

## บทที่ 4

### อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

#### 4.1 เคมีภัณฑ์

- 4.1.1 ไดโปรตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) ของบริษัท AJAX
- 4.1.2 โปรตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) ของบริษัท MERCK
- 4.1.3 แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ) ของบริษัท AJAX
- 4.1.4 เฟอรัสซัลเฟต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ของบริษัท AJAX
- 4.1.5 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท AJAX
- 4.1.6 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Eka Nobel
- 4.1.7 น้ำตาลกลูโคส (D(+)) Glucose anhydrous) ของบริษัท Fluka
- 4.1.8 Yeast Extract ของบริษัท GIBCO
- 4.1.9 น้ำก่่าจัดแร่ธาตุ (demineral water)

#### 4.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในการกรอง คือ Clostridium acetobutylicum ATCC 824 เก็บในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

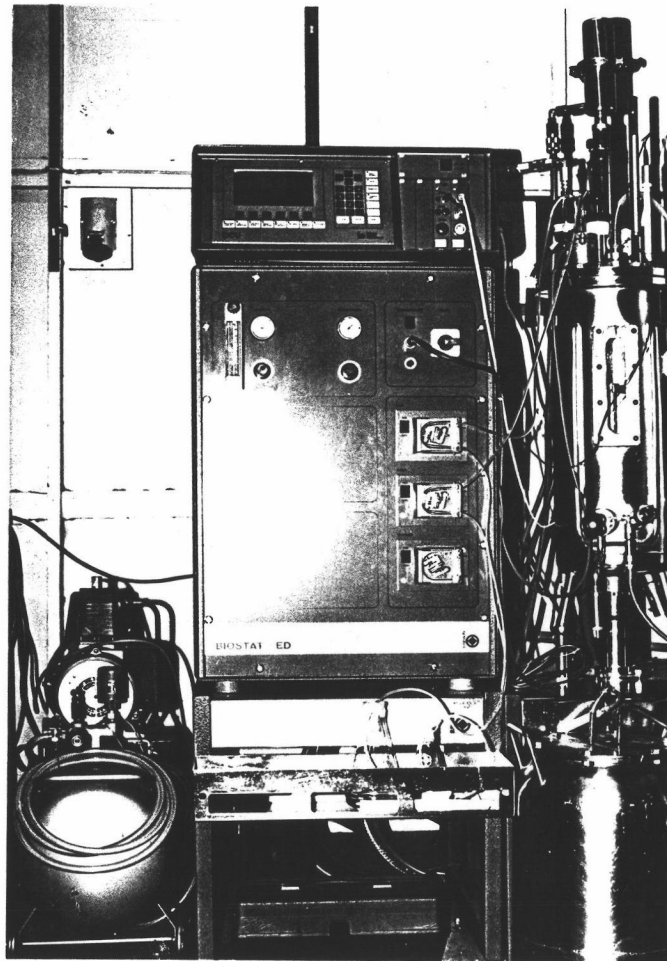
#### 4.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

##### 4.3.1 กระบวนการหมัก (Fermentation)

4.3.1.1 ถังหมัก (Fermentor) ของบริษัท B.Braun ขนาดปริมาตร 15 ลิตร ประกอบด้วยเครื่องควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ,เครื่องควบคุมอุณหภูมิ ,เครื่องควบคุมปริมาณฟอง และปั๊มป้อนสารแบบรีด(Peristaltic pump) จำนวน 3 ตัว ดังแสดงในรูปที่ 4.1

4.3.1.2 ถังเก็บสารป้อน ขนาด 10 ลิตร จำนวน 2 ถัง

4.3.1.3 หม้ออบความดันสูง (Autocave) ของบริษัท HIRAYAMA



รูปที่ 4.1 แสดงภาพของถังหมัก ขนาดปริมาตร 15 ลิตร

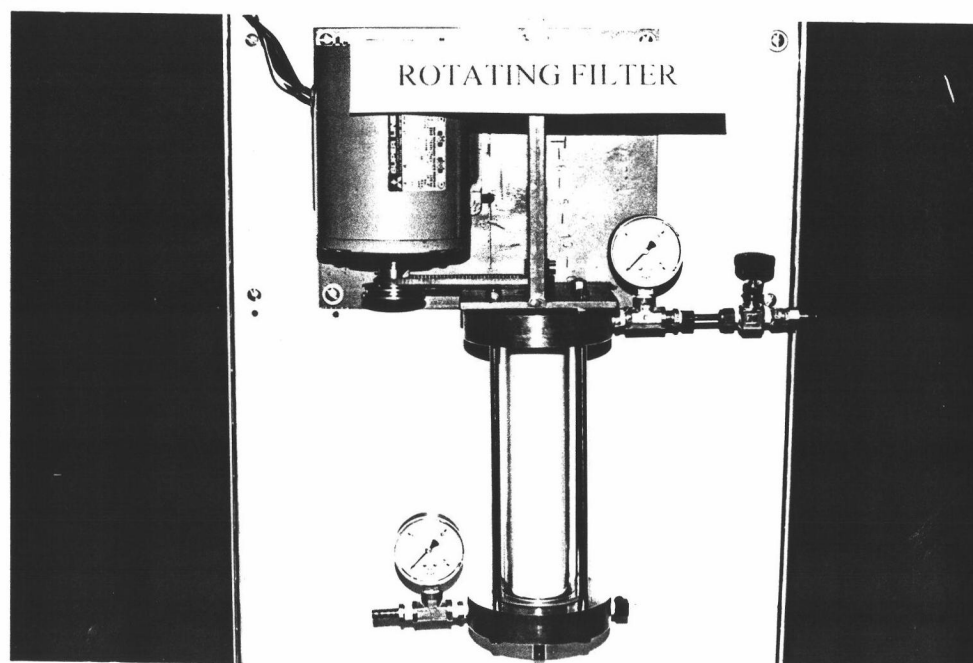
#### 4.3.2 กระบวนการกรอง (Filtration Unit)

4.3.2.1 เครื่องกรองชนิดหมุนได้ (Rotating Filter) ประกอบด้วยเยื่อแผ่นเซรามิกขนาด 0.2 ไมโครเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47.5 มิลลิเมตร ยาว 230 มิลลิเมตร มีพื้นที่ในการกรอง 341.72 ตารางเซนติเมตร ระยะระหว่างผนังเยื่อแผ่นด้านนอกกับผนังท่อด้านในสามารถปรับได้ 3 ค่า คือ 2.65 ,4.25 และ 5.60 มิลลิเมตร ใช้มอเตอร์ขนาด 1/4 แรงม้าของบริษัท MITSUBISHI ในการปรับทำให้เยื่อแผ่นหมุนและในการปรับหมุนความเร็วรอบ ติดตั้งเครื่องวัดความดันจำนวน 2 ตัวบริเวณด้านสารเข้าและด้านสารออก ดังแสดงในรูปที่ 4.2

4.3.2.2 บีบป้อนสารแบบรีด (Peristaltic Pump) ของบริษัท Masterflex ทำการทดลองที่อัตราการป้อนสาร 12 ลิตรต่อชั่วโมง

4.3.2.3 เกจวัดความดัน สเกลมีหน่วยเป็นปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทดลองที่ความดันขาเข้า 2,4,6,8 และ10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (0.136,0.272,0.408,0.544 และ 0.680 บาร์)

4.3.2.4 เครื่องกวนแม่เหล็ก(Magnetic Steerer) กวนสารด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.2 แสดงภาพเครื่องกรองชนิดหมุนได้

#### 4.4 วิธีการทดลอง

##### 4.4.1 การทดลองการหมัก

###### 4.4.1.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ถ่ายเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป่าก๊าซไนโตรเจนนาน 20 นาที เพื่อรักษาภาวะไร้อากาศ(anaerobic) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

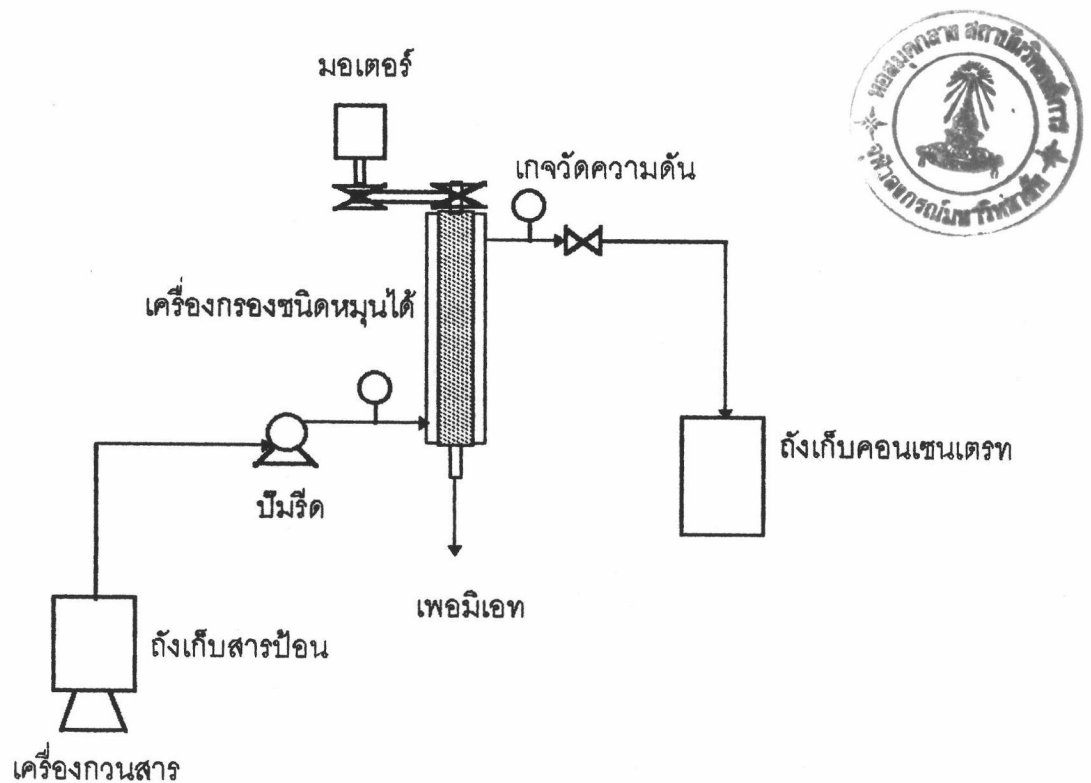
###### 4.4.1.2 กระบวนการหมัก

เตรียมสารอาหารปริมาตร 3 ลิตร ลงในถังหมักขนาด 15 ลิตร ทำให้ปลอดเชื้อด้วยไอน้ำร้อน (steam sterilization) เป่าก๊าซไนโตรเจนนาน 30 นาที จากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ลงในถังหมัก ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการกวนประมาณ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและความเข้มข้นของเซลล์ หลังจากสารอาหารที่วิเคราะห์มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเหลือประมาณ 10 กรัมต่อลิตร จึงเติมสารอาหารปริมาตร 8 ลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยใช้หม้ออบความดันสูง ทำการหมักจนกระทั่งความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเหลือประมาณ 10 กรัมต่อลิตร จึงทำการถ่ายเชื้อออกจากถังหมักจำนวน 8 ลิตร ด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic) เพื่อนำไปใช้ทดลองการกรอง หลังจากนั้นจึงเติมสารอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 8 ลิตร ลงในถังหมักเพื่อทำการหมักต่อไป

##### 4.4.2 การทดลองกระบวนการกรอง

นำเชื้อที่ได้จากการหมักเก็บในถังเก็บสารป้อน ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสาร เก็บตัวอย่างสารป้อนเริ่มต้นเพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นเริ่มต้น จากนั้นใช้ปั๊มรีดดูดสาร

ละลายผ่านสายยางซิลิโคนเข้าทางด้านล่างของเครื่องกรองชนิดหมุนได้ ด้วยอัตราการป้อนสาร 12 ลิตรต่อชั่วโมง รอจนสารละลายเต็มโมดูลจึงทำการปรับรอบมอเตอร์ และความดัน เพอมีเอทจะไหลออกทางด้านล่างของแท่งเซรามิก ทำการวัดปริมาตรเพอมีเอททุก 2 นาที และ เก็บตัวอย่างเพอมีเอทเพื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์ทุก 4 นาที ทำการทดลองเป็นเวลา 40 นาที หลังจากทำการทดลองทุกครั้ง ต้องนำเยื่อแผ่นเซรามิกแช่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เพื่อย่อยสลายเซลล์ที่เกาะบริเวณผิวเยื่อแผ่นออก และก่อนทำการทดลองครั้งต่อไปต้องทำการทดลองกรองน้ำ เปรียบเทียบกับค่าฟลักซ์มาตรฐานเพื่อตรวจสอบความสะอาดของผิวเยื่อแผ่นทุกครั้ง แผนภาพแสดงการกรองแบบไหลขนานกับเยื่อแผ่นโดยใช้เครื่องกรองชนิดหมุนได้แสดงดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 แสดงแผนภาพการทดลองการกรองแบบไหลขนานกับเยื่อแผ่นโดยใช้เครื่องกรองชนิดหมุนได้

#### 4.4.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์

ทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นเซลล์ของสารละลายเริ่มต้น เพอมีเอท และคอนเซนเตรท โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ของบริษัท MILTON ROY รุ่น SPECTRONIC 20 D ที่ความยาวคลื่นแสง 625 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นมาตรฐาน

#### 4.4.4 การวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์

ทำการวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ในสารละลายเพอมีเอท โดยใช้แผ่นนับเซลล์ (Haemocytometer) ของบริษัท BOECO กับ กล้องจุลทรรศน์ ของบริษัท OLYMPUS รุ่น BH-2 กำลังขยายสูงสุด 100 เท่า