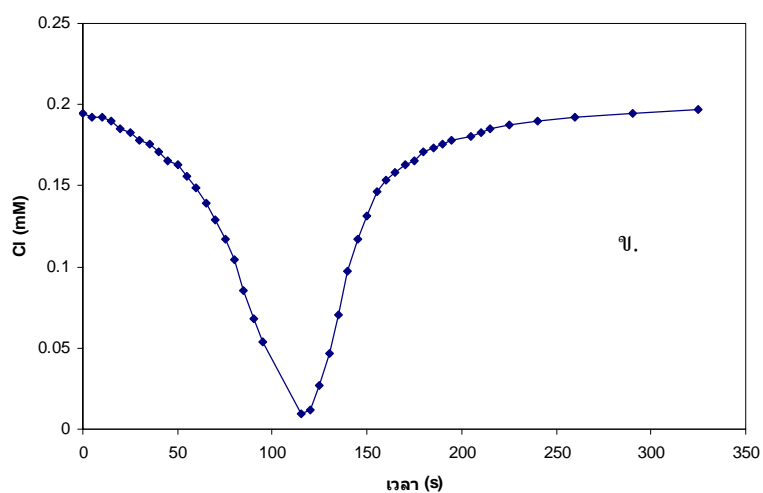
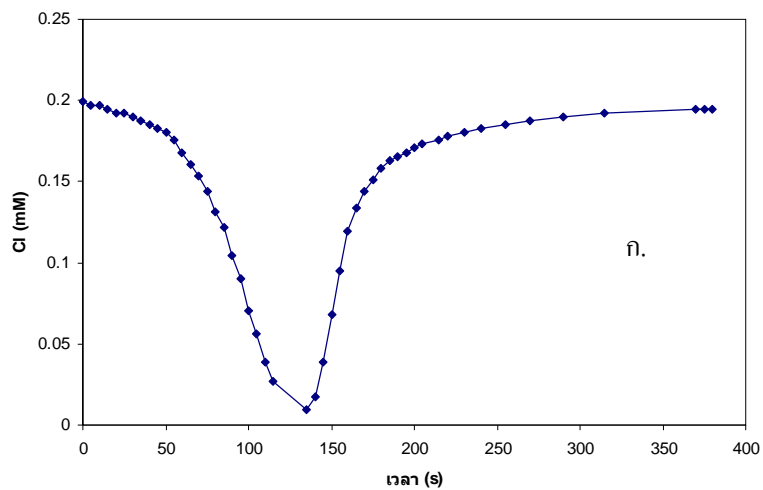
time (s)	DO (%)	C_L (mM)	dC_L/dt (mM/s)	$dC_L/dt + OUR$ (mM/s)
0 (ปิดอากาศ)	84	0.204624		
5	83	0.202188	0.0004872	
10	81	0.197316	0.0009744	
20	79	0.192444	0.0004872	
25	77	0.187572	0.0009744	
30	76	0.185136	0.0004872	
35	73	0.177828	0.0014616	
45	69	0.168084	0.0009744	
50	67	0.163212	0.0009744	
55	64	0.155904	0.0014616	
60	61	0.148596	0.0014616	
65	56	0.136416	0.002436	
70	52	0.126672	0.0019488	
75	46	0.112056	0.0029232	
80	41	0.099876	0.002436	
85	34	0.082824	0.0034104	
90	27	0.065772	0.0034104	
95	19	0.046284	0.0038976	
115 (เปิดอากาศ)	1	0.002436	0.0021924	0.0048924
120	3	0.007308	0.0009744	0.0036744
125	7	0.017052	0.0019488	0.0046488
130	16	0.038976	0.0043848	0.0070848
135	27	0.065772	0.0053592	0.0080592
140	39	0.095004	0.0058464	0.0085464
145	50	0.1218	0.0053592	0.0080592
150	57	0.138852	0.0034104	0.0061104
155	63	0.153468	0.0029232	0.0056232
160	66	0.160776	0.0014616	0.0041616
165	69	0.168084	0.0014616	0.0041616
170	72	0.175392	0.0014616	0.0041616
175	73	0.177828	0.0004872	0.0031872
180	75	0.1827	0.0009744	0.0036744
185	76	0.185136	0.0004872	0.0031872
190	77	0.187572	0.0004872	0.0031872
195	78	0.190008	0.0004872	0.0031872
210	80	0.19488	0.0003248	0.0030248



รูปที่ 19 การบันทึกปริมาณออกซิเจนละลายเมื่อปิดและเปิดการให้อากาศเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในชั่วโมงที่ 12 โดยใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และ อัตราอากาศมีค่าเท่ากับ (ก) 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ข) 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ค) 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร



รูปที่ 20 การบันทึกปริมาณออกซิเจนละลายเมื่อปิดและเปิดการให้อากาศเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในชั่วโมงที่ 12 โดยใช้อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และ อัตราอากาศมีค่าเท่ากับ (ก) 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ข) 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ค) 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร



รูปที่ 21 การบันทึกปริมาณออกซิเจนละลายเมื่อปิดและเปิดการให้อากาศเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในชั่วโมงที่ 12 โดยใช้อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที และ อัตราอากาศมีค่าเท่ากับ (ก) 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ข) 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (ค) 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมัก 10 ลิตร

ภาคผนวก จ

การคำนวณค่าความเร็วรอบของการกวนเมื่อใช้เกณฑ์ทางกายภาพ ในการกำหนดการขยายส่วนของถังหมัก

1. สัดส่วนของถังหมักมาตรฐาน

1.1 ถังหมักขนาด 10 ลิตร

- เส้นผ่าศูนย์กลางถังหมัก (D_T)	0.094 เมตร
- เส้นผ่าศูนย์กลางใบพัด (D_i)	0.190 เมตร

1.1 ถังหมักขนาด 300 ลิตร

- เส้นผ่าศูนย์กลางถังหมัก (D_T)	0.650 เมตร
- เส้นผ่าศูนย์กลางใบพัด (D_i)	0.296 เมตร

2. การคำนวณความเร็วรอบในการกวน

2.1 อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ของถังหมัก 10 ลิตร และ 300 ลิตร มีค่าเท่ากัน

จากสมการที่ 14

$$n_2 = n_1 (D_{i1}/D_{i2})^{2/3}$$

เมื่อ n_2 = ความเร็วรอบของการกวนในถังหมัก 300 ลิตร

n_1 = ความเร็วรอบของการกวนในถังหมัก 10 ลิตร

D_{i2} = เส้นผ่าศูนย์กลางใบพัดของถังหมัก 300 ลิตร

D_{i1} = เส้นผ่าศูนย์กลางใบพัดของถังหมัก 10 ลิตร

$$n_2 = 600 \times (0.190/0.296)^{2/3} = 279.28 \text{ รอบต่อนาที}$$

ดังนั้นความเร็วรอบของการกวนของถังหมัก 300 ลิตร จะใช้ประมาณ 280 รอบต่อนาที

2.2 ความเร็วรอบของปลายใบพัด ($\pi n D_i$) ของถังหมัก 10 ลิตร และ 300 ลิตร มีค่าเท่ากัน

จากสมการที่ 21

$$\text{Tip speed} \propto n D_i$$

ความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นเมื่อความเร็วรอบของปลายใบพัด ($\pi n D_i$) ของถังหมักมีค่าเท่ากันคือ

$$n_2 D_{i2} = n_1 D_{i1}$$

$$n_2 = 600 \times (0.190/0.296) = 190.54 \text{ รอบต่อนาที}$$

ดังนั้นความเร็วรอบของการกวนของถังหมัก 300 ลิตร จะใช้ประมาณ 190 รอบต่อนาที

2.3 ค่าเรย์โนลด์นัมเบอร์ (N_{RE}) ของถังหมัก 10 ลิตร และ 300 ลิตร มีค่าเท่ากัน จากสมการที่ 24

$$\text{Reynolds number} \propto nD_i^2$$

$$n_1 D_{i1}^2 = n_2 D_{i2}^2$$

$$n_2 = 600 \times (0.190/0.296)^2 = 60.51 \text{ รอบต่อนาที}$$

ดังนั้นความเร็วรอบของการกวนของถังหมัก 300 ลิตร จะใช้ประมาณ 60 รอบต่อนาที

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายบุญฤทธิ์ เมฆศิริพร เกิดวันที่ 19 ตุลาคม 2525 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2547 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรจุลชีววิทยา ทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551