บทที่ 5
ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

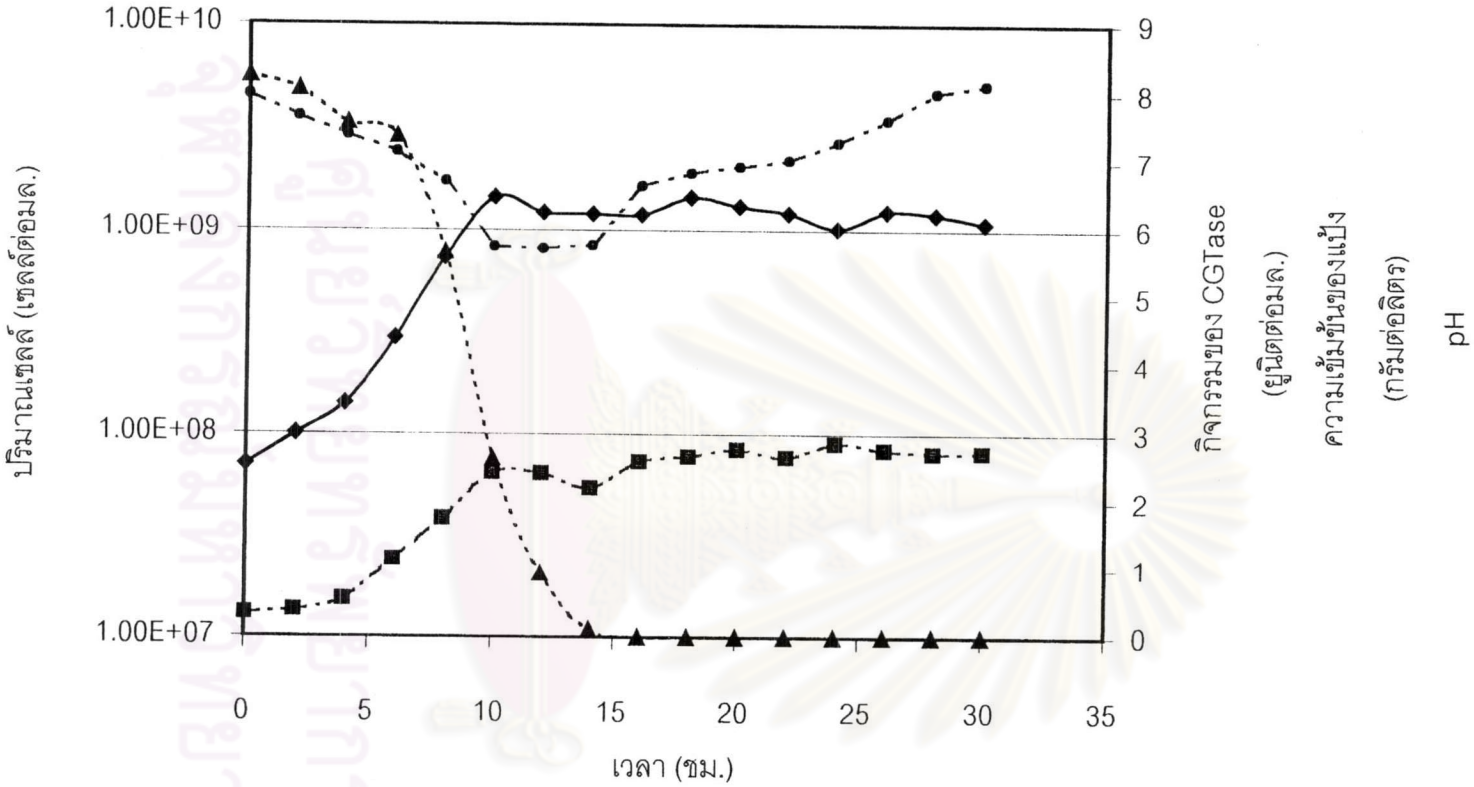
การศึกษาแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus circulans* ATCC 9995 ในถังปฏิกรณ์แบบไม่ต่อเนื่องในงานวิจัยนี้ แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกเป็นการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต CGTase เพิ่มเติมในส่วนของการควบคุม พีเอช ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต และความเร็วรอบในการกวน ขั้นตอนที่สองจะนำภาวะที่เหมาะสมนี้ไปทำการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นเริ่มต้นต่างกันแล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเข้าสมการของแบบจำลองต่างๆ เพื่อหาแบบจำลองที่มีความสอดคล้องในการอธิบายจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของ *B. circulans* ATCC 9995 และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการทดสอบแบบจำลองโดยนำไปทำนายการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์ สารอาหาร และ กิจกรรมของเอนไซม์ ตามเวลาในถังปฏิกรณ์แบบไม่ต่อเนื่องที่แต่ละความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น รวมทั้งนำแบบจำลองไปใช้ในกระบวนการผลิตแบบต่างๆ

5.1 การเลี้ยงเชื้อ *B. circulans* ATCC 9995 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ

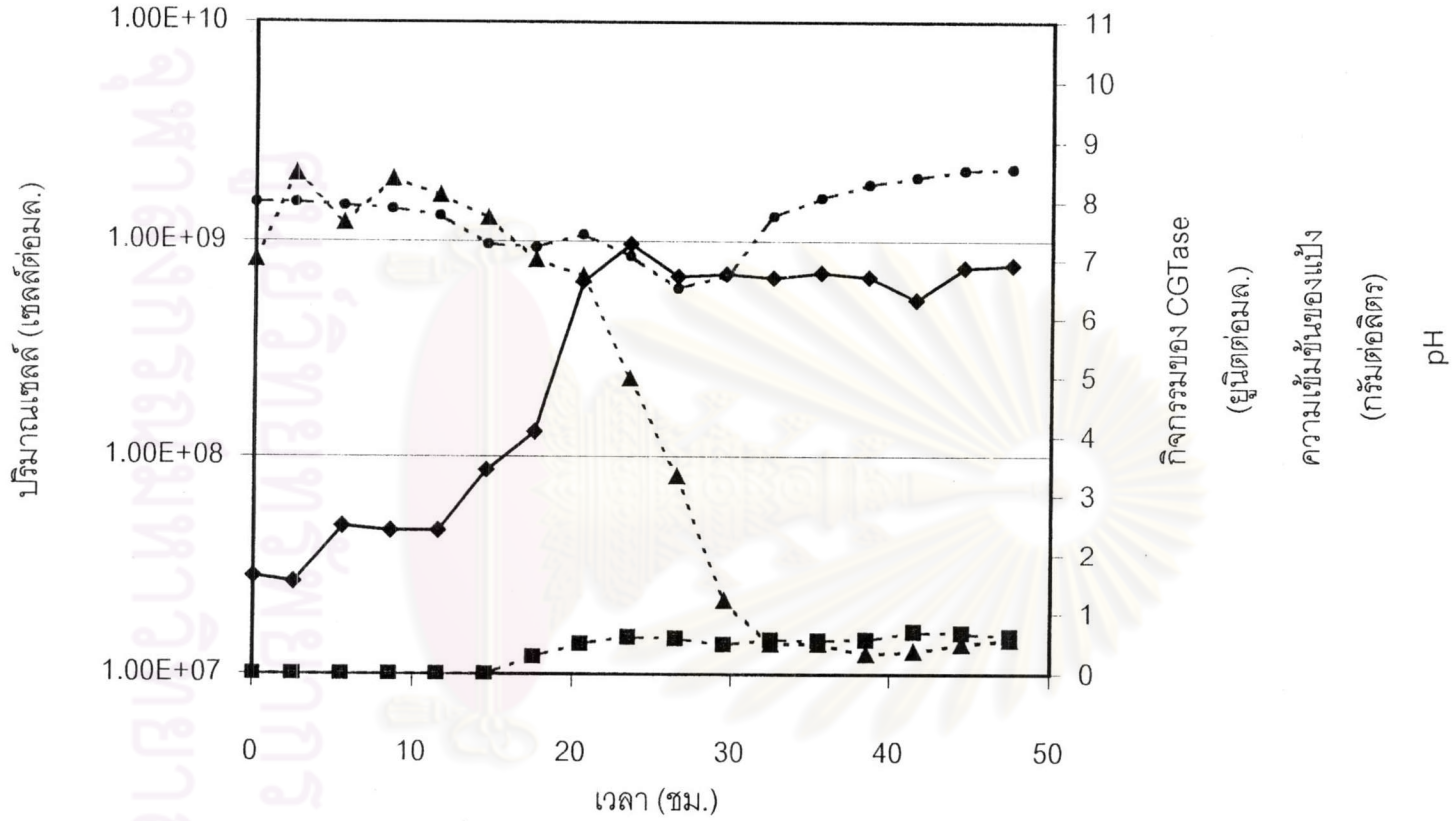
จากการตรวจเอกสารงานวิจัยของ อรุณี ตรีศิริโรจน์, 2537 พบว่าสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus circulans* ATCC 9995 เพื่อผลิตเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (CGTase) ซึ่งทราบภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์บางส่วนแล้ว ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 1% corn steep liquor (CSL) 5% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 % และแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5% น้ำหนักโดยปริมาตร ค่าพีเอชเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8 ดังนั้นจึงใช้สภาวะในการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาทำการทดลองในงานวิจัยนี้ เมื่อทำทดลองเลี้ยงเชื้อ *B. circulans* ATCC 9995 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไม่ควบคุมพีเอช และ ความเร็วรอบในกวน 400 rpm จากการติดตามปริมาณเซลล์ กิจกรรมของเอนไซม์ ความเข้มข้นของแป้ง และค่าพีเอช พบว่ามีรูปแบบการเจริญเติบโต การผลิตเอนไซม์ และการใช้สารอาหาร ดังแสดงในรูปที่ 5.1 โดยพบว่าระยะปรับตัวจะสั้นมากแทบจะไม่ปรากฏเมื่อใช้หัวเชื้อตั้งต้นที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ แต่ถ้าใช้หัวเชื้อตั้งต้นที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเทรียนบรอท (NB) จะปรากฏระยะปรับตัว 2 ชม. แล้วเจริญเติบโตขึ้นเล็กน้อย หลังจากนั้นปริมาณเซลล์คงที่ประมาณ 4 ชม. จึงมีการเจริญเติบโตขึ้นอีกครั้ง ลักษณะของกราฟการเจริญเติบโตเป็นแบบ diauxic ดังรูปที่ 5.2 จากรูปที่ 5.1 พบว่าพารามิเตอร์ต่างๆที่วัดได้จะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นพร้อมๆกันคือ ในช่วงแรกค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะ

ลดลงขณะเดียวกันเซลล์เริ่มมีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ CGTase จุดที่พีเอชตกลงต่ำสุดเกิดขึ้นบริเวณที่กราฟการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นสูงสุด โดยค่าพีเอชในน้ำหมักมีค่าลดลงประมาณ 2 ยูนิต หลังจากนั้นค่าพีเอชกลับเพิ่มขึ้นมาอย่างต่อเนื่องในช่วงระยะการเจริญเติบโตคงที่และระยะถดถอยโดยเซลล์จะเริ่มมีการผลิตเอนไซม์พร้อมกับการเจริญเติบโต และเอนไซม์ CGTase จะถูกผลิตอย่างรวดเร็วระหว่างระยะการเจริญเติบโตทวีคูณ จากนั้นจะคงที่หรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงระยะคงที่ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ อรุณี ตรีศิริโรจน์, 2537 และงานวิจัยในการเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดอื่นเพื่อผลิตเอนไซม์ CGTase ที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* ATCC 21783 [Makela และ คณะ,1988], *Alkalophillic Bacillus sp.* NP 523 [วรางคณา สงวนพงษ์, 2540], และ *Bacillus sp.* A11 [อุไรวรรณ รัชธร, 2537]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.1 แสดงลักษณะการเจริญเติบโต การผลิต CGTase และการใช้สารอาหาร ของ Bacillus circulans ATCC 9995 ในถังปฏิกรณ์ ที่ค่า pH เริ่มต้น 8, 30°C, 400 rpm และความเข้มข้นของแป้ง 8.27 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 5.2 แสดงลักษณะการเจริญเติบโต การผลิต CGTase และการใช้สารอหาร ในถังปฏิกรณ์ เมื่อเลี้ยงหัวเชื้อใน อาหารนิวเทรียนบรอท, NB ที่ภาวะ: ค่า pH เริ่มต้น 8, 30°C, 280 rpm ความเข้มข้นของแป้ง 8.4 กรัมต่อลิตร —◆— เซลล์ ··▲·· แป้ง —■— CGTase —●— pH

เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีองค์ประกอบที่เป็นแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นแป้งชนิดที่มีความหนืดสูง และแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อต้องผ่านการฆ่าเชื้อก่อนทำการหมักด้วยหม้อฆ่าเชื้อแบบไอน้ำ (Autoclave) ต้องใช้ความร้อนสูงถึง 121°C เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งสำหรับแป้งมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 66°C แป้งจะเริ่มเกิดสภาวะเจล (เจลาติไนซ์เซชัน) (กล่าวถึงในทฤษฎีหัวข้อ 2.1) ดังนั้นแป้งที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อซึ่งต้องให้ความร้อนเพิ่มขึ้นจนอุณหภูมิสูงกว่า 66°C ทำให้เม็ดแป้งพองตัวเพิ่มขึ้นและแตกออก โมเลกุลของอะมิโลสขนาดเล็กจะกระจัดกระจายออกมาทำให้ความหนืดลดลง เมื่อปล่อยให้เย็นตัวโมเลกุลอะมิโลสที่อยู่ใกล้กันจะเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลเกิดเป็นร่างแหสามมิติโครงสร้างใหม่ที่สามารถอุ้มน้ำและไม่มีการดูดน้ำเข้ามาอีก มีความหนืดคงตัวมากขึ้น เกิดลักษณะเจลเหนียว จากลักษณะดังที่กล่าวมาทำให้แป้งที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีการละลายดีแต่จะมีความหนืดสูงด้วย

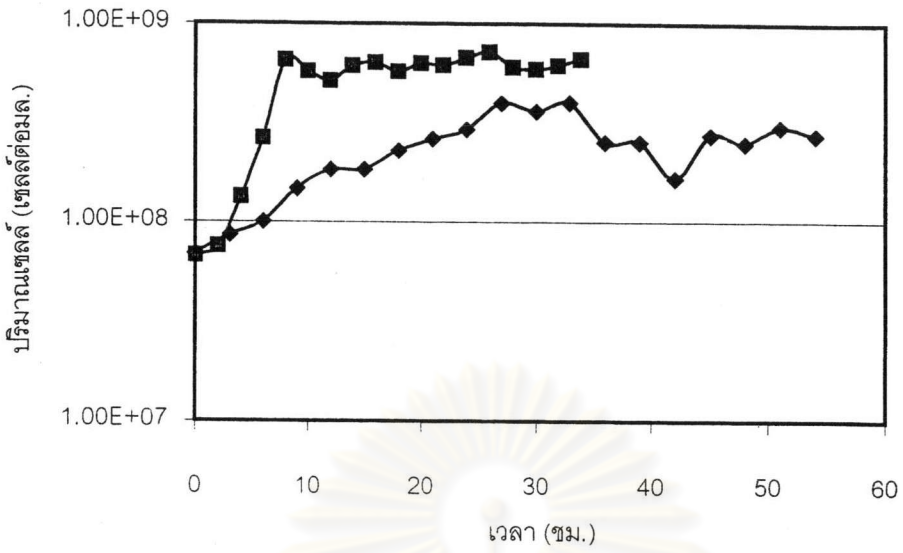
จากการทดสอบนำความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 1-3% น้ำหนักโดยปริมาตร ไปผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่าที่ความเข้มข้นของแป้ง 3% แป้งเริ่มจับตัวเป็นก้อนมีลักษณะเหนียวและหนืดคล้ายแป้งเปียก เมื่อทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนที่ไม่ตกตะกอน (supernatant) ไปหาน้ำหนักแห้ง พบว่าที่ความเข้มข้นของแป้งน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1% แป้งจะละลายได้เกือบหมด (ประมาณ 80-90%) แต่ที่ความเข้มข้นของแป้งมากกว่านั้นส่วนที่ละลายน้ำจะลดลงโดยที่ความเข้มข้นของแป้ง 2% แป้งจะละลายน้ำได้เพียง 50-60% เท่านั้น แต่ถ้านำสารละลายแป้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อขณะยังร้อนอยู่ไปกวนจนกระทั่งเย็นแป้ง 2% จะละลายน้ำได้ดีมากขึ้นถึง 90% แต่อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นสูงแป้งยังคงมีความหนืดสูงซึ่งจะมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากการถ่ายเทมวลของสารอาหารและออกซิเจนจะถูกจำกัด [Sirisansaneeyakul และ คณะ, 1996] ทำให้ต้องใช้ความเร็วรอบในการกวนสูงมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแป้งอยู่ในช่วง 0.1-1.2% น้ำหนักโดยปริมาตร นอกจากนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีองค์ประกอบบางส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ CSL ที่ประกอบด้วยของแข็ง 50% และแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เป็นเนื้อเดียว การถ่ายเทมวลสารภายในถังปฏิกรณ์จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึง ซึ่งจะศึกษาเพิ่มเติมถึงความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมในหัวข้อต่อไป

5.2 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต CGTase

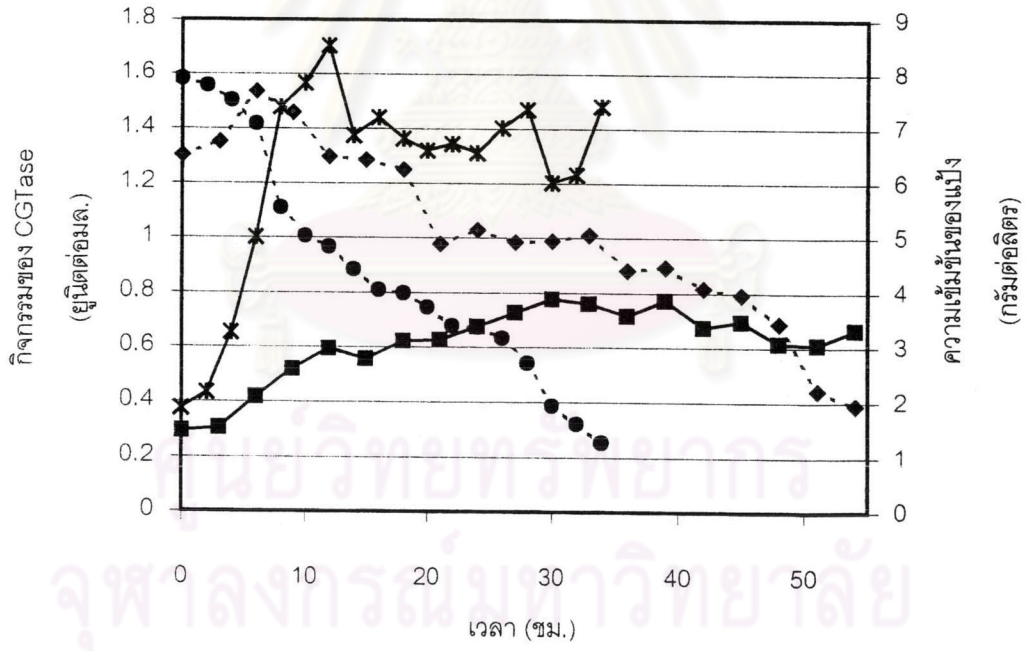
ในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต CGTase ซึ่งประกอบด้วย การเลี้ยงเชื้อแบบควบคุมพีเอชและไม่ควบคุมพีเอช ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อ และความเร็วรอบในการกวน ผลการทดลองที่ได้นำไปคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด โดยรายละเอียดในการคำนวณแสดงไว้ในภาคผนวก ค สำหรับในการเลือกภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อจะพิจารณาจากอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดเป็นเกณฑ์สำคัญ เนื่องจากค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะมีหน่วยต่อกรัมเซลล์ดังนั้นในบางกรณีจะมีค่าไม่ต่างกันเท่าใดนักสำหรับน้ำหมักที่มีปริมาณเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกับน้ำหมักที่มีปริมาณเซลล์มากและกิจกรรมของเอนไซม์สูง นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ ความต้องการของผู้ผลิตคือต้องการเอนไซม์ในปริมาณมากในช่วงเวลาการผลิตที่สั้นที่สุด โดยไม่ต้องคำนึงถึงว่าจุลินทรีย์จะมีการเจริญและปริมาณมากหรือน้อยเพียงใด ดังนั้นในการเลือกภาวะในการเลี้ยงเชื้อเพื่อนำไปใช้ในการทดลองเพื่อหาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ในหัวข้อต่อไปจะพิจารณาจากอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดเป็นหลัก

5.2.1 ผลของการเลี้ยงเชื้อแบบควบคุมพีเอชและไม่ควบคุมพีเอช

จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *B. circulans* ATCC 9995 แบบควบคุมพีเอชให้คงที่เท่ากับ 8 ตลอดการทดลอง ความเร็วรอบในการกวน 280 รอบต่อนาที พบว่าเซลล์ค่อยๆเจริญเติบโตอย่างช้าๆพร้อมกับการผลิต CGTase ค่อยๆเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 5.3 และ 5.4 โดยที่เวลา 27 ชม. เซลล์มีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 3.96×10^{8} เซลล์ต่อมล. ให้กิจกรรมของ CGTase 0.78 ยูนิตต่อมล. นอกจากนี้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังลดลงอย่างช้าๆ โดยพบว่าภายใน 40 ชม.แป้งลดลง 50% เหลือความเข้มข้นของแป้ง เท่ากับ 4.46 กรัมต่อลิตร ซึ่งเห็นได้ว่าผลการทดลองที่ได้มีความแตกต่างอย่างมากจากการเลี้ยงเชื้อแบบไม่ควบคุมพีเอช ความเร็วรอบในการกวน 280 รอบต่อนาที กล่าวคือในการเลี้ยงเชื้อโดยเริ่มต้นพีเอชที่ 8 แล้วปล่อยให้ค่าพีเอชปรับตัวขึ้นลงตามอิสระ การเจริญของเซลล์ การผลิตเอนไซม์ CGTase และ การใช้สารอาหารจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและมีค่าสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบมีการควบคุมพีเอช โดยในการเลี้ยงเชื้อแบบไม่ควบคุมพีเอชใช้เวลาเพียง 8 ชม. เซลล์มีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 6.52×10^{8} เซลล์ต่อมล. ให้กิจกรรมของ CGTase เท่ากับ 1.78 ยูนิตต่อมล. และความเข้มข้นของแป้งลดลงเหลือ 1.93 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 30 ชม. จากผลการทดลองข้างต้นได้ผลเช่นเดียวกับการเลี้ยงเชื้อ *Alkalophilic Bacillus sp.* NP 523 ในงานวิจัยของ วรางคณา สงวนพงษ์, 1997 ตามรายงานกล่าวว่าช่วงระยะปรับตัวในการเลี้ยงเชื้อแบบไม่ควบคุมพีเอชสั้นและต่ำกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบควบคุมพีเอช และเมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของ



รูปที่ 5.3 แสดงปริมาณเซลล์ตามเวลาเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงเชื้อแบบควบคุมและไม่ควบคุมพีเอช ที่ภาวะ: ค่า pH เริ่มต้น 8, 30°C, 280 rpm และ ความเข้มข้นของแป้ง 1%น้ำหนักโดยปริมาต ◆ ควบคุมพีเอช ■ ไม่ควบคุมพีเอช



รูปที่ 5.4 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ และ ความเข้มข้นของแป้ง ตามเวลา เปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงเชื้อแบบควบคุมและไม่ควบคุมพีเอช ที่ภาวะ: ค่า pH เริ่มต้น 8, 30°C, 280 rpm และ ความเข้มข้นของแป้ง 1%น้ำหนักโดยปริมาตร
✱ ไม่ควบคุมพีเอช (CGTase) ■ ควบคุมพีเอช (CGTase)
● ไม่ควบคุมพีเอช (แป้ง) ◆ ควบคุมพีเอช (แป้ง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เซลล์ สารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ ของการเลี้ยงเชื้อทั้งสองแบบดังที่รายงานไว้ในตรวจเอกสาร ตารางที่ 3.2 พบว่าการเลี้ยงเชื้อแบบไม่ควบคุมพีเอชแบคทีเรียสามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ CGTase สูงและเร็วกว่าในสภาวะที่มีการควบคุมพีเอช และสอดคล้องกับรายงานของ Mauri และคณะในปี 1990 เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบควบคุมพีเอชให้คงที่ตลอดเวลาแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ CGTase ไม่ดีหรืออาจจะไม่ผลิตเลย [อ้างอิงใน อุไรวรรณ รัชธร, 1992]

เมื่อนำผลการทดลองเลี้ยง *B. circulans* ในภาวะที่ควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชไปคำนวณถึงอัตราจำเพาะ (specific rate) และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5.1 พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด ของการเลี้ยงเชื้อแบบไม่ควบคุมพีเอชมีค่ามากกว่าแบบควบคุมพีเอชคิดเป็น 4.8, 3, 8.7 และ 4.7 เท่า ตามลำดับ ดังนั้นการทดลองเลี้ยงเชื้อเพื่อหาความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตและความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสม รวมทั้งการประเมินค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์จะใช้ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 8 (เป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเลี้ยง *B. circulans* ATCC 9995 ในการผลิต CGTase [อรุณี ตรีศิริโรจน์, 2537]) และไม่มีการควบคุมพีเอช ตลอดทุกการทดลอง

ตารางที่ 5.1 อัตราจำเพาะ (μ, q_s, q_p) และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดที่คำนวณได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบควบคุมพีเอชและแบบไม่ควบคุมพีเอช

	การเลี้ยงเชื้อแบบควบคุมพีเอช	การเลี้ยงเชื้อแบบไม่ควบคุมพีเอช
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) (ต่อชม.)	0.06	0.29
อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (q_s) (กรัมแป้งต่อกรัมเซลล์·ชม.)	0.12	0.36
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (q_p) (ยูนิตต่อกรัมเซลล์·ชม)	19.49	169.96
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด (P_{max}) (ยูนิตต่อมล.·ชม)	0.03 (30 ชม.)	0.14 (12 ชม.)

5.2.2 ผลของแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการเลี้ยงเชื้อ *B. circulans* ATCC 9995 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วยแหล่งเกลือคาร์บอเนตเป็นแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1% (น้ำหนักโดยปริมาตร) ในขวดเขย่า พบว่าเมื่อใส่แคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณต่างกันจะไม่มีผลต่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งตรงข้ามกับการใช้โซเดียมคาร์บอเนตเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงขึ้นจะให้ค่าพีเอชเริ่มต้นสูงขึ้นตามไปด้วย [Makela และ คณะ, 1990] นอกจากนี้การใส่แคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณต่างกันยังไม่มีผลต่อการเพิ่มของ ระยะปรับตัว (lag phase) ในการเลี้ยงเชื้อ และ ค่าความแตกต่างของ pH ระหว่างค่า pH เริ่มต้นกับค่า pH ที่ต่ำสุดในการเลี้ยงเชื้อ (Δ $pH_{max.}$) โดยที่ความเข้มข้นของ $CaCO_3$ ในช่วง 0.5-1% จะให้ค่า Δ pH_{max} ใกล้เคียงกันคือ 1.8-1.9 ยูนิต ซึ่งได้ผลต่างจาก Makela และ คณะ, 1990 ที่เลี้ยงเชื้อเชื้อ Alkalophilic *Bacillus sp.* ATCC 21783 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคาร์บอเนตเป็นองค์ประกอบ (แสดงไว้ในบทที่ 3 ตรวจเอกสาร ในตารางที่ 3.4) ซึ่งพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Na_2CO_3 จาก 0.5% เป็น 0.75% จะส่งผลให้ลดค่า Δ pH_{max} จาก 3.5 ยูนิตเป็น 1.5 ยูนิต และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Na_2CO_3 มากขึ้นกว่านี้จะสามารถลดค่า Δ pH_{max} เพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ Na_2CO_3 สูงขึ้นจาก 0.75% เป็น 1.75% ระยะปรับตัวจะเพิ่มขึ้นจาก 15 ชม. เป็น 120 ชม. การที่ $CaCO_3$ ไม่มีผลต่อค่า pH และการลดค่า Δ pH_{max} เช่นเดียวกับ Na_2CO_3 อาจมีสาเหตุจาก $CaCO_3$ เมื่อละลายน้ำจะมีค่าความเป็นด่างต่ำกว่าถ้าเปรียบเทียบกับ Na_2CO_3 และมีรายงานว่า $CaCO_3$ ช่วยรักษาระดับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อได้อีกด้วย

เมื่อนำผลการทดลองการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของ $CaCO_3$ ต่างกัน มาคำนวณหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ และ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 5.2 เนื่องด้วยการทดลองทำในขวดเขย่า ซึ่งแต่ละความเข้มข้นของ $CaCO_3$ จะเก็บตัวอย่างตามเวลาจากขวดเขย่า 3 ขวดสลับกัน และบางความเข้มข้นของ$CaCO_3$ ไม่ได้ทำการทดลองพร้อมกัน ทำให้ผลที่ได้อาจเกิดการคลาดเคลื่อนดังนั้นจึงทำการทดลองที่ $CaCO_3$ 1% ซ้ำกัน 3 ครั้งแล้วนำมาหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) จากนั้นนำมาคำนวณค่าความคลาดเคลื่อนของการทดลองที่ค่าความเชื่อมั่น 90% (e) ของอัตราจำเพาะต่างๆดังแสดงไว้ในตารางที่ 5.3 (วิธีการคำนวณแสดงไว้ในภาคผนวก ค 2) และเมื่อคำนวณค่าความแตกต่างที่มีค่ามากที่สุดของค่าอัตราจำเพาะที่ความเข้มข้นของ $CaCO_3$ ต่างกัน (Δmax) จากข้อมูลในตารางที่ 5.2 จากนั้นนำมาหาอัตราส่วนระหว่างค่าความแตกต่างของค่าอัตราจำเพาะที่ความเข้นข้นของ $CaCO_3$ ต่างกันที่มีค่ามากที่สุดกับค่าความคลาดเคลื่อน (Δmax/e) ดังแสดงในตารางที่ 5.3 จะเห็นว่าค่า $\Delta q_p \max / e_p$ มีค่าน้อยกว่า 1 ส่วน $\Delta q_s \max / e_s$ และ $\Delta \mu \max / e_\mu$ มีค่าเท่ากับ 1 และมากกว่า 1 เพียงเล็กน้อย ตามลำดับ

ตารางที่ 5.2 อัตราจำเพาะและค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดของ *B. circulans* ATCC 9995 ในขวดเขย่าที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตต่างกัน

	แคลเซียมคาร์บอเนต (% น้ำหนักโดยปริมาตร)							
	0.25	0.5	0.75	1.00				
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	SD
อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชม.)	0.24	0.20	0.24	0.23	0.21	0.22	0.21	0.02
อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (กรัมแป้งต่อกรัมเซลล์·ชม.)	0.24	0.23	0.23	0.24	0.29	0.27	0.27	0.03
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (ยูนิตต่อกรัมเซลล์·ชม.)	87.37	105.73	85.15	110.87	87.7	82.68	93.75	15.04
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด (ยูนิตต่อมล.·ชม.) (18 ชม.)	0.075	0.092	0.074	0.079	0.078	0.075	0.077	0.002
ความแตกต่างของพีเอชสูงสุด	1.94	1.85	1.85	1.93	1.82	1.94	1.9	0.07

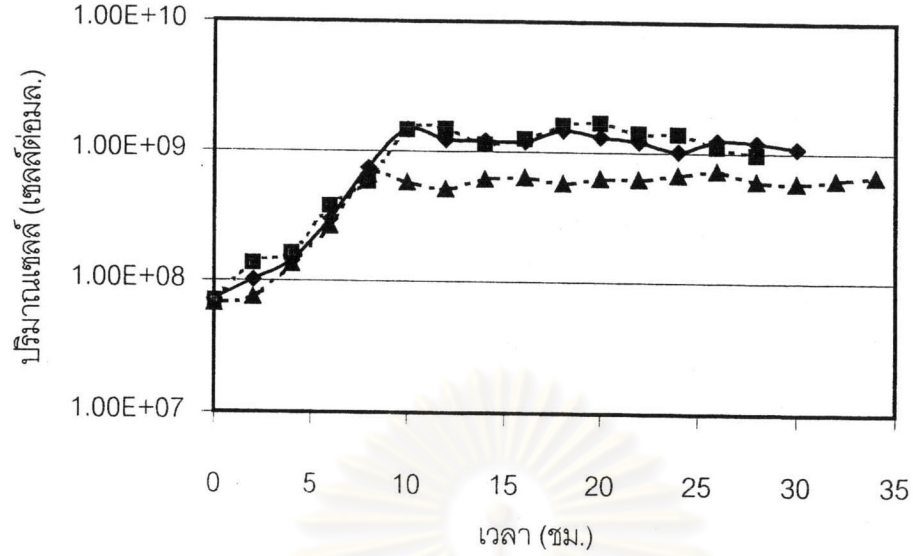
ตารางที่ 5.3 การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของอัตราจำเพาะที่ความแตกต่างกันมากที่สุดที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตต่างๆกันกับค่าความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง

	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ความเชื่อมั่น 90% (e)	ค่าความแตกต่างของค่าอัตราจำเพาะที่มากที่สุด ที่ความเข้มข้นของ $CaCO_3$ ต่างกัน (Δmax)	$\frac{\Delta max}{e}$
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)	$\pm$ 0.03	0.04	1.33 > 1
อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (q_s)	$\pm$ 0.05	0.05	1 = 1
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (q_p)	$\pm$ 25.36	20.58	0.81 < 1
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด (P_{max})	$\pm$ 0.0034	0.018	5.29 >> 1

จากข้อมูลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่ออัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ และ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเพียงเล็กน้อย แต่ไม่มีผลต่ออัตราการผลิตจำเพาะของเอนไซม์ CGTase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่ใส่แคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจะช้ากว่าและมีปริมาณเซลล์สูงสุดเพียง 1.12 กรัมต่อลิตร น้อยกว่าการมีแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25% ประมาณ 1.02 กรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามสำหรับความเข้มข้นของ $CaCO_3$ ที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อจะพิจารณาจากค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด จากตารางที่ 5.2 ที่ความเข้มข้นของ $CaCO_3$ 0.5% อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 0.092 ยูนิตต่อมล.·ชม. และมีค่ามากกว่าที่ความเข้มข้นของ $CaCO_3$ อื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างมากอีกด้วย ($\Delta P_{max} / e >> 1$) ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ $CaCO_3$ เท่ากับ 0.5% น้ำหนักโดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการทดลองในหัวข้อต่อไป

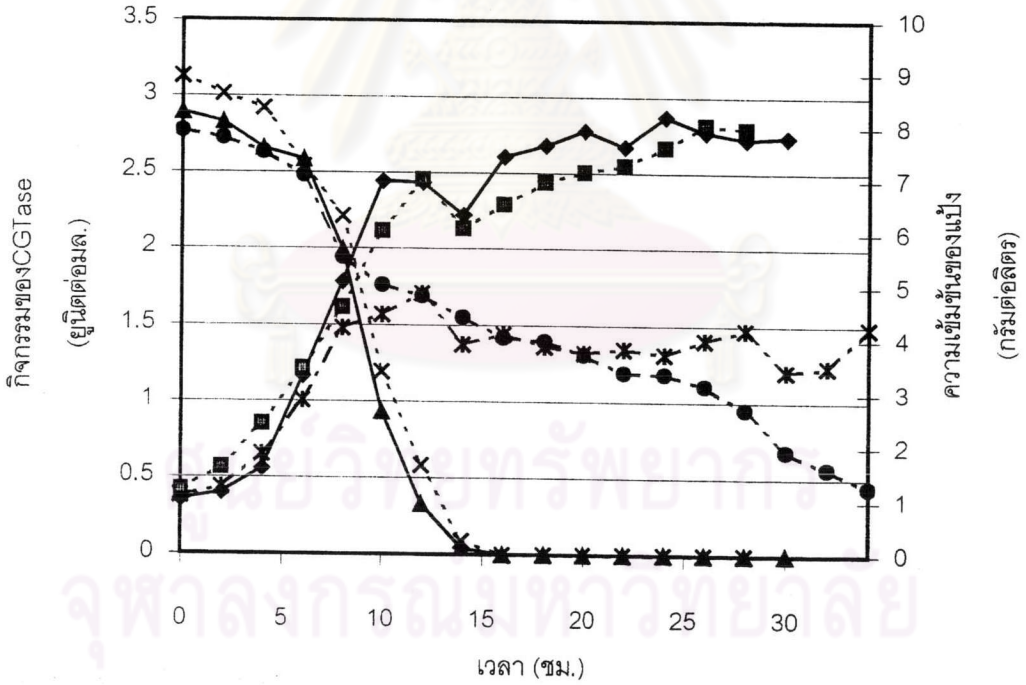
5.2.3 ผลของความเร็วรอบในการกวนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

จากกราฟรูปแบบการเปลี่ยนแปลงเซลล์ สารอาหาร และผลิตภัณฑ์ ตามเวลาที่ความเร็วรอบต่างๆเปรียบเทียบกัน ดังรูปที่ 5.5 และ 5.6 โดยมีภาวะในการเพาะเลี้ยงคือ ค่าพีเอชเริ่มต้น 8, อุณหภูมิ 30°C และอัตราการให้อากาศประมาณ 4-5 ลิตรต่อนาที หรือคิดเป็น 1.5-2 vvm ความเร็วรอบ 280-560 rpm ซึ่งจากการตรวจเอกสารพบว่าอัตราการให้อากาศในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียส่วนใหญ่คือ 1 vvm และจากงานวิจัยของ Jamuna และคณะ, 1993 พบว่าในการเพาะเลี้ยง *B. cereus* เพื่อผลิต CGTase เมื่ออัตราการให้อากาศ 1.5 vvm 300 rpm อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าสูงสุด ดังนั้นในงานวิจัยนี้คาดว่าออกซิเจนจึงเป็นสารอาหารที่มีอยู่ในปริมาณมากเกินพอแม้ที่ความเร็วรอบ 280 rpm จากรูปที่ 5.5 และ 5.6 จะเห็นได้ว่าที่ความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 400 และ 560 rpm การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารต่างๆ มีค่าใกล้เคียงกันแต่แตกต่างจากที่ความเร็วรอบ 280 rpm อย่างมาก โดยที่ความเร็วรอบ 280 rpm ปริมาณเซลล์และเอนไซม์มีค่าต่ำกว่าที่ความเร็วรอบ 400 และ 560 rpm ประมาณ 2 เท่า นั่นคือ ที่ความเร็วรอบ 280 rpm (ชม.ที่ 8) เซลล์มีปริมาณสูงสุด เท่ากับ 6.52×10^8 เซลล์ต่อมล. ให้กิจกรรมของเอนไซม์ 1.48 ยูนิตต่อมล., ที่ความเร็วรอบ 400 rpm (ชม.ที่ 10) เซลล์มีปริมาณสูงสุด เท่ากับ 1.46×10^9 เซลล์ต่อมล. ให้กิจกรรมของเอนไซม์ 2.44 ยูนิตต่อมล. และที่ความเร็วรอบ 560 rpm เซลล์มีปริมาณสูงสุด เท่ากับ 1.44×10^9 เซลล์ต่อมล. ให้กิจกรรมของเอนไซม์ 2.12 ยูนิตต่อมล. ตามลำดับ อีกทั้งอัตราการใช้สารอาหารของเซลล์ที่ความเร็วรอบ 280 rpm ยังน้อยกว่าที่ความเร็วรอบ 400 และ 560 rpm ประมาณ 2 เท่า เช่นเดียวกันซึ่งเป็นผลมาจากการกวนที่ความเร็วรอบ 280 rpm นั้นมีค่าน้อยไปทำให้การถ่ายเทมวลของสารอาหารภายในถังปฏิกรณ์เกิดขึ้นได้ไม่ดีส่งผลให้



รูปที่ 5.5 ปริมาณเซลล์ตามเวลาของการเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่ความเร็วรอบต่างกัน ที่ pH เริ่มต้น 8, 30°C และ ความเข้มข้นของแป้ง 1%น้ำหนักโดยปริมาตร

280 rpm 400 rpm 560 rpm



รูปที่ 5.6 กิจกรรมของ CGTase และปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ตามเวลาของการเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่ความเร็วรอบต่างกัน ที่ pH เริ่มต้น 8, 30°C และ ความเข้มข้นของแป้ง 1%น้ำหนักโดยปริมาตร

CGTase 280 rpm CGTase 400 rpm CGTase 560 rpm

starch 280 rpm starch 400 rpm starch 560 rpm

เซลล์มีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ CGTase ได้น้อย

ถึงแม้ว่าที่ความเร็วรอบ 400 และ 560 rpm จะมีปริมาณเซลล์ กิจกรรมของเอนไซม์ และ การใช้สารอาหารมากกว่าที่ความเร็วรอบ 280 rpm แต่ถ้าพิจารณาจากอัตราจำเพาะต่างๆดังแสดงในตารางที่ 5.4 จะพบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ความเร็วรอบในการกวน 400 rpm มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 0.31 ต่อชม. ส่วนที่ความเร็วรอบ 560 และ 280 rpm มีค่าเท่ากันเท่ากับ 0.29 ต่อชม. สำหรับอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะเมื่อความเร็วรอบสูงขึ้นจะมีค่าลดลงเล็กน้อย ซึ่งตรงข้ามกับอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะที่ความเร็วรอบสูงขึ้นจะมีค่าลดลงอย่างมากโดยที่ความเร็วรอบเท่ากับ 560 rpm มีค่าน้อยกว่าที่ 280 rpm ถึง 39% ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากถึงแม้ว่าที่ความเร็วรอบ 400 และ 560 rpm ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CGTase และการใช้แป้งจะสูงแต่ปริมาณเซลล์จะมากตามไปด้วย ดังนั้นเมื่อคำนวณค่าอัตราจำเพาะคิดต่อกรัมเซลล์ทำให้ค่าอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะและอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะไม่ได้มีค่ามากตามไปด้วย และจากการที่อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะมีค่าลดลงอย่างมากเมื่อความเร็วรอบในการกวนเพิ่มขึ้น เกิดเนื่องจาก CGTase เป็นเอนไซม์ที่ถูกขับออกมานอกเซลล์ ดังนั้นที่ความเร็วรอบสูงขึ้นแรงกลที่เกิดจากใบกวนในถังปฏิกรณ์เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ทำลายแรงยึดระหว่างโมเลกุลโดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธะไฮโดรเจน ทำให้อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมบางส่วนไป

ตารางที่ 5.4 แสดงค่าอัตราจำเพาะและอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่ความเร็วรอบต่างกัน

ความเร็วรอบในการกวน (rpm)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชม.)	อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (กรัมแป้งต่อกรัมเซลล์*ชม)	อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (ยูนิตต่อกรัมเซลล์ต่อชม.)	อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด (ยูนิตต่อมล.*ชม.)
280	0.29	0.36	169.96	0.15 (8 ชม.)
400	0.31	0.35	132.38	0.24 (10 ชม.)
560	0.29	0.34	103.97	0.21 (10 ชม.)

สำหรับการเลือกความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสม เมื่อพิจารณาอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สุดท้าย (ที่เวลา 10 ชม.) จากตารางที่ 5.4 จะเห็นได้ว่าที่ความเร็วรอบ 400 และ 560 rpm มีค่าสูงกว่าที่ความเร็วรอบ 280 rpm ถึง 1.6 และ 1.4 เท่า ตามลำดับ แต่เมื่อความเร็วรอบสูงขึ้นจาก 400 rpm เป็น 560 rpm ค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะลดลงถึง 21.7% ดังนั้นในการทดลองต่อไปเพื่อประเมินค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองจลนพลศาสตร์ จึงเลือกใช้ความเร็วรอบในการกวนต่ำที่สุดที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ซึ่งในงานวิจัยนี้คือที่ความเร็วรอบ 400 rpm (P_{max} เท่ากับ 0.24 ยูนิตต่อมล.·ชม.) เพื่อเป็นการประหยัดพลังงานที่ใช้ในการกวน

5.3 อิทธิพลของความเข้มข้นเริ่มต้นของสารตั้งต้นต่ออัตราจำเพาะต่าง ๆ (μ, q_s, q_p)

สารตั้งต้นที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *B. circulans* ATCC 9995 คือแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นสารอาหารหลักและเป็นสารอาหารที่เป็นตัวกำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยาเพียงชนิดเดียว จากการทดลองใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่างๆกัน (1.46-11.33 กรัมต่อลิตร) ในการเลี้ยงเชื้อสามารถคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (q_s) และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ(q_p) ดังแสดงในตารางที่ 5.5 เนื่องจากในงานวิจัยนี้ทำการวัดความเข้มข้นของแป้งที่เหลือโดยใช้วิธี phenol-sulfuric ซึ่งค่าที่วัดได้คือน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) และเมื่อตรวจวัดน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีค่ามากกว่าน้ำตาลจากแป้งอย่างเดียว (โดยการเทียบจากกราฟมาตรฐานปริมาณน้ำตาลทั้งหมดกับความเข้มข้นของแป้ง รูปที่ ก2) ดังนั้นจึงทำการวัดน้ำตาลใน corn steep liquor (CSL) ซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า CSL 5 % น้ำหนักโดยปริมาตร ประกอบด้วยน้ำตาล 1.4 กรัมต่อลิตร ดังนั้นค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งที่แสดงในตารางที่ 5.5 เป็นค่าที่แสดงหลังจากการหักลบด้วยน้ำตาลใน CSL แล้ว และจากการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีองค์ประกอบของแป้งพบว่า อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เพาะ ซึ่งเกิดจากแหล่งคาร์บอนใน CSL มีค่าเท่ากับ 0.02 ต่อชม., 0.1 กรัมแป้งต่อกรัมเซลล์·ชม. และ 17.33 ยูนิตต่อกรัมเซลล์·ชม. ตามลำดับ

เมื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลังกับค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ (รูปที่ 5.7) พบว่าเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลังมีความเข้มข้นสูงขึ้น (ในช่วง 1.46 ถึง 6.57 กรัมต่อลิตร) อัตราการเจริญจำเพาะจะมีแนวโน้มสูงขึ้นตามไปด้วย แต่เมื่อความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นสูงถึง 11.4 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะกลับมีค่าต่ำกว่าที่ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 8.2 กรัมต่อลิตร ประมาณ 25.8% ในภาวะที่ใช้ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที เท่ากัน เนื่องจากแป้งสามารถเกิดสภาวะการเกิดเจล

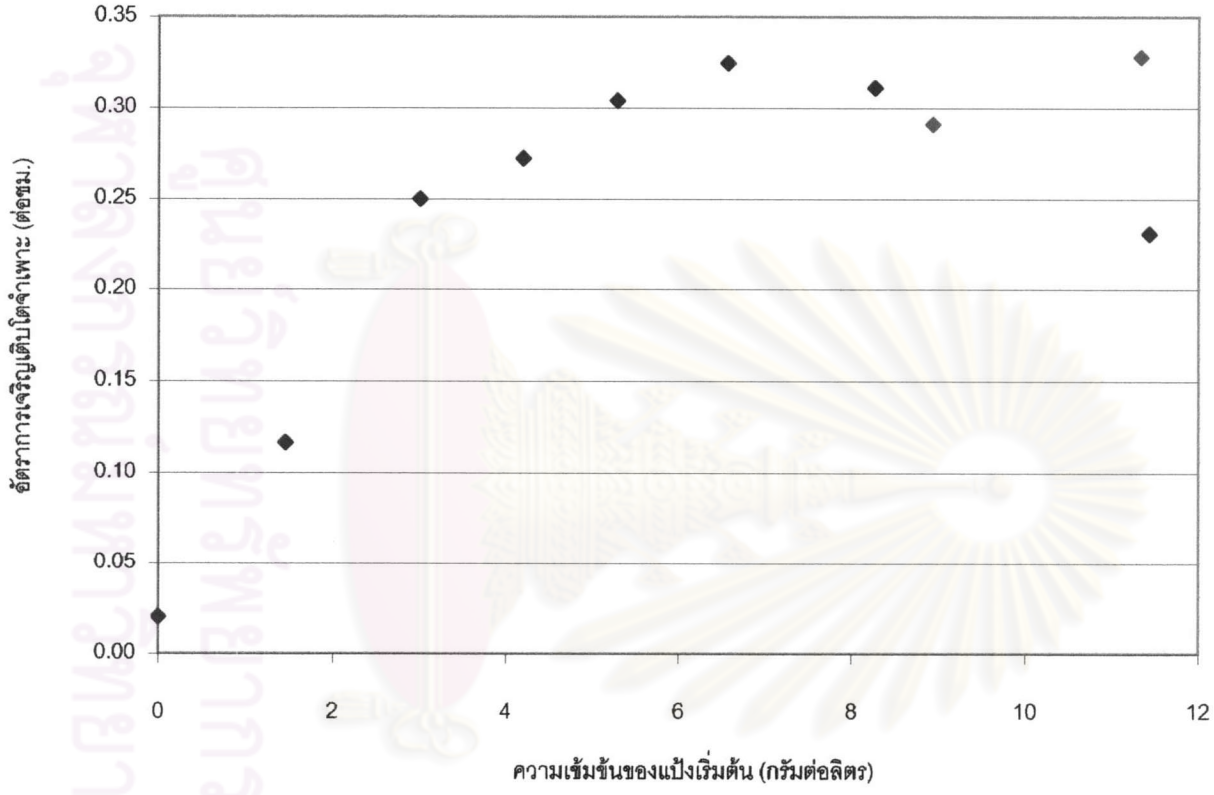
(gelatinization) (กล่าวถึงในทฤษฎีหัวข้อที่ 2.1) ทำให้ที่ความเข้มข้นของแป้งสูงน้ำแป้งจะมีความหนืดสูง สำหรับน้ำแป้งมันสำปะหลังเมื่อให้ความร้อนถึงอุณหภูมิ 66°C จะเกิดสภาวะเจลขึ้นและในการฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อก่อนทำการหมักด้วยหม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำต้องใช้ความร้อนสูงถึง 121°C เป็นเวลา 20 นาที ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังมีความหนืดสูงตามไปด้วย ดังนั้นเราจึงจำเป็นต้องพิจารณาถึงการถ่ายเทมวลของสารอาหารและออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ซึ่งอาจถูกจำกัดเมื่อความหนืดของแป้งที่ใช้เพิ่มมากขึ้น ต่อไปจึงแยกพิจารณาผลการทดลองออกเป็นสองส่วน คือ

ตารางที่ 5.5 ค่าอัตราจำเพาะ (μ , q_s, q_p) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลังต่างกัน ภาวะในการถังปฏิกรณ์ : ค่า pH เริ่มต้น 8 , 33°C และ ความเร็วรอบ 400 rpm

ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลัง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (กรัมแป้งต่อกรัมเซลล์·ชม)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชม.$^{-1}$)	อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (ยูนิตต่อกรัมเซลล์·ชม.)
1.46[a]	0.08	0.12	44.42
3.01[a]	0.27	0.25	159.80
4.2[a]	0.34	0.27	141.37
5.29[a]	0.35	0.30	152.95
6.57[a]	0.37	0.32	153.95
8.20[a]	0.35	0.31	132.38
11.36[a]	0.25	0.23	153.59
8.87[b]	0.34	0.29	103.97
11.26[b]	0.38	0.33	111.87

หมายเหตุ [a] ทำการทดลองที่ความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 400 rpm

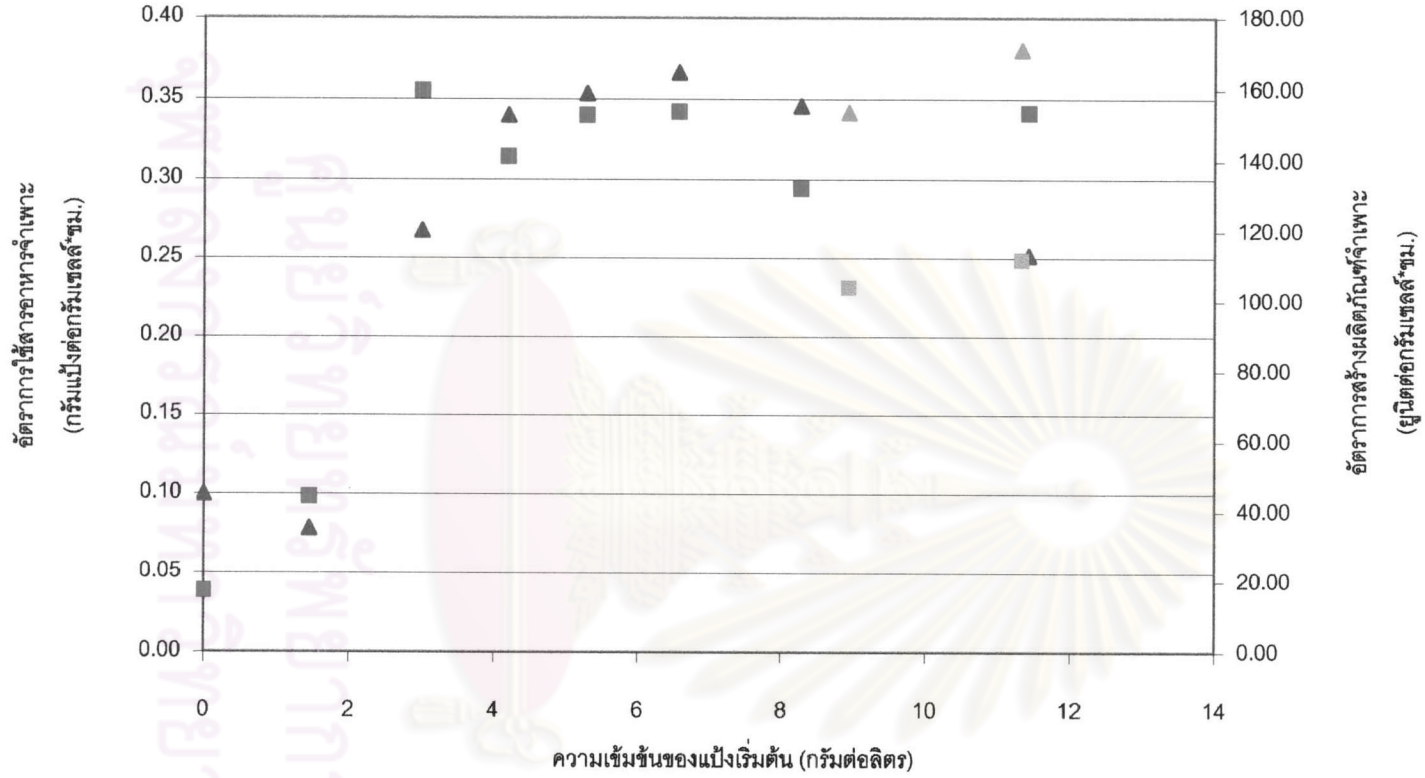
[b] ทำการทดลองที่ความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 560 rpm



รูปที่ 5.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ในถังปฏิกรณ์แบบไม่ต่อเนื่อง ที่ pH เริ่มต้น 8 และ 30°C

ส่วนแรกที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลังน้อยกว่าหรือเท่ากับ 8.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งช่วงความเข้มข้นนี้แป้งมีความหนืดไม่สูงมากและจากผลการทดลองในหัวข้อที่ 5.2 การทดสอบความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมสำหรับความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งเท่ากับ 8.2 กรัมต่อลิตร พบว่าความเร็วรอบ 400 rpm เป็นค่าที่เหมาะสมและเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ CGTase จากการผลทดลองดังกล่าวจึงมั่นใจได้ว่าในช่วงความเข้มข้นของแป้งน้อยกว่าเท่ากับ 8.2 กรัมต่อลิตรไม่มีการจำกัดการเจริญเติบโตเนื่องจากอิทธิพลของการถ่ายเทมวลสารเข้าสู่เซลล์ จากรูปที่ 5.7 จะเห็นได้ว่ากราฟ μ-S มีลักษณะใกล้เคียงกับสมการประเภท Monod โดยไม่พบการยับยั้งการเจริญเนื่องจากสารอาหารและผลิตภัณฑ์ สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นกับอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะและอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะแสดงในรูปที่ 5.8 จากรูปจะเห็นได้ว่าความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นกับอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะมีลักษณะคล้ายกับความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญจำเพาะคือมีแนวโน้วเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมีค่าสูงขึ้น และลู่เข้าสู่ค่าอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของแป้งสูงมากขึ้น ในส่วนของค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะที่ความเข้มข้นของแป้ง 1.46 กรัมต่อลิตร จะมีค่าต่ำ (44.22 ยูนิตต่อกรัมเซลล์·ชม.) แต่ที่ความเข้มข้นของแป้งมากกว่า 1.46 กรัมต่อลิตร ค่าอัตราการการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะจะอยู่ในช่วง 132-159 ยูนิตต่อกรัมเซลล์·ชม.

ส่วนที่สองที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมากกว่า 8.2 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาการทดลองที่ความเร็วรอบ 400 rpm เท่ากัน ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งเท่ากับ 11.33 กรัมต่อลิตร ค่าอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะต่ำลงเท่ากับ 0.23 ต่อชม. และ 0.25 กรัมแป้งต่อกรัมเซลล์·ชม. ตามลำดับ จากผลดังกล่าวการที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมากขึ้นแต่อัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะกลับต่ำลงอาจเกิดได้จาก ประการแรกสารอาหารที่เพิ่มมากขึ้นเป็นตัวยับยั้งการเจริญ (substrate inhibition) ประการที่สองคือการจำกัดการเจริญเนื่องจากการถ่ายเทมวลสารเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นจึงทำการทดลองเพิ่มความเร็วรอบในการกวนเป็น 560 rpm เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลสารภายในถังปฏิกรณ์ พบว่าเมื่อเพิ่มความเร็วรอบส่งผลให้อัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะมีค่าสูงขึ้นเท่ากับ 0.33 ต่อชม. และ 0.38 กรัมแป้งต่อกรัมเซลล์·ชม. ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะที่ความเร็วรอบ 400 rpm ถึง 43.48% และ 52% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการที่อัตราการเจริญจำเพาะลดลงที่ความเข้มข้นของแป้ง 11.33 กรัมต่อลิตร สาเหตุหลักเกิดจากอัตราการถ่ายเทมวลสารภายในถังปฏิกรณ์ที่ความเร็วรอบ 400 rpm ต่ำเกินไปทำให้อัตราถ่ายเทมวลสารเข้าสู่เซลล์เป็นตัวกำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยาแทนที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาจากจลนพลศาสตร์จะเป็นตัวกำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยา ด้วยเหตุดังกล่าวทำให้การวัดค่าทางจลนพลศาสตร์ (อัตราการเจริญจำเพาะ และ อัตราการใช้สาร



รูปที่ 5.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นกับอัตราการใช้สารอาหาร จำเพาะ และ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ ในถังปฏิกรณ์แบบไม่ต่อเนื่อง ที่ภาวะ: ค่า pH เริ่มต้น 8 และ 30°C

▲ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะที่ความเร็วรอบ 400 rpm

▲ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะที่ความเร็วรอบ 560 prm

■ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะที่ความเร็วรอบ 400 rpm

■ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะที่ความเร็วรอบ 560 rpm

อาหารจำเพาะ) นั้นผิดพลาดมีค่าน้อยไปจากความเป็นจริง เมื่อพิจารณาถึงอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะจากรูปที่ 5.8 พบว่าที่ความเร็วรอบ 400 rpm ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้ง 11.36 กรัมต่อลิตร อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะมีค่าใกล้เคียงกับที่ความเข้มข้นอื่น มีค่าเท่ากับ 153.59 ยูนิตต่อกรัมเซลล์·ชม. แต่เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการกวนเป็น 560 rpm พบว่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะกลับลดลง27.16% เมื่อเปรียบเทียบกับที่ความเร็วรอบ 400 rpm ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในหัวข้อที่ 5.2 คือที่ความเข้มข้นของแป้ง 8.2 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการกวนจาก 400 เป็น 560 rpm จะเป็นผลให้อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะลดลง 21.46% จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเร็วรอบในการกวนถึงแม้ว่าจะทำให้การถ่ายเทมวลภายในถังดีขึ้นแต่ในขณะเดียวกันจะทำให้แรงเฉือนซึ่งเกิดจากใบกวนเพิ่มขึ้นด้วยส่งผลต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ดังนั้นในการเลือกใช้ภาวะการผลิตจึงต้องคำนึงถึงจุดนี้ด้วย

จากผลการทดลองข้างต้นเราจะนำความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งกับอัตราการเจริญจำเพาะในช่วงที่ไม่มีการจำกัดการเจริญเติบโตเนื่องจากการถ่ายเทมวลสาร นั่นคือ ช่วงความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งน้อยกว่าหรือเท่ากับ 8.2 กรัมต่อลิตร ความเร็วรอบในการกวน 400 rpm ไปทดสอบกับแบบจำลองคณิตศาสตร์แบบต่างๆเพื่อประมาณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.4 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโต

ในงานวิจัยนี้จะพิจารณาเฉพาะแบบจำลอง unstructured และ unsegregated ซึ่งเป็นแบบจำลองที่ง่ายไม่ซับซ้อน สามารถพัฒนาให้เหมาะสมกับการทดลองในแต่ละกรณีได้ง่าย และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ในการอธิบายภาพรวมของจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จากหัวข้อที่ 5.3 ที่ผ่านมาพบว่าการเจริญเติบโตของ *B. circulans* ATCC 9995 ไม่มีการยับยั้งปฏิกิริยาเนื่องจากสารอาหารและผลิตภัณฑ์และมีแป้งมันสำปะหลังเป็นสารอาหารที่เป็นตัวกำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยาเพียงชนิดเดียว ดังนั้นแบบจำลองคณิตศาสตร์ที่เลือกใช้ในการอธิบายจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์จะเป็นแบบที่สารอาหารจำกัดการเจริญเติบโต (Substrate-limited growth) (ในทฤษฎี หัวข้อ 2.5.1) ได้แก่ แบบจำลองของ Monod, Moser, Teissier และ Mason

แบบจำลอง	สมการ	พารามิเตอร์
Monod	$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S}$	μ_m, K_s
Teissier	$\mu = \mu_m(1 - e^{-kS})$	μ_m, k
Moser	$\mu = \frac{\mu_m S^n}{K_h^n + S^n}$	μ_m, K_h, n
Mason & Milles	$\mu = \frac{S}{K_S + S} + K_D \cdot S$	μ_m, K_S, K_D

สำหรับการประมาณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของแบบจำลองคณิตศาสตร์ใช้วิธี initial rate คือจากความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ_{data}) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้ง (S_0) ต่างกัน (รูป 5.7) ในหัวข้อที่ 5.3 นำมาทำการประมาณพารามิเตอร์ของแบบจำลองที่ทำให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่คำนวณได้จากแบบจำลองต่างๆ (μ_{model}) สอดคล้องกับข้อมูลจากการทดลองโดยใช้ระเบียบวิธีถดถอยแบบไม่เป็นเชิงเส้น (non-linear regression) Newton's method จากโปรแกรม solver ใน Microsolft Excell มีฟังก์ชันวัตถุประสงค์ (objective function) คือ การหาค่าผลรวมของค่าความผิดพลาดยกกำลังสองที่น้อยที่สุด (minimize sum square error, $\sum e^2$) โดยที่ค่าความผิดพลาด (e) คือ ความแตกต่างระหว่าง อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ได้จากการทดลองกับ อัตราการเจริญจำเพาะที่ได้จากแบบจำลอง ($\mu_{data} - \mu_{model}$) แต่เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีองค์ประกอบของ CSL ซึ่งจากการทดลองหัวข้อ 5.3 ที่ผ่านมาพบว่า เมื่อความเข้มข้นของแป้งเท่ากับ 0 จะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ เท่ากับ 0.02 ต่อชม.

ดังนั้น μ_{model} ในที่นี้จะมีค่าเท่ากับ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่คำนวณได้จากแบบจำลองต่างๆบวกด้วยค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจาก CSL (0.02 ต่อชม.) ซึ่งให้เป็นค่าคงที่เนื่องจากมีปริมาณ CSL เท่ากันทุกการทดลอง

จากการใช้โปรแกรม solver ในการประมาณค่าพารามิเตอร์ได้ค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองดังแสดงในตารางที่ 5.6 และรูปที่ 5.9 แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง μ_{model} ของแบบจำลองต่างๆที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งต่างกัน จากการเปรียบเทียบค่า $\sum e^2$ ในตารางที่ 5.6 ของแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์แบบต่างๆ พบว่าแบบจำลองของ Moser ให้ค่า $\sum e^2$ น้อยที่สุด ส่วนแบบจำลองของ Monod มีค่า $\sum e^2$ มากที่สุด รองลงมาคือแบบจำลองของ Teissier และ Mason ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบความสอดคล้องของแบบจำลองกับข้อมูลจากการทดลอง (Goodness of fit) โดยใช้การทดสอบแบบ F (F-test) ตามวิธีของ Edward, 1970 โดยพิจารณาค่าความแปรปรวน (equality of variances, σ^2) จาก

$$\sigma^2 = \frac{\sum(\mu_{data} - \mu_{model})^2}{df} = \frac{\sum e^2}{df} \qquad (5.1)$$

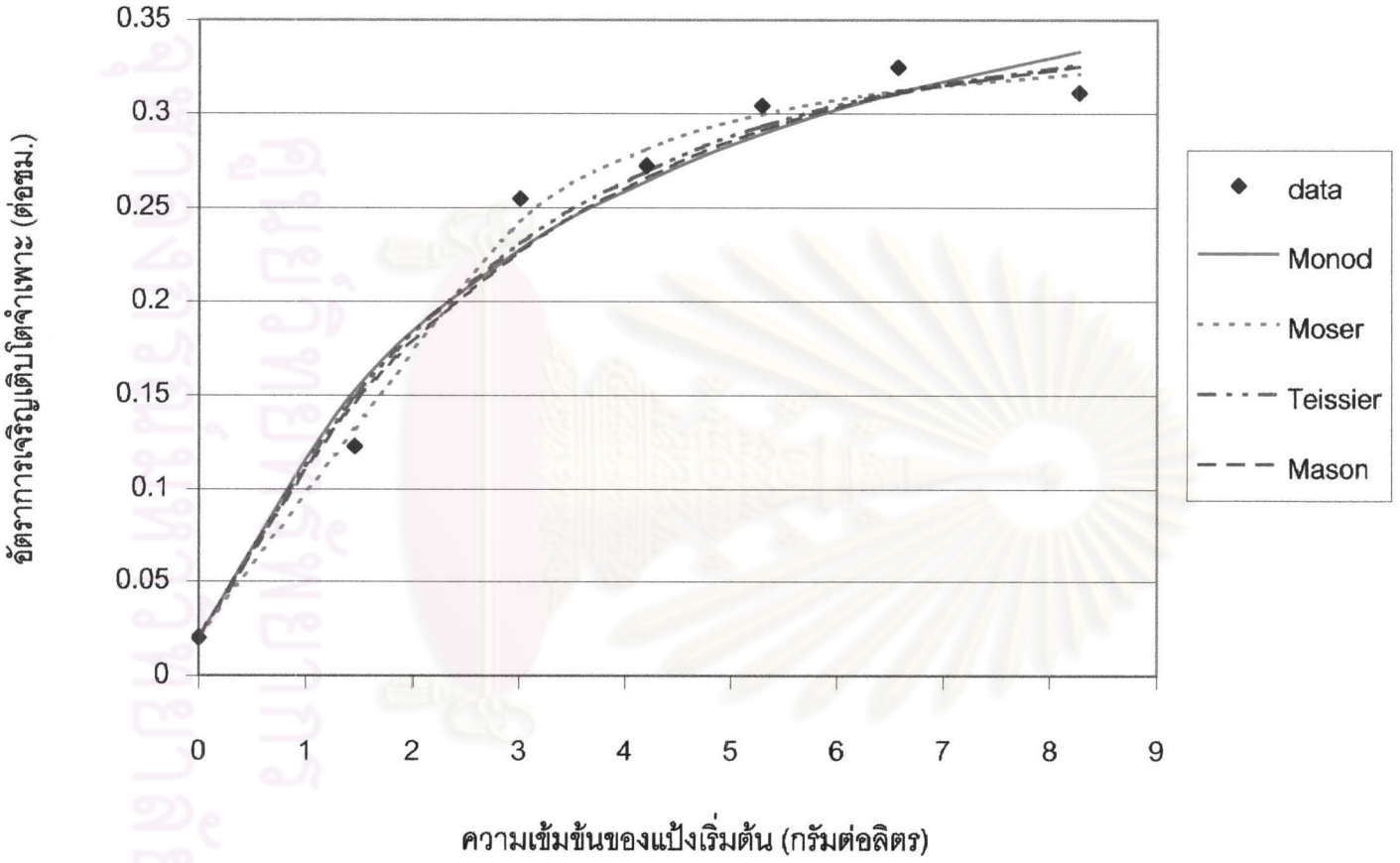
df = degree of freedom = จำนวนการทดลองทั้งหมด – จำนวนพารามิเตอร์ในแบบจำลอง

$$F = \frac{\sigma_L^2}{\sigma_S^2} \qquad (5.2)$$

$$= \frac{\text{ค่าความแปรปรวนของแบบจำลองที่ให้ค่าความแปรปรวนมาก}}{\text{ค่าความแปรปรวนของแบบจำลองที่ให้ค่าความแปรปรวนน้อย}}$$

ตารางที่ 5.6 ค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลอง ค่าผลรวมความคลาดเคลื่อนยกกำลังสอง และค่าทางสถิติอื่นๆ

	μ_{max}	K	n	K_i	$\sum e^2$ ($\times 10^{-3}$)	$\sum e^2/df$ ($\times 10^{-3}$)	$F_{i,Moser}$	$f_{0.05;\nu_1,\nu_2}$	$f_{0.1;\nu_1,\nu_2}$
Monod	0.44	3.41			2.35	0.59	3.43	9.12	5.34
Teissier	0.32	0.35			1.62	0.40	2.36	9.12	5.34
Moser	0.32	1.98	2		0.51	0.17	-	-	-
Mason & Milles	0.76	5.9		-0.02	2.07	0.52	3.03	9.28	5.39



รูปที่ 5.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่คำนวณได้จากแบบจำลองต่างๆ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งต่างกันเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลอง

จากค่า F จากสมการที่ 5.2 นำมาเปรียบเทียบกับค่า f_{α,ν_1,ν_2} ที่เปิดจากตารางทางสถิติของการแจกแจงความน่าจะเป็นแบบเอฟที่ระดับความน่าจะเป็น (probability level, α), degree of freedom ของแบบจำลองที่ให้ค่าความแปรปรวนมาก (ν_1) และแบบจำลองที่ให้ความแปรปรวนน้อย (ν_2) ถ้าค่า F จากการคำนวณในสมการที่ 5.2 มากกว่าค่า f_{α,ν_1,ν_2} แสดงว่าแบบจำลองที่ให้ค่าความแปรปรวนน้อยมีความสอดคล้องกับข้อมูลจากการทดลองดีกว่าแบบจำลองที่ให้ค่าความแปรปรวนมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นนั้นๆ สำหรับค่า σ^2 และค่า F ของแบบจำลองแบบต่าง และ ค่า f_{α,ν_1,ν_2} จากการเปิดตารางทางสถิติของการแจกแจงความน่าจะเป็นแบบเอฟที่ระดับความน่าจะเป็น 0.05 และ 0.1 แสดงในตารางที่ 5.6

จากการเปรียบเทียบค่า $F_{i,moser}$ จากตารางที่ 5.6 กับ $f_{\alpha;\nu_1,\nu_2}$ จะพบว่าค่า $F_{i,moser}$ ยังมีค่าน้อยกว่าค่า $f_{\alpha;\nu_1,\nu_2}$ หมายความว่าแบบจำลองของ Moser มีความสอดคล้องกับข้อมูลจากการทดลองดีกว่าแบบจำลองอื่นๆ (Monod, Teissier, Mason & Milles) อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 90% ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับการรายงานของ Edward, 1970 ในการใช้แบบจำลองแบบ unstructured ที่มีการยับยั้งการเจริญเติบโตจากสารอาหาร เพื่อการประมาณค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลอง เมื่อการทำการตรวจสอบแบบ F พบว่าไม่สามารถบอกได้ว่าแบบจำลองแบบต่างๆ ที่ใช้ในการประมาณค่าพารามิเตอร์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 90% และ 95% แต่อย่างไรก็ตามในการเลือกใช้แบบจำลองคณิตศาสตร์ในการทำนายจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตยังคงเลือกแบบจำลองที่ให้ค่าผลรวมของค่าความผิดพลาดยกกำลังสองที่น้อยที่สุด (minimize sum square error, $\sum e^2$) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าสามารถทำนายค่าอัตราการเจริญจำเพาะได้สอดคล้องกับการทดลองมากที่สุด ในงานวิจัยนี้คือแบบจำลองของ Moser โดยมีค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของแบบจำลอง ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_m) เท่ากับ 0.32 ต่อชม., ค่าคงที่ของ Moser (K_n) เท่ากับ 1.98 กรัมต่อลิตร และ ค่าคงที่ n เท่ากับ 2

โดยจากการนำทฤษฎี statistical thermodynamic มาอธิบายแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เมื่อมีการจำกัดสารอาหารเพียงหนึ่งชนิด เพื่อตรวจสอบความหมายทางกายภาพ (physical meaning) ของพารามิเตอร์ที่ปรากฏอยู่ในแบบจำลอง เช่น Monod และ Moser [Tan และ คณะ, 1994] จะพบว่าสำหรับแบบจำลองของ Moser ค่าคงที่ n จะแสดงถึง binding sites ของเอนไซม์ที่ควบคุมอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ (rate-limiting enzyme) โดยกำหนดให้ n =1 ในกรณีที่ binding site บนเอนไซม์ไม่มีปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน (non-interactive and independent binding sites) เมื่อแบบจำลอง Moser ปรากฏค่า n =1 จะมีผลทำให้ลดรูปกลายเป็นแบบจำลองของ Monod ซึ่งตั้งอยู่บนข้อสมมติฐานของระบบ one site ที่ถือว่า binding site แต่ละตำแหน่งไม่มีความแตกต่าง และ ไม่มีปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและ

กัน สำหรับงานวิจัยนี้ค่า n ที่คำนวณได้จากระเบียบวิธีถดถอยแบบไม่เป็นเชิงเส้น มีค่าเท่ากับ 2 ซึ่งแสดงว่า จำนวน binding site ของเอนไซม์ที่ควบคุมอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มีค่าเท่ากับ 2 โดยมีลักษณะของปฏิสัมพันธ์แบบเกื้อกูลกัน (positive cooperatively) คือ การจับตัวของสารตั้งต้นกับ binding site แรก มีผลเหนี่ยวนำให้การจับตัวของสารตั้งต้นกับ binding site ที่สองเกิดได้ดีขึ้น และค่า μ_m คือ ค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นเมื่อทุกส่วน (sites) ถูกจับกับสารอาหาร ส่วน K_h ที่ปรากฏในแบบจำลองของ Moser Tan และ คณะ, 1994 ได้ชี้แจงว่ามีความหมายทางกายภาพแตกต่างจาก ค่าคงที่อิ่มตัว (saturation constant) ที่ปรากฏอยู่ในแบบจำลองต่างๆ โดย K_h ในที่นี้ไม่ได้มีหน่วยเดียวกับความเข้มข้น แต่จะเป็นฟังก์ชันของค่าพลังงานที่ใช้ในการจับตัว (binding energy) ซึ่งจะมีค่าเป็นบวกเสมอ แต่อย่างไรก็ตามจากทฤษฎี statistical thermodynamic ยังไม่กล่าวอย่างแน่ชัดถึงหน่วยของ K_h ในขณะที่แบบจำลองของ Moser นั้นถูกสร้างขึ้นก่อนและจากในหนังสือบางเล่มกล่าวว่า แบบจำลองของ Moser คล้ายคลึงกับแบบจำลองของ Monod แต่ปฏิกิริยาของสารอาหารไม่เป็นอันดับหนึ่ง ดังนั้นหน่วยของ K_h จึงมีหน่วยเดียวกับ K_S อีกทั้งเมื่อพิจารณาจากสมดุลของหน่วยของ K_h ในสมการของ Moser จะพบว่า K_h ควรจะมีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงยังคงใช้หน่วยของ K_h เป็น กรัมต่อลิตร

ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ค่าหนึ่งที่สำคัญซึ่งใช้อธิบายจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์ในการใช้สารอาหารและการสร้างผลิตภัณฑ์เชื่อมโยงกับการเจริญเติบโต คือ ค่าผลได้ของเซลล์จากสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต ($Y_{X/S,G}$), ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อเซลล์ ($Y_{P/X}$), ค่าอัตราการใช้สารอาหารเพื่อการดำรงชีวิต (m_S) และค่าคงที่ของการสร้างผลิตภัณฑ์ในกรณีที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโต (Nongrowth-associated products constant, b) โดยค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ต่างๆ ได้แก่สัมประสิทธิ์ผลได้เฉลี่ย $Y_{X/S,G,\ avg}$ และ $Y_{P/X,\ avg}$ รวมทั้ง $m_{S,avg}$ และ b_{avg} ในงานวิจัยนี้ทำการประมาณมาจากการทำ optimization เพื่อหาค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์เหล่านี้เมื่อนำไปใช้คำนวณร่วมกับแบบจำลองของ Moser แล้วให้ผลที่ได้จากการคำนวณความเข้มข้นของเซลล์ สารอาหาร และกิจกรรมของเอนไซม์ ตามเวลา ได้สอดคล้องกับผลการทดลองในทุกชุดข้อมูลที่ความเข้มข้นของของแป้งเริ่มต้นต่างกัน (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ง) ดังนั้นสามารถหาค่า $Y_{X/S,G,\ avg}$, $Y_{P/X,\ avg}$, $m_{S,avg}$ และ b_{avg} ของการเลี้ยงเชื้อ *B. circulans* ATCC 9995 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังเป็นสารอาหารหลักมีค่าเท่ากับ 0.67 กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้ง, 555.97 ยูนิตต่อกรัมเซลล์, 0.005 กรัมแป้งต่อกรัมเซลล์·ชม. และ 3.66 ยูนิตต่อกรัมเซลล์ชม. ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ที่ได้จากงานวิจัยนี้กับค่าจากงานวิจัยอื่นๆที่ศึกษาผลิตเอนไซม์ CGTase เช่นเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 5.7 พบว่าค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของงานวิจัยนี้มีค่ามากกว่างานวิจัยของ Sirisansaneeyakul และ คณะ, 1996 ที่ทำการ

เพาะเลี้ยงเชื้อ ของ *B. circulan* var. alkolophilus TISTR 907 ในขวดเขย่า ถึง 5.17 เท่า และมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Jamuna และ คณะ, 1993 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไม่ต่อเนื่องเช่นเดียวกัน และค่าผลได้ของเซลล์จากสารอาหารในงานวิจัยนี้มีค่ามากกว่า งานวิจัยของ Sinsansaneeyakul และ คณะ, 1996 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า ถึง 3.38 เท่า ส่วนอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะและค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหารไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้โดยตรงเนื่องจากใช้วิธีวัดคนละวิธี และนิยามยูนิตของเอนไซม์ต่างกัน

ตารางที่ 5.7 เปรียบเทียบค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ที่ได้จากงานวิจัยนี้กับค่าจากงานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษาการผลิต CGTase ที่ความเข้มข้นของแป้ง1% น้ำหนักโดยปริมาตร

	Sirisansaneeyakul และคณะ, 1996[a]	Jamuna และ คณะ, 1993[b]	งานวิจัยนี้[b]
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, μ (ต่อชม.)	0.06	0.32	0.31
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ, q_p (ยูนิตต่อกรัมเซลล์·ชม)	110	-	132.28
ค่าผลได้ของเซลล์ต่อสารอาหาร, $Y_{X/S}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้ง)	0.26	-	0.62
ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร, $Y_{P/S}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้ง)	1,760	-	461.30

หมายเหตุ [a] ทำการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า และ วัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี starch-dextrinizing

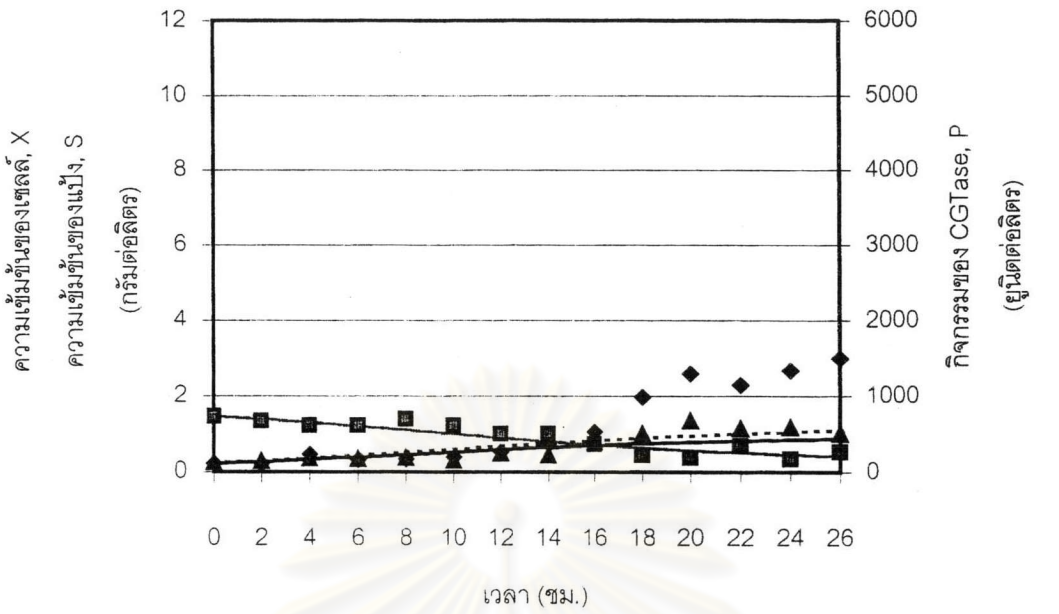
[b] ทำการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบไม่ต่อเนื่อง และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี phenolphthalein

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

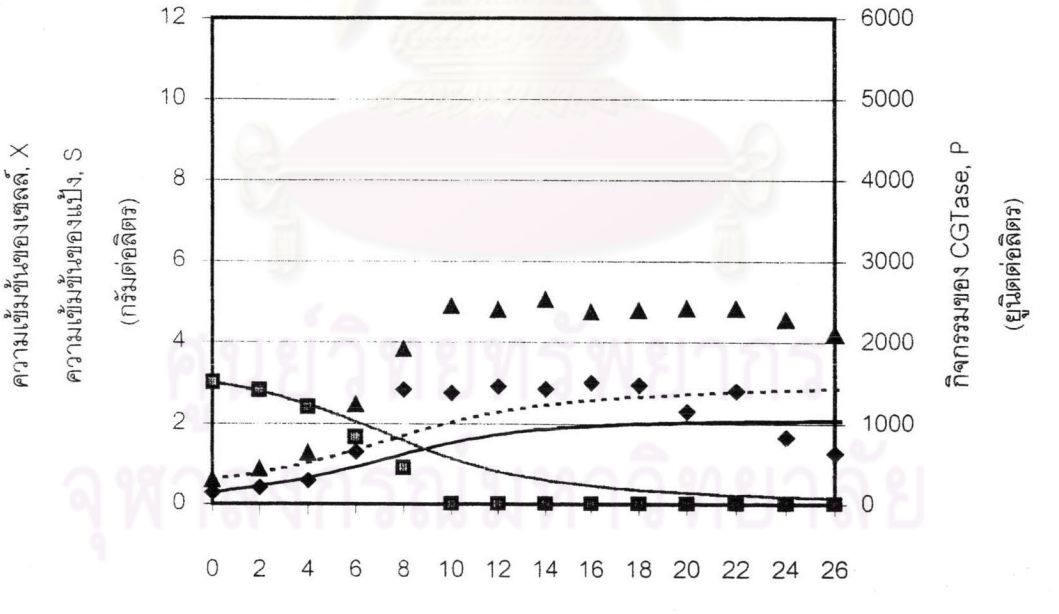
5.5 การทดสอบแบบจำลองคณิตศาสตร์ทางจลนพลศาสตร์

จากแบบจำลองของ Moser ที่ได้จากหัวข้อที่ผ่านมาในหัวข้อนี้จะนำมาใช้ทำนายจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโต การใช้สารอาหาร และ การสร้างผลิตภัณฑ์ ตามเวลาเปรียบเทียบกับข้อมูลความเข้มข้นของเซลล์ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง และ กิจกรรมของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆในการทดลองเพาะเลี้ยง *B. circulans* ATCC 9995 (ค่าความเข้มข้นของแป้งที่เวลาต่างๆได้หักลบปริมาณน้ำตาลจาก CSL แล้ว) โดยแก้สมการความเข้มข้นของเซลล์ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง และ กิจกรรมของเอนไซม์ ตามเวลา สมการที่ ง.3, ง.5 และ ง.7 ดังแสดงในภาคผนวก ง ไปพร้อมกันที่เวลาต่างๆ แล้วนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง X, S และ P ตามเวลาเทียบกับข้อมูลจากการทดลองที่ช่วงความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งเท่ากับ 1.46 ถึง 11.36 กรัมต่อลิตร ได้ดังรูปที่ 5.12-5.17 โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ ได้แก่ $Y_{X/S,G,\ avg}$, $Y_{P/X,\ avg}$, $m_{S,avg}$ และ b_{avg} เท่ากับ 0.67 กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้ง, 555.97 ยูนิตต่อกรัมเซลล์, 0.005 กรัมแป้งต่อกรัมเซลล์·ชม. และ 3.66 ยูนิตต่อกรัมเซลล์ชม.

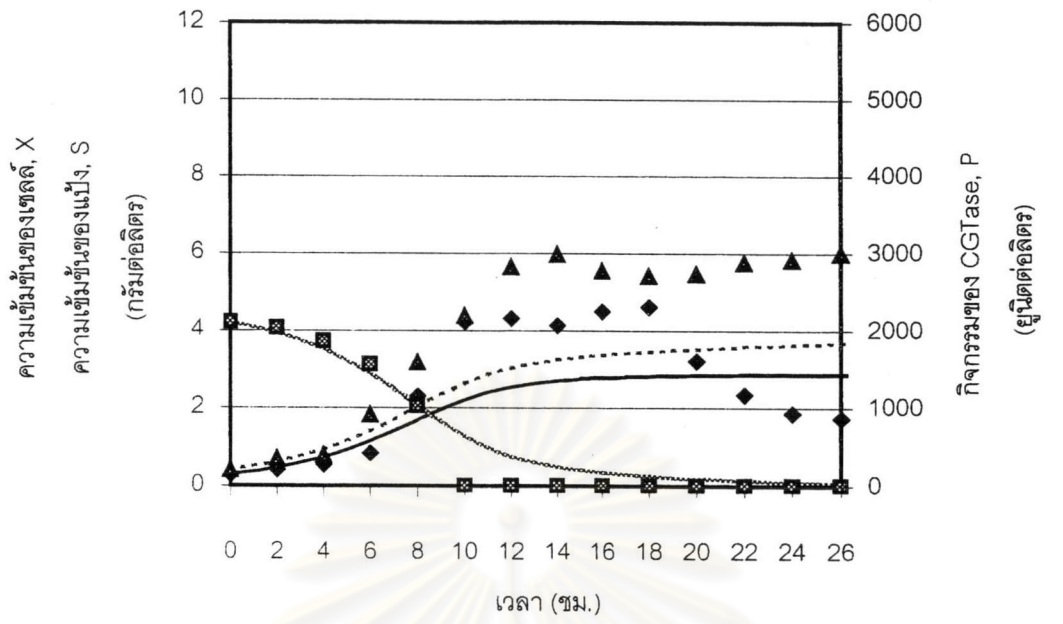
จากรูปที่ 5.10-5.12 ที่ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นเท่ากับ 1.46-4.2 กรัมต่อลิตร ค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองไม่สอดคล้องกับค่าที่ได้จากทดลองโดยการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ รวมทั้งการลดลงของแป้งที่ทำนายได้จากแบบจำลองจะช้าและต่ำกว่าผลการทดลอง (under estimation) ส่วนที่ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 5.13) แบบจำลองจะใช้ทำนายการเปลี่ยนแปลงความความเข้มข้นต่างๆดีขึ้น แต่กราฟความเข้มข้นของเซลล์ตามเวลาในช่วงปลายระยะการเจริญเติบโตทวีคูณที่ทำนายได้จากแบบจำลองยังช้าและต่ำกว่าผลการทดลองอยู่เล็กน้อย สำหรับที่ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นเท่ากับ 8.2 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 5.14) แบบจำลองใช้ทำนายกราฟความเข้มข้นต่างๆตามเวลาได้สอดคล้องกับข้อมูลจากการทดลอง แต่ในช่วงระยะการเจริญเติบโตคงที่กิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำนายได้จากแบบจำลองมีค่ามากกว่าผลการทดลอง (over estimation) และเมื่อลองนำแบบจำลองไปใช้ทำนายข้อมูลจากการทดลองที่ค่าความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นเท่ากับ 11.33 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 5.15) ความเร็วรอบในการกวน 560 rpm พบว่า ได้ผลเช่นเดียวกัน คือ ถึงแม้ว่าความเร็วรอบในการกวนที่ใช้จะสูงขึ้น แต่แบบจำลองสามารถใช้ทำนายค่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นต่างๆได้ แต่กราฟความเข้มข้นของเซลล์ตามเวลาในช่วงปลายระยะการเจริญเติบโตทวีคูณที่ทำนายได้จากแบบจำลองยังช้าผลการทดลองและในช่วงระยะการเจริญเติบโตคงที่กิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำนายได้จากแบบจำลองมีค่ามากกว่าผลการทดลอง (over estimation)



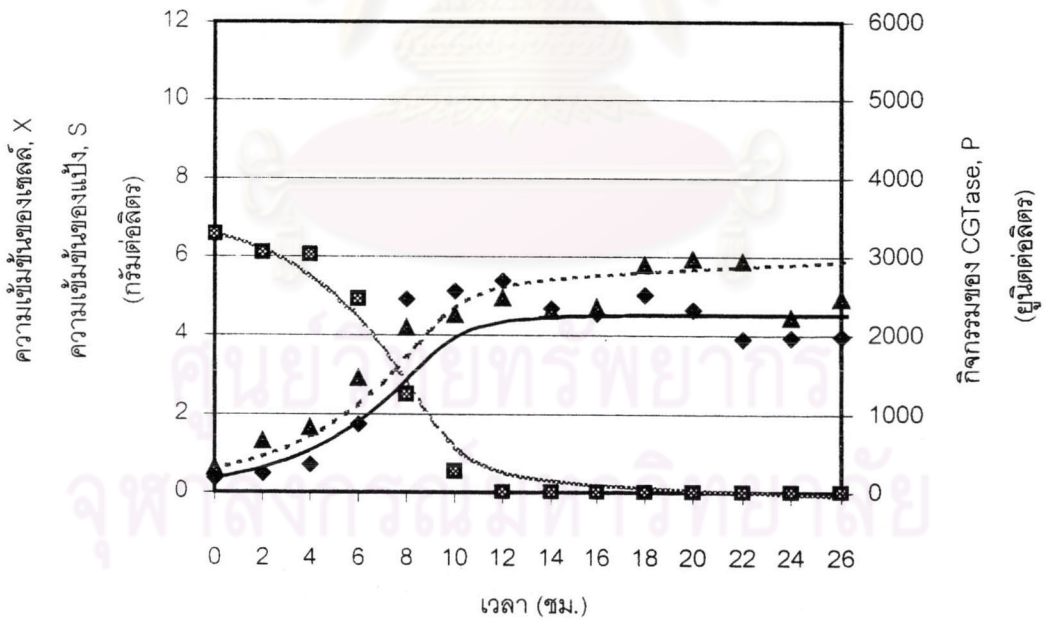
รูปที่ 5.10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์, แป้ง และ เอนไซม์ ตามเวลา ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 1.46 กรัมต่อลิตร (Yเฉลี่ย) ที่ภาวะ : ค่า pH เริ่มต้น 8, 30 °C และ 400 rpm



รูปที่ 5.11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์, แป้ง และ เอนไซม์ ตามเวลา ที่ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 3.01 กรัมต่อลิตร (Yเฉลี่ย) ที่ภาวะ : ค่า pH เริ่มต้น 8, 30 °C และ 400 rpm

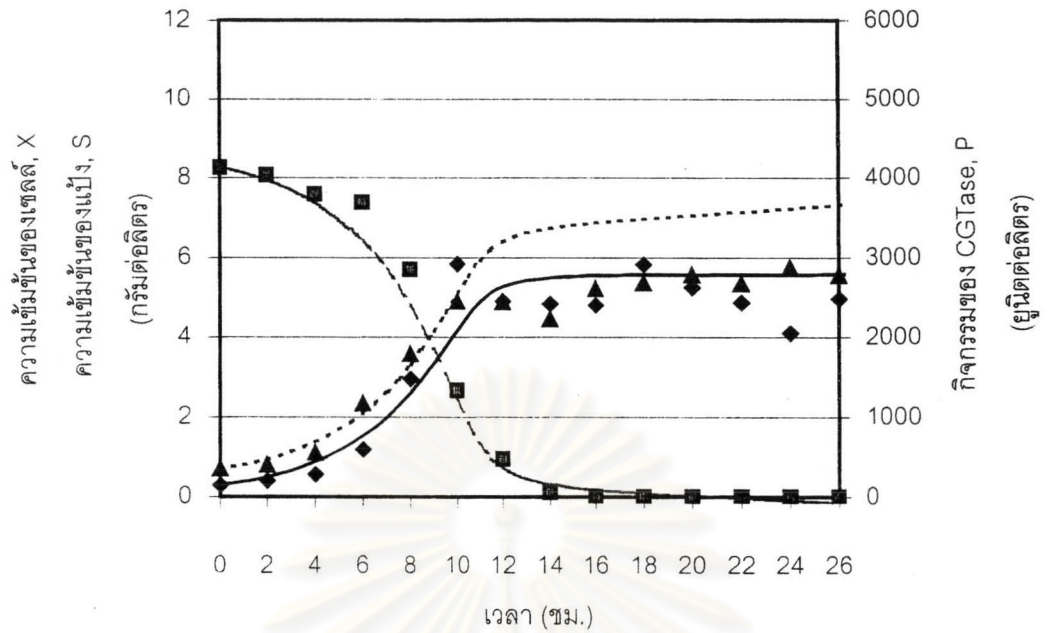


รูปที่ 5.12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์, แป้ง และ เอนไซม์ ตามเวลา ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 4.2 กรัมต่อลิตร (Yเฉลี่ย) ที่ภาวะ : ค่า pH เริ่มต้น 8, 30°C และ 400 rpm

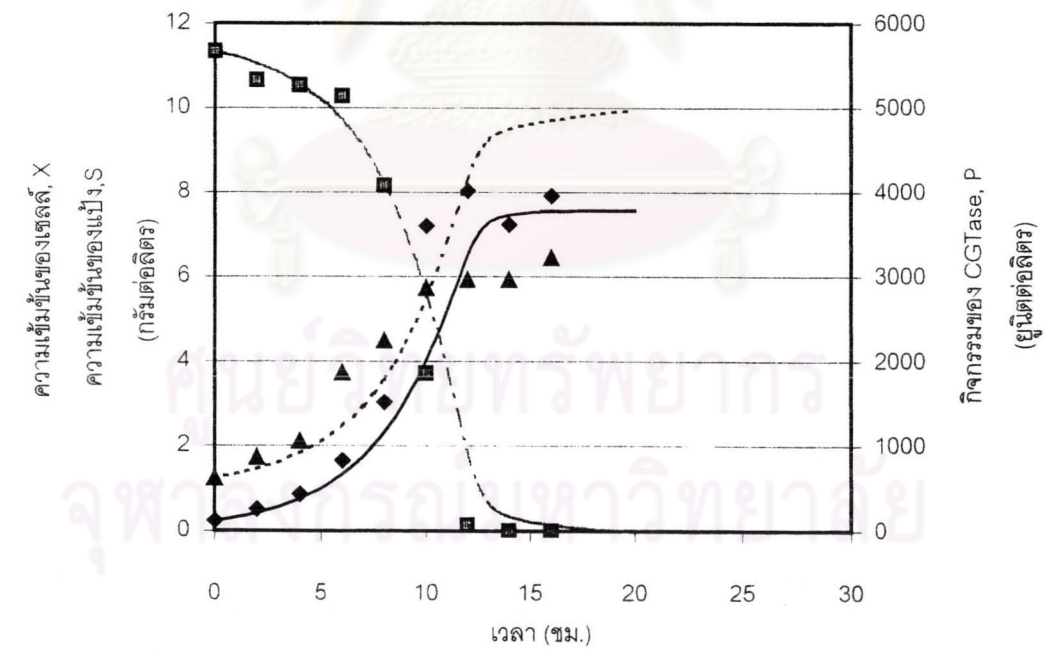


รูปที่ 5.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์, แป้ง และ เอนไซม์ ตามเวลา ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 6.57 กรัมต่อลิตร (Yเฉลี่ย) ที่ภาวะ : ค่า pH เริ่มต้น 8, 30°C และ 400 rpm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์, แป้ง และ เอนไซม์ ตามเวลา ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 8.2 กรัมต่อลิตร (Yเฉลี่ย) ที่ภาวะ : ค่า pH เริ่มต้น 8, 30°C และ 400 rpm



รูปที่ 5.15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์, แป้ง และ เอนไซม์ ตามเวลา ที่ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 11.33 กรัมต่อลิตร (Yเฉลี่ย) ที่ภาวะ : ค่าpH เริ่มต้น 8, 30°C และ 560 rpm

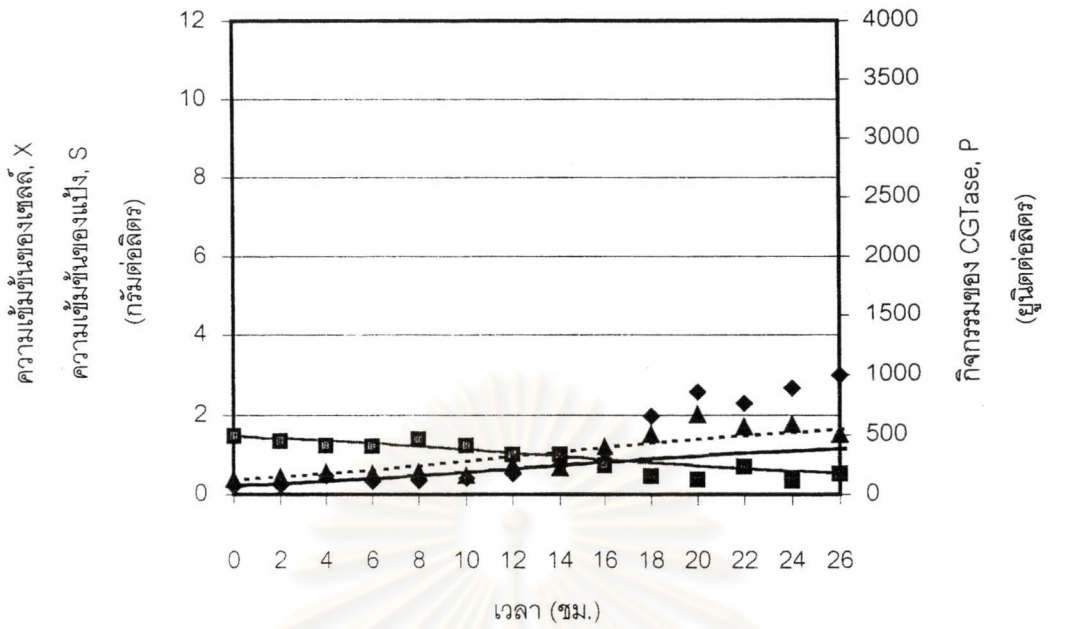
สำหรับปัญหาที่ความเข้มข้นของเซลล์และกิจกรรมของ CGTase ที่ทำนายได้จากแบบจำลองมีค่ามากกว่าข้อมูลจากการทดลอง (over estimation) จากทฤษฎีในหัวข้อ 2.5.4 รูปที่ 2.14 แสดงให้เห็นว่าพารามิเตอร์ที่ส่งผลต่อ ค่าปริมาณเซลล์สูงสุด คือ ค่าผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร ดังนั้นปัญหาที่แบบจำลองทำนายได้ค่าเกินกว่าการทดลอง (over estimation) น่าจะเป็นผลมาจากค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ในแต่การทดลองมีค่าไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงทำการประมาณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ ได้แก่ สัมประสิทธิ์ผลได้ $Y_{X/S,G}$ และ $Y_{P/X}$ รวมทั้ง m_s และ b ในแต่ละชุดการทดลองจากการทำ optimization เพื่อหาค่าพารามิเตอร์เหล่านี้ ที่ทำให้เมื่อนำไปใช้คำนวณร่วมกับแบบจำลองของ Moser แล้วให้ผลที่ได้จากการคำนวณความเข้มข้นของเซลล์ สารอาหาร และกิจกรรมของเอนไซม์ ตามเวลา ได้สอดคล้องกับผลการทดลองในแต่ชุดข้อมูลที่ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นต่างๆ โดยมีเงื่อนไข (constraints) คือ ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ทุกตัวต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0 และค่า $Y_{X/S,G,\ avg}$ ต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5.8 ซึ่งเห็นได้ที่ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นต่างกันจะให้ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ต่างกันออกไป แต่ค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ที่ใช้ในการทำนายจลนพลศาสตร์ที่ผ่านมาเป็นค่าเฉลี่ยซึ่งอาจจะไม่ใช่ค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ที่แท้จริงทำให้ค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองไม่สอดคล้องกับข้อมูลจากการทดลอง

ตารางที่ 5.8 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการทดลองที่ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นต่างกัน

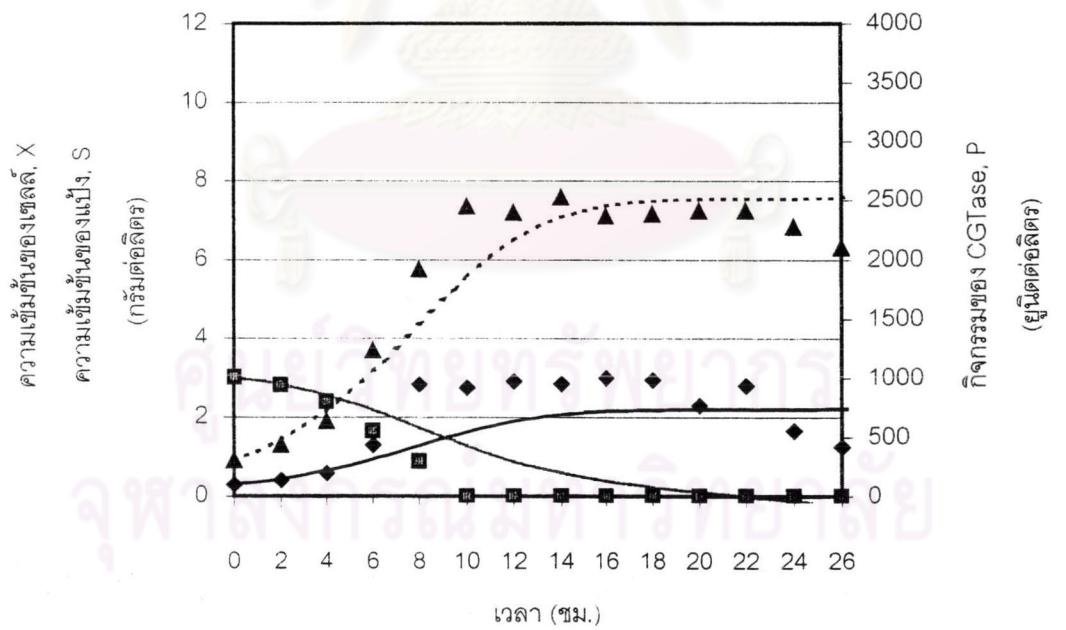
S_0 (กรัมต่อลิตร)	$Y_{X/S,G}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้ง)	m_s (กรัมแป้งต่อกรัมเซลล์·ชม.)	$Y_{P/X}$ (ยูนิตต่อกรัมเซลล์)	b (ยูนิตต่อกรัมเซลล์·ชม.)
1.46	1.00	0.000	453.84	0
3.01	0.88	0.026	1157.20	0
4.2	0.83	0.014	909.78	0
6.57	0.68	0.006	552.54	0
8.20	0.62	0.005	461.30	1.22
11.33	0.60	0.000	476.78	0

ดังนั้นจึงนำค่า $Y_{X/S.G}$, $Y_{P/X}$, m_s และ b ที่คำนวณแยกแต่ละการทดลองมาใช้ในการทำนายจลนพลศาสตร์ของเซลล์จากสมการที่ ง.3, ง.5 และ ง.7 ได้ดังรูปที่ 5.16-5.21 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าที่ค่าความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นส่วนใหญ่ ค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองมีความสอดคล้องกับผลการทดลองดีขึ้น แต่ในช่วงปลายระยะการเจริญเติบโตทวีคูณ ค่าความเข้มข้นของเซลล์และแป้งที่ทำนายได้จากแบบจำลองยังคงคลาดเคลื่อน โดยให้ค่าช้าและต่ำกว่าผลการทดลองอยู่ ซึ่งสาเหตุอาจเกิดเนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อนอกจากมีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนแล้ว ยังมีแหล่งคาร์บอนจาก corn steep liquor (CSL) จากการตรวจวัดพบว่ามีปริมาณน้ำตาล (tolal sugar) 1.4 กรัมต่อลิตร จึงทำให้เซลล์อาจจะมีการเจริญเติบโตเนื่องจากน้ำตาลใน CSL ส่งผลให้ปริมาณเซลล์จากการทดลองมีค่ามากกว่าค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลอง สำหรับที่ความเข้มข้นของแป้งต่ำ (1.46-4.20 กรัมต่อลิตร รูปที่ 5.16-5.18) ปริมาณเซลล์ที่ทำนายได้จากแบบจำลองในระยะการเจริญเติบโตคงที่จะมีค่าต่ำกว่าผลการทดลองอยู่ สาเหตุอีกประการหนึ่งอาจเกิดจากที่ความเข้มข้นของแป้งต่ำซึ่งจะให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำ เซลล์ที่มีชีวิตจะมีปริมาณลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูง [Esener และ Roel, 1983] แต่การนับเซลล์ไม่ได้แบ่งแยกถึงเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ดังนั้นปริมาณเซลล์ที่วัดได้ที่ความเข้มข้นของแป้งต่ำอาจจะมีความผิดพลาดเนื่องจากวัดรวมปริมาณเซลล์ที่ไม่มีชีวิตซึ่งมีอยู่มากไปด้วย นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของแป้งสูงขึ้น (6.57-8.11.33 กรัมต่อลิตร) กราฟการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแป้งตามเวลาที่ทำนายได้จากแบบจำลองจะมีความสอดคล้องกับผลการทดลองดีกว่าที่ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นต่ำ ซึ่งเป็นผลจากที่ความเข้มข้นของแป้งสูงปริมาณน้ำตาลใน CSL จะมีค่าน้อยเมื่อเทียบกับความปริมาณน้ำตาลจากแป้งจนสามารถละเลยได้ ตรงกันข้ามกับที่ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นต่ำอิทธิพลของน้ำตาลจาก CSL จะมีมากกว่า

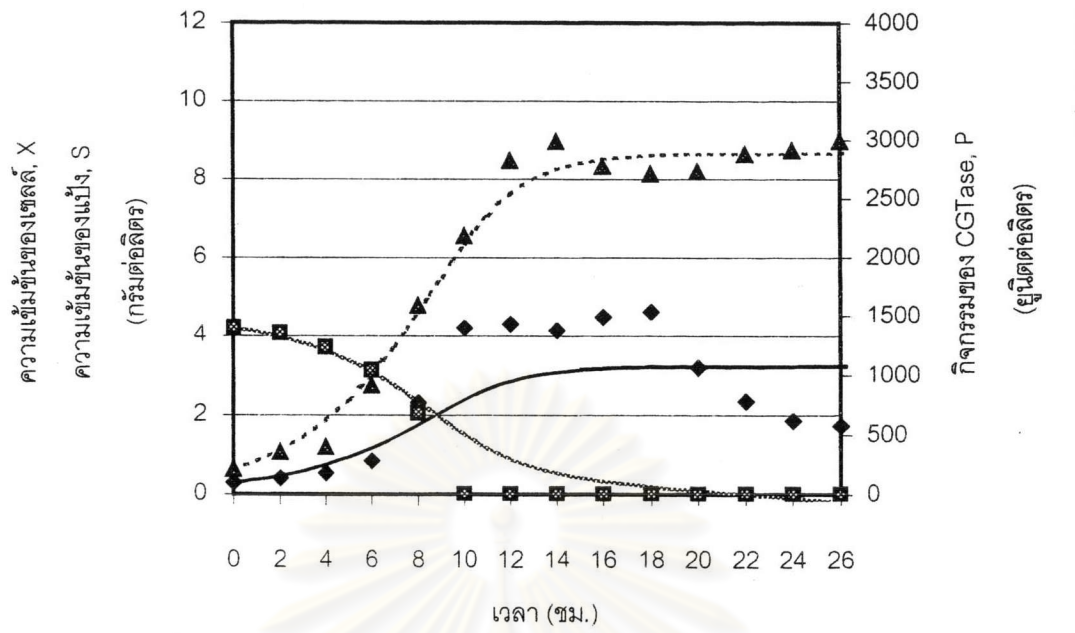
จากผลการทดลองข้างต้นจึงสรุปได้ว่าเมื่อใช้ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตรเฉลี่ย ($Y_{X/S.G.\ avg}$, $Y_{P/X.\ avg}$, $m_{S,avg}$ และ b_{avg}) มาคำนวณร่วมกับแบบจำลองของ Moser ในการทำนายการเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ ปริมาณแป้งที่เหลือ และ กิจกรรมของเอนไซม์ ตามเวลา พบว่าแบบจำลองสามารถใช้ทำนายจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโต การใช้สารอาหาร และการสร้างผลิตภัณฑ์ ที่ความเข้มข้นของแป้ง 6.57-11.33 กรัมต่อลิตร แต่ยังมีความคลาดเคลื่อนอยู่ในช่วงหลังจากปลายระยะการเจริญเติบโตทวีคูณ และแบบจำลองจะใช้ทำนายได้ดีขึ้น เมื่อใช้ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ที่ได้จากการแต่ละการทดลองมาใช้ในการคำนวณร่วมกับแบบจำลอง



รูปที่ 5.16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์, แป้ง และ เอนไซม์ ตามเวลา ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 1.46 กรัมต่อลิตร (Yจากการทดลอง) ที่ภาวะ: ค่า pH เริ่มต้น 8, 30°C และ 400 rpm

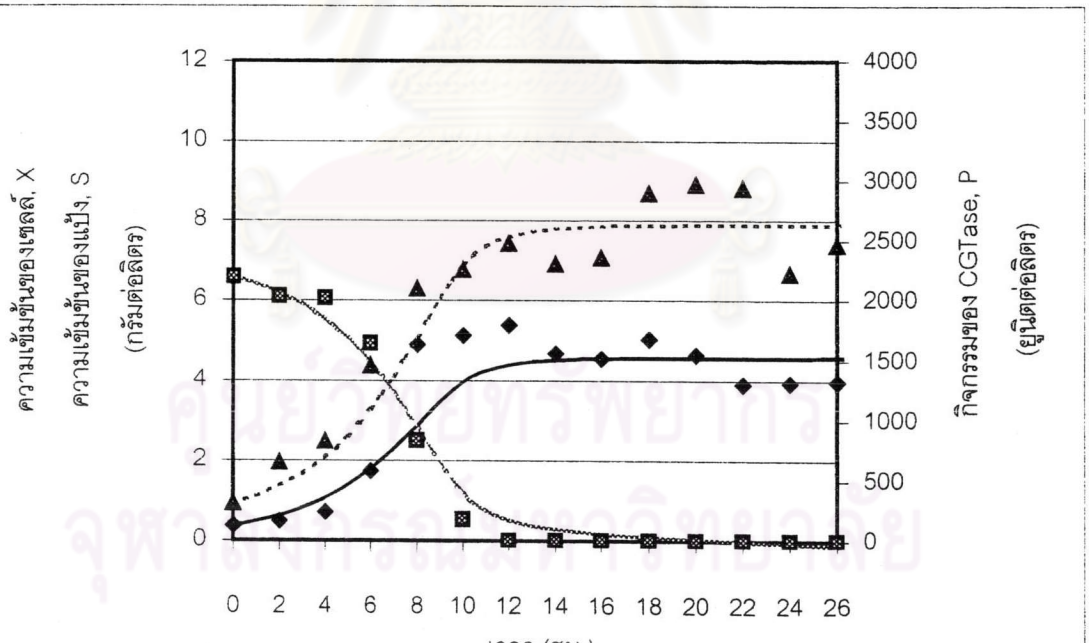


รูปที่ 5.17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์, แป้ง และ เอนไซม์ ตามเวลา ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 3.01 กรัมต่อลิตร (Yจากการทดลอง) ที่ภาวะ: ค่า pH เริ่มต้น 8, 30°C และ 400 rpm



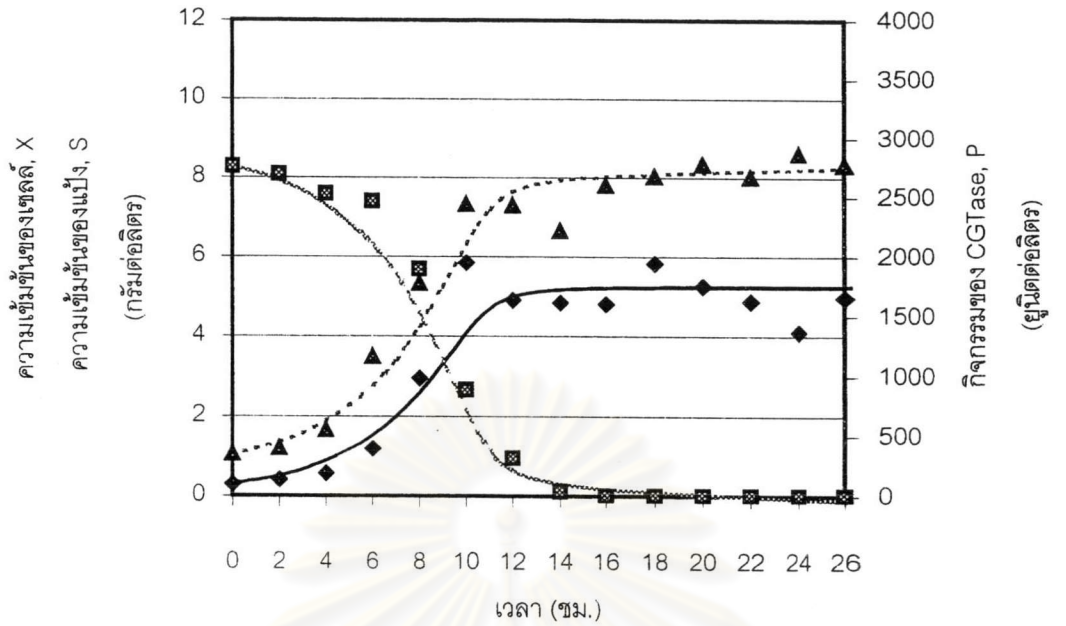
รูปที่ 5.18 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์, แป้ง และ เอนไซม์ ตามเวลา ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 4.20 กรัมต่อลิตร (Yจากการทดลอง)

ที่ภาวะ: ค่า pH เริ่มต้น 8, 30 ^{0}C และ 400 rpm



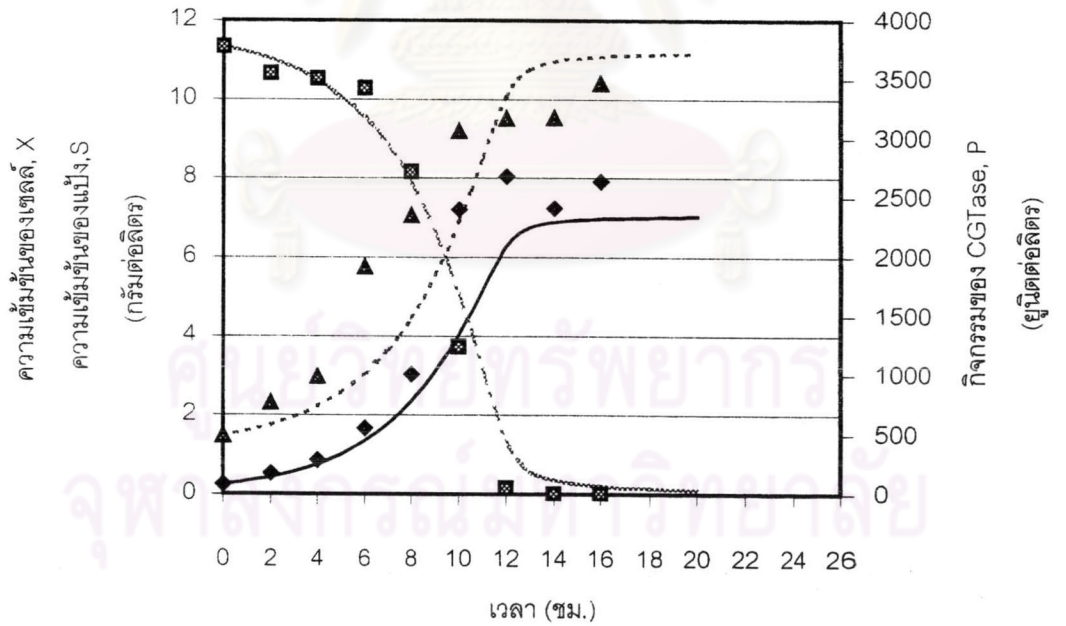
รูปที่ 5.19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์, แป้ง และ เอนไซม์ ตามเวลา ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 6.57 กรัมต่อลิตร (Yจากการทดลอง)

ที่ภาวะ: ค่า pH เริ่มต้น 8, 30 ^{0}C และ 400 rpm



รูปที่ 5.20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์, แป้ง และ เอนไซม์ ตามเวลา ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 8.2 กรัมต่อลิตร (Yจากการทดลอง)

ที่ภาวะ: ค่า pH เริ่มต้น 8, 30 ^{0}C และ 400 rpm



รูปที่ 5.21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์, แป้ง และ เอนไซม์ ตามเวลา ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 11.33 กรัมต่อลิตร (Yจากการทดลอง)

ที่ภาวะ: ค่า pH เริ่มต้น 8, 30 ^{0}C และ 560 rpm

5.6 การนำแบบจำลองของ Moser ไปใช้ในกระบวนการผลิต CGTase

กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปมีหลายวิธี ได้แก่ การเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่อง (batch operation), แบบกึ่งต่อเนื่อง (fed batch operation) และ แบบต่อเนื่อง (continuous operation) ซึ่งจะมีวิธีการแตกต่างกันไป การเลือกใช้การดำเนินงานแบบใดในกระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรมพิจารณาจากอัตราการผลิต (productivity) ซึ่งเป็นปริมาณเซลล์ หรือ ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ต่อปริมาตรต่อชั่วโมงในการดำเนินการ โดยจะเลือกกระบวนการที่ใช้เวลาน้อยแต่ได้ผลผลิตสูงซึ่งก็คือ กระบวนการที่ให้อัตราการผลิตสูงสุดนั่นเอง ในหัวข้อนี้จะกล่าวถึงการออกแบบการดำเนินงานในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ โดยใช้แบบจำลอง Moser ซึ่งมีความสอดคล้องในการใช้อธิบายการเจริญเติบโตและการผลิต CGTase (จากผลการทดลองหัวข้อที่ 5.4) และมีค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองคือ μ_m =0.32 ต่อชม., K_h = 1.98 (กรัมต่อลิตร)^2 และ n = 2

$$\mu = \frac{\mu_m S^2}{K_h^2 + S^2} \qquad (2.28)$$

เพื่อหาลักษณะในการดำเนินงาน (operating mode) ที่เหมาะสมที่ให้อัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase จาก *B. circulans* ATCC 9995 จากแป้งมันสำปะหลังที่สูงสุด

กระบวนการผลิต CGTase แบบไม่ต่อเนื่อง

สำหรับกระบวนการผลิต CGTase แบบไม่ต่อเนื่องเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอยู่ตลอดเวลาจนถึงช่วงปลายระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ หรือ ต้นระยะการเจริญเติบโตคงที่ ที่ระยะนี้เซลล์และกิจกรรมของ CGTase จะมีปริมาณสูงที่สุด และเมื่อการเจริญเติบโตเข้าระยะคงที่ เซลล์และกิจกรรมของ CGTase จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังนั้นในวิธีเพาะเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่องจึงหยุดการดำเนินการเมื่อการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ จากนั้นจะทำการล้างถังปฏิกรณ์และเตรียมดำเนินการใหม่ในครั้งต่อไป อัตราการผลิตสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่องจึงมีค่าเท่ากับ ปริมาณของเซลล์ที่ผลิตได้ในช่วงเวลาที่ใช้ดำเนินงานทั้งหมด ซึ่งจะรวมระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโต, t_g และ เวลาที่ไม่ได้ทำการผลิต, t_U ได้แก่ เวลาที่ต้องการสำหรับการล้างทำความสะอาด การฆ่าเชื้อ ระยะปรับตัว และ ระยะเวลาในการเก็บผลิตภัณฑ์

$$\text{อัตราการผลิตแบบไม่ต่อเนื่อง (productivity)} = \frac{Y S_0}{t_g + t_U} \qquad (5.3)$$

โดยระยะเวลาในการเจริญเติบโต (t_g) จะสัมพันธ์กับระยะเวลาที่เซลล์ใช้สารอาหารจากความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น S_0 จนสารอาหารภายในถังปฏิกรณ์หมด สำหรับค่าอัตราการผลิตแบบไม่ต่อเนื่องที่คำนวณในงานวิจัยนี้จะใช้ที่ค่าความเข้มข้นของเริ่มต้น (S_0) 8.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งในการทดลองเป็นความเข้มข้นที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและผลิต CGTase และ ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) สูงใกล้เคียงกับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) และใช้ค่าผลได้จากการทดลองที่ความเข้มข้นของแป้งเท่ากับ 8.2 กรัมต่อลิตร โดยค่าผลได้ของเซลล์ต่อสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโต ($Y_{X/S.G}$) เท่ากับ 0.62 กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้ง และค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 286.01 ยูนิตต่อกรัมแป้ง ส่วน m_s และ b มีค่าเท่ากับ 0.005 กรัมแป้งต่อกรัมเซลล์·ชม และ 1.22 ยูนิตต่อต่อกรัมเซลล์·ชม ซึ่งมีค่าน้อยจึงละเลยไม่นำมาคำนวณ ดังนั้นจะสามารถหา t_g ได้จากสมการที่ 2.18 (จากทฤษฎีในหัวข้อที่ 2.4)

$$\frac{dS}{dt} = -q_S X \tag{2.18}$$

โดยเนื่องจากไม่คิด m_s ดังนั้น $q_S = \mu / Y_{X/S}$ เมื่อนำ μ จากแบบจำลอง Moser และ จากสมดุลมวลสาร $X = Y_{X/S}(S_0 - S)$ แทนลงในสมการที่ 2.18

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\mu_m S^2}{K_h^2 + S^2} \cdot Y_{X/S}(S_0 - S) \tag{5.4}$$

$$\int_{S_0}^{S} -\frac{K_h^2 + S^2}{\mu_m S^2 (S_0 - S)} dS = \int_0^{t_g} dt \tag{5.5}$$

$$t_g = \int_{S_0}^{S} -\frac{K_h^2 + S^2}{\mu_m S^2 (S_0 - S)} dS \tag{5.6}$$

ใช้ระเบียบวิธีเชิงตัวเลขอินทิเกรตเทอมขวามือของสมการที่ 5.6 โดยใช้ Trapezoidal rule เมื่อ S_0 = 8.2 กรัมต่อลิตร ถึง S = 0.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งคำนวณได้เท่ากับ 14.32 ชม. (S ไม่เท่ากับ 0 เนื่องจากถ้ารอจนระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจนถึงช่วงที่ S=0 จะใช้เวลานานมากแต่ช่วงนั้นเซลล์มีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์น้อยมากหรือไม่ผลิตเลย ซึ่งจะทำให้เสียเวลาในการดำเนินงานโดยไม่ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเพิ่มขึ้น จึงเลือก S=0.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์ไม่เจริญเติบโตและผลิตภัณฑ์แล้ว) ดังนั้นในการผลิต CGTase แบบไม่ต่อเนื่องมีค่าระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญ

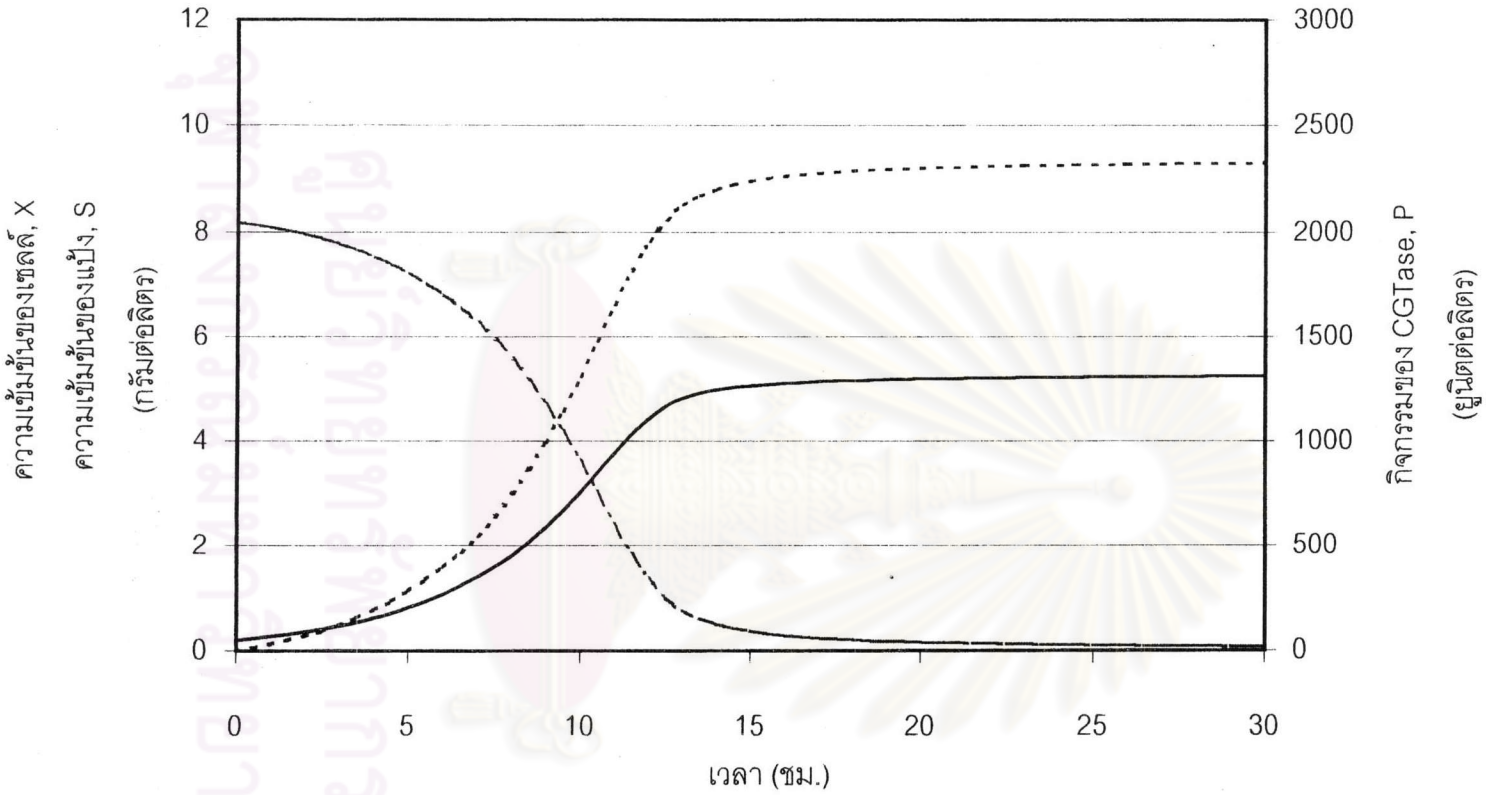
เติบโต, t_g = 14.32 ชม. โดยลักษณะการเจริญเติบโต และ การผลิต CGTase ตามเวลาแสดงดังรูปที่ 5.22 และ t_u เป็นเวลาในการทำความสะอาด เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และฆ่าเชื้อ ก่อนทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งได้จากการประมาณเวลาที่ใช้ในการดำเนินงานจริงเป็นเวลาประมาณ 8 ชม. ดังนั้น จากสมการที่ 5.3 จะสามารถคำนวณอัตราการผลิตเซลล์ ($P_{X,max}$) ได้โดยแทน $Y=Y_{X/S}$ และ อัตราการผลิต CGTase ($P_{E,max}$) โดยแทน $Y=Y_{P/S}$ สำหรับงานวิจัยนี้อัตราการผลิตเซลล์ และอัตราการผลิต CGTase มีค่าเท่ากับ

$$P_{X,max} = \frac{0.62 \times (8.2 - 0.8)}{14.32 + 8} = 0.21 \quad \text{กรัมต่อลิตร·ชม.}$$

$$P_{E,max} = \frac{286.01 \times (8.2 - 0.8)}{14.32 + 8} = 94.82 \quad \text{ยูนิตต่อลิตร·ชม.}$$

<u>กระบวนการผลิต CGTase แบบกึ่งต่อเนื่อง</u>

กระบวนการเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งต่อเนื่องเป็นการดำเนินงานที่มีการป้อนสารอาหารเข้าไปในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แต่จะไม่มีการดึงเซลล์และผลิตภัณฑ์ออกจากถังปฏิกรณ์ขณะดำเนินงาน ทำให้ปริมาตรของของเหลวในถังปฏิกรณ์จะเพิ่มขึ้นตามเวลา ดังนั้นกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องจะถูกจำกัดด้วยปริมาตรภายในถังปฏิกรณ์ ด้วยเหตุนี้เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ และ กิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงขึ้น จึงต้องใช้อัตราการป้อนสารอาหาร (Feed rate, F) ต่ำ และใช้ความเข้มข้นของสารอาหารสูง แต่งานวิจัยนี้ไม่สามารถใช้ความเข้มข้นของสารอาหารสูงมากได้ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบของแป้งซึ่งที่ความเข้มข้นสูงจะมีการละลายน้ำได้จำกัด (มากกว่า 10 กรัมต่อลิตร จะละลายน้ำได้น้อยลง) และน้ำแป้งจะมีความหนืดสูงขึ้นมากด้วย ดังนั้นจึงไม่สามารถเตรียมสารอาหารที่จะป้อนเข้าถังปฏิกรณ์ที่ความเข้มข้นสูงได้ และถ้าใช้ความเข้มข้นของสารอาหารในกระแสป้อนต่ำ จึงจำเป็นต้องใช้อัตราการป้อนสูงเพื่อให้สารอาหารเพียงพอกับการเจริญเติบโตและการผลิต CGTase ซึ่งถ้าอัตราการป้อนสูงจะส่งผลให้มีระยะเวลาในการดำเนินงานน้อย (เนื่องจากถังปฏิกรณ์เต็มเร็ว) และนอกจากนี้ยังต้องทำการรักษาระดับความเข้มข้นของแป้งในถังปฏิกรณ์ไว้ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 8.2 กรัมต่อลิตร เนื่องจากที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้จะเกิดการจำกัดการเจริญเนื่องจากการถ่ายเทมวลของสารอาหารและออกซิเจนภายในถังปฏิกรณ์ จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นจึงไม่พิจารณาการดำเนินงานแบบกึ่งต่อเนื่องในงานวิจัยนี้



รูปที่ 5.22 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์ การใช้ แป้ง และ การผลิต CGTase ตามเวลา ที่ภาวะ: ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร, ค่า pH เริ่มต้น 8, 30°C และ 400 rpm

กระบวนการผลิต CGTase แบบต่อเนื่อง

กระบวนการผลิต CGTase แบบต่อเนื่อง (Continuous stirred-tank fermenter) เป็นลักษณะการดำเนินงานที่มีการป้อนสารอาหาร ดึงเซลล์และผลิตภัณฑ์ออกจากถังปฏิกรณ์ โดยมีสมมติฐาน คือ

1. ถังหมักมีการผสมกันอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นความเข้มข้นของเซลล์ในกระแสออกเท่ากับความเข้มข้นของเซลล์ภายในถังปฏิกรณ์
2. ไม่มีเซลล์และผลิตภัณฑ์ในกระแสป้อน และ อัตราของกระแสป้อนเข้าและออกเท่ากัน
3. พิจารณาระบบที่ steady state

จากสมการสมดุลมวลสารดังสมการที่ 5.7

$$\left|\begin{array}{l}\textit{อัตราการ}\\ \textit{เปลี่ยนแปลง}\\ \textit{มวลi}\end{array}\right| = \left|\begin{array}{l}\textit{อัตราการป้อน}\\ \textit{ของมวลiใน}\\ \textit{กระแสเข้า}\end{array}\right| - \left|\begin{array}{l}\textit{อัตราการออก}\\ \textit{ของมวลiใน}\\ \textit{กระแสออก}\end{array}\right| + \left|\begin{array}{l}\textit{อัตราการเกิด}\\ \textit{ปฏิริยาทาง}\\ \textit{ชีวเคมี}\end{array}\right| \qquad (5.7)$$

สมดุลมวลของเซลล์:

$$\frac{d(XV)}{dt} = F_{in}X_{in} - F_{out}X_{out} + \mu SXV \qquad (5.8)$$

สมดุลมวลของสารอาหาร:

$$\frac{d(SV)}{dt} = F_{in}S_{in} - F_{out}S_{out} - q_S xV \qquad (5.9)$$

จากสมมติฐาน $F_{in}=F_{out}$ และ ที่ steady state $dX/dt = 0$ เมื่อ $D = F/V$ ดังนั้น

$$D(X_{0ut} - X_{in}) = R_X = \mu X \qquad (5.10)$$

$$D = \mu\frac{X}{X_{out} - X_{in}} \qquad (5.11)$$

และจากสมมติฐาน $X_{out} = X$ และ $X_{in} = 0$

$$D = \mu \qquad (5.12)$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับงานวิจัยนี้แทนอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะด้วยแบบจำลองของ Moser

$$D = \frac{\mu_m S^2}{K_h^2 + S^2} \tag{5.13}$$

$$S = \left(\frac{DK_h^2}{\mu_m - D} \right)^{\frac{1}{2}} \tag{5.14}$$

จากสมการ (5.9) อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตจำเพาะ ($q_s = \mu / Y_{X/S}$) และที่ steady state, dS/dt =0

$$X = Y_{X/S}(S_{in} - S_{out}) \tag{5.15}$$

แทนสมการ 5.14 ลงในสมการ 5.15 (S_{out}= S)

$$X = Y_{X/S}\left(S_{in} - \left[\frac{DK_h^2}{\mu_m - D} \right]^{\frac{1}{2}} \right) \tag{5.16}$$

และอัตราการผลิตเซลล์แบบต่อเนื่อง (cell productivity, P_X) คำนวณได้จาก

$$P_X = DX \tag{5.17}$$

$$DX = DY_{X/S}\left(S_{in} - \left[\frac{DK_h^2}{\mu_m - D} \right]^{\frac{1}{2}} \right) \tag{5.18}$$

การหาค่าอัตราการเจือจาง (D) ที่ให้อัตราการผลิตเซลล์สูงสุด ทำได้โดยหาอนุพันธ์ของสมการ 5.18 แล้วให้เท่ากับ 0 โดยความเข้มข้นของอาหารที่ป้อนเข้าถังปฏิกรณ์ (S_{in}) คือ 8.2 กรัมต่อลิตร และใช้ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์เช่นเดียวกับการคำนวณแบบไม่ต่อเนื่อง

$$\frac{d}{dD}\left\{ Y_{X/S} S_{in} D - Y_{X/S} D \left(\frac{DK_h^2}{\mu_m - D} \right)^{\frac{1}{2}} \right\} = 0 \tag{5.19}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$S_{in} - \left[\frac{D_{op}K_h^2}{\mu_m - D_{op}}\right]^{\frac{1}{2}} - \frac{1}{2}\frac{\mu_m (D_{op}K_h^2)^{\frac{1}{2}}}{(\mu_m - D_{op})^{\frac{3}{2}}} = 0 \qquad (5.20)$$

จากสมการที่ 5.20 ไม่สามารถจัดรูป D_{op} ได้จึงใช้วิธี trial & error หาค่า D_{op} ที่ทำให้เทอมด้านขวามือของสมการ 5.20 เป็น 0 ได้ค่า D_{op} เท่ากับ 0.24 ต่อชม.

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าถ้าจะทำการเลี้ยงเชื้อ *B. circulans* ATCC 9995 ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องที่ความเข้มข้นของแป้งในกระแสป้อน 8.2 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้ค่าอัตราการเจือจาง (Dilution rate, D) เท่ากับ 0.24 ต่อชม. จึงจะให้อัตราการผลิตเซลล์สูงสุด จากค่า D_{op} นำไปแทนในสมการที่ 5.18 คำนวณหาอัตราการผลิตเซลล์สูงสุด แบบต่อเนื่อง (Maximum cell productivity, $P_{X,max}$)

$$P_{X,max} = D_{op}X = 0.71 \text{ (กรัมเซลล์ต่อลิตร·ชม.)}$$

ในทำนองเดียวกันก็จะสามารถหาอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ได้ จากสมการสมดุลมวลสาร (5.7) สมการสมดุลมวลของผลิตภัณฑ์:

$$\frac{d(PV)}{dt} = F_{in}P_{in} - F_{out}P_{out} + q_P XV \qquad (5.21)$$

เนื่องจากที่ steady state dP/dt = 0, สารอาหารที่ป้อนเข้าไม่มีผลิตภัณฑ์ $P_{in} = 0$, $P_{out}=P$ และการสร้างผลิตภัณฑ์สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเซลล์ $q_P = \mu Y_{P/X}$ ดังนั้น

$$P = Y_{P/X}X \qquad (5.22)$$

เมื่อแทน X ด้วยสมการที่ 5.16

$$P = Y_{P/X} \cdot Y_{X/S}\left(S_{in} - \left[\frac{DK_h^2}{\mu_m - D}\right]^{\frac{1}{2}}\right)$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$= Y_{P/S}\left(S_{in} - \left[\frac{DK_h^2}{\mu_m - D}\right]^{\frac{1}{2}}\right) \qquad (5.23)$$

และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์แบบต่อเนื่อง (productivity, P_E) = DP

$$DP = D\,Y_{P/S}\left(S_{in} - \left[\frac{DK_h^2}{\mu_m - D}\right]^{\frac{1}{2}}\right) \qquad (5.24)$$

ดังนั้นอัตราการผลิต CGTase สูงสุด (Maximum CGTase productivity, $P_{E,max}$) แบบต่อเนื่อง จะหาได้จากการแทนค่า D_{op} ในสมการที่ 5.24 สำหรับในงานวิจัยนี้มีค่าเท่ากับ

$$P_{E,max} = D_{op}P = 327.17 \text{ (ยูนิตต่อลิตร·ชม.)}$$

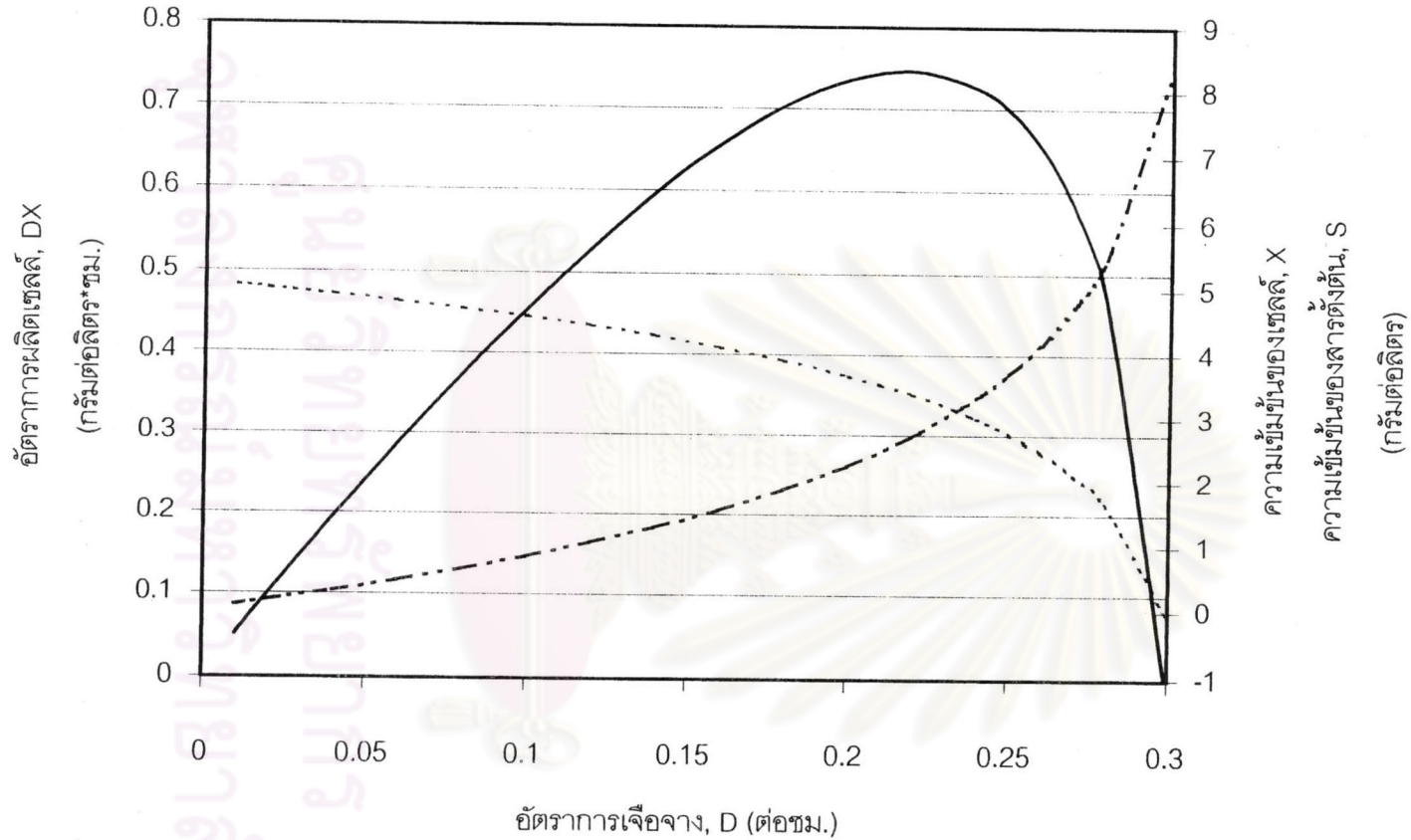
สำหรับความสัมพันธ์ระหว่าง อัตราการผลิตเซลล์ และ CGTase รวมทั้งอัตราการใช้แป้งของ *B. circulans* ATCC 9995 ในการดำเนินงานแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง (D) ต่างกัน แสดงดังรูปที่ 5.23 โดยค่า S, X และ DX คำนวณจากสมการที่ 5.14, 5.16 และ 5.18 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตแบบต่อเนื่องกับแบบไม่ต่อเนื่อง (Productivity ratio) แสดงดังตารางที่ 5.9 พบว่าอัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิต CGTase แบบต่อเนื่องมีค่ามากกว่าแบบไม่ต่อเนื่องถึง 3 เท่า จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจึงสรุปได้ว่าควรเลือกใช้กระบวนการผลิตแบบต่อเนื่องในการผลิตเอนไซม์ CGTase จาก *B. circulans* ATCC 9995 โดยใช้ความเข้มข้นของแป้งในกระแสป้อน 8.2 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.24 ต่อชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.9 เปรียบเทียบอัตราการผลิตแบบต่อเนื่องกับแบบไม่ต่อเนื่อง

	แบบไม่ต่อเนื่อง	แบบต่อเนื่อง
อัตราการผลิตเซลล์ (กรัมต่อลิตร·ชม.)	0.21	0.71
อัตราการผลิต CGTase (ยูนิตต่อลิตร·ชม.)	94.82	327.17



รูปที่ 5.23 การจำลอง (simulation) การดำเนินงานแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางต่างกันของกระบวนการผลิต CGTase ที่ภาวะ: ความเข้มข้นของแป้งในกระแสป้อน 8.2 กรัมต่อลิตร, ค่า pH เริ่มต้น 8, 30oC, และ 400 rpm —— DX ····· X – – – S