# บทที่ 4

# อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

## 4.1 อุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์

### 4.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

ใช้เครื่องรุ่น Kubota 5100 ของบริษัท KUBOTA Corporation, Japan

ชุดเครื่องวิเคราะห์ HPLC

ประกอบด้วยอุปกรณ์ต่างๆ ดังนี้

1. เครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (Autosampler) รุ่น 717 Autosampler
2. เครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสง (Detector) รุ่น 996 Photodiode Array Detector
3. คอลัมน์ (Column) ใช้คอลัมน์แบบ μ Bondapax C18
4. เครื่องอุลตราโซนิค (Ulatrasonic bath) รุ่น Bransonic 2200 ของบริษัท Branson Ultrasonics Corporation, USA
5. เครื่องคอมพิวเตอร์ NEC รุ่น 486DX2-66MHZ
6. โปรแกรมจัดการข้อมูลสำหรับเครื่องวิเคราะห์ Millennium 2010 Chromatography Manager

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

ใช้เครื่องรุ่น Spectronic 20D ของบริษัท Milton Roy, USA

เครื่องวัดและควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter, pH Controller)

1. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่างรุ่น Digital pH/Temperature meter Model 671 ของบริษัท JENCO Electronics, Ltd., Taiwan
2. เครื่องวัดและควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างรุ่น Digital pH Controller ของบริษัท Mituwa, Japan

ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow

ใช้เครื่องรุ่น VS-124 ของบริษัท ISSCO, USA

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)

ใช้เครื่องรุ่น HL24ADY ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corparation, Tokyo, Japan

ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)

ใช้เครื่องรุ่น GFS ของบริษัท Gesells chaft fur Labortechnik, Germany

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

ใช้เครื่องรุ่น Julabo ของบริษัท Labertechnik GMBH, Germany

ถังหมัก (Fermenter)

1. รุ่น MINI-JAR-FERMENTATOR KMJ ของบริษัท Mituwa, Japan
2. รุ่น Biostat® ED, ระบบวัดและควบคุม DCU-System รุ่น 2.30 ของบริษัท B.BRAUN BIOTECH INTERNATION, Germany

ปั๊มรีด (Peristaltic pump)

1. รุ่น SJ-1211 ของบริษัท Chromatograph ATTO, Japan
2. รุ่น MICROTUBE PUMP MP-3 ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan
3. รุ่น Watson-Marlow 505U ของบริษัท Watson-Marlow Limited, England

ปั๊มลม (Air compressor)

ใช้เครื่องรุ่น BEBICON ของบริษัท Hitachi Ltd., Japan

เครื่องวัดค่าความขุ่น (Turbidity measuring system)

ใช้เครื่องรุ่น FSC 402 ของบริษัท METTLER TOLEDO

แผงวงจรแปลงสัญญาณอะนาล็อก/ดิจิตอลและดิจิตอล/อะนาล็อก

ใช้แผงวงจรแปลงสัญญาณรุ่น PCL-711S ของบริษัท AdvanceTech, USA

เครื่องวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Shimadzu portable gas tester)

ใช้เครื่องรุ่น CGT-10-1A ของบริษัท SHIMADZU, Japan

เครื่องไมโครคอมพิวเตอร์

ใช้หน่วยประมวลผลกลาง Intel DX2-66MHZ หน่วยความจำ 8 เมกกะบิต ระบบปฏิบัติการดอส รุ่น 6.22 และวินโดวส์ รุ่น 3.11

โปรแกรมใช้งาน

1. โปรแกรม Cellmax.exe และ Model1.exe ซึ่งเขียนขึ้นในงานวิจัยชิ้นนี้
2. โปรแกรม Excel 5.0a รุ่นภาษาไทย, บริษัท ไมโครซอฟท์
3. โปรแกรมไดร์เวอร์สำหรับแผงวงจรแปลงสัญญาณ Pci-711s และชุดโปรแกรมติดต่อเชื่อมโยงระหว่างภาษาวิชวลเบสิก 3.0 กับแผงวงจรแปลงสัญญาณ (VBX Files)

4.1.2 โปรแกรมใช้งานCellmax.exe และModel1.exe

4.1.2.1 ภาพรวมของโปรแกรม

โปรแกรมใช้งานที่สร้างขึ้นคือโปรแกรม CellMax.exe และ Model1.exe เขียนขึ้นเพื่อใช้ศึกษากระบวนการควบคุมการเติมสารป้อนในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มค่าอัตราผลผลิตพอลิ-เบตา-ไฮดรอกซีบิวทิริกจาก Alcaligenes eutrophus ATCC 17697 โปรแกรม CellMax.exe ใช้เพื่อควบคุมการเติมสารป้อนโดยอาศัยข้อมูลจากอุปกรณ์ตรวจวัดสภาวะในถังหมักเป็นข้อมูลย้อนกลับ เพื่อปรับเปลี่ยนค่าอัตราการเติมสารป้อน เพื่อให้ได้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดตลอดเวลา โปรแกรมModel1.exe ใช้เพื่อศึกษากระบวนการหมักจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ก่อนทดลองปฏิบัติการจริงด้วยโปรแกรม CellMax.exe โปรแกรมทั้งสองมีรูปแบบการควบคุมเหมือนกันทุกประการ แตกต่างกันเพียงโปรแกรมModel1.exe ใช้ข้อมูลย้อนกลับที่ได้จากแบบจำลองการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ แต่โปรแกรม CellMax.exe ใช้ข้อมูลที่ได้จากอุปกรณ์ตรวจวัดจริงเป็นข้อมูลย้อนกลับ

โปรแกรมทั้งสองถูกเขียนขึ้นด้วยภาษาวิชวลเบสิก โปรเฟสชันแนล รุ่น 3.0 สาเหตุที่เลือกใช้ภาษาวิชวลเบสิก ซึ่งมีความเร็วในการประมวลผลที่ค่อนข้างช้ากว่าภาษาอื่นๆ เช่น ภาษาซี เนื่องจากในงานควบคุมการเติมสารป้อนของกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยอาศัยข้อมูลการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เป็นข้อมูลย้อนกลับ ไม่จำเป็นต้องอาศัยความรวดเร็วในการประมวลผลมากนัก การเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารอาหารมีค่าเวลาหน่วงค่อนข้างมาก ทำให้ไม่มีความจำเป็นต้องใช้อัตราการเก็บข้อมูล (sampling rate) ความถี่สูง โปรแกรม Cellmax.exe มีค่าอัตราการเก็บข้อมูลเร็วที่สุดเพียง 1 ครั้งต่อนาที ด้วยสมรรถนะของเครื่องคอมพิวเตอร์ในปัจจุบัน ภาษาวิชวลเบสิก โปรเฟสชันแนล รุ่น 3.0 ให้ความเร็วในการประมวลผลเพียงพอกับการใช้งาน นอกจากนี้ภาษาวิชวลเบสิกยังมีอุปกรณ์ช่วยเหลือต่างๆ มากมาย ทำให้สามารถ

ดำเนินงานที่ซับซ้อนต่างๆ ได้โดยง่าย สะดวกต่อการสร้างโปรแกรม และทำให้สร้างโปรแกรมที่ทำงานซับซ้อนได้ในระยะเวลาสั้นๆ

โปรแกรมทั้งสองทำงานบนระบบปฏิบัติการวินโดวส์ จัดเก็บข้อมูลที่ได้ในเวลาจริงในโปรแกรมเอกเซล รุ่น 5.0a โดยอาศัยการทำงานแบบ Dynamic Data Exchange (DDE) การที่จัดเก็บข้อมูลในลักษณะดังกล่าว เนื่องจากโปรแกรมทำงานบนระบบปฏิบัติการวินโดวส์ จึงสามารถทำงานได้ในแบบหลายงานพร้อมกัน (Multitasking) ดังนั้นในระหว่างใช้งานโปรแกรม Cellmax เพื่อการติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมัก หรือติดตามการเปลี่ยนแปลงอัตราการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และควบคุมการเติมสารป้อนในขณะต่างๆ จะสามารถทำงานอื่นๆ ได้ในเวลาเดียวกัน ได้แก่ การดำเนินงานเพื่อใช้ หรือปรับปรุงแบบจำลองการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในแบบเวลาจริง การจัดทำรายงานต่างๆ เป็นต้น ทั้งยังสามารถส่งออกข้อมูลที่ได้ผ่านเอกเซลไปยังโปรแกรมประเภทอื่นๆ เช่น โปรแกรมจัดการฐานข้อมูล โปรแกรมเพื่อการนำเสนอผลงาน หรือโปรแกรมประมวลผลได้โดยง่าย และนอกจากนี้ยังได้อาศัยส่วนการแสดงผลในรูปของกราฟของโปรแกรมเอกเซล เพื่อการแสดงผลของโปรแกรม Cellmax.exe และ Model1.exe ซึ่งทำให้ประหยัดเวลาในการสร้างโปรแกรมในส่วนแสดงผลไปได้อย่างมาก อีกทั้งยังจะทำให้สามารถปรับเปลี่ยนลักษณะปรากฏต่างๆ ของส่วนแสดงผล เพื่อการออกรายงานได้อย่างอิสระ โปรแกรม Cellmax.exe และ Model1.exe มีการติดต่อกับผู้ใช้ทางกราฟฟิก (Graphic User Interface GUI) ซึ่งทำให้ง่ายต่อการใช้งาน นอกจากนี้อุปกรณ์ต่างๆ ของโปรแกรม เช่น ปุ่ม กรอบข้อความ ฯลฯ ยังเป็นไปตามแบบทั่วๆ ไปของระบบปฏิบัติการวินโดวส์ทั้งสิ้น ทำให้ผู้ใช้สามารถเริ่มต้นใช้งานโปรแกรมได้โดยใช้เวลาเรียนรู้น้อยที่สุด

โปรแกรมทั้งสองถูกเขียนขึ้น เพื่อทำงานเฉพาะในงานวิจัยนี้เท่านั้น จึงไม่มีระบบให้ความช่วยเหลือใดๆ นอกจากข้อความสั้นๆ แสดงลำดับการทำงานเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อย่างไรก็ตามเนื่องจากมีข้อดีต่างๆ ดังแสดงข้างต้น ผู้ใช้สามารถเรียนรู้เพื่อประยุกต์ใช้งานโปรแกรม Cellmax.exe และ Model1.exe สำหรับกระบวนการหมักกึ่งต่อเนื่องโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ได้โดยง่าย และในระยะเวลาอันสั้น

#### 4.1.2.1.1 ภาพรวมของโปรแกรม Cellmax.exe

โปรแกรม Cellmax.exe ทำหน้าที่ติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักและควบคุมการเติมสารป้อน เพื่อให้ได้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่สูงสุดตลอดเวลา โปรแกรมสามารถทำงานได้ใน 3 รูปแบบ คือ

1. ติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักเพียงอย่างเดียว
2. ควบคุมการเติมสารป้อนเข้าสู่ถังหมัก โดยอาศัยข้อมูลการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ เพื่อให้ได้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่สูงสุดตลอดเวลา

3. ควบคุมการเติมสารป้อนเข้าสู่ถังหมัก โดยอาศัยข้อมูลการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จากการวัดปริมาณเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ในเวลาจริง เพื่อให้ได้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่สูงสุดตลอดเวลา

โปรแกรมสามารถติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักได้โดยอาศัยการวัดปริมาณเซลล์จากเครื่องวัดค่าความขุ่น (Turbidimeter, FSC-402 Mettler Toledo) เครื่องวัดค่าความขุ่นจะทำหน้าที่วัดค่าการกระจายของแสงตามแบบเวลาจริง จากนั้นส่งสัญญาณอะนาล็อกเข้าสู่เครื่องคอมพิวเตอร์โดยผ่านการ์ดแปลงสัญญาณ ซึ่งจะแปลงสัญญาณอะนาล็อกไปสู่สัญญาณแบบดิจิตอล โปรแกรม Cellmax.exe จะรับสัญญาณที่ถูกส่งมาจากการ์ดแปลงสัญญาณ ทำการกรองสัญญาณแบบดิจิตอลเพื่อขจัดการรบกวนจากตัวรบกวนต่างๆ (noise) จากนั้นคำนวณหาค่าปริมาณเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ แสดงผลออกหน้าจอ และส่งผลที่ได้ไปคำนวณในโปรแกรมเอกเซล

ในส่วนที่ 2 ซึ่งเป็นการควบคุมการเติมสารป้อนเข้าสู่ถังหมักโดยอาศัยข้อมูลการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ เพื่อให้ได้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่สูงสุดตลอดเวลา โปรแกรมนี้จะคำนวณหาค่าปริมาณเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ทุกๆ 1 นาที โดยอาศัยแบบจำลองการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง จากค่าปริมาณเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ จะคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ทำการปรับเปลี่ยนค่าอัตราการเติมสารป้อนตามรูปที่ 3.3 ซึ่งแสดงแผนภูมิสายงาน จากค่าอัตราการเติมสารป้อนที่คำนวณได้ คำนวณหาแรงดันทางไฟฟ้า ส่งออกผ่านการ์ดแปลงสัญญานซึ่งจะแปลงค่าแรงดันทางไฟฟ้าที่คำนวณได้ จากสัญญานดิจิตอลเป็นสัญญานอะ-นาล็อก และส่งสัญญานอะนาล็อกที่ได้ ไปสู่ปั๊มเพอริสตาลติกชนิดปรับเปลี่ยนความเร็วรอบได้ (variable speed) เพื่อเติมสารป้อนเข้าสู่ถังหมักต่อไป สำหรับการทำงานในส่วนนี้ ผู้ใช้สามารถแก้ไขค่าปริมาณเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ และค่าความเข้มข้นของสารอาหารในถังหมักได้ตลอดระยะเวลาการทำงาน เพื่อให้ถูกต้องตรงกันกับค่าที่ตรวจวัดได้โดยวิธีการเก็บตัวอย่างวัดจริง (off-line) จากนั้นส่งค่าปริมาณเซลล์ ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อจุลินทรีย์ ค่าความเข้มข้นสารอาหาร ค่าอัตราการเติมสารป้อน เข้าสู่โปรแกรมเอกเซล

การทำงานของโปรแกรมนี้ในส่วนที่สาม แตกต่างจากการทำงานในส่วนที่สองตรงที่ปริมาณเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักได้มาจากการวัดค่าความขุ่นในเวลาจริงเท่านั้น นอกจากนี้เหมือนกับการทำงานในส่วนที่สอง

4.1.2.1.2 ภาพรวมของโปรแกรม Model1.exe

โปรแกรม Model1.exe เป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของกระบวนการหมักเชื้อจุลินทรีย์ ALcaligenes eutrophus ATCC 17697 ในแบบกึ่งต่อเนื่องเพื่อ

ผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ใช้ทำงานเพื่อศึกษาหาข้อมูลขั้นต้น และสภาวะต่างๆ ที่จะเหมาะสมต่อกระบวนการหมักก่อนที่จะใช้โปรแกรม Cellmax.exe ควบคุมกระบวนการหมักจริง

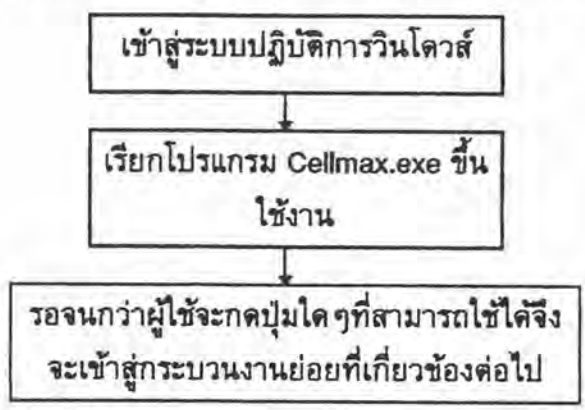
โปรแกรมนี้ จะใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องแทนถังหมักจริง ดังนั้นโปรแกรม Model1.exe จึงมีลักษณะการทำงานคล้ายกันกับโปรแกรม Cellmax.exe ในส่วนที่สอง แตกต่างกันเพียงโปรแกรม Model1.exe ไม่ได้ควบคุมปั๊มเพื่อเติมสารป้อนจริง แต่จะส่งค่าอัตราการเติมสารป้อนที่เวลาต่าง ๆ ที่คำนวณได้ เข้าสู่แบบจำลองของเชื้อจุลินทรีย์เท่านั้น

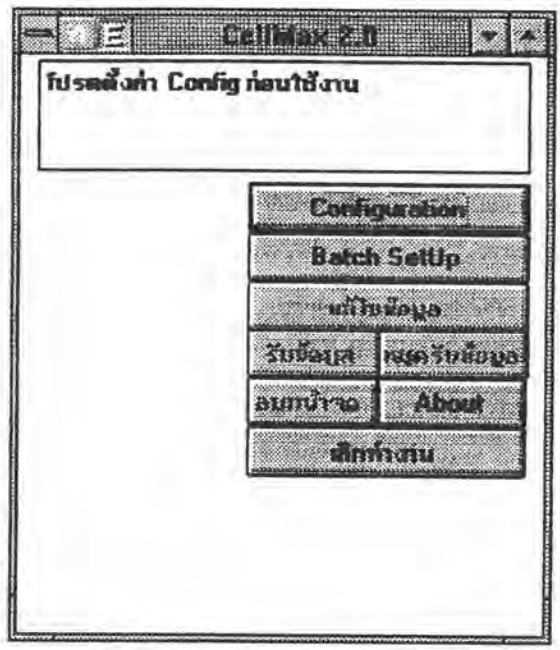
โปรแกรม Model1.exe ถูกดัดแปลงมาจากโปรแกรม Cellmax.exe ดังนั้นโปรแกรมจะมีรูปร่างลักษณะปรากฏที่คล้ายคลึงกัน เพียงแต่การป้อนค่าบางอย่างเข้าสู่โปรแกรมในลักษณะเดียวกันกับ Cellmax.exe จะไม่มีผลต่อการทำงานของโปรแกรม

4.1.2.2 แผนภูมิสายงาน

โปรแกรม Cellmax.exe และ Model1.exe มีรูปแบบการทำงานในแบบถูกกระตุ้นให้ทำงานใดๆ แล้วแต่ชนิดของเหตุการณ์ที่ไปกระตุ้นอุปกรณ์ชนิดหนึ่งๆ ของโปรแกรม (Event Oriented Programming) ดังนั้นโปรแกรมจะมีจำนวนสายงานอิสระแยกจากกันหลายสายงานขึ้นกับจำนวนอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในโปรแกรม และจำนวนเหตุการณ์ที่จะเกิดขึ้นได้กับอุปกรณ์นั้นๆ ซึ่งแตกต่างไปจากโปรแกรมที่เขียนขึ้นด้วยภาษาในยุคเดิม เช่น Quick Basic ที่จะมีสายงานหลักเพียงสายงานเดียว จากนั้นจึงแตกกิ่งแยกสาขาออกไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตามสายงานบางสายงานมีไว้เพื่อให้ทำงานกับอุปกรณ์ต่างๆ ได้สะดวกมากยิ่งขึ้นเท่านั้น ไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานเพื่อควบคุมการเติมสารป้อน ดังนั้นจึงแสดงรายละเอียดแผนภูมิสายงานเฉพาะสายงานที่เกี่ยวข้องเท่านั้น การอธิบายจะแสดงเป้าหมายการทำงานของกระบวนงานย่อยนั้นๆ ก่อน หลังจากนั้นจึงจะแสดงรายละเอียด และขั้นตอนต่างๆ ของแผนภูมิสายงาน

4.1.2.2.1 แผนภูมิสายงานโปรแกรม Cellmax.exe






รูปที่ 4.1 แสดงรูปโปรแกรม Cellmax.exe เมื่อเรียกขึ้นใช้งาน

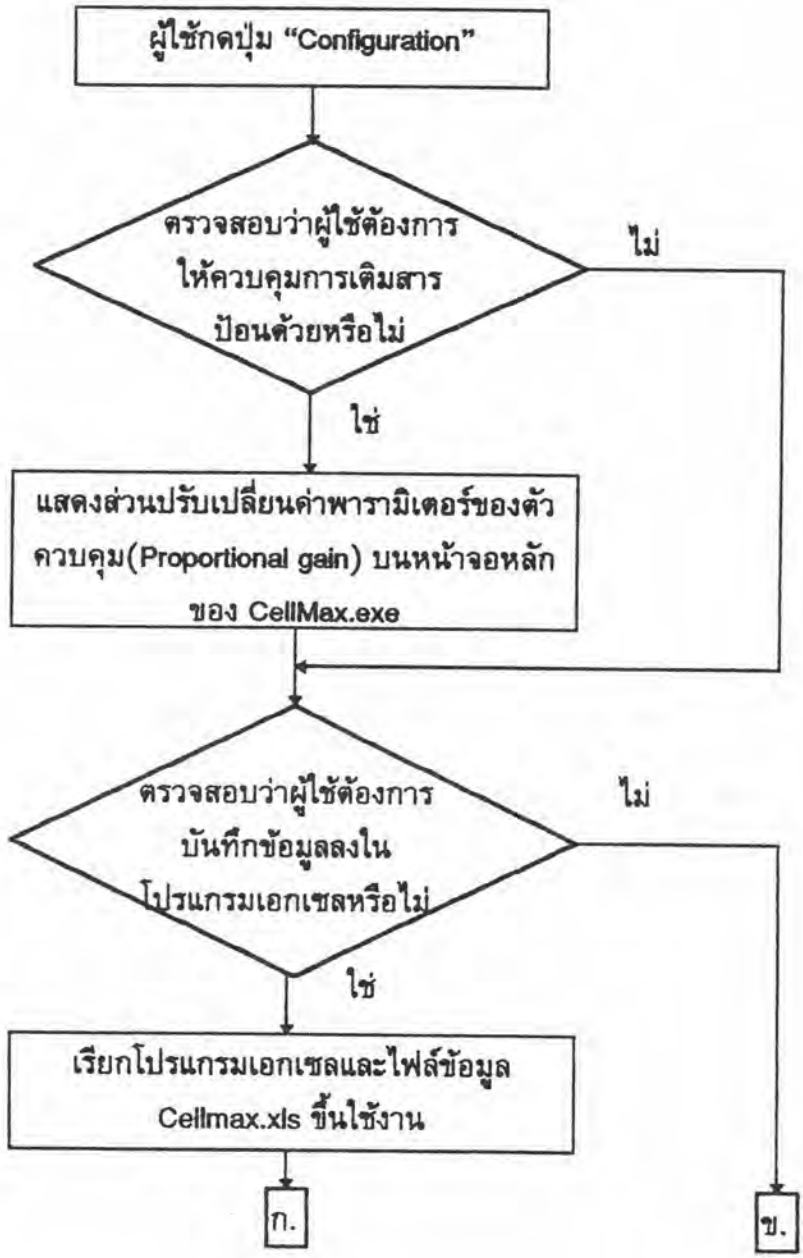
**กรณีผู้ใช้กดปุ่ม "Configuration"**

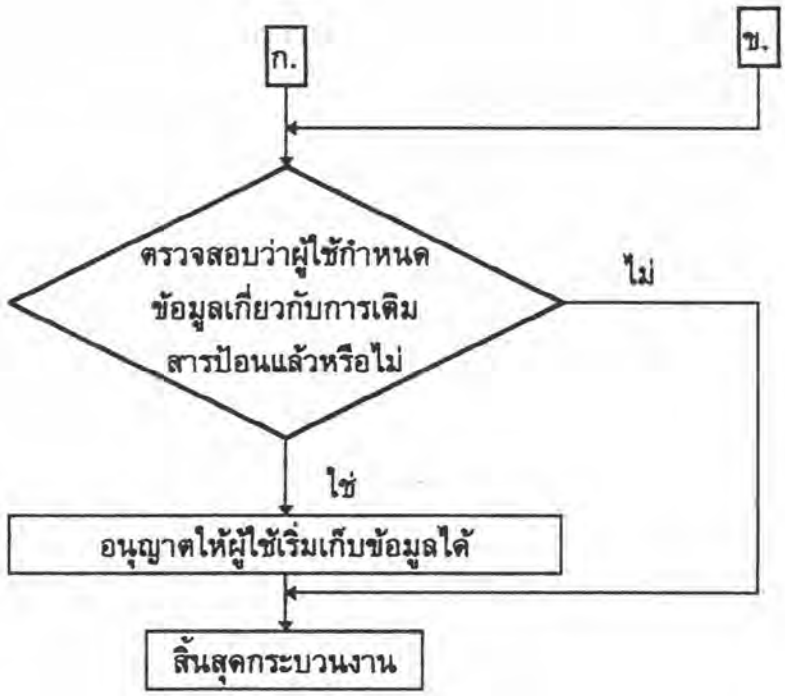
<u>เป้าหมายการดำเนินงาน</u>

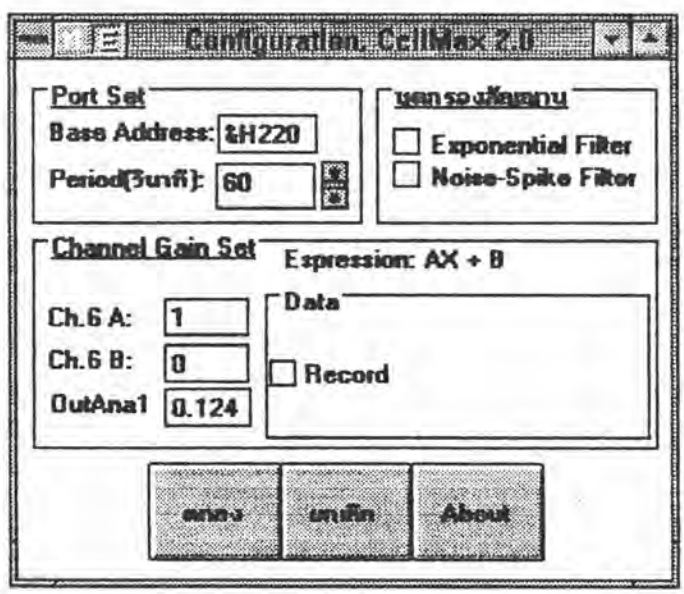
หลังจากเหตุการณ์นี้ Cellmax.exe จะแสดงหน้าจอสำหรับกำหนดค่าต่างๆ ที่จำเป็นต่อการทำงานรับส่งข้อมูล และการบันทึกข้อมูล ได้แก่

- ช่องทางรับส่งข้อมูลระหว่างการ์ดแปลงสัญญาณกับคอมพิวเตอร์ ในรูปแบบเลขฐานสิบหก ค่าปกติคือ &H220
- อัตราการรับข้อมูล (Sampling rate) จากอุปกรณ์รับข้อมูล ในรูปของคาบเวลา (วินาที/ครั้ง) ค่าปกติคือ 60 วินาที/ครั้ง
- รูปแบบการกรองสัญญาณที่ได้จากอุปกรณ์รับข้อมูล
- ค่าเกน (gain) ซึ่งใช้สำหรับแปลงค่าสัญญาณทางไฟฟ้าที่อ่านได้ (0-5โวลต์) ให้อยู่ในรูปของค่าสัญญาณที่มีความหมายในกระบวนการหมัก
- ค่าเกนซึ่งใช้สำหรับแปลงค่าอัตราการเติมสารป้อนที่ต้องการให้อยู่ในรูปของค่าสัญญาณทางไฟฟ้า (0-5โวลต์)
- เลือกว่าต้องการเก็บบันทึกข้อมูลที่ได้ไว้หรือไม่

<u>แผนภูมิสายงานของกระบวนงานย่อย</u>

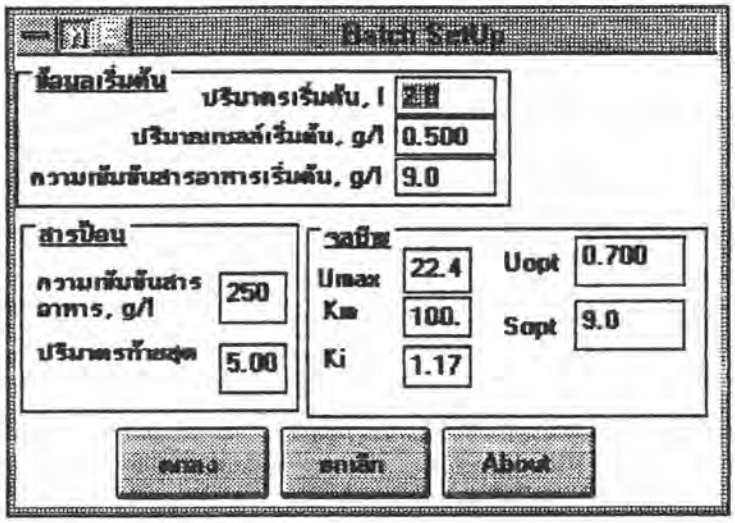





รูปที่ 4.2 แสดงหน้าจอที่แสดงขึ้นเมื่อผู้ใช้เลือกกดปุ่ม "Configuration"

**กรณีผู้ใช้กดปุ่ม "Batch Setup"**




รูปที่ 4.3 แสดงหน้าจอที่แสดงขึ้นเมื่อผู้ใช้เลือกกดปุ่ม "Batch Setup"

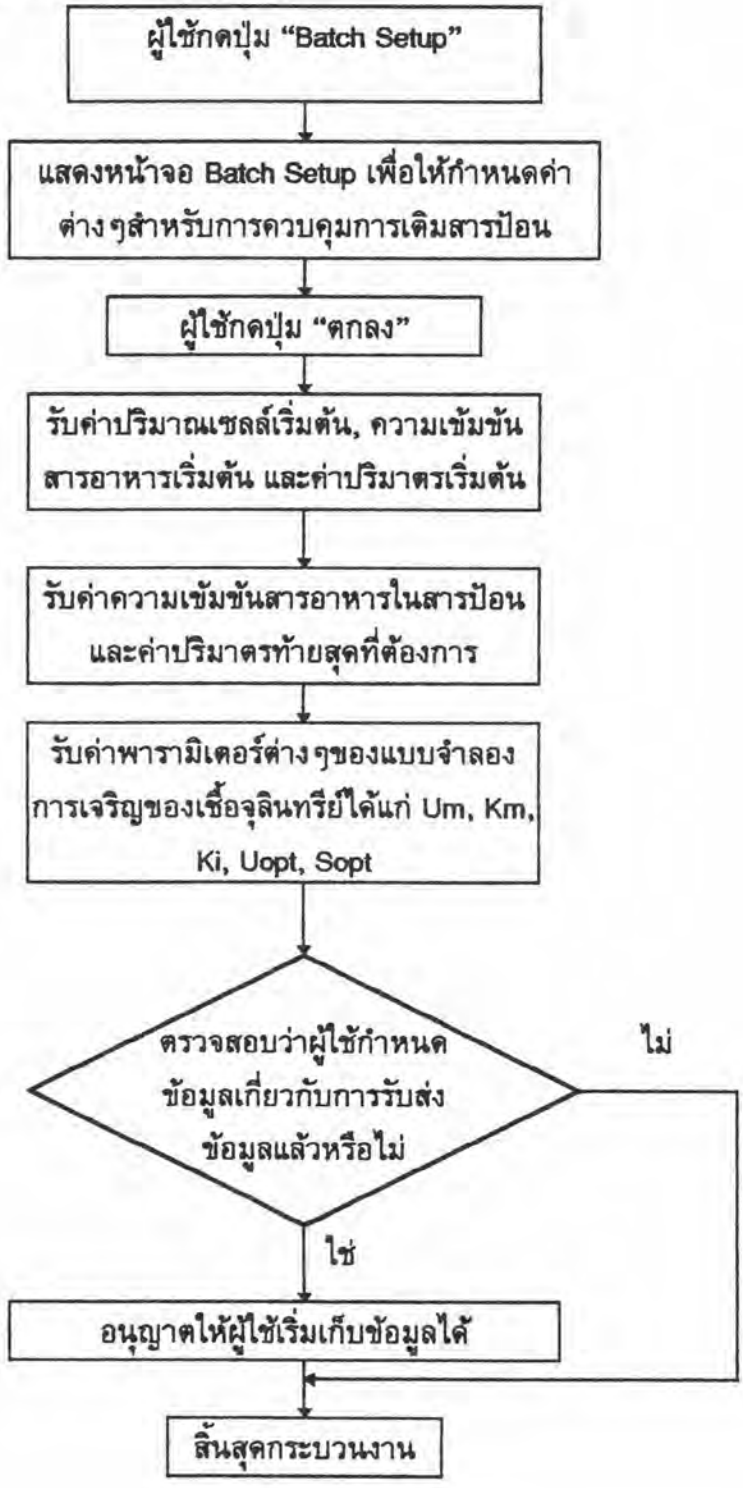
<u>เป้าหมายการดำเนินงาน</u>

หลังจากเหตุการณ์นี้ Cellmax.exe จะแสดงหน้าจอสำหรับกำหนดค่าต่างๆ ที่จำเป็นต่อการควบคุมการเติมสารป้อน ได้แก่ ค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้

- ความเข้มข้นเริ่มต้นของแหล่งคาร์บอนในถังหมัก, กรัม/ลิตร
- ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในสารป้อน, กรัม/ลิตร
- ปริมาณเซลล์เริ่มต้น, กรัม/ลิตร
- ปริมาตรเริ่มต้น และปริมาตรท้ายสุด, ลิตร
- ค่าแสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ค่า Umax, Uopt, Km, Ki, Sopt

เมื่อผู้ใช้กดปุ่ม "ตกลง" CellMax.exe จะนำค่าต่างๆ ดังกล่าว ที่ผู้ใช้กำหนดไปใช้

<u>แผนภูมิสายงานของกระบวนงานย่อย</u>

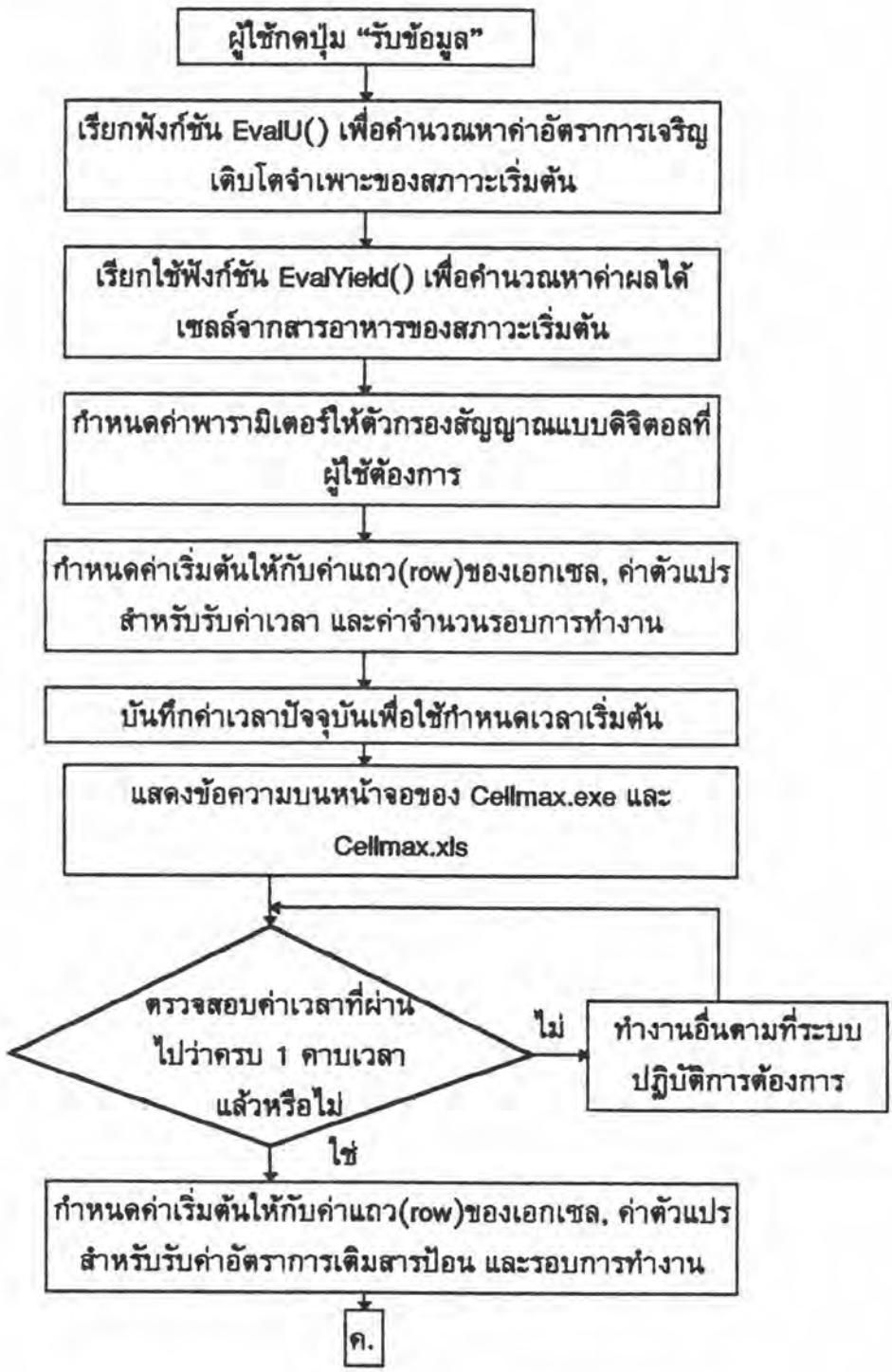


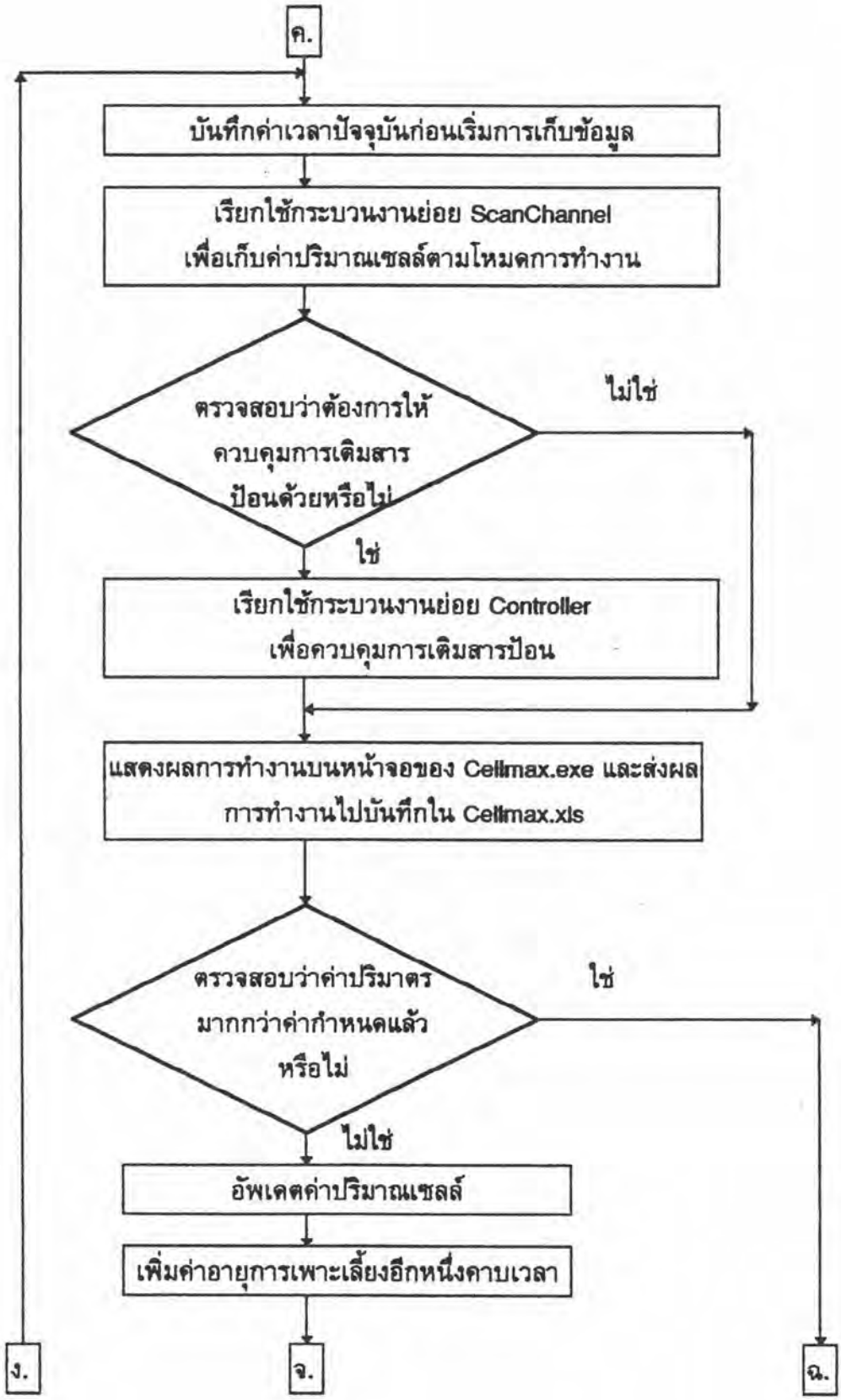
**กรณีที่ผู้ใช้กดปุ่ม "รับข้อมูล"**

<u>เป้าหมายของกระบวนงาน</u>

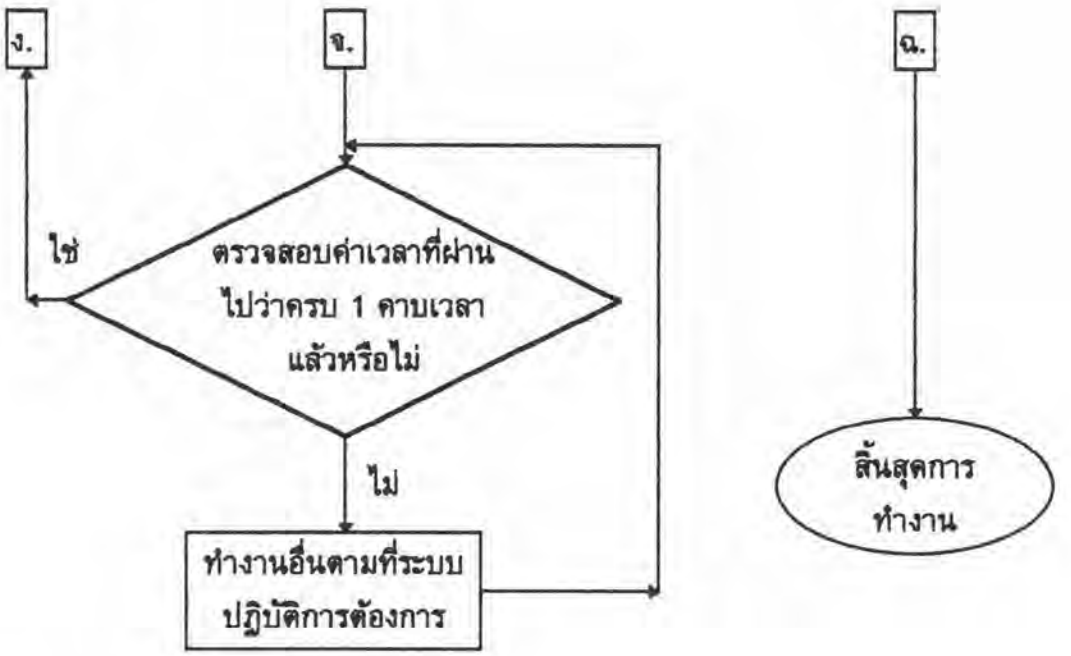
เพื่อทำงานในโหมดที่ 1, 2 หรือ 3 ตามวัตถุประสงค์ของผู้ใช้

<u>แผนภูมิสายงานของกระบวนงานย่อย</u>




ค.
บันทึกค่าเวลาปัจจุบันก่อนเริ่มการเก็บข้อมูล
เรียกใช้กระบวนงานย่อย ScanChannel
เพื่อเก็บค่าปริมาณเซลล์ตามโหมดการทำงาน
ตรวจสอบว่าต้องการให้
ควบคุมการเติมสาร
ป้อนด้วยหรือไม่
ไม่ใช่
ใช่
เรียกใช้กระบวนงานย่อย Controller
เพื่อควบคุมการเติมสารป้อน
แสดงผลการทำงานบนหน้าจอของ Cellmax.exe และส่งผล
การทำงานไปบันทึกใน Cellmax.xls
ตรวจสอบว่าค่าปริมาตร
มากกว่าค่ากำหนดแล้ว
หรือไม่
ใช่
ไม่ใช่
อัพเดตค่าปริมาณเซลล์
เพิ่มค่าอายุการเพาะเลี้ยงอีกหนึ่งคาบเวลา
ง.
จ.
ฉ.

I 19362407




<u>กระบวนงานย่อยและฟังก์ชันต่าง ๆ ที่ใช้เรียงตามลำดับที่อ้างถึง มีดังต่อไปนี้ คือ</u>

1. <u>ฟังก์ชัน EvalU (Substrate as double) as double</u> ใช้เพื่อคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์
2. <u>ฟังก์ชัน Eval Yield (Substrate as double) as double</u> ใช้เพื่อคำนวณหาค่าผลได้เซลล์จาก ฟรุคโตสที่ภาวะความเข้มข้นของฟรุคโตสในถังหมักต่าง ๆ
3. <u>กระบวนงานย่อย Scan Channel</u> ใช้เพื่อรับค่าปริมาณเซลล์จากแหล่งต่างๆ ตามที่ผู้ใช้กำหนด ในกระบวนงานย่อยนี้ มีการเรียกใช้กระบวนงานย่อยอื่น และฟังก์ชันอื่นๆ เรียงตามลำดับที่อ้างถึงได้ดังนี้
   - <u>ฟังก์ชัน Single Sample ()</u> ใช้คำนวณหาค่าปริมาณเซลล์จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ซึ่งจะได้โครงสร้างรูปแบบและวิธีการคำนวณจากขั้นตอนการวิจัยที่ 4.2.7.1.4 ดังได้แสดงในลำดับถัดไป
   - <u>ฟังก์ชัน EvalS (flow As Double, new Cell As Double) As Double</u> ใช้คำนวณหาค่าความเข้มข้นของฟรุคโตสจากค่าอัตราการเติมสารป้อน และค่าปริมาณเซลล์ที่ได้โดยอาศัยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง
   - <u>ฟังก์ชัน Read Turbid ()</u> ใช้เพื่อรับค่าปริมาณเซลล์จากเครื่องเทอร์บิดิมิเตอร์

4. กระบวนงานย่อย Controller ใช้เพื่อควบคุมการเติมสารป้อนตามรูปที่ 3.3 ซึ่งแสดงแผนภูมิสายงานการควบคุมการเติมสารป้อน

- กระบวนงานย่อย Data Analyse (j As Integer) ใช้เพื่อคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากค่าปริมาณเซลล์ ในกรณีที่ผู้ใช้ต้องการสามารถกรองค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ได้ด้วยการกรองสัญญาณแบบดิจิตอลชนิดเอ็กโปเนนเชียล จากนั้นกรองค่าที่ได้ด้วยเทคนิคการกรองสัญญาณแบบ moving average โดยใช้จำนวนข้อมูล 6 จุด

- กระบวนงานย่อย Up date Val (Mu As Double, SConc As Double) กรณีที่พบว่าค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่คำนวณได้ใหม่มีค่าสูงกว่าค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเดิมที่ดีที่สุด กระบวนงานจะทำหน้าที่แก้ไขค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ดีที่สุด และค่าความเข้มข้นของฟรุคโตสที่สอดคล้องกันให้เป็นค่าที่พบใหม่ นอกจากนี้ยังสามารถใช้กระบวนงานย่อยนี้ เพื่อแก้ไขค่าความเข้มข้นของฟรุคโตสที่ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะดีที่สุดให้เป็นค่าใหม่ตามต้องการได้

- กระบวนงานย่อย ChangeF (ChgType As Integer, Err As Single) กระบวนงานย่อยนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมแบบ P (Proportional controller) เพิ่มหรือลดค่าอัตราการเติมสารป้อนให้เหมาะสม โดยพิจารณาจากค่าความแตกต่างระหว่างค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจริงตามเวลากับค่าเซ็ตพอยน์ และค่าความแตกต่างระหว่างค่าความเข้มข้นของฟรุคโตสที่ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะดีที่สุดกับค่าเซ็ตพอยน์

- กระบวนงานย่อย Send Flow Out (flow as single) กระบวนงานย่อยนี้ทำหน้าที่แปลงค่าอัตราการเติมสารป้อนที่ต้องการให้อยู่ในรูปของค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐาน (0-5 โวลต์) เพื่อส่งไปให้การ์ดแปลงสัญญาณเปลี่ยนจากสัญญาณดิจิตอลให้เป็นค่าสัญญาณอะนาล็อก เพื่อส่งไปควบคุมปั๊มต่อไป

4.1.3 เคมีภัณฑ์

ฟรุคโตส ของบริษัท Merck, Germany.
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท GIBCO BRL, Scotland.
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [$Na_2HPO_4$] ของบริษัท CARLOERBA, Italy.
โซเดียมไนโตรปรัสไซด์ (Sodium nitroprusside) ของบริษัท FLUKA, Switzreland.
โซเดียมไฮดรอกไซด์ ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia.
โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ของบริษัท CARLOERBA, Italy.
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต [$KH_2PO_4$] ของบริษัท Merck, Germany.
แมกนีเซียมซัลเฟต [$MgSO_4.7H_2O$] ของบริษัท FLUKA, Switzreland.

แคลเซียมคลอไรด์ [$CaCl_2$] ของบริษัท Merck, Germany.

ซิงค์ซัลเฟต [$ZnSO_4.7H_20$] ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia.

เฟอรัสซัลเฟต [$FeSO_4.7H_2O$] ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia.

แอมโมเนียมโมลิบเดต ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia.

แอมโมเนียมคลอไรด์ ของบริษัท CARLOERBA, Italy.

แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia.

ฟีนอล (Phenol) ของบริษัท CARLOERBA, Italy.

กรดซัลฟุริก [$H_2SO_4$] ของบริษัท Merck, Germany.

กรดบอริก [$H_3BO_3$] ของบริษัท Merck, Germany.

กรดฟอสฟอริก ของบริษัท CARLOERBA, Italy.

กรดโครโตนิก ของบริษัท Sigma, USA

อะซิโตรไนไทรส์ ($CH_3CN$) ของบริษัท CARLOERBA, Italy.

4.1.4 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย คือ Alcaligenes eutrophus สายพันธุ์ ATCC 17697 จัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มแกรมลบ

4.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ ใช้อาหารอุดมแบบแข็งเอียง (Nutreint agar slant)
2. อาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ ใช้อาหารอุดมแบบเหลว (Nutreint broth)
3. อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ใช้อาหารเหลวสูตรเกลือแร่ (Mineral salt medium) ในอาหารเหลว 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารกลุ่มที่ 1

| | | |
|---|---|---|
| น้ำตาล | 20 | กรัม |
| สารสกัดจากยีสต์ | 0.1 | กรัม |

สารกลุ่มที่ 2

| | | |
|---|---|---|
| แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] | 2 | กรัม |
| โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต [$KH_2PO_4$] | 2 | กรัม |
| ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [$Na_2HPO_4$] | 1 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต [$MgSO_4.7H_20$] | 0.2 | กรัม |
| แคลเซียมคลอไรด์ [$CaCl_2$] | 20 | มิลลิกรัม |

| | | |
|---|---|---|
| ซิงค์ซัลเฟต [$ZnSO_4.7H_20$] | 1.6 | มิลลิกรัม |
| เฟอรัสซัลเฟต [$FeSO_4.7H_2O$] | 0.3 | มิลลิกรัม |
| แอมโมเนียมโมลิบเดต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_20$] | 0.6 | มิลลิกรัม |
| กรดบอริก [$H_3BO_3$] | 0.6 | มิลลิกรัม |

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเกลือแร่นี้ เมื่อเตรียมสารแต่ละกลุ่มได้ตามต้องการแล้ว แยกฆ่าเชื้อสารกลุ่มที่ 1 และ 2 หลังจากนั้นจึงผสมกันด้วยวิธีการแบบปลอดเชื้อเพื่อป้องกันเชื้ออื่นเข้าปนเปื้อน สาเหตุที่ต้องแยกจากกันก่อนฆ่าเชื้อ คือ วิธีการฆ่าเชื้อที่ใช้เป็นการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจากไอน้ำความดัน 1.5 บาร์ เป็นเวลา 15 นาที ถ้าผสมกันก่อนน้ำตาลจะไหม้เกิดเป็นสีดำเข้ม และออกฤทธิ์ทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ช้าลง หลังจากผสมกันแล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 7.0

4.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

วิธีการดำเนินงานวิจัยในงานวิจัยนี้เป็นการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ คือ การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเตรียมไว้สำหรับใช้ตลอดงานวิจัย การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในงานทดลองแต่ละครั้ง และการทดลองเพาะเลี้ยงเพื่อหาภาวะต่าง ๆ ตามแนวทางการดำเนินงานวิจัย ซึ่งแบ่งออกเป็นการเพาะเลี้ยงในแบบไม่ต่อเนื่องในระดับขวดแก้วทรงกรวย การเพาะเลี้ยงในแบบไม่ต่อเนื่องในถังหมัก และการเพาะเลี้ยงในแบบไม่ต่อเนื่องในถังหมัก และนอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ วิธีการแต่ละขั้นตอนได้แสดงรายละเอียดตามหัวข้อต่างๆ ต่อไปนี้

4.2.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

4.2.1.1 วิธีเก็บรักษาแบบระยะยาว

เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) ซึ่งเป็นการทำให้เซลล์แข็งตัวในสภาพสูญญากาศ เมื่อต้องการใช้จึงนำออกมาถ่ายเชื้อลงในอาหารอุดมแบบเหลว เพื่อบำรุงให้เซลล์แข็งแรง และเพิ่มปริมาณมากขึ้น การเก็บด้วยวิธีนี้ระหว่างการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์จะไม่มีการเจริญเติบโตแบ่งตัว ดังนั้นจึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์อย่างแน่นอน

4.2.1.2 วิธีเก็บรักษาแบบระยะสั้น

เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารอุดมแบบแข็งเอียง (Nutrient agar slant) วิธีการคือ ในครั้งแรกนำเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารอุดมแบบเหลว (Nutrient broth) ถ่ายลงบนผิวหน้าของอาหารอุดมแบบแข็งเอียง นำไปเก็บในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมไว้สำหรับใช้ในงานวิจัย ด้วยวิธีนี้จะเก็บรักษาเชื้อไว้ประมาณ

1 เดือน หากเกินกว่านั้นจะถ่ายเชื้อลงอาหารอุดมแบบแข็งเอียงหลอดใหม่ กระตุ้นให้เจริญเติบโต เพื่อเก็บรักษาสำหรับเดือนถัดไป จะเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีนี้ต่อเนื่องกันไปเป็นเวลา 1 ปีเท่านั้น เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์จากการเจริญเติบโต

4.2.2 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาในอาหารอุดมแบบแข็งเอียง (Nutrient agar slant) ถ่ายลงในอาหารอุดมแบบเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 200 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการแบบปลอดเชื้อ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ โดยรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณใช้สำหรับการทดลองแต่ละครั้งคือ 10 % โดยปริมาตร

4.2.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus ATCC17697 ในแบบไม่ต่อเนื่อง

4.2.3.1 การหาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบไม่ต่อเนื่องในขวดแก้วทรงกรวย ใช้อาหารเหลวสูตรเกลือแร่ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ทำการทดลองสองชุด ชุดแรกใช้น้ำตาลกลูโคส และชุดที่สองใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ละชุดใช้ค่าความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นตั้งแต่ 4.0-20.0 กรัม/ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นไว้ที่ 7.0 ปริมาณเซลล์เริ่มต้นประมาณ 0.5 กรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์, ปริมาณน้ำตาล, ปริมาณ PHB , และปริมาณไนโตรเจน เลือกชนิดของน้ำตาล และความเข้มข้นเริ่มต้นที่ให้ผลดีที่สุด

4.2.3.2 การหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์

จากผลการทดลองในขั้นตอนที่ 4.2.3.1 เลือกใช้น้ำตาลที่ให้ผลผลิตเซลล์ และ PHB ที่ดีกว่าเป็นแหล่งคาร์บอน ในปริมาณที่ให้ผลดีที่สุด ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบไม่ต่อเนื่องในขวดแก้วทรงกรวย ใช้อาหารเหลวสูตรเกลือแร่ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 5 ชุด แต่ละชุดปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นแตกต่างกัน ได้แก่ 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ปริมาณเซลล์เริ่มต้นประมาณ 0.5 กรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักไป วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์, ปริมาณน้ำตาล, ปริมาณ PHB , และปริมาณไนโตรเจน เลือกค่า ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ให้ผลดีที่สุด

4.2.3.3 การหาค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์

จากผลการทดลองในขั้นตอนที่ 4.2.3.1 เลือกใช้น้ำตาลที่ให้ผลผลิตเซลล์ และ PHB ที่ดีกว่าเป็นแหล่งคาร์บอน และในปริมาณที่ให้ผลดีที่สุด ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบไม่ต่อเนื่องในขวดแก้วทรงกรวย ใช้อาหารเหลวสูตรเกลือแร่ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 6 ชุด แต่ละชุดมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นแตกต่างกัน ได้แก่ 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, และ 2.0 กรัม/ลิตร ซึ่งคิดเป็นค่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ ไม่มีไนโตรเจนเลย, 150, 30, 15, 15, 10, และ 8 ตามลำดับ ปริมาณเซลล์เริ่มต้นประมาณ 0.5 กรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์, ปริมาณน้ำตาล, ปริมาณ PHB , และปริมาณไนโตรเจน เลือกค่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นที่ให้ผลดีที่สุด

4.2.3.4 การหาค่าพารามิเตอร์เบื้องต้นเกี่ยวกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

จากผลการทดลองในขั้นตอนที่ 4.2.3.1 เลือกใช้น้ำตาลที่ให้ผลผลิตเซลล์ และ PHB ที่ดีกว่าเป็นแหล่งคาร์บอน และในปริมาณที่ให้ผลดีที่สุดเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบไม่ต่อเนื่องในถังหมัก เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นของแต่ละครั้งตั้งแต่ 6.0-12.0 กรัม/ลิตร ในทุกๆ ครั้งควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ระหว่าง 6.9-7.1 ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น และกรดไฮโดรคลอริก เติมอากาศเข้าในอัตรา 1 ปริมาตร/ปริมาตร-นาที (vvm) เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เพื่อตรวจวัดค่าปริมาณเซลล์ (กรัม/ลิตร) ปริมาณน้ำตาล (กรัม/ลิตร) จากผลการทดลองวิเคราะห์หาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในช่วงการเจริญแบบเอ็กโปเนนเชียล และวิเคราะห์หาค่าผลได้จากสารอาหาร จากค่าปริมาณเซลล์ที่ได้ และปริมาณน้ำตาลที่หายไปของแต่ละการทดลอง

4.2.3.5 จัดสร้างโปรแกรม Cellmax.exe และ Model1.exe

4.2.3.6 การทดลองหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่จำเป็นต้องใช้ในการควบคุมการสารป้อน

จากในขั้นตอนที่ 4.2.3.4 ซึ่งเป็นการหาค่าลักษณะจำเพาะของเชื้อจุลินทรีย์ นำค่าพารามิเตอร์ที่ได้สร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่แสดงการเจริญเติบโต โดยนำค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน มาหาความสัมพันธ์ตามรูปแบบมาตรฐานที่เหมาะสม ซึ่งจะใช้รูปแบบของโมนอด (Monod) หรือรูปแบบการเจริญแบบมีการยับยั้งด้วยสารอาหาร ใช้วิธีการวิเคราะห์ถดถอยแบบไม่เชิงเส้นเพื่อหาค่าคงที่ต่างๆ ที่ปรากฏในแบบจำลองการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ หลังจากที่ได้รูปแบบที่เหมาะ

สม และค่าพารามิเตอร์ที่เข้ากันกับข้อมูลจริงมากที่สุด นำไปสร้างแบบจำลองการเพาะเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่อง และแบบกึ่งต่อเนื่อง

จากสมดุลมวลสารของปริมาณเซลล์ และสารอาหาร ได้สมการต่างๆ ที่แสดงลักษณะทางจลนศาสตร์ของกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในแบบไม่ต่อเนื่อง ดังนี้

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \qquad 4.1$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu x}{Y_{x/s}} \qquad 4.2$$

แทนแบบจำลองการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ลงในแบบจำลองการเพาะเลี้ยง อินทิเกรทสมการที่ 4.1-4.2 เพื่อสร้างแบบจำลองกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่อง และอินทิเกรทสมการที่ 3.8-3.10 เพื่อสร้างแบบจำลองกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง

เชื่อมต่อแบบจำลองการเพาะเลี้ยงที่ได้เข้ากับโมดูล ควบคุมการเติมสารป้อนของโปรแกรม Cellmax.exe และ Model1.exe จำลองกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อใช้ตรวจสอบความถูกต้องของโปรแกรมควบคุมการเติมสารป้อนที่สร้างขึ้นก่อนใช้งานจริง

หลังจากตรวจสอบโปรแกรม ใช้แบบจำลองที่สร้างขึ้นเชื่อมต่อกับส่วนโปรแกรมควบคุมการเติมสารป้อน จากนั้นจำลองกระบวนการเพาะเลี้ยงเพื่อทดลองหาค่าคงที่ต่างๆ ที่ต้องใช้ในการควบคุม ได้แก่ ค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในสารป้อน และค่าคงที่ $K_c$ ที่ต้องใช้ในการปรับเปลี่ยนค่าอัตราการเติมสารป้อน โดยเป้าหมายของขั้นตอนนี้ คือ เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของสารป้อน และค่า $K_c$ ที่จะทำให้ได้ผลต่างๆ ดังต่อไปนี้

- ได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 70 กรัม/ลิตรเร็วที่สุด
- ได้ปริมาตรหลังการเพาะเลี้ยงไม่เกิน 3.5 ลิตร
- เป็นค่าที่ให้ค่าอัตราการเติมสารอาหารอยู่ในช่วงที่สามารถใช้งานด้วยปั๊มที่มีได้คือ มีค่ามากกว่า 3.8 มิลลิลิตร/นาที
- ในระหว่างการควบคุมค่าความเข้มข้นสารอาหารภายในถังหมักมีค่าไม่สูงหรือต่ำมากเกินไป

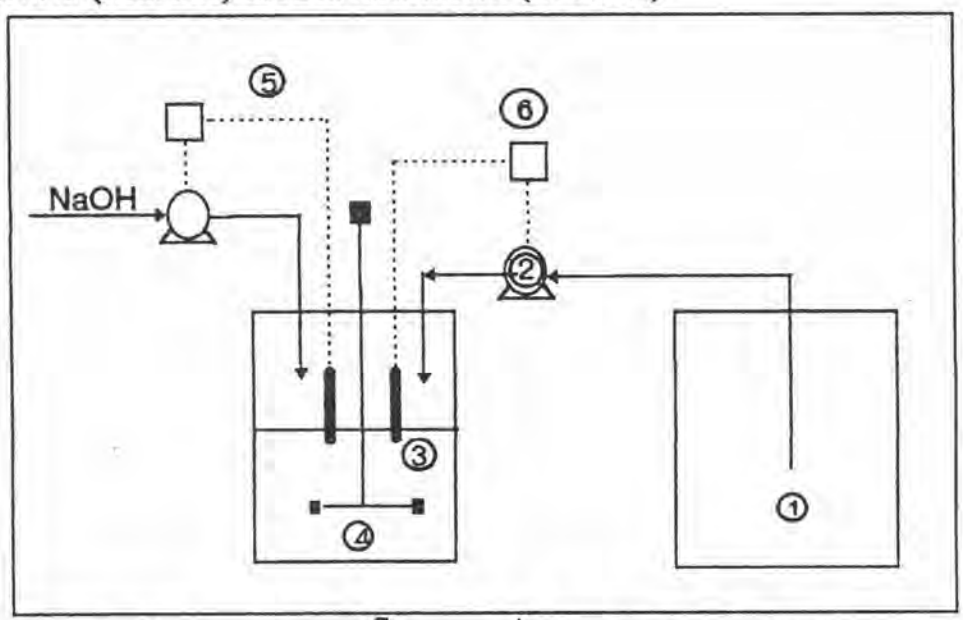
วิธีการหาค่าความเข้มข้นของสารป้อน ทำโดยเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของสารป้อนที่ใช้ในแบบจำลองไปตั้งแต่ 50-500 กรัม/ลิตร โดยกำหนดให้ค่า $K_c$ ที่ใช้ในการควบคุมคงที่ ที่ 0.25 ปริมาตรเริ่มต้น 2.0 ลิตร ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.5 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นค่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ใช้จริง และค่าความเข้มข้นสารอาหารเริ่มต้นตามที่ทราบจากการทดลอง

ตามหัวข้อ 4.2.3.1 ว่าเป็นค่าที่ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด เลือกค่าความเข้มข้นในช่วงที่ให้ผลเป็นไปตามเป้าหมาย หลังจากนั้นใช้ค่าความเข้มข้นของสารป้อนค่าต่างๆ ที่ได้ ทดลองหาค่า $K_c$ ที่จะให้ผลเป็นไปตามเป้าหมายโดยใช้ค่า $K_c$ ต่างๆ ตั้งแต่ 0.1-10 เลือกค่า $K_c$ ที่ให้ค่าความแตกต่างของความเข้มข้นฟรุคโตสภายในถังหมักสูงสุด และต่ำสุดในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงน้อยที่สุด สุดท้ายจึงนำกรณีที่ดีที่สุดของแต่ละความเข้มข้นมาเปรียบเทียบกัน เลือกใช้กรณีที่ให้ผลดีที่สุด

4.2.4 การเพิ่มอัตราผลผลิตโดยอาศัยการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง

4.2.4.1 การเพาะเลี้ยงในแบบควบคุมความเข้มข้นสารอาหารเพื่อให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าสูงสุดตลอดเวลา

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในแบบกึ่งต่อเนื่อง ใช้ค่าความเข้มข้นน้ำตาลฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับค่าความเข้มข้นที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ซึ่งจะได้ค่านี้จากการทดลองในขั้นที่ 4.2.3.1 ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ระหว่าง 6.9-7.1 ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น และกรดไฮโดรคลอริก เติมอากาศเข้าในอัตรา 1 ปริมาตร/ปริมาตร-นาที (vvm) ตรวจวัดปริมาณเซลล์แบบเวลาจริง เมื่อเชื้อจุลินทรีย์เริ่มเจริญเติบโตในแบบเอกโปเนนเชียล ควบคุมอัตราการป้อนสารละลายน้ำตาลฟรุคโตสโดยอาศัยวิธีการตามแผนภูมิสายงานในรูปที่ 3.3 (แผนภูมิสายงานแสดงวิธีการควบคุมการเติมสารป้อนเพื่อให้ได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด) เพาะเลี้ยงจนกระทั่งได้ปริมาณเซลล์ 70 กรัม/ลิตร ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมงเพื่อตรวจวัดค่า ปริมาณเซลล์ (กรัม/ลิตร) ปริมาณน้ำตาล (กรัม/ลิตร) และปริมาณไนโตรเจน (กรัม/ลิตร)




1. ถังสารอาหาร 2. ปั๊ม 3. เครื่องวัดความขุ่น 4. ถังหมัก
5. ระบบควบคุมความเป็นกรด-ด่าง 6. คอมพิวเตอร์

รูปที่ 4.4 แผนภาพแสดงการทดลองเพาะเลี้ยง Alcaligenes eutrophus ATCC 17697 แบบกึ่งต่อเนื่องโดยวัดปริมาณเซลล์เพื่อใช้เป็นข้อมูลย้อนกลับ

4.2.4.2 การเพิ่มอัตราผลผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยให้สารป้อนมีค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนคงที่ในช่วงสร้างผลิตภัณฑ์ของการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบกึ่งต่อเนื่อง ใช้ค่าความเข้มข้นน้ำตาลฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับค่าความเข้มข้นที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ซึ่งจะได้ค่านี้จากการทดลองในขั้นที่ 4.2.3.1 ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ระหว่าง 6.9-7.1 ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น และกรดไฮโดรคลอริก เติมอากาศเข้าในอัตรา 1 ปริมาตร/ปริมาตร-นาที เพาะเลี้ยงในแบบกึ่งต่อเนื่องโดยควบคุมค่าความเข้มข้นไว้ที่ค่าที่เหมาะกับการเจริญของเชื้อที่สุด จนกระทั่งได้ปริมาณเซลล์มากที่สุดหรือไม่เกิน 70 กรัม/ลิตร เปลี่ยนให้เชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่ภาวะสร้าง PHB โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างแทนแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ และเปลี่ยนวิธีการควบคุมอัตราการป้อนสารอาหาร โดยควบคุมให้ได้ปริมาณน้ำตาลคงที่โดยให้สารป้อนมีค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนคงที่ เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จนครบ 50 ชั่วโมง ตรวจวัดค่าปริมาณเซลล์ (กรัม/ลิตร) ปริมาณน้ำตาลฟรุคโตส (กรัม/ลิตร) ปริมาณไนโตรเจน (กรัม/ลิตร) ปริมาณ PHB (พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)

4.2.5 วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปั่นแยกเซลล์จากน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Cetrifuge) ความเร็วรอบ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปั่นแยกด้วยสภาวะเดิม (30 รอบ/นาที, 30 นาที) นำเซลล์ที่ได้เจือจางด้วยน้ำกลั่น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากค่าที่ได้หาค่าปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งจากกราฟมาตรฐาน

4.2.6 วิธีการหาปริมาณน้ำตาลฟรุคโตสในน้ำหมัก

ใช้วิธีของ Bernfeld (Ashwell, 1966) โดยนำน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกรีเอเจนต์ (Dinitrosalicylic acid reagent: DNSA Reagent) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในน้ำแข็ง 5 นาที เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก รีเอเจนต์ (Dinitrosalicylic acid reagent: DNSA Reagent) ทำได้โดยละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท 30 กรัม แล้วปรับปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.2.7 วิธีการหาปริมาณแอมโมเนียมไอออน

ใช้วิธีของ Sonnleitner (Sonnleitner, 1978) โดยนำน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายชนิด A ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายชนิด B ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวางในอ่างน้ำรักษาอุณหภูมิ โดยรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณแอมโมเนียมไอออนจากกราฟมาตรฐาน โดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ ($NH_4Cl$) สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายสำหรับทำปฏิกริยา แบ่งออกเป็นสารละลายชนิด A และสารละลายชนิด B การเตรียมสารละลายชนิด A ทำได้โดยนำฟีนอล (Phenol) ในปริมาณ 10 กรัม กับโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ (Sodium nitroprusside) ปริมาณ 10 มิลลิกรัม เติมน้ำ ผสมให้เข้ากัน ทำให้เป็นปริมาตร 1 ลิตร บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง การเตรียมสารละลายชนิด B ทำได้โดยผสมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) 6 กรัม,โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite) 10 มิลลิลิตร และได-โซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (di-Sodium hidrogen orthophosphate) 90 กรัม เติมน้ำ ผสมให้เข้ากัน ทำให้เป็นปริมาตร 1 ลิตร บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

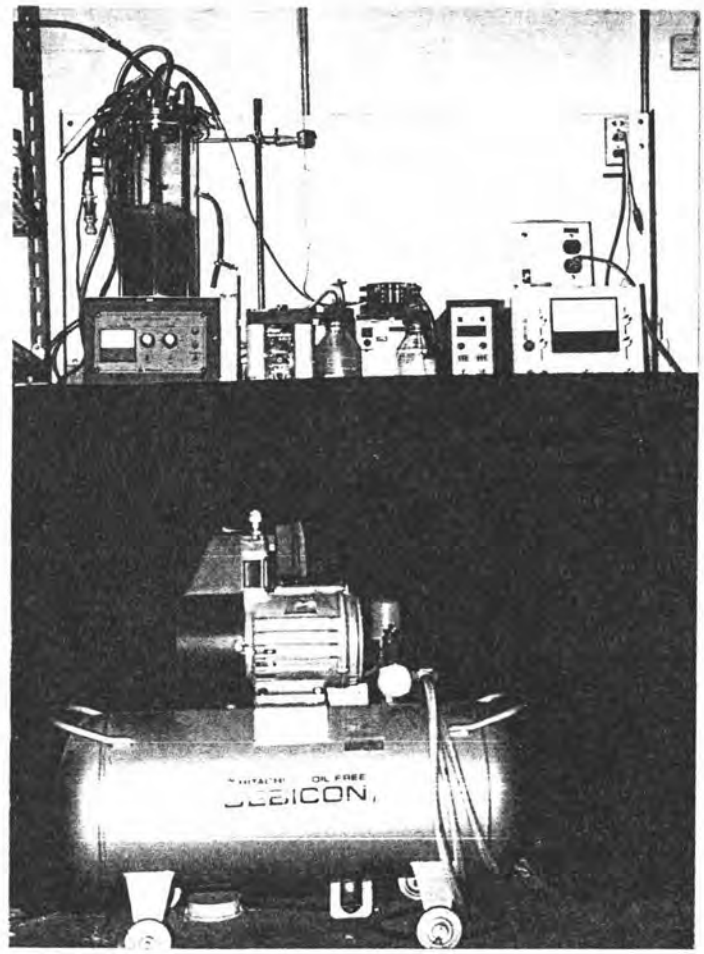
4.2.8 วิธีการหาปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

ใช้วิธีของ Siddiqui และคณะ (Siddiqui, 1992) เป็นการวัดปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตในรูปของกรดโครโตนิก (Crotonic acid) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด μ Bondapax $C_{18}$ ตรวจวัดด้วยความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร วัฏภาคไหลที่ใช้คือ อะซิโตรไนไทรล์เข้มข้น 1.5 เปอร์เซนต์ในกรดฟอสฟอริก 20 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 2.9 และใช้สารละลายกรดโครโตนิกเป็นสารละลายมาตรฐาน มีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้คือ

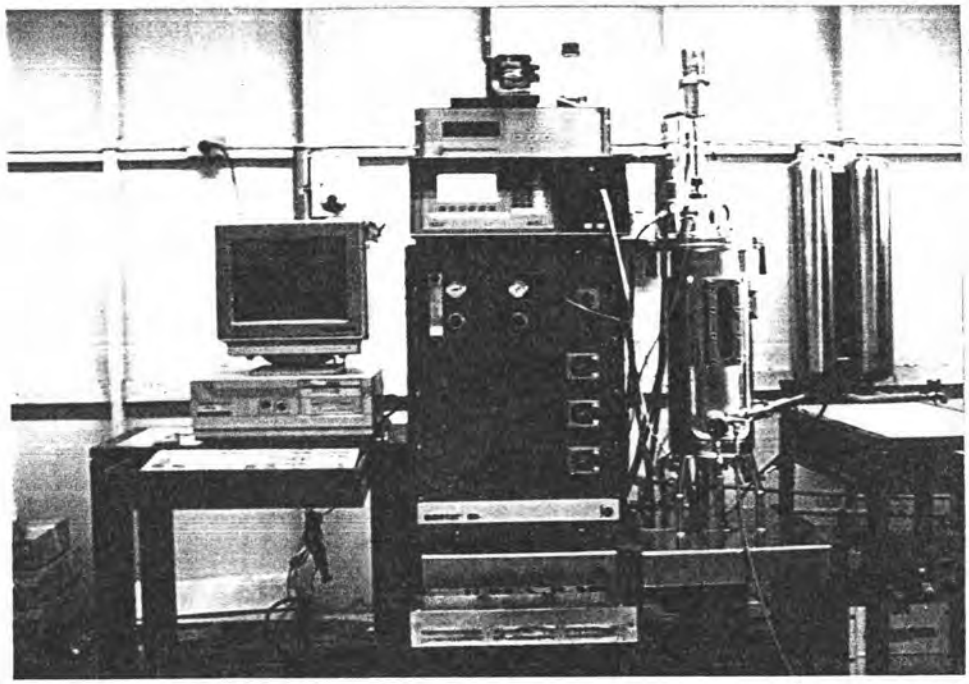
1. นำน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร เข้าตู้อบจนแห้งสนิท จากนั้นนำไปย่อยสลายเซลล์ โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 4.4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปย่อยเซลล์ในอ่างน้ำรักษาอุณหภูมิ ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. นำไปล้างออกด้วยน้ำปราศจากเกลือแร่ (DI Water) 2 ครั้ง จากนั้นล้างอีกด้วยเอธานอลบริสุทธิ์เพื่อตกตะกอนพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และล้างเอาองค์ประกอบที่เป็นไขมันออก จากนั้นนำไปอบแห้งในตู้อบ ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 80 องศาเซลเซียส
3. นำไปทำปฏิกริยากับกรดซัลฟุริกเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เพื่อเปลี่ยนพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซี

บิวทิเรตให้เป็นกรดโครโตนิก (Crotonic acid) จากนั้นทำให้เย็นลงทันที เจือจางด้วยน้ำปราศจากเกลือแร่จากนั้นปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 2.9

นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์แบบ HPLC ควบคุมให้วัฏภาคไหลไหลด้วยอัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที หาปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยดูจากพื้นที่ใต้กราฟ




รูปที่ 4.5 ภาพถ่ายแสดงการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตในถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่องในถังหมักขนาด 3 ลิตร



รูปที่ 4.6 ภาพถ่ายแสดงการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตในถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่องในถังหมักขนาด 10 ลิตร