บทที่ 5
ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

การศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas* sp A .41 นี้ได้ทำการศึกษาถึงผลของอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N) ที่มีต่อการเจริญเติบโต และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่เขย่า จากนั้นจึงศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง ซึ่งจะศึกษาผลของเวลาในการเปลี่ยนอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน ที่มีต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และสุดท้าย ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวที่ทางกองทัพเรือใช้อยู่ในปัจจุบัน

5.1 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องนี้เป็นการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาถึงผลของ C/N ที่มีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องต่อไป แหล่งคาร์บอนที่ใช้ตลอดการทดลองนี้คือ น้ำมันปาล์มดิบซึ่งได้ทำการทดสอบกับแหล่งคาร์บอนอื่นๆที่ได้เคยใช้ในการทดลองได้แก่ กลูโคส และน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ พบว่าน้ำมันปาล์มดิบให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุด (ภาคผนวก ข.1) แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการทดลองนี้ก็ได้มีการทดสอบเช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอนโดยทดลองเปรียบเทียบระหว่างแอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งจากผลการทดลอง (ภาคผนวก ข.2) พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตนั้นให้การเจริญเติบโตจำเพาะและความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีกว่าแอมโมเนียมไนเตรทดังนั้นจึงเลือกแอมโมเนียมซัลเฟตมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการทดลองนี้

เนื่องจากกลไกการขนถ่ายอาหารเข้าสู่เซลล์นั้นมีหลายรูปแบบ และสารอาหารที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นน้ำมันปาล์มดิบซึ่งเป็นสารที่อยู่คนละวัฏภาคกับน้ำ ซึ่งในช่วงแรกของการเจริญเติบโตนั้นจุลินทรีย์จะสามารถใช้สารอาหารในการเจริญเติบโตได้โดยอาศัยกลไกแบบที่ 1 และ 2 ดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 2.3 นั่นคือน้ำมันบางส่วนที่สามารถละลายอยู่ในน้ำซึ่งมีในปริมาณน้อยมากนั้นจุลินทรีย์จะใช้กลไกแบบที่1 ในการขนถ่ายอาหารเข้าสู่เซลล์ ส่วนหยดน้ำมันที่มีขนาดใหญ่จุลินทรีย์จะเกาะรวมตัวรอบๆหยดโดยตรงจึงจะเกิดการขนถ่ายอาหารเข้าสู่เซลล์ และเมื่อจุลินทรีย์สามารถผลิต

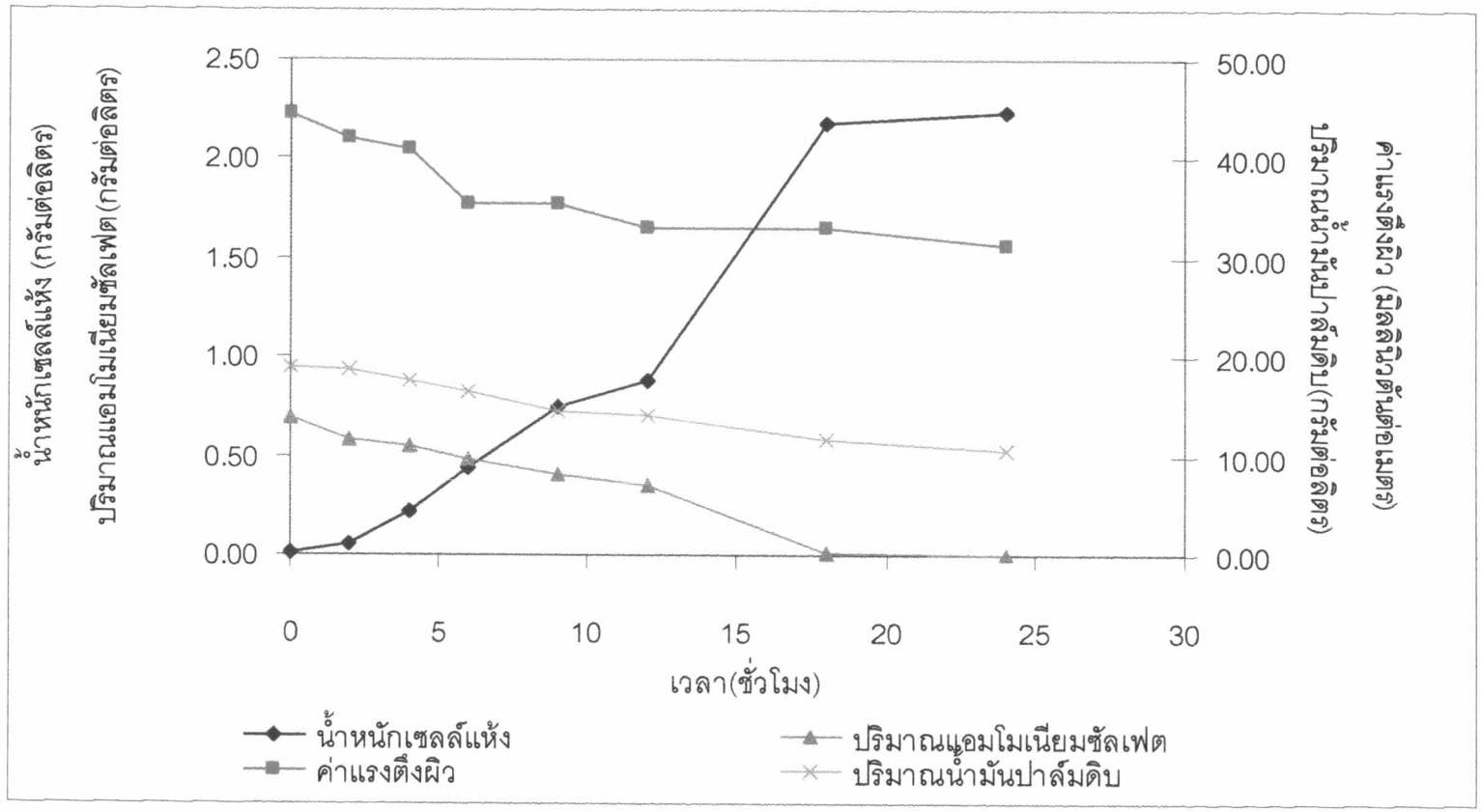
สารลดแรงตึงผิวได้ระยะหนึ่งซึ่งทำให้เกิดการกระจายตัวของหยดน้ำมันในรูปของไมเซลล์ซึ่งสามารถขนถ่ายเข้าสู่เซลล์ได้ ซึ่งจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในขวดรูปชมพู่เขย่านั้นทำให้เราสังเกตการเปลี่ยนแปลงได้อย่างชัดเจน โดยในช่วงเริ่มต้นของการหมักนั้นเราจะพบว่ายังมีการแยกชั้นกันระหว่างน้ำกับน้ำมันปาล์มดิบอย่างเห็นได้ชัด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปเป็นระยะเวลาประมาณ 3ชั่วโมงจะพบว่าน้ำมันปาล์มดิบจะเริ่มกระจายตัวเข้าไปอยู่ในชั้นของน้ำ และเมื่อเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมงจะพบว่าน้ำมันจะกระจายตัวอยู่ในชั้นน้ำได้อย่างทั่วถึง นั่นแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาเพื่อช่วยให้น้ำมันกลายเป็นหยดเล็กๆในรูปของไมเซลล์ซึ่งจุลินทรีย์สามารถขนถ่ายเข้าสู่เซลล์ได้สะดวกขึ้น

การทดลองในหัวข้อนี้แบ่งเป็นสองส่วนคือ ส่วนแรกเป็นการทดลองในขวดรูปชมพู่เขย่าเพื่อศึกษาผลของ C/N ที่มีต่อการเจริญเติบโตจำเพาะ การใช้สารอาหารจำเพาะ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ และ ค่าผลได้ของเซลล์และผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร($Y_{x/s}$,$Y_{p/s}$) และส่วนที่สองเป็นการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง โดยใช้ C/N ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งได้จากผลการทดลองในส่วนแรกเป็นค่าที่ใช้สำหรับการหมัก

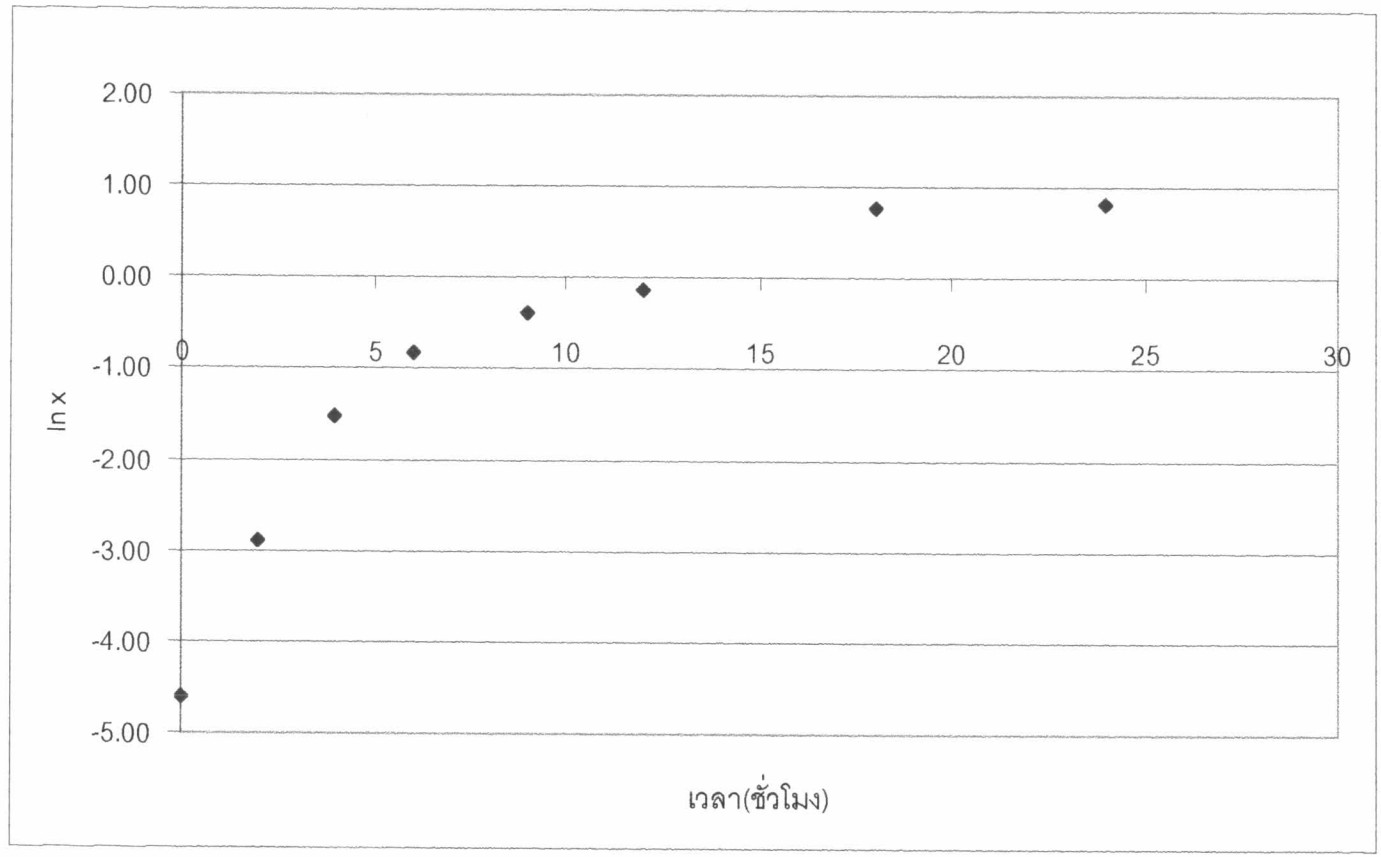
5.1.1 ผลของอัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญเติบโตจำเพาะ การใช้สารอาหารจำเพาะ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะและ ค่าผลได้ของเซลล์และผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร($Y_{x/s}$,$Y_{p/s}$)

การทดลองหาค่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเลือก C/N ทั้งหมด 5 ค่ามาทำการทดลองคือ C/N เท่ากับ 5, 50, 100, 150 และ 200 ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้คือ น้ำมันปาล์มดิบ และแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์ในขวดเขย่ารูปชมพู่ ขนาด 500 มล. และเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์วัดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ วัดจากค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักซึ่งจะมีค่าลดลงเมื่อปริมาณสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำมันปาล์มดิบวัดโดยชั่งน้ำหนักแห้ง และปริมาณไนโตรเจนวัดจากปริมาณแอมโมเนียในน้ำหมัก (หัวข้อ 4.3.3.2 ในบทที่ 4) ซึ่งจะได้ลักษณะการเจริญเติบโตเป็นดังกราฟรูปที่ 5.1 ซึ่งเป็นตัวอย่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่อัตราส่วนระหว่าง C/N เท่ากับ 150

โดยให้ปริมาณน้ำมันปาล์มดิบเริ่มต้นที่ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก หรือ 20 กรัมต่อลิตร (ณรงค์, 2543) และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นที่ 0.70 กรัมต่อลิตร



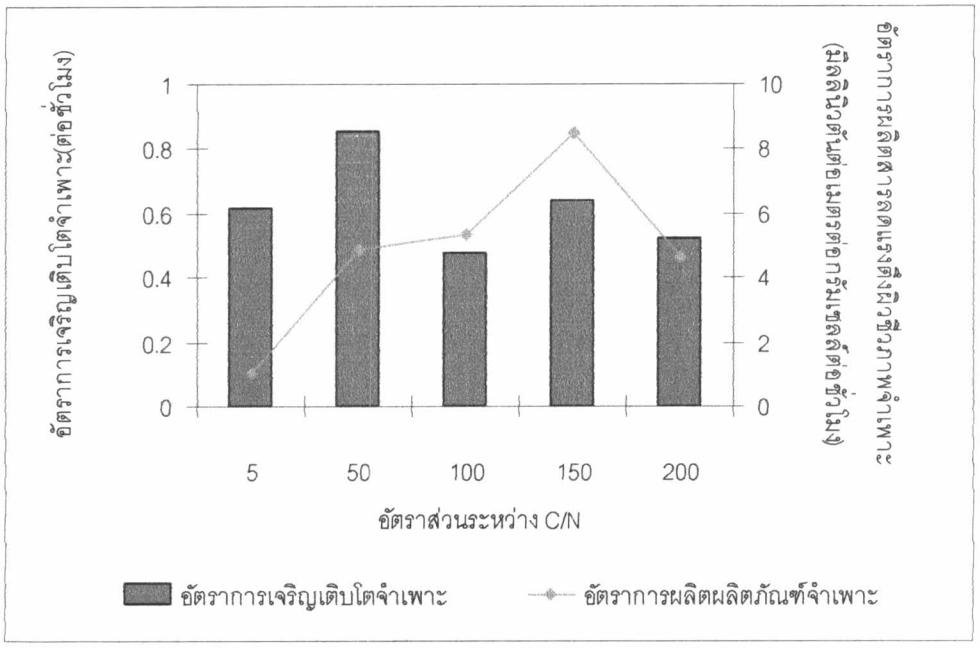
รูปที่ 5.1 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และการเปลี่ยนแปลงปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ที่อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 150 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตรบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง และที่ค่าความเป็นกรด ด่าง เริ่มต้น ที่ 7.5



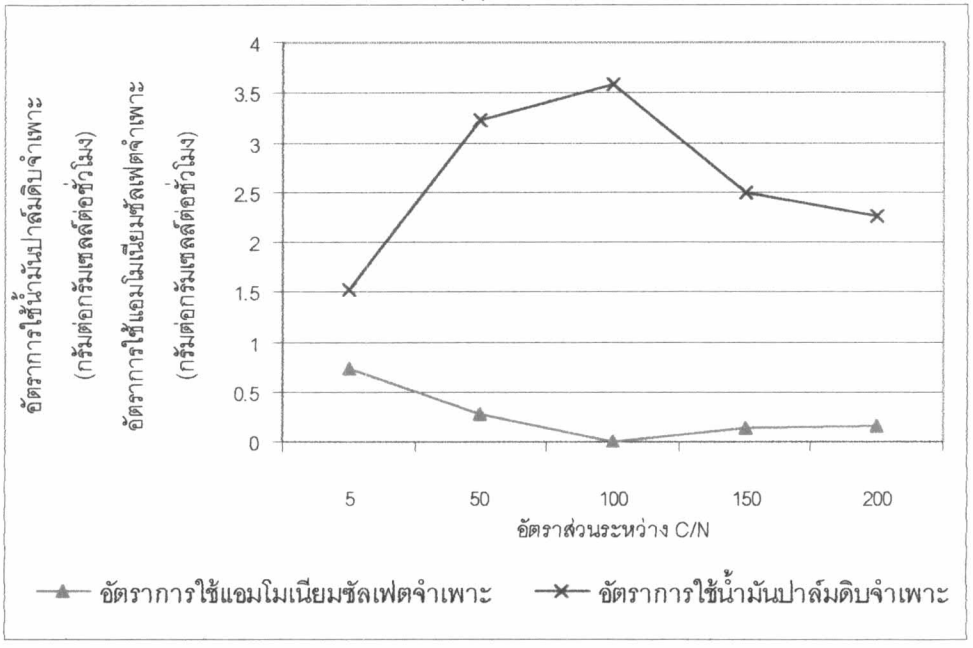
รูปที่ 5.2 ความสัมพันธ์ระหว่าง ln x กับเวลา ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ที่อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 150 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตรบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง และที่ค่าความเป็นกรด ด่าง เริ่มต้น ที่ 7.5

จากรูปที่ 5.1 พบว่า จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องโดยไม่มีระยะพัก จนกระทั่งหลังจากชั่วโมงที่ 18 การเจริญเติบโตจะค่อนข้างคงที่ นั่นคือจุลินทรีย์เริ่มเข้าสู่ระยะคงตัว และเมื่อนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ln x กับเวลา ดังรูปที่ 5.2 จะพบว่าในช่วง 6 ชั่วโมงแรกนั้น จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตแบบทวีคูณอย่างเห็นได้ชัดและหลังจากนั้นการเจริญเติบโตจะเริ่มเข้าสู่ระยะคงตัวแสดงให้เห็นว่าการที่น้ำมันปาล์มดิบซึ่งเป็นสารตั้งต้นปรากฏอยู่ในลักษณะแยกคนละชั้นกับวัฏภาคของน้ำหมักไม่ได้มีผลให้เกิดระยะพักตัวในช่วงต้นของการหมัก และจากรูปที่ 5.1 จะเห็นว่าจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตสูงขึ้นอีกเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งสาเหตุที่ทำให้จุลินทรีย์มีการเพิ่มปริมาณขึ้นในช่วงท้ายนั้นยังไม่สามารถหาสาเหตุที่แน่นอนได้ เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะได้ปริมาณเซลล์สูงสุดอยู่ที่ 2.24 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พิจารณาจากค่าแรงตึงผิวที่ลดลงซึ่งหมายถึงมีปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้น โดยพบว่าค่าแรงตึงผิวจะลดลงเล็กน้อยในช่วง 6 ชั่วโมงแรก และหลังจากนั้นจะลดลงอย่างต่อเนื่องและเมื่อสิ้นสุดการทดลองจะมีค่าแรงตึงผิว 31.30 มิลลินิวตันต่อเมตร ซึ่งมีแนวโน้มว่าจะลดลงได้อีกถึงแม้ว่าแนวโน้มของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้นค่อนข้างจะคงที่แล้วก็ตามแสดงว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้มีลักษณะเป็นแบบผสม (Mixed growth associated product) ส่วนปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนนั้นพบว่ามีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลองจะพบว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือนั้นน้อยมาก นั่นแสดงให้เห็นว่าการที่จุลินทรีย์หยุดการเจริญเติบโตก็เนื่องมาจากปริมาณไนโตรเจนที่เหลือน้อยนั่นเอง แต่ในช่วงที่ปริมาณไนโตรเจนเหลือน้อยนี้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังคงมีอยู่อย่างต่อเนื่องโดยเห็นได้ชัดจากค่าแรงตึงผิวที่ลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วงนี้ นั่นแสดงให้เห็นว่าไนโตรเจนมีความจำเป็นน้อย ต่อกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทั้งนี้เนื่องจากแรมโนลิปิดซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ *Pseudomonas* sp. ผลิตขึ้นไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ กรณีที่อัตราส่วนระหว่าง C/N อื่นๆแสดงลักษณะการเจริญเติบโตไว้ใน ภาคผนวก ข.3

จากการทดลองที่ C/N ต่างๆกัน 5 ค่า คือ 5 ,50,100,150 และ 200 ซึ่งแต่ละการทดลองจะคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ อัตราการใช้น้ำมันปาล์มดิบและแอมโมเนียมซัลเฟตจำเพาะซึ่งแสดงการคำนวณไว้ใน ภาคผนวก ค.1 ค่าต่างๆที่คำนวณได้ แสดงการเปรียบเทียบแต่ละอัตราส่วนไว้ในรูปที่ 5.3 โดยคำนวณจากช่วงเวลาการหมักเดียวกัน คือช่วงเวลา 6 ชั่วโมงแรกซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างทวีคูณ



(ก)



(ข)

รูปที่ 5.3 การเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ (ก) และอัตราการใช้น้ำมันปาล์มดิบและแอมโมเนียมซัลเฟตจำเพาะ (ข) ที่อัตราส่วนของ C/N ต่างๆกัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง และที่ค่าความเป็นกรด ด่าง เริ่มต้น ที่ 7.5

ตารางที่ 5.1 ผลได้ของเซลล์ และผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร

อัตราส่วนระหว่าง C/N	Yx/c (กรัมต่อกรัมน้ำมันปาล์มดิบ)	Yx/n (กรัมต่อกรัมแอมโมเนียมซัลเฟต)	Yp/c (มิลลินิวตันต่อกรัมน้ำมันปาล์มดิบ)
5	0.41	0.83	0.67
50	0.27	3.11	1.52
100	0.13	97.49	1.50
150	0.26	4.36	3.40
200	0.23	3.32	2.07

เมื่อพิจารณารูปที่ 5.3 (ก) ซึ่งแสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์ และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะพบว่า ที่อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 50 จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.86 ต่อชั่วโมง และที่ C/N เท่ากับ 100 ซึ่งมีค่า 0.48 ต่อชั่วโมง จะให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำที่สุด ซึ่งต่ำกว่าถึง 79.17 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะนั้นก็พบว่า ที่ C/N เท่ากับ 150 จะให้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะสูงที่สุด เท่ากับ 8.49 มิลลินิวตันต่อเมตรต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง และอัตราส่วนที่ให้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ำที่สุดคือที่อัตราส่วนเท่ากับ 5 ซึ่งมีค่า 1.02 มิลลินิวตันต่อเมตรต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าที่ C/N 150 อยู่ 732.35 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาผลได้ของเซลล์ต่อสารอาหารพบว่าที่ C/N 5 จะให้ $Y_{x/c}$ สูงที่สุดเท่ากับ 0.41 กรัมต่อกรัมน้ำมันปาล์มดิบ และ C/Nเท่ากับ 100 ให้ $Y_{x/n}$ สูงที่สุดเท่ากับ 97.49 กรัมต่อกรัมแอมโมเนียมซัลเฟต และที่ C/N 150 จะให้ $Y_{p/c}$ เท่ากับ 3.40 มิลลินิวตันต่อกรัมน้ำมันปาล์มดิบ ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลได้ของเซลล์ต่อสารอาหารไม่สอดคล้องกับค่าจำเพาะทางจลนพลศาสตร์ที่คำนวณได้แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้พิจารณาจากค่าอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการผลิตจำเพาะเป็นหลักดังนั้นจึงเลือกค่า C/N ที่ 50 และ 150 มาทำการทดลองต่อไป

นอกจากนี้ที่อัตราส่วนระหว่าง C/N ต่างๆกันนั้นจะมีอัตราการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างกันดังรูปที่ 5.3 (ข) ซึ่งจากรูปพบว่า ที่C/N เท่ากับ 100 จะมีอัตราการใช้น้ำมันปาล์มดิบจำเพาะสูงที่สุด เท่ากับ 3.59 กรัมน้ำมันปาล์มดิบต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง และที่ C/N เท่ากับ 5 ซึ่งมีอัตราการใช้น้ำมันปาล์มดิบจำเพาะต่ำที่สุดเท่ากับ 1.52 กรัมน้ำมันปาล์มดิบต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าที่ C/N 100 อยู่ 136.18 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอัตราการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจำเพาะ พบว่า ที่ C/N เท่ากับ 5

มีอัตราการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจำเพาะ สูงที่สุดเท่ากับ 0.74 กรัมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง และต่ำที่สุดคือที่ C/N เท่ากับ 100 ซึ่งมีค่า 0.01 กรัมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นได้ว่า C/N เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pseudomonas* sp.A41 โดยพบว่า C/N ที่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตมีค่าเท่ากับ 50 ส่วน C/N ที่เหมาะสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่าเท่ากับ 150 ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีที่เราทราบว่าไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญของจุลินทรีย์ดังนั้นจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตได้ดีเมื่อมีปริมาณไนโตรเจนเป็นแหล่งอาหารที่เพียงพอ ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเมื่ออยู่ในภาวะไนโตรเจนต่ำ(C/N=150)จุลินทรีย์จึงมีการใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากขึ้นนั่นเอง ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Linhardt และคณะ (1989) ซึ่งพบว่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีไนโตรเจนน้อยๆจะให้ผลผลิตแรมโนลิปิดสูงกว่าอาหารที่มีไนโตรเจนมากๆ ถึง 42.85 เปอร์เซ็นต์ Sudhakar และคณะ (1996) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* BS2 โดยใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมเป็นสารอาหาร ในการเลี้ยงเปรียบเทียบกับสารอาหารสังเคราะห์ โดยศึกษาของเสียจากอุตสาหกรรม 2 ชนิด คือ Whey waste และ Distillery waste จากการศึกษาพบว่า Whey wasteให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณไนโตรเจนใน Whey waste มีมากกว่าเมื่อเทียบกับ Distillery waste ส่วน Distillery waste นั้นเหมาะสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์มากกว่าทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากปริมาณไนโตรเจนที่มีมากเกินไป(excessive nitrogen) ใน Whey waste จะสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์แต่ทำให้การผลิตผลิตภัณฑ์ลดน้อยลง

เป็นที่น่าสังเกตจากรูปที่ 5.3(ข) พบว่า ที่ C/Nเท่ากับ 100 มีอัตราการใช้แหล่งคาร์บอนสูงที่สุดและในขณะเดียวกันก็มีอัตราการใช้แหล่งไนโตรเจนต่ำที่สุดด้วยซึ่งปริมาณคาร์บอนที่ถูกใช้ไปในอัตราที่สูงนั้นน่าจะส่งผลให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอัตราที่สูงด้วย แต่กลับพบว่าที่ C/N เท่ากับ 100 อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่ได้มีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับค่า C/N อื่นๆ ส่วนอัตราการใช้แหล่งไนโตรเจนต่ำที่สุด (0.01 กรัมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง) ที่ค่า C/N 100 นั้นส่งผลสอดคล้องกันคือให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำที่สุดด้วย (0.048 ต่อชั่วโมง)

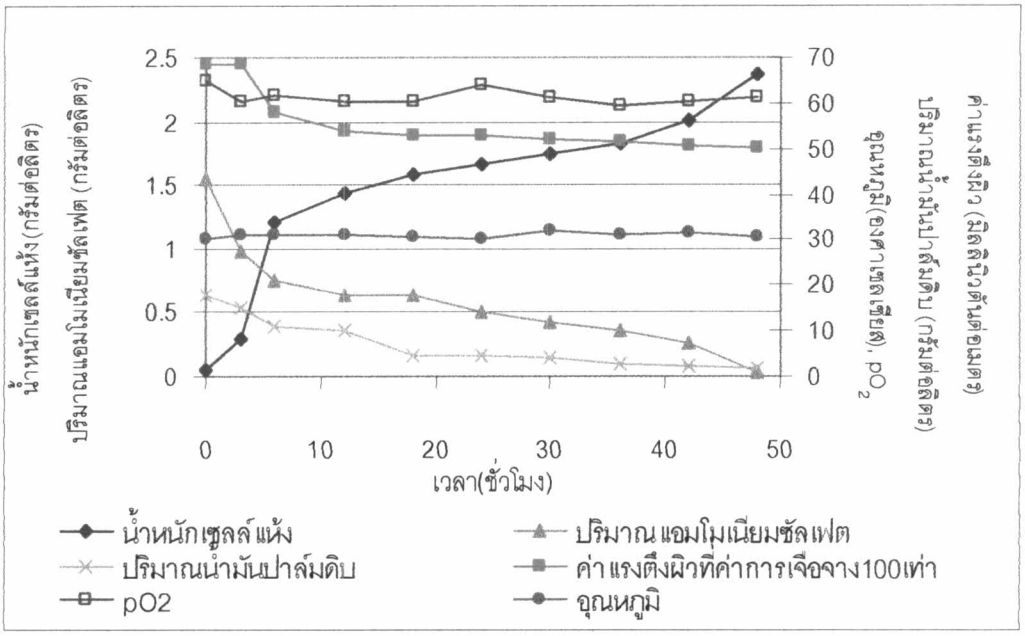
จากข้อสรุปข้างต้นที่ว่า C/N เท่ากับ 50 เหมาะสำหรับการเจริญเติบโต และ C/N 150 เหมาะสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Pseudomonas* sp.A41 จึงเป็นการสมเหตุสมผลที่เราจะศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่องในขั้นต่อไปโดยควบคุมค่า C/N

ในช่วงต้นของการเจริญเติบโตที่ 50 และหลังจากที่จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจึงทำการเปลี่ยนค่า C/N เป็น 150 เพื่อเสริมการผลิตผลิตภัณฑ์

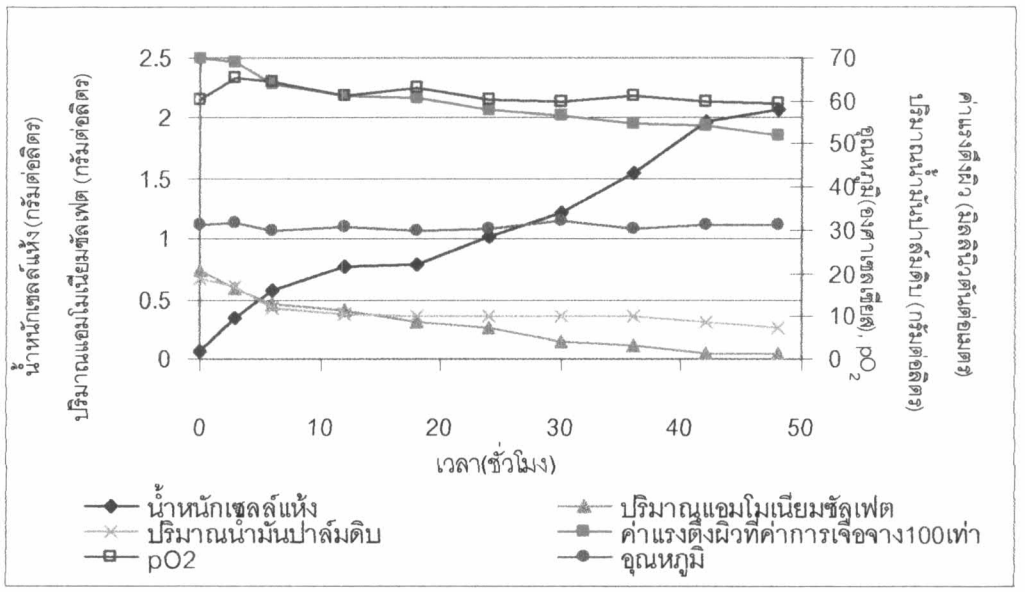
5.1.2 การหาอัตราจำเพาะทางจลนพลศาสตร์ที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน 50 และ 150 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

หลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในขวดรูปชมพู่เขย่าเพื่อศึกษาผลของ C/N แล้วนั้น ทำให้เราทราบว่าอัตราส่วนระหว่าง C/N ที่ 50 ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 0.86 ต่อชั่วโมงและที่ 150 จะให้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงที่สุด ที่ 8.49 มิลลินิวตันต่อเมตรต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง จึงใช้ค่า C/N ทั้งสองค่านี้ในการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องเพื่อหาอัตราจำเพาะทางจลนพลศาสตร์ สำหรับนำไปใช้ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องต่อไปโดยทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง โดยควบคุม ค่าความเป็นกรด ด่าง ที่ 7.5 อัตราการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศที่ 60 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว (ณรงค์, 2543) ซึ่งลักษณะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้น แสดงดังรูปที่ 5.4

และเนื่องจากการรายงานผลในลักษณะของค่าแรงตึงผิวนั้นเป็นค่าโดยอ้อมและไม่เป็นสากล ดังนั้นจึงได้มีการเปลี่ยนค่าแรงตึงผิวที่ลดลงให้เป็นความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในหน่วยกรัมต่อลิตร โดยใช้ผลการทดลองที่พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น 0.96 กรัมต่อลิตร สามารถทำให้ค่าแรงตึงผิวที่ค่าความเจือจาง 100 เท่า ลดลงได้ 20 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็นค่าเทียบบัญญัติไตรยางค์ในการแปลงหน่วยโดยแสดงผลในรูป 5.5 (ก) และ (ข)

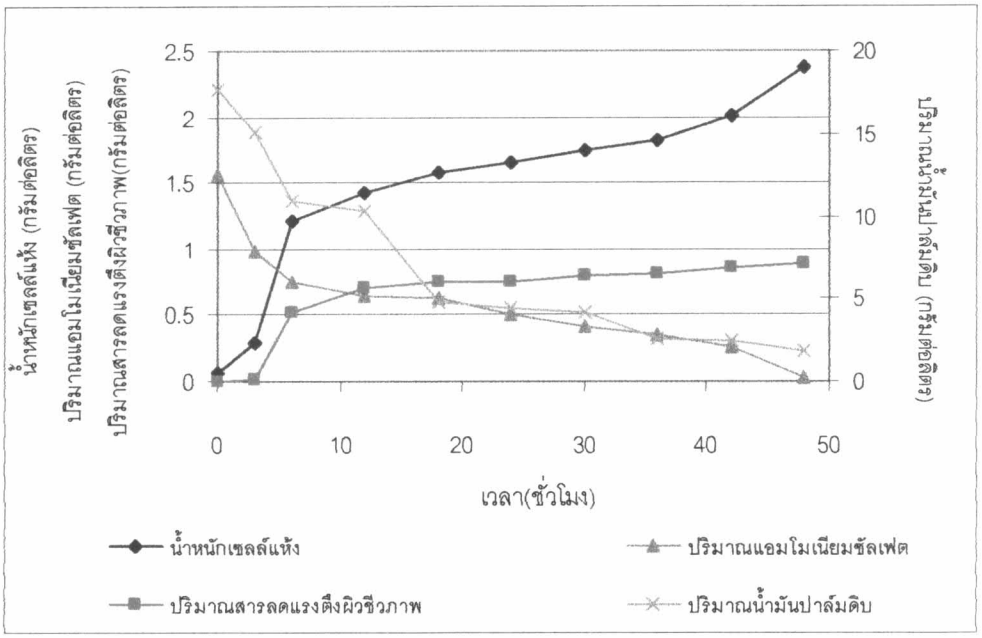


(ก)

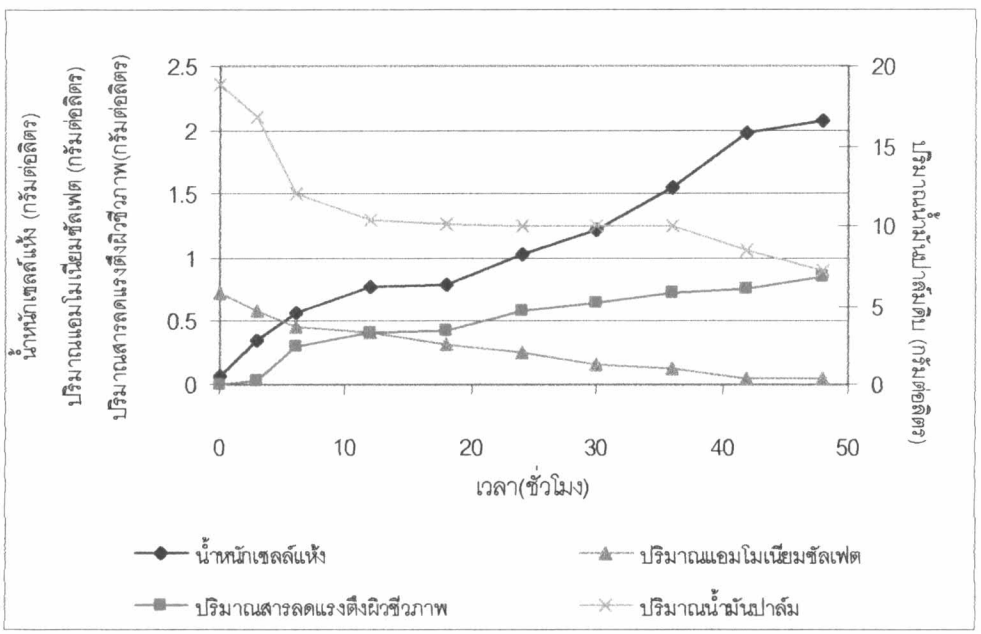


(ข)

รูปที่ 5.4 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และการเปลี่ยนแปลงปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ที่อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 50 (ก) และ 150 (ข) ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศที่ 60เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ความเร็วของการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที



(ก)



(ข)

รูปที่ 5.5 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ความเข้มข้น(กรัมต่อลิตร)ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และการเปลี่ยนแปลงปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ที่อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 50 (ก) และ 150 (ข) ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศที่ 60 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ความเร็วของการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที

จากกราฟรูปที่ 5.4 และ 5.5 จะเห็นได้ว่าที่ทั้ง C/N เท่ากับ 50 และ 150 จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง และแม้จะผ่านเวลาการหมักแล้วถึง 48 ชั่วโมงก็ยังไม่เข้าสู่ภาวะหยุดการเจริญเติบโตอย่างชัดเจน แต่ช่วงการเจริญเติบโตแบบทวีคูณยังคงเป็นช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการเจริญเติบโตอยู่เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่เขย่า

จากกราฟเราสามารถคำนวณหาอัตราจำเพาะทางจลนพลศาสตร์ซึ่งแสดงวิธีการคำนวณไว้ในภาคผนวก ค.1 ซึ่งได้ค่าดังตารางที่ 5.2 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบกับอัตราจำเพาะทางจลน์พลศาสตร์ที่อัตราส่วน C/N 50 และ 150 ระหว่างการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่เขย่า กับ การเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ตารางที่ 5.2 อัตราจำเพาะทางจลนพลศาสตร์ต่างๆที่คำนวณได้ ที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างคาร์บอนและ ไนโตรเจน เท่ากับ 50 และ 150

อัตราส่วน C/N	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ (มิลลินิวตันต่อเมตรต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง)	อัตราการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจำเพาะ (กรัมต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง)	อัตราการใช้น้ำมันปาล์จำเพาะ (กรัมต่อกรัมเซลล์ต่อชั่
50	0.52[1]	2.68[1]	0.29[1]	2.90[1]
	0.86[2]	4.90[2]	0.28[2]	3.22[2]
150	0.35[1]	4.60[1]	0.13[1]	1.77[1]
	0.64[2]	8.49[2]	0.15[2]	2.49[2]

หมายเหตุ [1] การเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

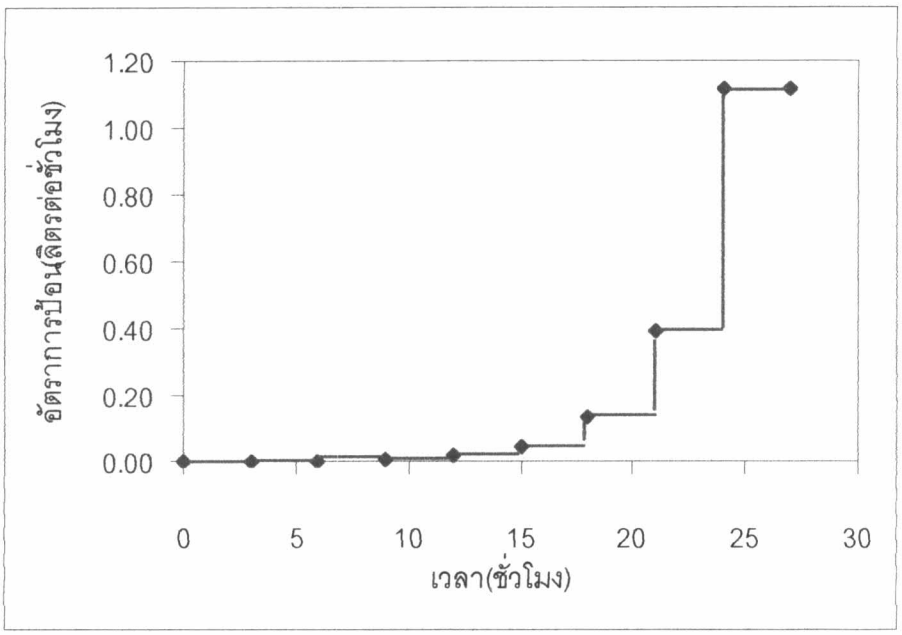
[2] การเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่เขย่า

จากตารางที่ 5.2 พบว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องนั้น ที่อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 50 จะให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงกว่าที่ 150 ในทางกลับกันที่ C/N เท่ากับ 150 จะให้อัตราการผลิตจำเพาะสูงกว่าที่ C/N 50 ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่เขย่า แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า การเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่เขย่าจะให้ค่าอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการผลิตจำเพาะสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ถึง 65.4-82.8 เปอร์เซ็นต์ และ 82.8-84.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับในขณะที่มีอัตราการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนมากกว่ากว่าเพียง 11-40.7เปอร์เซ็นต์ และ 15 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อพิจารณาในทั้งสองค่าของ C/N ซึ่งแสดงให้เห็นว่า

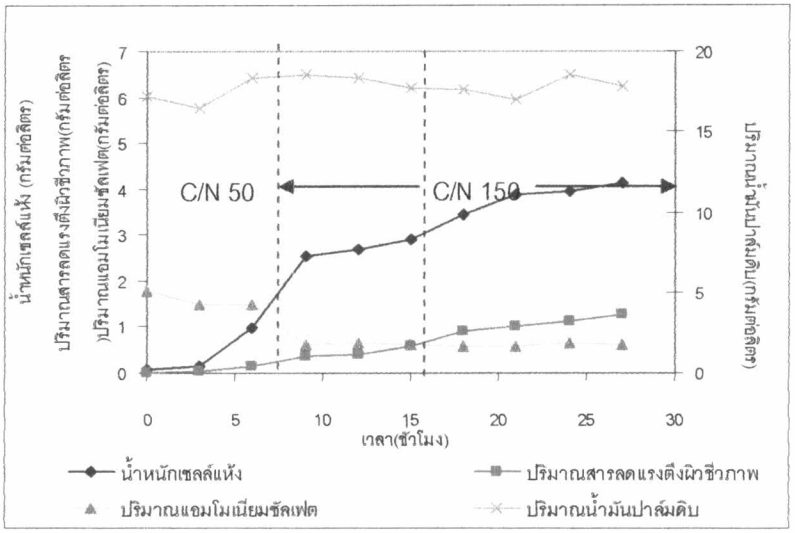
ค่าผลได้ของเซลล์จากสารตั้งต้น ($Y_{x/s}$) และค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสารตั้งต้น ($Y_{p/s}$) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่ารูปชมพู่มีค่าสูงกว่าผลได้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ทั้งๆที่การเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่เขย่าไม่ได้มีการควบคุมสภาวะใดๆเลย (ค่าความเป็นกรด-ด่าง, อุณหภูมิ, และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตรได้มีการควบคุมสภาวะเหล่านี้ให้อยู่ในค่าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับ *Pseudomonas* sp.A41ดังที่ ณรงค์ (2543) ได้ทำการวิจัยไว้แล้ว (ดูรูปที่ 5.4 ประกอบ)

5.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pseudomonas* sp.A41 ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

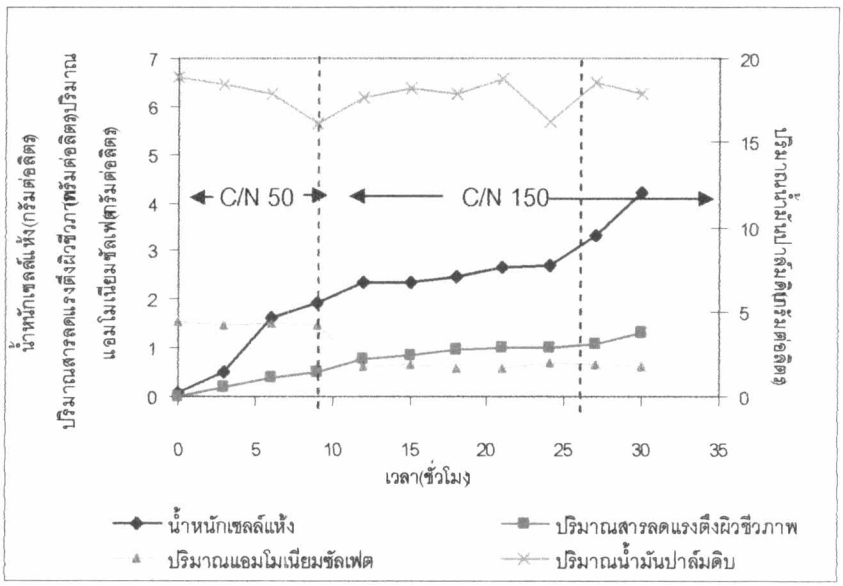
จากผลการทดลองในตารางที่ 5.1 ซึ่งแสดงอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (น้ำมันปาล์มดิบ และแอมโมเนียมซัลเฟต) ในกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบไม่ต่อเนื่อง โดย *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ทำให้เราสามารถกำหนดอัตราการป้อนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนได้ดังแสดงในรูปที่ 5.6 (ดูตาราง ค.4ภาคผนวก ค ประกอบ) จะเห็นได้ว่าในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องนี้เราใช้เทคนิคการป้อนสารอาหารแบบทวีคูณ โดยควบคุมให้ระดับความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มและแอมโมเนียมซัลเฟตในถังหมักมีค่าคงที่ที่ C/N ที่กำหนดไว้(C/N เท่ากับ 50 ในช่วงการเจริญเติบโตและ C/N เท่ากับ 150 ในช่วงการผลิตผลิตภัณฑ์ ซึ่งในความเป็นจริงแล้วเราควบคุมได้อยู่ในช่วง C/N เท่ากับ 45-52 และ C/N เท่ากับ 142-148 ตามลำดับ) ทั้งนี้เพื่อควบคุมให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะคงที่ที่ค่าสูงที่สุด (อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.52 ต่อชั่วโมง และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ 4.6 มิลลินิวตันต่อเมตรต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง หรือ 0.13 กรัมต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง) ในการทดลองชุดนี้จะทำการแปรค่าเวลาในการเปลี่ยนอัตราส่วน C/N จาก 50 เป็น 150 มีการป้อนสารอาหารโดยควบคุมให้ C/N ในถังหมักมีค่า 50 ใน 6, 9,12 และ 15 ชั่วโมงแรกของการหมักตามลำดับ และหลังจากนั้นจะทำการเปลี่ยนค่า C/N ในถังหมักให้มีค่าเท่ากับ 150 ทำการหมักต่อเนื่องไปจนกระทั่งน้ำหมักมีปริมาตร 10 ลิตร จึงหยุดกระบวนการหมัก ผลการทดลองการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในทั้ง 4 การทดลองแสดงในรูปที่ 5.7 ถึง 5.10



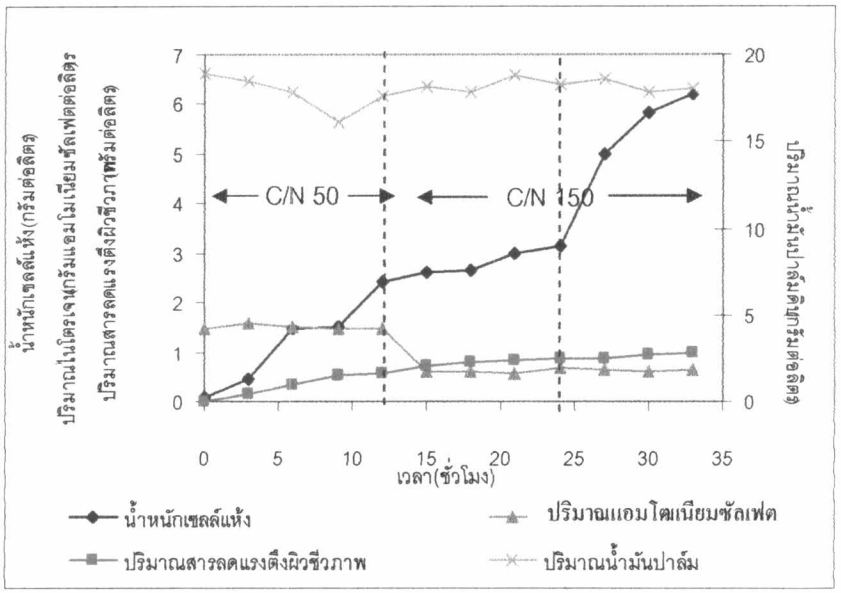
รูปที่ 5.6 รูปแบบการป้อนสารอาหารโดยกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องที่เวลาในการเปลี่ยนอัตราส่วน C/N เท่ากับ 6 ชั่วโมง



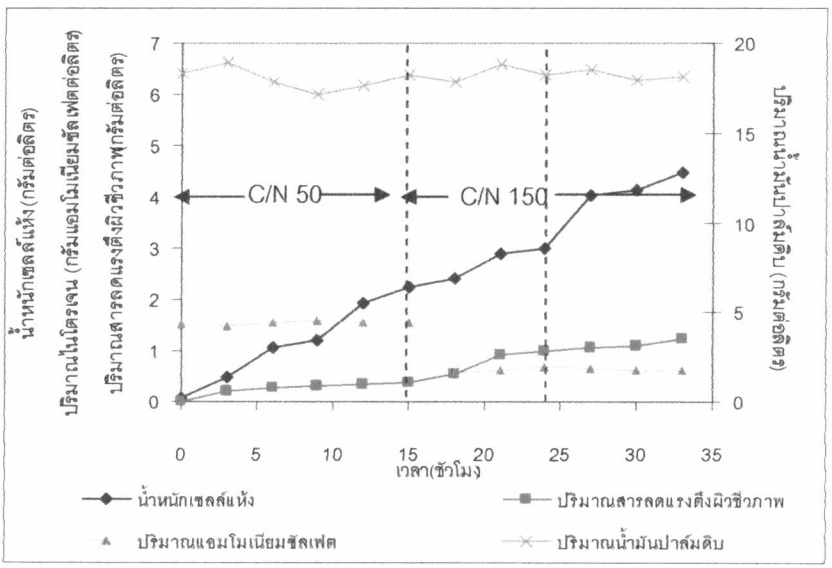
รูปที่ 5.7 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเมื่อเวลาที่เปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง C/N คือ 6 ชั่วโมง โดยควบคุมความเร็วรอบของการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด ด่างที่ 7.5 และปริมาณออกซิเจนที่ 60 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว



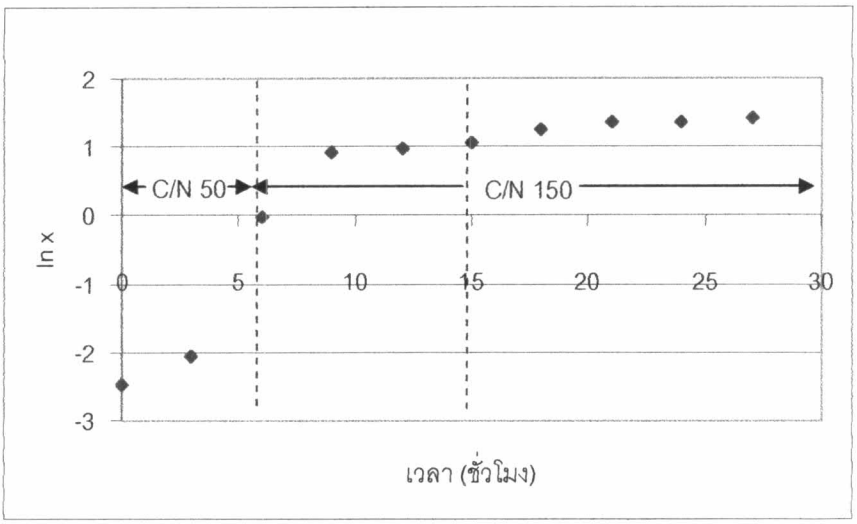
รูปที่ 5.8 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเมื่อเวลาที่เปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง C/N คือ 9 ชั่วโมง โดยควบคุมความเร็วรอบของการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด ด่างที่ 7.5 และปริมาณออกซิเจนที่ 60 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว



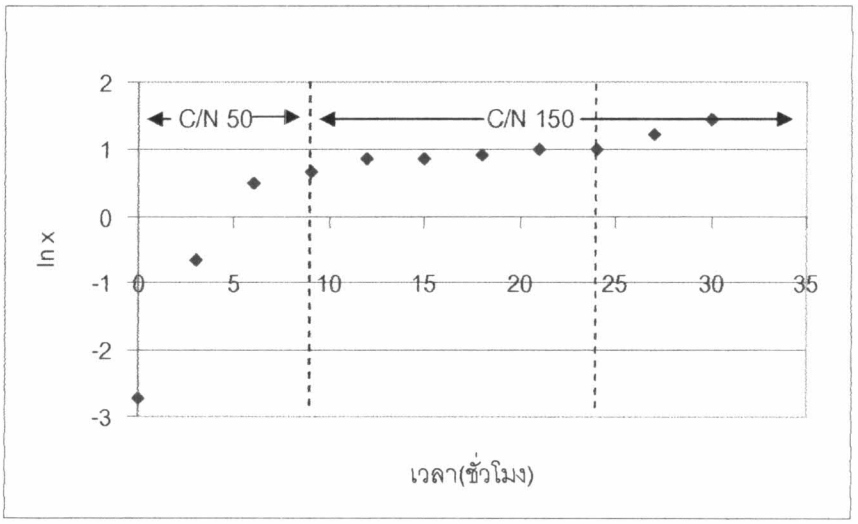
รูปที่ 5.9 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเมื่อเวลาที่เปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง C/N คือ 12 ชั่วโมง โดยควบคุมความเร็วรอบของการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด ด่างที่ 7.5 และปริมาณออกซิเจนที่ 60 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว



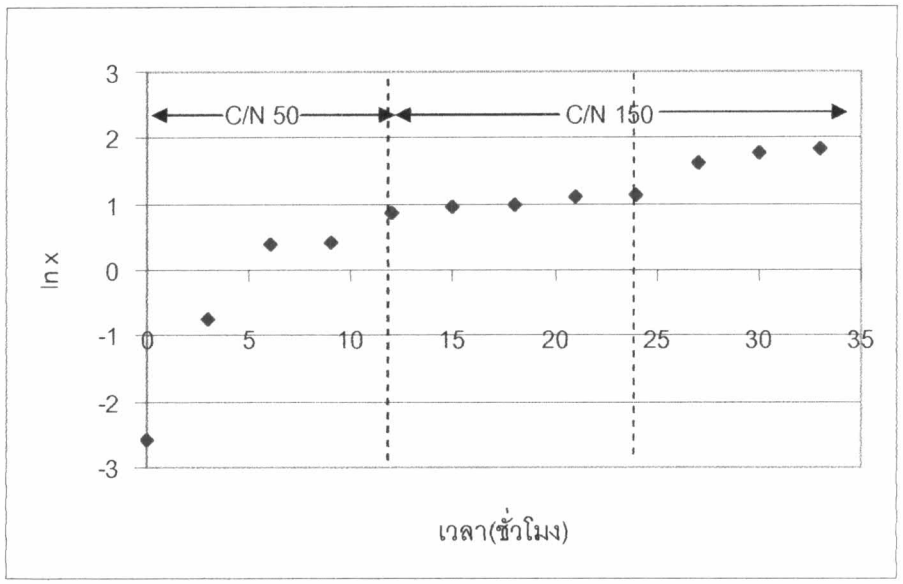
รูปที่ 5.10 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 การผลิตสารลดแรงตึงผิวในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเมื่อเวลาที่เปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง C/N คือ 15 ชั่วโมง โดยควบคุมความเร็วรอบของการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด ด่างที่ 7.5 และปริมาณออกซิเจนที่ 60 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว



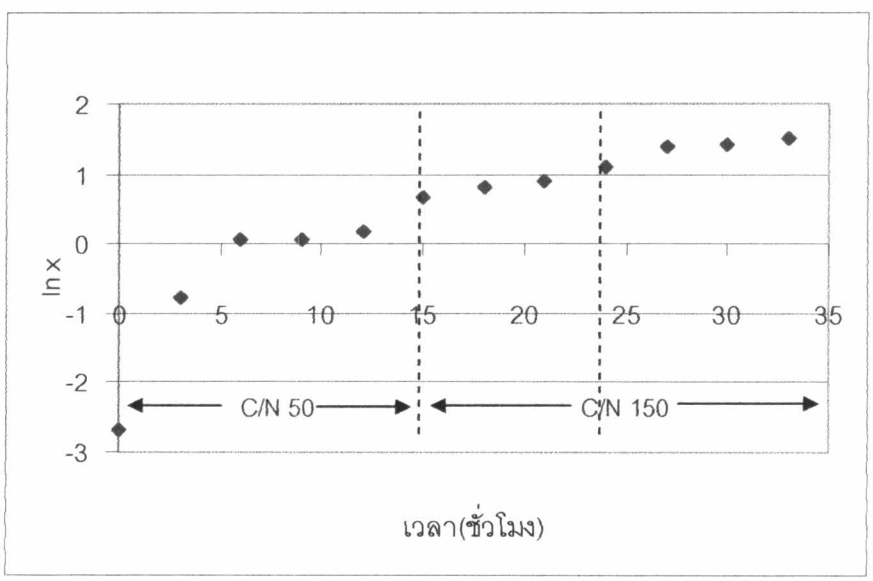
รูปที่ 5.11 ความสัมพันธ์ระหว่าง ln x กับ เวลา ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 การผลิตสารลดแรงตึงผิวในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเมื่อเวลาที่เปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง C/N คือ 6 ชั่วโมง



รูปที่ 5.12 ความสัมพันธ์ระหว่าง ln x กับ เวลา ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 การผลิตสารลดแรงตึงผิวในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเมื่อเวลาที่เปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง C/N คือ 9 ชั่วโมง



รูปที่ 5.13 ความสัมพันธ์ระหว่าง ln x กับ เวลา ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 การผลิตสารลดแรงตึงผิวในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเมื่อเวลาที่เปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง C/N คือ 12 ชั่วโมง

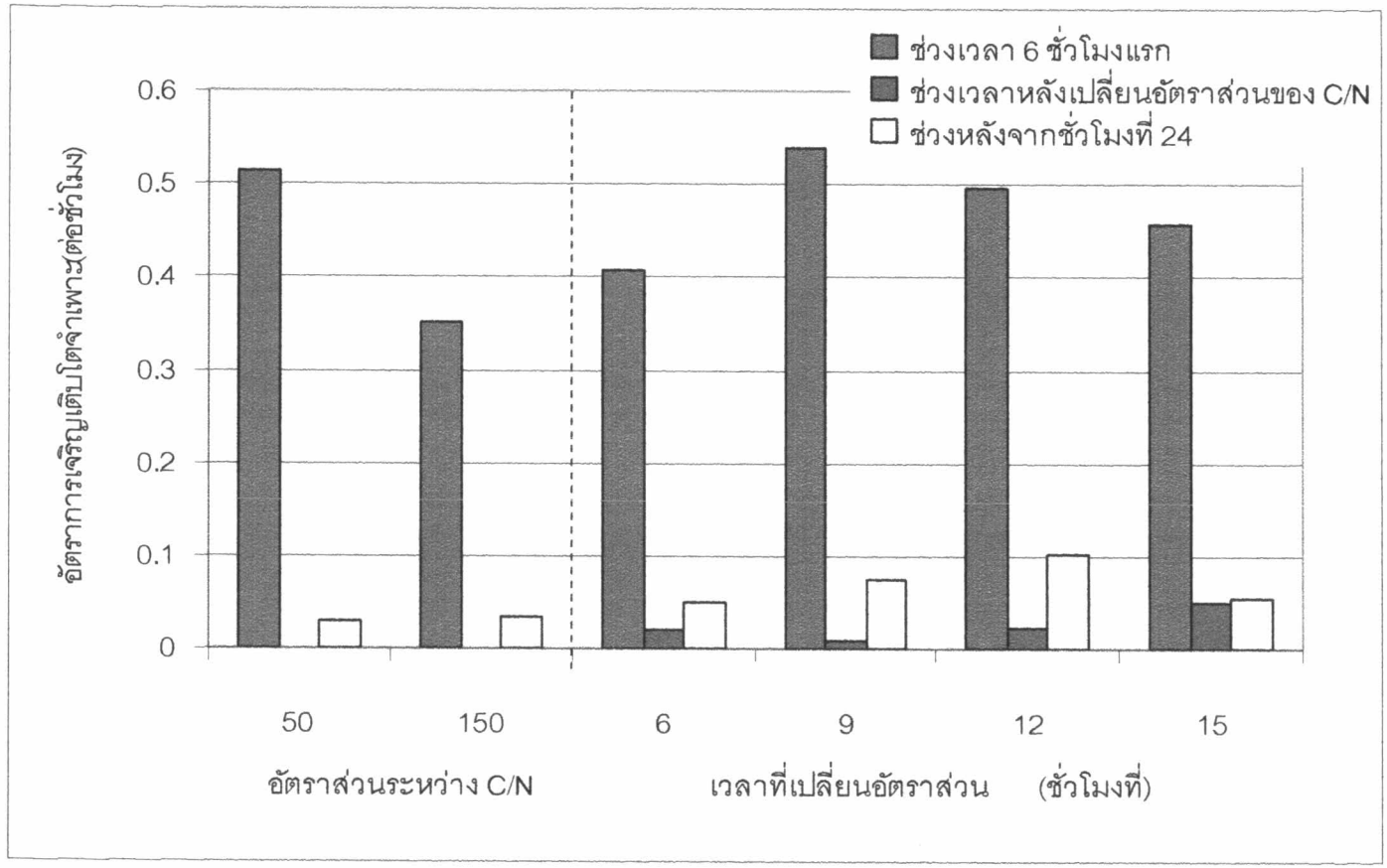


รูปที่ 5.14 ความสัมพันธ์ระหว่าง ln x กับ เวลา ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 การผลิตสารลดแรงตึงผิวในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเมื่อเวลาที่เปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง C/N คือ 15 ชั่วโมง

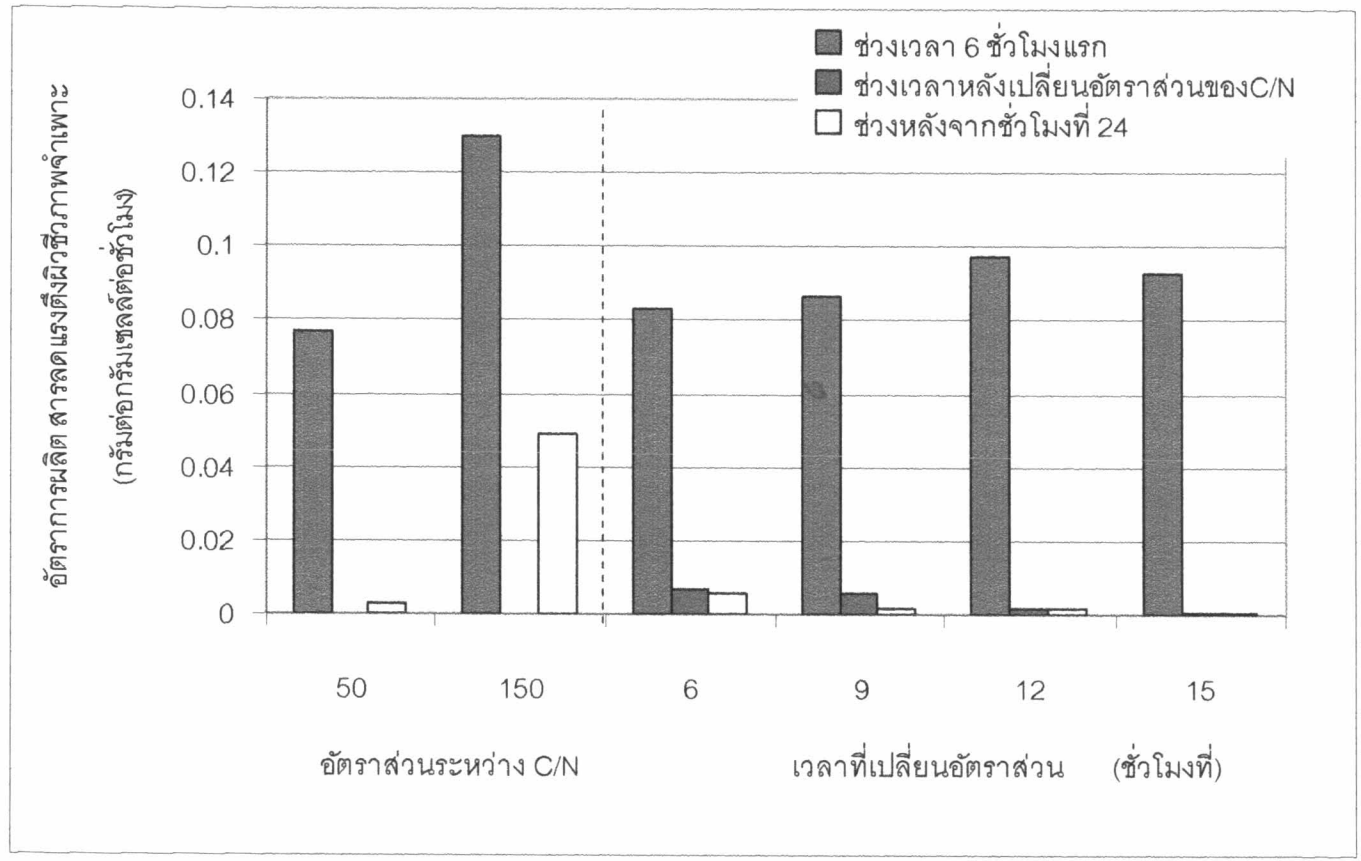
จากผลการทดลอง (รูปที่ 5.7-5.10) ข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเราสามารถควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารในถังหมักให้อยู่ในระดับที่ค่อนข้างคงที่ และจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดกระบวนการหมักแต่เป็นที่น่าสังเกตว่าจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโต เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในช่วงประมาณหลังจาก 24 ชั่วโมง ของเวลาในการหมัก ซึ่งเมื่อนำมาสร้างความสัมพันธ์ระหว่าง ln x กับ เวลา จะเห็นว่ามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนดังรูปที่ 5.11 ถึง 5.14 ดังนั้นเพื่อให้การวิเคราะห์ผลชัดเจนยิ่งขึ้นเราจึงแบ่งช่วงเวลาการหมักที่สนใจออกเป็น 3 ช่วง คือช่วง 0 ถึง 6 ชั่วโมงแรก ช่วง 6 ชั่วโมงหลังจากเปลี่ยนอัตราส่วน C/N และช่วงประมาณหลังจาก 24 ชั่วโมงของการหมัก ดังแสดงผลในรูปที่ 5.15 ถึง 5.18

5.2.1 ค่าอัตราจำเพาะทางจลนพลศาสตร์ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

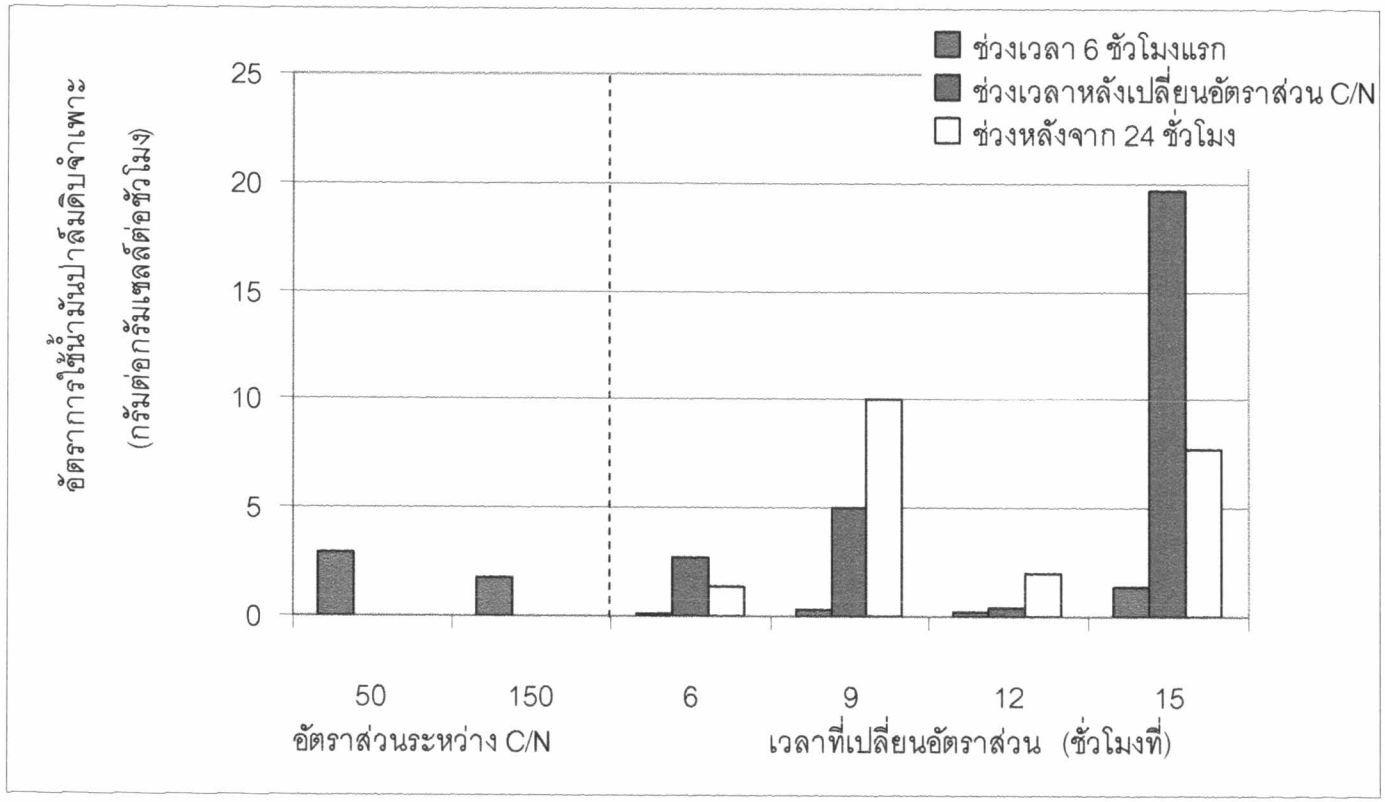
รูปที่ 5.15 แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกรณีการหมักแบบไม่ต่อเนื่องและแบบกึ่งต่อเนื่องในช่วงเวลาการหมักต่างๆกัน จะเห็นว่าในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการหมักที่มีค่า C/N เท่ากับ 50 ในแต่ละการทดลองให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะใกล้เคียงกันโดยมีค่าเฉลี่ยที่ 0.47 ต่อชั่วโมง ค่าสัมประสิทธิ์ความคลาดเคลื่อนเป็น 11.68 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในช่วงหกชั่วโมงหลังการเปลี่ยนอัตราส่วน C/N จาก 50 เป็น 150 จะพบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าต่ำกว่าในช่วง 6 ชั่วโมงแรกถึงประมาณ 1851 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกรณีการหมักแบบไม่ต่อเนื่องจะเห็นว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในช่วง 6 ชั่วโมงแรก และช่วงหลังจาก 24 ชั่วโมงของการหมักมีค่าแตกต่างกันมาก โดยในช่วงหลังมีค่าลดลงถึง 1634 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นไปตามความคาดหมายเนื่องจากในช่วงหลังของกระบวนการหมักนั้นสารอาหารมีอยู่ในปริมาณจำกัด ทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่ในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการป้อนสารอาหารเป็นทวีคูณ ซึ่งทำให้สามารถควบคุมปริมาณสารอาหารให้คงที่ตลอดทุกช่วงการหมักกลับมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะลดลงเช่นเดียวกับการหมักแบบไม่ต่อเนื่องทั้งๆที่เราคาดหวังว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในช่วงหลังจากเปลี่ยน C/N จะมีค่าคงที่เท่ากับ 0.35 ต่อชั่วโมงตลอดทุกช่วงการหมัก ทั้งนี้ในช่วง 6 ชั่วโมงหลังจากกระบวนการหมักเซลล์มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ในระดับหนึ่ง (0.16-0.37 กรัมต่อลิตร)ซึ่งอาจเป็นผลให้อัตราการถ่ายโอนมวลของออกซิเจนเข้าสู่เซลล์มีค่าลดลงและในที่สุดก็ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ แต่อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าในช่วงเวลาประมาณหลังจาก 24 ชั่วโมงของการหมักอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าสูงขึ้นกว่าในช่วงหลังจากการเปลี่ยน C/N ทั้งนี้สาเหตุของการกระตุ้นการเจริญเติบโตยังไม่ปรากฏแน่ชัด



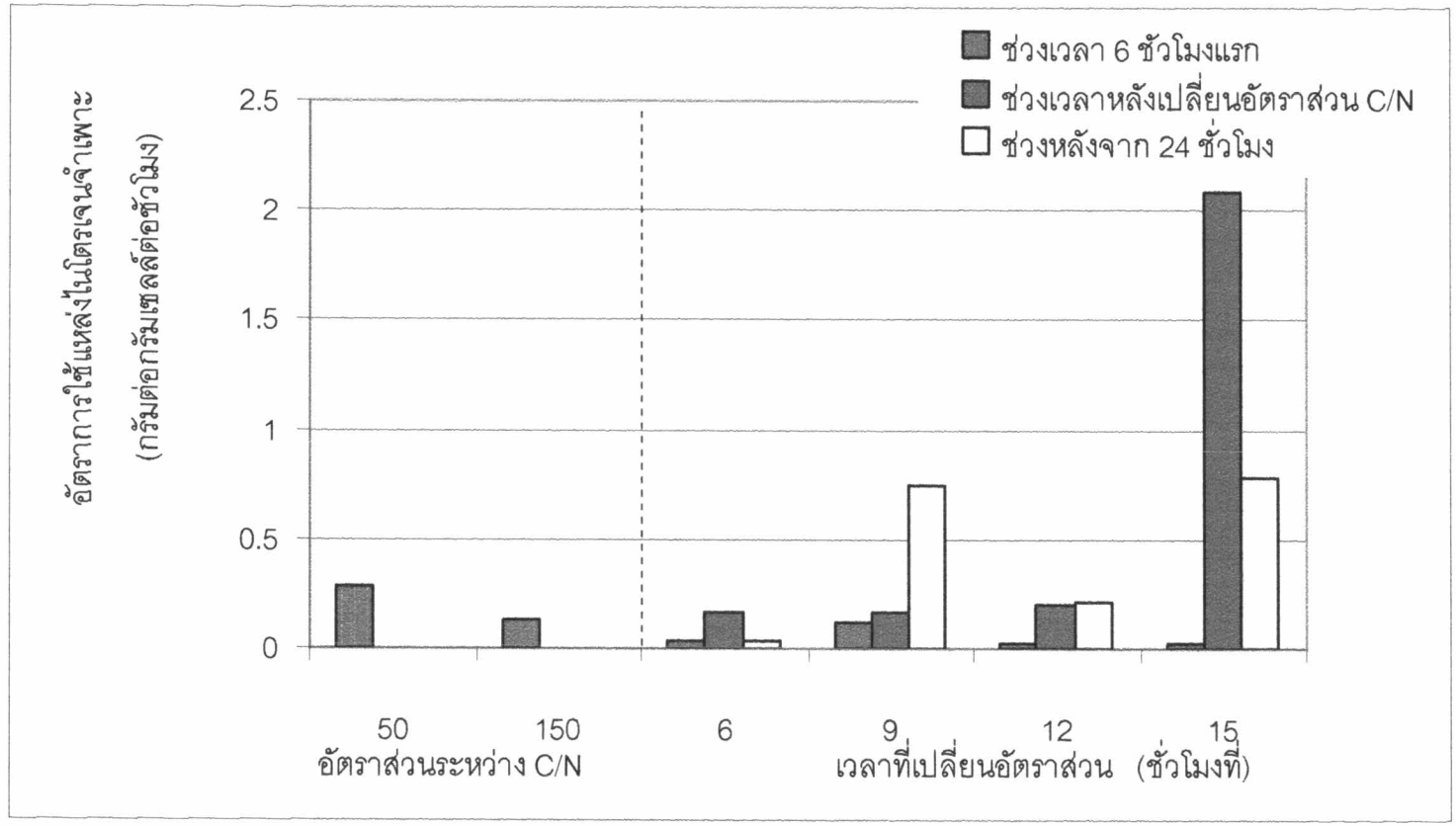
รูปที่ 5.15 การเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp. A41 ระหว่างกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง ที่อัตราส่วนระหว่าง C/N เท่ากับ 50 และ 150 และกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องที่เวลาในการเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง C/N ต่างๆ



รูปที่ 5.16 การเปรียบเทียบอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp. A41 ระหว่างกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง ที่อัตราส่วนระหว่าง C/N เท่ากับ 50 และ 150 และกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องที่เวลาในการเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง C/N ต่างๆ



รูปที่ 5.17 การเปรียบเทียบอัตราการใช้น้ำมันปาล์มดิบจำเพาะของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp. A41 ระหว่างกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง ที่อัตราส่วนระหว่าง C/N เท่ากับ 50 และ 150 และกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องที่เวลาในการเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง C/N ต่างๆ



รูปที่ 5.18 การเปรียบเทียบอัตราการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจำเพาะของจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp. A41 ระหว่างกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง ที่อัตราส่วนระหว่าง C/N เท่ากับ 50 และ 150 และกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องที่เวลาในการเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง C/N ต่างๆ

จากรูปที่ 5.16 แสดงอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะจากกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องในช่วงเวลาการหมักต่างๆกัน พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมงแรกของการเจริญเติบโต อัตราการผลิตจำเพาะนั้นมีค่าใกล้เคียงกันในแต่ละการทดลองโดยมีค่าเฉลี่ย และส้มประสิทธิ์ความคลาดเคลื่อนอยู่ที่ 0.089 กรัมต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมงและ 6.93 เปอร์เซ็นต์ แต่หลังจากการเปลี่ยนอัตราส่วน C/N แล้วพบว่าอัตราการผลิตจำเพาะลดลงถึง 1125 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ได้ในรูปที่ 5.15 แล้วพบว่ามีความสอดคล้องกัน เนื่องจากการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41 นั้นเป็นแบบผสมหรือ mixed growth associated product ซึ่งเมื่อพิจารณาสมการของการเกิดผลิตภัณฑ์ดังสมการ (5.2.1-1)

$$\frac{dP}{dt} = \alpha\mu x + \beta x \qquad (5.2.1\text{-}1)$$

ดังนั้นเราจะได้สมการอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์จำเพาะ

$$\frac{1}{x}\frac{dP}{dt} = \alpha\mu + \beta \qquad (5.2.1\text{-}2)$$

เมื่อ P = ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)

t = เวลา(ชั่วโมง)

α = ค่าคงที่

β = ค่าคงที่

μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

x = ความเข้มข้นเซลล์จุลินทรีย์ (กรัมต่อลิตร)

จากสมการ (5.2.1-2) จะเห็นได้ว่าอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์จำเพาะมีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์ ดังนั้นการที่อัตราการผลิตจำเพาะในช่วงหลังจากเปลี่ยน C/N ต่ำลงนั้นน่าจะมีผลมาจากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ลดลงนั่นเอง แต่จะสังเกตได้อีกอย่างหนึ่งว่าอัตราการผลิตจำเพาะในช่วงประมาณ 24 ชั่วโมงของการหมักนั้นมีค่าลดลงแต่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์ในช่วงนี้มีค่าสูงขึ้น ซึ่งในความเป็นจริงอัตราการผลิตจำเพาะน่าจะสูงขึ้นเช่นเดียวกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอัตราการผลิตจำเพาะในช่วงนี้มีผลกระทบอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องมากขึ้น (ค่า β ในสมการ (5.2.1-2))จึงทำให้อัตราการผลิตจำเพาะลดลง

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นจะเห็นได้ว่าในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการเจริญเติบโตในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องนั้นจะได้ทั้งอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการผลิตจำเพาะที่มีค่าใกล้เคียงกันในแต่ละการทดลองและใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่องที่ C/N เท่ากับ 50 แต่ในช่วงหลังจากการเจริญเติบโตในระยะทวีคูณใน 6 ชั่วโมงแรก ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการผลิตจำเพาะลดลงอย่างเห็นได้ชัดทั้งที่อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะเพิ่มขึ้นดังแสดงในรูป 5.17 และ 5.18 ค่าต่างๆเหล่านี้จะลดลง ดังนั้นจึงส่งผลให้ผลได้ของเซลล์และผลิตภัณฑ์จากสารตั้งต้นลดลงด้วยเช่นกัน ดังจะเห็นได้จากการทดลองเปลี่ยนอัตราส่วน C/N ที่เวลา 9 ชั่วโมง พบว่า ผลได้ของเซลล์ต่อแหล่งคาร์บอนในช่วง 6 ชั่วโมงแรก ช่วง 3 ชั่วโมงหลังจากการเปลี่ยน C/N และช่วงประมาณ ชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก มีค่า 0.61, 0.03 และ 0.008 กรัมต่อกรัมน้ำมันปาล์มดิบ ผลได้ของเซลล์ต่อแหล่งไนโตรเจน ทั้ง3 ช่วงมีค่า 7.44, 0.10 และ 0.097 กรัมต่อกรัมแอมโมเนียมซัลเฟตตามลำดับ และผลได้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ช่วง มีค่า 0.14, 0.05 และ 0.002 กรัมต่อกรัมน้ำมันปาล์มดิบตามลำดับ

5.2.2 <u>ผลของเวลาในการเปลี่ยนอัตราส่วนของ C/N ต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ</u>

จากรูปที่ 5.15 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแต่ละการทดลองนั้นพบว่าที่เวลาในการเปลี่ยนอัตราส่วน C/N ต่างๆกันจะให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในช่วงหลังจากการเปลี่ยน C/N ต่างกัน โดยจะมีค่าสัมประสิทธิ์ความคลาดเคลื่อน 66 เปอร์เซ็นต์ และจะเห็นว่ามีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่ C/N เท่ากับ 50 นานขึ้นด้วย ซึ่งเมื่อพิจารณาที่เวลาการหมักประมาณ 24 ชั่วโมงจะพบว่า เมื่อเราเปลี่ยน C/N ที่เวลา 12 ชั่วโมงจะทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดที่ 0.10 ต่อชั่วโมง แต่เมื่อพิจารณารูปที่ 5.16 ซึ่งแสดงอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะแม้จะพบว่าหลังจากเปลี่ยนอัตราส่วน C/N แล้ว อัตราการผลิตจำเพาะจะมีความแตกต่างกันถึง 82.58 เปอร์เซ็นต์ แต่แนวโน้มจะลดลงเมื่อเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่ C/N 50 นานขึ้น โดยพบว่าการเปลี่ยน C/N ที่เวลา 6 ชั่วโมงจะให้อัตราการผลิตสูงที่สุดที่ 0.55 กรัมต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งสาเหตุของความแตกต่างนี้น่าจะเกิดจากการที่จุลินทรีย์มีอายุที่แตกต่างกันและสภาวะแวดล้อมของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันเมื่อทำการเปลี่ยนอัตราส่วน C/N ซึ่งสภาวะแวดล้อมที่กล่าวถึงนี้อาจหมายถึงปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น หรืออาจมีสารอื่นๆที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นอีก ซึ่งน่าจะมีการศึกษาต่อไป

5.2.3 การเปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องและกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

จากการเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องและกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง สามารถแสดงอัตราการผลิตเซลล์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดังตารางที่ 5.3

ตารางที่ 5.3 อัตราการผลิตเซลล์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องและกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

	หมักแบบไม่ต่อเนื่อง		หมักแบบกึ่งต่อเนื่อง			
	C/N 50	C/N 150	ชั่วโมงที่ 6*	ชั่วโมงที่ 9*	ชั่วโมงที่ 12*	ชั่วโมงที่ 15*
อัตราการเจริญผลิตเซลล์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.07	0.06	0.13	0.13	0.19	0.14
อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04

หมายเหตุ คิดที่เวลาสุดท้ายของการหมัก

* หมายถึงเวลาในการหมักที่มีการเปลี่ยนค่า C/N จาก 50 เป็น 150

จากตารางจะเห็นได้ว่ากระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องจะให้อัตราการผลิตเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยเฉลี่ยแล้วสูงกว่ากระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องถึง 126.92 เปอร์เซ็นต์ และให้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงกว่าการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง 25 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลาในการเปลี่ยนอัตราส่วน C/N ต่างกันนั้นจะให้อัตราการผลิตเซลล์ต่างกัน 19.47 เปอร์เซ็นต์โดยพบว่าเมื่อเปลี่ยนอัตราส่วน C/N ที่ 12 ชั่วโมงจะให้อัตราการผลิตเซลล์สูงที่สุด 0.19 กรัมเซลล์ต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นนั้นจะพบว่ามีค่าใกล้เคียงกันในแต่ละการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่องโดยพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความคลาดเคลื่อน 13.33 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าเมื่อเปลี่ยนอัตราส่วน C/N ที่เวลา 12 ชั่วโมงจะให้อัตราการผลิตต่ำที่สุด คือ 0.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่เวลาอื่นที่เปลี่ยน C/N จะให้ผลเท่ากัน ซึ่งจากงานวิจัยของ Lee และคณะ (1998) ที่ได้เพาะเลี้ยง *Pseudomonas areuginosa* YPJ-80 ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องด้วยการควบคุมแบบ pH-

stat โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าได้อัตราการเจริญเติบโต 0.05 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าต่ำกว่างานวิจัยนี้ถึง 280 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้ 0.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากงานวิจัยนี้ และเนื่องจากงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเดิมงานวิจัยของ ณรงค์ (2543) ที่ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 โดยกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องพบว่ามีอัตราการเจริญเติบโต 0.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอยู่ที่ 0.1 มิลลินิวตันต่อเมตรต่อชั่วโมง โดยเมื่อนำกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องมาใช้เราพบว่าให้อัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นถึง 137.5 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตคิดเทียบในหน่วยมิลลินิวตันต่อเมตรต่อชั่วโมงพบว่ากระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องมีอัตราการผลิตเฉลี่ยแล้วอยู่ที่ 0.67 มิลลินิวตันต่อเมตรต่อชั่วโมง ซึ่งมากกว่าเดิม 570 เปอร์เซ็นต์

5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ กับสารลดแรงตึงผิวที่กองทัพเรือใช้ในปัจจุบัน (% Effectiveness)

เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ไปใช้ประโยชน์จริงกับคราบน้ำมันที่ตกค้างในอับเฉาเรือของเรือที่ทางกองทัพเรือใช้ ดังนั้นจึงมีการทดสอบประสิทธิภาพ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทางกองทัพเรือใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยการทดสอบประสิทธิภาพหรือ Effectiveness นี้เป็นการทดสอบความสามารถของสารลดแรงตึงผิวที่สามารถทำให้น้ำมันกระจายตัวไปอยู่ในน้ำมากน้อยเท่าไหร่ซึ่งเป็นวิธีที่ทางกองควบคุมมลพิษทางทะเลใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยทำการเจือจางสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเท่ากัน แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับน้ำมันดิบที่ได้มาจากกองทัพเรือ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตร แล้วนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค.4) ที่ทำขึ้น จะได้ผลดังตาราง

ตารางที่ 5.4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวที่กองทัพเรือใช้

ชนิดของสารลดแรงตึงผิว	มวลของน้ำมันที่ใช้ทดสอบ (กรัม)	มวลของน้ำมันที่กระจายในน้ำ (กรัม)	Effectiveness (%)
สารลดแรงตึงผิวที่กองทัพเรือใช้	4.800	0.110	2.294
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้	4.800	0.119	2.470

จากตารางที่ 5.4 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวที่กองทัพเรือใช้พบว่า จากมวลของน้ำมันที่ใช้ทดสอบมีปริมาณเท่ากัน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะทำให้มวลของน้ำมันกระจายตัวในน้ำมากกว่าสารลดแรงตึงผิวที่กองทัพเรือใช้เท่ากับ 7.56 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพ (Effectiveness) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จะมีประสิทธิภาพ เท่ากับ 2.47 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าสารลดแรงตึงผิวที่กองทัพเรือใช้ในปัจจุบัน 7.13 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยทั่วๆไปแล้วนั้น ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวที่ได้ นี้ถือว่าอยู่ในระดับต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้มีเพียง 1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น