KKU Res. J. 2012; 17(2):227-235
http : resjournal.kku.ac.th

การหมักน้ำอ้อยแบบกะเพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ชนิดพีเอชเอ

Batch fermentation of sugar cane juice for producing biopolymer of PHAs

สามารถ มูลอามาตย์ (Samart Moonamart)[1], ผกาวดี แก้วกันเนตร (Pakawadee Kaewkannetra)[1], วรัญญา สุวรรณสิงห์ (Waranya Suwannasing)[2]*

[1]ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
[2]บัณฑิตศึกษา (ปริญาโท) บัณฑิตมหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
**Correspondent author : paknar@kku.ac.th.*

Received August 17,2010
Accepted March 20,2012

บทคัดย่อ

การประเมินศักยภาพการผลิตไบโอพอลิเมอร์ชนิดพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHAs) จากน้ำอ้อยคั้นโดยผ่านการหมักแบบกะด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ จากการศึกษาพบว่า ในน้ำอ้อยมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิด จากการนำจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์คือ *Alcaligenes latus* TISTR 1043 และ *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 มาเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรวมในน้ำอ้อย 20 กรัมต่อลิตร พบว่า *A. latus* มีอัตราการเจริญค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับการเจริญของ *A. eutrophus* ดังนั้นจึงได้เลือก *A. eutrophus* เพื่อใช้ในการผลิต PHAs จากน้ำอ้อย โดยแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลรวม 4 ระดับที่ 20, 30, 40, 50 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ที่มีอาหาร 100 มิลลิลิตร ควบคุมการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าpH 6.5-7 ปริมาณกล้าเชื้อ 10% พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้ได้เซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดเท่ากับ 6.013 และ 1.838 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาในการหมัก 60 ชั่วโมง คิดเป็นผลได้มวลเซลล์ (Biomass yield, $Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.163 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลรวมที่ถูกใช้ คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์ (Product yield, $Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.050 กรัม PHAs ต่อกรัมน้ำตาลรวมที่ถูกใช้ คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Specific product yield, $Y_{p/x}$) เท่ากับ 0.306 กรัม PHAs ต่อกรัมเซลล์แห้ง และคิดเป็นอัตราการผลิต (Productivity) เท่ากับ 0.031 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อขยายการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรทำงาน 2 ลิตร โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงจากระดับฟลาสก์ พบว่าที่เวลาหมัก 60 ชั่วโมงได้ปริมาณเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดเท่ากับ 5.881 และ 1.281 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้มวลเซลล์ ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.19 ผลได้ผลิตภัณฑ์ ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.041 ผลได้ผลิตภัณฑ์จำเพาะ ($Y_{p/x}$) เท่ากับ 0.218 และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.021 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยที่ค่าผลได้ผลิตภัณฑ์และผลิตภัณฑ์จำเพาะ ($Y_{p/s}$,$Y_{p/x}$) ในฟลาสก์และถังหมัก ประมาณ 5%, 4% และ 31 %, 22% ตามลำดับ

Abstract

Potential of sugar cane juice for producing biopolymer of polyhydroxyalkanoates (PHAs) via batch fermentation by two pure bacterial strains of *Alcaligenes latus* TISTR 1403 and *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 is evaluated. The results revealed that sugar cane juice composed of several kinds of sugars. Then, the *A. latus* and the *A. eutrophus* were separately cultivated in the 100 mL medium containing 20 gL^{-1} total sugar under

controlled conditions of 30ºC, 200 rpm, pH 6.5-7 and with 10% inoculums size. It was found that the *A. eutrophus* grown better than the *A. latus*. Thus, the *A. eutrophus* was further cultivated in different initial total sugar concentrations (20, 30, 40 and 50 gL^{-1}) under controlled conditions (200 rpm, 30°C, pH 6.5-7 and 10% inoculums size). The optimal total sugar concentration of 50gL^{-1} was reached. The dry cell mass (DCM) and maximum PHAs were obtained at 6.013 gL^{-1} and 1.84 gL^{-1} after 60 hr fermentation converted to biomass yield ($Y_{x/s}$) and product yield ($Y_{p/s}$) of 0.163 and 0.050 $gL^{-1}h^{-1}$. Meanwhile, specific product yield ($Y_{p/x}$) and productivity were 0.306 and 0.031 $gL^{-1}h^{-1}$. To increase the PHAs production, 5 L fermentor (2 L working volume) was considered using the condition obtained from the flask scale. The DCM and the maximum PHAs were 5.881 $gL^{-1}$and 1.281 gL^{-1} calculated to values of $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, $Y_{p/x}$ and productivity at about 0.19, 0.041, 0.218 and 0.028 $gL^{-1}h^{-1}$, respectively.

คำสำคัญ : การหมักแบบกะ, น้ำอ้อยคั้น, ไบโอพอลิเมอร์

Keywords: Batch fermentation, Sugar cane juice, biopolymer

1. บทนำ

ปัจจุบันปัญหาการสะสมของขยะพลาสติกสังเคราะห์ซึ่งย่อยสลายได้ยากในสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น จึงมีการหาแนวทางเพื่อจัดการกับขยะพลาสติกเหล่านั้น เช่น การเรียกคืนบรรจุภัณฑ์ การแปรรูปและการใช้ซ้ำ รวมถึงการกระตุ้นให้ประชาชนได้รับรู้ปัญหาทางสิ่งแวดล้อม จึงทำให้เกิดการศึกษาวิจัยเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายได้และไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม (1) ซึ่งพลาสติกชีวภาพหลายชนิด เช่น กลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates: PHAs) และกลุ่มพอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid: PLA) เป็นต้น ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์

ไบโอพอลิเมอร์ PHAs จัดเป็นพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ในระยะ เวลาสั้น (6-12 เดือน) และมีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์พอลีโพรพิลีน (Polypropylene: PP) (2) จุลินทรีย์หลายชนิดในธรรมชาติสามารถสร้างและสะสม PHAs ไว้ภายในเซลล์ ในสภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินพอ แต่ขณะเดียวกันปริมาณสารชนิดอื่นมีอยู่อย่างจำกัด เช่น ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส เป็นต้น (3) ซึ่งในปัจจุบันการผลิต PHAs ในทางการค้ายังมีข้อจำกัดเนื่องจากต้นทุนการผลิตสูงจากราคาของวัตถุดิบที่นำมาผลิต การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก เช่น กากน้ำตาล หรือกากมันสำปะหลัง (4) อาจมีปัจจัยบางประการที่มีผลทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตภายใต้แหล่งอาหารนั้นๆได้หรือได้ผลผลิตน้อย เมื่อพิจารณาถึงแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกเพื่อเป็นแนวทางการผลิต PHAsในระดับอุตสาหกรรม ปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยในการใช้น้ำอ้อยเพื่อผลิตเอทานอล นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงปริมาณน้ำตาลและแง่ของราคามีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำอ้อยมาใช้ในการศึกษาเพื่อผลิต PHAs เนื่องจากในน้ำอ้อยมีปริมาณน้ำตาลเพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครส (Sucrose) ซึ่งพบในปริมาณมากที่สุด (5) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาศักยภาพในการนำน้ำอ้อยมาหมักโดยใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้นนอกเหนือไปจากน้ำตาลและเอทานอล ซึ่งอาจจะนำไปสู่การขยายผลเพื่อการผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีทำการทดลอง

2.1 วัตถุดิบและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

น้ำอ้อยคั้นสดที่ผ่านการหีบด้วยเครื่องบีบอัดจากกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากโรงงานน้ำตาลมิตรผล อำเภอภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ และจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ 2 สายพันธุ์ได้แก่ แบคทีเรีย *Alcaligenes latus* TISTR 1403 และ *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 สั่งซื้อมาจากศูนย์วิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(วว.) กรุงเทพมหานคร

2.2 การศึกษาองค์ประกอบในน้ำอ้อย

น้ำอ้อยคั้นจะนำมาเก็บรักษาไว้ที่ตู้แช่แข็งที่ควบคุมอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาคุณภาพต่างๆของน้ำอ้อยไม่ให้เปลี่ยนแปลง เมื่อจะนำมาทดลองต้องละลายน้ำแข็งก่อนโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 2 รอบ ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกกากตะกอนที่มีขนาดใหญ่ออก จากนั้นนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆในน้ำอ้อยตามวิธีมาตรฐานซึ่งได้แก่ ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริค (Phenol-sulfuric acid) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Soluble solid: Brix) โดยใช้แฮนด์รีแฟร็กโตมิเตอร์ (Hand refractometer) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) โดยใช้ pH meter ค่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี TKN (Total Kjeldahl Nitrogen) และชนิดของน้ำตาลต่างๆ ในน้ำอ้อยโดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำอ้อยคั้นในขวดเขย่า

2.3.1 การเตรียมกล้าจุลินทรีย์บริสุทธิ์

โดยการนำกล้าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. latus* และ *A. eutrophus* มาเพาะเลี้ยงในอาหารสมบูรณ์ (Nutrient broth: NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นนำเชื้อ 10 มิลลิลิตรใส่ในอาหาร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงให้ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเท่าเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อต่อไป (6)

2.3.2 การศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ *A. latus* และ *A. eutrophus* ในน้ำอ้อย

นำปริมาณกล้าเชื้อ *A. latus* และ *A. eutrophus* มาอย่างละ 10 มิลลิลิตร (Inoculums size 10%) ถ่ายลงในอาหารสูตรเกลือแร่หรืออาหารหลักปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร เลี้ยงให้เจริญในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า โดยควบคุมความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2-3 วัน (6)

2.4 การศึกษาปริมาณน้ำตาลรวมที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์เพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs

โดยการแปรผันปริมาณน้ำตาลรวมในน้ำอ้อยออกเป็น 4 ระดับตามที่ออกแบบการทดลองไว้ที่ 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เพื่อผสมในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ในฟลาสก์ที่มีอาหาร 100 มิลลิลิตร ที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6.5-7 ปริมาณกล้าเชื้อ 10% เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงจากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด การเจริญและน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ การเก็บเกี่ยวและการวัดปริมาณ PHAs

2.5 การผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs จากการหมักน้ำอ้อยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

โดยนำสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในฟลาสก์เขย่ามาใช้ผลิต PHAs ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (ที่มีปริมาตรทำงาน 2 ลิตร) อัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ค่าpH 6.5-7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2 vvm เพื่อควบคุมค่าความเข้มข้นออกซิเจนในน้ำหมักให้คงที่ที่ 30 %

2.6 การเก็บเกี่ยวไบโอพอลิเมอร์ PHAs ที่สร้างและสะสมอยู่ภายในเซลล์จุลินทรีย์

จะใช้วิธีการสกัดใน Soxhlet โดยการนำเซลล์แห้งของ *A. eutrophus* ที่ได้หลังการหมัก มาเติมด้วยโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ อัตราส่วน1 กรัมต่อ10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเซลล์จุลินทรีย์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และนำเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้ไปสกัดโดยคลอโรฟอร์มใน Soxhlet ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปตกตะกอนในเมทานอลเย็นและนำไประเหยใน Vacuum ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ผงสีขาวของ PHAs แล้วทิ้งไว้ให้น้ำหนักคงที่ใน Desiccators (7, 8) แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไบโอพอลิเมอร์ PHAs โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร ตามวิธีของ Hahn และคณะ (9)

3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

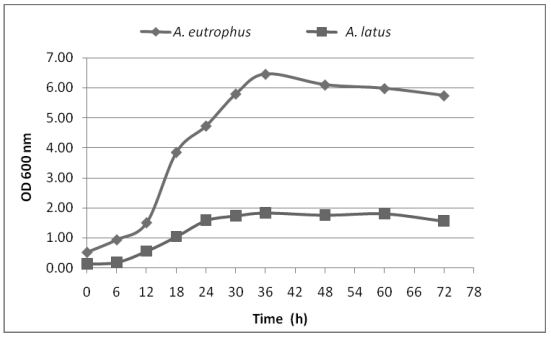
3.1 องค์ประกอบต่างๆ ในน้ำอ้อย

พบว่าในน้ำอ้อยประกอบด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ 87.34% ของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ 11.6% ที่เหลือเป็นเยื่อ 1.06% โดยที่ปริมาณของแข็งที่ละลายได้นั้นเป็นการประมาณค่าของน้ำตาลที่ละลายได้ เนื่องจากในน้ำอ้อยมีองค์ประกอบของน้ำตาลละลายอยู่เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งพบว่าในน้ำอ้อยมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ เท่ากับ 11.6 บริกซ์ หรือ 116 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 105.5 กรัมต่อลิตร หรือ 90.9% ที่เหลือเป็นไนโตรเจน 1.2% และสารอื่นๆที่ไม่ใช่น้ำตาลอีก 7.9% และค่า pH ประมาณ 3.4 ซึ่งมีความเป็นกรดสูงไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ *A. latus* เนื่องจากจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีในสูตรอาหารที่มีช่วงของค่า pH 6.5-7 (4,5) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องปรับค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการหมัก

3.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำอ้อยแบบกะในขวดเขย่า

3.2.1 ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้จุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ในน้ำอ้อย

จากการติดตามการเจริญของจุลินทรีย์โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (รูปที่ 1) พบว่า อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดโดยจุลินทรีย์ *A. latus* มีอัตราการเจริญค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับการเจริญของจุลินทรีย์ *A. eutrophus* ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้จุลินทรีย์ *A. eutrophus* ในการหมักน้ำอ้อยเพื่อผลิต PHAs ต่อไป

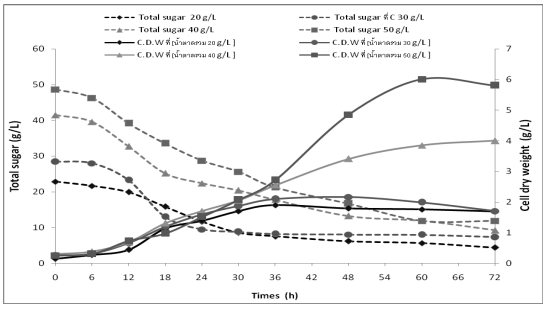


รูปที่ 1 เปรียบเทียบการเจริญโดยวิธีวัดค่าความขุ่น (OD 600) ของจุลินทรีย์ *A. latus* TISTR 1043 และ *A. eutrophus* TISTR 1095 ในน้ำอ้อย 20 กรัมต่อลิตร

3.2.2 ผลการแปรผันปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดในน้ำอ้อยเพื่อผลิต PHAs ในขวดเขย่า

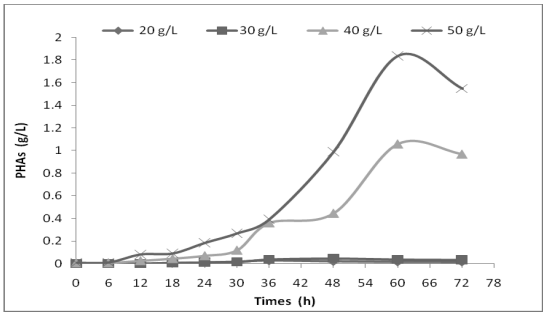
จากรูปที่ 2 เมื่อมีการแปรผันปริมาณน้ำตาลรวมของน้ำอ้อยเป็น 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าที่เวลา 0-36 ชั่วโมง การเจริญของจุลินทรีย์จะใกล้เคียงกันในทุกๆความเข้มข้นของน้ำตาลรวม หลังจาก 36 ชั่วโมง จึงพบความแตกต่างของการเจริญจุลินทรีย์ โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร มีการเจริญสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.899 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นค่าจึงเริ่มคงที่จนถึงเวลาการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรวม 30 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญของจุลินทรีย์มีลักษณะใกล้เคียงกับที่สภาวะน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลรวมที่ 40 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญของจุลินทรีย์มีค่าสูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง และมีค่ามากกว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลรวมที่ 20 และ 30 กรัมต่อลิตร อย่างเห็นได้ชัด โดยได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดคือ 3.999 กรัมต่อลิตร และที่ความเข้มข้นน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเป็นสภาวะที่ดีสุดต่อการเพาะเลี้ยง โดยพบว่าหลังจาก 36 ชั่วโมง อัตราการเจริญจะเร็วมากและมีค่าสูงสุดที่เวลา 60 ชั่วโมง และคงที่ไปจนกระทั่ง 72 ชั่วโมง ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเท่ากับ 6.013 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์พบว่ามีความสอดคล้องกับอัตราการเจริญ สังเกตได้จากความชันของกราฟในช่วงเวลา 0-36 ชั่วโมง อัตราการลด

ลงของน้ำตาลมีค่าใกล้เคียงกันทุกๆ ความเข้มข้น แต่หลังชั่วโมงที่ 36 การลดลงของน้ำตาลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 40 และ 50 กรัมต่อลิตร มีค่ามากขึ้นตามลำดับ โดยพบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมที่เวลาสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีค่า 4.39, 7.28, 9.19 และ 11.86 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตรตามลำดับ



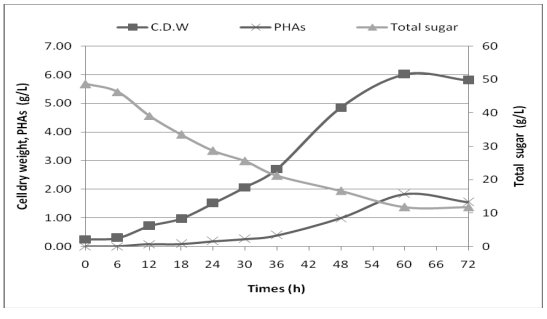
รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดและน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์ระหว่างการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่การเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.2.3 ปริมาณไบโอพอลิเมอร์ (PHAs)



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงการผลิตไบโอพอลิเมอร์ ระหว่างการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกัน ที่การเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ในรูปที่ 3 พบว่าปริมาณ PHAs ซึ่งสะสมอยู่ภายในเซลล์ ภายหลังสิ้นสุดเวลาการหมักแบบกะที่ 72 ชั่วโมง สอดคล้องกับการเจริญ (ดังรูปที่ 2) เนื่องจากความเข้มข้นของเซลล์ค่อนข้างต่ำที่ความเข้มข้นน้ำตาล 20, 30 กรัมต่อลิตร ดังนั้นค่า PHAs ที่ได้จึงค่อนข้างต่ำ คือ 0.027 และ 0.048 ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นน้ำตาล 40, 50 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHAs มีค่าสูงขึ้นอย่างชัดเจน โดยมีค่า 1.058 และ 1.838 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนในรูปที่ 4 เป็นกราฟความสัมพันธ์การเจริญการผลิตPHAs ของจุลินทรีย์ และการลดลงของน้ำตาล สำหรับการเพาะเลี้ยงที่สภาวะน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสภาวะที่ดีที่สุด จะเห็นได้ว่าการเจริญและการผลิต PHAs ของจุลินทรีย์มีลักษณะไปด้วยกันและสอดคล้องกับการลดลงของน้ำตาล



รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs ระหว่างการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อผลิต PHAs ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่างๆ กันสามารถสรุปประสิทธิภาพการผลิตในแง่ของผลได้ (yield) และอัตราการผลิต (productivity) ได้ดังตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าที่เวลาการเพาะเลี้ยง 60 ชั่วโมง ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร มีค่าผลได้และอัตราการผลิตสูงสุด ไม่ว่าจะพิจารณาในแง่ผลได้ชีวมวล (biomass yield:$Y_{x/s}$) ผลได้ PHAs (product yield: $Y_{p/s}$) หรือผลได้ PHAs จำเพาะ (specific product yield: $Y_{p/x}$)

ตารางที่ 2 ปริมาณผลได้และผลผลิตที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลรวมแตกต่าง

ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมด (g/L)	Biomass (g/L)	PHAs (g/L)	Biomass yield, $Y_{x/s}$	Product yield, $Y_{p/s}$	Specific product yield, $Y_{p/x}$	Productivity (g/Lh)
20	1.899	0.027	0.124	0.002	0.015	0.001
30	2.161	0.048	0.107	0.002	0.022	0.001
40	3.999	0.968	0.124	0.023	0.186	0.013
50	6.013	1.838	0.163	0.050	0.306	0.031

ตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการผลิตในแง่ผลได้และอัตราการผลิตที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร โดยคิดเฉพาะที่ 60 ชั่วโมงเท่านั้น เพื่อให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้นจึงวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าผลได้และอัตราการผลิตสำหรับที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร โดยคิดเปรียบเทียบที่เวลาการเพาะเลี้ยงตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงที่เวลาสุดท้ายคือ 72 ชั่วโมง ผลการเปรียบเทียบสรุปได้ในตารางที่ 4 ซึ่งที่เวลา 60 ชั่วโมง ให้ค่าผลได้และอัตราการผลิตสูงสุดเทียบกับที่เวลาอื่นๆ

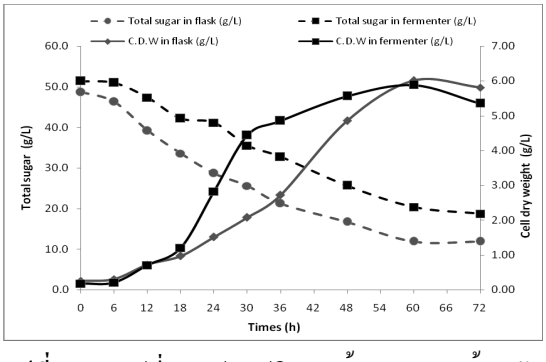
ตารางที่ 3 ปริมาณผลได้ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยของความเข้มข้นน้ำตาลรวม 50 g/L ที่เวลาต่างๆ

เวลา hr	C.D.W (g/L)	PHAs (g/L)	Total sugar (g/L)	Biomass yield, $Y_{x/s}$	Product yield, $Y_{p/s}$	Specific product yield, $Y_{p/x}$	Productivity (g/Lh)
0	0.253	0.009	48.66	-	-	-	-
6	0.304	0.012	46.28	0.128	0.005	0.038	0.002
12	0.723	0.083	39.16	0.076	0.009	0.115	0.007
18	0.970	0.092	33.55	0.064	0.006	0.095	0.005
24	1.514	0.185	28.68	0.076	0.009	0.122	0.008
30	2.073	0.269	25.57	0.090	0.012	0.130	0.009
36	2.715	0.393	21.24	0.099	0.014	0.145	0.011
48	4.852	0.991	16.67	0.152	0.031	0.204	0.021
60	6.013	1.838	11.86	0.163	0.050	0.306	0.031
72	5.807	1.548	11.86	0.158	0.042	0.267	0.022

3.3 ผลการศึกษาการผลิต PHAs ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

รูปที่ 5 กระบวนการหมักน้ำอ้อยโดย *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมด 50 กรัม/ลิตร

จากสภาวะที่เหมาะสมการผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ได้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุด จึงใช้ค่าความเข้มข้นน้ำตาลนี้ เพื่อขยายการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (ปริมาตรอาหารในถังหมัก 2 ลิตร) ดังรูปที่ 5 โดยควบคุมอัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที pH 6.5-7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2 vvm โดยปรับให้เครื่องทำงานอัตโนมัติ เพื่อควบคุมค่าความเข้มข้นออกซิเจน (pO_2) ในน้ำหมักให้มีค่าคงที่ที่ 30 % ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล และน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ ในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง *A.eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมด 50 gL^{-1} ในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพและในขวดเขย่า

รูปที่ 6 เป็นการเปรียบเทียบผลจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักและในขวดเขย่า พบว่า การลดลงของน้ำตาลมีลักษณะคล้ายกัน แต่ในขวดเขย่ามีการใช้น้ำตาลไปมากกว่า เนื่องจากความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือมีค่าต่ำกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงถังหมัก ในขณะที่ความเข้มข้นเซลล์สุดท้ายที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน (ที่เวลา 60-72 ชั่วโมง) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาที่เวลา18-60 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วง growth phase จะเห็นว่าอัตราการเจริญของเซลล์ในถังหมักมีค่ามากกว่าในขวดเขย่า ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสภาวะแวดล้อมในถังหมักเอื้อต่อการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์ได้มากกว่า เพราะในถังหมักมีการใช้ใบกวนทำให้สารมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) ได้ดีและเกิดลักษณะการเคลื่อนที่ของของไหลแบบปั่นป่วน (turbulent flow) ส่งผลดีในแง่การถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) ไม่ว่าจะเป็นสารอาหารหรือออกซิเจน และในช่วงท้าย (60 -72 ชั่วโมง) ที่อัตราการเจริญในถังหมักไม่ได้แตกต่างไปจากในขวดเขย่านั้น อาจเป็นเพราะเป็นช่วงที่ความเข้มข้นน้ำตาลเหลือน้อย ซึ่งไม่ส่งผลเท่าที่ควรต่อปัจจัยที่เกี่ยวกับการถ่ายเทมวลสาร นอกจากนี้ช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่เซลล์ปรับสภาพเข้าสู่สภาวะคงที่แล้ว(Stationary phase) ดังนั้นเมตาบอลิซึมภายในเซลล์จึงไม่แตกต่างกันมากนัก และตารางที่ 4 เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHAs ในแง่ของผลได้และอัตราการผลิต PHAs ที่เวลาการเพาะเลี้ยงต่างๆ ซึ่งพบว่า ผลได้ชีวมวลและอัตราการผลิต PHAs ในช่วงเวลา 48-60 ชั่วโมง มีค่าใกล้เคียงกัน โดยที่ 60 ชั่วโมง มีค่าสูงสุด

ตารางที่ 4 ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ (Biomass) และปริมาณไบโอพอลิเมอร์ (PHAs) ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา hr	C.D.W (g/L)	PHAs (g/L)	Total sugar (g/L)	Biomass yield, $Y_{x/s}$	Product yield, $Y_{p/s}$	Specific product yield, $Y_{p/x}$	Productivity (g/Lh)
0	0.176	0.007	51.35	-	-	-	-
6	0.206	0.009	50.94	0.502	0.022	0.044	0.002
12	0.706	0.079	47.32	0.175	0.020	0.112	0.007
18	1.206	0.101	42.15	0.131	0.011	0.084	0.006
24	2.823	0.390	41.10	0.275	0.038	0.138	0.016
30	4.440	0.861	35.47	0.280	0.054	0.194	0.029
36	4.852	1.017	32.70	0.260	0.055	0.210	0.028
42	5.263	1.038	30.56	0.253	0.050	0.197	0.025
48	5.557	1.128	25.67	0.216	0.044	0.203	0.024
54	5.616	1.217	21.06	0.185	0.040	0.217	0.023
60	5.881	1.281	20.36	0.190	0.041	0.218	0.021
66	5.734	1.252	19.57	0.180	0.039	0.218	0.019
72	5.351	1.087	18.69	0.164	0.033	0.203	0.015

4. สรุปผลการทดลอง

น้ำอ้อยมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำและของแข็งที่สามารถละลายได้รวมทั้งส่วนที่เป็นเยื่อ นอกจากนี้ในน้ำอ้อยยังประกอบไปด้วยน้ำตาลหลายชนิดและประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนใหญ่ พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรวมที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ *A. eutrophus* TISTR 1095 เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้เซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุด โดยใช้เวลาในการหมักทั้งสิ้น 60 ชั่วโมง คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์ (Product yield, $Y_{p/s}$) และผลได้ผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Specific product yield, $Y_{p/x}$) ทั้งในระดับ ฟลาสก์และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเท่ากับ 5%, 4% และ 31 %, 22% ตามลำดับ

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยหลักจากทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2552 (เพิ่มเติม) และทุนสนับสนุนบางส่วนจากโครงการวิจัยพื้นฐานเชิงยุทธศาสตร์ (Strategic Basic Research) สำนักงานกองทุนสนับสนุนวิจัย (สกว) ประจำปีงบประมาณ 2553 สัญญาทุนเลขที่ DBG-5380013 (ผศ.ดร.ผกาวดี แก้วกันเนตร)

6. เอกสารอ้างอิง

(1) Slepecky R. A., Law J. H. (1960). **Synthesis and degradation of poly- β-hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium***. J Bacteriol: 82:37-42

(2) Anderson, A.J., Dawes, E.A., (1990). **Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacteria polyhydroxyalkanoates**. Microbiol. Rev. 54, 450 - 472.Steinbuchel A, Valentin HE. FEMS Microbiol Lett 1995; 128:219-28.

(3) Byrom, D. (1987) **Polymer synthesis by microorganism: Technology and economics trend**. , Biotechno. vol.5, pp. 246-250.

(4) Khanna, S., Srivastrava, A. K. (2005). **Statistical media optimization studies for growth and PHB production *by Ralstonia eutropha***. Process Biochem. 40: 2173-2182.

(5) Grothe, E., Moo-Young, M., Chisti, Y. (1999). **Fermentation optimization for the production of poly (-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic**. Enz. and Microb. Technol. 25:132-141.

(6) Kaewkannetra, P., Tanonkeo, P., Tanamool, V. and Imai, T. (2008) Biorefinery of squeeze sorghum juice into value added product of biopolymer, J. Biotechnol.136:S402.

(7) Ramsay, J. A., Berger, E. Ramsay, B. A., Chavarie, C. (1987). **Recovery of poly- β-hydroxy butyric acid granules by hypochlorite treatment**. Biotechnol. Tech. 4:221-226.

(8) Berger, E. Ramsay, B. A., Ramsay, J. A., Chavarie, C., Braunegg, G. (1989). **PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass**. Biotechnol Tech. 3:227-232.

(9) Hahn, S.K., Chang, Y.K., Lee, S.Y. (1995). **Recovery and characterization of poly (3- β hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and *Escherichia coli***. Applied and envi.microb. 60: 34-39.