บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการผลิต และสะสม PHB ให้ได้ปริมาณมาก จะต้องจำกัดปริมาณอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน (Byrom, 1987) แต่ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยสารอาหารที่สมบูรณ์ เชื้อจุลินทรีย์จะเติบโตในภาวะสมดุลย์ โดยสารอาหารจะถูกนำไปใช้ในการเติบโต มากกว่า การผลิตและสะสม PHB ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณมากแล้วนำลงสู่อาหารสำหรับการผลิต และสะสม PHB งานวิจัยนี้ศึกษาหาอาหารสูตรที่เหมาะสม เพื่อที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (จากข้อ 2.3.2) โดยเปรียบเทียบจากน้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของเซลล์ พบว่าอาหารสูตรที่ 2 จะให้ความเข้มข้นของเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารอาหารที่ประกอบในอาหารสูตรที่ 2 มีความเหมาะสมกว่าในสูตรอาหารที่ 1 และ 3 ในการทำให้ *Alcaligenes* sp. A-04 เติบโตได้ดี ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงกล้าเชื้อก่อนนำลงอาหาร MSM สำหรับการผลิต PHB ในถังหมัก คือ 30 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ได้จากการศึกษารูปแบบของการเจริญเติบโต เนื่องจากที่เวลานี้ได้ปริมาณเซลล์มาก และเซลล์เจริญอยู่ในช่วง log phase ซึ่งทำให้ได้กล้าเชื้อปริมาณมาก เพื่อที่จะใช้ในการผลิตและสะสม PHB ในขั้นต่อไป

เปรียบเทียบในระดับขวดเขย่าและในถังหมัก ระหว่างเมื่อใช้อาหารสูตรที่2 และอาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อแล้วใช้อาหาร MSM เป็นอาหารสำหรับการผลิต PHB พบว่าปริมาณ PHB ที่ผลิตขึ้นเมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อได้ปริมาณ PHB สูงกว่าในระยะเวลาที่สั้นกว่า เมื่อใช้อาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 ทำให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นสูงกว่า เมื่อใช้ MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ส่วนอาหาร MSM นั้นเหมาะที่จะเป็นอาหารที่กระตุ้นการสร้าง และสะสม PHB มากกว่าจะเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อ

ในการเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ผลิตขึ้น เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM และใช้อาหาร MSM เป็นอาหารสำหรับการผลิต PHB พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้ในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าโดยปริมาณ PHB ที่ได้เมื่อเลี้ยงในถังหมัก สูงกว่าในขวดเขย่าถึง 2.4เท่า ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากสภาวะการผลิต PHB ในถังหมักเหมาะสมกว่าสภาวะในขวดเขย่า

ผลการศึกษาในระดับขวดเขย่า (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ ,2536) พบว่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB อยู่ในช่วง 6.0-7.0 ดังนั้นเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักจึงปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และศึกษาผลของการควบคุม และไม่ควบคุมค่า pH ตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อ พบว่าในสภาวะที่ไม่ควบคุม pH เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตค่าpHของน้ำหมักลดลงและการลดลงแปรผันตามความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เพิ่มขึ้น และค่าpH คงที่เมื่อแอมโมเนียมซัลเฟตหมดลง ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการเจริญของเชื้อแล้วมีการนำแอมโมเนียมซัลเฟตไปใช้ (Steinbuchel และ Schlegel ,1989) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB/โปรตีน ระหว่างสภาวะที่ควบคุม และไม่ควบคุมpHตลอดการทดลองโดยแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.1 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร พบว่าสภาวะที่ควบคุม pH ตลอดการทดลองให้ปริมาณ PHB สูงกว่า สภาวะที่ไม่ควบคุม pH ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะมีการผลิตสารที่มีความเป็นกรด จึงทำให้ pH ของน้ำหมักต่ำลง (Nakata ,1963) แม้ว่าโดยส่วนใหญ่แล้วการศึกษาเกี่ยวกับ pH ในการเลี้ยงเชื้อเป็นไปในด้านการหา pH ที่เหมาะสมซึ่งเป็นเพียง pH เริ่มต้น โดยศึกษาในระดับขวดเขย่า เช่นงานวิจัยที่เกี่ยวกับการหา สารอาหารและสภาวะที่เหมาะกับการเติบโตของ *Hydrogenomonas eutropha* โดย Repaske (1961) และการศึกษาผลของอาหารคาร์บอนที่มีต่อมวลโมเลกุลของ PHB ใน *Alcaligenes eutrophus* โดย Taidi และคณะ (1994) เป็นต้น โดยที่ในระดับถังหมักไม่พบว่ามีการศึกษาเปรียบเทียบ ผลของการควบคุม และไม่ควบคุม pH ตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อแต่พบว่ามีงานวิจัยจำนวนมากที่เกี่ยวกับการผลิตPHBโดย *Alcaligenes* sp. ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Sonnleitner และคณะ (1979) Steinbuchel และ Schlegel (1989) ล้วนควบคุม pH ตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อทั้งสิ้น

จากการศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ต่อการเติบโตและการผลิต PHB โดยให้ปริมาณการละลายอิ่มตัวของออกซิเจนที่ระดับต่าง ๆ พบว่าเมื่อให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100% 80% 70% (ที่เวลาเริ่มต้น และปรับเป็น 50% ที่เวลา 12 ชั่วโมง) และ 50% ของค่าการละลายอิ่มตัว จะได้ปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB/โปรตีน ลดลงตามลำดับ โดยพบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100% ของค่าการละลายอิ่มตัว ทำให้เซลล์ผลิต PHB ได้สูงสุด อัตราการเจริญจำเพาะเมื่อการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักมีค่าเท่ากับ 100% 80% และ 70% ของค่าการละลายอิ่มตัว จะใกล้เคียงกันคือ 0.0930 0.0924 และ 0.0941 แสดงให้เห็นว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ที่ระดับนี้ไม่มีผลต่อ อัตราการเจริญจำเพาะของ *Alcaligenes*sp.A-04 แต่จะมีผลต่อการผลิต PHB เมื่อให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 70% ของค่าการละลายอิ่มตัว ที่ชั่วโมงที่ 0 และปรับเป็น 50% ของค่าการละลายอิ่มตัว ที่ชั่วโมงที่ 12 พบว่าปริมาณ PHB ที่ผลิตขึ้นมีปริมาณน้อยกว่า สภาวะที่ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100% และ 80% ของค่าการละลายอิ่มตัว และในสภาวะที่ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 50% ของค่าการละลายอิ่มตัว พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะลดลงเท่ากับ 0.0845 และการผลิต PHB ก็ลดลงด้วย โดยที่ฟรุคโตสยังคงเหลืออยู่ในน้ำหมัก ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักต่ำเกินไป ปริมาณออกซิเจนจึงอาจไม่เพียงพอสำหรับการเติบโต และการผลิต PHB สำหรับจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ แต่มีรายงานของผู้วิจัยบางกลุ่ม (Senior และคณะ, 1972 ; Jackson และ Dawes, 1976 ; Ward และคณะ, 1977) ได้รายงานไว้ว่าการจำกัดปริมาณออกซิเจนเป็นการกระตุ้นการสร้าง PHB เช่น *Azotobacter beijerinckii* สามารถผลิต PHB ได้ถึง 70% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อจำกัดปริมาณออกซิเจนเท่ากับ 0.275 % (oxygen in inflowing gas) Mulchandani และคณะ (1989) และ Groom และคณะ (1988) รายงานไว้ว่าเพื่อให้การ ผลิต PHB ของ *Alcaligenes* sp. มีผลดีควรรักษาระดับของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักให้มากกว่า 80% ของค่าการละลายอิ่มตัว จึงอาจสรุปได้ว่าปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมต่อการเติบโต และการผลิต PHB อาจแตกต่างกันขึ้น กับชนิดของสายพันธุ์จุลินทรีย์ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเลี้ยงเชื้อ

เมื่อแปรผันปริมาณฟรุคโตสเท่ากับ 5.0 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร โดยความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร พบว่าฟรุคโตสปริมาณ 5.0 กรัม/ลิตร ไม่เพียงพอที่ *Alcaligenes* sp. A-04 ใช้ในการเติบโตและการผลิต PHB คาดว่าเมื่อฟรุคโตสในน้ำหมักเหลืออยู่ปริมาณน้อยมาก เซลล์จะนำ PHB มาใช้แต่เมื่อความเข้มข้นของฟรุคโตสเพิ่มเป็น 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร พบว่าเพียงพอสำหรับใช้ในการเติบโตและการผลิต PHB ตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ฟรุคโตส5.0 และ 10.0 กรัม/ลิตรพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะใกล้เคียงกันคือ 0.0937 และ 0.0930 เมื่อปริมาณฟรุคโตสเพิ่มขึ้นเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร อัตราการเจริญจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 0.1324 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ โดยใช้ปริมาณฟรุคโตสเท่ากับ 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร พบว่าใกล้เคียงกัน (1.58 และ 1.60 กรัม/ลิตร ตามลำดับ) แต่ปริมาณฟรุคโตสที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ฟรุคโตสปริมาณ 10.0 กรัม/ลิตร นั้นน้อยกว่าเมื่อใช้ฟรุคโตสเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร (14.0 และ 6.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ) ดังนั้นจึงสรุปว่าปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นที่เหมาะสม เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร ควรเป็น 10.0 กรัม/ลิตร

เมื่อได้ปริมาณฟรุคโตสที่เหมาะสมแล้ว ได้แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ฟรุคโตสปริมาณ 10.0 กรัม/ลิตรนั้น เพียงพอที่จะใช้ในการเลี้ยงเชื้อเมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และ 0.3 กรัม/ลิตร เท่านั้น เพราะเมื่อเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร พบว่าฟรุคโตสหมดก่อนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทำให้เซลล์มีการนำPHBไปใช้ ทำให้ปริมาณ PHB ลดลง ดังนั้นเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร จึงได้เพิ่มปริมาณฟรุคโตสเป็น 20.0 กรัม/ลิตร และเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1.5 กรัม/ลิตรด้วย พบว่าฟรุคโตสปริมาณ 20.0 กรัม/ลิตร ไม่เพียงพอสำหรับ *Alcaligenes* sp. A-04 ใช้ในการเติบโตและการผลิต PHB ตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.5 กรัม/ลิตรจึงได้เพิ่มปริมาณฟรุคโตสเป็น 30.0 กรัม/ลิตร และได้เพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 2.0 กรัม/ลิตร ด้วย ผลการทดลองพบว่า สำหรับการเลี้ยงเชื้อแบบ batch cultivation นั้น การเลี้ยงเชื้อที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1.5 กรัม/ลิตร ใช้ฟรุคโตสเท่ากับ 30.0 กรัม/ลิตร *Alcaligenes*

sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 7.21 กรัม/ลิตร คิดเป็นปริมาณ 82.12% ของน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณ PHB ที่ได้นี้สูงกว่าที่ Mulchandani และคณะ (1989) ได้ศึกษาไว้เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697 ในสภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 2.0 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 40.0 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นสภาวะที่ดีที่สุด โดยปริมาณ PHB ที่ได้สูงสุดเท่ากับ 3.78 กรัม/ลิตร คิดเป็น 59.10% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 47 ชั่วโมง และเมื่อดูที่เวลาใกล้เคียงกัน ที่ 48 ชั่วโมงเห็นได้ว่า *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้ถึง 6.64 กรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าปริมาณที่ *A. eutrophus* ATCC 17697 ผลิตได้ถึง 2 เท่า

เมื่อใช้กากน้ำตาลปริมาณ 20% (w/v) เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน แล้วแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้สูงที่สุดเท่ากับ 2.27 กรัม/ลิตร คิดเป็น 53.86% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 1.76 ได้พบว่ารูปแบบการผลิต PHB มีการสร้าง PHB ในช่วงแรก พร้อมไปกับการเจริญของเชื้อ ในช่วงนี้จะมีการใช้กลูโคส และฟรุคโตส แต่เมื่อกลูโคสและฟรุคโตสหมดลงจึงมีการสลายซูโครส ในช่วงนี้มีการผลิต PHB พร้อมไปกับการเติบโตของเชื้ออีกช่วงหนึ่ง ทำให้พบว่ารูปแบบการเติบโตของเซลล์ เป็นลักษณะของการเจริญแบบ diauxic และเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่เลี้ยงด้วย กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส บริสุทธิ์พบว่า เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัม/ลิตร ปริมาณ PHB ที่ได้ใกล้เคียงกับเมื่อใช้กากน้ำตาล 20% คือที่เวลา 84 ชั่วโมง สามารถผลิต PHB ได้ 2.29 กรัม/ลิตร คิดเป็น 69.18% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และไม่พบการเจริญแบบ diauxic เห็นได้ว่าน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ในกากน้ำตาล เป็นน้ำตาลที่เชื้อสามารถนำไปใช้เพื่อการเติบโตและการผลิต PHB ได้เช่นเดียวกับ น้ำตาลบริสุทธิ์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1.5 กรัม/ลิตร โดยใช้กากน้ำตาล 30% เป็นอาหารคาร์บอนพบว่า เชื้อสามารถผลิต PHB ได้ 3.88 กรัม/ลิตร คิดเป็น 37.15% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 1.37 ที่เวลา 84 ชั่วโมง และรูปแบบการเติบโตก็เป็นแบบ diauxic เช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบสภาวะที่ใช้กากน้ำตาล 30% แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัม

/ลิตร กับสภาวะที่ใช้กากน้ำตาล 20% ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัม/ลิตร พบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้เท่ากับ 1.91 กรัม/ลิตรและ 2.27 กรัม /ลิตรตามลำดับ ดังนั้นสำหรับ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นอาหารคาร์บอน พบว่ากากน้ำตาล 20% และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัม/ลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB

การใช้กากน้ำตาล ไม่ดีเท่ากับการใช้น้ำตาลบริสุทธิ์ เพราะตามรายงานของ Page กล่าวไว้ว่าในกากน้ำตาลมีธาตุไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ซึ่งอาจทำให้ปริมาณของธาตุอาหารเหล่านี้มีมากกว่าปริมาณที่จำกัดจริง เป็นผลให้ระยะเวลาที่ใช้ในการจำกัดปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น เมื่อศึกษารายงานของ Page ในปี 1989 ซึ่งนำกากน้ำตาล และอาหารคาร์บอนที่มีองค์ประกอบซับซ้อน มาเลี้ยง *Azotobacter vinelandii* UWD เพื่อผลิต PHB พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลจากหัวบีท สามารถผลิต PHB ได้สูงสุด 2.74 กรัม/ลิตร คิดเป็น 60% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB/โปรตีนเท่ากับ 2.46 โดยใช้เวลาเพียง 24 ชั่วโมง ในการเลี้ยงในขวดเขย่า เมื่อให้แอมโมเนียมอะซิเตท 15 mM เป็นอาหารไนโตรเจน และให้กากน้ำตาลจากหัวบีท 2% (w/v) เป็นอาหารคาร์บอน เห็นได้ว่า จากรายงานของ Page เชื้อสายพันธุ์ที่ Page ใช้สามารถผลิต PHB ได้ดีกว่า ซึ่งอาจเป็นผลมาจากชนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ใช้ สันนิษฐานว่าการที่มีผู้สนใจศึกษาการนำกากน้ำตาลมาใช้เพื่อการผลิต PHB ยังมีน้อย เนื่องจากคุณสมบัติของกากน้ำตาล ที่อาจมีสารไม่บริสุทธิ์ (impurity) ปนมา รวมทั้งสีของกากน้ำตาลที่อาจจะไปรบกวนขั้นตอน product recovery ซึ่งอาจทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีที่แปลกออกไป

ในการเลี้ยงแบบ fed-batch โดยมีการเติมฟรุคโตส เติมแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตส และการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ได้ผลสรุปดังนี้

เมื่อเติมเฉพาะฟรุคโตส โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 กรัม/ลิตร หลังจากเติมฟรุคโตสแล้ว พบว่าปริมาณ PHB ที่ได้ต่ำกว่าสภาวะที่ใช้ฟรุคโตสเริ่มต้น เท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร การผลิต และสะสม PHB อยู่ในปริมาณที่ต่ำซึ่งอาจเป็นเพราะเป็นการเติมฟรุคโตสในช่วง stationary phase จึงทำให้มีการสะสม PHB เพิ่มขึ้นน้อย แต่เมื่อมีแอมโมเนียม

ซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร เมื่อเติมฟรุคโตสที่ 18 ชั่วโมง พบว่าหลังจากเติมแล้วมีการสะสม PHB เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว อาจเนื่องจากช่วงเวลานี้เป็นช่วง log phase ทำให้การผลิต และสะสม PHB เป็นไปอย่างต่อเนื่อง เมื่อเติมฟรุคโตส ให้ได้ความเข้มข้นหลังเติมเป็น 10.0 กรัม/ลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ใช้ฟรุคโตส 20.0 กรัม/ลิตร แล้วปริมาณ PHB % PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB/โปรตีน จะใกล้เคียงกัน โดยได้ปริมาณ PHB ที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 4.97 กรัม/ลิตร คิดเป็น 74.18% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

ในการเลี้ยงแบบ fed-batchดังที่กล่าวมาแล้ว จะพบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้สูงเปรียบเทียบกับ เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม/ลิตร จึงได้พยายามที่จะเพิ่มปริมาณการผลิต PHB ให้สูงขึ้นอีก โดยมีการเติมทั้งแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตสพร้อมกัน (ดังที่ Ramsay และคณะ (1990) ได้รายงานไว้เมื่อศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* ด้วยวิธีการเลี้ยงแบบ fed-batch โดยการเติมทั้งแอมโมเนียมซัลเฟต และกลูโคส เมื่ออาหารทั้งสองใกล้หมด) โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร ฟรุคโตสเริ่มต้น 10.0 กรัม/ลิตร ด้วยเหตุผลที่ว่าระยะเวลาที่ ทั้งแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตสใกล้จะหมด อยู่ในช่วงของ log phase คาดว่าเมื่อเชื้อได้รับอาหารเพิ่มจะสามารถนำอาหารนั้นไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เปรียบเทียบระหว่าง การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตสให้ได้ความเข้มข้น 1.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร กับความเข้มข้น 1.5 และ 20.0 กรัม/ลิตรตามลำดับ ได้ผลว่าเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตสให้ได้ความเข้มข้น 1.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร ได้ปริมาณ PHB ที่สูงกว่า โดยพบว่าที่ 48 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูง 6.56 กรัม/ลิตร คิดเป็น 79.23% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตส ให้ได้ความเข้มข้น 1.5 และ 20.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ สามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงสุดเพียง 5.48 กรัม/ลิตร ที่ 60 ชั่วโมง ซึ่งคิดเป็น 68.07% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และหลังจากเวลาที่ 60 ชั่วโมง ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้งลดลง ทั้งนี้อาจเป็นไปตามรายงานของ Suzuki และคณะ (1986a) ที่ได้ศึกษาการผลิต PHB โดย *Protomonas extorquens* ด้วยวิธีการเลี้ยงแบบ fed-batch culture ที่ว่าปริมาณแอมโมเนียมในน้ำหมักที่มากไปอาจทำให้เกิดการสลายของ PHB ที่

สะสม หรือลดกิจกรรมในการสังเคราะห์ PHB ของเซลล์ รวมทั้งทำให้เกิดการเป็นพิษ (toxic effect) ต่อการเติบโตของเซลล์ด้วย

จากการวิจัย การเพิ่มปริมาณ PHB ให้สูงขึ้นอีก โดยนำสภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 1.5 กรัม/ลิตร ปริมาณฟรุคโตส 30.0กรัม/ลิตร ซึ่งให้ปริมาณ PHB สูงที่สุดในการเลี้ยงแบบ batch แล้วเติมเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อแอมโมเนียมใกล้จะหมดที่เวลา24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์จะสร้างPHB สูงสุดที่ 60 ชั่วโมงเท่ากับ 6.2 กรัม/ลิตร คิดเป็น 71.46% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง หลังจากนั้นทั้ง PHB และน้ำหนักเซลล์แห้งก็ลดลง ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะเหตุผลเดียวกับที่ได้กล่าวมาแล้ว เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ผลิตได้สูงสุดจากสภาวะการเลี้ยงแบบ fed-batch กับงานวิจัยในลักษณะเดียวกันพบว่า ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้นี้มีปริมาณสูงหรือต่ำขึ้นกับสภาวะในการเลี้ยง และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เช่น ในงานวิจัยของ Ramsay และคณะ ในปี 1990 พบว่าหลังจากเติมแอมโมเนียมซัลเฟต และกลูโคสที่ 15 ชั่วโมง และที่ 23 ชั่วโมงเติมกลูโคสเพื่อรักษาระดับกลูโคสในถังหมักให้คงที่ พบว่าที่ 35 ชั่วโมง *Alcaligenes eutrophus* สามารถผลิตPHB ได้ 24 กรัม/ลิตร โดยเลี้ยงในถังหมักขนาด 20 ลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ PHB/โปรตีน พบว่าปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 1.85 ซึ่งต่ำกว่าปริมาณ PHB/โปรตีน ที่ได้จากงานวิจัยนี้เป็นอย่างมาก (เท่ากับ 5.09) เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Bitar และ Underhill (1990) ที่ได้ศึกษาการผลิต PHB จาก *Alcaligenes eutrophus* H16 แบบ fed-batch โดยการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อย่างต่อเนื่อง พบว่า สามารถผลิต PHB ได้ 8.5 กรัม/ลิตร คิดเป็น 63% ของน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 45 ชั่วโมง ขณะที่ *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิตได้ 6.56 กรัม/ลิตร เมื่อคิดเป็น % ของน้ำหนักเซลล์แห้งแล้วสูงถึง 79.23% ที่เวลา 48 ชั่วโมง จากที่กล่าวมาทำให้เห็นได้ว่าสภาวะที่ผลิต PHB ได้ปริมาณสูง มิได้หมายความว่าความสามารถของเซลล์ในการผลิต และสะสม PHB จะสูงตามไปด้วย

จากข้อมูลที่ได้เมื่อศึกษาการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 แบบ batch คาดว่าสภาวะที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในแง่ของการผลิตในระดับขยายส่วนต่อไปนั้น คือ สภาวะที่ใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร เนื่องจากที่สภาวะนี้เมื่อเลี้ยงแบบ batch นอกจากจะให้ปริมาณ PHB ที่สูงในระยะเวลาสั้น (4.63 กรัม/ลิตร หรือคิดเป็น 76.53%

ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 48 ชั่วโมง) แล้วยังพบว่าปริมาณ PHB/โปรตีน ก็มีค่าสูงด้วย และเมื่อนำสภาวะนี้ไปใช้เป็นสภาวะเริ่มต้นในการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 แบบ fed-batch โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้นเท่าเดิมพบว่า เชื้อสามารถผลิต PHB ได้สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง (6.56 กรัม/ลิตร คิดเป็น 79.23% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) โดยได้ปริมาณ PHB/โปรตีน สูงที่สุดเท่ากับ 5.09 กรัม/ลิตร (แสดงถึง ความสามารถของเชื้อในการผลิต PHB ต่อหน่วยโปรตีนของเซลล์) ปริมาณ PHB ที่ได้จากการเลี้ยงแบบ fed-batch เพิ่มขึ้นจากสภาวะที่เลี้ยงแบบ batch ถึง 1.93 กรัม/ลิตร และการสะสม PHB เพิ่มขึ้น 2.7% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ขณะที่สภาวะที่ทำให้เชื้อผลิต PHB ได้สูงสุดในการเลี้ยงแบบ batch คือสภาวะที่ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.5 กรัม/ลิตร (7.21 กรัม/ลิตร คิดเป็น 82.12% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 72 ชั่วโมง) นั้นไม่ได้สนับสนุนการเติบโต และการผลิต PHB เมื่อนำมาเลี้ยงแบบ fed-batch เพราะปริมาณ PHB ที่เชื้อผลิตได้มีปริมาณที่ต่ำกว่าสภาวะที่เลี้ยงแบบ batch (เท่ากับ 6.26 กรัม/ลิตร คิดเป็น 71.46% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 60 ชั่วโมง) ดังนั้นสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสม ที่จะนำไปเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อการผลิต PHB ในระดับการผลิตต่อไป คือสภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร โดยมีปริมาณฟรุคโตสที่เพียงพอ โดยที่ความเป็นจริง อาจจะต้องมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณความเข้มข้นบ้างซึ่งก็ขึ้นอยู่กับความเหมาะสม แต่ก็คงยึดเอาสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะหลักเช่นเดิม

สรุปผลของงานวิจัยนี้

สภาวะที่เหมาะสม ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04 มีดังนี้

1. อาหารสูตรที่เหมาะสมที่ใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อของ *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ A-04 คืออาหารสูตรที่ 2 ที่เวลา 30 ชั่วโมง

2. สภาวะที่ใช้เลี้ยง *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ A-04 ในถังหมัก ควบคุมค่า pH เท่ากับ 7.0 ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100% อิ่มตัว ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยปรับอัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบ/นาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.8 vvm

3. เมื่อแอมโมเนียมซัลเฟตมีปริมาณเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของฟรุคโตส พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฟรุคโตสที่เพิ่มขึ้น ขณะที่เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอยู่ในช่วง 0.3 ถึง 2.0 กรัม/ลิตร เมื่อเพิ่มปริมาณฟรุคโตสที่แต่ละความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของอัตราการเจริญจำเพาะ และทุกความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เพิ่มขึ้น พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เพิ่มขึ้น

4. *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ A-04 สามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 7.54 กรัม/ลิตร คิดเป็น 85.20% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 84 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงแบบ batch cultivation โดยให้ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.5 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 30.0 กรัม/ลิตร

5. เมื่อใช้กากน้ำตาล 20% เป็นอาหารคาร์บอน จะให้ผลดีเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตมีค่าเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร โดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 2.27 กรัม/ลิตร แต่เมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตสูงขึ้น PHB ที่ได้มีปริมาณลดลง โดยเมื่อแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร ปริมาณ PHB ที่ได้เท่ากับ 2.11 และ 0.35 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

6. ในการเลี้ยงแบบ fed-batch สภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และฟรุคโตส เริ่มต้นเท่ากับ 1.0 และ 10.0 กรัม/ลิตร แล้วเติมแอมโมเนียมซัลเฟต และฟรุคโตส ที่ 18 ชั่วโมงให้ได้ความเข้มข้น 1.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ จะได้ PHB สูงสุดเท่ากับ 6.56 กรัม/ลิตร คิดเป็น 79.23% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 48 ชั่วโมง

7. การผลิต PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04 พบว่าการเลี้ยงเชื้อแบบ batch ได้ปริมาณ PHB สูงกว่าการเลี้ยงแบบ fed-batch ในสภาวะที่ใช้ฟรุคโตส และแอมโมเนียมซัลเฟต 30.0 และ 1.5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 84 ชั่วโมง ได้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 7.54 กรัม/ลิตร คิดเป็น 85.20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสามารถทำให้ *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้มากขึ้นถึง 35% โดยเปรียบเทียบกับเมื่อนำสายพันธุ์นี้มาใช้ศึกษาในตอนเริ่มต้น ซึ่งเชื้อนี้ผลิต PHB ได้ประมาณ 50% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง