บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ศึกษาคุณลักษณะและการผลิตกรดโดยการหมักแบบไร้อากาศ

ผลจากการศึกษาคุณลักษณะของน้ำเสียจากโรงงาน 3 โรงงาน ได้แก่ โรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้น, โรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์ และโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการหมักแบบไร้อากาศ ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่าน้ำเสียก่อนเข้าระบบบำบัดแบบ UASB ของโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้น มีพีเอชเริ่มต้น 2.43 ซึ่งมีค่าค่อนข้างเป็นกรดมาก เนื่องจากมีการเติมกรดซัลฟูริกในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำยางข้น ขณะที่น้ำเสียปรับสภาพก่อนเข้าระบบบำบัดแบบ UASB หลังจากมีการกรองของแข็งออกแล้วของโรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์ มีพีเอชเท่ากับ 6.27 ซึ่งค่อนข้างเป็นกลาง และน้ำเสียที่ออกจากบ่อที่ผ่านการหมัก (ACID TANK) ก่อนเข้าระบบบำบัดแบบ UASB ของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง มีค่า 5.41 ซึ่งมีค่าค่อนข้างเป็นกรดเนื่องจากผ่านการหมักแบบไร้อากาศมาแล้ว และมีปริมาณกรดระเหยง่าย (VA) สูง เมื่อนำน้ำเสียทั้ง 3 โรงงานมาทำการหมักแบบไร้อากาศและปรับพีเอชเริ่มต้นให้ได้ 5.5 เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มสร้างมีเทนและส่งเสริมจุลินทรีย์กลุ่มสร้างกรด แต่ผลการทดลองพบว่า หลังจากการหมักเป็นระยะเวลา 2 วัน พีเอชอยู่ในช่วง 7.2 -7.3 เนื่องจากในระหว่างการหมัก ทำให้น้ำเสียมีความเป็น alkalinity เพิ่มขึ้น ทำให้ pH ของน้ำเสียเปลี่ยนแปลงไปเป็นกลาง ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมของการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มสร้างมีเทน ซึ่งจะมีการใช้ VA ในน้ำเสียหลังจากการหมักเพื่อเปลี่ยนไปเป็นก๊าซมีเทน ทำให้ VA หลังการหมักจึงลดลง โดยพบว่า VA ของน้ำเสียจากโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้น, โรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์และโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งที่ไม่ผ่านการหมักมีค่าเท่ากับ 1049, 10.3 และ 1503 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าน้ำเสียที่ผ่านการหมัก มีค่า VA เท่ากับ 37.7, 13.7 และ 24.0 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ อาจเป็นเพราะการทดลองยังไม่ได้มีการปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างกรดจึงได้ VA ที่ต่ำ ซึ่งผลการทดลองแตกต่างจากการทดลองของ Yu (2001) ที่ใช้น้ำเสียที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบทำการหมักแบบไร้อากาศสามารถผลิตกรดได้เท่ากับ 4000 มก.ต่อลิตร โดยน้ำเสียจากโรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์และโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง มีสัดส่วนของกรดอะซิติกมากกว่ากรดชนิดอื่นๆ รองลงมาคือกรดโพรพิโอนิกและกรดบิวทิริก ตามลำดับ ขณะที่โรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้นมีปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด รองลงมาคือกรดอะซิติกและกรดบิวทิริก ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่า COD ของน้ำเสียจากโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้น, โรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์และโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งที่ไม่ผ่านการหมักมีค่าเท่ากับ 3523, 3618 และ 85,100 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าน้ำเสียที่ผ่านการหมัก มีค่า COD เท่ากับ 2853, 2068 และ 80,850 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ เนื่องจากจุลินทรีย์มีการนำสารอาหารจากน้ำเสียไปใช้ในการผลิตก๊าซมีเทนระหว่างกระบวนการหมัก เช่นเดียวกับค่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของตัวอย่างน้ำเสียที่ผ่านการหมักจากทั้ง 3 โรงงานจะมีค่าลดลงเนื่องจากในกระบวนการหมักเชื้อจุลินทรีย์จะมีการใช้สารอาหารคือไนโตรเจนในการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยไนโตรเจนของน้ำเสียจากโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้น, โรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์ และโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งที่ไม่ผ่านการหมักมีค่าเท่ากับ 338, 452 และ 507 มก.ต่อลิตร และเมื่อผ่านการหมักเท่ากับ 246, 234 และ 236 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ค่า TOC พบว่าเป็นไปในทำนองเดียวกันกับค่า COD นั่นคือ โรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้นเริ่มต้นมีค่า TOC เท่ากับ 1174 มก.ต่อลิตร หลังจากการหมักค่า TOC จะมีค่าลดลงเหลือ 951 มก.ต่อลิตร โรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์เริ่มต้นมีค่า TOC เท่ากับ 1206 มก.ต่อลิตร หลังจากการหมักค่า TOC ลดลงเป็น 689 มก.ต่อลิตร ส่วนโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งเริ่มต้นมีค่า TOC เท่ากับ 28,367 มก.ต่อลิตร หลังจากการหมักมีค่า TOC ลดลงเป็น 26,950 มก.ต่อลิตร และเมื่อคำนวณหาค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) ของตัวอย่างน้ำเสียทุกชุดการทดลอง พบว่าชุดที่ผ่านการหมักมีค่า C:N เพิ่มขึ้น โดยโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้นเริ่มต้นมีค่า C:N เท่ากับ 3.47 กรัมต่อลิตร หลังจากการหมักค่า C:N จะมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 3.86 กรัมต่อลิตร โรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์เริ่มต้นมีค่า C:N เท่ากับ 2.66 กรัมต่อลิตร หลังจากการหมักค่า C:N เพิ่มขึ้นเป็น 2.94 กรัมต่อลิตร ส่วนโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งเริ่มต้นมีค่า C:N เท่ากับ 56.0 กรัมต่อลิตร หลังจากการหมักมีค่า C:N เพิ่มขึ้นเป็น 114.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากรายงานของ Grothe และคณะ (1999) ทำการทดลองเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร ในสารอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่อัตราส่วน C:N เท่ากับ 28.3 จะให้การผลิต PHA สูงสุด

ดังนั้นจะเห็นว่าน้ำเสียที่ผ่านการหมักไม่ได้ช่วยเพิ่มให้ค่าปริมาณกรดระเหยง่าย (VA) สูงขึ้น ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำคัญที่เซลล์ต้องใช้ในการผลิต PHA จึงเลือกน้ำเสียจากทั้งสามโรงงานโดยไม่จำเป็นต้องทำการหมักแบบไร้อากาศก่อนในการผลิต PHA เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4 คุณลักษณะของน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมที่ผ่านการหมักและไม่ผ่านการหมักแบบไร้อากาศ

Table 4. Characteristics of industrial wastewater with and without anaerobic fermentation.

Composition	โรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้น		โรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์		โรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง	
	หมัก	ไม่หมัก	หมัก	ไม่หมัก	หมัก	ไม่หมัก
pH	7.26	2.43	7.19	6.27	7.31	5.41
COD	2,853	3,523	2,068	3,618	80,850	85,100
VA	37.7	1,049	13.7	10.3	24.0	1,503
TOC	951	1,174	689	1,206	26,950	28,367
N	246	338	234	452	236	507
C:N	3.86	3.47	2.94	2.66	114	56.0
Phosphate	143	566	520	720	313	330
Acetic acid	-	211.38	-	325.5	-	292.71
Propionic acid	-	327.9	-	117	-	178.83
Butyric acid	-	135.3	-	25.86	-	103.74
Long chain acid(C>4)	-	53.55	-	6.48	-	47.1

หมายเหตุ: ทุกพารามิเตอร์มีหน่วยเป็นมก.ต่อลิตร ยกเว้น pH และ C:N

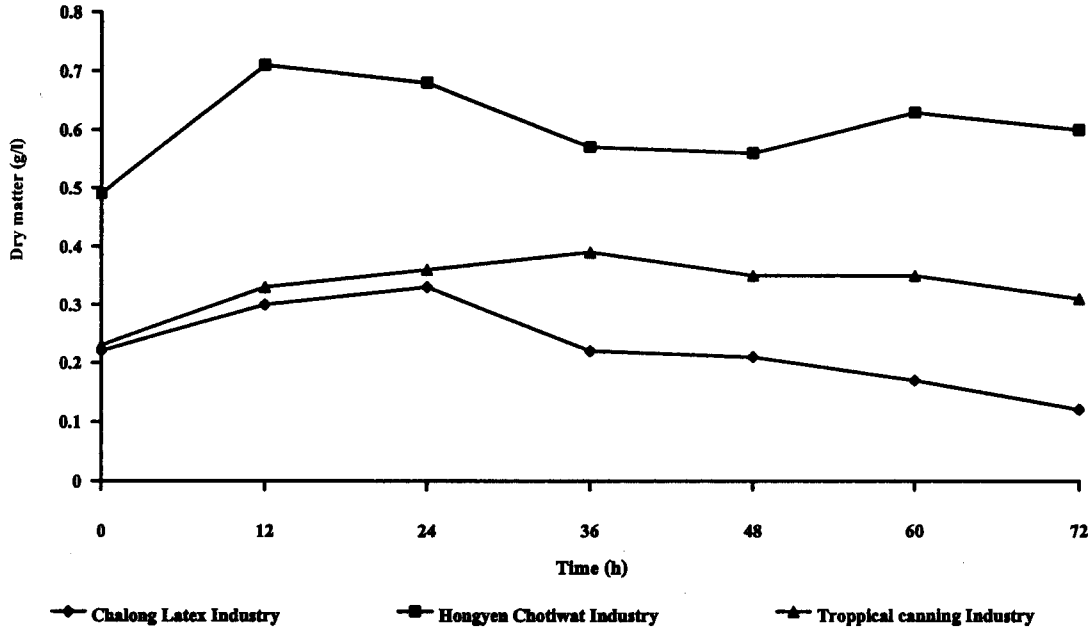
3.2 การศึกษาชนิดของแหล่งน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA

จากการทดลองนำน้ำเสียจากโรงงานทั้ง 3 โรงงาน ได้แก่ตัวอย่างน้ำเสียก่อนเข้า UASB ของโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้น โรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์ และ โรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง มาเพาะเลี้ยงเชื้อ *Ralstonia eutropha* ในขั้นต้นพบว่าลักษณะของน้ำเสียหลังจากปรับพีเอชให้ได้ 7 แล้ว นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที น้ำเสียโรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์และโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้น เกิดความขุ่นอย่างเห็นได้ชัด จึงไม่สามารถติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยวิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้งได้ อย่างไรก็ตาม ได้ทำการวิเคราะห์น้ำหนักวัตถุแห้งที่ได้ในระหว่างการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ พบว่าโรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์ให้ปริมาณน้ำหนักวัตถุแห้งสูงสุด

เท่ากับ 0.71 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 สำหรับโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้นให้ปริมาณน้ำหนักวัตถุแห้งเท่ากับ 0.33 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 24 และโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งให้ปริมาณน้ำหนักวัตถุแห้งเท่ากับ 0.39 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 36 ดังแสดงในภาพที่ 7 โดยพบว่าโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งและโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้นให้ปริมาณน้ำหนักวัตถุแห้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ใน 24 ชั่วโมงแรก แต่อย่างไรก็ตามในชั่วโมงที่ 0 น้ำเสียจากโรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์มีความขุ่นมากกว่าน้ำเสียจากโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้นและโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งทำให้ค่าวัตถุแห้งที่ชั่วโมงที่ 0 จากทั้งสามโรงงานมีค่าไม่เท่ากัน

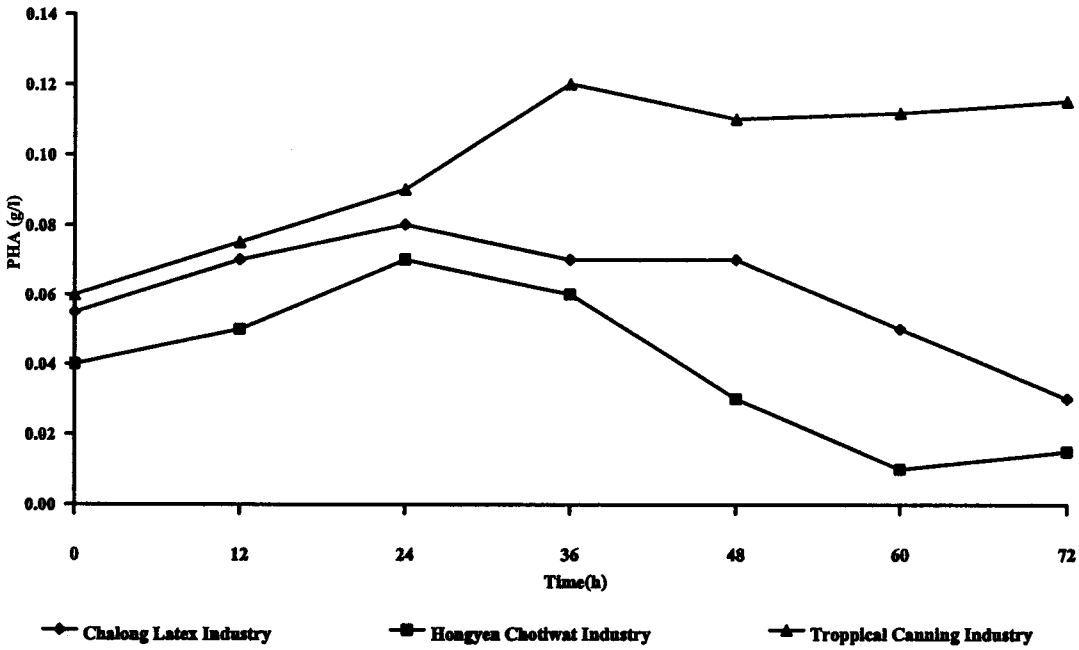
เมื่อพิจารณาน้ำเสียจากโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง ซึ่งเป็นโรงงานอุตสาหกรรมอาหารผลิตปลาทูน่ากระป๋อง น้ำเสียจึงมีปริมาณของไนโตรเจนสูงสุด จึงให้การผลิตเซลล์สูงกว่าโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้นซึ่งเป็นโรงงานอุตสาหกรรมน้ำยาง ส่วนโรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์เป็นโรงงานอุตสาหกรรมอาหารผลิตอาหารทะเลแช่เยือกแข็ง ถึงแม้จะมีปริมาณไนโตรเจนสูงแต่น้ำเสียที่ได้หลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วมีตะกอนเกิดขึ้น ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นทำให้ไม่สามารถวัดปริมาณเซลล์ได้ และให้ผลสอดคล้องกันเมื่อพิจารณาปริมาณการสะสม PHA โดยปริมาณ PHA ที่เซลล์ผลิตได้ของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งให้ปริมาณ PHA สูงสุดเท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 36 ขณะที่โรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์และโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้นให้ปริมาณ PHA สูงสุดเท่ากับ 0.07 กรัมต่อลิตรและ 0.08 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 8 ทั้งนี้เนื่องจาก น้ำเสียแต่ละโรงงานมีคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกันทำให้มีปริมาณสารอาหารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้แตกต่างกันได้ พบว่าโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้นและโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง มีปริมาณกรดระเหยง่าย (VA) เท่ากับ 1049 และ 1503 มก.ต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าโรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์ (เท่ากับ 613 มก.ต่อลิตร) ซึ่ง VA เป็นสารตั้งต้นเริ่มต้นที่สำคัญในการผลิต PHA จึงทำให้ PHA ที่ผลิตจากโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งและโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้นมีค่า PHA สูงกว่าการใช้น้ำเสียจากโรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการใช้น้ำเสียจากโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งจะให้การผลิต PHA สูงที่สุด นอกจากนี้หลังจากการฆ่าเชื้อน้ำเสียแล้วไม่เกิดปัญหาการขุ่นของน้ำเสียทำให้ง่ายต่อการดำเนินการทดลอง ดังนั้นจึงเลือกน้ำเสียจากโรงงานทรอปิคอลไปใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 7 ผลของแหล่งน้ำเสียต่อปริมาณน้ำหนักวัตถุแห้งในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml

Figure 7. The effect of different industrial wastewater on dry matter concentration in 500 ml Erlenmeyer flasks.

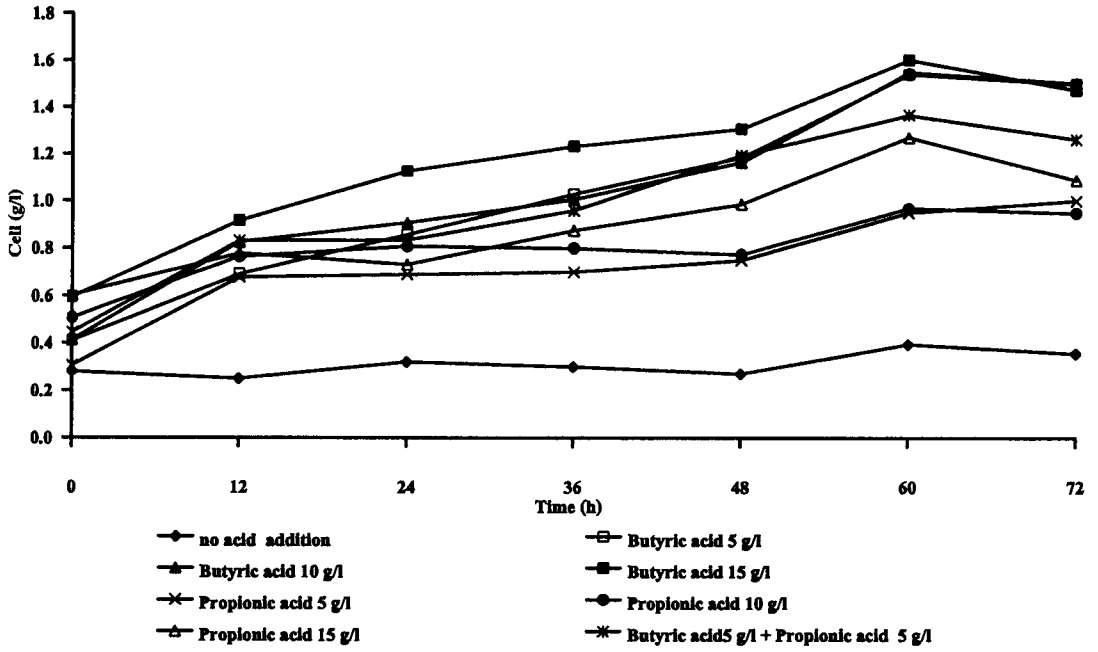


ภาพที่ 8 ผลของแหล่งน้ำเสียต่อปริมาณ PHAในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml

Figure 8. The effect of different industrial wastewater on PHA concentration in 500 ml Erlenmeyer flasks.

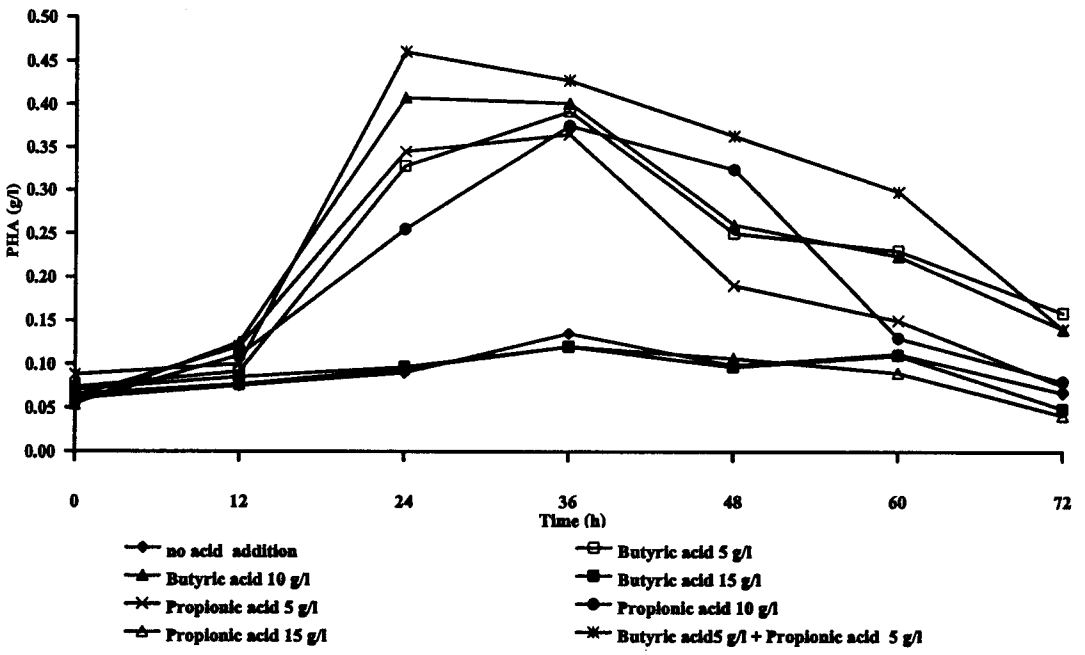
3.3 การศึกษาผลของการเติมกรด

จากการศึกษาการเติม propionic acid และ butyric acid ในปริมาณ 0, 5 ,10 และ 15 กรัมต่อลิตร ในน้ำเสียโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกรดและการเติม propionic acid 5 กรัมต่อลิตรและ butyric acid 5 กรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อมีการเติมกรดคือ propionic acid กับ butyric acid ลงในน้ำเสียที่ความเข้มข้นต่างๆกันเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่มีการเติมกรด พบว่า ชุดการทดลองที่ให้การเจริญของเชื้อ *R. eutropha* สูงสุดคือ ชุดที่มีการเติมกรด butyric acid 15 กรัมต่อลิตร โดยให้ปริมาณเซลล์สูงสุด 1.6 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 60 แต่ให้ปริมาณ PHA เพียง 0.12 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 36 (ภาพที่ 9) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่มีการเติมกรดผสมคือ เติม propionic acid และ butyric acid อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณ PHA สูงสุด 0.46 กรัมต่อลิตร ดังภาพที่ 10 จะเห็นว่าการเติมกรดจะช่วยส่งเสริมให้มีการเจริญของจุลินทรีย์สูงขึ้น โดยความเข้มข้นของกรดสูงขึ้นจะได้ปริมาณเซลล์มากขึ้นและการใช้กรด butyric ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีกว่าการใช้กรด propionic (ภาพที่ 9) นอกจากนี้การใช้กรด butyric acid จะให้การสะสม PHA ที่มากกว่าการใช้กรด propionic ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ruan และคณะ (2003) คือเมื่อมีการทดลองโดยใช้กรด 3 ชนิดคือ butyric acid, propionic acid และ acetic acid พบว่ากรด butyric acid ให้การผลิต PHA สูงที่สุด แต่จากผลการทดลองจะเห็นว่าการใช้กรด propionic ร่วมกับการใช้กรด butyric จะทำให้ได้ปริมาณ PHA เพิ่มมากขึ้นแต่การใช้กรดในปริมาณความเข้มข้นที่สูงเกินไปจะทำให้ได้เซลล์ในปริมาณสูงแต่ปริมาณ PHA ต่ำ และจากการศึกษาของ Yu (2001) ที่ทำการผลิต PHA จากกรดอินทรีย์ในน้ำเสียโรงงานแป้งโดยใช้ *A. eutrophus* โดยทำการเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อแบบการเติมอาหาร 2 ครั้งกับการเติมอาหารแบบครั้งเดียว พบว่าการใช้กรดผสม butyric และ propionic ที่มีการเติมอาหารแบบสองครั้งให้การผลิต PHA สูงกว่าการเติมอาหารแบบครั้งเดียว โดยให้การสะสม PHA 40 % ดังนั้นจึงได้เลือกน้ำเสียที่มีการเติมกรดผสม butyric acid และ propionic acid อย่างละ 5 กรัมต่อลิตรที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุด 0.46 กรัมต่อลิตร ไปใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 9 ผลของการเติมกรดต่อปริมาณเซลล์ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml

Figure 9. The effect of carbon sources on cell concentration in 500 ml Erlenmeyer flasks.



ภาพที่ 10 ผลของการเติมกรดต่อปริมาณ PHAในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml

Figure 10. The effect of acid addition on PHA concentration in 500 ml Erlenmeyer flask.

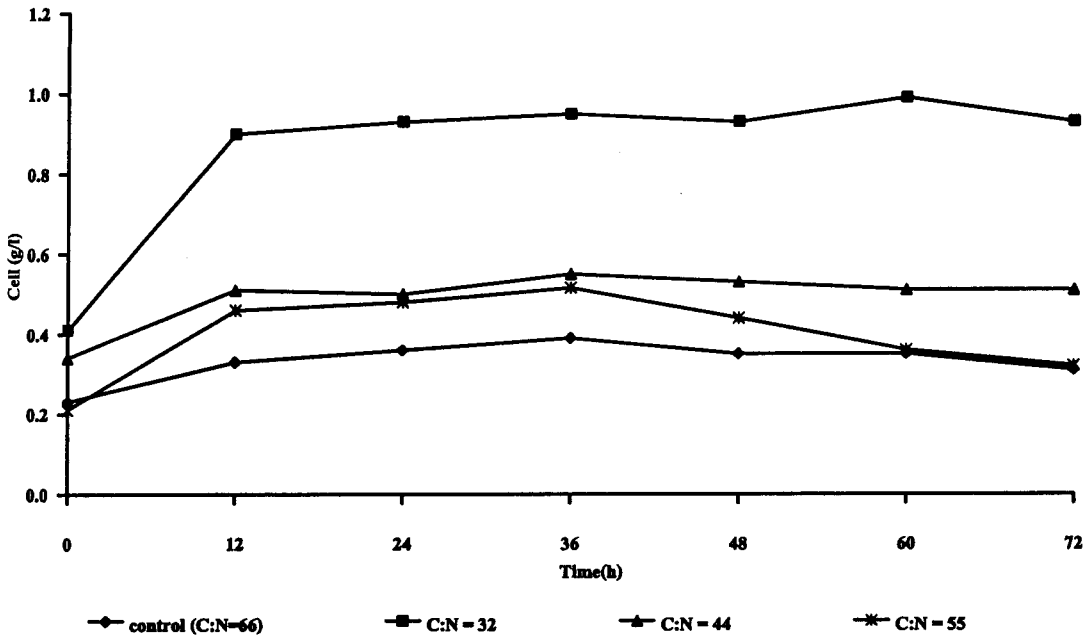
3.4 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N)

จากการศึกษาการเจริญและการผลิต PHA ของ *Ralstonia eutropha* ในน้ำเสียโรงงานทรอปิคอลที่ C:N เท่ากับ 32, 44 และ 55 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติม (C:N=66) โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยน้ำเสียที่มีการเติมกรดผสม propionic acid และ butyric acid อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่า เมื่อค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำๆหรือมีไนโตรเจนในอาหารสูง จะเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณเซลล์มาก โดยค่าอัตราส่วน C:N เท่ากับ 32 จะให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.99 มก.ต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 60 และเมื่อเพิ่มค่าอัตราส่วน C:N จะทำให้ได้ปริมาณเซลล์ลดลง (ภาพที่ 11) อย่างไรก็ตามที่อัตราส่วน C:N สูงขึ้นหรือมีไนโตรเจนในสารอาหารต่ำจะทำให้ได้ PHA มากกว่าชุดที่มีไนโตรเจนสูงหรืออัตราส่วน C:N ต่ำ โดยค่าอัตราส่วนที่ดีที่สุดคือชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมไนโตรเจนเพิ่มเติมซึ่งมีค่าอัตราส่วน C:N เท่ากับ 66 ให้ค่าปริมาณ PHA สูงสุดที่ 0.27 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 12) สอดคล้องกับการศึกษาของ Chang และคณะ (1994) พบว่าการจำกัดแหล่งไนโตรเจนให้กับ *Alcaligenes eutrophus* H16 มีผลให้มีการสะสม PHA และจากการเติม NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการสังเคราะห์ PHA นั้นพบว่าจะมีผลให้เกิดการหยุดชะงักและลดการสะสม PHB ภายในเซลล์ นอกจากนี้จากการศึกษาของศิริพงษ์ วิงวอน (2539) ที่ศึกษาการผลิต PHA โดยใช้การควบคุมอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนโดยเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยน้ำตาลฟรุกโตส ปริมาณ 8.0 กรัมต่อลิตร เปลี่ยนแปลงอัตราส่วน C:N ตั้งแต่ 8 จนถึงไม่มีไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเลย ผลการทดลองพบว่าเมื่ออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำๆ จะเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณเซลล์มากในระยะเวลาอันสั้นๆ โดยค่าอัตราส่วน C:N ที่ดีที่สุดคือ 10 โมลคาร์บอน/โมลไนโตรเจน หรือปริมาณคาร์บอนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสิบเท่าของปริมาณไนโตรเจน แต่เมื่อมีค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงๆ หรือมีไนโตรเจนในสารอาหารต่ำจะทำให้ได้ปริมาณ PHB มากกว่า มีไนโตรเจนปริมาณมาก โดยค่าอัตราส่วนที่ดีที่สุดอยู่ที่ 30 โมลคาร์บอนต่อโมลไนโตรเจน และจากการศึกษาของพิมพ์ชนก นาคราช (2542) ที่ทำการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ PHB จาก *A. eutrophus* NCIMB 11599 โดยการหมักแบบสองขั้นตอน ซึ่งแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกเป็นการศึกษาปริมาณสารอาหารในสายป้อนที่เหมาะสมโดยการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มอัตราการผลิต PHB จากกลูโคส พบว่า การมีปริมาณไนโตรเจนมากไม่ได้ช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตดีแต่กลับทำให้เซลล์ลดลงและเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเส้นยาว (filament) และพบว่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสายป้อนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคือ 33 ส่วนที่สองศึกษาการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องสองขั้นตอนพบว่า เมื่อหยุดการป้อนน้ำหมักจากถังแรก การสะสมของ

PHB จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 26.79 เป็น 46.7% PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และส่วนสุดท้ายเป็นการเป็นการประยุกต์ใช้การหมักแบบสองขั้นตอนโดยถังหมักแรกเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโตสูงสุดด้วยการหมักแบบต่อเนื่องในภาวะที่สารอาหารสมบูรณ์ จากนั้นกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ PHB ในถังหมักที่สองด้วยการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องในภาวะที่สารอาหารไม่สมดุล พบว่าที่อัตราการเจือจางจากถังหมักแรกเท่ากับ 0.10 ต่อชั่วโมง จะให้ปริมาณ PHB 14.526 กรัมต่อลิตร หรือ 33.25% PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในถังหมักที่สอง

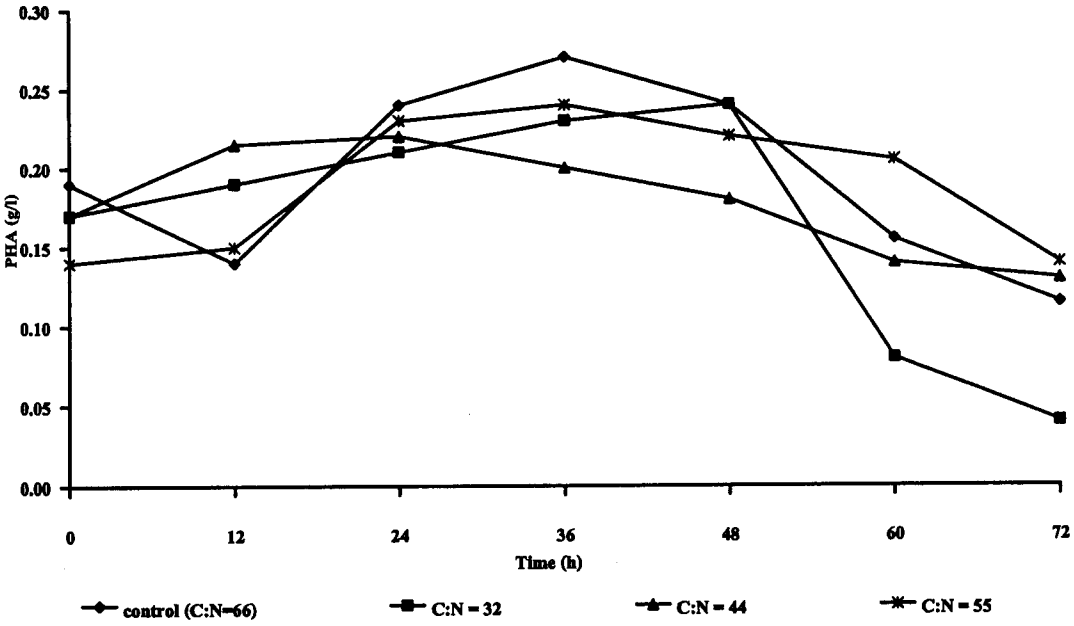
และเมื่อพิจารณาภาพที่ 9 กับภาพที่ 11 และภาพที่ 10 กับภาพที่ 12 จะเห็นได้ว่าปริมาณเซลล์ที่ได้ไม่เท่ากัน มีสาเหตุมาจากค่าความขุ่นของหัวเชื้อเริ่มต้นในชุดการศึกษาชนิดของกรดและการศึกษาอัตราส่วน C:N ไม่เท่ากัน โดยค่าความขุ่นของหัวเชื้อเริ่มต้นของการการศึกษาชนิดของกรดมีค่าเท่ากับ 0.826 และในการศึกษาอัตราส่วน C:N มีค่าความขุ่นของหัวเชื้อเท่ากับ 0.930 จึงอาจเป็นสาเหตุให้ปริมาณเซลล์และปริมาณ PHA ของชุดควบคุมทั้งสองการทดลองไม่เท่ากัน

ดังนั้นชุดการทดลองต่อไปจึงไม่มีความจำเป็นต้องเติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมเพื่อปรับค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) เริ่มต้น



ภาพที่ 11 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml.

Figure 11. The effect of C:N ratio on cells growth in 500 ml Erlenmeyer flasks.



ภาพที่ 12 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิต PHA ของเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml.

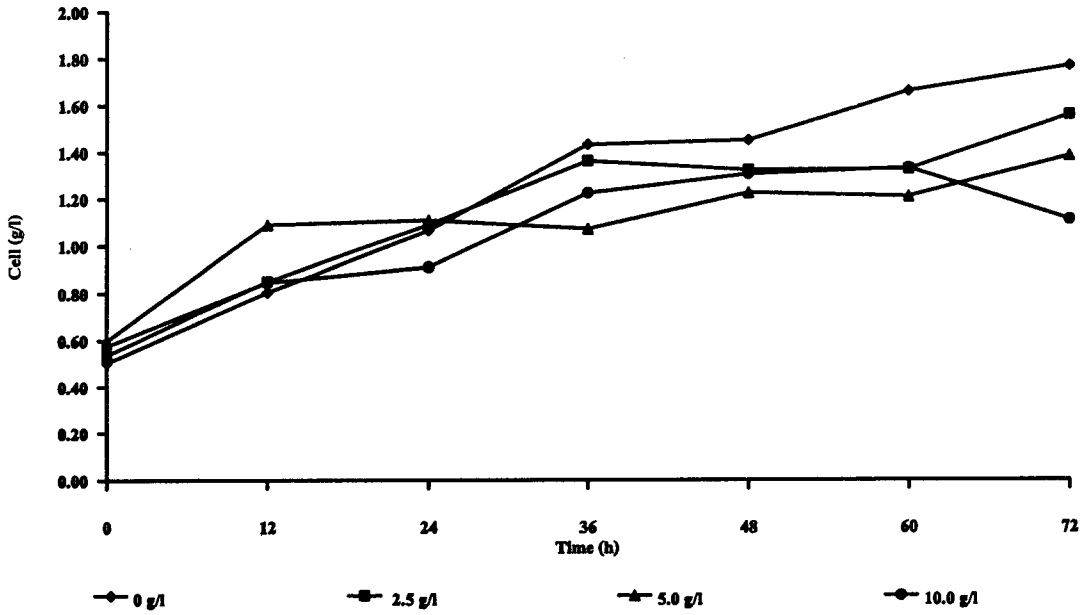
Figure 12. The effect of C:N ratio on PHA production in 500 ml Erlenmeyer flask.

3.5 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งฟอสเฟต

จากการศึกษาความเข้มข้นของปริมาณฟอสเฟตเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทำการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นในช่วง 0, 2.5, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร พบว่าการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตไม่มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญและการเพิ่มปริมาณ PHA ให้สูงขึ้น แสดงดังในภาพที่ 13 และ 14 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปริมาณเซลล์ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันมาก โดยชุดควบคุมจะให้ปริมาณเซลล์สูงสุด 1.76 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือชุดที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟตเริ่มต้น 2.5 กรัมต่อลิตร, 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาปริมาณ PHA ที่ได้พบว่าที่ความเข้มข้นของฟอสเฟต 5 และ 10 กรัมต่อลิตรให้การผลิต PHA เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนเกือบคงที่ในชั่วโมงสุดท้าย ส่วนชุดที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร และชุดควบคุมให้การผลิต PHA เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องโดยเฉพาะชุดควบคุม ซึ่งให้ค่าปริมาณ PHA สูงที่สุด 0.625 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 72

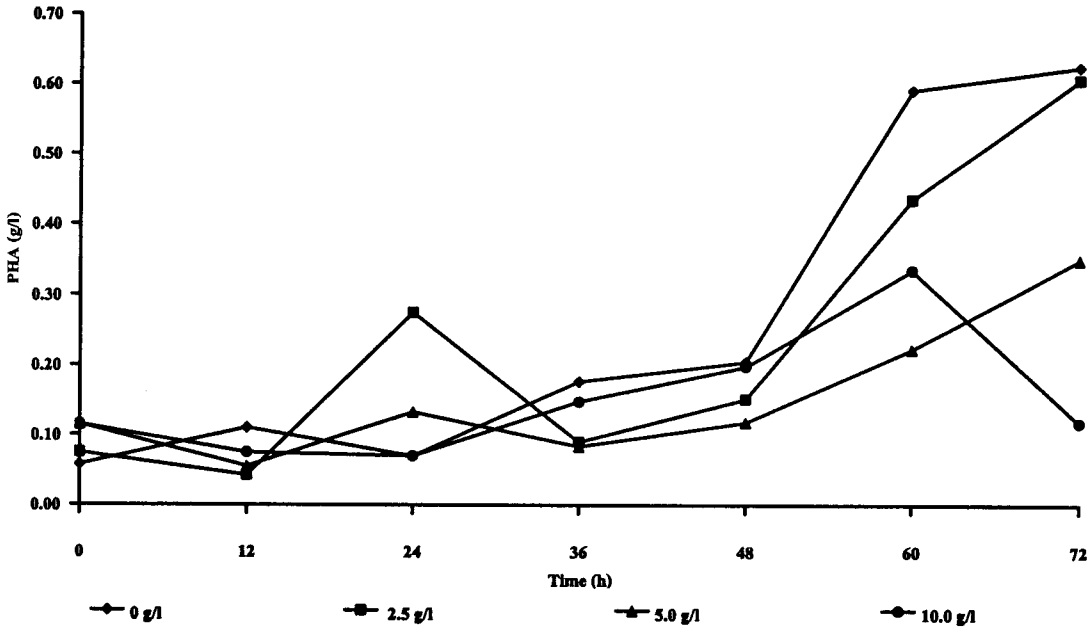
ทั้งนี้เป็นเพราะฟอสเฟตเป็นปัจจัยจำกัดที่มีความจำเป็นต้องควบคุมซึ่งน้ำเสียมีองค์ประกอบที่มีฟอสเฟตเพียงพออยู่แล้ว 330 มก.ต่อลิตร จึงอาจมีผลทำให้ฟอสเฟตที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีมากเกินไปทำให้ยับยั้งการเจริญและลดการสะสม PHA ในเซลล์ จากการศึกษาของ

Ryu และคณะ (1997) ซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับผลของการควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นของฟอสเฟตเริ่มต้นต่อการผลิต PHA จากเชื้อ *A. eutrophus* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณฟอสเฟตเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHA เท่ากับ 5.5 กรัมต่อลิตร มีการเก็บสะสมสาร PHA ไว้ภายในเซลล์สูงถึงร้อยละ 80 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งต่างจากผลการทดลองในครั้งนี้ จากการศึกษา พบว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมฟอสเฟตจะให้ผลการเจริญและการผลิต PHA ดีกว่าชุดการทดลองที่มีการเติมฟอสเฟต ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตในน้ำเสียเพื่อการผลิต PHA



ภาพที่ 13 ผลของความเข้มข้นฟอสเฟตต่อการเจริญของเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml.

Figure 13. The effect of phosphate concentration on cells growth in 500 ml Erlenmeyer flasks.



ภาพที่ 14 ผลของความเข้มข้นฟอสเฟตต่อการผลิต PHAในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml.

Figure 14. The effect of phosphate concentration on PHA production in 500 ml Erlenmeyer flasks.

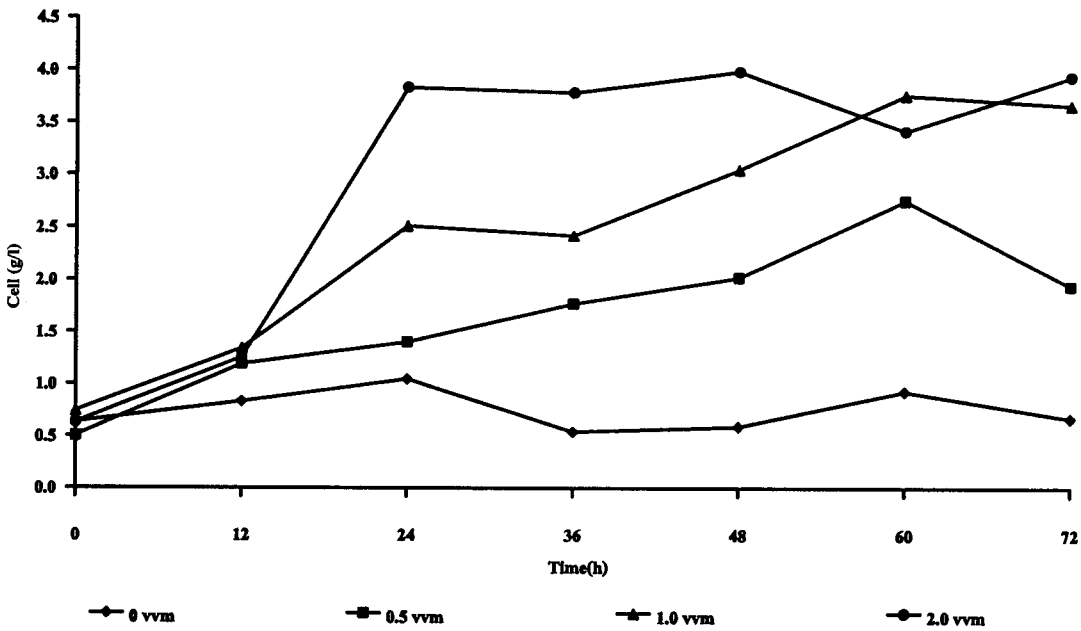
3.4 การศึกษาการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์แบบกะ

ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ในถังหมักขนาด 3 ลิตร โดยใช้อาหารที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3 ซึ่งมีองค์ประกอบคือน้ำเสียที่มีการเติม propionic acid และ butyric acid อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนและแหล่งฟอสเฟต มาศึกษาและได้ผลดังนี้

3.4.1 ศึกษาอัตราการให้อากาศ

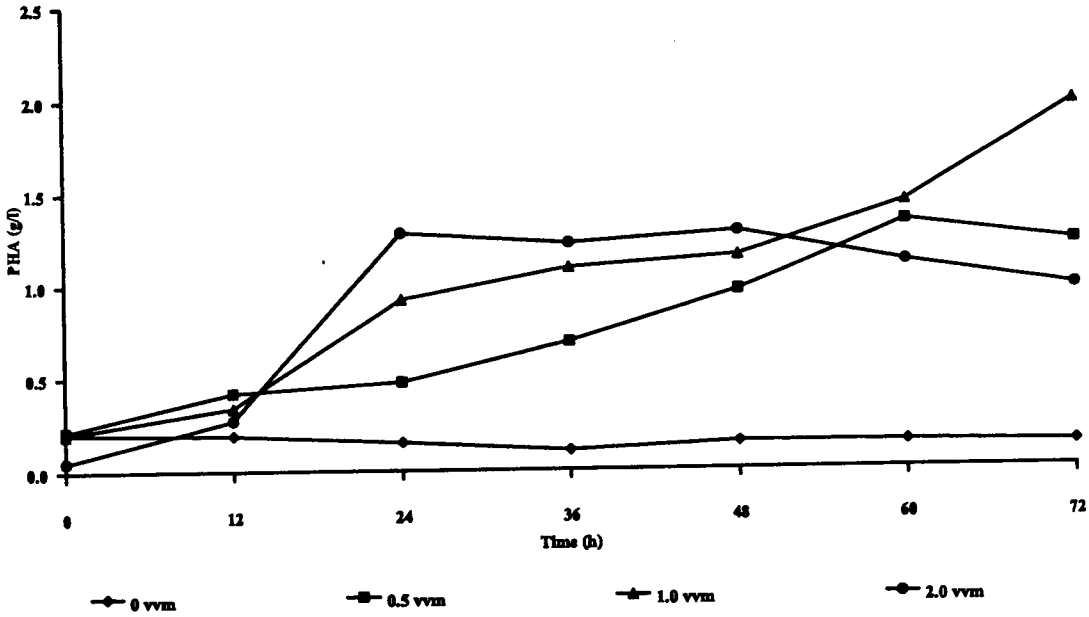
การศึกษาการเจริญและการผลิต PHA ของ *R. eutropha* โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เติมในอาหารปริมาตร 3 ลิตร ทำการควบคุมพีเอชเริ่มต้นที่ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที และทำการเปลี่ยนแปลงอัตราการให้อากาศที่ 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 vvm ตามลำดับ จากภาพที่ 15 และ 16 แสดงการเจริญและการผลิต PHA ของแต่ละอัตราการให้อากาศที่เวลาต่างๆ พบว่า ที่ปริมาตรอากาศ 0 vvm เซลล์ไม่มีการเจริญและไม่มีการผลิต PHA เนื่องจากไม่มีออกซิเจนซึ่งเซลล์จะใช้ในการเจริญเติบโต และเมื่อให้ปริมาตรอากาศที่ 0.5 vvm จะมีการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต PHA น้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณของออกซิเจนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยเกินไปจึงทำให้เชื้อเจริญได้น้อย และเมื่อพิจารณาที่มีการให้อากาศ 1 vvm จะมีอัตราการเจริญอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับการเก็บสะสมสาร PHA เพิ่มขึ้นด้วย แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการให้อากาศที่ 2 vvm จะพบว่า ที่มีการให้อากาศ 2 vvm จะมีอัตราการเจริญที่เร็ว

กว่า หากพิจารณาดูปริมาณ PHA จะเห็นได้ว่าเมื่อผ่านชั่วโมงที่ 48 ปริมาณ PHA ของถังที่มีการให้อากาศ 2 vvm จะมีปริมาณที่ลดน้อยลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์มีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่และสารอาหารเริ่มลดน้อยลงจึงมีผลทำให้เซลล์ดึงแหล่งพลังงานสำรองมาใช้ การผลิต PHA เกิดควบคู่กับการเจริญของเซลล์ โดยในช่วง 48 ชั่วโมงแรกชุดการทดลองที่มีการให้อากาศ 2 vvm จะมีการผลิต PHA สูงที่สุดแต่ชั่วโมงที่ 60 และ 72 พบว่าอัตราการให้อากาศ 1 vvm จะมีการผลิตPHAสูงที่สุด ขณะที่PHA ของชุดการทดลองที่มีการให้อากาศ 2 vvm จะมี PHA ลดลงเนื่องจากมีการดึง PHA ไปใช้ในการเจริญเติบโต ปริมาณ PHA ที่เกิดขึ้นสูงสุดเท่ากับ 1.97 กรัมต่อลิตรและมีการสะสม PHAในเซลล์เท่ากับ 53.86% ในชุดการทดลองที่มีอัตราการให้อากาศ 1 vvm สอดคล้องกับรายงานของ Hocking และ Marchesaualt (1994) ที่พบว่าในสภาวะมีการจำกัดปริมาณออกซิเจน จะส่งเสริมให้เกิดวิถีการผลิต PHA ดังนั้นจึงเลือกอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm ไปใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 15 ผลของการให้อากาศต่อการเจริญของเชื้อในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร

Figure 15. The effect of aeration on microbial growth in 3 L fermemtors.

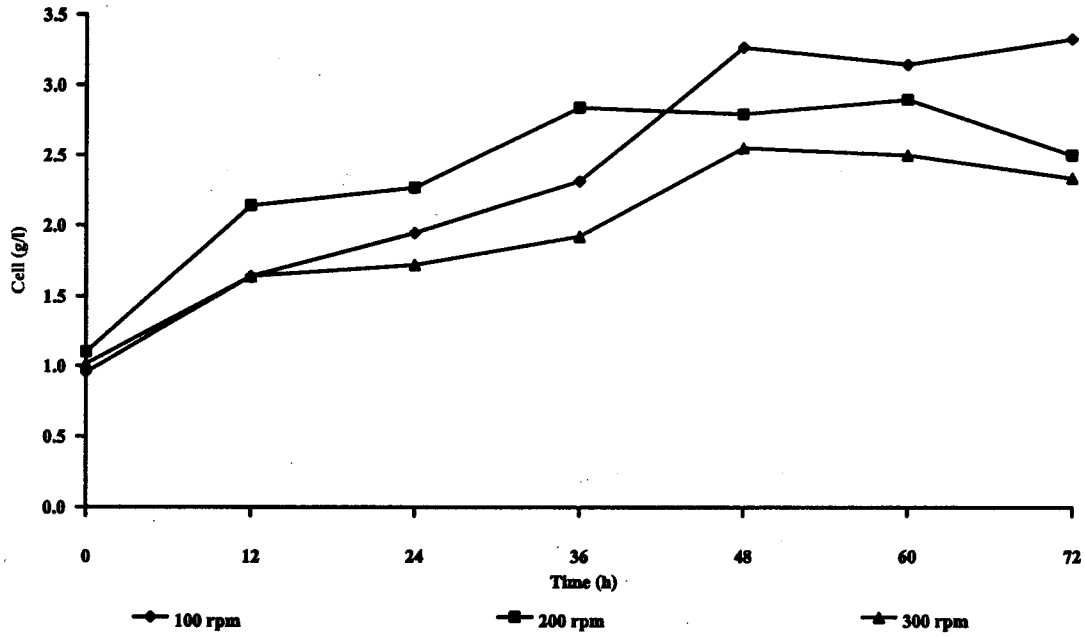


ภาพที่ 16 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร

Figure 16 Effect of aeration rate on PHA production in 3 L fermemtors.

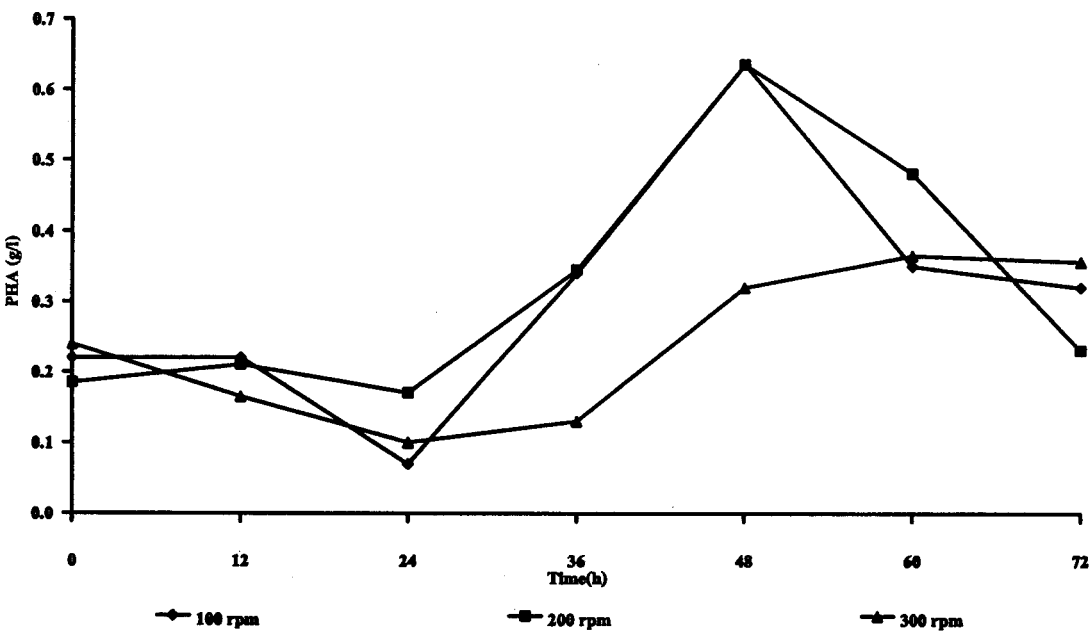
3.4.2 ศึกษาอัตราการกวน

ศึกษาผลของอัตราการกวน (100, 200 และ 300 รอบต่อนาที) ในถังหมักขนาด 3 ลิตร ต่อการเจริญและการผลิต PHA ด้วย *R. eutropha* ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm พบว่าการกวนมีผลต่อการเจริญ โดยในช่วง 36 ชั่วโมงแรก การกวนที่ 200 รอบต่อนาทีจะให้การเจริญเท่ากับ 2.84 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการกวนที่ 100 และ 300 รอบต่อนาที แต่หลังจาก 36 ชั่วโมง พบว่าการกวนที่ 100 รอบต่อนาทีให้การเจริญดีที่สุดโดยมีการเจริญสูงสุดที่ชั่วโมง 72 เท่ากับ 3.33 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 17) และเมื่อพิจารณาการผลิตสาร PHA พบว่าที่อัตราการกวน 100 และ 200 รอบต่อนาที จะให้การผลิต PHA ใกล้เคียงและที่ชั่วโมงที่ 48 จะผลิต PHA ได้สูงสุดเท่ากันทั้งสองชุดการทดลองเท่ากับ 0.635 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 18) แสดงว่าเมื่อมีการเพิ่มความเร็วรอบของการกวนจาก 100 เป็น 200 rpm ไม่ได้ช่วยส่งเสริมให้มีการผลิต PHA มากขึ้นและจากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการใช้ความเร็วการกวนที่ 100 มีผลต่อการส่งเสริมให้จุลินทรีย์เก็บสะสม PHA ไว้ภายในเซลล์เท่ากับ 23.26% ขณะที่การใช้ความเร็วในการกวนที่ 200 และ 300 rpm มีการสะสม PHA ในเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 19.24% และ12.53% ที่ชั่วโมงที่ 48 ตามลำดับจะเห็นว่าการใช้ความเร็ว 100 rpm ให้การสะสม PHA ในเซลล์สูงกว่าทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกการควบคุมอัตราการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ในชุดการทดลองต่อไป



ภาพที่ 17 ผลของอัตราการกวนต่อการเจริญของเชื้อในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร

Figure 17. The effect of agitation rate on microbial growth in 3 L fermemtors.

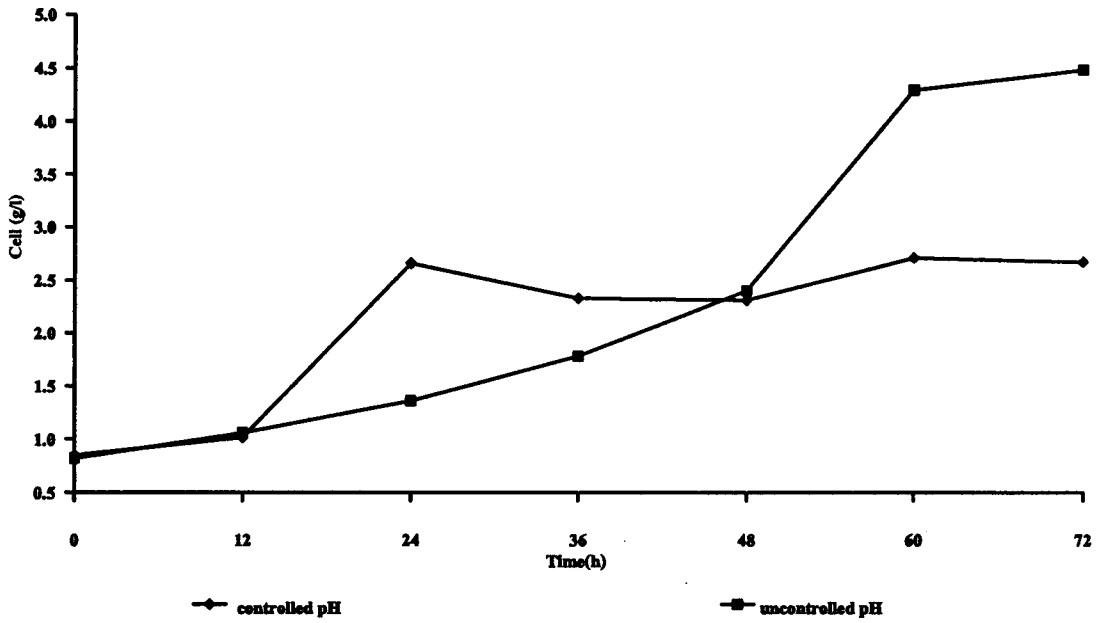


ภาพที่ 18 ผลของอัตราการกวนต่อการผลิต PHA ของเชื้อในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร

Figure 18. The effect of agitation rate on PHA production in 3 L fermemtors.

3.4.3 ศึกษาการควบคุมพีเอช

เป็นการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีการควบคุมพีเอชที่ 7 และไม่มีการควบคุมพีเอชโดยจะทำการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* TISTR 1095 ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วยกรดผสม propionic acid 5 กรัมต่อลิตร กับ butyric acid 5 กรัมต่อลิตร และควบคุมอัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที และอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการควบคุมพีเอชจะมีการเจริญที่เร็วกว่าชุดการทดลองที่มีการควบคุมพีเอชใน 24 ชั่วโมงแรก ดังแสดงในภาพที่ 19 หลังจากชั่วโมงที่ 24 พบว่าชุดการทดลองที่มีการควบคุมพีเอชจะมีการเจริญของจุลินทรีย์ลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่ จนสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่มีการควบคุมพีเอชจะมีการเจริญอย่างช้าๆ และจะเริ่มเข้าสู่ stationary phase ที่ชั่วโมงที่ 60 โดยให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 4.48 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่มีการควบคุมพีเอช

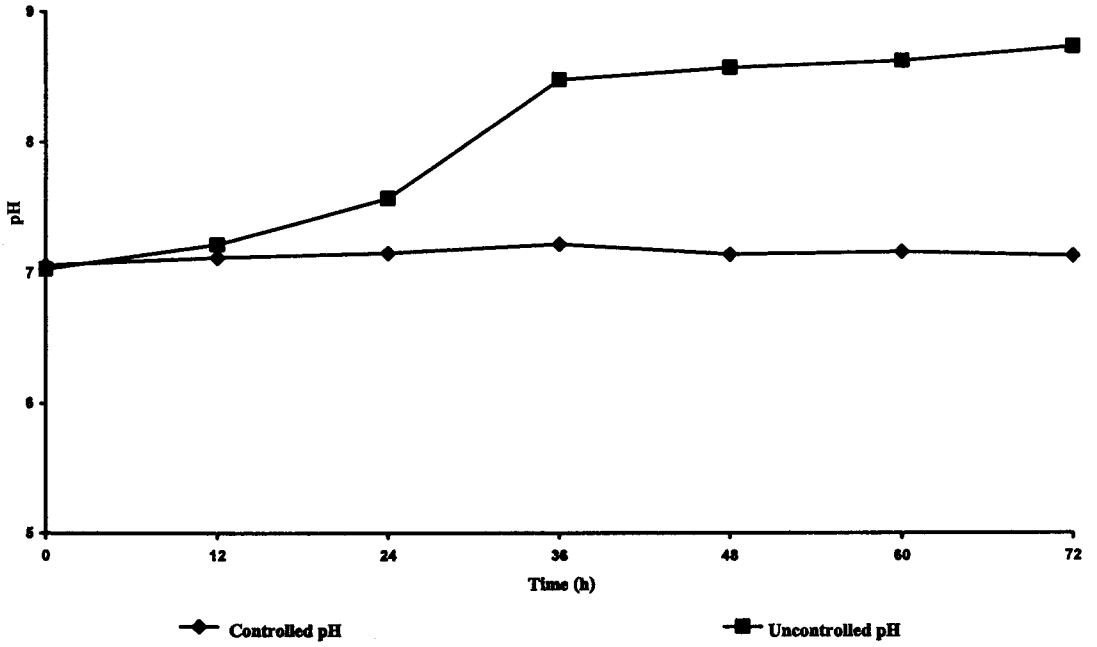


ภาพที่ 19 ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชต่อการเจริญของเซลล์ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร

Figure 19. Effect of controlled and uncontrolled pH on cell in 3 L fermemtors.

จากภาพที่ 20 แสดงค่าพีเอชในชุดการทดลองของถังหมักชุดที่มีการควบคุมพีเอชและชุดที่ไม่มีการควบคุมพีเอช จะเห็นได้ว่าชุดที่ไม่มีการควบคุมพีเอช ค่าพีเอชจะมีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 8.7 ในชั่วโมงที่ 72 และจะมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากในการเจริญเติบโตเชื้อจุลินทรีย์จะมีการใช้กรดจากน้ำเสียทำให้พีเอชมีค่าเพิ่มขึ้น ส่วนชุดที่มีการควบคุมพีเอช มีค่าพีเอชค่อนข้างคงที่ โดยค่าพีเอชจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงโมงที่ 36 แต่ได้มีการปรับค่าพีเอชให้คงที่โดยใช้ตัวควบคุมอัตโนมัติด้วยชุด controller โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ จะเห็นว่า ในช่วง 12-24 ชั่วโมง หากไม่มีการควบคุมพีเอช จะทำให้พีเอชในถังหมักเพิ่มขึ้นซึ่งมีผลให้การเจริญของจุลินทรีย์ ต่ำกว่าชุดที่มีการควบคุมพีเอชให้เท่ากับ 7.0

เมื่อพิจารณาการผลิต PHA พบว่า ทั้งสองชุดการทดลองมีการผลิต PHA สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 และมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่หลังจากนั้นชุดการทดลองที่มีการควบคุมพีเอช มีปริมาณ PHA ลดลงอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 21) ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ จึงมีการดึง PHA ซึ่งเป็นพลังงานสำรองในเซลล์ไปใช้ แต่เมื่อเปรียบเทียบการสะสม PHA ในเซลล์ พบว่า ชุดการทดลองที่มีการควบคุม pH มีการสะสมในเซลล์เพียง 53.49% ขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่มีการควบคุมควบคุม pH มีการสะสมในเซลล์ 75.84 % ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงเห็นได้ว่าไม่จำเป็นต้องมีการควบคุมพีเอช



ภาพที่ 20 ค่าพีเอชในชุดการทดลองที่มีการควบคุมพีเอชและที่ไม่มีการควบคุมพีเอชในชั่วโมงต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร

Figure 20. pH values of controlled and uncontrolled pH on PHA production in 3 L fermemtors.