บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักแบบเฟดแบชเพื่อการผลิต P(3HB-co-3HV) มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตของสารผลิตภัณฑ์ต่อหน่วยเวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อ และลดเวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อ นั่นคือสามารถทำให้อัตราการผลิตสูงขึ้นเนื่องจาก P(3HB-co-3HV) ถูกผลิตขึ้นภายในเซลล์ ดังนั้นการทำให้เซลล์มีปริมาณมากหรือมีความหนาแน่นเซลล์สูงจึงเป็นวิธีที่เพิ่มการผลิตโคพอลิเมอร์ให้ได้มากขึ้นด้วย วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชเป็นวิธีซึ่งสามารถเลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาณเซลล์สูงขึ้น โดยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการจากที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ และสรุปผลได้ดังต่อไปนี้

1. การเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) ในขวดเขย่า

เนื่องจากจุลินทรีย์มีกิจกรรมของเซลล์ และอัตราการเจริญ แตกต่างกันตามช่วงระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นความสามารถของเซลล์ช่วงอายุแตกต่างกันจึงมีความสามารถในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้แตกต่างกัน จุลินทรีย์ที่อยู่ในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ จะมีกิจกรรมภายในเซลล์ที่ดีกว่าการเจริญในช่วงอื่น รูปแบบการเจริญของ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารสำหรับกล้าเชื้อ พบว่าเชื้อมีการเจริญได้ช้าในช่วงแรก (ชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 6) ซึ่งเชื้ออยู่ในช่วงการปรับตัวให้เข้าสู่สิ่งแวดล้อมใหม่ (lag phase) เพราะต้องเริ่มปรับตัวในการเจริญจากอาหารแข็ง (nutrient agar) มาเจริญในอาหารเหลว (seed medium) ช่วงต่อมาเชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว (ชั่วโมงที่ 12 ถึง ชั่วโมงที่ 30) จนกระทั่งการเจริญช้าลงและเริ่มคงที่ (ชั่วโมงที่ 36 ถึง 60) (รูปที่ 9) เมื่อพิจารณาจากรูปแบบการเจริญแล้วเซลล์ที่อายุเหมาะสมควรอยู่ในชั่วโมงที่ 18 ถึง 36 เนื่องจากอยู่ในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ (log phase)เพราะว่ากิจกรรมของเซลล์มีมากที่สุดในช่วงเวลานี้ ผู้วิจัยจึงศึกษาพบว่ากล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงมีการเจริญได้ดีที่สุด ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และโคพอลิเมอร์สูงสุด คือ 7.44 และ 2.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนกล้าเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง มีการเจริญที่ช้ากว่า ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง และ

โคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 6.90 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 60 (ตารางที่ 5) การที่เชื้อมีการเจริญที่ช้าอาจเนื่องมาจากอายุกล้าเชื้อยังน้อยเกินไป (อยู่ในช่วงแรกของการเจริญแบบทวีคูณ) การปรับตัวในอาหารใหม่จึงยังไม่ดีเท่ากับเชื้อที่มีอายุมากขึ้น ส่วนกล้าเชื้ออายุ 30 และ 36 ชั่วโมง อยู่ในช่วงปลายของช่วงการเจริญแบบทวีคูณ ทำให้ได้ทั้งปริมาณเซลล์และปริมาณ P(3HB-co-3HV) ไม่สูง กล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ให้ค่าอัตราการผลิตที่ได้สูงสุดเท่ากับ 0.041 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนกล้าเชื้ออายุ 18 30 และ 36 ชั่วโมง ได้ค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.033 0.039 และ 0.018 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ดังตารางที่ 6) ชนัญ ผลประไพ(2537) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต PHB โดยใช้เชื้อสายพันธุ์เดียวกัน ได้ใช้กล้าเชื้ออายุ 30 ชั่วโมง ซึ่งมีความแตกต่างจากรายงานวิจัยนี้ที่เป็นการผลิต P(3HB-co-3HV) ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนที่เป็นกรดวาเลอริกอยู่ด้วย กล้าเชื้อที่อายุน้อยกว่าอาจจะสามารถทนต่อความเป็นกรด ได้ดีกว่ากล้าเชื้อที่อายุมากกว่าก็อาจเป็นได้ Lefebvre และคณะ (1997) รายงานการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* เพื่อผลิต P(3HB-co-3HV) ในถังหมัก โดยใช้กล้าเชื้ออายุ 20-24 ชั่วโมง ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้

2. การหาภาวะที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenese* sp. A-04 ในถังหมัก เพื่อการผลิต โคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)

การศึกษาผลของปริมาณกล้าเชื้อต่อการเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) มีความสำคัญในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมจะทำให้กล้าเชื้อสามารถเจริญ และผลิตสารได้ในเวลารวดเร็ว นั่นคือจะทำให้การเจริญในช่วงการเจริญแบบทวีคูณสั้น ช่วยลดเวลาในการเลี้ยงเชื้อ การทดลองนี้จึงแปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นตั้งแต่ 1.5 1.7 1.8 และ1.9 กรัมต่อลิตร พบว่าการทดลองที่มีปริมาณเซลล์ 1.5 กรัมต่อลิตร เจริญได้ดีโดยพบว่าไม่มีช่วงของการเจริญแบบพักตัว (lag phase) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 10.28 กรัมต่อลิตร ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 4.50 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 42 และ 48 ตามลำดับ การทดลองที่มีกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.7 กรัมต่อลิตร ไม่มีระยะพักตัวเช่นกัน ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 11.22 กรัมต่อลิตร และ 5.44 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดในงานวิจัยนี้ การทดลองที่มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.8 กรัมต่อลิตร มีการเจริญโดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 9.78 และ 4.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการทดลองที่มีปริมาณกล้าเชื้อเท่ากับ 1.9 กรัมต่อลิตร มีการเจริญให้น้ำหนัก

เซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.2 กรัมต่อลิตร และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 3.87 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 (ตารางที่ 8) เมื่อปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่สูงมากๆ (1.8 และ 1.9 กรัมต่อลิตร) เชื้อมีการเจริญ โดยการให้น้ำหนักเซลล์แห้งรวมทั้งปริมาณโคพอลิเมอร์ไม่ดีเท่ากับการทดลองที่มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.7 กรัมต่อลิตร เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์จะดีนั้นควรมีปริมาณของเซลล์ที่พอเหมาะกับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ และถ้าเซลล์มากเกินไปอาจมีการสะสมสารที่เป็นตัวยับยั้งการเจริญสูงขึ้นตามไปด้วย Yamane และคณะ(1995) ต้องการเพิ่มการผลิต PHB เพื่อให้มีอัตราการผลิตสูงใน *Alcaligenes latus* DSM 1123 ได้อ้างถึงปริมาณของกล้าเชื้อเริ่มต้นว่ามีบทบาทสำคัญในการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้อให้ได้อัตราการการเจริญจำเพาะคงที่ซึ่งสามารถทำได้โดยการเติมสารอาหารที่เหมาะสม จะได้ความ สัมพันธ์ระหว่างเซลล์ เวลา ปริมาตรของอาหาร และอัตราการเจริญจำเพาะคือ

$$t = \{\ln(X/X_0) + \ln(V/V_0)\} / \mu$$

และเมื่อการเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงปริมาตรน้อยมาก เทอมของ $\ln(V/V_0)$ จึงมีค่าน้อยมาก ดังนั้นจากสมการนี้สามารถบอกได้ว่าเมื่อมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นมากจะทำให้เวลาในการเลี้ยงสั้นลง จากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มากเกินไปก็จะทำให้การเจริญและการผลิตโคพอลิเมอร์ไม่มีประสิทธิภาพเช่นกัน

ความเป็นกรดด่างมีผลต่อการเจริญ และการสะสมโคพอลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่าง (ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 10.22 กรัมต่อลิตร และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 4.85 กรัมต่อลิตร รูปแบบของค่าความเป็นกรดด่างเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตั้งแต่ 7.0 ถึง 8.9 การเลี้ยงที่ควบคุมความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 ซึ่งมีความเป็นกรด ทำให้การเจริญเป็นไปอย่างช้า ซึ่งให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเพียง 4.62 และ 2.12 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การเลี้ยงเชื้อโดยควบคุมความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 7.0 ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 10.98 และ 5.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ดีที่สุด ส่วนการเลี้ยงที่ควบคุมความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 ได้ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 10.58 และ 3.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 36 ดังนั้นการทดลองที่ควบคุมความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทดลองนี้ Kim และคณะ (1992) ได้ศึกษาผลของกรดโพรพิโอนิกต่อการผลิต P(3HB-co-3HV) จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17699 โดยควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นกลางโดยเติมกรดซัลฟูริกให้สมมูลกับปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ถูกใช้ไป Chung และคณะ (1996) ได้รายงานผลการเลี้ยง

Alcaligenes eutrophus เพื่อการผลิต P(3HB-co-3HV) ใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยควบคุมความเป็นกรดด่าง พบว่ากรดโพรพิโอนิกในปริมาณมากกว่า 0.5 กรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการเจริญ แต่สามารถทำให้เชื้อมีการเจริญดีได้ถ้าควบคุมความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 แต่ถ้าค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 พบว่าเชื้อไม่มีการเจริญ

การผลิตโคพอลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 จำเป็นต้องให้กรดอินทรีย์ (กรดวาเลอริก) เป็นซับสเตรต เพื่อเป็นโครงสร้างหลักของโมโนเมอร์ 3HV เนื่องจากในงานของ อัญชนา ศุรติขจร (2537) พบว่าฟรักโตส และกรดวาเลอริกเป็นซับสเตรตซึ่งเหมาะสมสำหรับผลิต P(3HB-co-3HV) การศึกษานี้จึงได้แปรผันอัตราส่วนของฟรักโตสต่อวาเลอริก เท่ากับ 15:5 16:4 17:3 18:2 19:1 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาพบว่าสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดเท่ากับ 18:2 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 11.38 และ 5.26 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อัตราส่วนฟรักโตสต่อกรดวาเลอริกอื่น ให้ผลที่ดีรองลงมา แต่เมื่อพิจารณาจากสัดส่วนของ 3HV แล้ว สัดส่วนฟรักโตสต่อกรดวาเลอริก เท่ากับ 18:2 ให้สัดส่วนโมลของ 3HV ที่สูงกว่า คือได้ค่าเท่ากับ 16 โมลเปอร์เซ็นต์ ทำให้ผู้วิจัยเลือกค่าฟรักโตสต่อกรดวาเลอริก 18:2 กรัมต่อลิตร การศึกษาของ Ishihara และคณะ (1996) เมื่อผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดยต้องการควบคุมสัดส่วนโมโนเมอร์โดยวิธีการเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17699 แบบเฟดแบช พบว่าการผลิตโคพอลิเมอร์มีค่าต่ำเมื่อความเข้มข้นของกรดวาเลอริกมีค่าเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร และเมื่อความเข้มข้นของกรดวาเลอริกมีค่าเท่ากับ 0.3 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตโมโนเมอร์ของ 3HV มีค่าคงที่ Kim และคณะ(1992) ได้อธิบายกลไกการนำกรดอินทรีย์เข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ว่าการเข้าสู่เซลล์ของเกลือของกรดอินทรีย์ เช่น โพรพิโอเนต เป็น antiport ของ ไฮดรอกซีไอออน หรือเข้าโดยการซึมผ่านของกรดอินทรีย์โดยไม่แตกตัว (undissociated fatty acid) ซึ่งทั้งสองวิธีนี้จะทำให้ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น Ishihara และคณะ(1996) ได้แสดงวิถีเมตาบอลิสมการสังเคราะห์ของ PHB และ P(3HB-co-3HV) โดยใช้กรดบิวทิริก และกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้โครงสร้างหลักแก่โคพอลิเมอร์ (รูปที่ 5) จากกรดวาเลอริกสามารถถูกเปลี่ยนเป็นโมโนเมอร์ของ 3HB และ 3HV ดังนั้นปริมาณ กรดวาเลอริกในอาหารเลี้ยงเชื้อมีมากก็ทำให้สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV สูงตามด้วยแต่ถ้ามากเกินไปจะทำให้ไปยับยั้งการเจริญและการสร้างโคพอลิเมอร์เช่นกัน

ผลการวิจัยความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิต P(3HB-co-3HV) พบว่าการทดลองที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.0

กรัมต่อลิตร มีการเจริญอย่างรวดเร็ว โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และแอมโมเนียมซัลเฟตสูงสุดเท่ากับ 10.81 และ 6.76 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าสูงสุด เมื่อเทียบกับการทดลองที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 0.5 1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร การทดลองของ Yamane และคณะ(1996) ได้ศึกษาปริมาณธาตุที่ประกอบอยู่ในเซลล์ของ *Alcaligenes latus* เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเติมอาหารที่มีค่า C/N สัดส่วนใกล้เคียงกับธาตุที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ พบว่าปริมาณ C/N ในอาหารที่ใช้เติมในการเลี้ยงที่ไม่เกินส่วนประกอบของธาตุภายในเซลล์ให้การเจริญที่ดีกว่า ซึ่งมีส่วนสำคัญกับการเลือกส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพราะเป็นการประหยัดต้นทุนในอีกทางหนึ่งนั่นคือไม่ต้องใช้ปริมาณที่สูงเกินไป

ผลของปริมาณฟอสเฟตที่มีต่อการเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) เนื่องจากในสูตรอาหารมีฟอสเฟตประกอบอยู่มากกว่า 1 ชนิด จึงได้แปรผันปริมาณฟอสเฟตเป็นคู่ คือ คู่ของ NH_2PO_4 : Na_2HPO_4 การแปรผันปริมาณฟอสเฟตมีผลทั้งการเจริญ และการสร้าง P(3HB-co-3HV) พบว่าปริมาณฟอสเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 : 0.3 กรัมต่อลิตร ได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และP(3HB-co-3HV) สูงสุดเท่ากับ 11.92 และ 5.26 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การศึกษาผลของแมกนีเซียมพบว่ามีผลต่อการเจริญและการผลิต P(3HB-co-3HV) เช่นเดียวกัน ค่าที่เหมาะสมที่สุดคือปริมาณแมกนีเซียมเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 9.44 และ 4.84 กรัมต่อลิตร Respeske และ Respeske (1976) ได้รายงานถึงสารอาหาร เช่น ฟอสเฟต แมกนีเซียม ปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ให้สูงขึ้นได้ เนื่องจากสารอาหารพวกนี้มีความสัมพันธ์กับการเจริญ โดยปริมาณที่ใช้ไม่มาก ถ้ามีปริมาณมากอาจทำให้ยับยั้งการเจริญ และการสร้างโคพอลิเมอร์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยนี้

การศึกษาผลของปริมาณอากาศที่มีต่อการเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อให้อากาศในระดับต่างๆ โดยปรับการให้อากาศตามแบบการทดลองของ ชนัญ ผลประไพ(2537) เนื่องจากเป็นถังหมัก ชุดและขนาดเดียวกัน ผลการวิจัยพบว่าเมื่อมีการให้อากาศปริมาณสูง คือที่อัตราการกวนเท่ากับ 600 rpm. อัตราการให้อากาศ 1.8 vvm. ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดคือ 10.91 กรัมต่อลิตร และได้โคพอลิเมอร์สูงกว่าการทดลองที่ให้ปริมาณอากาศต่ำกว่า

3. การเพิ่มอัตราการผลิต P(3HB-co-3HV) ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบช

การเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชเพื่อต้องการเพิ่มปริมาณ ดังนั้นการเติมสารอาหาร ซึ่งได้พิจารณาถึงอัตราการเติมสารอาหารที่มีผลให้ได้การเจริญสูงสุด จากสมการที่รายงานโดย Scragg(1991) พารามิเตอร์ที่สำคัญคือ μ X_r และ $Y_{x/s}$ ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการทดลองในตารางที่ 21 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนการเลี้ยงแบบแบช จากการคำนวณได้อัตราการเติมอาหาะเท่ากับ 4.52 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง (27.13 มิลลิลิตรต่อ 6 ชั่วโมง) ผลของการเติมสารอาหารที่มีอัตราส่วน C/N ต่อการเจริญและการผลิต P(3HB-co-3HV) พบว่าการเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอน การเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 แบบแบช ส่วนการทดลองที่มีการเติมสารอาหารที่มีทั้งแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟต อัตราส่วนของสารอาหารที่เติมลงระหว่างการเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดคือ C/N เท่ากับ 100 ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดได้เท่ากับ 7.89 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 62 มีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.22 Suzuki และคณะ(1986) ได้รายงานอัตราส่วนเมทธานอลต่อแอมโมเนียในอาหารที่ใช้เติมระหว่างการเลี้ยง *Protomonas extorquens* เพื่อผลิต PHB ว่ามีผลต่อการเจริญและการผลิตสารผลิตภัณฑ์ โดยการผลิต PHB ต้องอยู่ใต้ภาวะการจำกัดไนโตรเจน เช่นเดียวกับ *Alcaligenes eutrophus* ที่พบว่าการเติมสารอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมนอกจากเพิ่มปริมาณ PHB ได้แล้วยังลดการสลายตัวของ PHB ภายในเซลล์อีกด้วย Ryu และคณะ(1997) เลี้ยงเชื้อ *Alcaligens eutrophus* NCIMB 11599 เพื่อผลิต PHB ได้ทดลองเติมแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) ระหว่างการเลี้ยงเชื้อและจำกัดแหล่งฟอสเฟต และอธิบายถึงความสำคัญของแหล่งไนโตรเจนว่ามีความสำคัญต่อการเลี้ยงเพื่อให้ได้ความหนาแน่นเซลล์สูง Ramsay และคณะ(1990) ได้เลี้ยงเชื้อหลายสายพันธุ์เพื่อเปรียบเทียบการผลิต P(3HB-co-3HV) ได้กล่าวถึงการเลี้ยงเชื้อทั้งแบบเฟดแบชและแบบต่อเนื่อง เป็นวิธีที่สามารถเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตขึ้นทางการค้าได้ดี วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบแบชนั้นไม่สามารถให้น้ำหนักเซลล์แห้งได้สูง ซึ่งมีข้อจำกัดเรื่องสารอาหารเพราะมีสารอาหารเฉพาะการเลี้ยงในช่วงเริ่มต้นของการเลี้ยงเท่านั้น วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชสามารถเปลี่ยนแปลงพัฒนาส่วนประกอบของอาหารที่จำเป็นสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ และการเจริญของเชื้อ Rhee และคณะ(1993) ศึกษาการผลิต P(3HB-co-3HV) โดยเลี้ยง *Alcaligenes* sp. SH-69 ด้วยวิธีเฟดแบช ภายใต้ C/N เท่ากับ 23.1 โมลต่อโมล เพื่อรักษากิจกรรมของเซลล์และการผลิตโคพอลิ

เมอร์ไว้ในระหว่างช่วงการผลิต โดยต้องพยายามรักษาระดับการเติมไนโตรเจนในปริมาณต่ำ ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ ดังนั้นงานวิจัยนี้ซึ่งใช้วิธีการเลี้ยงแบบเฟดแบชต้องการเพิ่มปริมาณเซลล์ให้สูง เพื่อให้มีปริมาณการผลิตโคพอลิเมอร์สูงด้วย จะต้องเติมสารอาหารที่มีอัตราส่วน C/N สูงๆ เพื่อส่งเสริมการผลิตโคพอลิเมอร์ และเพื่อให้เซลล์มีกิจกรรมพอที่เจริญให้เซลล์สูงๆด้วย ซึ่งได้อัตราส่วนที่เหมาะสม คือ C/N เท่ากับ 100 โมลต่อโมล

การเติมสารอาหารที่มีแหล่งเกลือแร่ลงไปพร้อมกับสารอาหาร น้ำตาลฟรักโตส กรดวาเลอริก และแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบของสารอาหารทั้งหมดในอาหารเพื่อการผลิต แต่ปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ อาจไม่ไปกระตุ้นการสร้างโคพอลิเมอร์ได้ จากที่เคยมีรายงานมาแล้วว่า ถ้าปริมาณ ธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ แมกนีเซียม ถูกจำกัดจะทำให้มีการสร้างโคพอเมอร์สูง การทดลองนี้จึงต้องการศึกษาปริมาณเกลือแร่ที่เหมาะสมที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลของการเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และเกลือแร่ที่จำเป็น พบว่าการเติมสารอาหารทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าว โดยเติม แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ในชั่วโมงที่ 12 – 42 จำนวน 6 ครั้งและเติมแหล่งเกลือแร่ที่จำเป็น ในชั่วโมงที่ 12 และ 30 ได้ผลการทดลองดีที่สุด โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 24.38 กรัมต่อลิตร ปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 15.28 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 62 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และได้อัตราการผลิตสูงถึง 0.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากรายงานของ Ramsay และคณะ 1990 ได้เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็น กลูโคส และกรดโพรพิโอนิก ด้วยวิธีการเลี้ยงแบบเฟดแบช ได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 43 กรัมต่อลิตร ปริมาณ P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 17 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.34 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Chung และคณะ 1997 เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* NCIBB 11599 โดยใช้แหล่งคาร์บอน ชนิดเดียวกับงานของ Ramsay ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 18 กรัมต่อลิตร ปริมาณ P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 2.7 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเท่ากับ 0.09 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Cho และคณะ 1997 ได้เลี้ยงเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ATCC 53799 ได้ปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 9.4 กรัมต่อลิตร ปริมาณ P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 5.48 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบงานวิจัยนี้กับงานของผู้วิจัยที่กล่าวมาข้างต้น พบว่างานวิจัยนี้ได้ค่าอัตราการผลิตสูงที่สุด แสดงในตารางที่ 23

จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 แบบเฟดแบชในงานวิจัยนี้ สามารถทำให้เพิ่มปริมาณทั้งน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และอัตราการผลิต สูงขึ้น จากเดิมในขวดเขย่าซึ่งได้เท่ากับ 7.44 กรัมต่อลิตร 2.77 กรัมต่อลิตร และ 0.046 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เป็น 24.38 กรัมต่อลิตร 15.28 กรัมต่อลิตร และ 0.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ตารางที่ 26 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และ อัตราการผลิต ในการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อผลิต P(3HB-co-3HV)

วิธีการเลี้ยงเชื้อ	ชนิดของเชื้อ	แหล่งคาร์บอน	CDW (g/l)	P(3HB-co-3HV) (g/l)	P(3HB-co-3HV) (% by wt.)	productivity (g/l.h)	แหล่งอ้างอิง
ขวดเขย่า	*Alcaligenes* sp. A-04	f + va	7.44	2.77	37	0.046	งานวิจัยนี้
แบช	*Alcaligenes* sp. A-04	f + va	10.91	5.94	54	0.17	
เฟดแบช	*Alcaligenes* sp. A-04	f + va	**24.38**	**15.28**	**63**	**0.42**	
เฟดแบช	*A. eutrophus* DSM 545	g + pa	43.00	17.00	39.53	0.34	Ramsay และคณะ 1990
ต่อเนื่อง	*A. eutrophus* NCIBB 11599	g + pa	18.00	2.70	15	0.09	Chung และคณะ 1997
แบช	*Azotobacter vinelandii* ATCC 53799	sw + g	9.40	5.48	58.3	0.11	Cho และคณะ 1997

หมายเหตุ f หมายถึง ฟรักโตส
va หมายถึง กรดวาเลอริก
g หมายถึง กลูโคส
pa หมายถึง กรดโพรพิโอนิก
sw หมายถึง swine waste liquor