

อัตราการป้อนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำมันปาล์มดิบโดย
Pseudomonas sp.A41 ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง



นางสาว พรชนก รัตนะรัต

สถาบันวิทยบริการ
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMAL FEED RATE FOR BIOSURFACTANT PRODUCTION FROM CRUDE PALM OIL
BY *Pseudomonas* sp.A41 IN FED BATCH FERMENTATION



Miss Pornchanok Rattanarat

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ อัตราการป้อนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
จากน้ำมันปาล์มดิบโดย *Pseudomonas* sp.A41 ในกระบวนการหมัก
แบบกึ่งต่อเนื่อง

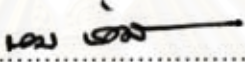
โดย นางสาว พรชนก รัตนะรัต

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

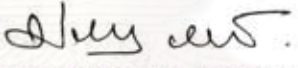
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สิริรุ่ง ปริธานนท์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรชัย อภรณ์วิชานพ

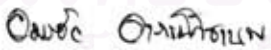
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้แก่นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

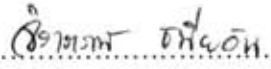

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. บุญสม เลิศนिरุญวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ ภาวสันต์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. สิริรุ่ง ปริธานนท์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรชัย อภรณ์วิชานพ)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เหมื่อนเดือน พิศาลพงศ์)

พรชนก รัตนะรัต : อัตราการป้อนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำมันปาล์มดิบโดย *Pseudomonas* sp.A41 ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (OPTIMAL FEED RATE FOR BIOSURFACTANT PRODUCTION FROM CRUDE PALM OIL BY *Pseudomonas* sp.A41 IN FED BATCH FERMENTATION)
 อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สิริรุ่ง ปริษานนท์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. อมรชัย อภรณ์วิชานพ,
 117 หน้า

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแบบจำลองที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 จากน้ำมันปาล์มดิบและหาอัตราการป้อนที่เหมาะสมสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

ในงานวิจัยนี้ทำการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 จากน้ำมันปาล์มดิบในขวดรูปชมพู่เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) เริ่มต้นเท่ากับ 5, 50, 100, 150 และ 200 โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มดิบคงที่ที่ 20 กรัมต่อลิตรแต่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตจะเปลี่ยนไปตามอัตราส่วน C/N มีค่าเท่ากับ 16.68, 1.66, 0.83, 0.55 และ 0.42 กรัมต่อลิตรตามลำดับ พบว่าที่อัตราส่วน C/N 50 ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 0.472 ต่อชั่วโมงและอัตราส่วน C/N 150 ให้ค่าอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุดเท่ากับ 0.204 กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะตาม

แบบจำลอง Andrews : $\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s + S^2/K_{si}}$ ซึ่งเกิดการยับยั้งการเติบโตเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียม

ซัลเฟตเริ่มต้นมีค่าสูง เมื่อนำแบบจำลอง Andrews มาศึกษาต่อเปรียบเทียบกับแบบจำลอง Logistic : $\mu = \mu_0 \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$ พบว่าแบบจำลอง Andrews สามารถอธิบายผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก

จุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ในขวดรูปชมพู่ตลอดการหมัก 48 ชั่วโมงได้ดีที่อัตราส่วนเริ่มต้น C/N 150 และ 200 ส่วนแบบจำลอง Logistic สามารถอธิบายผลได้ดีทุกอัตราส่วน C/N ตั้งแต่เริ่มต้น 5-200 แต่แบบจำลอง Logistic ไม่เหมาะกับการนำไปศึกษาในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเพราะเป็นแบบจำลองที่ไม่คำนึงผลของสารอาหารต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นจึงนำแบบจำลอง Andrews มาใช้ในการหาอัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสม โดยใช้ค่าพารามิเตอร์เฉลี่ยจากทุกอัตราส่วน C/N 5-200 พบว่าอัตราส่วน C/N ช่วงต้นในถังหมักมีค่าประมาณ 50-75 และช่วงหลังมีค่าประมาณ 120-1200 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง และทำให้ได้ค่าอัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุดเท่ากับ 0.53 และ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อผู้ผลิต..... พรมชนก รัตนะรัต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อ.พ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... อ.อมรชัย อภรณ์วิชานพ

4770368221 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD : BIOSURFACTANT / C/N RATIO / KINETIC MODEL / RHAMNOLIPID

PORNCHANOK RATTANARAT : OPTIMAL FEED RATE FOR BIOSURFACTANT PRODUCTION FROM CRUDE PALM OIL BY *Pseudomonas* sp.A41 IN FED BATCH FERMENTATION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SEEROONG PRICHANONT, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSIST. PROF. AMORNCHAI ARPORNWICHANOP, D.Eng., 117 pp.

The objectives of this research are to study suitable model for biosurfactant production of *Pseudomonas* sp.A41 from crude palm oil and to find the optimum feed rate for biosurfactant production in fed batch fermentation.

The cultivation of *Pseudomonas* sp.A41 from crude palm oil was performed in shake flask for 48 hours at varied initial carbon to nitrogen mole ratio at 5, 50, 100, 150 and 200. The crude palm oil concentration was fixed at 20 g/l while the ammonium sulphate concentration was varied to match the specified C/N ratio. It was found that maximum specific growth rate of 0.472 h^{-1} was obtained at C/N ratio of 50 and the maximum biosurfactant production of 0.204 gP/gcell/h was obtained at C/N ratio of 150. Furthermore, the initial ammonium sulphate concentration was found to affect specific growth rate according to Andrews model : $\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s + S^2/K_{si}}$. Compared between Andrews and Logistic models : $\mu = \mu_0 \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$, Andrews model can provided good prediction at C/N ratio of 150 and 200, while Logistic model was better at C/N ratio of 5-200. The Logistic model was not appropriate to use in fed batch fermentation process because the cell growth in these model was substrate independent. Therefore Andrews model was used to determine the optimum feed of the ammonium sulphate and crude palm oil. The parameters used in Andrews model were obtained from average fitting at C/N 5-200. C/N ratio was obtained in the first stage of 50-75 and the second stage of 120-1200 with supported the experiment. The maximum cell production rate and the maximum biosurfactant production rate were at 0.53 and 0.23 g/l/h respectively.

Department Chemical Engineering
Field of study Chemical Engineering
Academic year 2007

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co- advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายๆท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สิริรุ่ง ปริษานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรชัย อภรณ์วิชานพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำงานและพัฒนางานวิจัยตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ ภาวนันต์ รองศาสตราจารย์ ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ ที่ได้กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน ที่ได้อนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ในการทดลองและได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอบพระคุณ อาจารย์ทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาในการทำงานวิจัย

ขอบพระคุณ พี่หมุด พี่ลักษณ์ พี่ปิ น้องแป้ม พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการ วิศวกรรมชีวเคมีที่ได้ให้คำแนะนำต่างๆ ที่ดีและช่วยเหลือในการทำงานวิจัย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และพี่สำหรับกำลังใจและให้ความสนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์.....	ฒ
บทที่	

1	บทนำ.....	1
1.1	มูลเหตุจูงใจ.....	1
1.2	วัตถุประสงค์.....	2
1.3	ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	4
2.2	ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	8
2.3	แบบจำลองคณิตศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์.....	13
2.4	เทคนิคควบคุมการปนเปื้อนสารอาหารในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง.....	22
3	ทฤษฎี.....	27
3.1	กระบวนการหมัก.....	27
3.2	สมการสมดุลมวล.....	28
3.3	สมการอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ.....	33
3.4	วิธีเจเนเนติก.....	36
3.5	อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์.....	41
4	วิธีการทดลอง.....	47
4.1	อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์.....	47

บทที่	หน้า
4.2 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	49
4.3 การวิเคราะห์สารตัวอย่าง.....	50
4.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์.....	52
4.5 การคัดเลือกแบบจำลองสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการหาค่าพารามิเตอร์จากแบบจำลอง.....	55
4.6 การหาอัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	62
5 ผลการทดลอง.....	66
5.1 ผลการทดลองการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในขวดรูปชมพู่เขย่า.....	66
5.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์.....	73
5.3 ผลการเลือกแบบจำลองที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	77
5.4 ผลการหาอัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	92
6 สรุปผลการทดลอง.....	96
6.1 สรุปผลการทดลอง.....	96
6.2 ข้อเสนอแนะ.....	98
รายการอ้างอิง	99
ภาคผนวก.....	106
ภาคผนวก ก	107
ภาคผนวก ข	109
ภาคผนวก ค.....	114
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.	117

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	แบบจำลองการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....21
4.1	แบบจำลอง สมมติฐานของแบบจำลองและพารามิเตอร์ของแบบจำลอง การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ 8 แบบจำลอง.....54
4.2	ค่าขอบเขตบน ขอบเขตล่างและค่าเริ่มต้นจากการคาดเดาของ พารามิเตอร์แต่ละตัว.....55
4.3	แบบจำลองและพารามิเตอร์ของแบบจำลอง Andrews และแบบจำลอง Logistic....56
4.4	สรุปพารามิเตอร์ที่ต้องทำการประมาณค่าของสมการสมดุลมวลและแบบจำลอง แต่ละแบบจำลอง.....59
4.5	ค่าขอบเขตบนและขอบเขตล่างของพารามิเตอร์แต่ละตัว.....60
5.1	ความเข้มข้นของเซลล์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เวลาสุดท้ายของการหมัก คือ 48 ชั่วโมงที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นต่างๆ.....69
5.2	ผลการทดสอบแบบจำลอง ค่าพารามิเตอร์และค่าความผิดพลาดของ แบบจำลอง 8 แบบจำลอง.....74
5.3	ผลรวมของค่าความผิดพลาดกำลังสองจากการทดสอบแบบจำลอง Andrews และแบบจำลอง Logistic ที่นำไปใช้อธิบายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียมซัลเฟตและ น้ำมันปาล์มดิบตลอดช่วงการหมัก 48 ชั่วโมงในขวดรูปชมพู่ ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 5, 50, 100, 150 และ 200.....78
5.4	ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากแบบจำลอง Logistic และสมการสมดุลมวลในการ อธิบายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 การผลิตสาร ลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์ม ดิบตลอดช่วงการหมัก 0 – 48 ชั่วโมงในขวดรูปชมพู่ ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้น เท่ากับ 5, 50, 100, 150 และ 200.....85
5.5	ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากแบบจำลอง Andrews และสมการสมดุลมวลในการ อธิบายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 การผลิตสาร ลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์ม ดิบตลอดช่วงการหมัก 0 – 48 ชั่วโมงในขวดรูปชมพู่ ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้น เท่ากับ 5, 50, 100, 150 และ 200.....91

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
5.6 ผลเปรียบเทียบอัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยของเลิศลักษณ์ (2546).....	95
ข.1 แสดงการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่า ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 5.....	109
ข.2 แสดงการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่า ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50.....	110
ข.3 แสดงการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่า ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 100.....	111
ข.4 แสดงการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่า ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150.....	112
ข.5 แสดงการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่า ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 200.....	113

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....4
2.2	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวกับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว.....5
2.3	ตัวอย่างโครงสร้างของแรมโนลิปิด 4 แบบที่ผลิตจาก <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...6
2.4	ความแตกต่างของแบบจำลองที่ใช้อธิบายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์.....15
2.5	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะกับความเข้มข้นของ สารอาหารตามแบบจำลอง Monod.....16
3.1	กระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง.....29
3.2	กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง.....31
3.3	ตัวอย่างการทำงานของตัวดำเนินการในวิถีเจนเนติก.....38
3.4	แผนผังการทำงานของวิถีเจนเนติก.....40
4.1	แผนผังขั้นตอนการหาค่าพารามิเตอร์จากวิถีเจนเนติก.....61
5.1	ผลของการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็น กรดต่างเริ่มต้น 7.5 ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50.....67
5.2	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln X$ กับเวลาของจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 7.5 ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50.....67
5.3	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ อัตราการใช้น้ำมันปาล์มดิบจำเพาะและอัตราการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจำเพาะ ที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 5-200 เมื่อ เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 7.5.....70
5.4	อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อเวลา (productivity) ที่อัตราส่วนโดย โมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 5-200 เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 7.5.....70

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่

หน้า

- 5.5 ผลได้ของเซลล์ต่อแอมโมเนียมซัลเฟต (Y_x/n) ค่าผลได้ของเซลล์ต่อน้ำมัน
ปาล์มดิบ (Y_x/oil) และค่าผลได้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อน้ำมันปาล์ม
ดิบ (Y_p/oil) เมื่อคิดที่เวลาสุดท้ายของการหมักที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่าง
คาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 5-200 เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์
Pseudomonas sp.A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที
อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 7.5.....72
- 5.6 ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากทดลองและค่าอัตราการเจริญเติบโต
จำเพาะจากคำนวณจากแบบจำลอง 8 แบบจำลองที่ความเข้มข้นของ
แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.42, 0.55, 0.83, 1.66, 5.56, 8.34,
13.90, 16.68 และ 20.85 กรัมต่อลิตร.....76
- 5.7 ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากทดลองและค่าอัตราการเจริญเติบโต
จำเพาะจากคำนวณจากแบบจำลอง 3 แบบจำลองที่ความเข้มข้นของ
แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.42, 0.55, 0.83, 1.66, 5.56, 8.34,
13.90, 16.68 และ 20.85 กรัมต่อลิตร.....76
- 5.8 ผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากผลการทดลองกับค่าที่ได้จากการ
ทดสอบแบบจำลอง Logistic กรณีอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 5.....80
- 5.9 ผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากผลการทดลองกับค่าที่ได้จากการ
ทดสอบแบบจำลอง Logistic กรณีอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50.....81
- 5.10 ผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากผลการทดลองกับค่าที่ได้จากการ
ทดสอบแบบจำลอง Logistic กรณีอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 100.....82
- 5.11 ผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากผลการทดลองกับค่าที่ได้จากการ
ทดสอบแบบจำลอง Logistic กรณีอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150.....83
- 5.12 ผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากผลการทดลองกับค่าที่ได้จากการ
ทดสอบแบบจำลอง Logistic กรณีอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 200.....84
- 5.13 ผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากผลการทดลองกับค่าที่ได้จากการ
ทดสอบแบบจำลอง Andrews กรณีอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 5.....86

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่

หน้า

5.14	ผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากผลการทดลองกับค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง Andrews กรณีอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50.....	87
5.15	ผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากผลการทดลองกับค่าที่ได้จากผลการทดสอบแบบจำลอง Andrews กรณีอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 100.....	88
5.16	ผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากผลการทดลองกับค่าที่ได้จากผลการทดสอบแบบจำลอง Andrews กรณีอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150.....	89
5.17	ผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากผลการทดลองกับค่าที่ได้จากผลการทดสอบแบบจำลอง Andrews กรณีอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 200.....	90
5.18	ความเข้มข้นของเซลล์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แอมโมเนียมซัลเฟต น้ำมันปาล์มดิบที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาเมื่อป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบด้วยความเข้มข้นเท่ากับ 28.35 และ 300 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ตลอดทั้งช่วงการหมัก 30 ชั่วโมง.....	93
5.19	รูปแบบการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบด้วยความเข้มข้นเท่ากับ 28.35 และ 300 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ตลอดทั้งช่วงการหมัก 30 ชั่วโมง.....	93
ข.1	การเจริญเติบโต และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ที่อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 5.....	109
ข.2	การเจริญเติบโต และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ที่อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 50.....	110
ข.3	การเจริญเติบโต และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ที่อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 100.....	111
ข.4	การเจริญเติบโต และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ที่อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 150.....	112
ข.5	การเจริญเติบโต และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของจุลินทรีย์ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ที่อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 200.....	113

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ค.1 ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (crude biosurfactant) ในสารละลาย 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	114
ค.2 ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (crude biosurfactant) ในสารละลาย 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	115
ค.3 ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (crude biosurfactant) ในสารละลาย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	115
ค.4 ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (crude biosurfactant) ในสารละลาย 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	116
ค.5 ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (crude biosurfactant) ในสารละลาย 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	116

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์

F	=	อัตราการป้อน (ลิตรต่อชั่วโมง)
K_D	=	ค่าคงที่ของการแพร่ของสารอาหารในแบบจำลอง Mason และ Milles (1976)
k_d	=	อัตราการตายจำเพาะของเซลล์ (ต่อชั่วโมง)
K_i	=	ค่าคงที่ของการเกิดการยับยั้งจากสารอาหารในแบบจำลอง Aiba (กรัมต่อลิตร)
K_S	=	ความเข้มข้นของสารอาหาร ณ จุดที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (กรัมต่อลิตร)
K_{Si}	=	ค่าคงที่ของการเกิดการยับยั้งจากสารอาหารในแบบจำลอง Andrews (กรัมต่อลิตร)
n	=	ค่าคงที่ซึ่งปรากฏอยู่ในแบบจำลอง Moser (1958), Luong (1986) และ Levenspiel (1980)
m_N	=	อัตราการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตในการบำรุงรักษาเซลล์ (กรัมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง)
m_{oil}	=	อัตราใช้น้ำมันปาล์มดิบในการบำรุงรักษาเซลล์ (กรัมน้ำมันปาล์มดิบต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง)
N	=	ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)
N_F	=	ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในสายป้อน (กรัมต่อลิตร)
Oil	=	ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มดิบ (กรัมต่อลิตร)
Oil_F	=	ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มดิบในสายป้อน (กรัมต่อลิตร)
P	=	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์หรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)
P_F	=	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์หรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสายป้อน (กรัมต่อลิตร)
P_m	=	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สูงสุดที่ทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าเท่ากับศูนย์ (กรัมต่อลิตร)
P_0	=	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์หรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
q_P	=	อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์หรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง)
q_S	=	อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (กรัมสารอาหารต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง)
r_d	=	อัตราการตายของเซลล์ (กรัมเซลล์ต่อลิตรต่อชั่วโมง)

r_p	=	อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์หรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อลิตรต่อชั่วโมง)
r_s	=	อัตราการใช้สารอาหาร (กรัมสารอาหารต่อลิตรต่อชั่วโมง)
r_x	=	อัตราการผลิตเซลล์ (กรัมเซลล์ต่อลิตรต่อชั่วโมง)
S	=	ความเข้มข้นของสารอาหาร (กรัมต่อลิตร)
S_m	=	ความเข้มข้นของสารอาหารสูงสุดที่ทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าเท่ากับศูนย์ (กรัมต่อลิตร)
S_0	=	ความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
t	=	เวลา (ชั่วโมง)
V	=	ปริมาตรน้ำหมัก (ลิตร)
X	=	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
X_F	=	ความเข้มข้นของเซลล์ในสายป้อน (กรัมต่อลิตร)
X_m	=	ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่ทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าเท่ากับศูนย์ (กรัมต่อลิตร)
X_0	=	ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
$Y_{P/oil}$	=	ผลได้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำมันปาล์มดิบ (กรัมต่อกรัม)
$Y_{X/N}$	=	ผลได้ของเซลล์จากแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อกรัม)
$Y_{X/oil}$	=	ผลได้ของเซลล์จากน้ำมันปาล์มดิบ (กรัมต่อกรัม)

สัญลักษณ์กรีก

μ	=	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (ต่อชั่วโมง)
μ_0	=	อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อไม่มีการยับยั้งการเติบโตด้วยความเข้มข้นของเซลล์ (ต่อชั่วโมง)
μ_{max}	=	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดของเซลล์ (ต่อชั่วโมง)
α	=	ค่าคงที่ของการผลิตผลิตภัณฑ์ในช่วงที่เซลล์เจริญเติบโต (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมเซลล์)
β	=	ค่าคงที่ของการผลิตผลิตภัณฑ์ในช่วงที่เซลล์หยุดเจริญเติบโต (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง)

บทที่ 1

บทนำ

1.1 มุลเหตุจูงใจ

ในปัจจุบันมีการส่งเสริมการนำสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมาใช้ประโยชน์มากขึ้น เพราะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถย่อยสลายได้ง่ายตามธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำ สารตั้งต้นหาได้ง่ายราคาถูก และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลายเนื่องจากมีโครงสร้างประกอบด้วยทั้งส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ทำให้สามารถกระจายตัวอยู่ระหว่าง 2 ภูมิภาคที่มีขั้วแตกต่างกันได้ เช่น การนำสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมาเป็นสารเติมแต่งในอุตสาหกรรมอาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋อง ผลิตภัณฑ์อาหารประเภทนม เนยและนำไปเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ในเครื่องสำอาง เพราะสามารถเกิดอิมัลชันที่เสถียรได้ไม่ว่าจะเป็นอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำและอิมัลชันเชิงซ้อนตามแต่กลไกการเกิดอิมัลชัน (Kreilgaard, 2002) ซึ่งบริษัท Kao coparation จากประเทศญี่ปุ่นได้ทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพไซโฟโรลิปิดจาก *Torulopsis bombicola* KSM-36 เพื่อนำไปทำผลิตภัณฑ์ประเภทครีมบำรุงผิว (Kitamoto และคณะ, 2002) นอกจากนี้เรายังสามารถนำสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในรูปแบบอื่นได้อีก เช่น ยารักษาภายใน ยารักษาภายนอกและยารักษาโรคผิวหนัง การที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถจัดเรียงตัวได้ในลักษณะต่างๆ ทำให้ใช้เป็นตัวนำในการส่งยาไปสู่เซลล์ที่ต้องการในอวัยวะหรือเนื้อเยื่อได้ โดยตัวยาคะกระจายในตัวนำหรือถูกบรรจุในถุงที่มีลักษณะล้อมรอบด้วยชั้นไขมันที่ภายในบรรจุตัวยาคือละลายน้ำได้ ทั้งนี้หากพัฒนาสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพซึ่งสามารถใช้เป็นตัวนำส่งยาให้มีขนาดเล็กลงระดับนาโนเมตรจะช่วยให้ตัวยาส่งไปยังตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง ควบคุมการปลดปล่อยยาในความเข้มข้นที่ต่ำแต่ยังมีประสิทธิภาพ และทำให้เกิดการสะสมของยาในตำแหน่งที่ไม่ต้องการได้ (Magnusson และคณะ, 2001)

แรมโนลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิปิดซึ่งส่วนมากผลิตได้จากแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp และ *Pseudomonas* sp มีค่าแรงตึงผิวอยู่ระหว่าง 25 -30 มิลลินิวตันต่อตารางเมตร (Desai และ Banet, 1997 และ Lang และ Wullbrandt, 1999) แรมโนลิปิดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายในทางการค้าทำให้เป็นที่ต้องการและมีการเพิ่มปริมาณการผลิต ในปัจจุบันบริษัท Jeneil Biosurfactant มีการผลิตแรมโนลิปิดชนิดต่างๆ ขึ้นแต่ราคาค่อนข้างสูง ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาระบบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.

A41 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.จิราภรณ์ ธนียวัน และคัดแยกโดยอารีย์ (2542) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ทำต่อจากอารีย์ (2542) ณรงค์ (2543) และเลิศลักษณ์ (2546) งานวิจัยของอารีย์ (2542) พบว่าเมื่อใช้น้ำมันปาล์มปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp. A41 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีกว่ากลูโคสและซูโครส และลดค่าแรงตึงผิวได้ 29 มิลลินิวตันต่อตารางเมตร ส่วนงานวิจัยของณรงค์ (2543) พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำมันปาล์มดิบโดย *Pseudomonas* sp. A41 ในกระบวนการหมักไม่ต่อเนื่องคือ ค่าความเป็นกรดต่าง 7.5 และความเร็วรอบใบกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาที แต่ยังให้ค่าอัตราผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพค่อนข้างต่ำ งานวิจัยของเลิศลักษณ์ (2546) จึงศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องโดยการเปลี่ยนอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้น (C/N) ให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่าเวลาในการเปลี่ยนอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50 ไปเป็นอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150 ที่เวลา 12 ชั่วโมงให้ค่าอัตราการผลิตเซลล์สูงสุดและให้ค่าอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใกล้เคียงกับเวลาในการเปลี่ยนอัตราส่วน C/N ที่ 6, 9 และ 15 ชั่วโมง ในส่วนของงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นหาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและหาอัตราการป้อนสารตั้งต้นที่เหมาะสมโดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสูงสุด โดยการพัฒนาระบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องบนโปรแกรม MATLAB เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อหาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำมันปาล์มดิบ โดย *Pseudomonas* sp. A41

1.2.2 เพื่อหาอัตราการป้อนสารตั้งต้นที่เหมาะสม โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสูงสุดในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ทำการทดลองในขวดรูปชมพู่เพื่อหาค่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) ที่เหมาะสม (C/N 5 - 200) สำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp. A41 และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำมันปาล์มดิบ

1.3.2 หาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมที่สามารถอธิบายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำมันปาล์มดิบ

1.3.3 พัฒนาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (fed batch fermentation)

1.3.4 หาอัตราการป้อนสารตั้งต้นที่เหมาะสม โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสูงที่สุดในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่พัฒนาขึ้นบนโปรแกรม MATLAB

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสม เพื่อเป็นแนวทางในการอธิบายพฤติกรรมของระบบสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำมันปาล์มดิบ

1.4.2 ทราบอัตราการป้อนสารตั้งต้นที่เหมาะสม ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับนำไปผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่องต่อไป

1.4.3 ช่วยเพิ่มคุณค่าน้ำมันปาล์ม เพราะสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

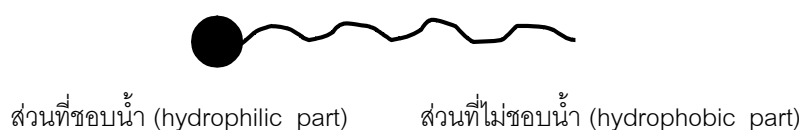
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

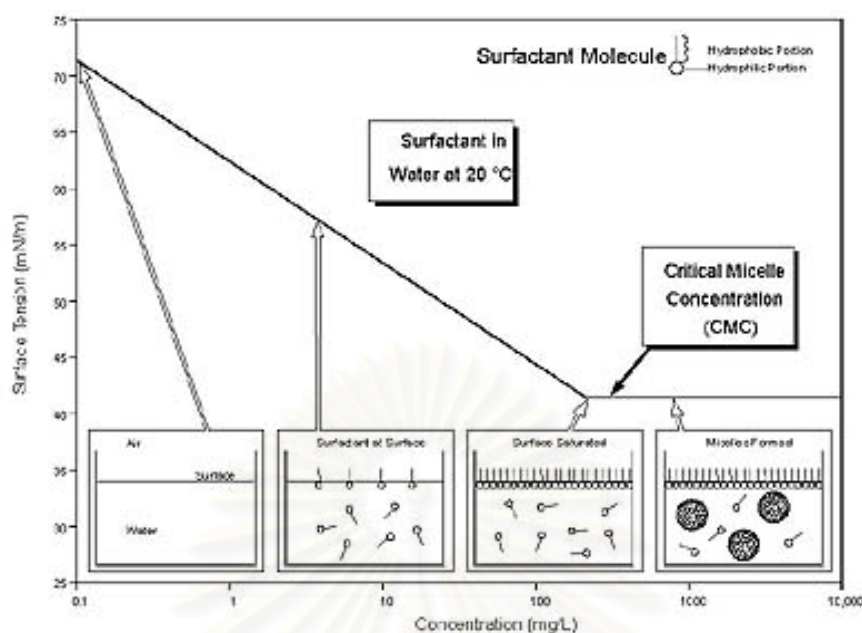
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactants) เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวซึ่งผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อีกด้วย

2.1.1 โครงสร้างทั่วไปและการจำแนกสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือสารประกอบที่มีโครงสร้างของโมเลกุลเป็นแบบแอมฟิพาติก ซึ่งผลิตได้จากจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรีย ยีสต์และรา มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวสัมผัสระหว่างวัฏภาคสองวัฏภาค ลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่มีขั้วหรือส่วนที่ชอบน้ำเรียกว่าไฮโดรฟิลิก (hydrophilic part) และส่วนที่ไม่มีขั้วหรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำเรียกว่าไฮโดรโฟบิก (hydrophobic part) ตามรูปที่ 2.1 ซึ่งมีหน้าที่ช่วยให้แรงตึงระหว่างผิวสัมผัสลดลง แรงตึงผิวที่ลดลงเนื่องมาจากในระบบนั้นมีโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวสะสมอยู่บริเวณผิวสัมผัส โดยโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนที่มีขั้วไปหาส่วนที่มีขั้ว และหันส่วนที่ไม่มีขั้วไปหาส่วนที่ไม่มีขั้ว และเมื่อมีโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวเพิ่มมากขึ้นหรือสารลดแรงตึงผิวมีความเข้มข้นมากขึ้น จะยิ่งทำให้แรงตึงระหว่างผิวสัมผัสต่ำลงเรื่อยๆ จนกระทั่งที่บริเวณผิวสัมผัสนั้นอิ่มตัวไปด้วยโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว โมเลกุลส่วนเกินที่ไม่สามารถแทรกเข้าไปอยู่บริเวณผิวสัมผัสได้จะกระจายตัวในน้ำมากขึ้นและรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ จุดที่เกิดการรวมตัวเป็นไมเซลล์นี้เรียกว่า จุดวิกฤติของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration, CMC) หรือจุดที่มีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวน้อยที่สุดที่ทำให้ค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด ตามรูปที่ 2.2 ณ จุดนี้ ถึงแม้ว่าจะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวมากขึ้น แต่ไม่ได้ทำให้แรงตึงระหว่างผิวสัมผัสลดลงได้อีก เพราะโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวที่รวมตัวเป็นไมเซลล์แล้วจะไม่มีบทบาทในการลดแรงตึงผิว



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



รูปที่ 2.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวกับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (Gilman, 1993)

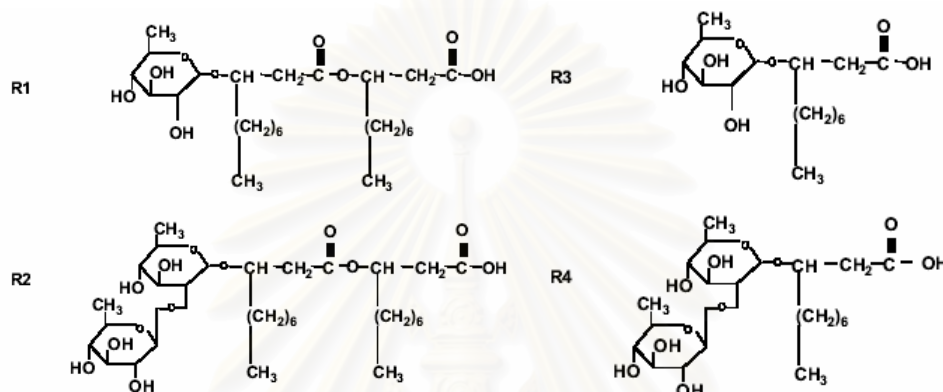
ค่าความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์หรือค่าซีเอ็มซี เป็นค่าคุณสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆ ซึ่งสามารถบอกถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวได้ เช่น ถ้าสารลดแรงตึงผิวมีค่าซีเอ็มซีต่ำ แสดงว่าใช้สารลดแรงตึงผิวปริมาณน้อยในการลดแรงตึงผิว แต่ถ้าสารลดแรงตึงผิวมีค่าซีเอ็มซีสูง แสดงว่าต้องใช้สารลดแรงตึงผิวปริมาณมากในการลดแรงตึงผิว

สำหรับการจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถจำแนกได้ตามโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งโครงสร้างทางเคมีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วและส่วนที่ไม่มีขั้ว สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จึงทำให้สามารถแบ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เป็น 5 ประเภท (Desai และ Banat, 1997) ได้แก่

- **ไกลโคลิปิด** (glycolipids) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส แมนโนส กาแลคโตส กรดกลูคูโรนิก แรมโนส และกาแลคโตสซัลเฟต เชื่อมต่อกับไขมัน เช่น กรดอะลิฟาติก และไฮดรอกซีอะลิฟาติก สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้รับความสนใจในกลุ่มนี้คือ แรมโนลิปิด ทรีฮาโรลิปิด และซีโฟโรลิปิด เป็นต้น

แรมโนลิปิด (rhamnolipids) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะโครงสร้างประกอบด้วยหนึ่งหรือสองโมเลกุลของน้ำตาลแรมโนส (rhamnose) เชื่อมต่อกับหนึ่งหรือสองโมเลกุลของกรดเบต้าไฮดรอกซีเดcanoic (β-hydroxydecanoic acid) ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตได้จาก

จุลินทรีย์จำพวก *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.* และ *Serratia rubidea* (Mulligan, 2005) รูปที่ 2.3 แสดงตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีแบบต่างๆ ของแรมโนลิปิด นอกจากนี้แรมโนลิปิดยังมีโครงสร้างแบบอื่นๆ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ผลิตแรมโนลิปิด องค์ประกอบและชนิดของสารอาหาร และสภาวะของระบบ เช่น ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ เป็นต้น



รูปที่ 2.3 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของแรมโนลิปิด 4 แบบที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* (Mulligan, 2005)

- **ไลโปเพพไทด์และไลโปโปรตีน** (lipopeptides and lipoproteins) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยสายโซ่ของโพลิเพพไทด์เชื่อมต่อกับไขมัน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้รับความสนใจในกลุ่มนี้คือ เซอร์แฟกติน ซัลโฟไลซิน เป็นต้น
- **กรดไขมัน ไขมันและฟอสโฟลิปิด** (fatty acids, neutral lipids and phospholipids) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยสารในกลุ่มแอลกอฮอล์เชื่อมต่อกับไขมันและฟอสเฟต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้รับความสนใจในกลุ่มนี้คือ ฟอสโฟลิปิด เป็นต้น
- **สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์** (polymeric biosurfactants) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยพวกโพลิแซคคาไรด์เชื่อมต่อกับกรดไขมัน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้รับความสนใจในกลุ่มนี้คือ อิมัลแซน ไลโปแซน แมนโนโปรตีน และสารประกอบเชิงซ้อนโปรตีนของโพลิแซคคาไรด์อื่นๆ เป็นต้น
- **สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค** (particulate biosurfactants) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้ประกอบด้วยโปรตีน ฟอสโฟลิปิด และไลโปโพลิแซคคาไรด์

2.1.2 ความสำคัญและประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ความต้องการในการใช้สารลดแรงตึงผิวในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมเกษตร เครื่องสำอาง อาหาร และปิโตรเคมี มีเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ แต่ในช่วง 10 – 20 ปีที่ผ่านมา อุตสาหกรรมต่างๆ หันมาใส่ใจสิ่งแวดล้อมมากขึ้นจึงเริ่มสนใจศึกษาการนำสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์หรือเรียกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ในอุตสาหกรรมแทนการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเป็นพิษต่ำ ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และสามารถผลิตได้จากสารตั้งต้นที่มีแหล่งทรัพยากรที่นำกลับมาใช้ใหม่และมีราคาถูก ทั้งยังมีโครงสร้างที่หลากหลายทำให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน แต่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีข้อจำกัดในด้านการผลิตและการเก็บเกี่ยวผลผลิตจึงทำให้มีราคาแพง ความสามารถในการแข่งขันจึงต่ำกว่าเมื่อเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ซึ่งมีราคาถูก ดังนั้นในหลายงานวิจัยจึงมีความพยายามที่จะศึกษาและทำความเข้าใจกระบวนการผลิตเพื่อช่วยลดต้นทุนโดยวิธีต่างๆ อาทิ เช่น การพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อเพิ่มผลผลิตของผลิตภัณฑ์ และการพัฒนากระบวนการผลิตและเลือกใช้สารตั้งต้นที่มีราคาต่ำเพื่อลดต้นทุนในการดำเนินงาน และจะต้องมีการจัดการกับผลพลอยได้ของผลิตภัณฑ์ให้เหลือน้อยที่สุดหรือเปลี่ยนให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาแพงกว่าเป็นของเสีย (Makkar และ Cameotra, 2002)

นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในหลายด้าน อาทิ (Banet และคณะ, 2000)

1. เป็นสารช่วยประสานและสารช่วยกระจาย นำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง สี และสารเติมแต่ง
2. เป็นสารช่วยละลายและสารก่อไมโครอิมัลชัน นำไปใช้ในอุตสาหกรรมยา สบู่ ยาสีฟัน
3. เป็นสารช่วยทำให้มีความเปียกชื้นและช่วยให้ซึมผ่าน นำไปใช้ในอุตสาหกรรมยา สิ่งทอ และสี
4. เป็นสารช่วยทำความสะอาด นำไปใช้ในอุตสาหกรรมในครัวเรือน และผลิตภัณฑ์การเกษตร
5. เป็นสารช่วยก่อฟอง นำไปใช้ในอุตสาหกรรมสบู่ ยาสีฟัน และเครื่องสำอาง
6. เป็นสารช่วยแยกโลหะหนัก นำไปใช้ในอุตสาหกรรมการทำเหมือง
7. เป็นสารช่วยลดความหนืด นำไปใช้ในลำเลียงขนส่งในท่อ
8. เป็นสารช่วยเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ นำไปใช้ในกระบวนการหมัก
9. สามารถจัดเรียงตัวเป็นไลโปโซมหรือเวสิคูล์ นำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและระบบนำส่งยา

โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอางและยา สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้าไปมีบทบาทมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาเป็นสารเติมแต่งในอุตสาหกรรมอาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋อง ผลิตภัณฑ์อาหารประเภทนม เนย และนำไปเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในเครื่องสำอาง เพราะสามารถเกิดอิมัลชันที่เสถียรได้ ไม่ว่าจะเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ และอิมัลชันเชิงซ้อนตามแต่กลไกการเกิดอิมัลชัน (Kreilgaard, 2002) บริษัท Kao coporation ประเทศญี่ปุ่นทำการผลิตสารโซโฟโรลิปิดจาก *Torulopsis bombicola* KSM-36 เพื่อนำไปเป็นส่วนผสมในการผลิตผลิตภัณฑ์ประเภทครีมบำรุงผิว (Kitamoto และคณะ, 2002) นอกจากนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบอื่นๆ ได้อีก เช่น ใช้เป็นตัวนำในการส่งยาไปสู่เซลล์ที่ต้องการในอวัยวะหรือเนื้อเยื่อได้ โดยตัวยาคะกระจายในตัวนำหรือถูกบรรจุในถุงที่มีลักษณะล้อมรอบด้วยชั้นไขมันที่ภายในบรรจุตัวยาที่ละลายน้ำได้ และหากสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพซึ่งสามารถใช้เป็นตัวนำส่งยาให้มีขนาดเล็กลงระดับนาโนเมตรจะช่วยให้ตัวยากถูกส่งไปยังตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง ควบคุมการปลดปล่อยยาในความเข้มข้นที่ต่ำแต่ยังมีประสิทธิภาพ และทำให้ไม่เกิดการสะสมของยาในตำแหน่งที่ไม่ต้องการได้ (Magnusson และคณะ, 2001)

2.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นอกเหนือจากชนิดสารของอาหารจะมีผลต่อโครงสร้างของแรมโนลิปิดแล้ว ชนิดของสารอาหารจากแต่ละแหล่ง เช่น ชนิดอาหารจากแหล่งคาร์บอน ชนิดอาหารจากแหล่งไนโตรเจน หรือจากแร่ธาตุต่างๆ ยังมีผลต่อการผลิตแรมโนลิปิดด้วย ส่วนปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลเช่นกัน ได้แก่ ปริมาณของแหล่งอาหารแต่ละชนิด ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง อุณหภูมิ และความเร็วรอบของไบกวน เป็นต้น

2.2.1 อิทธิพลจากแหล่งอาหารคาร์บอน

การเลือกสารอาหารแต่ละชนิดเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในกระบวนการหมัก นอกจากจะเลือกให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สายพันธุ์นั้นๆ และได้ผลผลิตที่ดีที่สุดตามต้องการแล้ว การคำนึงถึงการใช้สารอาหารที่มาจากธรรมชาติ หาได้ง่ายและราคาถูก เข้ามามีบทบาทมากขึ้นเพราะสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ Robert และคณะ (1989) ทำการศึกษามาจากการใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 พบว่าน้ำมันมะกอกให้ผลได้ของการผลิตแรมโนลิปิดเท่ากับ 38.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งดีกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ และพบว่าการใช้แหล่งคาร์บอน

ที่ต่างชนิดกันนอกจากส่งผลต่อปริมาณแรมโนลิปิดที่ผลิตได้ยังส่งผลกับชนิดของแรมโนลิปิดด้วย อารีย์ (2542) ศึกษาการเลี้ยง *Pseudomonas* sp. A41 ด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ กันได้แก่ กลูโคส ซูโครสและน้ำมันปาล์มดิบ พบว่าน้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดและปริมาณ น้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตรซึ่งสามารถลดแรงตึงผิวลงเหลือ 30 มิลลินิวตันต่อเมตร ส่วน Rahman และคณะ (2002) เลือกใช้น้ำมันที่มาจากพืช 2 ชนิดได้แก่ น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันจากต้นคำฝอย เปรียบเทียบกับการใช้กลีเซอรอลเพื่อเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* GS9-119 และ DS10-129 พบว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มมากขึ้นในช่วงที่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะพัก ซึ่งอาจเป็นเพราะแรมโนลิปิดเป็นผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ และการใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็น แหล่งคาร์บอนให้ค่าผลได้สูงที่สุด Costa และคณะ (2005) เลือกศึกษาน้ำมันที่มาจากพืช เช่นกันโดยเลือกพืชที่เป็นพันธุ์ท้องถิ่นในประเทศ พบว่าน้ำมันจากถั่วพันธุ์บราซิลสามารถผลิต แรมโนลิปิดได้สูงกว่าพืชชนิดอื่นและสามารถลดค่าแรงตึงผิวอยู่ในช่วง 29.8 – 31.5 มิลลินิวตัน ต่อเมตร ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันดอกทานตะวัน เห็นได้ว่าในหลาย งานวิจัยเลือกใช้น้ำมันที่ได้จากพืชมาเป็นแหล่งคาร์บอนเพราะสามารถผลิตแรมโนลิปิดได้ดี แต่ยังมีแหล่งคาร์บอนที่ได้จากของเสียในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ของเสียในอุตสาหกรรมอาหารซึ่ง สามารถผลิตแรมโนลิปิดได้เช่นกัน เพราะในของเสียต่างๆ ยังประกอบไปด้วยสารที่มีประโยชน์ เหลืออยู่ เช่น สารประกอบอินทรีย์และน้ำมันที่เหลือ เป็นต้น ทั้งยังช่วยลดปัญหาของเสียที่ทำให้ เกิดมลภาวะเป็นพิษได้อีกด้วย Benincasa และคณะ (2002) ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนหลาย ชนิดเพื่อใช้เลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* LBI มีทั้งน้ำมันจากพืช เช่น น้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง โอเลอิน และมาจากของเสีย เช่น soapstock ซึ่งเป็นของ เสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันดอกทานตะวัน และ soapstock ผสมน้ำเสีย พบว่า soapstock เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับผลิตแรมโนลิปิดและสามารถผลิตแรมโน ลิปิดได้สูงที่สุดถึง 12 กรัมต่อลิตร ส่วน Haba และคณะ (2000) ทำการศึกษาการผลิตสารลด แรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำมันมะกอกและน้ำมันดอกทานตะวันที่ใช้ทอดอาหารมาแล้ว เพราะ คำนึงถึงผลกระทบของสิ่งแวดล้อมที่มาจากปัญหาของเสียและช่วยลดต้นทุนของการผลิตซึ่งเป็น สิ่งสำคัญสำหรับการแข่งขันกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสังเคราะห์ พบว่าทั้งน้ำมันมะกอกและ น้ำมันดอกทานตะวันที่ใช้ทอดอาหารมาแล้วสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี โดยมี จุลินทรีย์ 36 สายพันธุ์เจริญเติบโตและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Pseudomonas* สามารถแรมโนลิปิดได้และสามารถลดแรงตึงผิวอยู่ในช่วง 32 - 34 มิลลินิวตัน ต่อเมตร

ในการใช้สารอาหารจำพวกสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ อาจทำให้กระบวนการนำอาหารเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตทำได้ยากขึ้นเนื่องจากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเหล่านั้นเป็นสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำ จึงมีงานวิจัยต่างๆ ที่ได้ทำการเสนอกลไกการนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำเข้าสู่เซลล์ ซึ่งรายงานบางส่วนพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีส่วนช่วยทำให้เกิดการนำสารประเภทไฮโดรคาร์บอนที่ละลายน้ำได้ยากเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น โดยสามารถสรุปกลไกการนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์กว้างๆ ได้เป็น 3 กลไกดังนี้ (Sekelsky และ Shreve, 1998)

1. โมเลกุลของสารไฮโดรคาร์บอนจะถูกใช้จากส่วนที่ละลายอยู่ในชั้นน้ำหุ้ม
2. โมเลกุลของสารไฮโดรคาร์บอนจะถูกใช้จากการสัมผัสโดยตรงระหว่างเซลล์กับหยดเล็กๆ ของสารไฮโดรคาร์บอน โดยที่โมเลกุลของสารไฮโดรคาร์บอนต้องมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์
3. โมเลกุลของสารไฮโดรคาร์บอนจะถูกนำผ่านเซลล์ โดยที่สารไฮโดรคาร์บอนนั้นอยู่ในสถานะเสมือนถูกละลายหรืออยู่ในรูปไมเซลล์

สำหรับในงานวิจัยนี้ใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำจึงไม่อาจใช้กลไกแบบที่หนึ่งอธิบายได้ แต่เนื่องจาก *Pseudomonas* sp. A41 เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาภายนอกเซลล์ได้ (อารีย์, 2542) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตออกมาอาจจะช่วยในการยึดเกาะของจุลินทรีย์ที่รวมตัวกันเกาะล้อมรอบบนหยดน้ำมัน จากนั้นก็จะนำหยดน้ำมันผ่านเข้าสู่เซลล์ซึ่งเป็นลักษณะกลไกแบบที่สอง หรือโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตออกมาอาจจะรวมตัวกับโมเลกุลของน้ำมันในรูปของไมเซลล์ซึ่งสามารถขนย้ายสารไฮโดรคาร์บอนผ่านช่องผนังเซลล์ได้ เป็นลักษณะกลไกแบบที่สาม หรืออาจจะอธิบายด้วยกลไกแบบที่สองและแบบที่สามผสมกันก็ได้

2.2.2 อิทธิพลจากแหล่งอาหารไนโตรเจน

สำหรับการเลือกสารอาหารเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์จำพวกไนเตรท เช่น โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท เพราะสามารถทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดี ส่วนปริมาณของแหล่งไนโตรเจนก็ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพราะแรมโนลิปิดสามารถผลิตได้ดีในช่วงที่มีไนโตรเจนจำกัด Santa และคณะ (2002) ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตแรมโนลิปิด พบว่าโซเดียมไนเตรทสามารถผลิตแรมโนลิปิดได้ดีกว่าแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย โดยมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์สูงที่สุดเท่ากับ

0.8 กรัมต่อกรัม เลิศลักษณ์ (2546) ทำการทดลองเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 และศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตเหมาะสมสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากกว่าแอมโมเนียมไนเตรท ส่วน Jeong และคณะ (2004) ทำการตรึงเซลล์ *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 ด้วยเม็ดโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ และศึกษาผลของปริมาณโซเดียมไนเตรท โดยแบ่งเป็น 4 กรณีคือ ไม่มีการเติมโซเดียมไนเตรทและเติมโซเดียมไนเตรทปริมาณ 0.002, 0.04 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าแรมโนลิปิดสามารถผลิตได้สูงที่สุดที่ปริมาณโซเดียมไนเตรทเท่ากับ 0.04 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่วนที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทต่ำ จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้น้อยทำให้แรมโนลิปิดที่ผลิตได้มีปริมาณต่ำลงไปด้วย และที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทสูง จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าแต่ก็ไม่ส่งผลให้มีการผลิตแรมโนลิปิดได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่กล่าวถึงการนำของเสียมาใช้เป็นแหล่งสารอาหาร แม้ว่าของเสียบางประเภทจะยังประกอบด้วยสารประกอบไนโตรเจน กรดอินทรีย์ น้ำตาล น้ำมันที่เหลือและแร่ธาตุเหลืออยู่ แต่ก็อาจมีไม่เพียงพอกับความต้องการของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเจริญเติบโต เช่น olive oil mill effluent หรือ OOME เป็นน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันมะกอก ซึ่ง Mercade และคณะ (1993) ศึกษาการนำ OOME มาใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อเลี้ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ พบว่าถึงแม้ OOME จะมีแร่ธาตุสูงแต่ก็มีไนโตรเจนไม่เพียงพอจึงมีการศึกษาการเติมโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2.5, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงที่สุดโดยดูจากค่าแรงตึงผิวที่ลดลงมากที่สุดจาก 42 มิลลินิวตันต่อเมตร ลดลงเหลือ 30 มิลลินิวตันต่อเมตร ส่วน Babu และคณะ (1996) ทำการศึกษาการใช้ของเสีย 2 ชนิดคือ distillery waste และ whey waste มาเป็นแหล่งสารอาหารเปรียบเทียบกับอาหารสังเคราะห์ที่มาจากกลูโคสและโซเดียมไนเตรทเพื่อเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* BS2 พบว่าของเสียทั้ง 2 ชนิดเหมาะสำหรับใช้เป็นแหล่งอาหารในการผลิตแรมโนลิปิดมากกว่าอาหารสังเคราะห์ โดยที่ distillery waste มีค่าอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะเท่ากับ 0.009 ต่อชั่วโมงซึ่งสูงกว่า whey waste แต่ whey waste มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงกว่า distillery waste ที่เป็นเช่นนั้นเพราะ whey waste มีไนโตรเจนอยู่ปริมาณมากกว่าจึงทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดีกว่าแต่ก็ทำให้ผลิตแรมโนลิปิดได้น้อยกว่า ในขณะที่ distillery waste มีไนโตรเจนปริมาณน้อยกว่าจึงอยู่ในสภาวะไนโตรเจนจำกัดซึ่งเป็นสภาวะที่สามารถผลิตแรมโนลิปิดได้ดี ทำให้สามารถผลิตแรมโนลิปิดได้มากกว่า

2.2.3 อิทธิพลจากแหล่งอาหารคาร์บอนและแหล่งอาหารไนโตรเจน

อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็นอีกตัวแปรหนึ่งที่มีศึกษาเพราะสามารถบ่งถึงปริมาณที่เหมาะสมของคาร์บอนและไนโตรเจนเพื่อใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ Santa และคณะ (2002) ศึกษาหาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตแรมโนลิปิดจากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* PA1 โดยทำการเปลี่ยนความเข้มข้นของกลีเซอรอลและความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีค่าคงที่ จึงได้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 8 ค่า ได้แก่ 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 และ 120 พบว่าค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์มีค่าสูงขึ้นตามอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นและมีค่าสูงที่สุดที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60 มีค่าเท่ากับ 0.13 กรัมต่อกรัม แต่ที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนมากกว่า 60 ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์กลับลดลงตามอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะผลจากการเกิดการยับยั้งของเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย เช่น การขนย้ายสารอาหารเข้าสู่เซลล์ทำได้ยากขึ้นเพราะกลีเซอรอลมีความเข้มข้นสูงขึ้น ส่วน Manresa และคณะ (1991) ทำการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์สูงที่สุดที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 6.6 และแรมโนลิปิดที่ผลิตได้มีทั้งในช่วงที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตและระยะพัก โดยจะเริ่มผลิตเมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนมีค่าต่ำ Haba และคณะ (2000) ศึกษาการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 เพื่อผลิตแรมโนลิปิดเช่นกัน ซึ่งทำการทดลองเปลี่ยนความเข้มข้นของไนโตรเจนหลายๆ ค่าโดยความเข้มข้นของคาร์บอนคงที่ ทำให้ได้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ กัน พบว่าค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์มากที่สุดเท่ากับ 0.34 กรัมต่อกรัมที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 8 และแรมโนลิปิดสามารถผลิตได้ทั้งในช่วงที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตและระยะพัก

2.2.4 อิทธิพลจากอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่าง

จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่แตกต่างกัน ซึ่งหากจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้ได้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ไม่เป็นไปตามต้องการ Guerra Santos และคณะ (1986) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 32 – 34 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิสูงขึ้นหรือต่ำกว่านี้จะส่งผลต่อการเปลี่ยน

แปลงเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ซึ่งทำให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลดลง และ Guerra Santos ยังศึกษาผลของค่าความเป็นกรดต่าง พบว่าค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.2 – 6.4 ถ้าค่าความเป็นกรดต่างสูงหรือต่ำกว่านี้จะทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ลดลง ณรงค์ (2543) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดต่างที่มีต่ออัตราการการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas* sp.A41 พบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.5 เหมาะสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและได้อัตราการการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 2.95 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมงต่อเมตร นอกจากนี้ค่าความเป็นกรดต่างจะมีอิทธิพลต่อความสามารถในการผลิตแรมโนลิปิด ยังมีผลต่อโครงสร้างและการรวมตัวของแรมโนลิปิดด้วย เพราะที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ กันแรมโนลิปิดจะรวมตัวได้แตกต่างกัน เช่น การรวมตัวเป็นไมเซลล์ หรือการรวมตัวเป็นทรงกลมผนังสองชั้น เป็นต้น ซึ่งจะส่งผลต่อการที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพรวมตัวกับแหล่งคาร์บอนเพื่อขนย้ายสารอาหารผ่านเซลล์และเข้าสู่เซลล์

2.2.5 อิทธิพลจากความเร็รรอบไบคอน

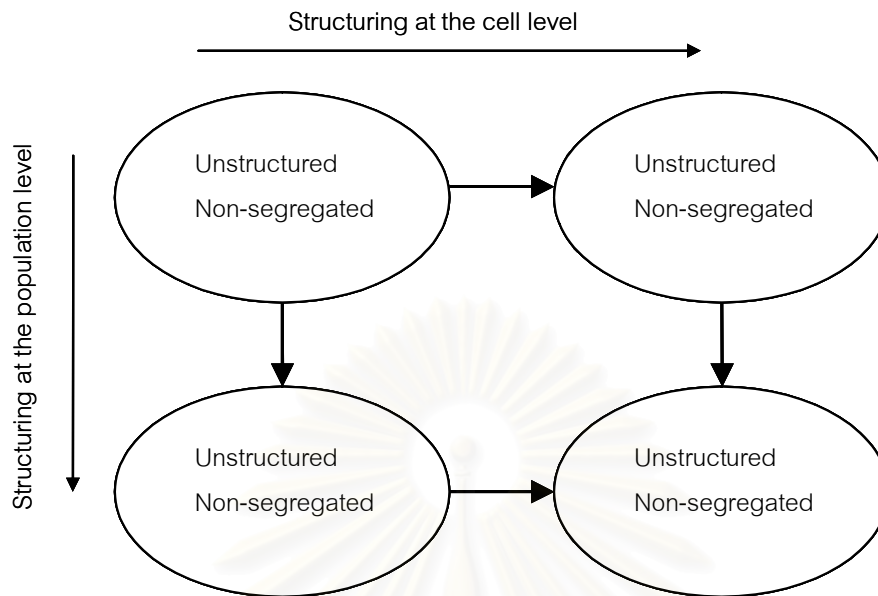
ไบคอนภายในถังหมักมีหน้าที่ช่วยเพิ่มพื้นที่สัมผัสระหว่างอากาศและแหล่งสารอาหารกับจุลินทรีย์ ถ้าแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสารอาหารไม่สามารถละลายในน้ำได้ เช่น น้ำมัน การกวนจะทำให้น้ำมันกระจายตัวอยู่ในชั้นน้ำมันมากขึ้นและช่วยลดขนาดของน้ำมัน แต่หากใช้ความเร็รรอบของการกวนไม่เหมาะสม เช่น ความเร็รรอบที่สูงเกินไปอาจทำให้เซลล์ถูกทำลาย Syldatk และ Wagner (1987) ทำการเพิ่มความเร็รรอบจาก 250 เป็น 500 รอบต่อนาที ทำให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวจาก *Nocardia erythropolis* มีค่าลดลงเนื่องมาจากแรงเฉือนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ส่วนณรงค์ (2543) ศึกษาผลของความเร็รรอบไบคอนจากการเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ด้วยน้ำมันปาล์มดิบ พบว่าความเร็รรอบไบคอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและไม่ทำลายเซลล์เท่ากับ 600 รอบต่อนาที

2.3 แบบจำลองคณิตศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การที่จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงที่สุดและพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อขยายขนาดจากระดับห้องปฏิบัติการไปสู่ระดับอุตสาหกรรม นอกเหนือจากการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพที่สามารถให้ผลผลิตที่ดีที่สุด การศึกษาถึงพฤติกรรมของ

จุลินทรีย์ในกระบวนการหมักและการศึกษาถึงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้ว การศึกษาการนำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มาใช้อธิบายพฤติกรรมต่างๆ ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมัก เช่น การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การลดลงของสารอาหาร การเกิดขึ้นของผลิตภัณฑ์ เป็นต้น ยังเป็นส่วนสำคัญเพราะทำให้ทราบถึงธรรมชาติของกระบวนการหมักและสามารถนำแบบจำลองคณิตศาสตร์ที่มีการเลียนแบบพฤติกรรมนั้นไปใช้ในการทำนายปรากฏการณ์ที่จะเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักในอนาคต ซึ่งจะมีประโยชน์ในออกแบบและปรับปรุงกระบวนการหมักเพื่อให้กระบวนการหมักเป็นไปตามทิศทางที่ต้องการ แต่แบบจำลองที่ใช้อธิบายพฤติกรรมของจุลินทรีย์มีความความซับซ้อนแตกต่างกันหลายระดับ แบบจำลองที่มีความซับซ้อนน้อยอาจจะอธิบายพฤติกรรมจริงของจุลินทรีย์ได้ไม่ดีเท่ากับแบบจำลองที่มีความซับซ้อนมาก แต่ก็มีความยุ่งยากในการคำนวณทางคณิตศาสตร์สูงเพราะมีพารามิเตอร์ในระบบหลายตัว ดังนั้นในการเลือกแบบจำลองใดไปใช้ขึ้นอยู่กับสมมติฐานที่ตั้งไว้และความเหมาะสมกับกระบวนการหมักนั้นๆ

แบบจำลองคณิตศาสตร์ที่มีความใกล้เคียงกับพฤติกรรมจริงของจุลินทรีย์คือแบบจำลองที่พิจารณาปฏิกิริยาทุกปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายในเซลล์แต่ละเซลล์และคำนึงการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์หนึ่ง แต่แบบจำลองลักษณะนี้ไม่เป็นที่ยอมรับเพราะมีความซับซ้อนมากยากต่อการคำนวณ แบบจำลองที่พัฒนาขึ้นส่วนใหญ่เป็นแบบจำลองที่มีการทำให้ง่ายลง สำหรับการแบ่งประเภทของแบบจำลองคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการอธิบายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก สามารถแบ่งได้ตามความซับซ้อนของแบบจำลองเป็น 4 ประเภทตามรูปที่ 2.4 โดยแบบจำลองที่มีความซับซ้อนน้อยที่สุดคือแบบจำลองที่ไม่คำนึงถึงโครงสร้างของเซลล์ (Unstructured model) และแบบจำลองที่ไม่แบ่งแยกชนิดของเซลล์ในระบบ (Non-segregated model) แบบจำลองประเภทนี้จะพิจารณาว่าเซลล์หนึ่งเซลล์มีองค์ประกอบเดียว ไม่คำนึงถึงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ประชากรเซลล์แต่ละเซลล์ที่อยู่ในระบบไม่มีความแตกต่างกัน มีคุณสมบัติและมีหน้าที่ในการทำงานเหมือนกันทุกประการ จึงสามารถใช้ตัวแปรเดียวแทนประชากรเซลล์ทั้งระบบได้ เช่น ความเข้มข้นรวมของเซลล์ (total biomass concentration) แต่ถ้าเป็นแบบจำลองที่มีการแบ่งแยกชนิดของเซลล์ (Segregated model) จะมีการแบ่งแยกและคำนึงถึงความแตกต่างของประชากรเซลล์ที่อยู่ในระบบ เช่น เซลล์ที่มีอายุน้อยจะทำหน้าที่การทำงานอย่างหนึ่ง และเซลล์ที่อายุมากจะมีหน้าที่การทำงานอีกอย่างหนึ่ง ส่วนแบบจำลองอีกประเภทหนึ่งคือแบบจำลองที่คำนึงถึงโครงสร้างของเซลล์ (Structured model) พิจารณาว่าในเซลล์หนึ่งเซลล์แบ่งเป็นหลายองค์ประกอบ เช่น ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ โปรตีน เป็นต้น และคำนึงถึงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ที่แต่ละองค์ประกอบนั้นด้วย



รูปที่ 2.4 แสดงความแตกต่างของแบบจำลองที่ใช้อธิบายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยความซับซ้อนของแต่ละแบบจำลองเรียงจากมุมซ้ายบนไปหามุมขวาล่าง (Ratledge และ Kristiansen, 2006)

2.3.1 แบบจำลองสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

ประเภทของแบบจำลองที่พัฒนาเพื่ออธิบายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่เป็นแบบจำลองที่ไม่คำนึงถึงโครงสร้างของเซลล์เพราะมีความซับซ้อนน้อยและง่ายต่อการเข้าใจ ซึ่งแต่ละแบบจำลองจะมีรูปแบบสมการที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสมมติฐานของแบบจำลองนั้น แบบจำลองที่ง่ายที่สุดที่มีการเสนอไว้คือแบบจำลองของ Malthus (1798)

$$r_x = \mu \cdot X \quad (2.1)$$

แบบจำลองของ Malthus เป็นแบบจำลองที่ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามเวลาที่เพิ่มขึ้น เพราะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป็นอิสระไม่ขึ้นกับสารอาหารที่มีอยู่ ไม่มีการคำนึงถึงผลของสารยับยั้งการเจริญเติบโตทั้งจากสารอาหาร ผลิตภัณฑ์และเซลล์ แต่ในความเป็นจริงอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีค่าจำกัด Verhulst (1844) และ Pearl และ Reed (1920) จึงเสนอแบบจำลองที่มีการเพิ่มเทอมที่คำนึงถึงผลของสารยับยั้งการเจริญเติบโตจากเซลล์ ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์จะถูกจำกัดเมื่อความเข้มข้นของเซลล์มีค่าสูงขึ้น

$$r_x = \mu_0 \cdot \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \cdot X \quad (2.2)$$

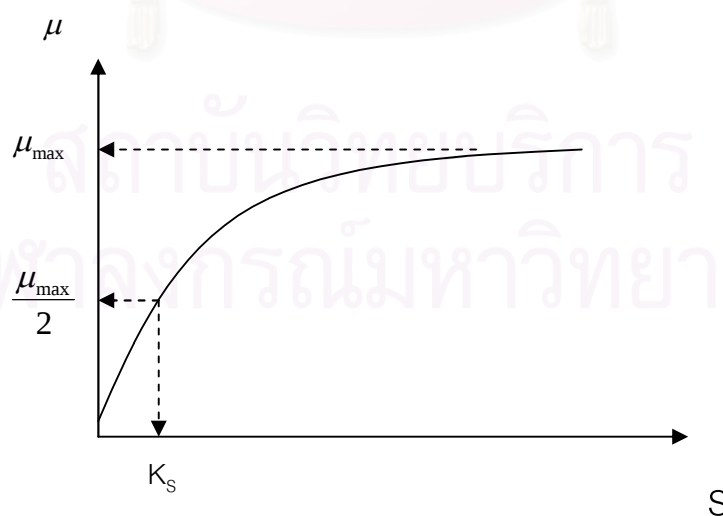
แบบจำลองนี้เป็นที่รู้จักกันในชื่อของแบบจำลอง logistic ซึ่งเป็นแบบจำลองหนึ่งที่มีการใช้อย่างกว้างขวาง เช่น ในระบบการหมักโพลีแซคคาไรด์ (Luong และ Mulchandani, 1987) และการผลิตไซโทโรลิปิดซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Ochoa และ Casas, 1999) แต่สำหรับแบบจำลองที่ได้รับความนิยมมากที่สุดและมีการใช้อย่างแพร่หลายคือ แบบจำลองของ Monod

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s} \quad (2.3)$$

แบบจำลองของ Monod (1942) เป็นแบบจำลองที่อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับสารอาหาร มีสมมติฐานว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับสารอาหารเพียงชนิดเดียว โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะกับความเข้มข้นของสารอาหารคือ เมื่อความเข้มข้นของสารอาหารต่ำๆ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารอาหารที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อสารอาหารมีความเข้มข้นสูงถึงค่าหนึ่งอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจะไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารอาหารอีกต่อไปตามรูปที่ 2.5 ทำให้สามารถเขียนในรูปสมการได้เป็น 2 รูปแบบดังนี้

$$\mu = \mu_{\max} \quad \text{เมื่อ } S \gg K_s$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max}}{K_s} \cdot S \quad \text{เมื่อ } S \ll K_s$$



รูปที่ 2.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะกับความเข้มข้นของสารอาหารตามแบบจำลองของ Monod

นอกเหนือจากแบบจำลองของ Monod ยังมีแบบจำลองอื่นๆ หลายแบบจำลองที่มีสารอาหารเพียงชนิดเดียวเป็นตัวกำหนดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เช่นเดียวกับแบบจำลองของ Monod แต่มีรูปแบบสมการต่างออกไป อาทิเช่น

แบบจำลองของ Teissier (1942)

$$\mu = \mu_{\max} (1 - e^{-S/K_S}) \quad (2.4)$$

แบบจำลองของ Moser (1958)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S^n}{K_S + S^n} \quad (2.5)$$

แบบจำลองของ Mason และ Milles (1976)

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_S + S} + K_D S \right) \quad (2.6)$$

แบบจำลองเหล่านี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับแบบจำลองของ Monod แต่จะมีการเพิ่มเทอมหรือพารามิเตอร์เข้าไปเพื่ออธิบายปรากฏการณ์อื่นที่เกิดขึ้น เช่น แบบจำลองของ Moser ใช้เมื่ออันดับการเกิดปฏิกิริยาของสารอาหารไม่ใช่อันดับหนึ่ง ส่วนแบบจำลองของ Mason และ Milles มีการเพิ่มพจน์ของแรงขับเคลื่อนเพื่ออธิบายการแพร่ของสารอาหารเข้าสู่เซลล์ และแบบจำลองของ Teissier เป็นแบบจำลองที่ได้มาจากผลการทดลองโดยไม่ได้อยู่บนพื้นฐานของกลไกทางชีววิทยา แต่อาศัยความสัมพันธ์ของสมการ $\frac{d\mu}{dS} = k(\mu_{\max} - \mu)^p$ เมื่อ $p = 1$ จะได้เป็นแบบจำลองของ Teissier

ในบางกรณีที่มีสารอาหารมากกว่าหนึ่งชนิดมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์ รูปแบบสมการจะมีความซับซ้อนมากขึ้นและยากที่จะแยกแยะว่าสารอาหารชนิดที่สองหรือสารอาหารที่เพิ่มเข้ามาเป็นสารอาหารที่จำเป็นจริงๆ ต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หรือเป็นสารอาหารที่เพียงช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตเท่านั้น สำหรับรูปแบบทั่วไปของแบบจำลองที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับสารอาหารที่จำเป็นหลายชนิดแบ่งเป็น 2 แบบ ได้แก่

แบบจำลองของสารอาหารที่จำเป็นหลายชนิดรวมกันแบบบวก (additive model)

$$\mu = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\mu_{\max_i} \cdot S_i}{K_{S_i} + S_i} \right) \quad (2.7)$$

แบบจำลองของสารอาหารที่จำเป็นหลายชนิดรวมกันแบบคูณ (multiplicative model)

$$\mu = \mu_{\max} \prod_{j=1}^n \left(\frac{S_j}{K_{S_j} + S_j} \right) \quad (2.8)$$

ส่วนแบบจำลองที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับสารอาหารหลายชนิด แต่สารอาหารเหล่านั้นแบ่งเป็น สารอาหารจำเป็นซึ่งเป็นสารอาหารหลักที่ขาดไม่ได้สำหรับการเจริญเติบโตและสารอาหารเสริมที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ Tsao และ Hanson (1975) ได้มีการเสนอแบบจำลองไว้คือ

$$\mu = \left(\mu_{\max,0} + \sum_{i=1}^n \frac{k_i \cdot S_{enh,i}}{K_{enh,i} + S_{enh,i}} \right) \left(\prod_{j=1}^m \frac{S_{ess,j}}{K_{ess,j} + S_{ess,j}} \right) \quad (2.9)$$

นอกจากนี้ยังมีแบบจำลองที่มีการคำนึงถึงผลของสารยับยั้งต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารอาหารผลิตภัณฑ์หรือเซลล์ในระบบมีค่าสูงๆ ซึ่งทำให้อัตราการเจริญเติบโตของจำเพาะจุลินทรีย์ นอกจากนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารอาหารยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารยับยั้งด้วย ตัวอย่างแบบจำลองที่มีสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ได้แก่

แบบจำลองที่มีสารอาหารเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

แบบจำลองของ Andrews (1968)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S + S^2/K_{Si}} \quad (2.10)$$

แบบจำลองของ Luong (1986)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S} \left(1 - \frac{S}{S_m} \right)^n \quad (2.11)$$

แบบจำลองของ Andrew และแบบจำลองของ Luong มีลักษณะแบบจำลองคล้ายกับแบบจำลองของ Monod แต่มีการเพิ่มเทอมของสารยับยั้งการเจริญเติบโตเข้าไป แบบจำลองของ Andrews เป็นแบบจำลองที่มีการเลียนแบบมาจากการเกิดสารยับยั้งในปฏิกิริยาของเอนไซม์ ส่วนแบบจำลองของ Luong เป็นแบบจำลองที่พัฒนามาจากแบบจำลองของ Levenspiel เพื่ออธิบายผลกระทบของความเข้มข้นชีวทานอลซึ่งเป็นสารอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตของยีสต์

แบบจำลองที่มีผลิตภัณฑ์เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

แบบจำลองของ Aiba และคณะ (1968)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \cdot e^{-P/K_i} \quad (2.12)$$

แบบจำลองของ Levenspiel (1980)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s} \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^n \quad (2.13)$$

แบบจำลองของ Aiba เป็นการศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นสารยับยั้งในการหมักแอลกอฮอล์ และแบบจำลองของ Levenspiel เป็นแบบจำลองที่ศึกษาผลของความเข้มข้นเอทานอลที่ผลิตออกมาในการหมักแอลกอฮอล์

แบบจำลองที่มีเซลล์เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

แบบจำลองของ Contois (1959)

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s X + S} \right) \quad (2.14)$$

แบบจำลองนี้มีการเพิ่มพารามิเตอร์คือความเข้มข้นของเซลล์ลงไปแบบจำลองของ Monod เพื่อแสดงการเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตเนื่องจากเซลล์ ในระบบที่มีความเข้มข้นของเซลล์สูงๆ จะทำให้เกิดความหนืดสูงจึงส่งผลกระทบต่อการแพร่ของสารอาหารเข้าสู่เซลล์

2.3.2 แบบจำลองสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ในรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่ามีการใช้แบบจำลองซึ่งประยุกต์มาจากแบบจำลองสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เพื่ออธิบายการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่มากนัก เช่น รายงานวิจัยของ Babu และคณะ (1996) ใช้แบบจำลองของ Monod ในการหาค่าจำเพาะทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas aeruginosa* BS2 โดยมีของเสียจากแหล่งอุตสาหกรรมและสารอาหารสังเคราะห์เป็นแหล่งคาร์บอน งานวิจัยของ Rodrigues และคณะ (2006) ใช้แบบจำลอง logistic ซึ่งเป็นแบบจำลองที่พิจารณาผลจากความเข้มข้นของของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกรณีที่มีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่าสูงๆ เพื่ออธิบายการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *Lactobacillus* สายพันธุ์ต่างๆ และงานวิจัยของ Ochoa และ Casas (1999) มีการใช้ค่าคงที่ (μ_p) เพื่ออธิบายการผลิตไซโฟโวลีปิดด้วย *Candida bombicola* จากกลูโคสและน้ำมันดอกทานตะวัน เพราะพิจารณาว่าน้ำมันดอกทานตะวันมีส่วนที่เป็นไขมันซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ จึงสมมติให้ความเข้มข้นของน้ำมันดอกทานตะวันมีค่าคงที่ที่ทุกช่วงเวลาและแทนด้วยค่า μ_p ส่วนงานวิจัยของ Sekelsky และ Shreve (1998) ศึกษาแบบจำลองของจุลินทรีย์ที่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาเพื่อช่วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งเป็นสารไม่ละลายน้ำเข้าสู่เซลล์ และงานวิจัยของ Levisauskas และคณะ (2004) เป็นการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Azotobacter vinelandii* 21 ด้วยกลูโคส ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง ซึ่งแบบจำลองการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามงานวิจัยที่ได้กล่าวถึงไปแสดงอยู่ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงแบบจำลองการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

ผลิตภัณฑ์	จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	สมการการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	เอกสารอ้างอิง
แรมโนลิปิด	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain BS2	synthetic medium distillery waste whey waste	$v = \frac{v_m \cdot S}{K_m \cdot S}$	Babu และคณะ, 1996
ไซโฟโรลิปิด	<i>Candida bombicola</i>	กลูโคส น้ำมันดอกทานตะวัน	$\frac{dC_p}{dt} = \mu_p C_s C_x$	Ochoa และ Casas, 1999
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	เฮกซะเดกเคน	$\frac{dB_{aq}}{dt} = \frac{k_B}{\Theta_w} X - \left(\frac{1}{MSR} \right) \frac{dC_{aq}}{dt}$	Sekelsky และ Shreve, 1999
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	<i>Azotobacter vinelandii</i> 21	กลูโคส	$\frac{dp}{dt} = q_p x - u \frac{p}{V}$	Levisauskas และคณะ, 2004
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus coryniform</i> <i>Lactobacillus pentosus</i>	กลูโคส	$\frac{dP}{dt} = P_r P \left(1 - \frac{P}{P_{max}} \right)$	Rodrigues และคณะ, 2006

โดยที่ C_p, B, p, P หมายถึง ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และ v หมายถึง อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.4 เทคนิคควบคุมการป้อนสารในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

การนำเทคนิคการควบคุมการป้อนสารในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่มีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มอัตราการผลิตของผลิตภัณฑ์ หรือป้องกันการเกิดสะสมของสารอาหารที่มากเกินไปซึ่งทำให้ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หรือการเกิดผลิตภัณฑ์ เทคนิคการป้อนสารสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ การป้อนโดยการควบคุมแบบย้อนกลับ (feedback control) และการป้อนโดยการควบคุมแบบไม่ย้อนกลับ (without feedback control)

- **การป้อนโดยการควบคุมแบบย้อนกลับ** เป็นการควบคุมอัตราการป้อนสารอาหารโดยใช้อุปกรณ์เครื่องมือวัดสัญญาณต่างๆ ที่ถูกส่งออกมาจากกระบวนการ จากนั้นจะส่งไปยังอุปกรณ์ควบคุมซึ่งทำหน้าที่เปรียบเทียบกับค่าที่ต้องการ ผลต่างของค่าที่วัดได้จะถูกส่งไปที่อุปกรณ์ควบคุมตัวสุดท้ายเพื่อปรับกระบวนการให้เป็นไปตามทิศทางที่ต้องการ ซึ่งการควบคุมแบบย้อนกลับนี้ยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีคือ

- การควบคุมแบบย้อนกลับโดยวิธีทางอ้อม ส่วนใหญ่วิธีนี้จะอาศัยการวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตและการใช้สารอาหารเพื่อใช้ในการเติมสารอาหาร เช่น การวัดค่าการละลายออกซิเจน (DO) จะสามารถบอกได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนเพิ่มขึ้นแสดงว่าปริมาณของสารอาหารเหลือน้อย หรือการวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) สามารถบอกได้ว่าเมื่อปริมาณแหล่งคาร์บอนถูกใช้หมด ค่าความเป็นกรดด่างก็จะสูงขึ้นเพราะความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่เซลล์ขับออกมา นอกจากนี้ยังมีการวัดความเข้มข้นของเซลล์โดยใช้เครื่องวัดความขุ่นและการวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ออกมา เป็นต้น
- การควบคุมแบบย้อนกลับโดยวิธีทางตรง วิธีนี้จะเป็นการวัดความเข้มข้นของแหล่งสารอาหารที่ใช้ โดยตรงเพื่อเติมสารอาหาร ซึ่งจะไม่มีการวัดผ่านพารามิเตอร์ตัวอื่นเหมือนวิธีทางอ้อม เช่น วัดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

- **การป้อนโดยการควบคุมแบบไม่ย้อนกลับ** เป็นการควบคุมอัตราการป้อนสารอาหารโดยมีการกำหนดค่าอัตราการป้อนไว้ล่วงหน้าเรียบร้อยแล้ว ซึ่งกำหนดค่านั้นได้มาจากการคำนวณโดยไม่ได้มีการวัดสัญญาณด้วยอุปกรณ์ควบคุมเพื่อปรับค่าเหมือนการควบคุมแบบย้อนกลับ สามารถแบ่งการควบคุมแบบไม่ย้อนกลับออกเป็น 2 วิธีคือ

- การป้อนสารด้วยอัตราคงที่ ซึ่งวิธีนี้จะส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง

- การป้อนสารด้วยอัตราไม่คงที่ การป้อนสารลักษณะนี้แบ่งได้เป็น 2 วิธีคือ การป้อนสารมีลักษณะแบบเชิงเส้น และการป้อนสารแบบทวีคูณซึ่งอัตราการป้อนเป็นแบบทวีคูณซึ่งวิธีนี้จะเป็นการควบคุมอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ให้มีค่าคงที่

2.4.1 ตัวอย่างการป้อนสารอาหารในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เทคนิคการควบคุมการป้อนสารแบบต่างๆ ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น Lee และคณะ (1999) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตของแรมโนลิปิดด้วยวิธีการควบคุมค่า pH ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยพิจารณาจากค่า pH ที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงการลดลงของแหล่งคาร์บอน กลูโคสซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* YPJ-80 ถูกป้อนเข้าไปด้วยความเข้มข้น 700 กรัมต่อลิตร พบว่าที่เวลา 53.5 ชั่วโมง จุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุดเท่ากับ 1.68 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงกว่าการผลิตในการหมักแบบไม่ต่อเนื่องเพียงเล็กน้อยสาเหตุมาจากการขาดแหล่งไนโตรเจนในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งสังเกตจากการที่จุลินทรีย์หยุดการเจริญเติบโตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 25 ดังนั้นจึงการเพิ่มแหล่งไนโตรเจนจากโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เป็นสารในการควบคุม pH ให้มีความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 นอร์มอล ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากขึ้นเท่ากับ 4.4 กรัมต่อลิตรที่เวลา 25 ชั่วโมง งานวิจัยของ Chen และคณะ (2007) ทำการศึกษาการหมัก *Pseudomonas aeruginosa* S2 ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเพื่อผลิตแรมโนลิปิดด้วยกลูโคส โดยทำการควบคุม pH ที่ 6.8 และทำการเปลี่ยนความเข้มข้นของกลูโคสในสายป้อน 3 ค่าได้แก่ 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ความเข้มข้นของกลูโคสในสายป้อนเท่ากับ 6 เปอร์เซ็นต์ให้ค่าความเข้มข้นของแรมโนลิปิดสูงที่สุดเท่ากับ 6.06 กรัมต่อลิตร จึงทำการทดลองต่อโดยใช้ความเข้มข้นของกลูโคสในสายป้อนเท่ากับ 6 เปอร์เซ็นต์และป้อนกลูโคสด้วยอัตราคงที่เท่ากับ 400 มิลลิลิตรต่อวัน พบว่าการป้อนกลูโคสด้วยอัตราคงที่ให้ค่าความเข้มข้นของแรมโนลิปิดสูงสุดที่ได้ต่ำกว่าการป้อนกลูโคสโดยมีการควบคุม pH ในงานวิจัยของ Kim และคณะ (2006) ทำการศึกษาการผลิต mannosylerythritol lipid ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิปิดผลิตจากจุลินทรีย์ *Candida sp.* SY16 โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนป้อนเข้าไปในช่วงที่มีการผลิตผลิตภัณฑ์ 2 ช่วง ช่วงแรกหลังจาก 50 ชั่วโมงของการหมักป้อนน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร และช่วงที่สองหลังจาก 100 ชั่วโมงป้อนน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 95 กรัมต่อลิตรที่เวลา 104 ชั่วโมงและยังสังเกตเห็นว่าเมื่อทำการป้อนน้ำมันถั่วเหลืองเข้าไปในช่วงหลังสามารถยับยั้ง

การเกิดโฟมได้ จึงทำการทดลองต่อโดยใช้ตัวเซ็นเซอร์ที่วัดการเกิดเกิดโฟมเป็นตัวกำหนดในการป้อนน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งปริมาณโฟมที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่ลดลง เมื่อมีโฟมเกิดขึ้นน้ำมันถั่วเหลืองจะถูกป้อนเข้าไปโดยอัตโนมัติ น้ำมันถั่วเหลืองถูกป้อนเข้าไปเป็นเวลา 78 ชั่วโมงของการหมักที่ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการหมักที่เวลา 200 ชั่วโมงพบว่าความเข้มข้นสุดท้ายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่าเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตรซึ่งต่ำกว่าการทดลองแบบแรก แต่ให้ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหารที่ป้อนเข้าไปสูงกว่าเล็กน้อย และงานวิจัยของ Levisauskas และคณะ (2004) ทำการศึกษาหาอัตราการป้อนสารอาหารตามสมการและแบบจำลองด้วยวิธีนิวรัลเน็ตเวิร์ด (neural network) เพื่อให้ได้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สูงที่สุด ซึ่งผลการทดลองพบว่าการป้อนสารอาหารตามที่คำนวณได้ตามวิธีนิวรัลเน็ตเวิร์ดจะให้ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีขึ้น 11 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับผลการทดลองที่ดีที่สุดที่เคยทำการศึกษาไว้ โดยสมการและแบบจำลองตามงานวิจัยนี้ที่เสนอไว้คือ

$$\text{แบบจำลอง : } \mu(S_1, X) = \mu_{\max} \frac{S_1}{k_x X + S_1 + \frac{S_1^2}{k_i}} - k_{xx} X$$

$$\text{สมการการผลิตเซลล์ : } \frac{dX}{dt} = \mu X - u \frac{X}{V}$$

$$\text{สมการการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ : } \frac{dp}{dt} = q_p X - u \frac{p}{V}$$

$$\text{สมการการใช้สารอาหาร : } \frac{dS_i}{dt} = -q_{s,i} X + u \frac{S_{i,f} - S_i}{V}$$

$$q_{s,1}(\mu) = \frac{1}{Y_{XS}} \mu + m$$

2.4.1 ตัวอย่างการป้อนสารอาหารในการผลิตสารชนิดอื่นๆ

สำหรับตัวอย่างงานวิจัยอื่นๆ ที่มีการใช้เทคนิคการป้อนสารในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องนอกเหนือจากการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แก่ งานวิจัยของ Li และคณะ (2004) ทำการศึกษการผลิตไลเปสในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องจาก *Acinetobacter radioresistens* โดยใช้ Tween 80 เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้เทคนิคการควบคุมวัด pH และ DO เพื่อเพิ่มอัตราการผลิตไลเปส พบว่าเมื่อทำการป้อนอากาศที่ 50%, 70% และ 90% ด้วยอัตราการป้อนคงที่หลังจากการหมักผ่านไป 6 ชั่วโมงจะสามารถหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

ที่อัตราป้อนอากาศต่างๆ ได้ในช่วง 0.274 - 0.716, 0.192 - 0.452 และ 0.016 - 0.095 ต่อชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำมาหาค่าผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อเซลล์พบว่าที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.1 ต่อชั่วโมงให้ค่าผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อเซลล์ ถ้าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าสูงหรือต่ำกว่านี้จะทำให้ค่าผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อเซลล์ลดลง จากนั้นจึงศึกษาการควบคุมค่า pH ที่ 6.9, 7.0 และ 7.1 ด้วยอัตราการป้อนแบบทวีคูณ ซึ่งสามารถหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่การควบคุมค่า pH ต่างๆ ได้เท่ากับ 0.162, 0.220, 0.288 ต่อชั่วโมงตามลำดับ และเมื่อนำค่ามาหาอัตราการผลิตไลเปส พบว่าที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.2 ต่อชั่วโมง ให้ค่าอัตราการผลิตไลเปสสูงที่สุด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Tashiro และคณะ (2004) ศึกษาการเพิ่มอัตราการผลิตบิวทานอลโดยผลิตจาก *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องโดยการควบคุมค่า pH ให้คงที่ ซึ่งการรักษาระดับค่าความเป็นกรดต่างให้มีความคงที่เนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นและลดลงของค่าความเป็นกรดต่างตลอดเวลา โดยจะศึกษาการป้อนอัตราส่วนความเข้มข้นของกรดบิวทริกต่อกลูโคสต่างๆ กันคือ 0.42, 0.80, 1.0, 1.5, 1.4 และ 1.6 โดยควบคุมค่า pH ที่ 5.1-5.4 เมื่อทำการป้อนหลังจาก 7-9 ชั่วโมงผ่านไปเพราะกลูโคสเริ่มลดลงอย่างเห็นได้ชัดและเป็นจุดที่ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง และพบว่าที่อัตราการป้อนกรดบิวทริกต่อกลูโคสเท่ากับ 1.4 ทำให้ได้ความเข้มข้นของบิวทานอลที่ผลิตได้มีค่าสูงสุดที่ 14 กรัมต่อลิตร ส่วนค่าผลได้ของบิวทานอลต่อเซลล์และค่าผลได้ของบิวทานอลต่อการใช้กลูโคสในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องมีค่าสูงกว่าค่าผลได้ของบิวทานอลต่อเซลล์และค่าผลได้ของบิวทานอลต่อการใช้กลูโคสในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องเท่ากับ 54% และ 72% ตามลำดับ

นอกจากนี้งานวิจัยของ Crolla และคณะ (2004) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดซิติคจาก *Candida lipolytica* ในกระบวนการหมักกึ่งต่อเนื่องโดยทำการศึกษาอัตราการป้อนสารอาหาร และศึกษาสภาวะการปั่นกวน์ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 400, 800, 1000 และ 1200 รอบต่อนาที ในตอนแรกทำการป้อน n-paraffin ด้วยอัตรา 1 ลิตรต่อวันทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน โดยป้อนหลังจาก 96 ชั่วโมงผ่านไปซึ่งเป็นช่วงของการผลิตผลิตภัณฑ์ พบว่าเมื่อทำการปั่นกวน์ด้วยความเร็วรอบที่เหมาะสมเท่ากับ 1000 รอบต่อนาที และป้อนสารอาหารที่อัตรา 1 ลิตรต่อวันไม่ทำให้อัตราการผลิตกรดซิติคเพิ่มมากขึ้น โดยความเข้มข้นของกรดซิติคสูงที่สุดเท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร จึงทำการศึกษาต่อโดยแบ่งอัตราการป้อนสารอาหารออกเป็น 3 ช่วงคือ ป้อนด้วยอัตรา 0.75, 1.0 และ 1.5 ลิตรต่อวันที่เวลา 96, 216 และ 336 ชั่วโมงตามลำดับ ทำการหมักเป็นเวลา 18 วัน พบว่ามีการผลิตกรดซิติคเพิ่มมากขึ้น โดยมีค่าความเข้มข้นของกรดซิติคสูงที่สุดอยู่

ในช่วง 30 - 40 กรัมต่อลิตร และมีความสามารถในการผลิต (productivity) กรดซิดิกเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนในงานวิจัย Lin และคณะ (2004) ต้องการเพิ่มการผลิต S-adenosyl-l-methionine (SAM) and glutathione (GSH) จากยีสต์ให้ได้ปริมาณสูงสุด โดยใช้กระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องในระยะแรกซึ่งใช้เวลาสั้น จากนั้นจะดำเนินการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องโดยทำการป้อนกลูโคสซึ่งเป็นสารอาหารแบบ 2 ขั้นตอน ในขั้นแรกจะทำการป้อนแบบทวีคูณมีจุดประสงค์เพื่อต้องการเพิ่มปริมาณเซลล์และต้องการลดการเกิดเอทานอล เพราะเอทานอลจะทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง ซึ่งพบว่าได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ SAM, GSH และเซลล์เท่ากับ 8.77, 0.81 และ 105 กรัมต่อลิตร ต่อมาในขั้นที่สองทำการป้อนสารอาหารด้วยอัตราคงที่ ซึ่งส่งผลให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์ SAM ต่อกลูโคสและผลได้ของผลิตภัณฑ์ GSH ต่อกลูโคสเพิ่มขึ้นจาก 0.039 และ 0.0035 กรัมต่อกรัมในขั้นแรกมาเป็น 0.048 และ 0.0038 กรัมต่อกรัม เนื่องจากสามารถกำจัดเอทานอลไม่ให้เกิดขึ้นได้ ส่วนงานวิจัยของ Shukla และคณะ (2005) ใช้เทคนิคกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิต (productivity) กรดกิบเบอเรลลิก (Gibberellic acid) จากรา *Gibberella fujikuroi* โดยใน 10 ชั่วโมงแรกจะเป็นการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อเข้าสู่ช่วงระยะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ 10-40 ชั่วโมงจะเริ่มป้อนกลูโคสที่ความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรทที่ความเข้มข้น 14.3 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการป้อน 0.005 ลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นหลังจาก 40 ชั่วโมงผ่านไปจะทำการเปลี่ยนความเข้มข้นในสายป้อนคือป้อนกลูโคสที่ความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตรแต่ไม่มีการป้อนแอมโมเนียมไนเตรทด้วยอัตราการป้อน 0.005 ลิตรต่อชั่วโมงเท่าเดิม เพื่อให้อยู่ในภาวะจำกัดไนโตรเจนซึ่งจะทำให้ผลิตกรดกิบเบอเรลลิกได้เพิ่มขึ้น โดยแอมโมเนียมไนเตรทจะหมดใน 50 ชั่วโมง นอกจากนี้การใช้เทคนิคนี้ทำให้ไม่มีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นตลอดเวลาการหมัก 100 ชั่วโมง ต่างจากในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องซึ่งจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กับการเกิดกรดกิบเบอเรลลิกและในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องนี้ทำให้ได้ค่าความเข้มข้นของเซลล์, ความเข้มข้นของกรดกิบเบอเรลลิกเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะความสามารถในการผลิต (productivity) กรดกิบเบอเรลลิกมีค่าเพิ่มขึ้นจากกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องถึง 2.9 เท่า

บทที่ 3

ทฤษฎี

3.1 กระบวนการหมัก

ชนิดของกระบวนการหมักโดยทั่วไปสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ คือ

1. **กระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation)** เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด ไม่มีการป้อนสารอาหารเข้าไปในระบบและดึงผลิตภัณฑ์ออกจากระบบ มีปริมาณสารอาหารในระบบจำกัด จุลินทรีย์จึงใช้สารอาหารที่มีอยู่ในระบบจนหมดเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์และสารอื่นๆ ออกมา และมีระยะเวลาการหมักสั้นเมื่อเทียบกับกระบวนการหมักแบบอื่น มีรูปแบบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกระบวนการนี้มีแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาซึ่งแบ่งกว้างๆ เป็น 4 ระยะได้แก่

- **ระยะปรับตัว (Lag phase)** เมื่อเปลี่ยนถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในอาหาร จุลินทรีย์จะมีการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ ซึ่งระยะนี้จุลินทรีย์จะยังไม่มีการเพิ่มจำนวน

- **ระยะทวีคูณ (Exponential phase)** เป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตสูงและมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว

- **ระยะพัก (Stationary phase)** เป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงเนื่องจากสารอาหารไม่เพียงพอหรือการสะสมของสารพิษที่เกิดจากจุลินทรีย์ เป็นต้น ระยะนี้จึงทำให้อัตราการเจริญเติบโตมีค่าเท่ากับอัตราการตาย

- **ระยะการตาย (Death phase)** อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ลดลงอย่างมากในระยะนี้เพราะมีสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม จึงทำให้อัตราการตายสูงกว่าอัตราการเจริญเติบโต

ในการดำเนินงานด้วยกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องมักใช้ในกระบวนการที่สามารถใช้ถังปฏิกรณ์เพียงถังเดียวในการผลิตผลิตภัณฑ์ได้หลายผลิตภัณฑ์และมีปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จำนวนไม่มากนัก ข้อดีของกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องคือกระบวนการลักษณะนี้ใช้

อุปกรณ์ในการควบคุมน้อยจึงมีต้นทุนในการติดตั้งต่ำ มีโอกาสในการปนเปื้อนและการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการดำเนินงานแบบอื่นเพราะมีระยะเวลาในการหมักสั้น

ส่วนข้อเสียคือเสียค่าใช้จ่ายในการเปลี่ยนถ่ายเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อบ่อยครั้งและมีโอกาสสัมผัสกับผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษหรือสารพิษอื่นจากการที่ภาวะในระบบเปลี่ยนแปลง

2. **กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)** เป็นกระบวนการที่มีทั้งการป้อนสารอาหารเข้าในระบบและดึงผลิตภัณฑ์ออกจากระบบ การเติมสารใหม่และดึงสารเก่าจะกระทำอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราที่เหมาะสม จึงทำให้เกิดสภาวะคงที่ (steady state) ในระบบ ซึ่งจะถือว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นใหม่เท่ากับปริมาณจุลินทรีย์ที่ออกไปจากระบบ ข้อดีของกระบวนการหมักลักษณะนี้คือปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อเวลามีค่าสูงและมีค่าคงที่ตลอดช่วงเวลาดำเนินการ แต่มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนและการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ได้ง่ายเนื่องจากมีระยะเวลาการหมักที่ยาวนาน และส่วนใหญ่ใช้ระบบอัตโนมัติในการควบคุมกระบวนการจึงมีค่าใช้จ่ายในการติดตั้งสูง

3. **กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Fed-batch fermentation)** เป็นกระบวนการที่มีการป้อนสารอาหารเข้าไปในระบบแต่ไม่มีการดึงผลิตภัณฑ์ออกจากระบบก่อนสิ้นสุดการหมัก ดังนั้นปริมาตรของสารอาหารในระบบจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น การเติมสารอาหารใหม่เข้าไปในระบบจะกระทำแบบต่อเนื่องหรือเติมแบบเป็นระยะก็ได้ กระบวนการหมักลักษณะนี้ได้รับการพัฒนาขึ้นมาเพื่อควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารในระบบให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ลดโอกาสเกิดการปนเปื้อนและการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และช่วยส่งเสริมการผลิตผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งจะผลิตในช่วงที่จุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงที่ ในกรณีนี้จะสามารถควบคุมอัตราการป้อนสารอาหารให้เหมาะสมกับภาวะการสร้างผลิตภัณฑ์ได้ แต่กระบวนการหมักเช่นนี้จะมีโอกาสในการสัมผัสกับผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษได้ง่ายและใช้อุปกรณ์เครื่องมือที่มีความซับซ้อนและราคาแพงในการควบคุมกระบวนการ

สำหรับในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องและกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง ในหัวข้อถัดไปจึงจะกล่าวถึงเฉพาะกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องและกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

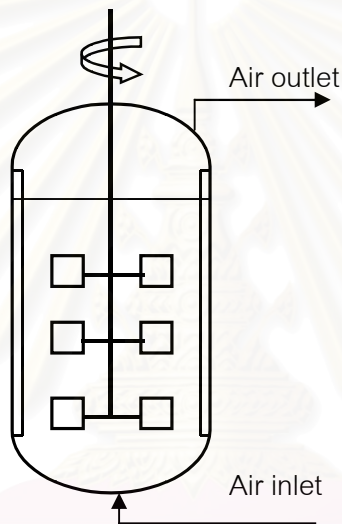
3.2 สมการสมดุลมวล

การเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระบบ เช่น การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ การลดลงของสารอาหาร หรือการเกิดขึ้นของผลิตภัณฑ์ สามารถอธิบายด้วยสมการสมดุลมวลซึ่งจะมีรูปแบบสมการแตกต่างกันไปตามสมมติฐานที่ได้กำหนดไว้ สำหรับรูปแบบทั่วไปของสมการสมดุลมวลเขียนได้ดังนี้

อัตราการสะสมมวลในระบบ = อัตราการป้อนมวลเข้าระบบ + อัตราการเกิดปฏิกิริยาภายในระบบซึ่งรวมถึงการสร้างมวลและการสลายมวล - อัตราการปล่อยมวลออกจากระบบ

$$\frac{dc_i V}{dt} = F \cdot c_{iF} + r_i \cdot V - F \cdot c_i \quad (3.1)$$

3.2.1 สมดุลมวลของกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง



รูปที่ 3.1 แสดงกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

สมมติฐานที่ใช้ทั่วไปสำหรับการสมดุลมวลของกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

- ไม่มีการป้อนมวลเข้าและปล่อยมวลออกจากระบบ
- เซลล์แต่ละเซลล์ในระบบมีองค์ประกอบเดียวและไม่มีความแตกต่างกัน
- การเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นรวมของสารในระบบน้อยมากจนถือว่าคงที่
- ปริมาตรของระบบคงที่
- การผสมของสารในถังหมักทั่วถึงกันจนถือว่าเป็นเนื้อเดียว
- การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความดัน และค่าความเป็นกรดด่างในระบบน้อยมากจนถือว่าคงที่
- ออกซิเจนในระบบมีมากเกินไป

ดังนั้นจึงสามารถเขียนสมการสมดุลของกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องในรูปทั่วไปได้ดังนี้
 อัตราการสะสมมวลในระบบ = อัตราการเกิดปฏิกิริยาภายในระบบซึ่งรวมถึงการสร้างมวลและ
 การสลายมวล

$$\frac{dc_i V}{dt} = r_i \cdot V \quad (3.2)$$

$$V \frac{dc_i}{dt} + c_i \frac{dV}{dt} = r_i \cdot V \quad (3.3)$$

$$\frac{d\rho V}{dt} = 0 \quad (3.4)$$

$$V \frac{dc_i}{dt} = r_i \cdot V \quad (3.5)$$

$$\therefore \frac{dc_i}{dt} = r_i \quad (3.6)$$

สมดุลมวลเซลล์ในระบบ

อัตราการสะสมมวลของเซลล์ในระบบ = อัตราการผลิตมวลเซลล์

$$\frac{dX}{dt} = r_X \quad (3.7)$$

สมดุลมวลของสารอาหารในระบบ

อัตราการสะสมมวลจากสารอาหารในระบบ = อัตราการใช้ไปของสารอาหาร

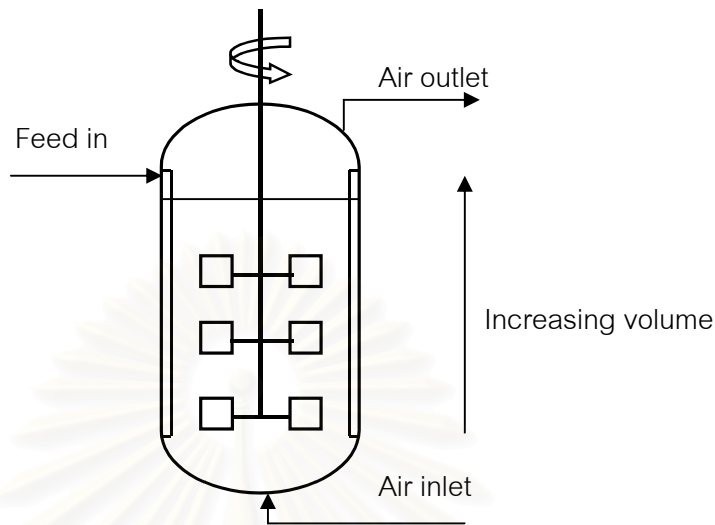
$$\frac{dS}{dt} = -r_S \quad (3.8)$$

สมดุลมวลของผลิตภัณฑ์ในระบบ

อัตราการสะสมมวลของผลิตภัณฑ์ในระบบ = อัตราการผลิตมวลผลิตภัณฑ์

$$\frac{dP}{dt} = r_P \quad (3.9)$$

3.2.2 สมดุลมวลของกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง



รูปที่ 3.2 แสดงกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

สมมติฐานที่ใช้ทั่วไปสำหรับการสมดุลมวลของกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

- มีการป้อนมวลเข้าระบบ แต่ไม่มีการปล่อยมวลออกจากระบบ
- เซลล์แต่ละเซลล์ในระบบมีองค์ประกอบเดียวและไม่มี ความแตกต่างกัน
- ในสายป้อนเข้าเป็นระบบปิดเชื้อ ไม่มีเซลล์ปะปนอยู่ถือว่า $X_F = 0$
- ในสายป้อนเข้ายังไม่มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น $P_F = 0$
- ความหนาแน่นรวมของสารในระบบไม่มีการเปลี่ยนแปลง
- ปริมาตรของระบบไม่คงที่เปลี่ยนแปลงตามเวลา
- การผสมของสารในถังหมักทั่วถึงกันจนถือว่าเป็นเนื้อเดียว
- อุณหภูมิ ความดัน และค่าความเป็นกรดด่างในระบบเปลี่ยนแปลงน้อยมากจนถือว่าคงที่
- ออกซิเจนในระบบมีมากเกินพอ

ดังนั้นจึงสามารถเขียนสมดุลของกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องในรูปทั่วไปได้ดังนี้

อัตราการสะสมมวลในระบบ = อัตราการป้อนมวลเข้าระบบ + อัตราการเกิดปฏิกิริยาภายใน
ระบบซึ่งรวมถึงการสร้างมวลและการสลายมวล

$$\frac{dc_i V}{dt} = F \cdot c_{iF} + r_i \cdot V \quad (3.10)$$

$$V \frac{dc_i}{dt} + c_i \frac{dV}{dt} = F \cdot c_{iF} + r_i \cdot V \quad (3.11)$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (3.12)$$

$$V \frac{dc}{dt} = F \cdot (c_{iF} - c_i) + r_i \cdot V \quad (3.13)$$

$$\frac{dc}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (c_{iF} - c_i) + r_i \quad (3.14)$$

สมดุลมวลเซลล์ในระบบ

อัตราการสะสมมวลเซลล์ในระบบ = อัตราการป้อนมวลเข้าระบบ + อัตราการผลิตมวลเซลล์ - อัตราการตายของเซลล์

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{F}{V} \cdot X + r_x - r_d \quad (3.15)$$

สมดุลมวลของสารอาหารในระบบ

อัตราการสะสมมวลของสารอาหารในระบบ = อัตราการป้อนมวลเข้าระบบ - อัตราการใช้ไปของสารอาหาร

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (S_{i0} - S_i) - r_s \quad (3.16)$$

สมดุลมวลของผลิตภัณฑ์ในระบบ

อัตราการสะสมมวลของผลิตภัณฑ์ในระบบ = อัตราการป้อนมวลเข้าระบบ + อัตราการผลิตมวลผลิตภัณฑ์

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{F}{V} \cdot P + r_p \quad (3.17)$$

3.3 สมการอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ

สมการแสดงอัตราการเกิดหรือการสลายของปฏิกิริยาในกระบวนการหมักมีหลายสมการ แต่ละสมการมีนิยามและความหมายแตกต่างกัน เช่น สมการอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ แสดงถึงปริมาณของจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นต่อเวลา อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะแสดงถึงปริมาณสารอาหารที่ถูกใช้ไปโดยจุลินทรีย์ต่อเวลา และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะแสดงถึงปริมาณที่เกิดขึ้นต่อเวลา เป็นต้น

3.3.1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์จะคำนวณในช่วงที่จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ เพราะจุลินทรีย์มีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่องแบบเอกซ์โปเนนเชียล ในบางครั้งมีการคำนึงถึงอัตราการตายของจุลินทรีย์เนื่องมาจากสารอาหารที่จำเป็นถูกใช้หมดไป และการสะสมของสารพิษ จุลินทรีย์เกิดการสลายตัวเองทำให้ปริมาณของจุลินทรีย์ลดลงอย่างชัดเจน

สมการแสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (3.18)$$

และสมการแสดงอัตราการตายจำเพาะ

$$\frac{dX}{dt} = -k_d \cdot X \quad (3.19)$$

วิธีการคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะทำได้โดย

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

$$\int_{X_0}^X \frac{1}{X} \cdot dX = \int_{t_0}^t \mu \cdot dt$$

$$\ln X = \mu(t - t_0) + \ln X_0 \quad (3.20)$$

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln X$ กับ $t - t_0$ จะได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าความชันเท่ากับ ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ)

3.3.2 อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ

จุลินทรีย์มีการใช้สารอาหารที่จำเป็นเพื่อทำหน้าที่ในลักษณะต่างๆ กัน เช่น การใช้สารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ การซ่อมแซมและบำรุงรักษาเซลล์ และการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ จุลินทรีย์อาจมีการใช้สารอาหารเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดเพื่อทำหน้าที่หลายหน้าที่หรือทำหน้าที่เพียงหน้าที่เดียว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสมมติฐานและความซับซ้อนของแต่ละแบบจำลอง

สมการอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ

$$\frac{dS_i}{dt} = -q_{S_i} \cdot X \quad (3.21)$$

$$q_{S_i} = \frac{r_{S_i}}{X} = \frac{\mu}{Y_{X/S_i}} + m_i + \sum_j \frac{r_{P_j}}{X \cdot Y_{P_j/S_i}} \quad (3.22)$$

วิธีการคำนวณอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะคือ

$$\frac{dS_i}{dt} = -q_{S_i} \cdot X$$

$$\int_{S_0}^S dS = \int_{t_0}^t -q_s \cdot X \cdot dt$$

$$S = -q_s \cdot \int_{t_0}^t X \cdot dt + S_0 \quad (3.23)$$

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง S กับ $\int_{t_0}^t X \cdot dt$ จะได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าความชันเท่ากับ

ค่าอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (q_s)

3.3.3 อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ

การผลิตของผลิตภัณฑ์มีหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมของจุลินทรีย์ว่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการผลิตผลิตภัณฑ์หรือไม่ การผลิตของผลิตภัณฑ์สามารถเกิดขึ้นในช่วงที่จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโต หรือในช่วงระยะพักของจุลินทรีย์ หรือเกิดขึ้นทั้งในช่วงที่จุลินทรีย์เจริญเติบโต และอยู่ในระยะพักก็ได้ ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกมาในช่วงที่จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเรียกว่า ผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ (primary metabolites) ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกมาในช่วงที่จุลินทรีย์อยู่ในระยะพักเรียกว่า ผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ (secondary metabolites)

สมการแสดงอัตราการการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ

$$r_p = \frac{dP}{dt} = q_p \cdot X \quad (3.24)$$

วิธีการคำนวณอัตราการการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะคือ

$$\frac{dP}{dt} = q_p \cdot X$$

$$\int_{P_0}^P dP = \int_{t_0}^t q_p \cdot X \cdot dt$$

$$P = q_p \cdot \int_{t_0}^t X \cdot dt + P_0 \quad (3.25)$$

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง P กับ $\int_{t_0}^t X \cdot dt$ จะได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าความชันเท่ากับ ค่าอัตราการการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ (q_p)

นอกจากนี้สามารถแบ่งรูปแบบการเกิดของผลิตภัณฑ์เป็น 3 รูปแบบดังนี้

1. อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์สัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (growth associated product) ซึ่งรูปแบบนี้การผลิตของผลิตภัณฑ์จะเกิดขึ้นควบคู่กับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

$$r_p = \alpha \mu X \quad (3.26)$$

2. อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ไม่สัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (non growth associated product) รูปแบบนี้การผลิตของผลิตภัณฑ์จะเริ่มเกิดขึ้นในช่วงที่ จุลินทรีย์เข้าสู่อยู่ในระยะพักและเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ

$$r_p = \beta X \quad (3.27)$$

3. อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์มีรูปแบบทั้งสัมพันธ์และไม่สัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (mixed growth associated product) รูปแบบนี้ผลิตภัณฑ์จะเริ่มผลิต ในช่วงที่จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างต่อเนื่องไปถึงช่วงระยะพักของ จุลินทรีย์

$$r_p = \alpha \mu X + \beta X \quad (3.28)$$

3.3.4 ค่าผลได้ของเซลล์และผลิตภัณฑ์

ค่าผลได้ของเซลล์ต่อสารอาหารและผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหารเป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของสารอาหารว่าตลอดช่วงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สารอาหารสามารถเปลี่ยนไปเป็นมวลของเซลล์และมวลของผลิตภัณฑ์มากน้อยเท่าใด

ค่าผลได้ของเซลล์ต่อสารอาหาร

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (3.29)$$

ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร

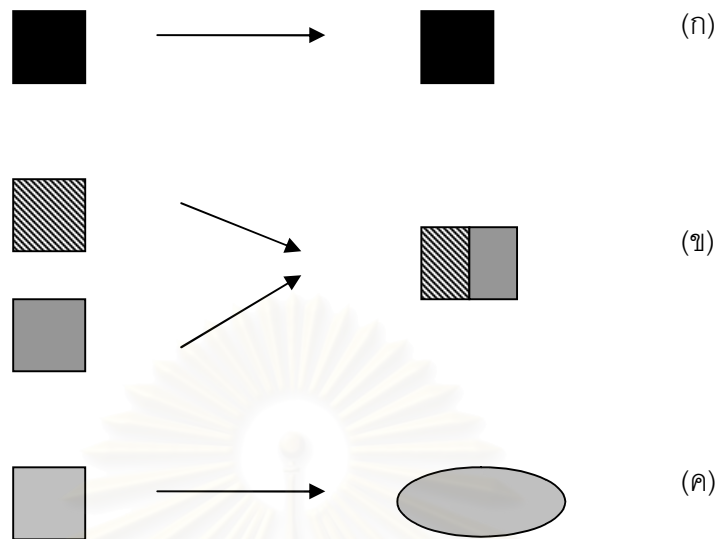
$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (3.30)$$

3.4 วิธีเจเนติก (Genetic algorithm)

วิธีเจเนติกเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในปัญหาการหาคำตอบที่เหมาะสมที่สุด (optimization problem) มีพื้นฐานมาจากทฤษฎีการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติซึ่งมีแนวคิดที่ว่าผู้ที่แข็งแรงกว่าย่อมมีโอกาสในการอยู่รอดมากกว่า ดังนั้นประชากรที่มีความแข็งแรงกว่า จะมีโอกาสในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมต่างๆ ไปสู่ประชากรรุ่นถัดไปได้มากกว่าและอาจเกิดการครอสโอเวอร์ (crossover) หรือมิวเตชัน (mutation) เพื่อให้ได้ประชากรที่มีความแข็งแรงมากกว่าประชากรในช่วงต้น

วิธีเจเนเนอติกมีเทคนิควิธีในการหาคำคำตอบที่เหมาะสมที่สุดด้วยวิธีการสุ่มและใช้ทฤษฎีการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตเป็นตัวกำหนดทิศทางการหาคำตอบภายใต้ขอบเขตพื้นที่ค้นหา โดยวิธีเจเนเนอติกมีขั้นตอนการทำงานอย่างง่ายเริ่มจากการกำหนดค่าเริ่มต้นของค่าตัวแปรตัดสินใจ (design variable) หรือเรียกว่าเป็นสมาชิก (individual) ของกลุ่มประชากร (population) ด้วยการสุ่ม ซึ่งสมาชิกที่ถูกเลือกจะถือเป็นสมาชิกรุ่นพ่อแม่ จากนั้นคำนวณค่าฟังก์ชันวัตถุประสงค์ (objective function) หาค่าฟิตเนสหรือค่าความแข็งแรง (fitness value) ของสมาชิกของกลุ่มประชากร และอาศัยตัวดำเนินการทั้งสาม ได้แก่ ตัวดำเนินการคัดเลือก (selection) ตัวดำเนินการครอสโอเวอร์ (crossover) และตัวดำเนินการมิวเตชัน (mutation) ในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม สับเปลี่ยนโครงสร้างและเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ของสมาชิกของกลุ่มประชากร เพื่อที่จะมีโอกาสได้ประชากรที่มีความหลากหลายและมีค่าความแข็งแรงมากขึ้นมาเป็นประชากรรุ่นลูกหรือรุ่นถัดไป จากนั้นคำนวณซ้ำจนกระทั่งถึงประชากรรุ่นสุดท้ายที่กำหนด หรือได้คำตอบที่ดีที่สุดหรือใกล้เคียงกับคำตอบที่ดีที่สุดของปัญหาภายใต้เงื่อนไขที่กำหนด

พื้นฐานที่สำคัญอีกประการหนึ่งสำหรับวิธีเจเนเนอติกคือ พื้นฐานเกี่ยวกับการสร้างประชากรในรุ่นถัดไปของวิธีเจเนเนอติก ซึ่งประชากรในรุ่นปัจจุบันหรือเรียกรุ่นพ่อแม่จะสร้างประชากรรุ่นลูกโดยการถ่ายทอดลักษณะที่ดี พ่อแม่ที่มีความแข็งแรงหรือมีค่าฟิตเนสสูงจะมีโอกาสในการอยู่รอดและถ่ายทอดลักษณะที่ดีสู่รุ่นลูกได้สูงกว่า ประชากรที่มีความแข็งแรงสูงจะได้รับการเลือกให้เป็นประชากรรุ่นพ่อแม่ตามวิธีการคัดแยกส่วนที่ดีที่สุด (elite) โดยไม่ต้องผ่านตัวดำเนินการอื่นๆ เป็นการป้องกันให้ประชากรที่มีความแข็งแรงได้อยู่รอด สำหรับการคัดเลือกประชากรเพื่อทำหน้าที่เป็นประชากรรุ่นพ่อแม่จะถูกคัดเลือกโดยอาศัยตัวดำเนินการคัดเลือก ตัวดำเนินการครอสโอเวอร์ และตัวดำเนินการมิวเตชัน ตัวดำเนินการคัดเลือกจะทำการคัดเลือกประชากรด้วยหลักการสุ่มเลือกตามวิธีเจเนเนอติก เช่น การเลือกตามวงล้อรูเล็ต หรือการสุ่มตัวอย่างแบบเฟ้นสุ่ม เป็นต้น และหลังจากผ่านตัวดำเนินการคัดเลือก ตัวดำเนินการครอสโอเวอร์จะทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรที่ถูกคัดเลือก ซึ่งการสับสายพันธุ์อาจมีการสับสายพันธุ์หนึ่งส่วนหรือหลายส่วนก็ได้ และเมื่อผ่านการทำงานตามวิธีเจเนเนอติกไปหลายรุ่นแต่ประชากรที่ได้ยังไม่มี ความหลากหลาย จึงจำเป็นต้องใช้ตัวดำเนินการมิวเตชัน เพื่อเพิ่มโอกาสในการได้ประชากรรุ่นลูกที่มีความหลากหลายซึ่งนำไปสู่การได้คำตอบที่ดีมากขึ้น



รูปที่ 3.3 แสดงตัวอย่างการทำงานของตัวดำเนินการในวิธีขั้นตอนเชิงพันธุกรรม (ก) การคัดแยกส่วนที่ดีที่สุด (elite) (ข) ตัวดำเนินการครอสโอเวอร์ (crossover) (ค) ตัวดำเนินการมิวเตชัน (mutation)

สำหรับปัญหาการประมาณค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ซึ่งมีฟังก์ชันวัตถุประสงค์คือ การลดค่าผลต่างระหว่างข้อมูลที่ประมาณได้จากแบบจำลองกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองให้เหลือน้อยที่สุด เขียนในรูปสมการคณิตศาสตร์ได้เป็น

$$\min J = \sum_{j=1}^M W_j \sum_{i=1}^N (\bar{y}_{ij} - y_{ij})^2 \quad (3.31)$$

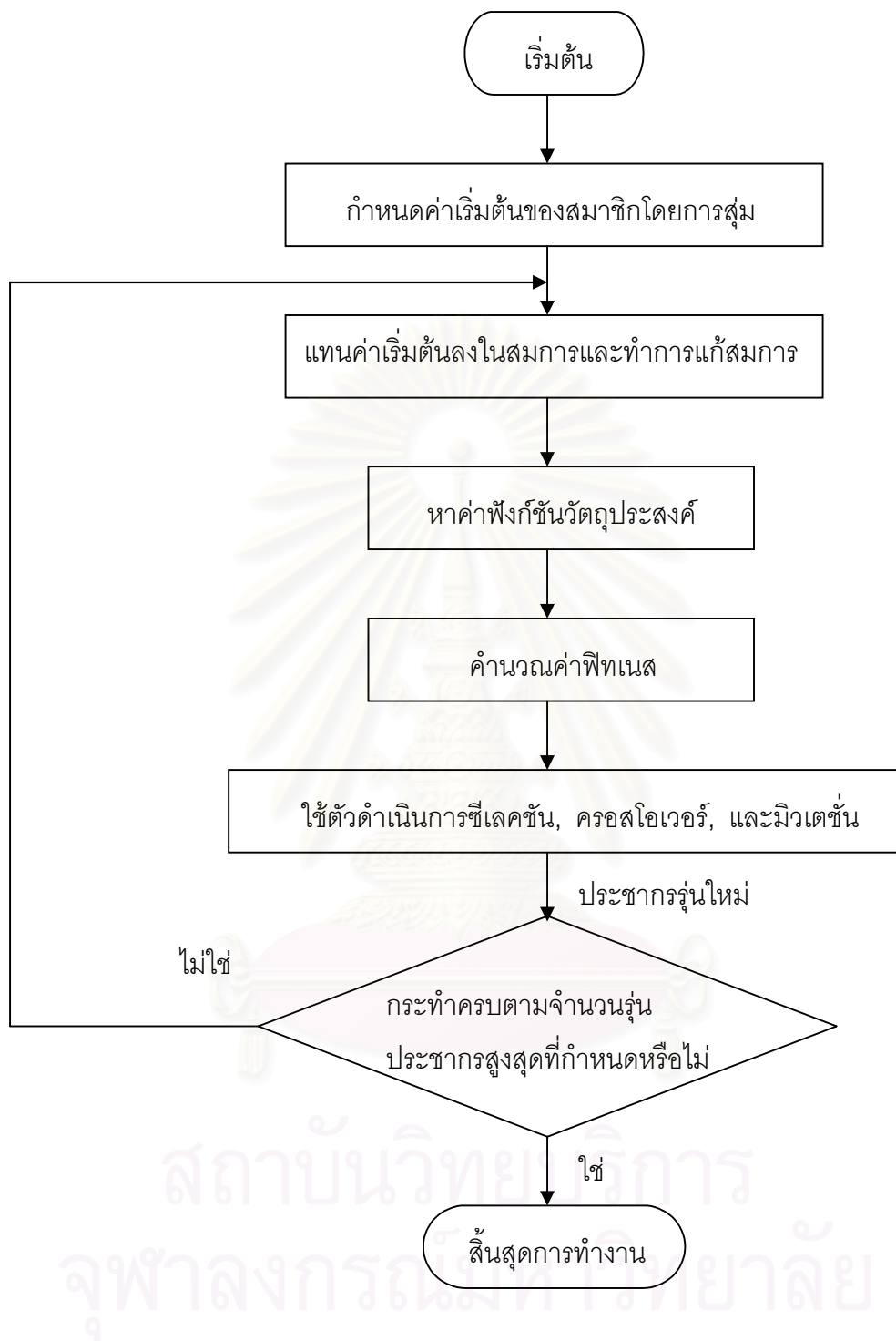
โดยที่ W_j เป็นค่าสัมประสิทธิ์การถ่วงน้ำหนัก

$\bar{y}_{ij}$ เป็นข้อมูลที่ประมาณได้จากแบบจำลอง

y_{ij} เป็นข้อมูลจากการทดลอง

สามารถใช้วิธีเจเนเนติกในการหาคำตอบของปัญหา โดยชุดพารามิเตอร์ที่ต้องการประมาณค่าเปรียบเสมือนเป็นสมาชิกกลุ่มประชากรของวิธีเจเนเนติก และมีลักษณะการแก้ปัญหาเช่นเดียวกับที่กล่าวไปซึ่งจะอธิบายเป็นลำดับขั้นได้ดังนี้

1. ทำการกำหนดค่าเริ่มต้นของสมาชิกของกลุ่มประชากร (initial population) โดยการสุ่มตามวิธีของเจนเนติก
 2. ค่าเริ่มต้นของสมาชิกของกลุ่มประชากรที่ได้จากการสุ่มถือเป็นค่าเริ่มต้นของพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ต้องการหาคำตอบ แทนค่าเหล่านั้นลงในสมการของระบบ
 3. แก่สมการอนุพันธ์ซึ่งเป็นสมการของระบบ โดยใช้การอินทิเกรตด้วยวิธีระเบียบวิธีเชิงตัวเลข (numerical method) และคำนวณค่าฟังก์ชันวัตถุประสงค์
 4. คำนวณค่าฟิตเนส (fitness value) ของสมาชิกของกลุ่มประชากรแต่ละตัว โดยอ้างอิงจากค่าฟังก์ชันวัตถุประสงค์
 5. นำค่าฟิตเนสที่ได้มาใช้ในการกำหนดเลือกสมาชิกของกลุ่มประชากรใหม่หรือค่าพารามิเตอร์ชุดใหม่ โดยใช้ตัวดำเนินการซีเลคชัน (การเลือกสมาชิกชุดใหม่จะพิจารณาจากค่าฟิตเนสของแต่ละสมาชิก สมาชิกปัจจุบันที่มีค่าฟิตเนสสูงสุดจะถูกส่งผ่านไปเป็นสมาชิกรุ่นใหม่ตามวิธีการคัดแยกส่วนที่ดีที่สุด (elite) โดยไม่ต้องใช้ตัวดำเนินการซีเลคชัน เพื่อป้องกันการหายไปของค่าสูงสุด)
 6. ใช้ตัวดำเนินการครอสโอเวอร์และตัวดำเนินการมิวเตชันในการเปลี่ยนแปลงสมาชิกของประชากร เพื่อให้มีโอกาสได้ประชากรที่มีค่าฟิตเนสสูงขึ้นมาเป็นประชากรรุ่นใหม่
 7. ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนที่ 2 ถึง 6 จนกระทั่งได้คำตอบที่ดีที่สุดหรือจำนวนรุ่นของประชากรถึงจำนวนสูงสุดที่กำหนดไว้
- หมายเหตุ 1 รุ่นของประชากร หมายถึง การคำนวณตั้งแต่ขั้นตอนที่ 2 ถึง 6 ครบ 1 รอบ



รูปที่ 3.4 แสดงแผนผังการทำงานของวิธีเจเนติก

3.5 ออปติมัลคอนโทรล (optimal control)

ปัญหาออปติมัลคอนโทรลจัดเป็นปัญหาการหาค่าเหมาะสมที่สุด ซึ่งลักษณะของปัญหาจะเป็นการหาค่าตัวแปรปรับหรือตัวแปรที่มีผลต่อการควบคุมระบบให้มีค่าเหมาะสมที่สุดเพื่อควบคุมระบบนั้นให้เป็นไปในทิศทางที่ต้องการและสอดคล้องกับเงื่อนไขต่างๆ ของระบบ ระบบที่พิจารณาในปัญหานี้มักเป็นระบบที่พฤติกรรมของระบบมีการเปลี่ยนแปลงตามเวลา สามารถเขียนในรูปสมการคณิตศาสตร์ประกอบด้วยส่วน 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นสมการอนุพันธ์ (differential equations) ซึ่งใช้อธิบายพฤติกรรมของกระบวนการที่ขึ้นกับเวลา เช่น สมการสมดุลมวล อีกส่วนหนึ่งเป็นสมการพีชคณิต (algebraic equations) จะใช้อธิบายพฤติกรรมทางกายภาพของกระบวนการ มีรูปแบบทั่วไปดังนี้

ฟังก์ชันวัตถุประสงค์ (objective function)

$$\min_{u(t)} \text{ (or max) } J = G(x(t_f), t_f) + \int_{t_0}^{t_f} F(x, u, t) dt \quad (3.32)$$

ภายใต้เงื่อนไข

สมการอนุพันธ์ของระบบ (process model)

$$\frac{dx}{dt} = f(x, u, t) \quad (3.33)$$

สภาวะเริ่มต้น (initial condition)

$$x(t_0) = x_0 \quad (3.34)$$

สมการเงื่อนไขพีชคณิตแบบเท่ากับและสมการเงื่อนไขพีชคณิตแบบไม่เท่ากับ (equality

and inequality algebraic constraints)

$$h(x(t), u(t), t) = 0 \quad (3.35)$$

$$g(x(t), u(t), t) \leq 0 \quad (3.36)$$

สภาวะขอบเขตของตัวแปรสถานะและตัวแปรปรับ (boundary condition on state and control variable)

$$x_L \leq x(t) \leq x_U \quad (3.37)$$

$$u_L \leq u(t) \leq u_U \quad (3.38)$$

สำหรับการหาค่าอัตราการป้อนสารอาหารสองชนิดได้แก่ น้ำมันปาล์มดิบและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมที่สุดเพื่อให้ได้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดในงานวิจัยนี้ถือว่าเป็นปัญหาออปติมัลคอนโทรล มีรูปแบบปัญหาและการกำหนดเงื่อนไขของระบบคล้ายกับ

รูปแบบทั่วไป ประกอบด้วยฟังก์ชันวัตถุประสงค์ของระบบคือการผลิตสารลดแรงตึงผิวในอัตราสูงสุดที่เวลาสุดท้าย สมการอนุพันธ์ของระบบคือการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์ สารอาหารและผลิตภัณฑ์ต่อเวลา สมการเงื่อนไขและสมการขอบเขตคือปริมาณน้ำหมักต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับปริมาณสูงสุดที่กำหนดและค่าอัตราการป้อนจะต้องอยู่ระหว่างค่าอัตราการป้อนต่ำสุดและสูงสุดที่กำหนดตามลำดับ

ฟังก์ชันวัตถุประสงค์

$$\max_{F_i(t)} = P_{t_f} \cdot V_{t_f}$$

โดยที่ P_{t_f} คือ ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เวลาสุดท้าย

V_{t_f} คือ ปริมาตรของระบบที่เวลาสุดท้าย

ภายใต้เงื่อนไข

สมการอนุพันธ์ของระบบ

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{F}{V} \cdot X + r_x - r_d$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (S_{i0} - S_i) - r_s$$

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{F}{V} \cdot P + r_p$$

สภาวะเริ่มต้น

$$X(t_0) = X_0$$

$$S(t_0) = S_0$$

$$P(t_0) = P_0$$

สมการเงื่อนไขพีชคณิต

$$V_{t_f} \leq V_{\max}$$

สภาวะขอบเขต

$$0 = F_{\min} \leq F_i(t) \leq F_{\max}$$

การแก้ปัญหาออปติมัลคอนโทรลมีเทคนิคการคำตอบหลายวิธี อาทิเช่น การหาคำตอบโดยวิธีทางตรงซึ่งแบ่งเป็นวิธีซีควนเชียล (sequential method) และวิธีซิมัลเทเนียส (simultaneous approach) และการหาคำตอบโดยวิธีทางอ้อมหรือเป็นที่รู้จักกันในวิธีแปรเอชัน (Variation method) การหาคำตอบโดยวิธีแปรเอชันเป็นวิธีที่จำเป็นต้องอาศัยเงื่อนไขจำเป็น (necessary condition) และเงื่อนไขพอเพียง (sufficient condition) มาใช้เป็นเงื่อนไขในการหาคำตอบที่ดีที่สุด

3.5.1 วิธีซีควนเชียล (sequential method)

วิธีซีควนเชียลเป็นวิธีที่ตัวแปรปรับถูกแบ่งค่าออกเป็นช่วง $(u_1, u_2, \dots, u_k)$ เพียงตัวแปรเดียว เทคนิคนี้เป็นที่รู้จักกันในวิธีคอนโทรลพารามิเตอร์ไรเซชัน (control parameterization method) ซึ่งเริ่มจากการกำหนดค่าสถานะเริ่มต้นและเดาค่าเริ่มต้นของชุดตัวแปรปรับ $(u_1, u_2, \dots, u_k)$ จากนั้นจะคำนวณสมการเงื่อนไข เช่น สมการของกระบวนการและฟังก์ชันวัตถุประสงค์ ทำให้ได้ค่าตัวแปรสถานะ (x) ที่เวลาต่างๆ และได้ค่าฟังก์ชันวัตถุประสงค์ ต่อจากนั้นตัวแก้ปัญหาลักษณะไม่เชิงเส้น (nonlinear programming solver) จะถูกเรียกขึ้นมาเพื่อหาค่าตัวแปรปรับใหม่ และจะกระทำซ้ำจนกระทั่งได้ตัวแปรปรับที่เหมาะสมที่สุดจึงหยุดการทำซ้ำ

ในการแก้ปัญหาดังวิธีนี้ ตัวแปรปรับที่ถูกแบ่งค่าออกเป็นช่วงตามช่วงของเวลา โดยค่าของตัวแปรปรับแต่ละช่วงจะสามารถประมาณค่าได้เป็นฟังก์ชันแบบค่าคงที่ ฟังก์ชันแบบเชิงเส้น หรือฟังก์ชันโพลีโนเมียลแล้วแต่กรณี แต่ในที่นี้พิจารณาเป็นฟังก์ชันแบบค่าคงที่ ซึ่งวิธีซีควนเชียลมีลำดับขั้นตอนในการแก้ปัญหาโดยทั่วไปดังนี้

ปัญหาออปติมัลคอนโทรล

$$\min_{u(t)} J = F(x(t), u(t), t)$$

ภายใต้เงื่อนไข

$$\frac{dx}{dt} = f(x(t), u(t), t)$$

$$x(t_0) = x_0$$

$$h(x(t), u(t), t) = 0$$

$$g(x(t), u(t), t) \leq 0$$

$$x_L \leq x(t) \leq x_U$$

$$u_L \leq u(t) \leq u_U$$

สมการของกระบวนการ

สถานะเริ่มต้น

สมการเงื่อนไขพีชคณิตแบบเท่ากับ

สมการเงื่อนไขพีชคณิตแบบไม่เท่ากับ

สถานะขอบเขตของตัวแปรสถานะ

สถานะขอบเขตของตัวแปรปรับ

(3.39)

ขั้นตอนที่ 1 ทำการแบ่งค่าตัวแปรปรับออกเป็นช่วง ด้วยวิธีคอลโลเคชัน (standard collocation method) เช่น วิธี orthogonal collocation

$$u_k(t) = \prod_{i=1}^k u_i \psi_i(t) \quad (3.40)$$

โดยที่
$$\psi_i(t) = \prod_{k=1, k \neq i}^k \frac{(t - t_k)}{(t_i - t_k)}, \quad u_k(t_i) = u_i \quad (3.41)$$

ขั้นตอนที่ 2 แทนค่าตัวแปรปรับที่ถูกแบ่งเป็นช่วง ลงในสมการของกระบวนการ

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= f(x(t), u_k(t), t) \quad \text{โดยที่ } i = 1, \dots, k \\ \text{และ } x(0) &= x_0 \end{aligned} \quad (3.42)$$

ขั้นตอนที่ 3 แทนสมการของกระบวนการใหม่ที่มีการแทนค่าของตัวแปรปรับใหม่แล้วตามสมการที่ (3.42) ลงในปัญหาการควบคุมแบบออปติมัลตามด้านบน (3.39) ซึ่งจะได้ปัญหาออปติมัลคอนโทรลใหม่ตามวิธีที่เคเวนเซียล

ปัญหาออปติมัลคอนโทรล

$$\min_{u(t)} J = F(x(t), u(t), t)$$

ภายใต้เงื่อนไข

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= f(x(t), u_k(t), t) \quad \text{โดยที่ } i = 1, \dots, k \\ u_k(t) &= \prod_{i=1}^k u_i \psi_i(t) \\ \text{โดยที่ } \psi_i(t) &= \prod_{k=1, k \neq i}^k \frac{(t - t_k)}{(t_i - t_k)}, \quad u_k(t_i) = u_i \\ x(t_0) &= x_0 \\ h(x(t), u(t), t) &= 0 \\ g(x(t), u(t), t) &\leq 0 \\ x_L &\leq x(t) \leq x_U \\ u_L &\leq u(t) \leq u_U \end{aligned} \quad (3.43)$$

ขั้นตอนที่ 4 เลือก t_i โดยวิธี orthogonal collocation และประมาณค่าตัวแปรปรับ u ที่เป็นฟังก์ชันกับเวลาโดยใช้สมการ

$$u_k(t) = \prod_{i=1}^k u_i \psi_i(t)$$

$$\text{โดยที่ } \psi_i(t) = \prod_{k=1, k \neq i}^k \frac{(t - t_k)}{(t_i - t_k)}, \quad u_k(t_i) = u_i$$

ขั้นตอนที่ 5 กำหนดค่าเริ่มต้นของตัวแปรปรับซึ่งได้จากการเดา จากนั้นคำนวณค่าสมการของกระบวนการโดยใช้ตัวแก้ปัญหสมการอนุพันธ์อันดับหนึ่ง (ODE solver) ตามสมการที่ (3.42) ในขั้นตอนที่ 2 เพื่อเป็นค่าอินพุตในขั้นตอนที่ 4

ขั้นตอนที่ 6 หาค่าฟังก์ชันวัตถุประสงค์ตามสมการที่ () โดยใช้ค่าตัวแปรสถานะและตัวแปรปรับที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาซึ่งคำนวณได้จากขั้นตอนที่ 5 จากนั้นทำการหาค่าตัวแปรปรับใหม่โดยการใช้วิธีออปติไมเซชัน และคำนวณซ้ำเริ่มจากขั้นตอนที่ 4 ถึงขั้นตอนที่ 6 อีกครั้ง ทำซ้ำเช่นนี้เรื่อยๆ จนกระทั่งได้ค่าตัวแปรปรับที่เหมาะสมที่สุดที่สอดคล้องกับเงื่อนไขต่างๆ จึงหยุดทำซ้ำ

ข้อดีของวิธีซีควนเชียลคือมีตัวแปรปรับเพียงตัวแปรเดียวที่ถูกพิจารณาแบ่งค่าเป็นช่วง แต่ก็มีข้อจำกัดคือ ยากต่อการจัดการกับปัญหาที่มีสมการเงื่อนไขของตัวแปรสถานะ

3.5.2 วิธีซิมัลเทเนียส (simultaneous method)

วิธีซิมัลเทเนียสเป็นวิธีการหาคำตอบโดยทางตรงเหมือนกับวิธีซีควนเชียล แต่ต่างกันที่วิธีซิมัลเทเนียสพิจารณาทั้งตัวแปรสถานะและตัวแปรปรับให้มีการแบ่งค่าออกเป็นช่วง นอกจากนี้สมการของกระบวนการและปัญหาออปติไมเซชันจะถูกแก้ปัญหไปพร้อมๆ กัน และสมการของกระบวนการซึ่งเป็นสมการอนุพันธ์ในปัญหาการควบคุมแบบออปติมัลนั้น จะถูกเปลี่ยนเป็นสมการพีชคณิตที่จะอยู่ในรูปของสมการเงื่อนไขแบบเท่ากับในปัญหาแบบไม่เชิงเส้น (nonlinear programming problem) ขั้นตอนการแก้ปัญหด้วยวิธีซิมัลเทเนียสโดยทั่วไปมีดังนี้

ปัญหาออปติมัลคอนโทรล

$$\min_{u(t)} J = F(x(t), u(t), t)$$

ภายใต้เงื่อนไข

$$\frac{dx}{dt} = f(x(t), u(t), t)$$

$$x(t_0) = x_0$$

$$h(x(t), u(t), t) = 0$$

$$g(x(t), u(t), t) \leq 0$$

$$x_L \leq x(t) \leq x_U$$

$$u_L \leq u(t) \leq u_U$$

สมการของกระบวนการ

สภาวะเริ่มต้น

สมการเงื่อนไขพีชคณิตแบบเท่ากับ

สมการเงื่อนไขพีชคณิตแบบไม่เท่ากับ

สภาวะขอบเขตของตัวแปรสถานะ

สภาวะขอบเขตของตัวแปรปรับ

(3.44)

ขั้นตอนที่ 1 ทำการแบ่งตัวค่าตัวแปรสถานะและแปรปรับออกเป็นช่วง ด้วยวิธีคอลโลเคชัน (standard collocation method) เช่น วิธี orthogonal collocation

$$x_{k+1}(t) = \sum_{i=0}^k x_i \phi_i(t) \quad (3.45)$$

โดยที่ $\phi_i(t) = \prod_{k=0, i}^k \frac{(t-t_k)}{(t_i-t_k)} \quad , u_{k+1}(t_i) = x_i \quad (3.46)$

$$u_k(t) = \prod_{i=1}^k u_i \psi_i(t) \quad (3.47)$$

โดยที่ $\psi_i(t) = \prod_{k=1, k}^k \frac{(t-t_k)}{(t_i-t_k)} \quad , u_k(t_i) = u_i \quad (3.48)$

ขั้นตอนที่ 2 แทนค่าตัวแปรสถานะและตัวแปรปรับที่ถูกแบ่งเป็นช่วง ลงในสมการของกระบวนการที่เป็นสมการพีชคณิต

$$R(t_i) = \sum_{j=0}^k x_j, \phi_j(t_i) - f(x_i, u_i, t_i) = 0 \quad \text{โดยที่ } i = 1, \dots, k \quad (3.49)$$

$$x(0) = x_0$$

ขั้นตอนที่ 3 แทนสมการของกระบวนการที่อยู่ในรูปสมการพีชคณิต ลงในปัญหาออปติมัลคอนโทรล

ปัญหาออปติมัลคอนโทรล

$$\min_{u(t)} J = F(x(t), u(t), t)$$

ภายใต้เงื่อนไข

$$R(t_i) = \sum_{j=0}^k x_j, \phi_j(t_i) - f(x_i, u_i, t_i) = 0 \quad \text{โดยที่ } i = 1, \dots, k$$

$$x(t_0) = x_0$$

$$h(x(t), u(t), t) = 0$$

$$g(x(t), u(t), t) \leq 0$$

$$x_L \leq x(t) \leq x_U$$

$$u_L \leq u(t) \leq u_U \quad (3.50)$$

ขั้นตอนที่ 4 เลือก t_i โดยวิธี orthogonal collocation

ขั้นตอนที่ 5 แก้ปัญหาออปติมัลคอนโทรลในขั้นตอนที่ 3 ที่ t_i ใดๆ ที่เลือกมาจากขั้นตอนที่ 4 โดยใช้ตัวแก้ปัญหาแบบไม่เชิงเส้น (nonlinear programming solver)

บทที่ 4

วิธีการทดลอง

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 โดยใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในงานวิจัยนี้ แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ 1. ทำการทดลองการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในขวดรูปชมพู่เขย่าที่อัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) เริ่มต้นในช่วง 5-200 เพื่อหาอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ 2. หาแบบจำลองคณิตศาสตร์และค่าพารามิเตอร์จากแบบจำลองที่เหมาะสมสำหรับอธิบายการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในขวดรูปชมพู่ 3. หาอัตราการป้อนน้ำมันปาล์มดิบและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเพื่อให้ได้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุด

4.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

4.1.1 อุปกรณ์

- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) รุ่น VS-124 บริษัท ISSCO , U.S.A.
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
- หม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HL24ADY บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan
- ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Hot Air Oven) รุ่น ULM 500 บริษัท Memmert, Germany
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Kubota 5100 apan บริษัท Kubota Corporation, Japan
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Instruments, U.S.A.
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries, Inc., U.S.A.
- เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring tensiometer) รุ่น K6 บริษัท Kruss, Germany

- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH Meter) รุ่น MP220 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland.

4.1.2 เคมีภัณฑ์

- อาหารแข็ง NA (Nutrient broth) บริษัท Difco laboratories, U.S.A.
- น้ำมันปาล์มดิบ บริษัทชุมชนพรอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มจำกัด, ประเทศไทย
- แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) บริษัท J.T.Baker, U.S.A.
- โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท J.T.Baker, U.S.A.
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท J.T.Baker, U.S.A.
- โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท BDH laboratory supplies, England
- โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3) บริษัท BDH laboratory supplies, England
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท J.T.Baker, U.S.A.
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท BDH laboratory supplies, England
- คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) บริษัท BDH laboratory supplies, England
- แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท BDH laboratory supplies, England
- แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) บริษัท J.T.Baker, U.S.A.
- ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท J.T.Baker, U.S.A.
- เฟอรัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- โคบอลต์คลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) บริษัท BDH laboratory supplies, England
- กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) บริษัท BDH laboratory supplies, England
- กรดบอริก (H_3BO_3) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- อีดีทีเอ (EDTA) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.
- แคลเซียม-แพนโทเทเนต (Calcium-Pantothenate) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.
- ไบโอติน (Biotin) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.
- กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (*p*-aminobenzoic acid) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.

- ไพริดอกซีน-ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine-HCl) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.
- ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.
- ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.

4.2 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.2.1 เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.จิราภรณ์ ธนียวัน โดยการคัดแยกในงานวิจัยของ อารีย์ (2542) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.2 การเตรียมหัวเชื้อ

4.2.2.1 นำจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ที่เลี้ยงในหลอดอาหารนิเวศน์เอคาร์แบบแข็งเอียงมาเชยลงบนอาหารนิเวศน์เอคาร์แบบแข็งเอียง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บเป็นหัวเชื้อ

4.2.2.2 เมื่อต้องการทดลอง นำจุลินทรีย์ในหลอดอาหารนิเวศน์เอคาร์แบบแข็งเอียงที่เก็บเป็นหัวเชื้อมาเชยลงบนอาหารนิเวศน์เอคาร์แบบแข็งเอียงอีกครั้ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ออกจากอาหารเอียงด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยควบคุมความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้อยู่ในช่วง 0.7-0.8 จากนั้นปิเปตสารละลายเซลล์ 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารกำหนดสูตรตามภาคผนวก ก. ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

4.2.3 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในขวดรูปชมพู่เขย่า

4.2.3.1 ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 4.2.2.2 ปริมาณ 8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหารกำหนดสูตรตามภาคผนวก ก. ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ 500 มิลลิลิตร ยกเว้นปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจะใช้ตามอัตราส่วน C/N ในแต่ละการทดลอง ซึ่งเริ่มทำการทดลองที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 5 (ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 16.68

กรัมต่อลิตร) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นที่ 7.5

4.2.3.2 ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 4.2.3.1 แต่เปลี่ยนอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเป็น 50, 100, 150 และ 200 (ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.66, 0.83, 0.55, 0.42 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) และทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง วัดค่าแรงดึงผิว ปริมาณสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ ปริมาณน้ำมันปาล์มและปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ

4.3 การวิเคราะห์สารตัวอย่าง

4.3.1 การหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (อารีย์, 2542)

นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ออกโดยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตรและปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำเซลล์เปียกใส่หลอดไมนิเยมฟลอยแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักเซลล์คงที่ และทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น 30 นาทีชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ด้วยเครื่องชั่งละเอียด น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือน้ำหนักของเซลล์ที่ได้ คำนวณหาปริมาณเซลล์ในหน่วยกรัมต่อลิตร (ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง มีค่าสัมประสิทธิ์ความคลาดเคลื่อนเท่ากับ 6.7 เปอร์เซ็นต์)

4.3.2 การหาปริมาณน้ำมันปาล์มดิบที่เหลือ (วิศวกรรมสถานแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์, 2545 และ alltech associates, Inc)

4.3.2.1 นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาสกัดน้ำมันออกด้วยเฮกเซนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้งโดยเปลี่ยนเฮกเซนใหม่ นำส่วนบนซึ่งเป็นส่วนของเฮกเซนที่มีน้ำมันละลายอยู่ไประเหยด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีในตู้ดูดควัน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อระเหยเฮกเซนออกไป ส่วนส่วนล่างที่สกัดน้ำมันออกแล้วจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนที่เหลือและปริมาณสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

4.3.2.2 นำน้ำมันที่สกัดได้จากขั้นตอน 4.3.2.1 มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อหาปริมาณของน้ำมันที่เหลือ โดยเติมสารผสมระหว่างอะซิโตนไตรท์กับไดคลอโรมีเทน

อัตราส่วน 70 : 30 ลงในน้ำมันที่สกัดได้ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ C18 อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที มีอะซิโตนไทรทและไดคลอโรมีเทนเป็นเฟสเคลื่อนที่ จากนั้นนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง มีค่าสัมประสิทธิ์ความคลาดเคลื่อนเท่ากับ 8.9 เปอร์เซ็นต์)

4.3.3 การหาปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (Strickland และ Parson, 1972)

นำน้ำมันที่สกัดน้ำมันออกแล้วตามข้อ 4.3.2.1 มาเจือจางให้อยู่ในช่วงที่วัดค่าดูดกลืนแสงได้ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายโซเดียมไนโตรพรัสไซด์เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายออกซิไดซ์ (สารละลายโซเดียมซีเตรทและโซเดียมไฮดรอกไซด์) 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดจุกด้วยพาราฟิล์ม ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงเพื่อรอให้เกิดปฏิกิริยาซึ่งสารจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองอ่อนไปเป็นสีฟ้า จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร แล้วนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง มีค่าสัมประสิทธิ์ความคลาดเคลื่อนเท่ากับ 5.3 เปอร์เซ็นต์)

4.3.4 การวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิว

4.3.4.1 การวัดค่าแรงตึงผิว

นำน้ำมันที่สกัดน้ำมันออกแล้วตามข้อ 4.3.2.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรไปวัดค่าแรงตึงผิวที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6, Kruss, Germany)

4.3.4.2 การสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Xie และคณะ, 2005 และ

McInerney และคณะ, 2003)

- นำน้ำมันที่สกัดน้ำมันออกแล้วตามข้อ 4.3.2.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรมาปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้เท่ากับ 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์และตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเกิดการตกตะกอนแยกชั้น จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกตะกอนแล้วทำล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นและปั่นเหวี่ยงซ้ำ จากนั้นนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตรทอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร ทำการสกัดแยก 3 ครั้งโดยใช้กรวยแยก แล้วนำส่วนล่างมาระเหยด้วยเครื่องระเหยจนแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส

- นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากขั้นตอนแรกไปวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเครื่อง HPLC ทำการวิเคราะห์โดยใช้เมทานอล 70% และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 6.8) เป็นเฟสเคลื่อนที่ด้วยคอลัมน์ C18 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต 210 นาโนเมตร ปริมาตรสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง มีค่าสัมประสิทธิ์ความคลาดเคลื่อนเท่ากับ 7.1 เปอร์เซ็นต์)

4.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์

การหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในช่วงการเติบโตแบบทวีคูณของจุลินทรีย์ จะใช้แบบจำลองการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่างๆ ในการอธิบายความสัมพันธ์และพิจารณาคัดเลือกแบบจำลองที่เหมาะสมที่สามารถอธิบายผลของความสัมพันธ์ได้ดีที่สุด โดยขั้นตอนการทดลองแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ

4.4.1 การคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่างกัน

4.4.1.1 ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 จากน้ำมันปาล์มดิบและแอมโมเนียมซัลเฟต (ตามหัวข้อที่ 4.2) โดยจะให้ปริมาณน้ำมันปาล์มดิบคงที่ที่ 20 กรัมต่อลิตร ในทุกการทดลอง แต่ทำการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่างๆ กัน 9 ค่า ได้แก่ 0.42, 0.55, 0.83, 1.66, 5.56, 8.34, 13.90, 16.68 และ 20.85 กรัมต่อลิตร (ซึ่งความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.42, 0.55, 0.83, 1.66 และ 16.68 กรัมต่อลิตร คือค่าอัตราส่วน C/N เริ่มต้น 200, 150, 100, 50 และ 5 ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 5.56, 8.34, 13.90 และ 20.85 กรัมต่อลิตรเป็นค่าที่มีการศึกษาเพิ่มเติมจะเท่ากับอัตราส่วน C/N เริ่มต้น 15, 10, 6 และ 4 ตามลำดับ)

4.4.1.2 เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการทดลองในข้อ 1 มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร (ตามหัวข้อที่ 4.3.1) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่างๆ กัน 9 ค่า เพื่อนำมาหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์ โดยนำค่าความเข้มข้นของเซลล์แห้งที่เวลา 6 ชั่วโมงแรกของการหมักซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตแบบทวีคูณมาวาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างล็อกการริเริ่มของเซลล์ ($\ln X$) กับเวลา

ประมาณค่าความสัมพันธ์เป็นแบบเชิงเส้น ค่าความชันที่ได้จากกราฟคือค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (μ) แสดงความสัมพันธ์ในรูปแบบการได้เป็น

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

$$\int_{X_0}^X \frac{1}{X} \cdot dX = \int_{t_0}^t \mu \cdot dt$$

$$\ln X = \mu(t - t_0) + \ln X_0$$

4.4.2 การเลือกแบบจำลองสำหรับอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะกับความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น

แบบจำลองที่นำมาคัดเลือกเพื่อหาแบบจำลองที่เหมาะสมมีทั้งหมด 8 แบบจำลองคือ แบบจำลอง Monod แบบจำลอง Moser แบบจำลอง Teissier แบบจำลอง Mason & Milles แบบจำลอง Contois แบบจำลอง Andrew แบบจำลอง Luong และแบบจำลอง Edward ซึ่งแต่ละแบบจำลองมีสมมติฐานของแบบจำลองแตกต่างกัน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ แบบจำลองที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะขึ้นอยู่กับสารอาหารจำกัดชนิดเดียวโดยไม่เกิดการยับยั้งจากเซลล์หรือสารอาหาร และแบบจำลองที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะขึ้นอยู่กับสารอาหารจำกัดหนึ่งชนิดและคำนึงถึงผลจากการเกิดการยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตจากเซลล์หรือสารอาหาร รูปแบบของแบบจำลองแสดงอยู่ในตารางที่ 4.1 ในส่วนของ การคำนวณจะใช้ฟังก์ชัน lsqcurvefit ซึ่งเป็นฟังก์ชันออปติไมเซชันในโปรแกรม MATLAB เวอร์ชัน R2006a โดยมีฟังก์ชันวัตถุประสงค์เป็นผลต่างกำลังสองระหว่างค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ได้จากการทดลองกับค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ได้จากการทดลองคำนวณ
$$J = \sum_{i=1}^N (\mu_{\text{experiment}} - \mu_{\text{predicted}})^2$$
 และมีขั้นตอนการคำนวณเริ่มจากการกำหนดค่าพารามิเตอร์เริ่มต้นของแบบจำลองที่ต้องการทดสอบจากการคาดเดา โปรแกรมจะนำค่าพารามิเตอร์เหล่านั้นไปแทนค่าในแบบจำลอง จากนั้นโปรแกรมจะทำการแก้สมการ ค่าที่ได้ออกมาจะเป็นค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่างๆ กัน ซึ่งค่าเหล่านั้นจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลอง ผลต่างระหว่างสองค่า นั่นคือค่าความผิดพลาดกำลังสองน้อยที่สุด และถ้าพารามิเตอร์ชุดที่คำนวณออกมานั้นยังไม่ทำให้ได้ค่าความผิดพลาดน้อยที่สุด โปรแกรมจะทำการคำนวณซ้ำ

โดยเปลี่ยนค่าพารามิเตอร์ใหม่แล้วทำการคำนวณค่าความผิดพลาดซ้ำ จนกระทั่งได้ค่าพารามิเตอร์ที่ทำให้ค่าความผิดพลาดมีค่าน้อยที่สุด โปรแกรมจึงหยุดการคำนวณ ต่อจากนั้นทำการเปลี่ยนแบบจำลองที่ใช้ทดสอบเป็นแบบจำลองอื่นๆ และทำการคำนวณซ้ำตามขั้นตอนเดิมตั้งแต่การกำหนดค่าพารามิเตอร์เริ่มต้นจนกระทั่งโปรแกรมหยุดการคำนวณ

ตารางที่ 4.1 แสดงแบบจำลอง สมมติฐานของแบบจำลองและพารามิเตอร์ของแบบจำลอง การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ 8 แบบจำลอง

แบบจำลอง	สมมติฐาน	พารามิเตอร์	อ้างอิง
$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S}$	μ ขึ้นอยู่กับ S หนึ่งชนิด	$\mu_{\max}, K_S$	Monod (1942)
$\mu = \mu_{\max} \frac{S^n}{K_S^n + S^n}$	μ ขึ้นอยู่กับ S หนึ่งชนิด	$\mu_{\max}, K_S, n$	Moser (1958)
$\mu = \mu_{\max} (1 - e^{-S/K_S})$	μ ขึ้นอยู่กับ S หนึ่งชนิด	$\mu_{\max}, K_S$	Teissier (1942)
$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_S + S} + K_D S \right)$	μ ขึ้นอยู่กับ S หนึ่งชนิด และพิจารณาผลจากการแพร่ของสารอาหาร	$\mu_{\max}, K_S, K_D$	Mason & Milles (1976)
$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_S X + S} \right)$	μ ขึ้นอยู่กับ S หนึ่งชนิด และเกิดการยับยั้งจากเซลล์	$\mu_{\max}, K_S$	Contois (1959)
$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S + S^2/K_{Si}}$	μ ขึ้นอยู่กับ S หนึ่งชนิด และเกิดการยับยั้งจากสารอาหาร	$\mu_{\max}, K_S, K_{Si}$	Andrew (1968)
$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S} \left(1 - \frac{S}{S_m} \right)^n$	μ ขึ้นอยู่กับ S หนึ่งชนิด และเกิดการยับยั้งจากสารอาหาร	$\mu_{\max}, K_S, S_m, n$	Luong (1987)
$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S} (e^{-S/K_{Si}})$	μ ขึ้นอยู่กับ S หนึ่งชนิด และเกิดการยับยั้งจากสารอาหาร	$\mu_{\max}, K_S, K_{Si}$	Edward (1970)

หมายเหตุ μ และ S หมายถึงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและความเข้มข้นของสารอาหาร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าขอบเขตบน ขอบเขตล่างและค่าเริ่มต้นจากการคาดเดาของพารามิเตอร์แต่ละตัว

พารามิเตอร์	ค่าขอบเขตล่าง	ค่าขอบเขตบน	ค่าเริ่มต้นจากการคาดเดา
$\mu_{\max}$	0	100	0.3
K_S	0	1000	5
n	0	100	1.5
K_D	0	1000	5
K_{Si}	0	1000	10
S_m	0	1000	50

4.5 การคัดเลือกแบบจำลองสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการหาค่าพารามิเตอร์จากแบบจำลอง

4.5.1 แบบจำลองและสมการสมดุลมวล

การเลือกแบบจำลองคณิตศาสตร์และหาค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในงานวิจัยนี้ จะทำการคัดเลือกแบบจำลองและหาค่าพารามิเตอร์โดยอาศัยผลการทดลองที่ได้จากการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเซลล์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เวลาต่างๆ ทั้งสิ้น 48 ชั่วโมงอ้างอิง และใช้วิธีเจเนติก (genetic algorithm) ในโปรแกรม MATLAB เวอร์ชัน R2006a ในการคำนวณ แบบจำลองคณิตศาสตร์ที่นำมาคัดเลือกเป็นแบบจำลองประเภทที่ไม่คำนึงถึงโครงสร้างของเซลล์ (unstructured model) มี 2 แบบจำลองได้แก่ แบบจำลอง Andrews และแบบจำลอง logistic ซึ่งอ้างอิงมาจากการคัดเลือกแบบจำลองตามหัวข้อที่ 4.4 และอ้างอิงจากงานวิจัยของ Ochoa และ Casas (1999) ซึ่งใช้แบบจำลองในการอธิบายการผลิตไซโฟลิปิดจาก *Candida bombicola* ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 แสดงแบบจำลองและพารามิเตอร์ของแบบจำลองแบบจำลอง Andrews และแบบจำลอง logistic

แบบจำลอง	พารามิเตอร์
Andrews : $\mu = \mu_{mam} \frac{S}{S + K_S + S^2/K_{Si}}$	μ_{max}, K_S, K_{Si}
Logistic : $\mu = \mu_0 \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$	μ_0, X_{max}

กระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในขวดรูปชมพู่เขย่าเป็นกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องการอธิบายการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ไนโตรเจนและน้ำมันปาล์มระหว่างกระบวนการหมักจึงใช้สมการสมดุลมวลของกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องในการอธิบาย โดยมีสมมติฐานที่ใช้ในการกำหนดรูปแบบสมการสมดุลมวลในงานวิจัยนี้คือ

- ความหนาแน่นรวมของสารในระบบการเปลี่ยนแปลงน้อยมากจนถือว่าคงที่
- ค่าอุณหภูมิ ความดัน และค่าความเป็นกรดต่างในระบบมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากจนถือว่าคงที่
- ออกซิเจนในระบบมีมากเกินไป
- คำนึงถึงอัตราการตายของเซลล์ในระบบ
- จุลินทรีย์มีการใช้ในไนโตรเจนเพื่อสร้างเซลล์และบำรุงรักษาเซลล์
- จุลินทรีย์มีการใช้น้ำมันปาล์มเพื่อสร้างเซลล์ บำรุงรักษาเซลล์และเปลี่ยนเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ดังนั้นสมการสมดุลมวลของการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในขวดรูปชมพู่เขย่าจึงมีรูปแบบสมการเป็น

สมการสมดุลมวลเซลล์

อัตราการสะสมมวลเซลล์ในระบบ = อัตราการสร้างมวลเซลล์ – อัตราการตายของเซลล์

$$\frac{dX}{dt} = r_x - r_d$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - k_d X \quad (4.1)$$

สมการสมดุลมวลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

อัตราการสะสมมวลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระบบ = อัตราการสร้างมวลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

$$\frac{dP}{dt} = r_P$$

$$\frac{dP}{dt} = \beta X + \alpha \mu X \quad (4.2)$$

สมการสมดุลมวลแอมโมเนียมซัลเฟต

อัตราการสะสมมวลไนโตรเจนในระบบ = - อัตราการใช้มวลแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อการสร้างเซลล์ - อัตราการใช้มวลแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อบำรุงรักษาและซ่อมแซมเซลล์

$$\frac{dN}{dt} = -r_N$$

$$\frac{dN}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{X/N}}\right)X - m_N X \quad (4.3)$$

สมการสมดุลมวลน้ำมันปาล์ม

อัตราการสะสมมวลน้ำมันในระบบ = - อัตราการใช้มวลน้ำมันเพื่อการสร้างเซลล์ - อัตราการใช้มวลน้ำมันเพื่อบำรุงรักษาและซ่อมแซม - อัตราการใช้มวลน้ำมันเพื่อเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์

$$\frac{dOil}{dt} = -r_{oil}$$

$$\frac{dOil}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{X/oil}}\right)X - m_{oil} X - \left(\frac{\beta X + \alpha \mu X}{Y_{P/oil}}\right) \quad (4.4)$$

จากสมการสมมูลมวลทั้ง 4 สมการ (สมการ 4.1-4.4) ทำให้ได้พารามิเตอร์ที่ต้องทำการประมาณค่าเพิ่มอีก 8 พารามิเตอร์ได้แก่ $k_d, \beta, \alpha, m_N, m_{oil}, Y_{X/N}, Y_{X/oil}, Y_{P/oil}$ ซึ่งขั้นตอนการหาค่าพารามิเตอร์ทั้งหมดนั้นจะกล่าวถึงในหัวข้อถัดไป

4.5.2 การประยุกต์ใช้วิธีเจเนเนติกเพื่อคัดเลือกแบบจำลองประมาณค่าพารามิเตอร์จากแบบจำลอง

การคัดเลือกแบบจำลองการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการหาพารามิเตอร์จากแบบจำลองและสมการสมมูลมวลของกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องเริ่มจากนำแบบจำลองแรกที่ต้องการทำการทดสอบคือ แบบจำลอง Andrew โดยกำหนดให้แอมโมเนียเซลล์เฟตเป็นสารอาหารจำกัด มาแทนลงในสมการสมมูลมวลทั้ง 4 สมการ จากนั้นสมการสมมูลมวลที่มีการแทนแบบจำลอง Andrew ลงไปแล้วจะถูกทดสอบด้วยวิธีเจเนเนติกในโปรแกรม MATLAB เวอร์ชัน R2006a ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. กำหนดขอบเขตบน (upper boundary) และขอบเขตล่าง (lower boundary) ของพารามิเตอร์แต่ละตัวเพื่อให้การค้นหาคำตอบอยู่ภายใต้ขอบเขตที่กำหนด

2. ค่าพารามิเตอร์เริ่มต้นจะถูกกำหนดขึ้นโดยวิธีการสุ่มตามวิธีเจเนเนติกและนำค่าพารามิเตอร์เหล่านั้นไปแทนลงในสมการสมมูลมวล (โดยพารามิเตอร์ที่ต้องทำการประมาณค่าในวิธีเจเนเนติกจะถูกเรียกว่าเป็นสมาชิก (individual) ของกลุ่มประชากร (population) ซึ่งค่าพารามิเตอร์ที่กำลังถูกใช้ในการคำนวณจะเรียกว่าเป็นสมาชิกของกลุ่มประชากรรุ่นปัจจุบัน)

3. แก้สมการสมมูลมวลซึ่งเป็นสมการอนุพันธ์โดยการอินทิเกรตด้วยวิธีระเบียบวิธีเชิงตัวเลข (numerical method) ผลลัพธ์ที่ได้จะเป็นค่าความเข้มข้นของเซลล์ สารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ ไนโตรเจน และน้ำมันปาล์มที่เปลี่ยนแปลงตามเวลา

4. นำผลลัพธ์ที่ได้ไปคำนวณค่าฟังก์ชันวัตถุประสงค์ (objective function) ซึ่งเป็นค่าความผิดพลาดกำลังสอง (sum square error) ระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการประมาณด้วยสมการทางคณิตศาสตร์ ($\min J = \sum_{i=1}^N (y_{\text{exp}} - y_{\text{estimate}})^2$ โดยที่ J คือ ค่าฟังก์ชันวัตถุประสงค์)

5. นำค่าฟังก์ชันวัตถุประสงค์มาคำนวณค่าฟิตเนส (fitness value) ซึ่งค่าความแข็งแรงเป็นค่าที่ใช้ในวิธีเจเนเนติกเพื่อเป็นตัวกำหนดในการคัดเลือกพารามิเตอร์ชุดใหม่ (พารามิเตอร์ชุดใหม่จะถูกคัดเลือกโดยอาศัยตัวดำเนินการต่างๆ ตามวิธีเจเนเนติก เช่น วิธีการคัดแยกส่วนที่ดีที่สุด (elite) ตัวดำเนินการซีเลคชัน (selection) ตัวดำเนินการครอสโอเวอร์ (crossover) และ

ดำเนินการมิวเตชัน (mutation) เพื่อเปลี่ยนแปลงค่าพารามิเตอร์ในชุดใหม่ให้มีโอกาสได้ค่าฟิตเนสสูงขึ้นและเข้าใกล้คำตอบที่ดีที่สุด)

6. ทำการคำนวณซ้ำตั้งแต่ข้อ 3 ถึงข้อ 5 โดยใช้พารามิเตอร์ในชุดใหม่ซึ่งจะถูกเรียกว่าเป็นพารามิเตอร์ชุดปัจจุบันแทน จนกระทั่งครบตามจำนวนรุ่นประชากรที่กำหนดไว้หรือได้คำตอบที่ดีที่สุดที่ทำให้ค่าความผิดพลาดกำลังสองมีค่าน้อยที่สุด (1 รุ่นประชากรหมายถึง การคำนวณครบ 1 ลูกตั้งแต่ข้อ 3 ถึงข้อ 5)

เมื่อคำนวณจนครบตามจำนวนรุ่นประชากรแล้วแต่ค่าพารามิเตอร์ที่ได้ยังไม่น่าพอใจ อาจจะมีการปรับเปลี่ยนค่าขอบเขตล่างและขอบเขตบนให้กว้างขึ้นหรือแคบลง เพื่อให้มีโอกาสดำเนินการฟิตเนสที่ดีที่สุด

หลังจากทำการหาค่าพารามิเตอร์จากสมการสมมูลมวลที่มีแบบจำลอง Andrews เป็นแบบจำลองแสดงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จนได้คำตอบที่ดีที่สุดแล้ว จะทำการเปลี่ยนแบบจำลองที่ทดสอบเป็นแบบจำลอง logistic เพื่อหาค่าพารามิเตอร์ใหม่ และต่อจากนั้นจะทำการคัดเลือกแบบจำลองโดยพิจารณาจากค่าความผิดพลาดกำลังสองของแต่ละแบบจำลอง

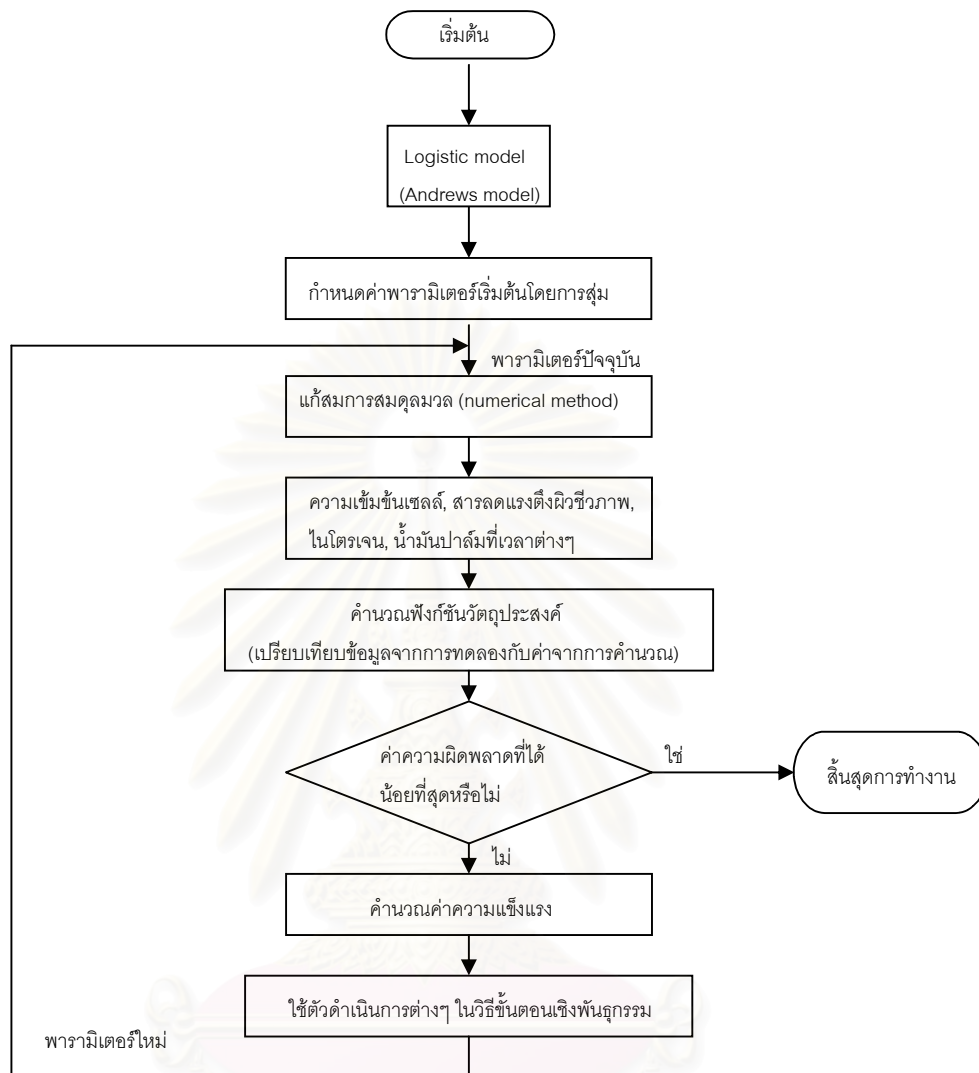
จากนั้นทำการเปลี่ยนข้อมูลผลการทดลองจากอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50 มาเป็น 5, 100, 150 และ 200 เพื่อคัดเลือกแบบจำลองและหาค่าพารามิเตอร์เช่นเดียวกับที่กล่าวไปโดยจะกระทำซ้ำตามขั้นตอนทั้งหมดข้างต้น

ตารางที่ 4.4 สรุปพารามิเตอร์ที่ต้องทำการประมาณค่าของสมการสมมูลมวลและแบบจำลองแต่ละแบบจำลอง

สมการสมมูลมวลและแบบจำลอง	พารามิเตอร์
สมการสมมูลมวล 4 สมการและแบบจำลอง Andrews (แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นสารอาหารจำกัด)	$k_d, \beta, \alpha, m_N, m_{oil}, Y_{X/N}, Y_{X/oil}, Y_{P/oil}$ μ_{max}, K_S, K_{Si}
สมการสมมูลมวล 4 สมการและแบบจำลอง Logistic	$k_d, \beta, \alpha, m_N, m_{oil}, Y_{X/N}, Y_{X/oil}, Y_{P/oil}$ μ_0, X_{max}

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าขอบเขตบนและขอบเขตล่างของพารามิเตอร์แต่ละตัว

พารามิเตอร์	ค่าขอบเขตล่าง	ค่าขอบเขตบน
k_d	0	0.01
α	0	0.7
β	0	0.007
m_N	0	0.01
m_{oil}	0	0.01
$Y_{X/N}$	0.0001	30
$Y_{X/oil}$	0.0001	30
$Y_{P/oil}$	0.0001	30
μ_{max}	0	1.5
K_S	0	500
K_{Si}	0	50
μ_0	0	1
X_{max}	0	100



รูปที่ 4.1 แสดงแผนผังขั้นตอนการหาค่าพารามิเตอร์จากวิธีเจเนติก

4.6 การหาอัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมสำหรับ ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การหาอัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมสำหรับ (optimal feed) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในงานวิจัยนี้ จะทำการศึกษาโดยเลือกใช้แบบจำลอง Andrews ในการอธิบายการเจริญเติบโตของเซลล์ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบเมื่อทำการป้อน สำหรับค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลอง Andrews ที่ใช้จะนำค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (ในหัวข้อที่ 4.5) ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นตั้งแต่ 5 – 200 มาเฉลี่ยกันเพื่ออธิบายการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน C/N ที่เปลี่ยนแปลงไปในถังหมักให้ครอบคลุมมากที่สุด เนื่องจากการหาอัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมโดยวิธีออปติมัลคอนโทรล (optimal control) จะไม่มีการควบคุมและไม่ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน C/N ในถังหมัก ในส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบในสายป้อนจะทำการป้อนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 28.35 และ 300 กรัมต่อลิตรตามลำดับตลอดช่วงการหมัก 30 ชั่วโมง ซึ่งเป็นค่าที่อ้างอิงจากงานวิจัยของเลิศลักษณ์ (2546) ในการคำนวณหาอัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมจะใช้ฟังก์ชัน fmincon ในโปรแกรม MATLAB เวอร์ชัน R2006a

4.6.1 สมการสมดุลมวลของกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

สมมติฐานที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่

- ในสายป้อนเข้าเป็นระบบปอดเชื้อ ไม่มีเซลล์ปะปนอยู่ถือว่า $X_F = 0$
- ในสายป้อนเข้ายังไม่มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น $P_F = 0$
- ความหนาแน่นรวมของสารในระบบไม่มีการเปลี่ยนแปลง
- การผสมของสารในถังหมักทั่วถึงกันจนถือว่าเป็นเนื้อเดียว
- อุณหภูมิ ความดัน และค่าความเป็นกรดต่างในระบบเปลี่ยนแปลงน้อยมากจนถือว่าคงที่
- ออกซิเจนในระบบมีมากเกินไป
- คำนึงถึงอัตราการตายของเซลล์ในระบบ
- จุลินทรีย์มีการใช้ในโตรเจนเพื่อสร้างเซลล์และบำรุงรักษาเซลล์
- จุลินทรีย์มีการใช้น้ำมันปาล์มเพื่อสร้างเซลล์ บำรุงรักษาเซลล์และเปลี่ยนเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

และรูปแบบสมการสมดุลมวลการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องคือ

สมดุลมวลเซลล์

อัตราการสะสมมวลเซลล์ในระบบ = อัตราการป้อนมวลเซลล์เข้า + อัตราการสร้างมวลเซลล์ -
อัตราการตายของเซลล์

$$\begin{aligned}\frac{d(XV)}{dt} &= FX_F + r_X - r_d \\ \therefore \frac{dX}{dt} &= -\frac{F}{V}X + r_X - r_d\end{aligned}\quad (4.5)$$

สมดุลมวลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

อัตราการสะสมมวลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระบบ = อัตราการป้อนมวลสารลดแรงตึงผิว
ชีวภาพเข้า + อัตราการสร้างมวลสารลด
แรงตึงผิวชีวภาพ

$$\begin{aligned}\frac{d(PV)}{dt} &= FP_F + r_P \\ \therefore \frac{dP}{dt} &= -\frac{F}{V}\beta X + \alpha\mu X\end{aligned}\quad (4.6)$$

สมดุลมวลแอมโมเนียมซัลเฟต

อัตราการสะสมมวลแอมโมเนียมซัลเฟตในระบบ = อัตราการป้อนมวลแอมโมเนียมซัลเฟตเข้า
- อัตราการใช้มวลแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อการ
สร้างเซลล์ - อัตราการใช้มวลแอมโมเนียม
ซัลเฟตเพื่อบำรุงรักษาและซ่อมแซมเซลล์

$$\begin{aligned}\frac{d(NV)}{dt} &= FN_F - r_N \\ \therefore \frac{dN}{dt} &= F(N_F - N) - \left(\frac{\mu}{Y_{X/N}}\right)X - m_N X\end{aligned}\quad (4.7)$$

สมดุลมวลน้ำมันปาล์ม

อัตราการสะสมมวลน้ำมันในระบบ = อัตราการป้อนมวลน้ำมัน - อัตราการใช้มวลน้ำมันเพื่อ
การสร้างเซลล์ - อัตราการใช้มวลน้ำมันเพื่อบำรุงรักษา
และซ่อมแซม - อัตราการใช้มวลน้ำมันเพื่อเปลี่ยนเป็น
ผลิตภัณฑ์

$$\frac{d(Oil \cdot V)}{dt} = F \cdot Oil_F - r_{oil}$$

$$\therefore \frac{dOil}{dt} = F(Oil_F - Oil) - \left(\frac{\mu}{Y_{X/oil}} \right) X - m_{oil} X - \left(\frac{\beta X + \alpha \mu X}{Y_{P/oil}} \right) \quad (4.8)$$

และมีฟังก์ชันวัตถุประสงค์ในการหาอัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมัน
ปาล์มดิบคือ อัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมที่ทำให้ได้
ผลิตภัณฑ์สูงที่สุด

$$\max_{F(t)} J = P_{t_f} \cdot V_{t_f}$$

ภายใต้เงื่อนไข

$$0 = F_{\min} \leq F_i(t) \leq F_{\max}$$

หรือ

$$0 \leq F_i(t) \leq 1.5$$

(ลิตรต่อชั่วโมง)

และ

$$V(t_f) \leq V_{\max}$$

หรือ

$$V(t_f) \leq 7$$

(ลิตร)

4.6.2 ขั้นตอนการหาอัตราการป้อนสารที่เหมาะสม

ในการคำนวณหาอัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมในงานวิจัยนี้ใช้ฟังก์ชัน `fmincon` ในโปรแกรม MATLAB เวอร์ชัน R2006a ซึ่งมีขั้นตอนการทำงานดังนี้

1. แบ่งค่าตัวแปร F ที่ทำการศึกษาออกเป็น 10 ช่วง ช่วงละ 3 ชั่วโมง จะได้เป็น $F_1, F_2, F_3, \dots, F_{10}$ (เวลาในการหมัก 30 ชั่วโมง)
2. กำหนดค่าตัวแปร F เริ่มต้นทั้ง 10 ค่าจากการคาดเดา
3. ตัวแปร F จะถูกแทนลงในสมการสมดุลมวลของกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง
4. แก้สมการสมดุลมวลโดยการอินทิเกรตด้วยระเบียบวิธีเชิงตัวเลข
5. คำนวณค่าฟังก์ชันวัตถุประสงค์ ภายใต้เงื่อนไขที่กำหนด
6. ตรวจสอบค่าฟังก์ชันวัตถุประสงค์ว่าได้สูงสุดหรือไม่ ถ้าใช่โปรแกรมจะหยุดคำนวณ แต่ถ้าไม่ใช่โปรแกรมจะทำการคำนวณต่อไปโดยทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 2 ถึงข้อ 6 จนกระทั่งได้ค่าฟังก์ชันวัตถุประสงค์สูงสุด

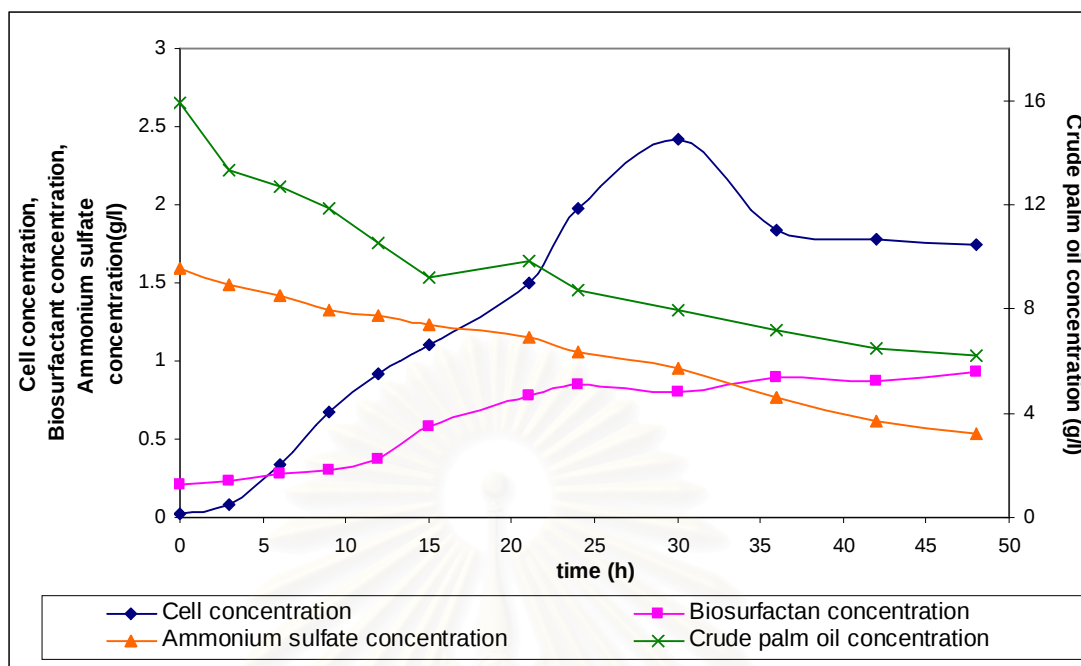
บทที่ 5

ผลการทดลอง

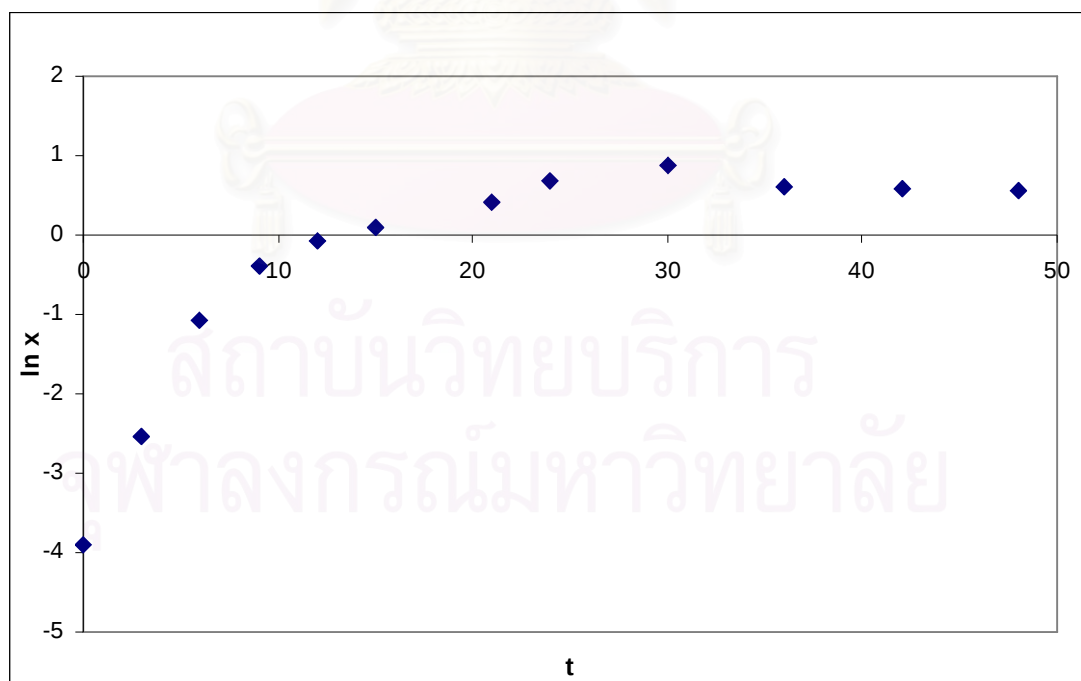
5.1 ผลการทดลองการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในขวดรูปชมพู่เขย่า

จากการทดลองการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ในขวดรูปชมพู่ที่มีปริมาตรของเหลวเท่ากับ 100 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีน้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการศึกษาอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) เริ่มต้น 5 ค่าได้แก่ 5, 50, 100, 150 และ 200 ทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ไนโตรเจน น้ำมันปาล์ม (ดังในหัวข้อที่ 4.3) และคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ อัตราการใช้น้ำมันปาล์มดิบจำเพาะและอัตราการใช้ไนโตรเจนจำเพาะ เพื่อหาอัตราส่วน C/N เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งผลการทดลองของแต่ละอัตราส่วน C/N เริ่มต้น พบว่ามีรูปแบบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ตามตัวอย่างผลการทดลองที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50 ตามรูปที่ 5.1 และ 5.2

จากผลการทดลองรูปที่ 5.1 จะเห็นว่าจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องแต่หลังจากเวลาการหมักผ่านไป 30 ชั่วโมงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะค่อยๆ ลดลงและคงที่ และเมื่อพิจารณากราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln X$ กับเวลาตามรูปที่ 5.2 จะพบว่าจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตแบบทวีคูณในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการหมัก ซึ่งเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์มีการใช้ทั้งแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตในช่วงทวีคูณ แม้ว่าน้ำมันปาล์มดิบซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนมีลักษณะแยกชั้นกับชั้นน้ำหมัก แต่อาจมีปริมาณน้ำมันปาล์มบางส่วนที่สามารถรวมตัวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เกิดขึ้นในรูปไมเซลล์และผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ ส่วนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามรูปที่ 5.1 จะเห็นว่าการผลิตทั้งในช่วงที่จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและช่วงที่จุลินทรีย์ไม่มีการเจริญเติบโต รูปแบบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลักษณะนี้เรียกว่า การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบผสม (mixed growth associated product) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Haba และคณะ (2000) งานวิจัยของ Rahman และคณะ (2002) และงานวิจัยของ Santa และคณะ (2002) ที่พบว่าจุลินทรีย์ *P. aeruginosa* 47T2 NCIB



รูปที่ 5.1 แสดงผลของการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 7.5 ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50



รูปที่ 5.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln X$ กับเวลาของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 7.5 ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50

40044 , *P. aeruginosa* และ *P. aeruginosa* PA1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ทั้งในช่วงที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตแบบพหุคูณและในระยะพัก

5.1.1 ผลของอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) เริ่มต้นที่มีต่อ อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ อัตราการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจำเพาะและอัตราการใช้ไขมันปาล์มดิบจำเพาะ

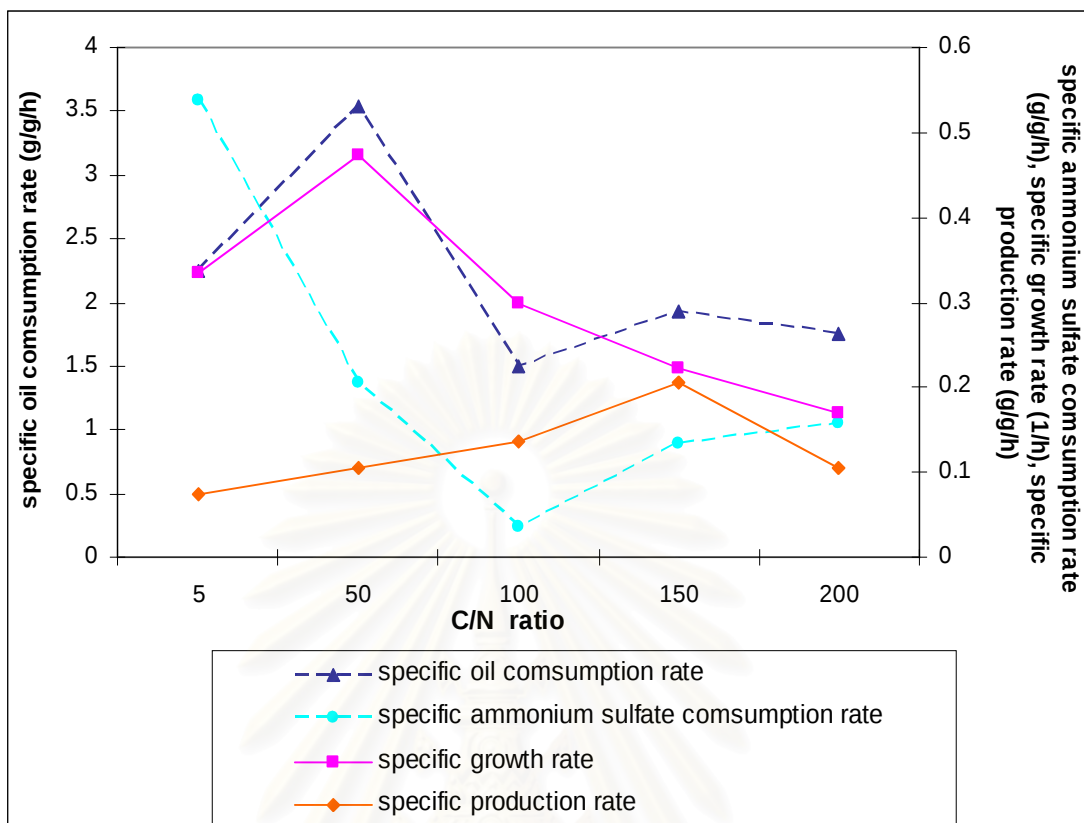
เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 5 – 200 ตามกราฟรูปที่ 5.3 พบว่าที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 0.472 ต่อชั่วโมง และที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150 อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 0.201 กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วน C/N เริ่มต้นต่างกันมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่เป็นเช่นนี้ เพราะที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50 มีไนโตรเจนอยู่มากเพียงพอ จุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและการสร้างเซลล์เพราะไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์ ทำให้ที่อัตราส่วนนี้มีการผลิตเซลล์ได้มาก ซึ่งสังเกตได้จากค่าอัตราการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจำเพาะที่มีค่าสูงที่อัตราส่วน C/N 50 นี้จึงยังสนับสนุนว่ามีการใช้ไนโตรเจนไปเพื่อเจริญเติบโตและสร้างเซลล์ เมื่อพิจารณาอัตราการใช้ไขมันปาล์มดิบจำเพาะร่วมด้วยพบว่าที่อัตราส่วน C/N 50 มีอัตราการใช้ไขมันปาล์มดิบที่สูงที่สุด เป็นไปได้ว่าไขมันที่ถูกใช้ไปจะนำไปเพื่อใช้ในการสร้างเซลล์เพราะไขมันซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนจะถูกใช้ผ่านวัฏจักรเครบเปลี่ยนเป็นกลูโคสออกมาเพื่อให้พลังงานและนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Sekelsky และ Shreve, 1998) จึงยังส่งเสริมให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้ดี ในขณะที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150 มีปริมาณไนโตรเจนต่ำสัดส่วนของคาร์บอนกับไนโตรเจนที่มีอยู่ต่างกันมาก ทำให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับการนำไนโตรเจนไปใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างเซลล์ จุลินทรีย์จึงหันมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อเป็นตัวนำแหล่งอาหารคาร์บอนเข้าสู่เซลล์สำหรับนำไปใช้ในการเติบโตมากขึ้นแทน ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์กรดไขมันจะถูกนำไปใช้ผ่านกระบวนการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาและนำไขมันซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเข้าสู่เซลล์ไปใช้ในการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากขึ้น ดังนั้นที่อัตราส่วน C/N 150 จุลินทรีย์จึงผลิตสารลดแรงตึงผิวได้มากกว่าเมื่อเทียบกับที่อัตราส่วนอื่น

นอกจากนี้อัตราส่วน C/N เริ่มต้นยังมีผลต่อความเข้มข้นของเซลล์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เมื่อสิ้นสุดการหมักตามตารางที่ 5.1 พบว่าที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 5 และ 50 ปริมาณเซลล์ที่ได้สูงกว่าที่อัตราส่วน C/N 100, 150 และ 200 เนื่องจากมีปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นมากกว่าทำให้จุลินทรีย์เติบโตได้ดีกว่าและผลิตเซลล์ได้มากกว่า เช่นเดียวกับที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150 ซึ่งมีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เวลาสุดท้ายเป็นเพราะมีปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นน้อยกว่าทำให้จุลินทรีย์มีไนโตรเจนไม่เพียงพอต่อการเติบโต จึงมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับวิจัยของ Singh และ คณะ (1990) และ Benincasa และคณะ (2001) สนับสนุนว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาได้ดีในช่วงสภาวะที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนหรือปริมาณไนโตรเจนต่ำ

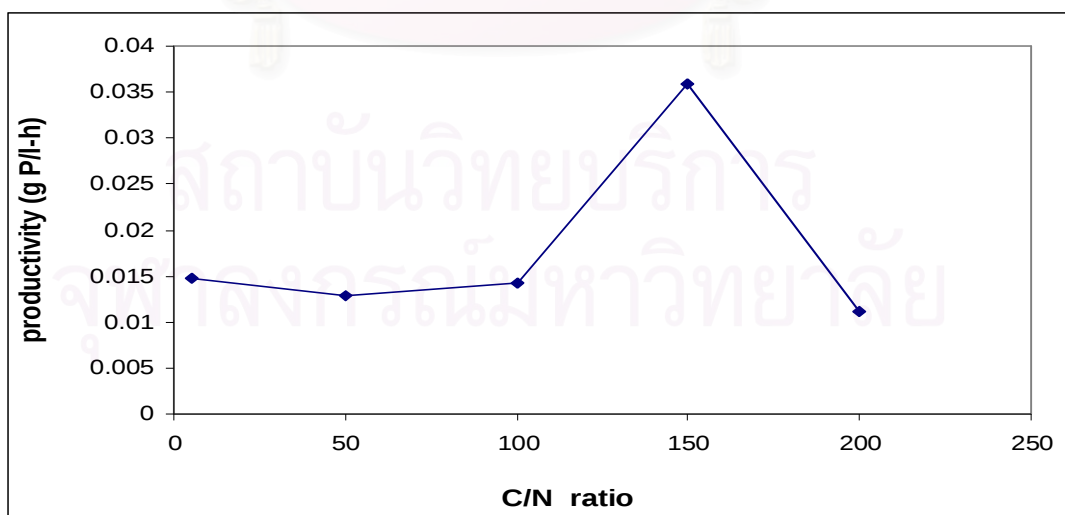
เมื่อวิเคราะห์ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะตามกราฟรูปที่ 5.3 จะเห็นได้ว่าเป็นไปตามที่กล่าวไว้คือเมื่ออัตราส่วน C/N เริ่มต้นต่ำอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจะมีค่าสูง แต่เมื่ออัตราส่วน C/N เริ่มต้นสูงขึ้นอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ได้จะมีค่าต่ำลง โดยมีค่าต่ำที่สุดที่อัตราส่วน C/N 200 เท่ากับ 0.169 ต่อชั่วโมงซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่าสูงสุดอยู่เท่ากับ 179.29 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งตรงข้ามกับกับอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะที่มีค่าสูงขึ้นตามอัตราส่วน C/N เริ่มต้นที่เพิ่มขึ้น โดยการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะมีค่าต่ำที่สุดที่อัตราส่วน C/N 5 เท่ากับ 0.074 กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมงซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่าสูงสุดอยู่เท่ากับ 171.62 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้ยังสอดคล้องกับค่าอัตราผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (productivity) ตามกราฟรูปที่ 5.4 ที่พบว่าอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150 มีค่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อเวลาสูงที่สุดเท่ากับ 0.036 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นค่าอื่นๆ อย่างชัดเจน

ตารางที่ 5.1 แสดงความเข้มข้นของเซลล์และสารลดแรงตึงผิวที่เวลาสุดท้ายของการหมักคือ 48 ชั่วโมงที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นต่างๆ

ความเข้มข้นที่เวลา 48 ชม.	C/N 5	C/N 50	C/N 100	C/N 150	C/N 200
เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	1.76	1.74	1.28	1.01	0.54
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	0.88	0.93	0.68	1.06	0.74



รูปที่ 5.3 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ อัตราการใช้ น้ำมันปาล์มดิบจำเพาะและอัตราการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจำเพาะที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อ ไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 5-200 เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่าที่ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 7.5



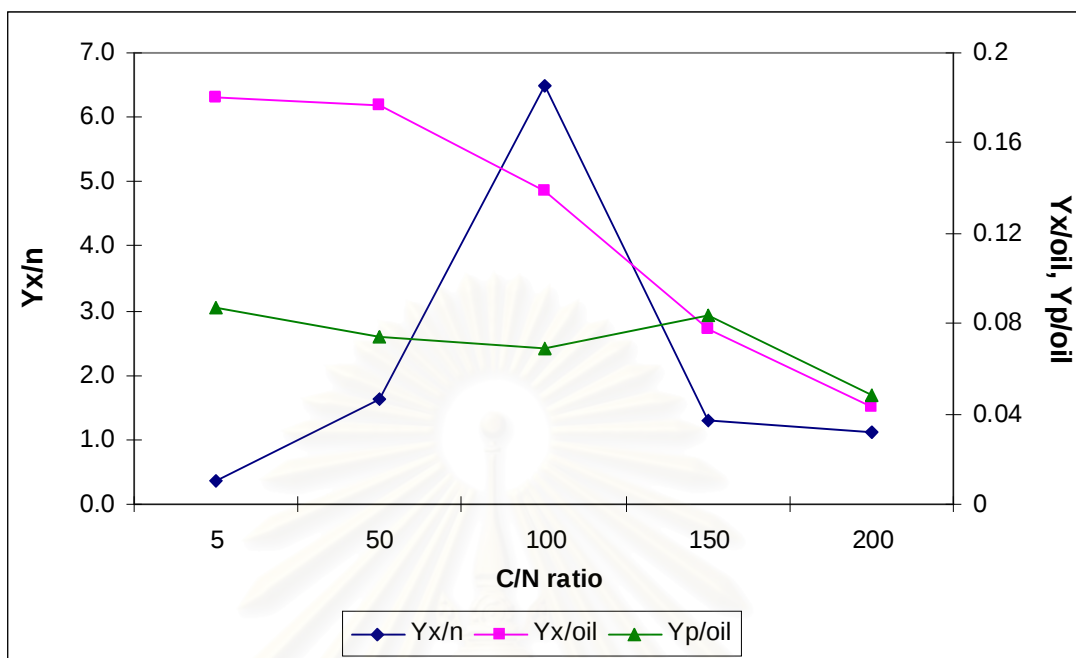
รูปที่ 5.4 แสดงอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อเวลา (productivity) ที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่าง คาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 5-200 เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ในขวดรูปชมพู่ เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 7.5

และเมื่อพิจารณาค่าอัตราการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจำเพาะพบว่ามีอัตราการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจำเพาะสูงที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นต่ำ ซึ่งมีค่าสูงที่สุดที่อัตราส่วน C/N 5 เท่ากับ 0.538 กรัมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง และมีค่าต่ำที่สุดที่อัตราส่วน C/N 100 เท่ากับ 0.0349 กรัมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมงต่ำกว่าค่าสูงสุดอยู่เท่ากับ 1441.55 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอัตราการใช้ไขมันปาล์มดิบจำเพาะมีค่าสูงที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นต่ำเช่นกัน โดยมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ เท่ากับ 3.546 กรัมไขมันปาล์มต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมงที่อัตราส่วน C/N 50 และมีค่าต่ำที่สุดที่อัตราส่วน C/N 100 เท่ากับ 1.497 กรัมไขมันปาล์มต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมงซึ่งต่ำกว่าค่าสูงสุดอยู่เท่ากับ 136.87 เปอร์เซ็นต์

จากผลที่กล่าวมาทั้งหมดสรุปได้ว่าอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50 เหมาะกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150 เหมาะกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

5.1.2 ผลของอัตราส่วนโดยโมระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) เริ่มต้นที่มีต่อค่าผลได้ของเซลล์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อสารอาหาร

สำหรับค่าผลได้ของเซลล์ต่อแอมโมเนียมซัลเฟต ค่าผลได้ของเซลล์ต่อน้ำมันปาล์มดิบ และค่าผลได้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อน้ำมันปาล์มดิบเมื่อคิดที่เวลาสุดท้ายของการหมัก ตามกราฟรูป 5.6 พบว่าที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 100 มีค่าผลได้ของเซลล์จากแอมโมเนียมซัลเฟตสูงที่สุดเท่ากับ 6.496 กรัมต่อกรัม แสดงว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีอยู่ในระบบถูกเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ได้สูงที่สุดที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 100 เมื่อพิจารณาค่าผลได้ของเซลล์ต่อน้ำมันปาล์มดิบจะเห็นว่ามีค่าลดลงตามอัตราส่วน C/N เริ่มต้นที่เพิ่มขึ้น ส่วนค่าผลได้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อน้ำมันปาล์มดิบมีค่าใกล้เคียงกันที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 5 – 150 แต่ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 200 ค่าผลได้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อน้ำมันปาล์มดิบมีค่าลดลงมาก เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกเปลี่ยนไปเซลล์กับปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกเปลี่ยนไปสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเห็นว่าที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 5 – 100 ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกเปลี่ยนไปเซลล์มีค่าสูงกว่าปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกเปลี่ยนไปสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แต่ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150 และ 200 ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกเปลี่ยนไปสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่าสูงกว่าเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นต่ำปริมาณน้ำมันปาล์มถูกใช้เพื่อการเจริญเติบโตมากกว่า ส่วนที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นสูงปริมาณน้ำมันปาล์มถูกใช้เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากกว่า



รูปที่ 5.5 แสดงค่าผลได้ของเซลล์ต่อแอมโมเนียมซัลเฟต ($Y_{x/n}$) ค่าผลได้ของเซลล์ต่อน้ำมันปาล์มดิบ ($Y_{x/oil}$) และค่าผลได้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อน้ำมันปาล์มดิบ ($Y_{p/oil}$) เมื่อคิดที่เวลาสุดท้ายของการหมักที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 5-200 เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 7.5

5.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์

จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่าที่มีปริมาตรของเหลว 100 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 7.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยน้ำมันปาล์มดิบเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตรและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่างกัน 9 ค่า ได้แก่ 0.42, 0.55, 0.83, 1.66, 5.56, 8.34, 13.90, 16.68 และ 20.85 กรัมต่อลิตร เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการเลือกแบบจำลองที่เหมาะสมที่สามารถอธิบายผลของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ในช่วงการเติบโตแบบทวีคูณของจุลินทรีย์ ซึ่งแบบจำลองที่นำมาคัดเลือกมีทั้งหมด 8 แบบจำลอง ประกอบด้วยแบบจำลอง Monod แบบจำลอง Moser แบบจำลอง Teissier แบบจำลอง Mason & Milles เป็นแบบจำลองที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะขึ้นอยู่กับสารอาหารจำกัดชนิดเดียวโดยไม่คำนึงถึงผลการเกิดการยับยั้งจากเซลล์หรือสารอาหาร และแบบจำลอง Contois แบบจำลอง Andrew แบบจำลอง Luong และแบบจำลอง Edward เป็นแบบจำลองที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะขึ้นอยู่กับสารอาหารจำกัดชนิดเดียวและคำนึงถึงผลจากการเกิดการยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตจากเซลล์หรือสารอาหาร ผลการทดสอบแบบจำลอง ค่าพารามิเตอร์และค่าความผิดพลาดซึ่งเกิดจากผลต่างระหว่างค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากการทดลองกับค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ได้จากการคำนวณกำลังสองของแต่ละแบบจำลองแสดงอยู่ในตารางที่ 5.2 และกราฟที่ 5.6 และ 5.7

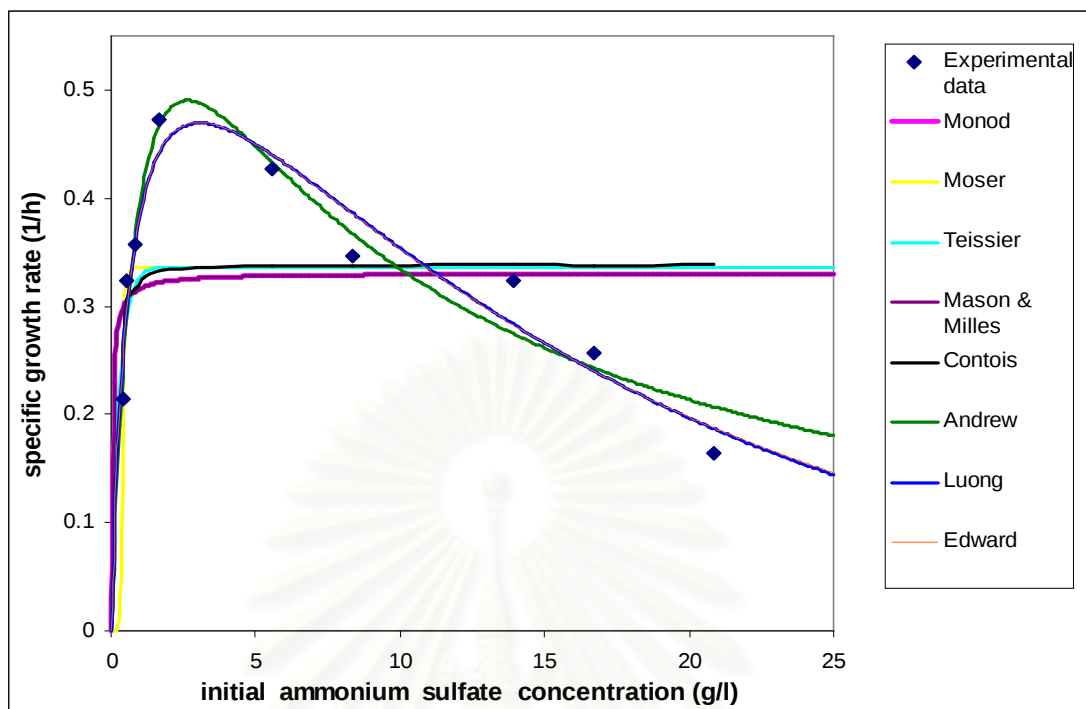
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.2 แสดงผลการทดสอบแบบจำลอง ค่าพารามิเตอร์และค่าความผิดพลาดของแบบจำลอง 8 แบบจำลอง

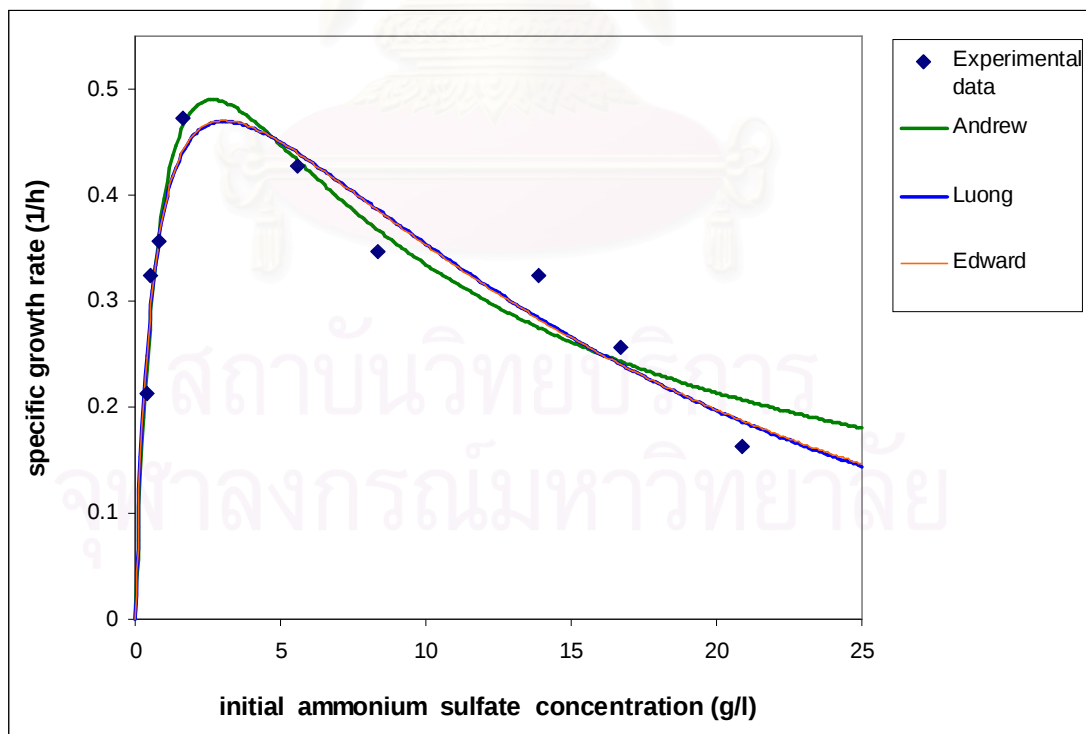
แบบจำลอง	สมการแบบจำลอง	ค่าพารามิเตอร์						ค่าความผิดพลาด $err = \sum_{i=1}^N (\mu_{\text{exp}} - \mu_{\text{predicted}})^2$
		μ_{max}	K_S	n	K_D	K_{Si}	S_m	
Monod	$\mu = \mu_{\text{max}} \frac{S}{S + K_S}$	0.3306	0.0442	-	-	-	-	0.0752
Moser	$\mu = \mu_{\text{max}} \frac{S^n}{K_S^n + S^n}$	0.3354	0.0001	9.9907	-	-	-	0.0637
Teissier	$\mu = \mu_{\text{max}} (1 - e^{-S/K_S})$	0.3363	0.2755	-	-	-	-	0.0682
Mason & Milles	$\mu = \mu_{\text{max}} \left(\frac{S}{K_S + S} + K_D S \right)$	0.3306	0.0442	-	-	-	-	0.0752
Contois	$\mu = \mu_{\text{max}} \left(\frac{S}{K_S X + S} \right)$	0.3397	1.5967	-	-	-	-	0.0678
Andrew	$\mu = \mu_{\text{max}} \frac{S}{S + K_S + S^2/K_{Si}}$	0.9008	1.1009	-	-	6.3216	-	0.0068
Luong	$\mu = \mu_{\text{max}} \frac{S}{S + K_S} \left(1 - \frac{S}{S_m} \right)^n$	0.6885	0.6846	18.861	-	-	319.57	0.0073
Edward	$\mu = \mu_{\text{max}} \frac{S}{S + K_S} (e^{-S/K_{Si}})$	0.6969	0.6993	-	-	16.306	-	0.0073

จากตารางที่ 5.2 พบว่าแบบจำลอง Monod แบบจำลอง Moser แบบจำลอง Teissier แบบจำลอง Mason & Milles รวมทั้งแบบจำลอง Contois ให้ค่าความผิดพลาดสูงกว่าแบบจำลอง Andrew แบบจำลอง Luong และแบบจำลอง Edward โดยเฉลี่ยประมาณ 10 เท่าและเมื่อพิจารณาจากกราฟที่ 5.7 จะเห็นว่าแบบจำลอง Monod แบบจำลอง Moser แบบจำลอง Teissier แบบจำลอง Mason & Milles และแบบจำลอง Contois สามารถอธิบายผลความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะกับความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นได้เฉพาะช่วงที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่ำกว่า 0.5 กรัมต่อลิตร เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นมีค่าสูงกว่า 0.5 กรัมต่อลิตร แบบจำลองเหล่านั้นให้ผลการประมาณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะคลาดเคลื่อนไปจากค่าที่ได้จากผลการทดลองมาก ในขณะที่แบบจำลอง Andrew แบบจำลอง Luong และแบบจำลอง Edward ซึ่งเป็นแบบจำลองที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะขึ้นอยู่กับสารอาหารจำกัดชนิดเดียวและคำนึงถึงผลของการยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตจากสารอาหาร สามารถอธิบายผลความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะกับความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นได้ดีตลอดทั้งช่วงการทดลอง ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่คำนวณได้จากทั้ง 3 แบบจำลองมีค่าใกล้เคียงกับค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากการทดลอง

หากพิจารณาเฉพาะแบบจำลอง Andrew แบบจำลอง Luong และแบบจำลอง Edward ตามกราฟรูปที่ 5.8 จะเห็นว่าแบบจำลอง Andrew ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่คำนวณสอดคล้องและมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากการทดลองมากกว่าแบบจำลอง Luong และแบบจำลอง Edward เนื่องจากแบบจำลองทั้ง 2 แบบจำลองนั้นประมาณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นช่วง 1.5 – 3 กรัมต่อลิตรคลาดเคลื่อนไปโดยประมาณได้ต่ำกว่าค่าจริง ดังนั้นแบบจำลอง Andrew จึงเป็นแบบจำลองที่อธิบายผลของค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นได้ดีทั้งในช่วงที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่ำกว่า 3 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นช่วงที่ยังไม่เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จากสารอาหาร และช่วงที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นสูงกว่า 3 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นช่วงที่เริ่มเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จากสารอาหาร และยังให้ค่าความผิดพลาดต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทุกแบบจำลอง เพราะฉะนั้นจึงเลือกแบบจำลอง Andrew ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 5.6 แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากทดลองและค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากคำนวณจากแบบจำลอง 8 แบบจำลองที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.42, 0.55, 0.83, 1.66, 5.56, 8.34, 13.90, 16.68 และ 20.85 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 5.7 แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากทดลองและค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากคำนวณจากแบบจำลอง 3 แบบจำลองที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.42, 0.55, 0.83, 1.66, 5.56, 8.34, 13.90, 16.68 และ 20.85 กรัมต่อลิตร

5.3 ผลการเลือกแบบจำลองที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ในงานวิจัยส่วนนี้เป็นการนำผลการทดลองการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขบวนการหมักที่มีปริมาตรของเหลว 100 มิลลิลิตร ในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง เริ่มต้น 7.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีน้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นต่างกัน 5 ค่าได้แก่ 5, 50, 100, 150 และ 200 (ให้ความเข้มข้นน้ำมันปาล์มดิบคงที่แต่เปลี่ยนความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต) ไปใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกแบบจำลองที่เหมาะสมเพื่อสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

แบบจำลองที่นำมาคัดเลือกในส่วนนี้มี 2 แบบจำลองคือ แบบจำลอง Andrews และแบบจำลอง Logistic แบบจำลอง Andrews เป็นแบบจำลองที่ได้จากการศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในหัวข้อ 5.2 จึงนำแบบจำลองนี้มาใช้ในการศึกษาต่อเพื่อหาแบบจำลองที่เหมาะสมสำหรับอธิบายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบตามเวลาตลอดช่วงการหมัก 0 – 48 ชั่วโมง ในขบวนการหมัก โดยเปรียบเทียบกับแบบจำลอง Logistic ซึ่งอ้างอิงมาจากการวิจัยของ Ochoa และ Casas (1999) ที่ใช้แบบจำลองในการอธิบายการผลิตไซโฟโรลิปิดจาก *Candida bombicola* การที่แบบจำลอง Logistic ไม่ถูกนำไปใช้ในการศึกษาผลความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในหัวข้อ 5.2 นั้นเนื่องจากแบบจำลอง Logistic เป็นแบบจำลองที่อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ไม่ขึ้นอยู่กับสารอาหารที่มีอยู่แต่จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเซลล์เพียงอย่างเดียว ดังนั้นแบบจำลอง Logistic จึงไม่สามารถอธิบายผลของสารอาหารเริ่มต้นที่มีต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะได้ แบบจำลอง Logistic จึงถูกนำมาใช้ทดสอบหาแบบจำลองที่เหมาะสมในส่วนนี้

สำหรับค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลอง Andrews ที่ได้จากการเลือกแบบจำลองในหัวข้อที่ผ่านมา จะไม่มีการนำมาใช้ต่อการทดสอบแบบจำลองในส่วนนี้เพราะค่าพารามิเตอร์ที่ได้เป็นผลมาจากการการศึกษาค้นคว้าผลความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในช่วงการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (exponential phase) ที่เวลา 6 ชั่วโมงแรกเท่านั้น

ทำให้พารามิเตอร์ชุดนั้นไม่สามารถนำมาใช้อธิบายการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และสารอาหารตลอดทั้งช่วงการหมัก 48 ชั่วโมงได้ ดังนั้นการทดสอบแบบจำลองในหัวข้อนี้จะทำการหาค่าพารามิเตอร์ของ Andrews ใหม่

การทดสอบแบบจำลองเพื่อหาแบบจำลองที่เหมาะสมจะใช้วิธีเจเนเนติกโดยอาศัยกล่องเครื่องมือวิธีเจเนเนติก (genetic algorithm toolbox) ในโปรแกรม MATLAB เวอร์ชัน R2006a ซึ่งมีฟังก์ชันวัตถุประสงค์เป็นผลรวมของค่าความแตกต่างระหว่างผลการทดลองกับค่าจากการคำนวณกำลังสองน้อยที่สุด ผลที่ได้แสดงตามตารางที่ 5.3

ตารางที่ 5.3 แสดงผลรวมของค่าความผิดพลาดกำลังสองจากการทดสอบแบบจำลอง

Andrews และแบบจำลอง Logistic ที่นำไปใช้อธิบายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบตลอดช่วงการหมัก 48 ชั่วโมงในขวดรูปชมพู่ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 5, 50, 100, 150 และ 200

แบบจำลอง	ผลรวมของค่าความผิดพลาดกำลังสอง (sum of square error)				
	C/N 5	C/N 50	C/N 100	C/N 150	C/N 200
Andrews $\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s + S^2/K_{Si}}$	63.86	20.1	3.71	6.43	9.80
Logistic $\mu = \mu_0 \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$	10.15	9.54	2.03	5.48	4.55

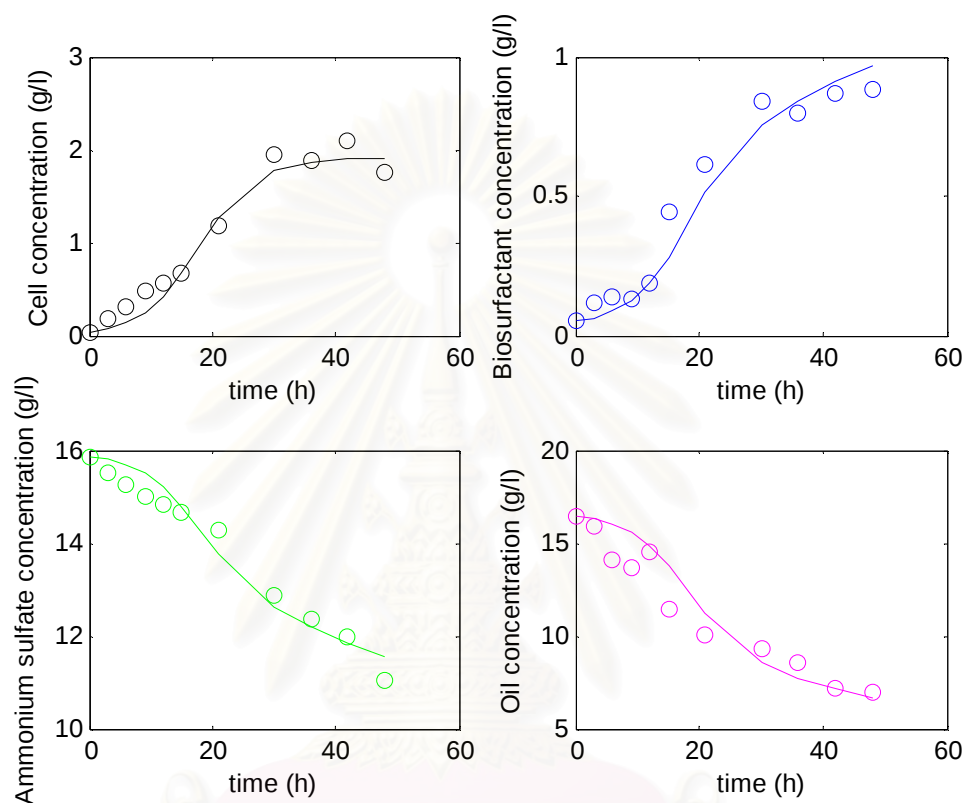
เมื่อเปรียบเทียบค่าความผิดพลาดของอัตราส่วน C/N เริ่มต้น 5 – 200 ตามตารางที่ 5.3 พบว่าแบบจำลอง Logistic ให้ค่าความผิดพลาดต่ำกว่าแบบจำลอง Andrews ทุกอัตราส่วน C/N และเมื่อพิจารณากาแฟผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการคำนวณจากแบบจำลอง Logistic ตามรูปที่ 5.8 – 5.12 พบว่าแบบจำลอง Logistic สามารถอธิบายผลการเจริญเติบโตของเซลล์ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบตลอดการหมัก 48 ชั่วโมงได้ดีทุกอัตราส่วน C/N ในขณะที่แบบจำลอง Andrews สามารถอธิบายผลได้ดีเฉพาะช่วงที่อัตราส่วน C/N มีค่าสูงเท่ากับ 150 และ 200 ตามกราฟรูปที่ 5.13-5.17

เมื่อนำแบบจำลอง Logistic มาอธิบายผลการทดลองที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 5, 50 และ 100 (กราฟรูปวงกลมหมายถึงผลการทดลองในรูปที่ 5.8 – 5.10) พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตช้าลงและเข้าสู่ระยะพักก่อนที่แอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นสารอาหารจำกัดจะหมดสาเหตุหนึ่งอาจมาจากความเข้มข้นของเซลล์ที่สูงขึ้นเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตสอดคล้องตามแบบจำลอง Logistic ส่วนที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150 และ 200 ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟตมีค่าต่ำจึงถูกใช้หมดไปก่อนสิ้นสุดการหมัก ดังนั้นการที่เซลล์เจริญเติบโตช้าลงอาจเป็นผลมาจากการที่สารอาหารจำกัดหมดหรือจากความเข้มข้นของเซลล์ที่สูงขึ้นก็ได้

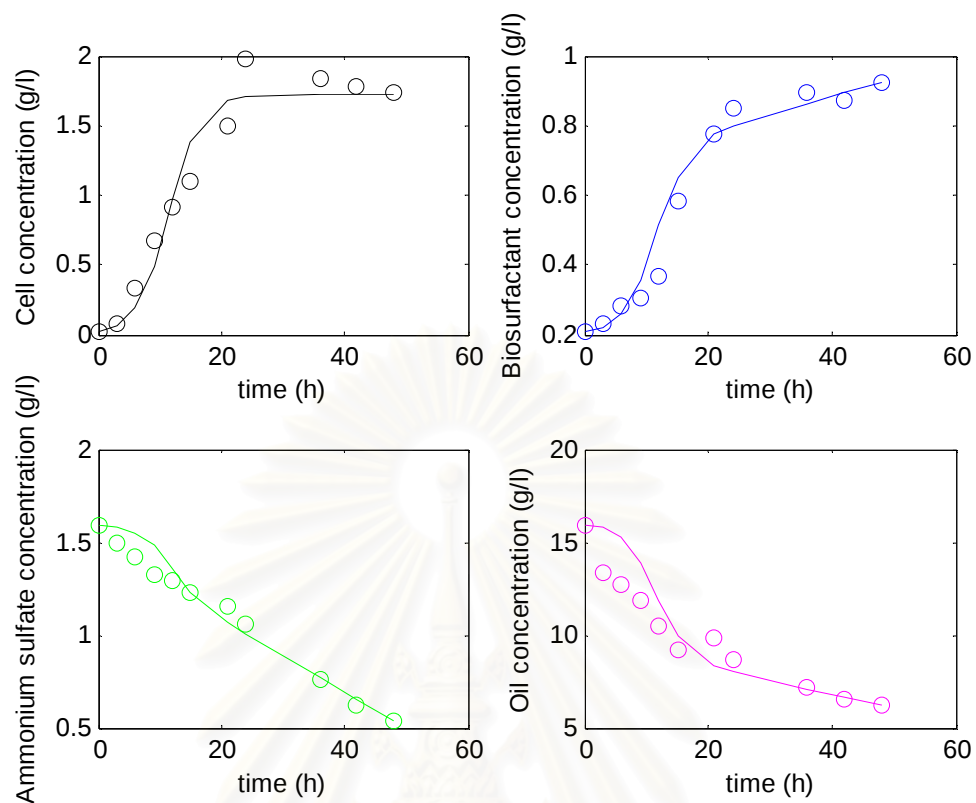
และถ้าพิจารณาการนำแบบจำลองไปใช้ศึกษาต่อในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องพบว่าแบบจำลอง Logistic ไม่เหมาะสมกับการนำไปหาอัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมเนื่องจากแบบจำลอง Logistic เป็นแบบจำลองที่อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่ขึ้นอยู่กับสารอาหารแต่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเซลล์ เซลล์จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยความเข้มข้นสูงสุดของเซลล์ แม้ว่าจะมีการเติมสารอาหารเข้าไปในระบบก็ไม่มีผลทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้มากขึ้น ดังนั้นการพิจารณาผลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อทำการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบเข้าไปในกระบวนการหมักจึงควรเลือกแบบจำลองที่มีการคำนึงถึงผลจากสารอาหารในการศึกษามากกว่า ด้วยเหตุผลนี้จึงเลือกแบบจำลอง Andrews ในการศึกษาหาอัตราการป้อนที่เหมาะสมต่อไป และเนื่องจากการหาอัตราการป้อนที่เหมาะสม (optimal feed) จะใช้วิธีหาค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสม (optimal control) ซึ่งไม่คำนึงถึงการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน C/N ในถังหมัก การใช้ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากอัตราส่วน C/N ค่าใดค่าหนึ่งอาจจะไม่สามารถอธิบายผลจากการเปลี่ยนแปลง C/N ที่เกิดขึ้นในถังหมักได้ครอบคลุม ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้การเฉลี่ยค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากทุกอัตราส่วน C/N 5 – 200 ในการหาอัตราการป้อนที่เหมาะสมในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

จากที่กล่าวมาทั้งหมดสรุปได้ว่า แบบจำลอง Logistic สามารถอธิบายผลการเจริญเติบโตของเซลล์ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบตลอดการหมักได้ดีทุกอัตราส่วน C/N ส่วนแบบจำลอง Andrews สามารถอธิบายผลได้ดีที่อัตราส่วน C/N เท่ากับ 150 และ 200 และในการศึกษาอัตราการป้อนที่เหมาะสมจะเลือกแบบจำลอง Andrews เนื่องจากเป็นแบบจำลองที่มีการคำนึงถึงผลของสารอาหารต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

ผลการนำแบบจำลอง Logistic ในการอธิบายผลการเจริญเติบโตของเซลล์ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบตลอดการหมัก 0 - 48 ชั่วโมง

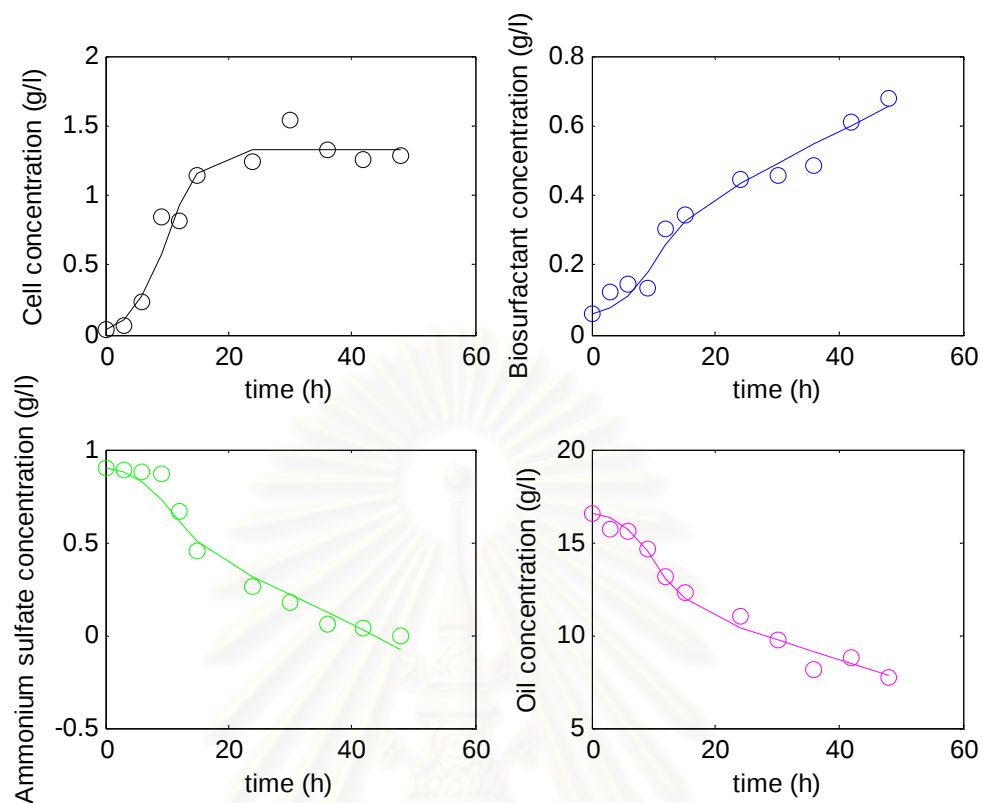


รูปที่ 5.8 แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง Logistic กรณีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 5 (กราฟวงกลมหมายถึงผลการทดลองและกราฟเส้นหมายถึงค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง)



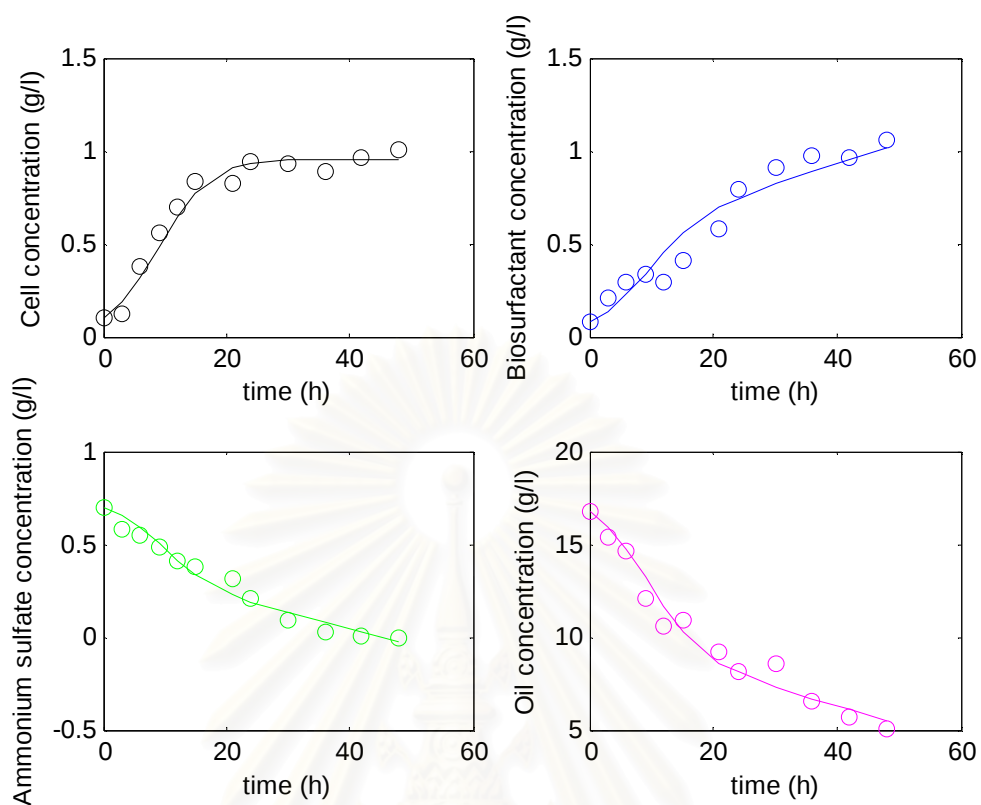
รูปที่ 5.9 แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง Logistic กรณีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 50 (กราฟวงกลมหมายถึงผลการทดลองและกราฟเส้นหมายถึงค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



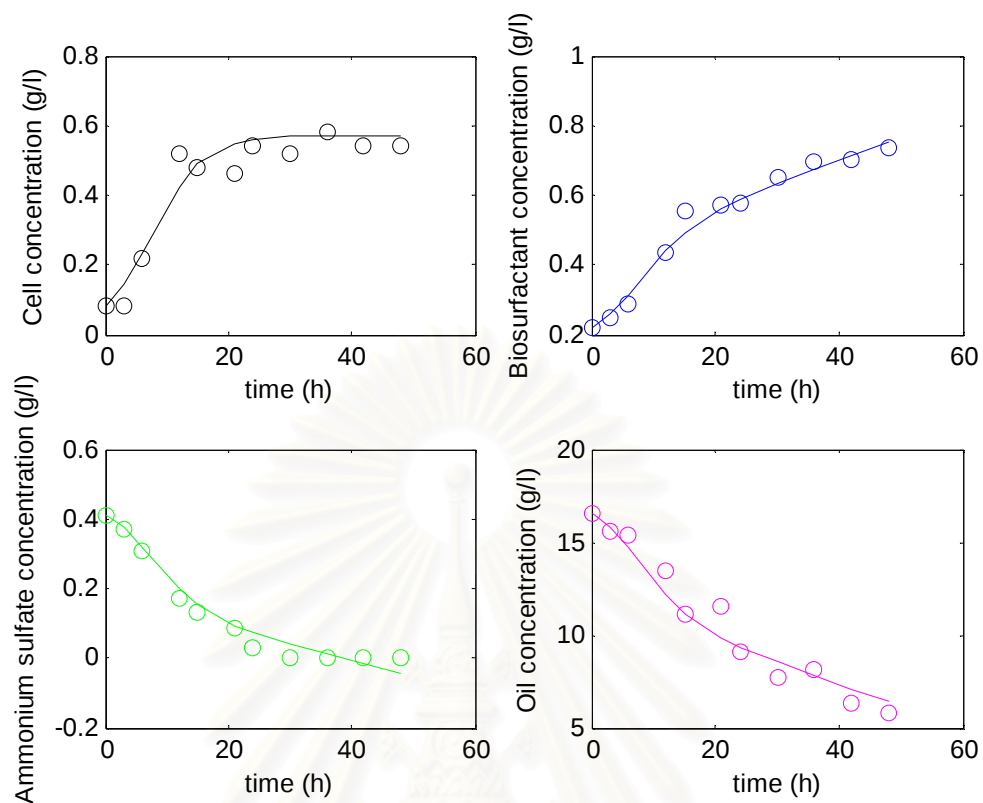
รูปที่ 5.10 แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง Logistic กรณีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 100 (กราฟวงกลมหมายถึงผลการทดลองและกราฟเส้นหมายถึงค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.11 แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง Logistic กรณีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 150 (กราฟวงกลมหมายถึงผลการทดลองและกราฟเส้นหมายถึงค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



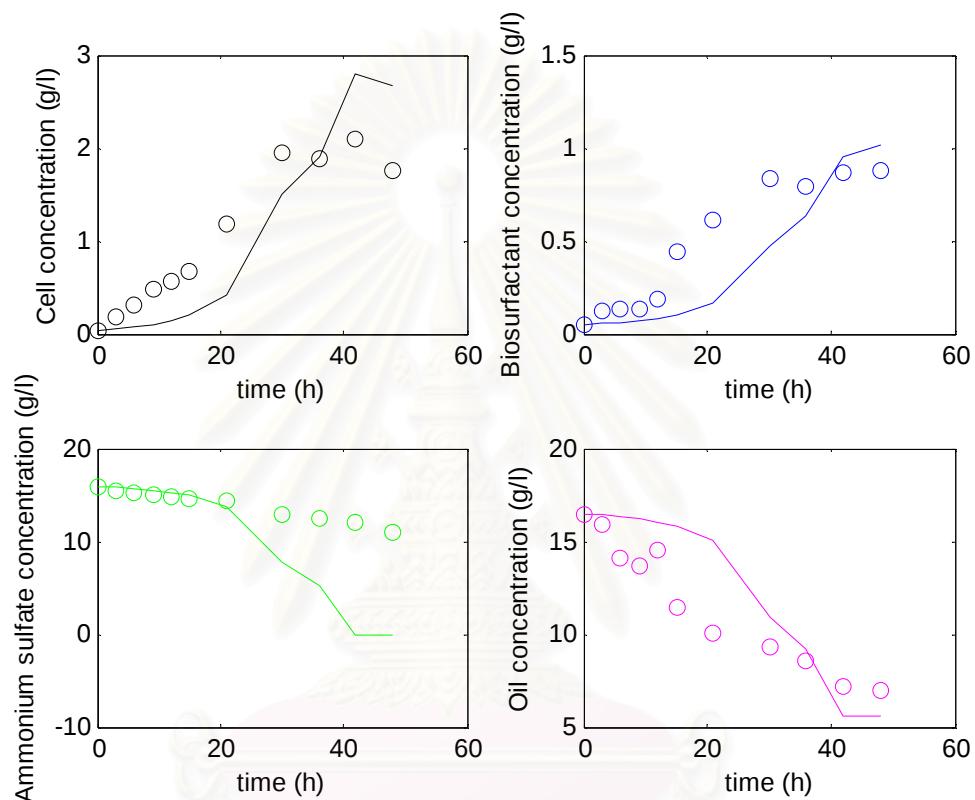
รูปที่ 5.12 แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง Logistic กรณีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 200 (กราฟวงกลมหมายถึงผลการทดลองและกราฟเส้นหมายถึงค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

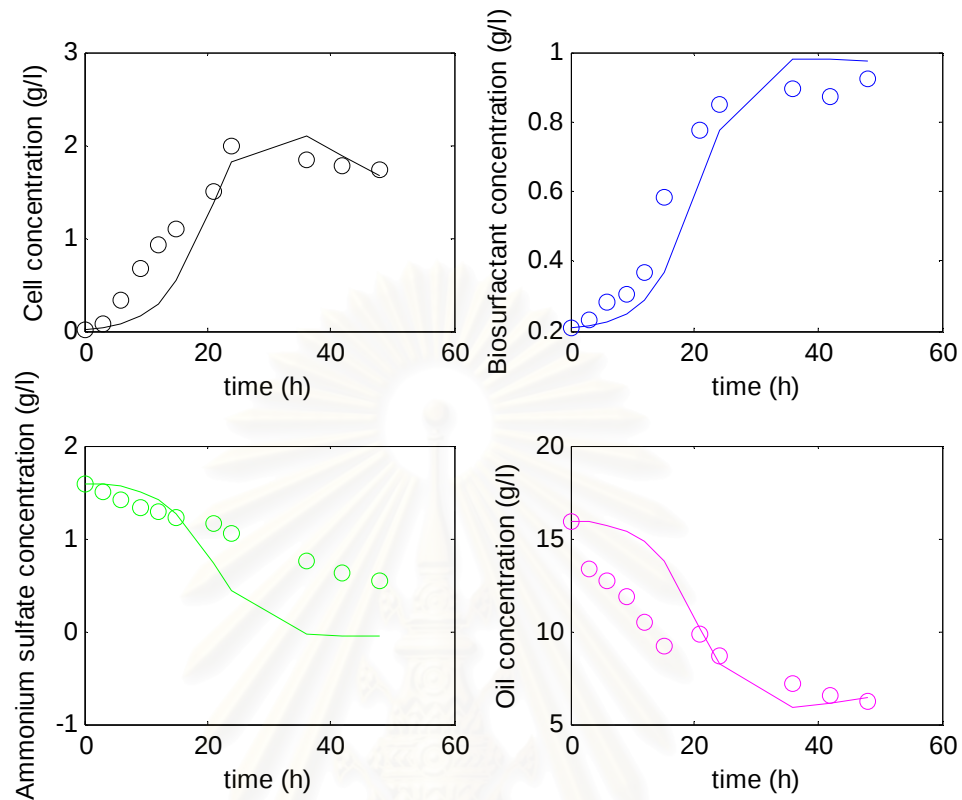
ตารางที่ 5.4 แสดงค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากแบบจำลอง Logistic และสมการสมดุลมวลในการอธิบายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบตลอดช่วงการหมัก 0 – 48 ชั่วโมง ในขบวนการหมัก ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 5, 50, 100, 150 และ 200

พารามิเตอร์	ค่าพารามิเตอร์				
	C/N 5	C/N 50	C/N 100	C/N 150	C/N 200
β (g P / g cell – hr)	0.0016	0.0011	0.0052	0.007	0.0065
α (g P / g cell)	0.3994	0.3106	0.1941	0.656	0.5364
K_d (hr ⁻¹)	0.01	0.0061	0.0088	0.0071	0.01
M_N (g N / g cell – hr)	0.01	0.01	0.0099	0.0055	0.003
M_{oil} (g Oil / g cell – hr)	0.0014	0.0052	0.01	0.0096	0.01
$Y_{X/N}$ (g / g)	0.6525	4.9641	3.6829	2.1515	1.8539
$Y_{X/oil}$ (g / g)	0.2756	1.4397	0.456	0.1789	0.2366
$Y_{P/oil}$ (g / g)	1.0334	0.0901	0.1343	0.2012	0.0771
μ_0 (hr ⁻¹)	0.2251	0.3972	0.3662	0.2471	0.2495
X_{max} (g cell / l)	1.9939	1.75	1.3643	0.9854	0.5965

ผลการนำแบบจำลอง Andrew ในการอธิบายผลการเจริญเติบโตของเซลล์ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบตลอดการหมัก 0 - 48 ชั่วโมง

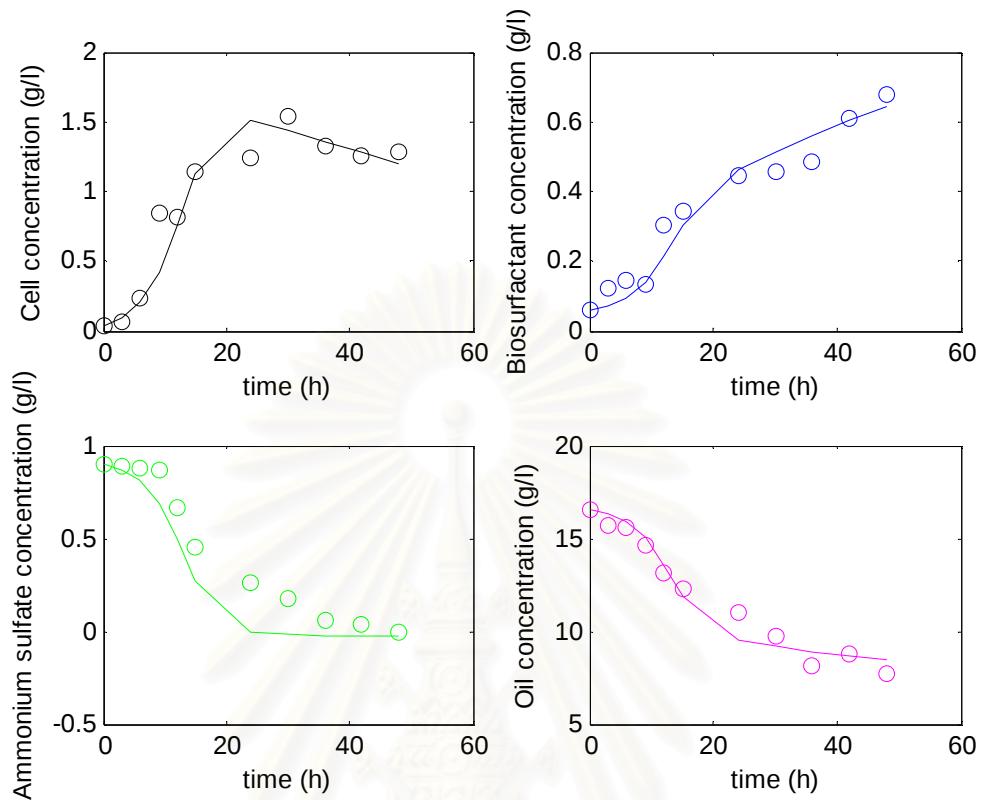


รูปที่ 5.13 แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง Andrews กรณีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 5 (กราฟวงกลมหมายถึงผลการทดลองและกราฟเส้นหมายถึงค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง)



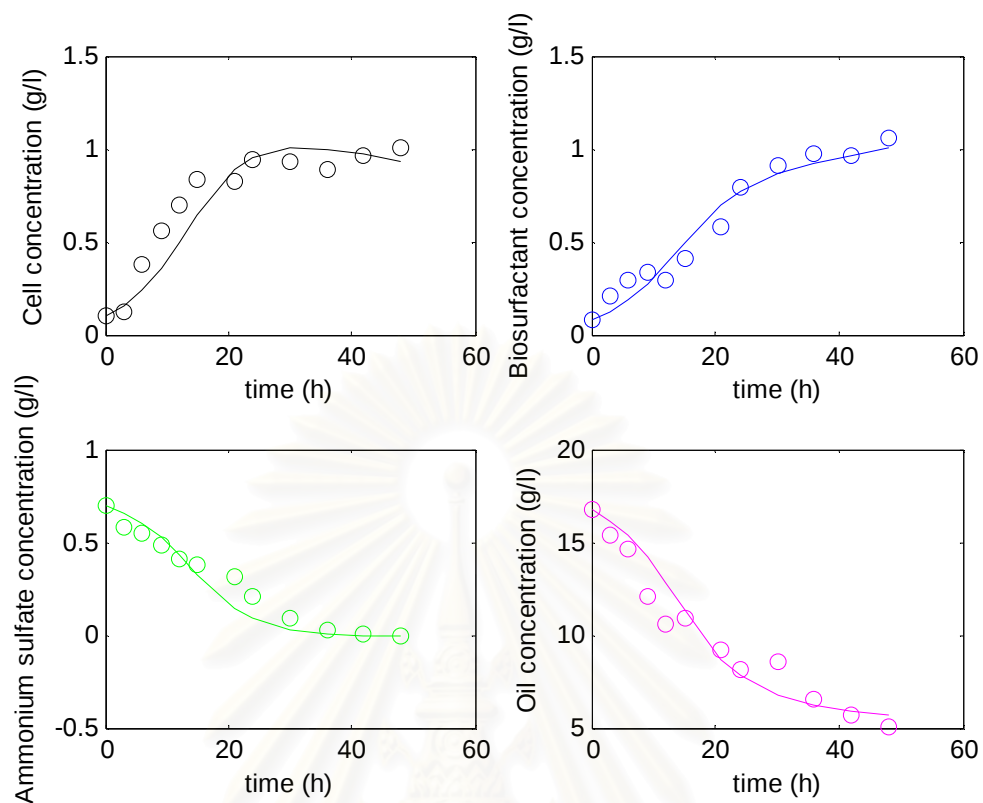
รูปที่ 5.14 แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง Andrews กรณีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 50 (กราฟวงกลมหมายถึงผลการทดลองและกราฟเส้นหมายถึงค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



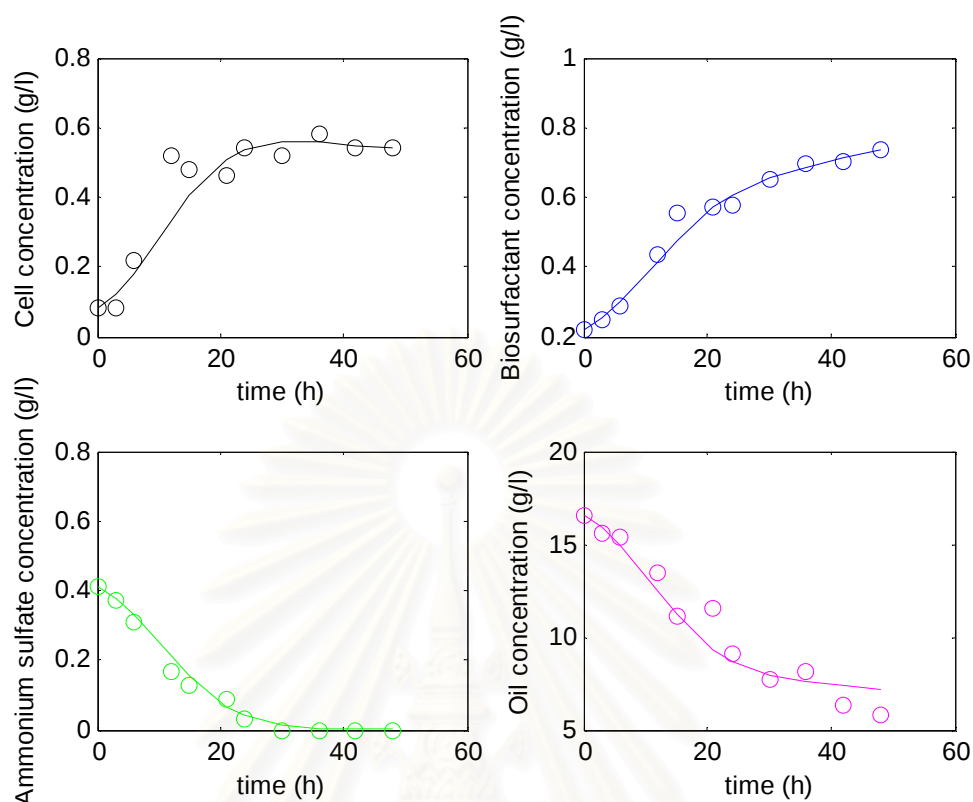
รูปที่ 5.15 แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง Andrews กรณีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 100 (กราฟวงกลมหมายถึงผลการทดลองและกราฟเส้นหมายถึงค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.16 แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง Andrews กรณีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 150 (กราฟวงกลมหมายถึงผลการทดลองและกราฟเส้นหมายถึงค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.17 แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง Andrews กรณีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 200 (กราฟวงกลมหมายถึงผลการทดลองและกราฟเส้นหมายถึงค่าที่ได้จากการทดสอบแบบจำลอง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

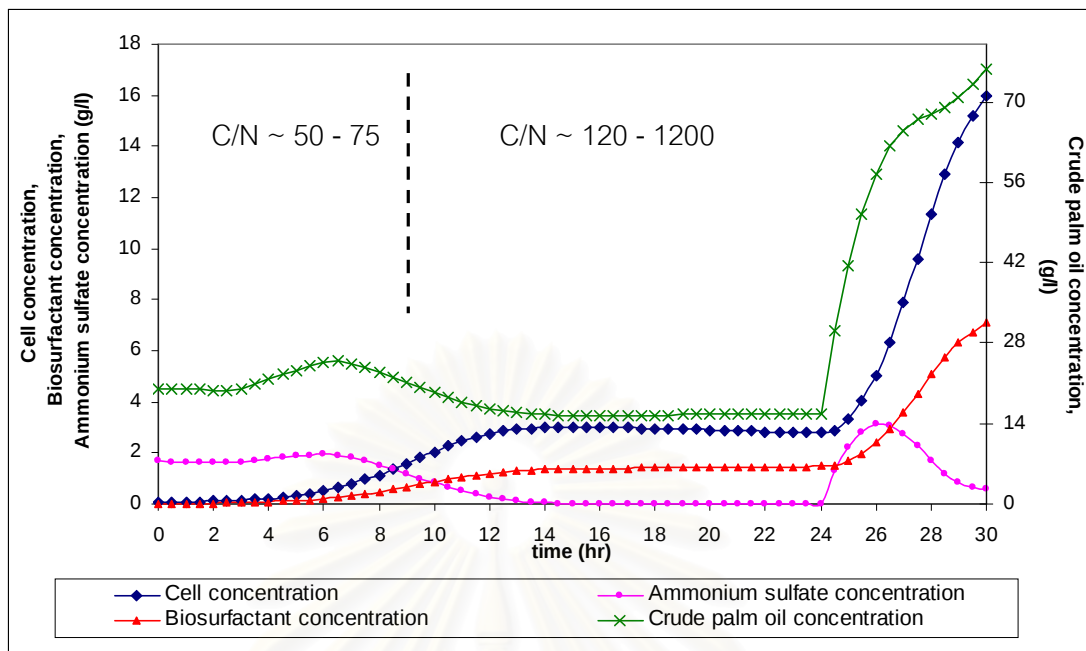
ตารางที่ 5.5 แสดงค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากแบบจำลอง Andrews และสมการสมดุลมวลในการอธิบายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบตลอดช่วงการหมัก 0 – 48 ชั่วโมง ในขบวนการหมัก ที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 5, 50, 100, 150 และ 200

พารามิเตอร์	ค่าพารามิเตอร์					
	C/N 5	C/N 50	C/N 100	C/N 150	C/N 200	ค่าเฉลี่ยจาก C/N 5-200
β (g P / g cell – hr)	0.0045	0.0021	0.007	0.007	0.007	0.00552
α (g P / g cell)	0.25	0.2813	0.1829	0.6641	0.6855	0.41276
K_d (hr ⁻¹)	0.005	0.01	0.001	0.005	0.0038	0.00496
M_N (g N / g cell – hr)	0.01	0.0061	0.0051	0.0012	0	0.00448
M_{oil} (g Oil / g cell – hr)	0.0061	0.0032	0.0088	0.0061	0.01	0.00684
$Y_{X/N}$ (g / g)	0.1895	1.7823	1.8381	1.5307	1.1317	1.33152
$Y_{X/oil}$ (g / g)	0.2756	0.3292	0.3999	0.2024	0.0832	0.25808
$Y_{P/oil}$ (g / g)	29.7646	0.3193	0.1262	0.1592	0.1928	6.11242
μ_{max} (hr ⁻¹)	1	1.2344	1.2158	1.1641	1.4391	1.21068
K_s (g/l)	0.294	6.5127	3.0122	4.3414	3.4957	3.5312
K_{Si} (g/l)	2	49.9688	49.9998	49.9922	49.9958	40.39132

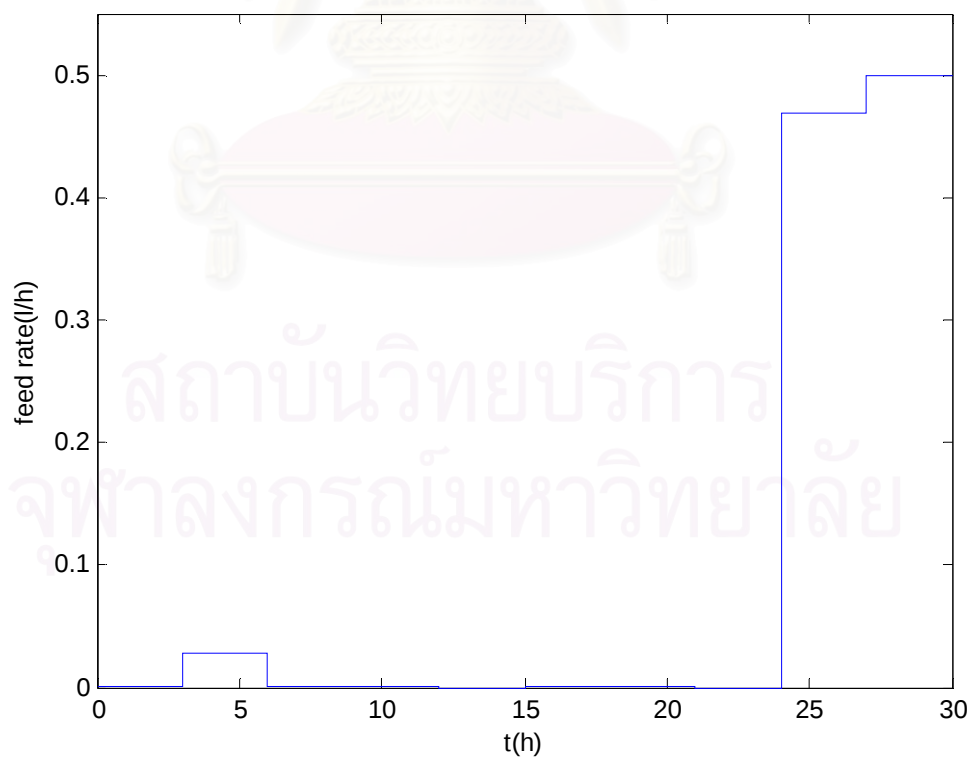
5.4 ผลการหาอัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสม (optimal feed) สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

ผลจากการศึกษาแบบจำลองที่เหมาะสมที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นต่างๆ ตั้งแต่ 5 – 200 (ในหัวข้อที่ 5.3) จะถูกนำมาใช้ในการหาอัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสม (optimal feed) และทำนายการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบเมื่อทำการป้อน โดยแบบจำลองที่นำมาใช้คือแบบจำลอง Andrews เนื่องจากแบบจำลอง Andrews เป็นแบบจำลองที่มีสมมติฐานว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ขึ้นอยู่กับสารอาหาร ดังนั้นในกรณีกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการป้อนสารอาหารเข้าไปเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การใช้แบบจำลอง Andrews ในการอธิบายจึงเหมาะสมกว่าแบบจำลอง Logistic แม้ว่าแบบจำลอง Logistic จะสามารถอธิบายผลการเจริญเติบโตของเซลล์ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องได้ดีในทุกอัตราส่วน C/N เริ่มต้น แต่แบบจำลอง Logistic เป็นแบบจำลองที่อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเซลล์ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารอาหาร ฉะนั้นจึงไม่เหมาะจะนำแบบจำลองนี้มาใช้ในการพิจารณาผลของสารอาหารที่ป้อนเข้าไปต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

สำหรับค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลอง Andrews ที่นำไปใช้อัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสม จะใช้พารามิเตอร์ที่ได้จากทุกอัตราส่วน C/N เริ่มต้นตั้งแต่ 5 – 200 โดยนำค่าพารามิเตอร์เหล่านั้นมาเฉลี่ยกันเนื่องจากการหาอัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมในงานวิจัยนี้ ใช้วิธีออปติมัลคอนโทรล (optimal control) อัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมที่ได้จะเป็นอัตราการป้อนที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ได้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดภายใต้เงื่อนไขที่กำหนด ซึ่งจะไม่คำนึงถึงการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน C/N ในถังหมัก ดังนั้นการใช้ค่าพารามิเตอร์ที่นำมาเฉลี่ยจากทุกอัตราส่วน C/N เริ่มต้นตั้งแต่ 5 – 200 เพื่อต้องการให้สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน C/N ที่เกิดขึ้นในถังหมักได้ครอบคลุมมากที่สุด



รูปที่ 5.18 แสดงความเข้มข้นของเซลล์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แอมโมเนียมซัลเฟต น้ำมันปาล์มดิบที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาเมื่อป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบด้วยความเข้มข้นเท่ากับ 28.35 และ 300 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ตลอดทั้งช่วงการหมัก 30 ชั่วโมง



รูปที่ 5.19 แสดงรูปแบบการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบด้วยความเข้มข้นเท่ากับ 28.35 และ 300 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ตลอดทั้งช่วงการหมัก 30 ชั่วโมง

จากรูปที่ 5.18 และ 5.19 เป็นกรณีการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่ความเข้มข้นในสายป้อนเท่ากับ 28.35 และ 300 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่อ้างอิงจากงานวิจัยของเลิศลักษณ์ (2546) จะเห็นว่าเมื่อทำการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมตามรูปที่ 5.19 ที่ได้จากวิธีออปติมัลคอนโทรลและพิจารณาค่าอัตราส่วน C/N ในถังหมักที่เปลี่ยนแปลงตามรูปที่ 5.18 พบว่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน C/N ในถังแบ่งเป็น 2 ช่วงคือ ช่วงที่อัตราส่วน C/N มีค่าต่ำ (C/N มีค่าประมาณ 50 – 75) และช่วงที่อัตราส่วน C/N มีค่าสูง (C/N มีค่าประมาณ 120 – 1200) ซึ่งตรงกับที่ผู้วิจัยคาดหวังไว้ว่าเมื่อทำการป้อนสารอาหารเข้าไปจะทำให้สภาวะในถังหมักแบ่งออกเป็น ช่วงที่อัตราส่วน C/N มีค่าใกล้เคียงหรืออยู่ในช่วงประมาณ 50 ซึ่งเหมาะกับการเจริญเติบโตของเซลล์และช่วงที่อัตราส่วน C/N มีค่าใกล้เคียงหรืออยู่ในช่วงประมาณ 150 ซึ่งเหมาะกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยอัตราการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมนี้จะทำให้ได้อัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุดเท่ากับ 0.53 และ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของเลิศลักษณ์ (2546) ที่ทำการทดลองป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบโดยมีการเปลี่ยนความเข้มข้นในสายป้อนที่เวลา 6, 9, 12 และ 15 ชั่วโมง พบว่าอัตราการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมโดยวิธีออปติมัลคอนโทรลในงานวิจัยนี้ให้ค่าอัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงกว่างานวิจัยของเลิศลักษณ์ (2546) เท่ากับ 178.94 และ 475 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อเทียบกับค่าที่สูงที่สุด

ดังนั้นผู้วิจัยหวังว่าการหาอัตราการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมโดยวิธีออปติมัลคอนโทรลสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในงานวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อทำการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.6 แสดงผลการเปรียบเทียบอัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยของเลิศลักษณ์ (2546)

งานวิจัยของเลิศลักษณ์ (2546)			งานวิจัยนี้	
เวลาในการเปลี่ยนความเข้มข้น	อัตราการผลิตเซลล์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	อัตราการผลิตเซลล์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
6 ชั่วโมง	0.13	0.04	0.53	0.23
9 ชั่วโมง	0.13	0.04		
12 ชั่วโมง	0.19	0.03		
15 ชั่วโมง	0.14	0.04		

หมายเหตุ การคำนวณค่าอัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคิดที่เวลาสุดท้ายของการหมัก

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ในขวดรูปชมพู่บ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 7.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีน้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และแบ่งการศึกษาออกเป็น 4 ส่วนได้แก่

6.1.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นที่ทำการศึกษามี 9 ค่า ได้แก่ 0.42, 0.55, 0.83, 1.66, 5.56, 8.34, 13.90, 16.68 และ 20.85 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นสูงขึ้นจะทำให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงขึ้น จนกระทั่งความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นสูงขึ้นถึงค่าค่าหนึ่งจะทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะลดลง ซึ่งแบบจำลอง Andrews : $\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s + S^2/K_{Si}}$ สามารถอธิบายผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับแบบจำลองที่นำมาศึกษา 8 แบบจำลอง

6.1.2 การศึกษาผลของอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

อัตราส่วน C/N เริ่มต้นที่นำมาศึกษามี 5 ค่า ได้แก่ 5, 50, 100, 150 และ 200 พบว่า

- อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50 ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์สูงที่สุดเท่ากับ 0.472 ต่อชั่วโมง
- อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150 ให้ค่าอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 0.204 กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง

ดังนั้นที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

6.1.3 การศึกษาผลของแบบจำลองที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ในขบวนการหมัก 48 ชั่วโมงที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้น 5 - 200

แบบจำลองที่นำมาศึกษามี 2 แบบจำลองได้แก่ แบบจำลอง Andrews และแบบจำลอง Logistic พบว่า

- แบบจำลอง Logistic : $\mu = \mu_0 \left(1 - \frac{X}{X_m} \right)$ เป็นแบบจำลองที่เหมาะสมสำหรับอธิบายการ

เจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบตามเวลาในขบวนการหมักทุกอัตราส่วน C/N เริ่มต้นตั้งแต่ 5 - 200

- แบบจำลอง Andrews ($\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s + S^2/K_{si}}$) เป็นแบบจำลองที่เหมาะสม

สำหรับอธิบายการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบตามเวลาในขบวนการหมักเฉพาะที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150 และ 200

6.1.4 การศึกษาผลของอัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสม (optimal feed) สำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

การหาอัตราการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่เหมาะสมในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง เลือกแบบจำลอง Andrews นำมาใช้ในการศึกษาเพราะเป็นแบบจำลองที่คำนึงผลของสารอาหารต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งต่างจากแบบจำลอง Logistic ที่อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่ขึ้นอยู่กับสารอาหาร ในการหาอัตราการป้อนที่เหมาะสมโดยใช้วิธีออปติมัลคอนโทรลจะไม่สามารถควบคุมและทราบถึงการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน C/N ในถังหมัก ดังนั้นจึงใช้ค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลอง Andrews จากอัตราส่วน C/N 5-200 นำมาเฉลี่ยกันเพื่อให้สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน C/N ได้ครอบคลุมที่สุด และเมื่อทำการป้อนแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำมันปาล์มดิบที่ความเข้มข้นในสายป้อนเท่ากับ 28.35 และ

300 กรัมต่อลิตรตามลำดับตลอดการหมัก พบว่าได้อัตราส่วน C/N ประมาณ 50-75 ในช่วงแรก และได้อัตราส่วน C/N ประมาณ 120-1200 ในช่วงหลัง และทำให้ได้ค่าอัตราการผลิตเซลล์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุดเท่ากับ 0.53 และ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ

6.2 ข้อเสนอแนะ

6.2.1 แบบจำลองที่นำมาใช้ศึกษาเป็นแบบจำลองกรณีที่สามารถละลายน้ำได้ แต่น้ำมันปาล์มดิบซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในงานวิจัยนี้เป็นสารอาหารละลายน้ำยาก จึงควรศึกษาหาแบบจำลองเพิ่มเติมที่มีการคำนึงถึงผลของสารอาหารซึ่งไม่ละลายน้ำ อาจทำให้อธิบายผลการทดลองได้แม่นยำมากยิ่งขึ้น

6.2.2 พีคที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย HPLC ที่นำมาพิจารณาควรมีการติดตามพีคนั้นโดยการวัดพื้นที่การกระจายน้ำมัน เพื่อให้แน่ใจว่าปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่พิจารณามีปริมาณเพิ่มขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ณรงค์ ลักษณะภิรมย์. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Pseudomonas sp.*

A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชา

วิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2543.

เลิศลักษณ์ แก้ววิมล. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Pseudomonas sp.* A41 ในถังหมัก

แบบกึ่งต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี บัณฑิต

วิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2546.

วิศวกรรมสถานแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์. คู่มือวิเคราะห์น้ำและน้ำเสีย. กรุงเทพฯ,
2545.

อารีย์ กังฉิน. การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการผลิตสารลดแรงตึงผิว

ชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2542.

ภาษาอังกฤษ

Aiba, S., Shoda, M., Nagatani. *Biotechnol Bioeng.* 10 (1968) : 845-864

Andrews, J.F. *Biotechnol Bioeng.* 10 (1968) : 707

Babu, P.S., Vaidya, A.N., Bal, A.S., Kapur, R., Juwarkar, A. and Khanna, P.

Kenetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain

BS2 from industrial waste. *Biotechnol Lett.* 18 (1996) : 263 – 268.

Banat, I.M., Makkar, R.S. and Cameotra, S.S. Potential commercial applications of

microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 53 (2000) : 495 - 508

Benincasa, M., Contiero, J., Manresa, M.A. and Moraes, I.O. Rhamnolipid production by

monas aeruginosa LBI growing on soapstock as the sole carbon source.

J. Food Eng. 54 (2002) : 283-288.

- Chávez, G.S., Lépine, F. and Déziel, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotechnol 68 (2005) : 718–725
- Chayabutra Chawala, Wu Jian and Ju Lu-Kwang. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: Effects of Limiting nutrients and carbon substrates. Biotechnol. Bioeng. 72 (2000) : 25-33.
- Chen, S.Y., Wei, Y.H. and Chang, J.S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. Appl Microbiol Biotechnol 76 (2007) : 67–74
- Contois D.E. Kinetics of bacterial growth: relationship between population density and specific growth rate of continuous culture. J Gen Microbiol. 1959 : 21-40.
- Costa, S.G.V.A.O., Nitschke, M., Haddad, R., Eberlin, M.N. and Contiero, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. Proc. biochem. 2005.
- Crolla, A. and Kennedy, K.J. Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on *n*-paraffins. Journal of Biotechnology 110 (2004) : 73–84
- Desai, J.D. and Banat, I.M. Microbial production of surfactant and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61(1997) : 47-64.
- Edward, V.H. Biotechnol. Bioeng. 27 (1970) : 679
- Fiechter, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends. Biotechnol. 10 (1992) : 208-217.
- Gilman, L.B. 1993. A review of instrument for static and dynamic surface and interfacial tension measurement. Present at the seminar by Kruss GmbH and Scientific promotion C., Ltd., at Indra Regent Hotel, BK. Thailand, 1997.
- Guerra Santos, L.H., Kiippeli, O. and Fiechter, A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl Microbiol Biotechnol. 24 (1986) : 443--448
- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M. and Manresa, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. J. Appl. Microbiol. 88 (2000) : 379-387

Healy, M.G., Devine, C.M. and Murphy, R. Microbial production of biosurfactants.

Resources, Conservation and Recycling 18 (1996) : 41-57

Ho, K.P., Tam, C.Y. and Zhou, B. Growth and carotenoid production of *Phaffia*

Rhodozyma in fed-batch cultures with different feeding methods. Biotechnol Lett. 21 (1999) : 175-178

Huang, G., Okabe, M., Kahar, P. and Tsunekawa, H. Optimization of Tylosin feeding rate profile in production of Acetyl-Isovaleryl Tylosin (AIV) from Tylosin by *Streptomyces thermotolerans* YN554. J. Biosci and Bioeng. 91 (2001) : 504-508

Itoh, S., Honda, H., Tomita, F. and Suzuki, T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (Mixture of C₁₂, C₁₃, and C₁₄ fractions). J. antibiot. 24 (1971) : 855-859

Jeong, H.S., Lim, D.J., Hwang, S.H., Ha, S.D. and Kong, J.Y. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* immobilized in polyvinyl alcohol beads. Biotechnol Lett. 26 (2004) : 35-39

Kim, H.S., Jeon, J.W., Kim, B.H., C.Y. Ahn, Oh, H.M. and Yoon, B.D. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. Appl Microbiol Biotechnol. 70 (2006) : 391-396

Kitamoto, D., Isoda, H. and Nakahara, T. Functions and Potential Applications of Glycolipid Biosurfactants from Energy-Saving Materials to Gene Delivery Carriers : reviews. J. Biosci. Bioeng. 94 (2002) : 187-201.

Kreilgaard, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 54 Suppl.1 (2002) : S77- S98

Lang, S. and Wullbrandt, D. Rhamnolipids ± biosynthesis, microbial production and application potential. Appl Microbiol Biotechnol. 51 (1999) : 22 - 32

Lee, J.M. Biochemical engineering. Englewood, Cliffs., N.J. Prentice-Hall, 1992

Lee, Y., Lee, S.Y., Yang, J.W. Production of rhamnolipid biosurfactant by fed-batch culture of *Pseudomonas aeruginosa* using glucose as a sole carbon source. Biosci Biotechnol Biochem. 63 (1999) : 946-967

Levenspiel, O. Biotechnol. Bioeng. 22 (1980) : 1671

- Levisauskas, Galvanauskas, V., Zunda, G. and Grigiskis, S. Model-based optimization of biosurfactant production in fed-batch culture *Azotobacter vinelandii*. Biotechnol Lett. 26 (2004) : 1141-1146
- Li, C.Y., Cheng, C.Y. and Chen, T.L. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. Biochemical Engineering Journal 19 (2004) : 25–31
- Lin, J.P., Tian, J., You, J.F., Jin, Z.H., Xu, Z.N. and Cen, P.L. An effective strategy for the co-production of S-adenosyl-L-methionine and glutathione by fed-batch fermentation. Biochemical Engineering Journal. 21 (2004) : 19–25
- Luong, J.H.T. Generalization of Monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition. Biotechnol. Bioeng. 29 (1987) : 242-248
- Magnusson, B. M., Kenneth A. Walters and Roberts, M. S. Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement. Advanced Drug Delivery Reviews. 50 (2001) : 205–227
- Maier, R.M. and Chavez, G.S. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid: biosynthesis and potential applications. Appl Microbiol Biotechnol. 54 (2000) : 625-633
- Makkar, R.S. and Cameotra, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Appl Microbiol Biotechnol 58 (2002) : 428–434
- Malthus, T. R. An Essay on the Principle of Population as It Affects the Future Improvement of Society, with Remarks on the Speculations of Mr. Godwin, M. Condorcet, and Other Writers. London. 1798
- Manresa, M.A., Bastida, J., Mercade, M.E., Robert, M., Andres J. de., Espuny, M.J. and Guinea, J. Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. J. Ind. Microbiol. 8 (1991) : 133 – 136
- Mason, T.J. and Milles, N.F. Growth kinetics of yeast grown on glucose of hexadecane. Biotechnol. Bioeng. 18 (1976) : 1337

- McInerney, M.J., Knapp, R.M., Nagle, D. P., Duncan, K., Youssef, N., Folmsbee, M. J. and Maudgakya, S. Development of microorganisms with improved transport and biosurfactant activity for enhanced oil recovery. Annual Report. University of Oklahoma. 2003
- Mercade, M. E., Manresa, M. A., Robert, M., Espuny, M. J., Andres C. d., and Guinea, J. Olive oil mill effluent (OOME) new substrate for biosurfactant production. Bioresource Technology 43 (1993) :1-6
- Monod, J. Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes, Paris : Herrmann et Cie. 1942
- Moser A. The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat. Publication 614. Washington, DC. The Carnegie Institution. 1958.
- Mulchandani, A. and Luong, J.H.T. Batch kinetics of microbial polysaccharide biosynthesis. Biotechnol. Bioeng. 32 (1988) : 639-646
- Mulligan, C.N. Environmental applications for biosurfactants. Environ. pol. 133 (2005) :183-198
- Nakata, K., Yoshimoto, A., Yamada, Y. Correlation between autoinducers and rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3924. J Ferment Bioeng. 86 (1998) : 608-610
- Ochoa, F.G. and Casas, J.A. Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. Enz.Micro.Technol. 25 (1999) : 613-621
- Pearl and Reed. On the rate of growth of the population of the United States since 1790 and its mathematical representation. Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.). 6 (1920) : 275-288
- Petal, R.M. and Desai J.A. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. Lett. In App Microb. 25 (1997) : 91-94
- Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., McClean, S., Marchant, R. and Banat, I.M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low cost raw materials. UK:University of Ulster, 2002.

- Ratledge C. and Kristiansen B. Basic biotechnology. Cambridge University Press. 2006
- Robert, M., Mercad, E., Bosch, P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Manresa M.A. and Guinea, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Biotechnology Letters. 12 (1989) : 871-874
- Rodrigues, L., Moldes, A., Teixeira, J. and Oliveira, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. Biochem. Eng. 28 (2006) : 109 -116
- Santa, L.M.A., Sebastian G.V., Menezes, E.P., Alves, T.L.M., Santos, A.S., Jr, N.P. and Freire, D.M.G. Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolate in oil environments. Brazilian J chem. Eng. 19 (2002) : 159 -166
- Sekelsky, A.M., and Shreve, G.S. Kinetic model of biosurfactant-enhanced hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. Biotechnol. Bioeng. 63 (1998) :401-409
- Shahhosseini, S. Simulation and optimization of PHB production in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*. Process biochem. 39 (2004) : 963-969
- Shukla, R., Chand, S. and Srivastava A.K. Improvement of gibberellic acid production using a model based fed-batch cultivation of *Gibberella fujikuroi*. Process Biochemistry. 40 (2005) : 2045–2050
- Singh, M., Saini, V., Adhikari, D.K., Desai, J.D. and Sista, V.R. Production of bioemulsifier by SCP producing strain of *Candida tropicalis* during hydrocarbon fermentation. Biotechnol. Lett. 12 (1990) : 743–746
- Strickland, J.D.H. and T.R. Parsons. A practical handbook of sea-water analysis. (2nd Edition) J. Fish. Res. Bd. Canada. (1972) : 167-311
- Syldatk, C. and Wagner, F. Production of biosurfactants. In Biosurfactants and Biotechnology, Surfactant Science Series. 25 (1987) : 89–120
- Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. High butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in fed-batch culture with pH-stat continuous butyric acid and glucose feeding method J. of Bioscience and Bioengineering. 98 (2004) : 263–268

Tessier G. Croissance des populations bacterie'nnes et quantite'd'aliment disponible.

Rev Sci (Paris). 1942 : 3208-3209.

Tsao, G.T. and Hanson, T.P. Extended Monod equation for batch cultures with multiple exponential phases. Biotechnol Bioeng 17 (1975) :1591–1598

Verhulst, P.F. Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population.

Mem. Acad. Royale Belg. 18 (1845) :1–38

Xie, D.M., Lin, D.H., Zhu, H.L., Lin Y.Q. and Zhang, J.A. Model-based optimization of temperature and feed control strategies for glycerol production by fed-batch culture of osmophilic yeast *Candida krusei*. Biochem Bioeng. 11 (2002) : 111-121

Xie, Y.W., Li, Y., Ye, R. Effect of alcohol on phase behavior of microemulsions formed by a biosurfactant – rhamnolipid. J. dispersion science and technology. 26 (2005) : 455 -461

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ก.1 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

ก.1.1 อาหารนิวเทรียนเอการ์ (Nutrient Agar)

เนื้อสกัด (beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตเน (bacto peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

ก.1.2 อาหารเหลวกำหนดสูตร (Define medium)

น้ำมันปาล์ม	20.0	กรัม.
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	4.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.4	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
กรดฟอสเฟอริก (H_3PO_4)	0.5	มล.
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.53	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.284	มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.71	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.7	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.9	มิลลิกรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4.3	มิลลิกรัม
โคบอลต์คลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1	มิลลิกรัม
อีดีทีเอ (EDTA)	200.0	มิลลิกรัม
แคลเซียม-แพนโททีเนต (Calcium Pantothenate)	1.176	มิลลิกรัม
ไบโอติน (Biotin)	5.88	ไมโครกรัม
กรดโฟลิก (Folic acid)	5.88	ไมโครกรัม
อินโนซิทอล (Inositol)	0.588	ไมโครกรัม
ไนอาซิน (Niacin)	1.176	ไมโครกรัม

กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (<i>p</i> -Aminobenzoic acid)	0.588	มิลลิกรัม
ไพโรดอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine-HCl)	1.176	มิลลิกรัม
ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)	0.588	มิลลิกรัม
ไทอามีน-ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl)	1.176	มิลลิกรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	14.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้ได้ 7.0 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน สำหรับสารละลายวิตามินได้แก่ แคลเซียม-แพนโททีเนต ไบโอดีน กรดโฟลิก อินโนซิทอล ไนอาซิน กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก ไพโรดอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ ไรโบฟลาวิน ไทอามีน-ไฮโดรคลอไรด์ ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง

ก.2 การเตรียมสารสำหรับวิเคราะห์ไนโตรเจน

ก.2.1 สารละลายฟีนอล

ฟีนอล	50	กรัม
เอทานอล 95 %	500	มิลลิลิตร

ก.2.2 สารละลายโซเดียมไนโตรพลัสไซด์

โซเดียมไนโตรพลัสไซด์	2.5	กรัม
น้ำดีไอออนไนซ์	500	มิลลิลิตร

เก็บในขวดสีชา มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

ก.2.3 อัลคาไรตรีเอเจน

โซเดียมซีเตรท	100	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	5	กรัม
น้ำดีไอออนไนซ์	500	มิลลิลิตร

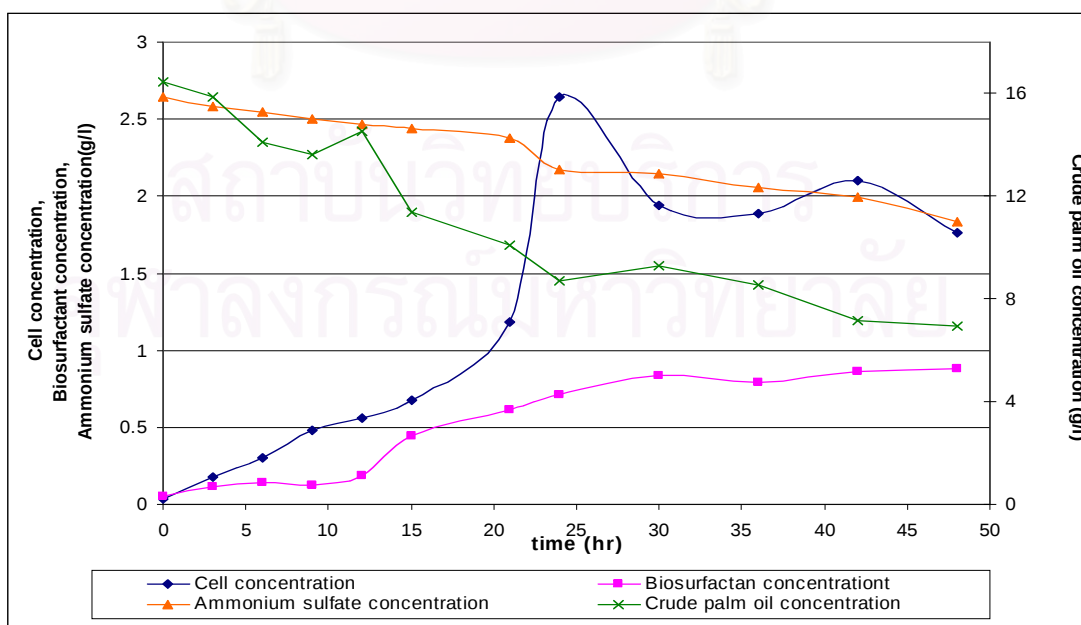
ก.2.4 สารละลายออกซีไดซ์ซิง

อัลคาไรตรีเอเจน	100	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 1.5 นอโมล	25	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ตาราง ข.1 แสดงการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas sp.*A41 ในขวดรูปชมพู่เขย่าที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 5

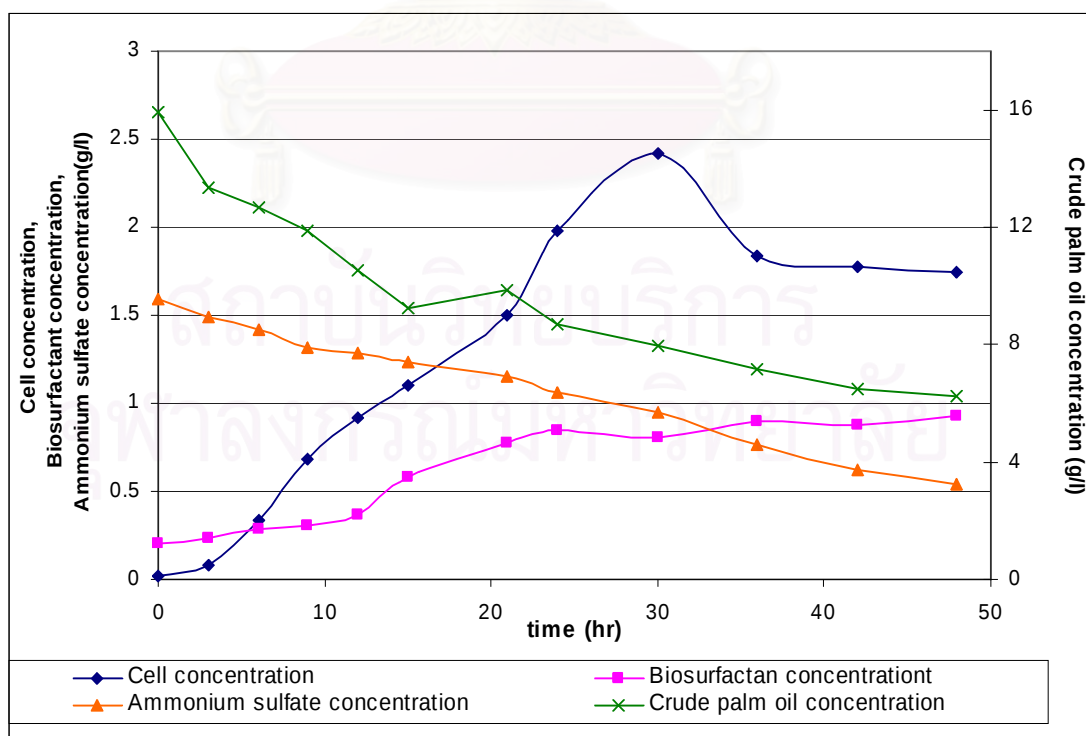
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนียม ซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำมันปาล์มดิบ (กรัมต่อลิตร)
0	0.04	0.050	15.86	16.460
3	0.18	0.118	15.50	15.886
6	0.3	0.138	15.25	14.117
9	0.48	0.129	14.99	13.623
12	0.56	0.189	14.82	14.502
15	0.68	0.442	14.66	11.395
21	1.18	0.612	14.27	10.092
24	2.64	0.716	13.00	8.726
30	1.94	0.840	12.86	9.306
36	1.89	0.795	12.36	8.528
42	2.1	0.867	11.98	7.146
48	1.76	0.880	11.03	6.928



รูปที่ ข.1 แสดงการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของจุลินทรีย์ *Pseudomonas sp.*A41 ที่อัตราส่วนของ C/N เริ่มต้นเท่ากับ 5

ตาราง ข.2 แสดงการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas sp.A41* ในขวดรูปชมพู่เขย่าที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50

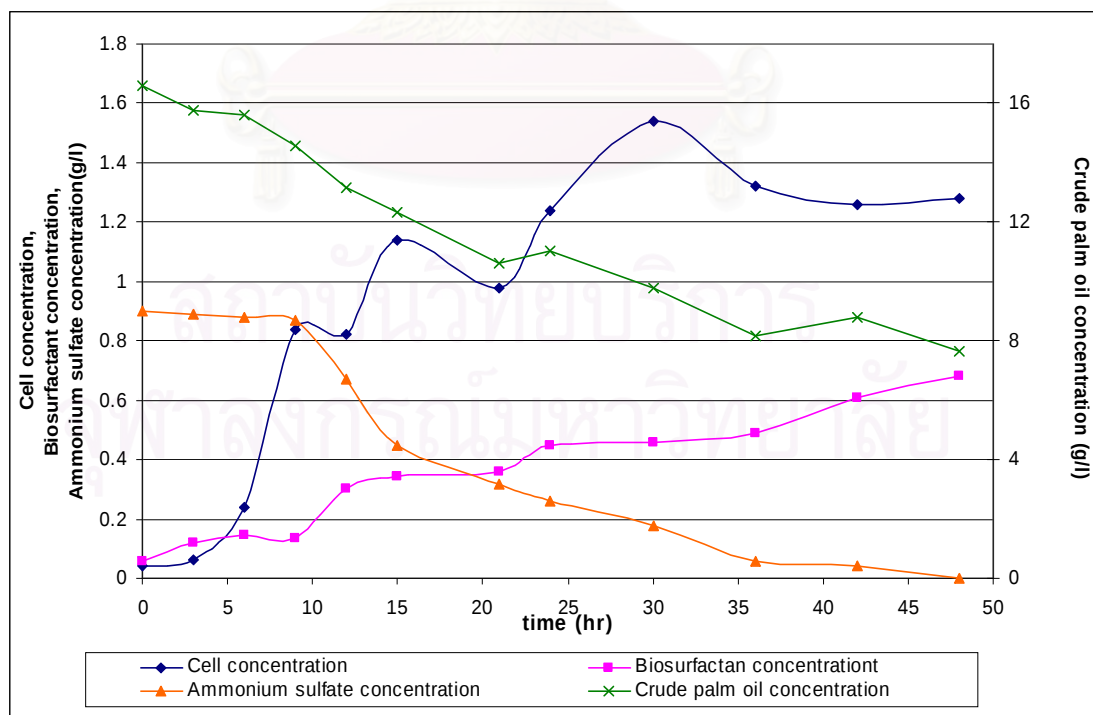
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนียม ซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำมันปาล์มดิบ (กรัมต่อลิตร)
0	0.02	0.107	1.59	15.935
3	0.08	0.133	1.49	13.357
6	0.34	0.184	1.42	12.678
9	0.68	0.303	1.32	11.855
12	0.92	0.367	1.29	10.518
15	1.1	0.584	1.23	9.226
21	1.5	0.775	1.15	9.843
24	1.98	0.85	1.06	8.711
30	2.42	0.808	0.00	7.961
36	1.84	0.894	0.77	7.165
42	1.78	0.873	0.32	6.511
48	1.74	0.926	0.54	6.225



รูปที่ ข.2 แสดงการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของจุลินทรีย์ *Pseudomonas sp.A41* ที่อัตราส่วนของ C/N เริ่มต้นเท่ากับ 50

ตาราง ข.3 แสดงการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas sp.A41* ในขบวนการหมักปุ๋ยที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 100

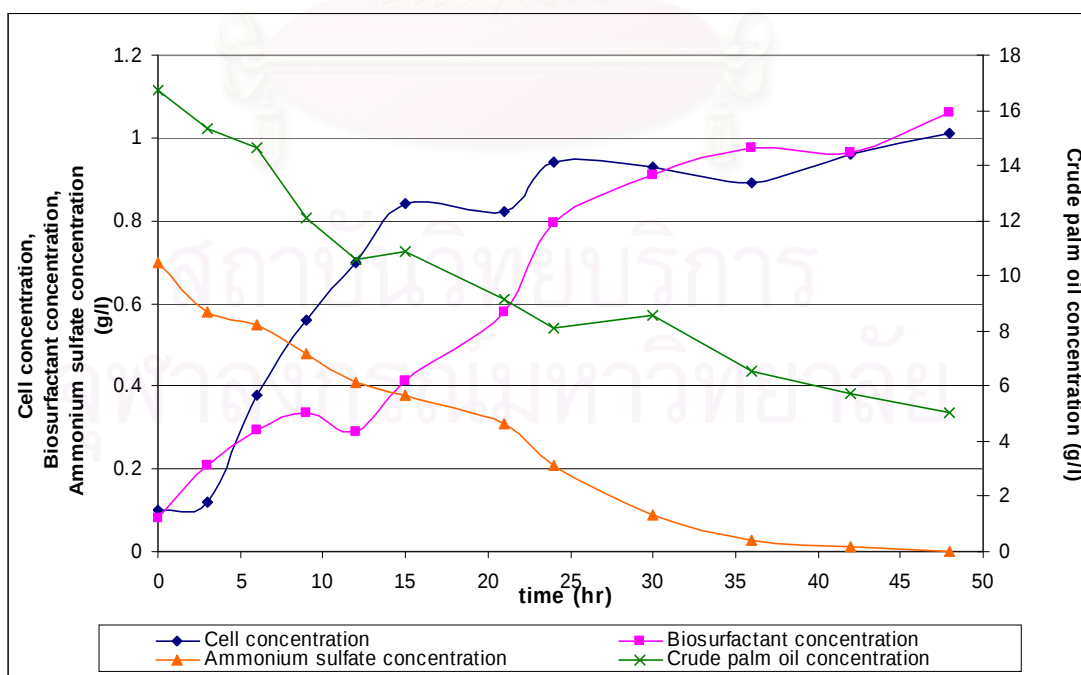
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนียม ซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำมันปาล์มดิบ (กรัมต่อลิตร)
0	0.04	0.059	0.90	16.592
3	0.06	0.121	0.89	15.744
6	0.24	0.145	0.88	15.592
9	0.84	0.133	0.87	14.581
12	0.82	0.303	0.67	13.178
15	1.14	0.342	0.45	12.331
21	0.88	0.361	0.32	10.592
24	1.24	0.448	0.26	11.029
30	1.54	0.459	0.18	9.781
36	1.32	0.487	0.06	8.183
42	1.26	0.608	0.04	8.766
48	1.28	0.68	0.00	7.662



รูปที่ ข.3 แสดงการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของจุลินทรีย์ *Pseudomonas sp.A41* ที่อัตราส่วนของ C/N เริ่มต้นเท่ากับ 100

ตาราง ข.4 แสดงการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas sp.A41* ในขบวนการหมักฟู่เขย่าที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150

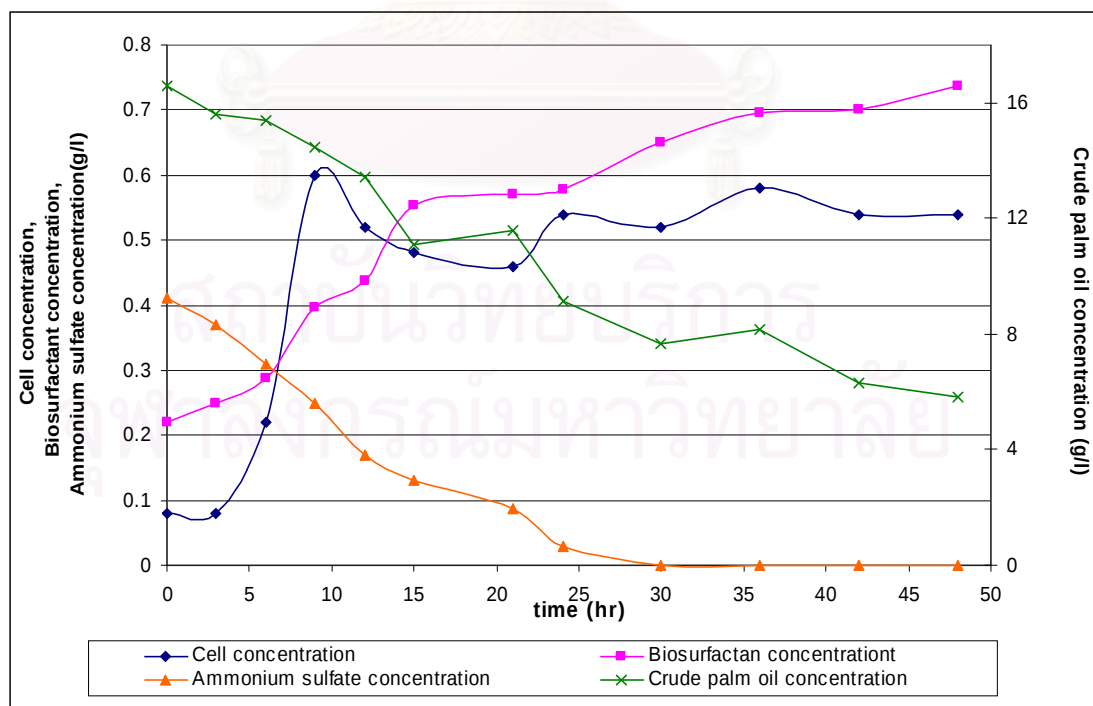
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนียม ซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำมันปาล์มดิบ (กรัมต่อลิตร)
0	0.1	0.080	0.70	16.728
3	0.12	0.210	0.58	15.341
6	0.38	0.295	0.55	14.666
9	0.56	0.336	0.48	12.122
12	0.7	0.289	0.41	10.599
15	0.84	0.411	0.38	10.908
21	0.82	0.578	0.31	9.155
24	0.94	0.795	0.21	8.129
30	0.93	0.911	0.09	8.585
36	0.89	0.978	0.03	6.525
42	0.96	0.966	0.01	5.729
48	1.01	1.06	0.00	5.020



รูปที่ ข.4 แสดงการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของจุลินทรีย์ *Pseudomonas sp.A41* ที่อัตราส่วนของ C/N เริ่มต้นเท่ากับ 150

ตาราง ข.5 แสดงการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas sp.A41* ในขบวนการหมักฟุ้งเย้าที่อัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 200

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนียม ซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำมันปาล์มดิบ (กรัมต่อลิตร)
0	0.08	0.221	0.41	16.593
3	0.08	0.248	0.37	15.633
6	0.22	0.288	0.31	15.383
9	0.6	0.396	0.25	14.457
12	0.52	0.438	0.17	13.408
15	0.48	0.554	0.13	11.120
21	0.46	0.57	0.09	11.578
24	0.54	0.578	0.03	9.129
30	0.52	0.651	0.00	7.668
36	0.58	0.696	0.00	8.137
42	0.54	0.701	0.00	6.316
48	0.54	0.738	0.00	5.814



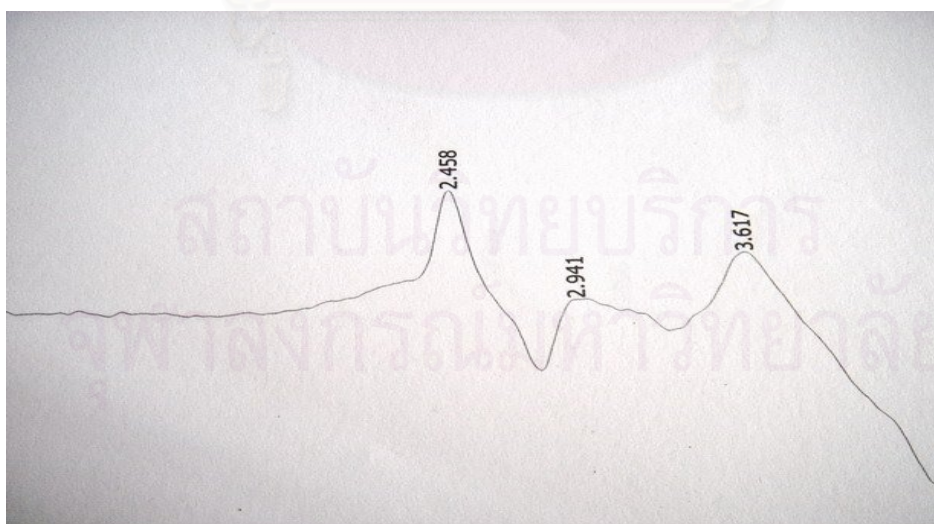
รูปที่ ข.5 แสดงการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของจุลินทรีย์ *Pseudomonas sp.A41* ที่อัตราส่วนของ C/N เริ่มต้นเท่ากับ 200

ภาคผนวก ค

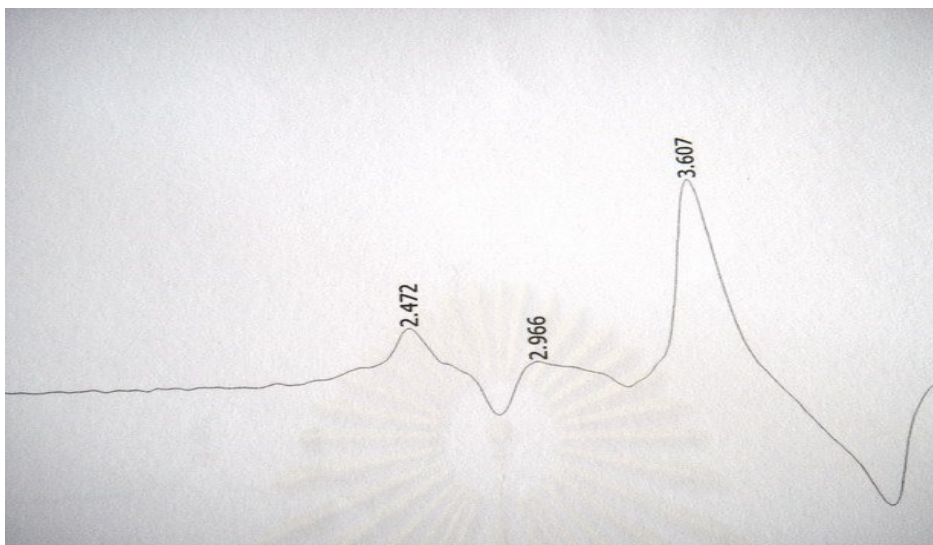
ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

น้ำหมักที่ได้หลังจากปั่นแยกเซลล์และสกัดน้ำมันออกแล้วจะนำมาสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามวิธีในหัวข้อ 4.3.4.2 ซึ่งจะได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีลักษณะหนืดเป็นสีน้ำตาลเข้ม (crude biosurfactant) นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มาละลายในสารละลายเมทานอลและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟีหรือ HPLC โดยมีเมทานอลและฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นเฟสเคลื่อนที่ ผลจากการวิเคราะห์แสดงในรูปที่ ค1-ค5

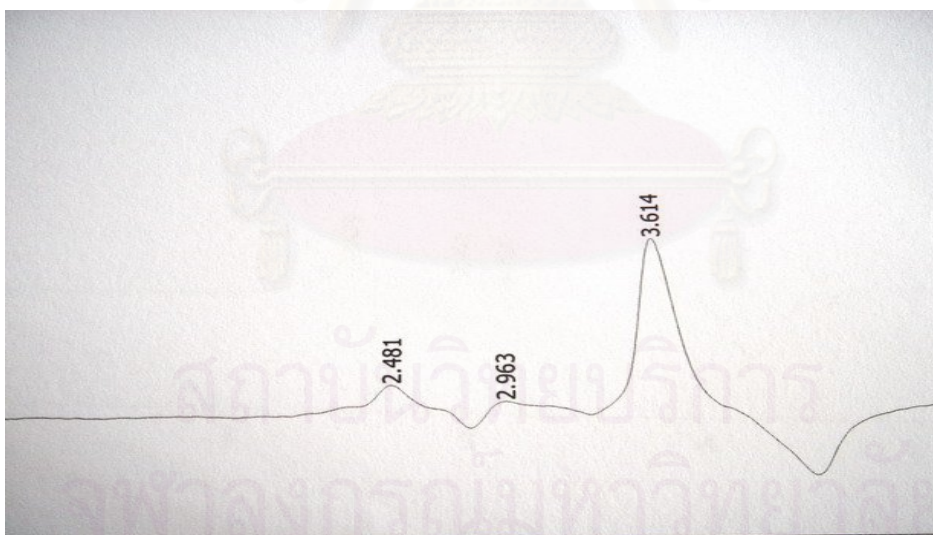
จากรูปที่ ค1-ค5 พบว่ามีพีค (peak) เกิดขึ้นที่เวลาใกล้เคียงกันคือ 3.617, 3.607, 3.614, 3.607 และ 3.595 นาที ที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (crude biosurfactant) ในสารละลาย 0.1, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าพีคเพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสารละลายที่เพิ่มขึ้น



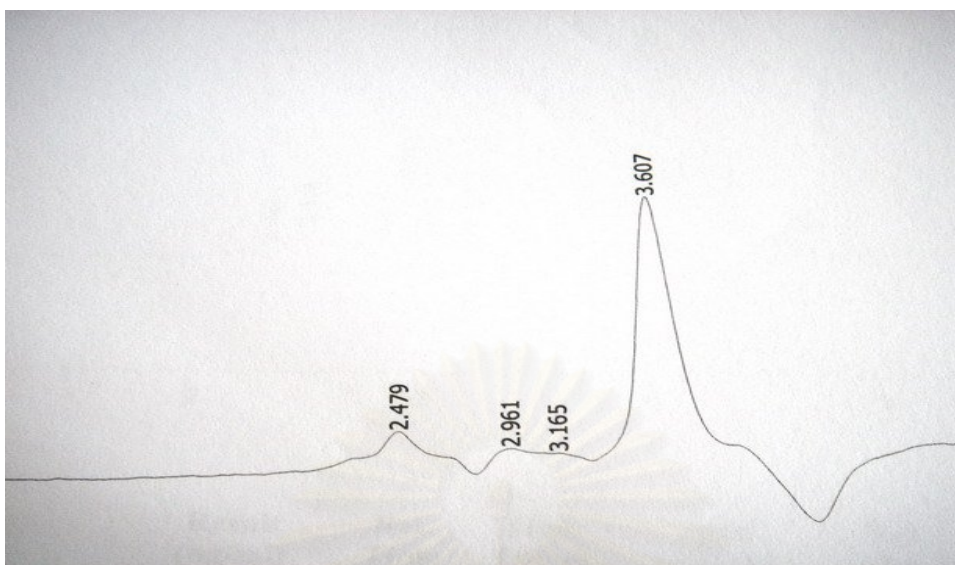
รูปที่ ค.1 ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (crude biosurfactant) ในสารละลาย 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



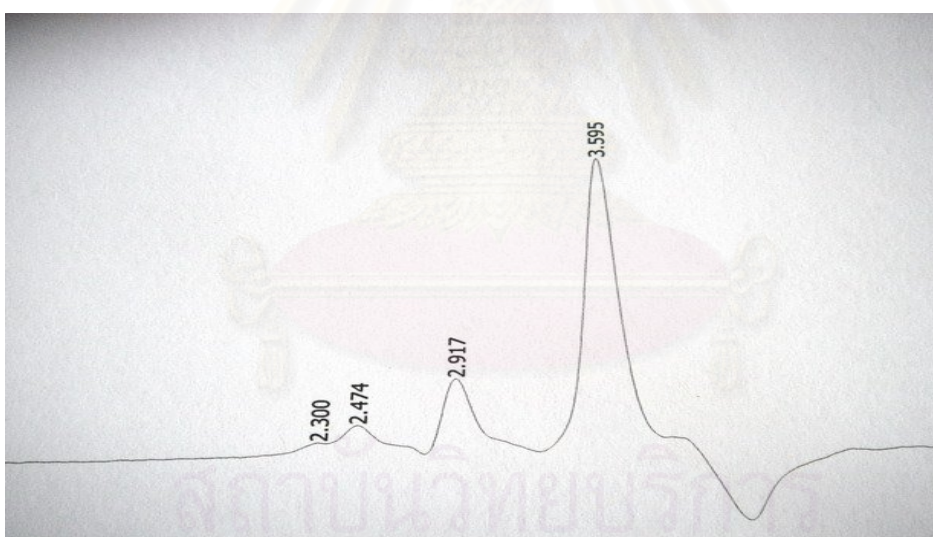
รูปที่ ค.2 ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (crude biosurfactant) ในสารละลาย 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ ค.3 ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (crude biosurfactant) ในสารละลาย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ ค.4 ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (crude biosurfactant) ในสารละลาย 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ ค.5 ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (crude biosurfactant) ในสารละลาย 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพรชนก รัตนะรัต เกิดวันที่ 22 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2525 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ในปีการศึกษา 2546 หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2547



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย