

# การผลิตเซลล์ยีสต์เข้มข้นโดยใช้ Stirred Ceramic Membrane Reactor (SCMR)

สิริลักษณ์ เกิดคล้าย<sup>1</sup> รัตนา จิระรัตนานนท์<sup>2</sup>  
สุदारัตน์ ตรีเพชรกุล<sup>3</sup> และ ดุษฎี อดุภาพ<sup>4</sup>

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางมด ทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ใน Stirred Ceramic Membrane Reactor (SCMR) ซึ่งมีการติดตั้งเยื่อแผ่นเซรามิกขนาดรูพรุน 5  $\mu\text{m}$  จำนวน 2 ชุด (6 ท่อ) ไว้ภายในถังหมัก เยื่อแผ่นเซรามิกแต่ละชุดจะทำหน้าที่สลับกันทุกๆ 15 นาที ระหว่างการกรองกับการให้อากาศ โดยมีการป้อนสารอาหารและดึงน้ำหมักผ่านเยื่อแผ่นออกอย่างต่อเนื่อง พบว่าที่ dilution rate เท่ากับ 0.2 และ 0.25  $\text{h}^{-1}$  เมื่อเวลาผ่านไป เซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้น แต่ค่าเพอมีเอทฟลักซ์จะลดต่ำลง ดังนั้นจึงต้องลด dilution rate ลงเพื่อรักษาระดับปริมาณในถังหมักไว้ นอกจากนี้พบว่า การป้อนสารอาหารเข้าสู่ถังหมักโดยเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสให้สูงขึ้นเป็นระยะๆ ให้อัตราการผลิตและ % Yield สูงกว่าการป้อนสารอาหารที่มีน้ำตาลคงที่ตลอด เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ที่ dilution rate 0.1  $\text{h}^{-1}$  โดยเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสจาก 40 g/L ที่เวลา 12 ชั่วโมง เป็น 70 และ 100 g/L ที่ 23 และ 38 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 55 ชั่วโมง จะได้ความเข้มข้นเซลล์ 136 g/L และค่าอัตราการผลิต (productivity) 2.48 g/L-h

คำสำคัญ : การหมัก / SCMR / *Saccharomyces cerevisiae*

<sup>1</sup> นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

<sup>2</sup> รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์

<sup>3</sup> อาจารย์ สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

<sup>4</sup> ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

## Production of High Cell Density of Yeast Using Stirred Ceramic Membrane Reactor

Siriluk Kerdklai<sup>1</sup> Ratana Jiratananon<sup>2</sup>  
Sudarut Tripetchkul<sup>3</sup> and Dudsadee Uttapap<sup>4</sup>

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangmod, Toongkru, Bangkok 10140

---

### Abstract

The SCMR system fitted with two sets (6 tubes) of ceramic filter having pore size of 5  $\mu\text{m}$  was used for yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell culture. The function of ceramic filters between filtration and aeration of each set was alternatively switched every 15 min. The feed medium was fed and culture medium was withdrawn through membrane continuously. At dilution rate of 0.2 and 0.25  $\text{h}^{-1}$ , the permeation **flux** reduced considerably at the early period of cultivation. Therefore, the lower dilution rates have to be adjusted to maintain the culture volume in fermentor. The higher productivity and yield were obtained when the glucose concentration of feed medium fed into the fermentor were increased step by step. Cell concentration at 136 g/L and productivity at 2.48 g/L-h were obtained when cultured the cell at dilution rate of 0.1  $\text{h}^{-1}$  for 55 h with increasing the glucose concentration from 40 g/L at 12 h to 70 and 100 g/L at 23 h and 38 h, respectively.

**Keywords** : Fermentation / Stirred Ceramic Membrane Reactor / *Saccharomyces cerevisiae*

---

<sup>1</sup> Graduate Student, Biotechnology Program, School of Bioresources and Technology

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering

<sup>3</sup> Lecturer, Natural Resource Management Program, School of Bioresources and Technology

<sup>4</sup> Assistant Professor, Biochemical Technology Program, School of Bioresources and Technology

## บทนำ

การพัฒนาเทคโนโลยีการหมัก [1,2] นั้น เริ่มพัฒนามาจากการหมักแบบกะ (batch) ซึ่งเป็นวิธีการหมักแบบเก่าที่มีอัตราการหมักและการใช้สารอาหารต่ำ เนื่องจากความเข้มข้นของเชื้อหมักต่ำ อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีความยุ่งยากแต่มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำจึงเป็นที่นิยมใช้ทั่วไป ต่อมาได้พัฒนาเทคโนโลยีเป็นการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) แต่ก็ยังไม่สามารถเพิ่มอัตราการหมัก อัตราการผลิต และความเข้มข้นเชื้อหมักได้มากนัก เนื่องจากการสูญเสียเชื้อหมักออกจากระบบ เมื่ออัตราการป้อนสารอาหารสูง จึงได้มีการศึกษาวิธีการอื่นๆ ในการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ วิธีการหนึ่งที่ศึกษากันมากคือ การใช้ membrane recycle fermentor [3-7] โดยเยื่อแผ่นจะทำหน้าที่แยกสารที่มีขนาดเล็ก ได้แก่ สารผลิตภัณฑ์ สารอาหารที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาออกจากระบบ และกักสารที่มีขนาดใหญ่ เช่น เชื้อหมักกลับเข้าสู่ถังกวน ปฏิกิริยาการหมักและการเจริญเติบโตของเชื้อหมักเกิดขึ้นทั้งในถังกวนและอุปกรณ์เยื่อแผ่น การเวียนเซลล์กลับทำให้เชื้อหมักมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น และมีอัตราการหมักเพิ่มขึ้น

ระบบที่มีการเวียนเซลล์กลับนั้นมักจะมีปัญหาคือ กิจกรรมของเซลล์ลดลงเนื่องจากขณะที่เซลล์ถูกปั๊มจากถังกวนผ่านท่อเข้าสู่อุปกรณ์เยื่อแผ่น การควบคุมสิ่งแวดล้อมในการหมัก เช่น dissolved oxygen (DO), pH, สารอาหาร และอุณหภูมิภายในท่อและในระบบเยื่อแผ่นให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์นั้นทำได้ยากหรืออาจควบคุมไม่ได้เลย นอกจากนี้กรณีที่เยื่อแผ่นเป็นแบบ thin channel การไหลผ่านของน้ำหมักผ่านช่องแคบอาจทำให้เกิดแรงเฉือนซึ่งอาจทำให้เซลล์ถูกทำลายได้ และในการเพิ่มหน่วยแยก (ระบบเยื่อแผ่น) ขึ้นมาอีกหนึ่งหน่วย จะทำให้เกิดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ เพิ่มขึ้น เนื่องจากต้องติดตั้งอุปกรณ์เพิ่มเติมลงไปทำให้ระบบมีรอยต่อ (ข้อต่อท่อ) มากขึ้น โอกาสการปนเปื้อนก็จะมากขึ้น

เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาระบบที่มีมีการติดตั้งเยื่อแผ่นไว้ภายในถังหมักอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุน เช่น เซลล์ยีสต์จะถูกกักไว้ในถังหมัก ส่วนอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่ารูพรุนจะถูกดึงผ่านเยื่อแผ่นโดยการปั๊ม พบว่าวิธีนี้สามารถผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นสูงมากได้ [8,9] Suzuki และคณะ [10] เสนอการหมักโดยใช้ stirred ceramic membrane reactor ซึ่งเยื่อแผ่นเซรามิคภายในถังหมักจะถูกแบ่งออกเป็นสองชุดสลับกันทำงานโดยการควบคุมอัตโนมัติ ชุดหนึ่งทำหน้าที่กรองอีกชุดจะทำหน้าที่ให้อากาศผ่านทางเยื่อแผ่น ซึ่งแรงดันอากาศที่ผ่านออกมาทางรูพรุนของเยื่อแผ่นจะดันอนุภาคที่เกาะอยู่บริเวณผิวของเยื่อแผ่นจากการกรองให้หลุดออกจะเป็นการลดการอุดตันและทำให้อัตราการกรองสูง Suzuki ได้ใช้ระบบนี้ในการผลิตเอทานอล โดยทำการเลี้ยงเซลล์แบบกึ่งกะ (fed batch) มีการกรองน้ำหมักผ่านเยื่อแผ่นและควบคุมการเติมสารอาหารเข้าระบบเป็นช่วงๆ โดยวิธีการควบคุมค่าความเป็นกรดต่างในระบบให้คงที่ (pH-stat) และจากค่า  $\text{CO}_2$  ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก การควบคุมการป้อนสารอาหารด้วยวิธีการนี้ ทำให้เกิดปัญหาในการดำเนินการระยะยาวคือ ปริมาณสารอาหารที่ป้อนเข้าสู่ถังหมักไม่สมดุลกับปริมาณเพอมีเอทที่ผ่านเยื่อแผ่น

ออกมา อัตราการป้อนสูงกว่าอัตราการดิ่งน้ำหมักออกเนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไปอัตราการกรองจะลดลงจากการที่เซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้นและเกิดการอุดตันที่บริเวณผิวของเยื่อแผ่น ทำให้ปริมาตรในถังหมักสูงขึ้นเกิดการล้นของน้ำหมักจากระบบได้ง่าย

งานวิจัยนี้จะทำการเลี้ยงเซลล์ยีสต์โดยใช้ระบบ SCMR เช่นกัน แต่จะควบคุมการป้อนสารอาหารโดยการปรับอัตราการป้อนสารอาหารให้เท่ากับอัตราการดิ่งน้ำหมักออกจากระบบ โดยการปรับ dilution rate และทำการทดลองเพิ่มความเข้มข้นสารอาหารที่ป้อนเข้าสู่ระบบ จากที่ความเข้มข้นต่ำไปสูง เพื่อป้องกันการสูญเสียอาหารออกจากระบบเมื่อเริ่มการเลี้ยงและป้องกันการขาดอาหารของเซลล์เมื่อเซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำตาลในสารป้อนจะพิจารณาจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลืออยู่ภายในถังหมักที่เวลาต่าง ๆ

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการทดลองคือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกเชื้อของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย อาหารที่ใช้สำหรับเตรียมเชื้อเริ่มต้น (seed culture) คือ อาหารสังเคราะห์ sabouraud dextrose broth (SDB) ปริมาณ 30 g ในน้ำกลั่น 1000 ml สำหรับอาหารที่ใช้ป้อนเข้าสู่ถังหมักมีส่วนประกอบดังนี้; น้ำตาลกลูโคส 20, 40, 70 หรือ 100 g, yeast extract 8.5 g,  $\text{NH}_4\text{Cl}_2$  1.3 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.12 g,  $\text{CaCl}_2$  0.06g และน้ำกลั่น 1000 ml

### 2. ชุดอุปกรณ์การหมักและการติดตั้งเยื่อแผ่นเซรามิก

#### 2.1 เยื่อแผ่นเซรามิก

เยื่อแผ่นเซรามิกที่ใช้ในระบบ SCMR มีลักษณะเป็นท่อทำมาจาก  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (INAX Co. Ltd., Japan) มีขนาดรูพรุน 5  $\mu\text{m}$  มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก และความยาวท่อเท่ากับ 7, 10 และ 76 mm ตามลำดับ และมีพื้นที่โดยรวมต่อเยื่อแผ่นเซรามิก 1 แห่งเท่ากับ 2028 ( $\text{mm}$ )<sup>2</sup>

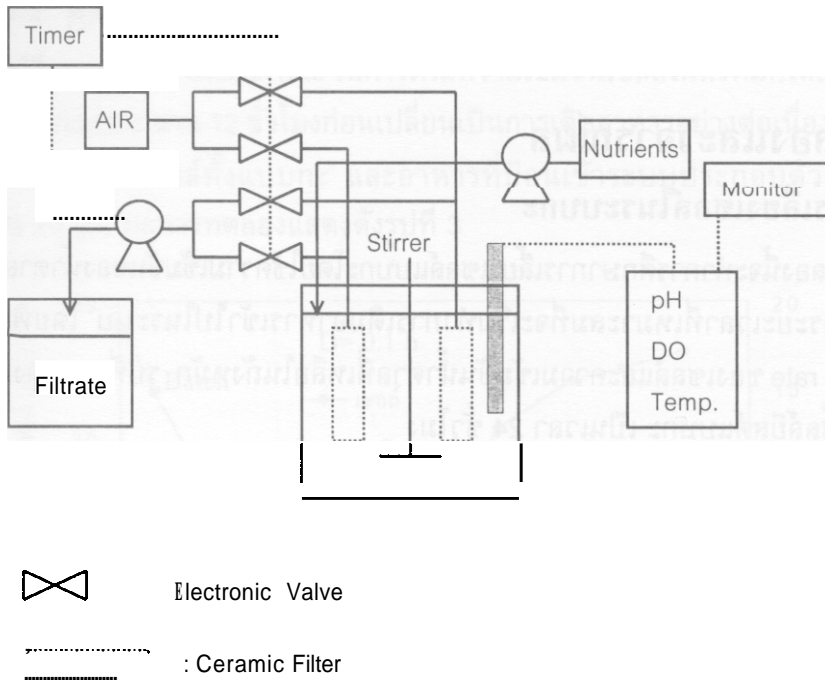
#### 2.2 ระบบ SCMR

รูปที่ 1 แสดงแผนภาพของระบบ SCMR ซึ่งประกอบด้วยอุปกรณ์ต่างๆ ดังนี้

- ก. ถังหมักที่มีขนาด 2.5 L ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co.,Ltd., Model M-100 Eyela Mini Jar Fermentor ประเทศญี่ปุ่น
- ข. ระบบควบคุมการให้อากาศ
- ค. ระบบควบคุมการป้อนสารอาหาร
- ง. ระบบควบคุมฟอง, อุณหภูมิ และความเป็นกรดต่างอัตโนมัติ



ภายในถังหมักจะทำการติดตั้งเยื่อแผ่นเซรามิคจำนวน 6 ท่อ ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชุดๆ ละ 3 ท่อ ชุดแรกจะทำหน้าที่กรองส่วนซึ่งเป็นสารละลายที่ประกอบด้วยสารที่มีขนาดเล็กกว่ารูพรุนของเยื่อแผ่นออกจากน้ำหมัก ส่วนอีกชุดหนึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการให้อากาศ เนื่องจากรูพรุนของเยื่อแผ่นมีขนาดเล็ก ดังนั้นฟองอากาศที่ออกจากแท่งเซรามิคนี้จะมีขนาดเล็กมาก จึงทำให้การแพร่ของอากาศไปยังเซลล์เกิดขึ้นได้ดี ท่อเซรามิคทั้งสองชุดจะทำงานสลับกันโดยการควบคุมของ electronic valve ซึ่งต่ออยู่กับ timer



รูปที่ 1 แสดงแผนภาพของระบบ SCMR ในการเลี้ยงเซลล์ยีสต์

### 3. การเลี้ยงเซลล์ในระบบกะ

อาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ (feed medium) ในถังหมัก ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 20 g/L และส่วนประกอบอื่นตามหัวข้อที่ 1 ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 ml เติมน้ำในถังหมักขนาด 2.5 L ปรับ pH เป็น 5.5 แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูงที่ 121 °C ความดัน 15 lb/in<sup>2</sup> เป็นเวลา 15 นาที ปลดปล่อยไอน้ำให้เย็นแล้วเติม seed culture ที่เตรียมไว้ลงในถังหมัก (ปริมาณยีสต์เริ่มต้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร) ทำการเลี้ยงเซลล์แบบกะ โดยมีการให้อากาศผ่านเยื่อแผ่นเซรามิค อัตราการกวน 300 rpm ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 4.5-5.5 และรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 30 °C เก็บตัวอย่างจากน้ำหมักเป็นช่วงๆ นำมาวิเคราะห์ความเข้มข้นเซลล์ยีสต์และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในถังหมัก

### 4. การเลี้ยงเซลล์ในระบบ SCMR

การเลี้ยงเซลล์ในระบบ SCMR จะทำการเลี้ยงเซลล์แบบกะตามหัวข้อที่ 3 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนมาเป็นการเลี้ยงโดยใช้ระบบ SCMR โดยมีการสลับให้อากาศและการกรองผ่านเยื่อ

แผ่นเซรามิกทุกๆ 15 นาที และมีการเติมอาหารอย่างต่อเนื่อง ตัวแปรต่างๆ ที่ทำการศึกษาคือ ผลของ dilution rate ( $0.1, 0.2$  และ  $0.25 \text{ h}^{-1}$ ), ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น ( $20, 40$  และ  $70 \text{ g/L}$ ) และศึกษารูปแบบการเติมน้ำตาลกลูโคสในถังหมัก

## 5. การวิเคราะห์

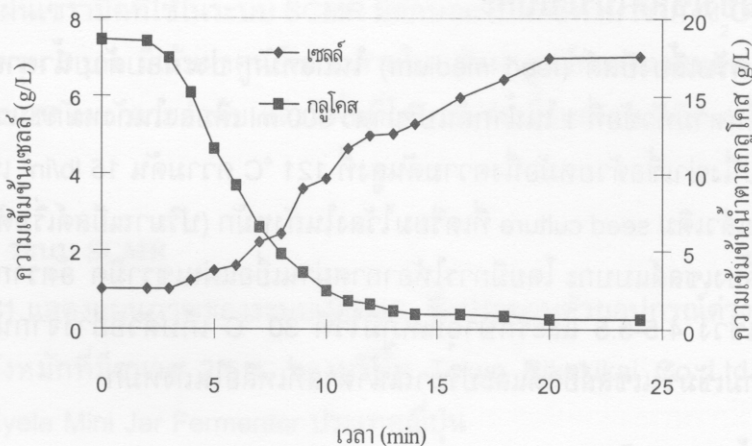
การวัดปริมาณของยีสต์ใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง Spectronic ของ Bausch and Lomb สหรัฐอเมริกา ที่ความยาวคลื่น  $560 \text{ nm}$  ส่วนการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสใช้วิธีของ Somogyi-Nelson [11] โดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

## ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

### 1. การเลี้ยงเซลล์ในระบบกะ

การทดลองนี้จะทำการศึกษาการเลี้ยงเซลล์แบบกะโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น  $20 \text{ g/L}$  เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะเริ่มทำการเติมอาหารเข้าไปในระบบ โดยพิจารณาจากค่า specific growth rate ของเซลล์และความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือในถังหมัก รูปที่ 2 แสดงผลการทดลองที่ได้จากเลี้ยงเซลล์ยีสต์แบบกะ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากการทดลองเมื่อเติมยีสต์เริ่มต้นลงไปในถังหมักแบบกะ พบว่าในชั่วโมงที่ 4 เซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะ log phase สามารถคำนวณค่า specific growth rate ( $\mu$ ) ได้  $0.08 \text{ h}^{-1}$  และน้ำตาลที่เหลือในระบบเท่ากับ  $15 \text{ g/L}$  ซึ่งยังสูงอยู่จึงทำการเลี้ยงเซลล์ต่อไปโดยมีการคำนวณค่า  $\mu$  เป็นช่วงๆ พบว่าในช่วงชั่วโมงที่ 8-12 จะได้ค่า  $\mu$  เท่ากับ  $0.26 \text{ h}^{-1}$  ซึ่งมีค่าสูงสุด และค่า  $\mu$  จะลดลงเรื่อยๆ หลังชั่วโมงที่ 13 ดังนั้นจากการทดลองจะเลือกช่วงเวลา 8-12 ชั่วโมงในการเติมน้ำตาลอย่างต่อเนื่อง เพราะเป็นช่วงเวลาที่ได้ค่า  $\mu$  สูงสุด



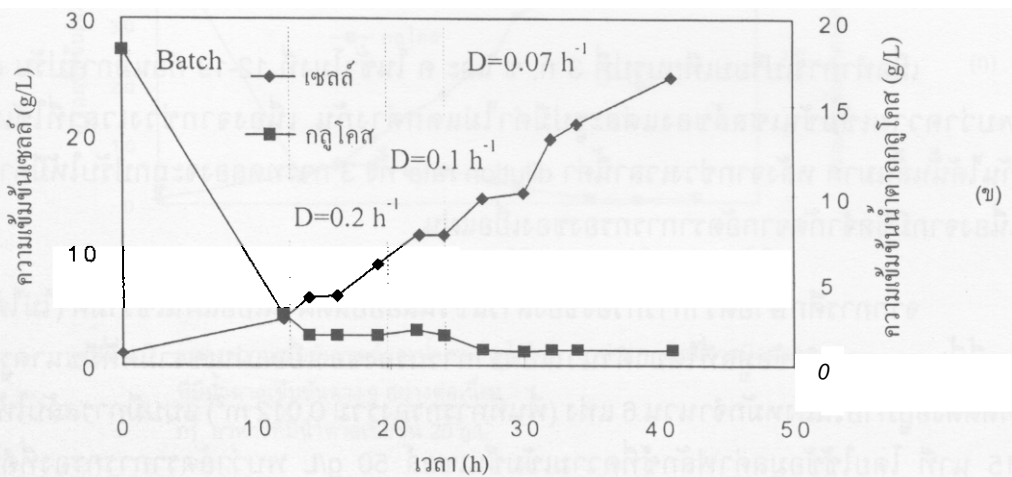
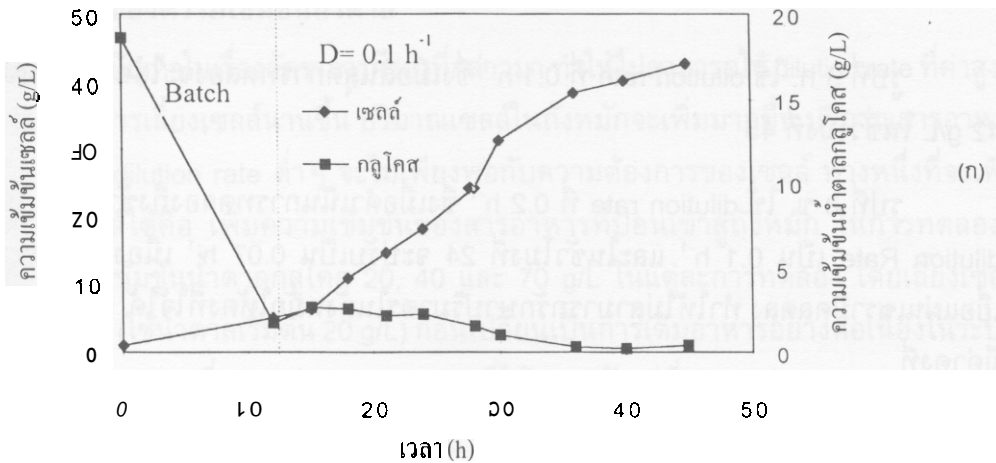
รูปที่ 2 แสดงความเข้มข้นเซลล์ที่ได้และความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือในถังหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ในระบบกะ (ปริมาณยีสต์เริ่มต้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร)

## 2. การเลี้ยงเซลล์ในระบบ SCMR

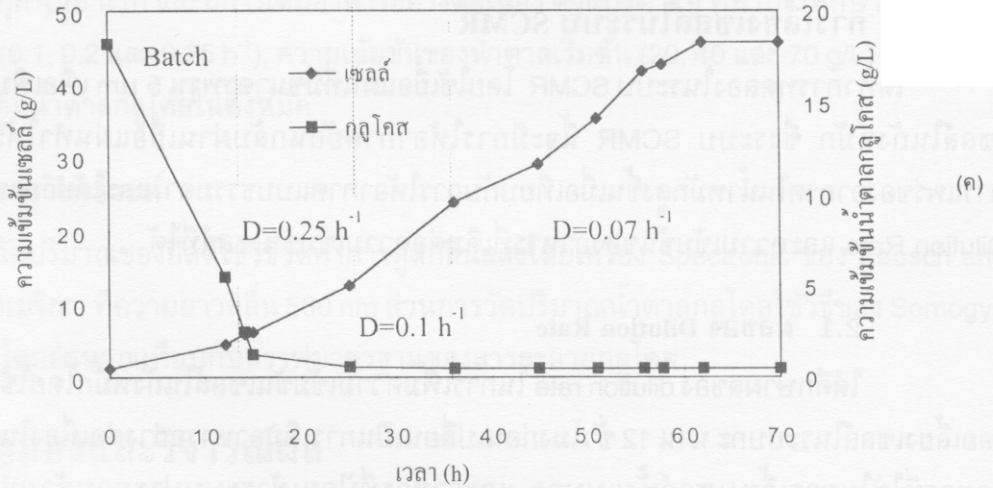
ได้ทำการทดลองในระบบ SCMR โดยใช้เยื่อแผ่นที่มีขนาดรูพรุน  $5 \mu\text{m}$  เพื่อเพิ่มความเข้มข้นเซลล์ในถังหมัก ซึ่งระบบ SCMR นี้จะมีการให้อากาศย้อนกลับผ่านเยื่อแผ่นทำให้มีสัมประสิทธิ์การแพร่ของอากาศในน้ำหมักสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการให้อากาศแบบธรรมดา และได้ทำการศึกษาผลของ Dilution Rate และความเข้มข้นของอาหารที่เติมต่อความเข้มข้นเซลล์ที่ได้

### 2.1 ผลของ Dilution Rate

ได้ศึกษาผลของ dilution rate ในการเพิ่มความเข้มข้นเซลล์ในถังหมักโดยใช้ระบบ SCMR โดยเลี้ยงเซลล์ในระบบกะ นาน 12 ชั่วโมงก่อนเปลี่ยนเป็นการเติมอาหารอย่างต่อเนื่องในระบบ SCMR อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ทั้งแบบกะ และอาหารที่ป้อนเข้าระบบประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ที่ความเข้มข้น  $20 \text{ g/L}$  ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงความเข้มข้นเซลล์และน้ำตาลกลูโคสที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ในระบบ SCMR โดยใช้ค่า dilution rate ต่างๆ  
 ก) dilution rate ที่  $0.1 \text{ h}^{-1}$   
 ข) dilution rate ที่  $0.2 \text{ h}^{-1}$  (ปรับเป็น  $0.1 \text{ h}^{-1}$  ในชั่วโมงที่ 19 และในชั่วโมงที่ 24 เป็น  $0.07 \text{ h}^{-1}$ )



รูปที่ 3 (ต่อ) แสดงความเข้มข้นเซลล์และน้ำตาลกลูโคสที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ในระบบ SCMR โดยใช้ค่า dilution rate ต่างๆ  
 ค) dilution rate ที่  $0.25 \text{ h}^{-1}$  (ปรับเป็น  $0.1 \text{ h}^{-1}$  ในช่วงเวลาที่ 25 และในช่วงเวลาที่ 36 เป็น  $0.07 \text{ h}^{-1}$ )

รูปที่ 3 ก. ใช้ dilution rate ที่  $0.1 \text{ h}^{-1}$  ซึ่งเมื่อสิ้นสุดการทดลองจะได้ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 42 g/L ในช่วงเวลาที่ 45

รูปที่ 3 ข. ใช้ dilution rate ที่  $0.2 \text{ h}^{-1}$  ซึ่งเมื่อดำเนินการทดลองถึงช่วงเวลาที่ 19 จะมีการปรับ dilution Rate เป็น  $0.1 \text{ h}^{-1}$  และในช่วงเวลาที่ 24 จะปรับเป็น  $0.07 \text{ h}^{-1}$  เนื่องจากอัตราการกรองผ่านเยื่อแผ่นเซรามิกลดลง ทำให้ไม่สามารถรักษาปริมาตรในถังหมักให้คงที่ไว้ได้ ถ้ายังคงให้ dilution rate มีค่าคงที่

รูปที่ 3 ค. ใช้ dilution rate ที่  $0.25 \text{ h}^{-1}$  ซึ่งเมื่อดำเนินการทดลองถึงช่วงเวลาที่ 25 จะมีการปรับ dilution rate เป็น  $0.1 \text{ h}^{-1}$  และในช่วงเวลาที่ 36 จะปรับเป็น  $0.07 \text{ h}^{-1}$  ด้วยเหตุผลเช่นเดียวกับที่ dilution rate  $0.2 \text{ h}^{-1}$

เมื่อทำการเปรียบเทียบรูปที่ 3 ก, ข และ ค ในช่วงเวลาที่ 12-19 ก่อนมีการปรับ dilution rate พบว่าความเข้มข้นเซลล์ของแต่ละรูปมีค่าไม่แตกต่างกัน เนื่องจากช่วงเวลาที่ใช้เปรียบเทียบกันได้นั้นสั้นมาก หลังจากช่วงเวลานี้ค่า dilution rate ทั้ง 3 การทดลองจะถูกปรับให้มีค่าใกล้เคียงกัน เนื่องจากมีขีดจำกัดจากอัตราการกรองของเยื่อแผ่น

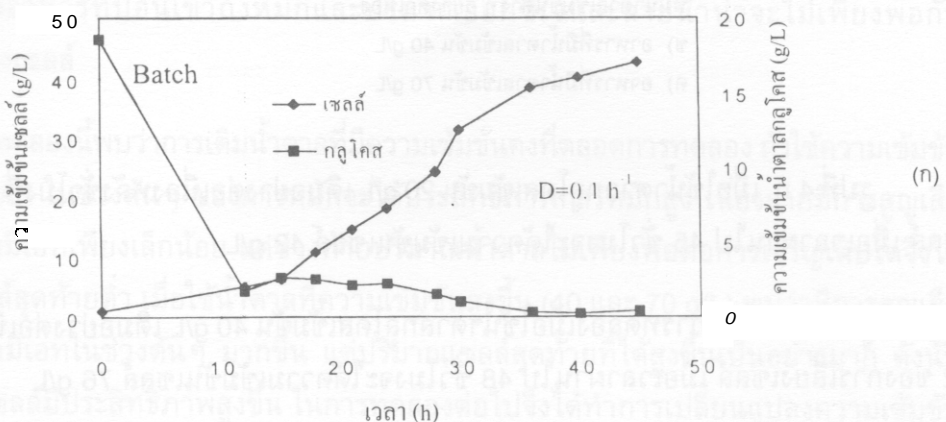
จากการศึกษาอัตราการกรองของสารแขวนลอยยีสต์ผ่านเยื่อแผ่นเซรามิก (ไม่ได้แสดงข้อมูลในที่นี้) สามารถนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณอัตราการกรองของเยื่อแผ่นเซรามิกที่มีขนาดรูพรุน  $5 \mu\text{m}$  ที่ติดตั้งอยู่ภายในถังหมักจำนวน 6 แห่ง (พื้นที่การกรองรวม  $0.012 \text{ m}^2$ ) แบบมีการสลับให้อากาศทุกๆ 15 นาที โดยใช้ข้อมูลค่าฟลักซ์ที่ความเข้มข้นเซลล์ 50 g/L พบว่าอัตราการกรองที่คำนวณได้คือ



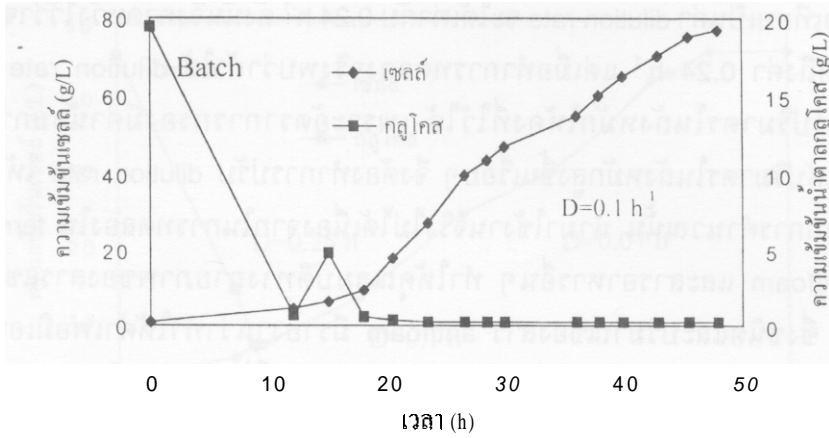
0.24 L/h หรือเมื่อเทียบเป็นค่า dilution rate จะได้เท่ากับ  $0.24 \text{ h}^{-1}$  ดังนั้นจึงคาดหวังไว้ว่าจะสามารถใช้ dilution rate ได้ถึงค่า  $0.24 \text{ h}^{-1}$  แต่เมื่อทำการทดลองจริงพบว่าถ้าใช้ dilution rate ในช่วงนี้จะไม่สามารถรักษาปริมาตรในถังหมักให้คงที่ไว้ได้ เพราะอัตราการกรองมีค่าน้อยกว่าอัตราการป้อนอาหาร ทำให้ปริมาตรในถังหมักสูงขึ้นเรื่อยๆ จึงต้องทำการปรับ dilution rate ให้ต่ำลง ซึ่งค่า dilution rate จากการคำนวณนั้น นำมาใช้งานจริงไม่ได้เนื่องจากการทดลองใน fermentor จะมีการเติมสาร antifoam และสารอาหารอื่นๆ ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพของสารแขวนลอยยีสต์เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งชนิดและปริมาณของสาร antifoam มีรายงานว่าทำให้ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ของเยื่อแผ่นลดลง [12] และสารอาหารอาจทำให้เกิดการอุดตันของเยื่อแผ่นมีผลให้ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ลดลง โดยในการศึกษาอัตราการกรองยีสต์ผ่านเยื่อแผ่นเซรามิกนั้นจะไม่มีมีการเติมสาร antifoam และเซลล์ที่ใช้จะทำการล้างเซลล์ 3 ครั้งก่อนทำการทดลองจึงทำให้ dilution rate จากการคำนวณนั้นไม่สามารถนำมาใช้งานจริงได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้ dilution rate ที่  $0.1 \text{ h}^{-1}$  ในการทดลองต่อไป

## 2.2 ผลของความเข้มข้นน้ำตาล

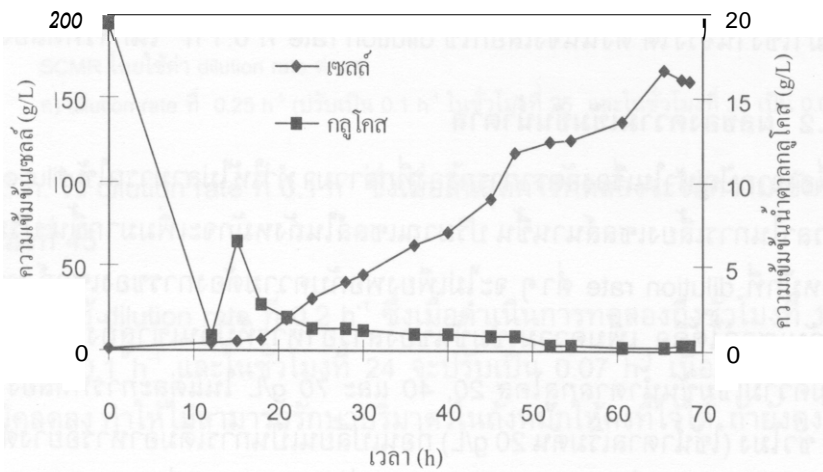
เนื่องจากปัญหาในเรื่องอัตราการกรองที่กล่าวมา ทำให้ไม่สามารถใช้ dilution rate ที่ค่าสูงๆ ได้ เมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์นานขึ้น ปริมาณเซลล์ในถังหมักจะเพิ่มมากขึ้น ปริมาณสารอาหารที่ป้อนเข้าสู่ถังหมักที่ dilution rate ต่างๆ จะไม่เพียงพอกับความต้องการของเซลล์ ทางหนึ่งที่จะเพิ่มสารอาหารให้กับเซลล์ได้คือ เพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารที่ป้อนเข้าสู่ถังหมัก ในการทดลองนี้ได้ใช้อาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 20, 40 และ 70 g/L ในแต่ละการทดลอง โดยเลี้ยงเซลล์ในระบบกะ 12 ชั่วโมง (ใช้น้ำตาลเริ่มต้น 20 g/L) ก่อนเปลี่ยนเป็นการเติมอาหารอย่างต่อเนื่องในระบบ SCMR โดยคง dilution rate ที่  $0.1 \text{ h}^{-1}$  ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงความเข้มข้นเซลล์และน้ำตาลกลูโคสที่เวลาต่างๆ เมื่อมีการป้อนอาหารที่มีน้ำตาลเข้มข้นต่างๆ อย่างต่อเนื่อง  
 ก) อาหารที่มีน้ำตาลเข้มข้น 20 g/L



(ข)



(ค)

รูปที่ 4 (ต่อ) แสดงความเข้มข้นเซลล์และน้ำตาลกลูโคสที่เวลาต่างๆ เมื่อมีการป้อนอาหารที่มีน้ำตาลเข้มข้นต่างๆ อย่างต่อเนื่อง  
 ข) อาหารที่มีน้ำตาลเข้มข้น 40 g/L  
 ค) อาหารที่มีน้ำตาลเข้มข้น 70 g/L

รูปที่ 4 ก. เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 20 g/L เติมอย่างต่อเนื่องหลังชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเซลล์ เมื่อเวลาผ่านไป 45 ชั่วโมงจะได้ความเข้มข้นเซลล์ 42 g/L

รูปที่ 4 ข. จากการทดลองเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 40 g/L เติมอย่างต่อเนื่องหลังชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเซลล์ เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงจะได้ความเข้มข้นเซลล์ 76 g/L

รูปที่ 4 ค. เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 70 g/L เติมอย่างต่อเนื่องหลังชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเซลล์ เมื่อเวลาผ่านไป 68 ชั่วโมงจะได้ความเข้มข้นเซลล์ 160 g/L โดยมีการปรับ dilution rate ให้ลดลงเป็น  $0.05 \text{ h}^{-1}$  ในชั่วโมงที่ 58



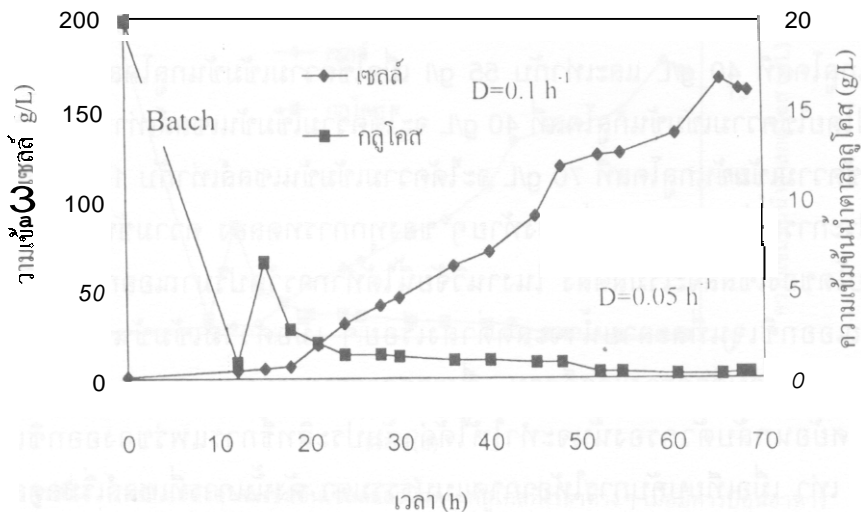
จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบเซลล์ในชั่วโมงที่ 12-20 นั้น จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นเซลล์ในแต่ละการทดลองไม่แตกต่างกันและเมื่อใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้น 40 และ 70 g/L จะมีความเข้มข้นน้ำตาลในถังหมักสูงกว่าการทดลองเมื่อใช้น้ำตาลเข้มข้น 20 g/L การเติมน้ำตาลที่ความเข้มข้นสูงขณะที่ความเข้มข้นเซลล์ยังน้อยอยู่ จะทำให้สูญเสียน้ำตาลออกจากระบบมาก (ความเข้มข้นน้ำตาลในเพอมีเอทจะเท่ากับความเข้มข้นน้ำตาลในถังหมัก) และเมื่อทำการทดลองต่อไปพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสที่ 20 g/L จะให้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 42 g/L ในชั่วโมงที่ 45 ซึ่งในชั่วโมงเดียวกันเมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสที่ 40 และ 70 g/L จะให้ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 75 และ 90 g/L ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นกลูโคส 40 กับ 70 g/L เมื่อดำเนินการทดลองมาถึงชั่วโมงที่ 36 จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นเซลล์ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยเท่ากับ 54 g/L เมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสที่ 40 g/L และเท่ากับ 55 g/L เมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสที่ 70 g/L เมื่อทำการทดลองต่อไปโดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสที่ 40 g/L จะให้ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 76 g/L ในชั่วโมงที่ 48 และเมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสที่ 70 g/L จะให้ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 160 g/L ในชั่วโมงที่ 68 มีข้อสังเกตประการหนึ่งคือ ในช่วงชั่วโมงท้ายๆ ของทุกการทดลอง ความชันของเส้นกราฟที่แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์จะเริ่มลดลง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำด้วยพบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำจะลดต่ำลงเรื่อยๆ เมื่อความเข้มข้นเซลล์สูงขึ้นแม้ว่าจะมีการพ่นอากาศย้อนกลับตัวกรองแล้วก็ตาม ซึ่งจากการรายงานของ Suzuki และคณะ [6] พบว่าการพ่นอากาศย้อนกลับตัวกรองนั้นจะทำให้ได้ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของออกซิเจนในน้ำหมักสูงกว่าเดิม 5 เท่า เมื่อเทียบกับการให้อากาศแบบธรรมดา ดังนั้นการที่เซลล์เริ่มลดลงอาจมีสาเหตุจากปริมาณสารอาหารที่ป้อนเข้าถังหมักและปริมาณออกซิเจนละลายน้ำน่าจะไม่เพียงพอกับความต้องการของเซลล์

จากการทดลองนี้พบว่าการเติมน้ำตาลที่มีความเข้มข้นคงที่ตลอดการทดลอง ถ้าใช้ความเข้มข้นน้ำตาลต่ำ (20 g/L) ในช่วงต้นๆ ของการหมักจะได้ประสิทธิภาพการหมักสูง เนื่องจากการสูญเสียน้ำตาลไปกับเพอมีเอทเพียงเล็กน้อย แต่ช่วงท้ายปริมาณน้ำตาลไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตจึงได้ความเข้มข้นเซลล์สุดท้ายต่ำ เมื่อใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (40 และ 70 g/L) พบว่ามีการสูญเสียน้ำตาลไปกับเพอมีเอทในช่วงต้นๆ มากขึ้น แต่ปริมาณเซลล์สุดท้ายที่ได้สูงขึ้นเป็นอย่างมาก ดังนั้นเพื่อให้การผลิตเซลล์มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ในการทดลองต่อไปจึงได้ทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นน้ำตาลที่ป้อนเข้าถังหมักจากความเข้มข้นต่ำไปสูงให้เหมาะสมกับการเพิ่มขึ้นของเซลล์

### 3. รูปแบบการเติมน้ำตาลกลูโคสในถังหมัก

รูปที่ 5 แสดงผลของการเติมสารอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 40, 70 และ 100 g/L ตามลำดับ ในระบบการหมักแบบ SCMR ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 g/L เมื่อถึงชั่วโมงที่ 12 ซึ่งความเข้มข้นน้ำตาลในถังหมักต่ำกว่า 1 g/L จึงเริ่มป้อนสารอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 40 g/L ที่ dilution rate  $0.1 \text{ h}^{-1}$  จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 23 เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลในถังหมักต่ำกว่า 1 g/L จึงเปลี่ยนไปป้อนสารอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 70 g/L ที่ dilution rate  $0.1 \text{ h}^{-1}$  จนถึงชั่วโมงที่ 38 เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลในถังหมักต่ำกว่า 1 g/L จึงเปลี่ยนไปป้อนสารอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 100 g/L ที่ dilution rate  $0.1 \text{ h}^{-1}$  และปรับเป็น  $0.05 \text{ h}^{-1}$  ที่ชั่วโมงที่ 45 เนื่องจากไม่สามารถรักษาปริมาตรในถังหมักให้คงที่ได้



รูปที่ 5 แสดงผลของการเติมน้ำตาลเข้มข้น 40, 70 และ 100 g/L ต่อความเข้มข้นเซลล์โดยเติมน้ำตาลเข้มข้น 40 g/L ในชั่วโมงที่ 12, 70 g/L ในชั่วโมงที่ 23 และ 100 g/L ในชั่วโมงที่ 38

จากรูปที่ 5 เมื่อสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่ 55 พบว่าจะได้ความเข้มข้นเซลล์ 136 g/L อัตราการผลิต 2.48 g/L-h และ Yield (g cell/g substrate) เท่ากับ 0.48

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบค่าอัตราการผลิตในการหมัก SCMR แบบการป้อนสารอาหารที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสกับการเติมน้ำตาลที่มีความเข้มข้นเดียวตลอดการทดลอง พบว่า การเติมน้ำตาลแบบเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นที่ป้อนเข้าในช่วงเวลาต่างๆ นั้น ให้ค่าอัตราการผลิตและค่า yield ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเซลล์ สูงกว่าการเติมสารอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสคงที่

ตารางที่ 1 แสดงค่าอัตราการผลิตและค่า Yield ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเซลล์ของการผลิตเซลล์ยีสต์ในระบบ SCMR ที่มีการป้อนสารอาหารที่ความเข้มข้นน้ำตาลคงที่ที่ 20, 40 และ 70 g/L และแบบที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ป้อนเข้าถังหมักที่ช่วงเวลาต่างๆ (โดยเปรียบเทียบกับ  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  และคิดค่าอัตราการผลิตตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดการทดลอง)

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสในอาหารที่ป้อนเข้าถังหมัก	อัตราการผลิต (g cell/L-h.)	Yield (g cell/g substrate)	ความเข้มข้นเซลล์สุดท้าย (g/L)
Batch (20 g/L)	0.29	0.35	7.02 (\$ 24 ชั่วโมง)
คงที่ที่ 20 g/L (SCMR)	0.95	0.42	42.6 (6 45 ชั่วโมง)
คงที่ที่ 40 g/L (SCMR)	1.6	0.49	76.96 (ที่ 48 ชั่วโมง)
คงที่ที่ 70 g/L (SCMR)	2.34	0.47	159.5 (ที่ 68.5 ชั่วโมง)
เปลี่ยนแปลงจาก 40, 73 และ 100 g/L (SCMR)	2.48	0.48	136 (ที่ 55 ชั่วโมง)

อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองในรูปที่ 5 จะเห็นได้ว่าการสูญเสียน้ำตาลออกไปกับเพอมีเอทค่อนข้างมาก โดยเฉพาะในช่วงที่เปลี่ยนความเข้มข้นแสดงว่าช่วงเวลาในการเปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำตาลและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เติม ยังไม่สอดคล้องกับปริมาณเซลล์และอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในถังหมัก ซึ่งชี้ให้เห็นว่าถ้าสามารถปรับความเข้มข้นน้ำตาลและช่วงเวลาในการเปลี่ยนความเข้มข้นให้เหมาะสมมากกว่านี้ จะทำให้ได้อัตราการผลิตและ yield ที่สูงมากขึ้นกว่านี้ได้ ซึ่งสามารถกระทำได้โดยการติดตามปริมาณเซลล์และอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในถังหมักตลอดเวลา และนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหารูปแบบการเติมน้ำตาลที่เหมาะสม

## เอกสารอ้างอิง

1. McGregor, W.C., 1986, Membrane Separation in Biotechnology, New York, Marcel Dekker Inc., pp. 61-301.
2. Cheryan, M. and Mehaia, M.A., 1986, "Membrane Bioreactor," Chemtech, Vol.11, pp 676-681
3. Lee, C.W. and Chang, H.N., 1987, "Kinetic of Ethanol Fermentations in Membrane Cell Recycle Fermentor," Biotechnology and Bioengineering, Vol. 29, pp. 1105-1112.
4. Nipkow, A., Zeikus, J.G., and Gerhardt, P., 1989, "Microfiltration Cell-Recycle Pilot System for Continuous Thermoarobic Production of Exo- $\beta$ -Amylase," Biotechnology and Bioengineering, Vol. 34, pp. 1075-1084.

5. Zeng, A.P., Biebl, H., and Deckwer, W.D., 1991, "Production of 2,3-Butanediol in a Membrane Bioreactor with Cell Recycle," *Applied Microbiology Biotechnology*, Vol. 34, pp. 463-468.
6. Melzoch, K., Rychtera, M., Markvichov, N.S., Pospichalova, V., Basarova, G. and Manakov, M.N., 1991, "Application of a Membrane Recycle Bioreactor for Continuous Ethanol Production," *Applied Microbiology Biotechnology*, Vol. 34, pp. 469-472.
7. Yang, K. and Tsoa, G.T., 1995, "Enhanced Acetone-Butanol Fermentation using Repeated Fed Batch Operation Coupled with Cell Recycle by Membrane and Simultaneous Removal of Inhibitory Product by Adsorption," *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 47, pp. 444-450.
8. Chang, H.N., Lee, W.G., and Kim, B.S., 1993, "Cell Retention Culture with an Internal Filter Module: Continuous Ethanol Fermentation," *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 41, pp. 677-681.
9. Lee, W.G., Lee, Y.S., Chang, H.N., and Chang, Y.K., 1994, "A Cell Retention Internal Filter Reactor for Ethanol Production using Tapioca Hydrolysate," *Biotechnology Technique*, Vol. 8, No. 11, pp. 817-820.
10. Suzuki, T., 1994, "A Dense Cell Retention Culture System using a Stirred Ceramic Membrane Reactor," *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 44, pp. 1186-1192.
11. Nelson, N., 1944, "A Photometric Adaptation of Somogyi Method for the Determination of Glucose," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 153, pp. 375-380.
12. Liew, M.K.H., Fane, A.G., and Roger, P.L., 1997, "Fouling Effects of Yeast Culture with Antifoam Agents on Microfilters," *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 53, pp. 10-16.