บทที่ 3

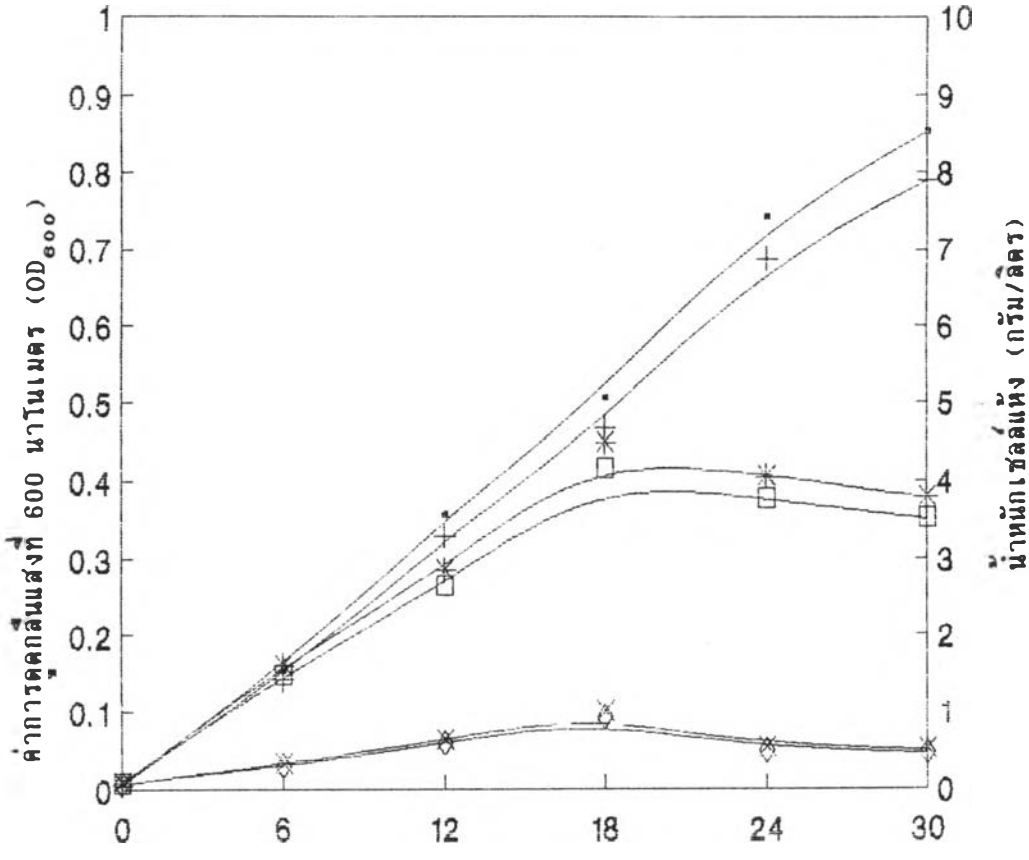
ผลการวิจัย

3.1 การเลือกชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อและหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ

3.1.1 การเลือกชนิดของอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

เตรียมเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ตามวิธีในข้อ 2.4.2 ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่ 1 2 และ 3 (จากข้อ 2.3.2) เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำแต่ละตัวอย่างมาหาความเข้มข้นของเซลล์ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากผลการวิจัยพบว่า อาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่ 2 (ข้อ 2.3.2) นั้นให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 18 24 และ 30 ส่วนอาหารสูตรที่ 3 และสูตรที่ 1 นั้นให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 และลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อต่างชนิดกัน

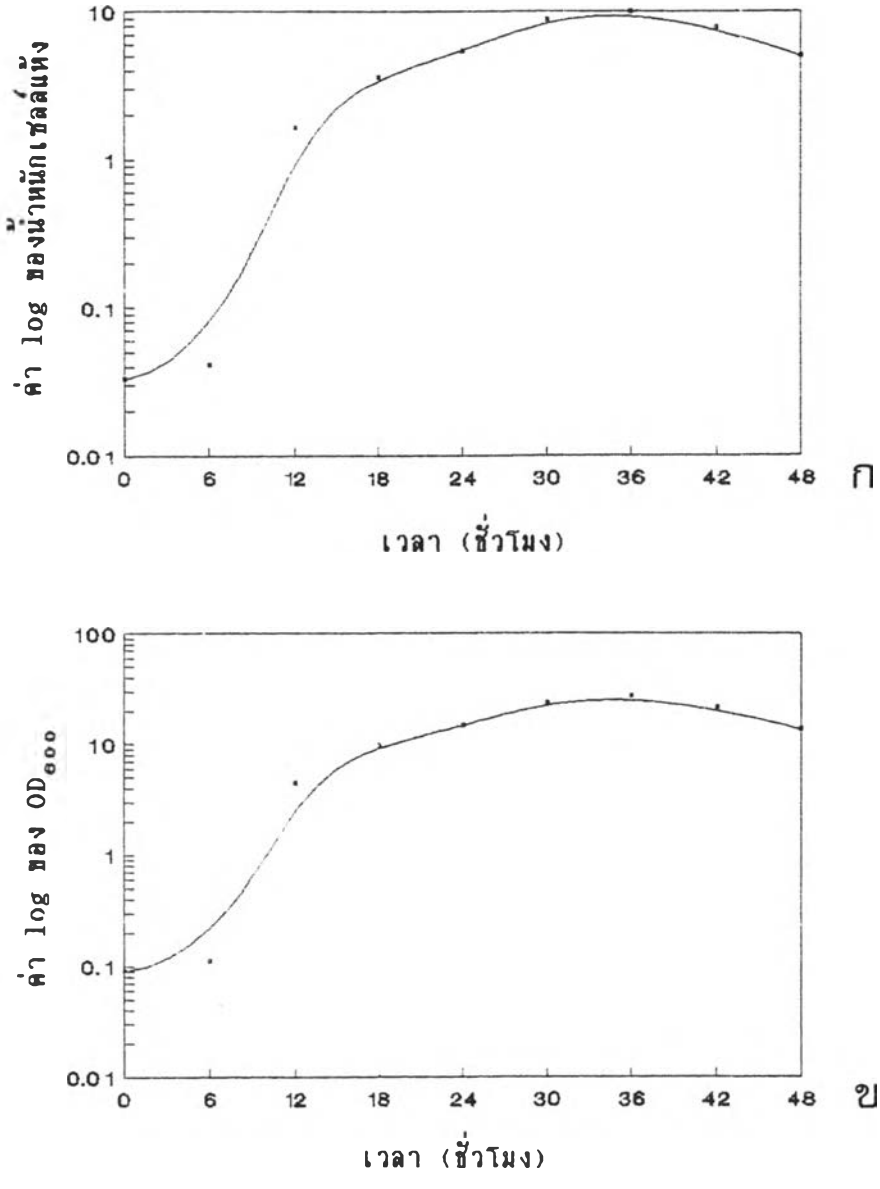
3.1.2 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

จากผลการวิจัยข้อ 3.1.1 ทราบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 เป็นอาหารสูตรที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ จึงเลี้ยงกล้าเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่ 2 นานเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำมาหาความเข้มข้นของเซลล์โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง แล้วนำค่าความเข้มข้นของเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้ง มาเขียนกราฟการเติบโตได้ผลดังแสดงในรูปที่ 7

เนื่องจากเซลล์ที่จะนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อเพื่อผลิตสารผลิตภัณฑ์นั้น ควรเป็นเซลล์ที่กำลังมีการเติบโต และในการวิจัยนี้ต้องการใช้เซลล์ปริมาณมากเพื่อใช้เป็นเซลล์เริ่มต้นในการผลิต PHB ดังนั้นจึงได้พิจารณาว่า กล้าเชื้อที่มีอายุ 30 ชั่วโมง เป็นกล้าเชื้อที่ยังอยู่ในระยะที่มีการแบ่งตัว และให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูง (ตารางที่ 4) คือ 8.79 กรัม/ลิตร ถึงแม้ว่าไม่ใช่เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เพราะที่เวลา 36 ชั่วโมง เซลล์จะอยู่ในช่วงการเติบโตคงที่แล้ว ส่วนที่เวลา 24 ชั่วโมง แม้ว่าจะเป็นช่วงที่เซลล์กำลังมีการเติบโต แต่ก็ได้ปริมาณเซลล์น้อยกว่าที่เวลา 30 ชั่วโมง ประมาณ 2 เท่า ในทำนองเดียวกัน จากตารางที่ 4 ที่เวลา 30 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 เติบโตได้ความเข้มข้นของเซลล์สูง (OD_{600} เท่ากับ 23.65) และเซลล์ยังอยู่ในระยะที่มีการเติบโต ส่วนที่เวลา 24 ชั่วโมง หรือน้อยกว่า 24 ชั่วโมงนั้น ความเข้มข้นของเซลล์ต่ำกว่ามาก (ประมาณ 2 เท่า) ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อคือเวลา 30 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร
0	0.03	0.09
6	0.04	0.11
12	1.64	4.40
18	3.59	9.65
24	5.42	14.58
30	8.79	23.65
36	9.95	26.78
42	7.80	21.06
48	5.00	13.50

ตารางที่ 4 น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2



รูปที่ 7 การเติบโตของ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่ 2 (ก.) (ค่า log) น้ำหนักเซลล์แห้งและ (ข.) (ค่า log) ความเข้มข้นของเซลล์

3.2 การเปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบ 2 ขั้นตอน

จากผลการวิจัยของคณะผู้ร่วมวิจัย (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2536) ซึ่งได้ปรับปรุงอาหารสูตร MSM สำหรับการผลิต PHB จึงมีแนวความคิดที่จะนำอาหารสูตรดังกล่าวมาลองใช้เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ

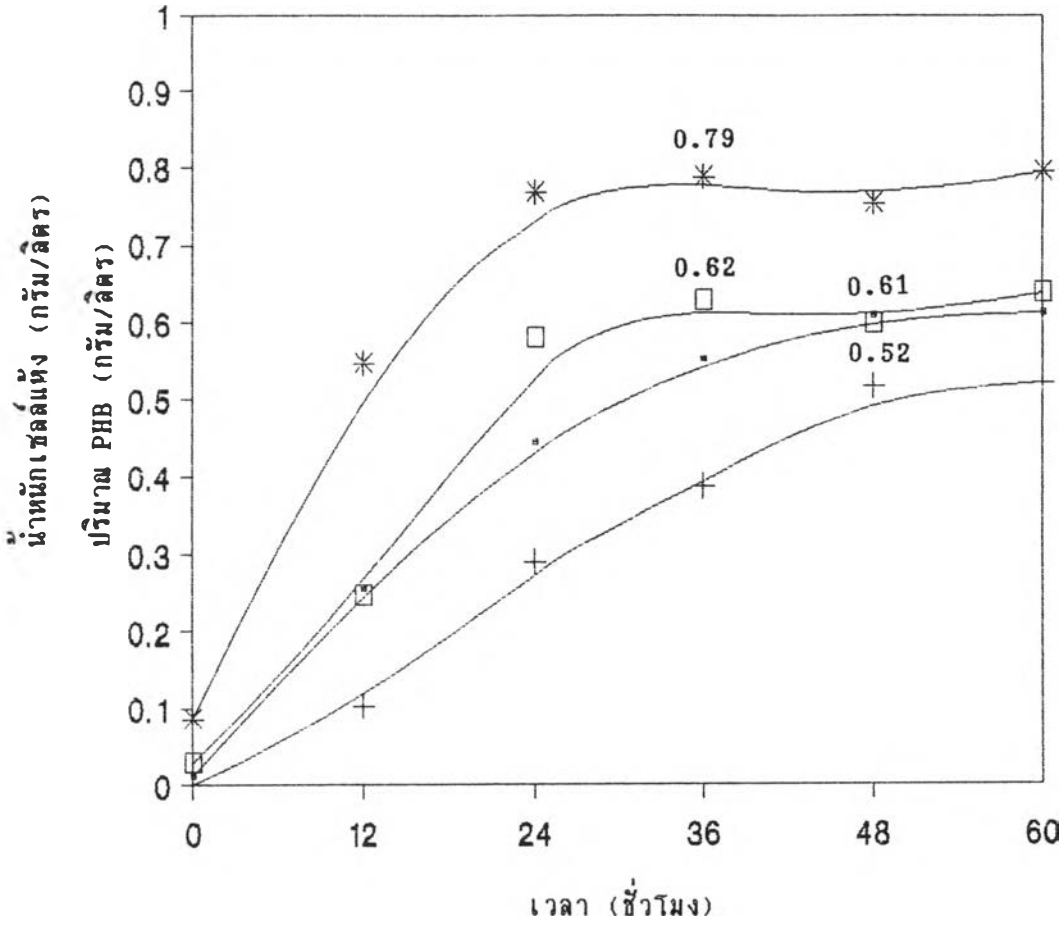
ศึกษาเปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 (ได้จากข้อ 3.1.1) และอาหาร MSM สูตรที่ปรับปรุงโดย อรุณ ชาญชัย-เชาว์วิวัฒน์ (2536) เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อแล้วเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต PHB ในอาหาร MSM

3.2.1 การเปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อในขวดเขย่า

ผลการวิจัยในระดับขวดเขย่านั้น เมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและการผลิต PHB เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมง ปริมาณ PHB สูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง โดยปริมาณ PHB ที่ผลิตได้เท่ากับ 0.62 กรัม/ลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.79 กรัม/ลิตร แต่เมื่อใช้อาหาร MSM เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นช้ากว่าเมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 โดยปริมาณ PHB สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยปริมาณ PHB ที่ผลิตได้เท่ากับ 0.52 กรัม/ลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.61 กรัม/ลิตร สรุปได้ว่าเมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาณ PHB ที่ได้สูงกว่าเมื่อใช้ MSM ประมาณ 1.2 เท่า โดยใช้เวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่สั้นกว่าเมื่อใช้ MSM เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 8

เวลา (ชั่วโมง)	อาหาร MSM		อาหารสูตรที่ 2	
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)
0	0.01	0.00	0.09	0.03
12	0.26	0.10	0.55	0.25
24	0.45	0.29	0.77	0.58
36	0.55	0.39	0.79	0.62
48	0.61	0.52	0.75	0.60
60	0.61	0.52	0.79	0.64

ตารางที่ 5 น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ แล้วใช้ MSM เป็นอาหารสำหรับผลิต PHB ในขวดเขย่า



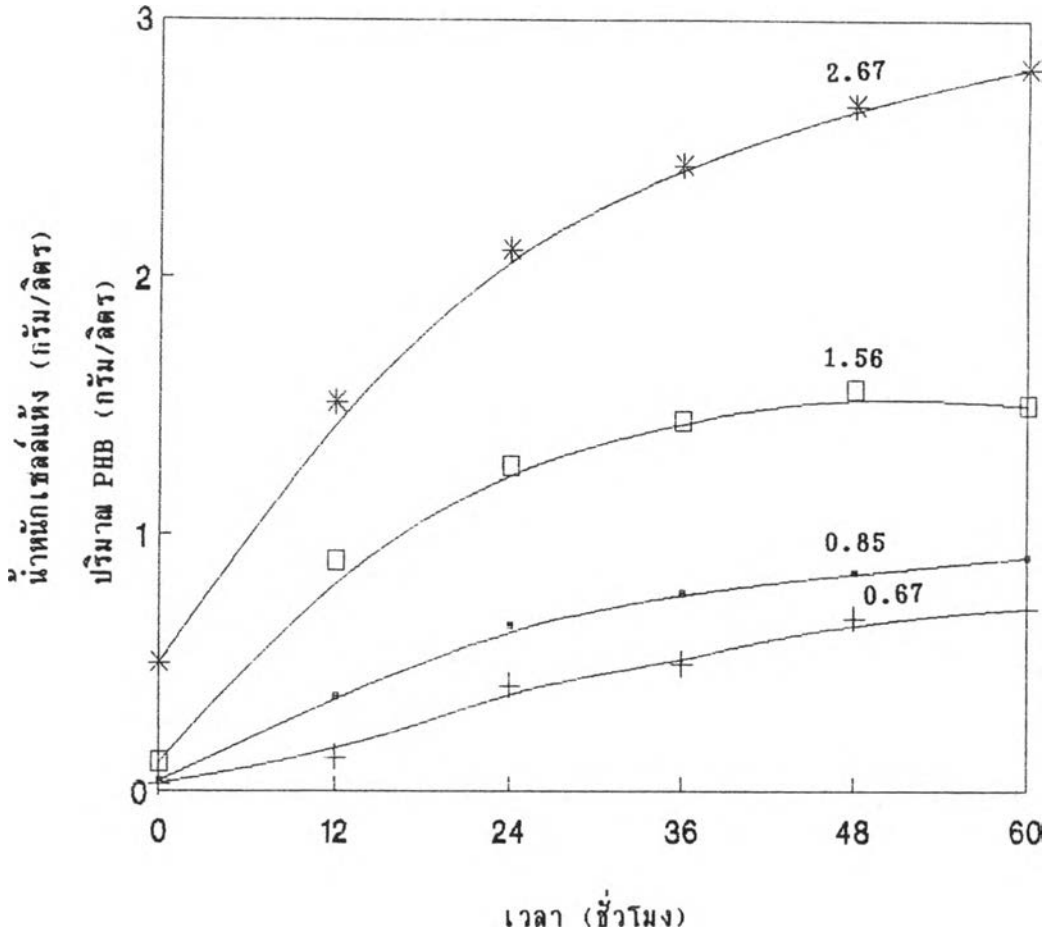
รูปที่ 8 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อแล้วใช้ MSM เป็นอาหารสำหรับการผลิต PHB ในขวดเขย่า

3.2.2 การเปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 โดยใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อในถังหมัก

ผลการวิจัยในระดับถังหมักนั้นพบว่า เมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาณ PHB ที่ผลิตขึ้นได้สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณเท่ากับ 1.56 กรัม/ลิตร และเมื่อใช้ MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้เท่ากับ 0.67 กรัม/ลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง และค่อนข้างลงที่โดยมีปริมาณเท่ากับ 0.71 กรัม/ลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง สรุปได้ว่าเมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาณ PHB ที่ได้สูงกว่าเมื่อใช้ MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อประมาณ 2.3 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 9 ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งได้พบว่าในทำนองเดียวกัน เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อในอาหารสูตรที่ 2 *Alcaligenes* sp. A-04 มีการเติบโตได้ดีกว่า เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อในอาหาร MSM กล่าวคือที่เวลา 48 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.67 กรัม/ลิตร และ 0.85 กรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรที่ 2 และในอาหาร MSM ตามลำดับ

เวลา (ชั่วโมง)	อาหาร MSM		อาหารสูตรที่ 2	
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)
0	0.04	0.03	0.50	0.11
12	0.37	0.13	1.51	0.89
24	0.64	0.41	2.11	1.26
36	0.77	0.49	2.43	1.44
48	0.85	0.67	2.67	1.56
60	0.91	0.71	2.81	1.50

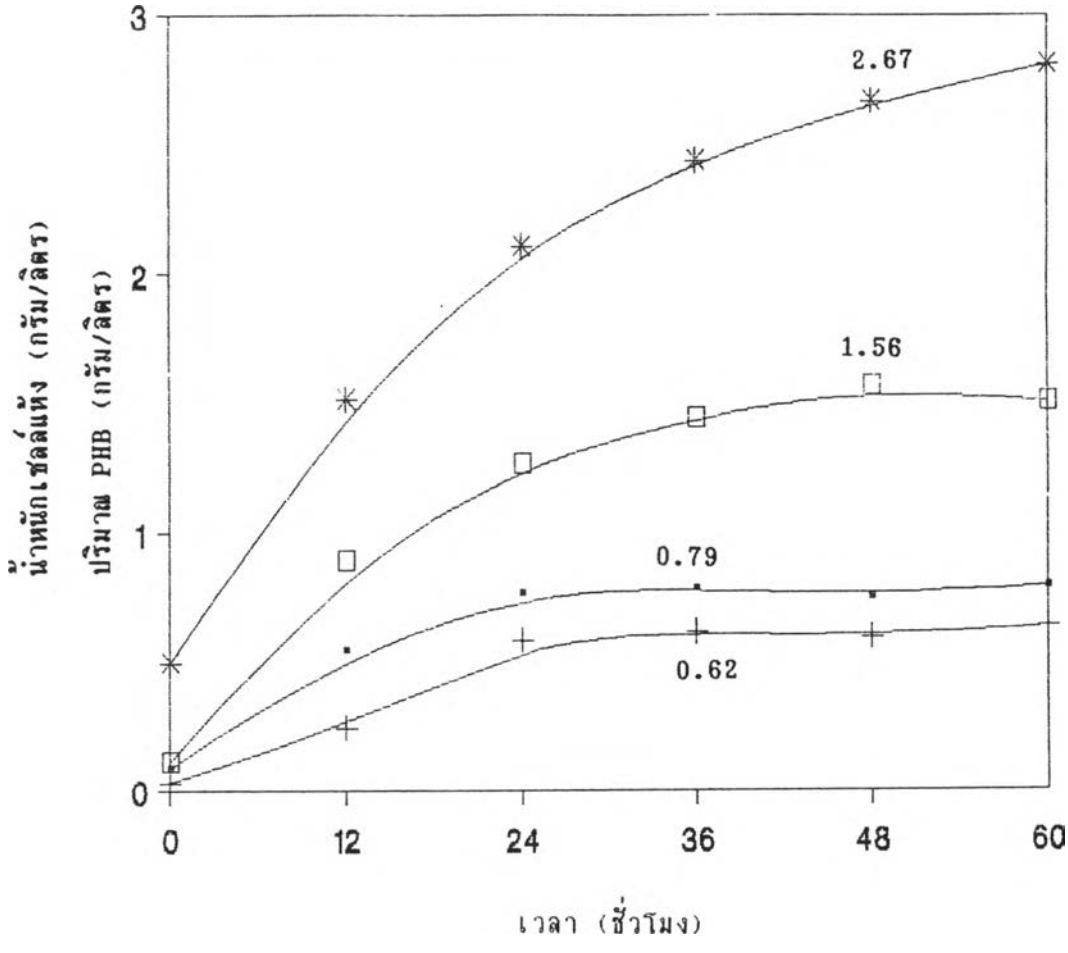
ตารางที่ 6 น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ แล้วใช้ MSM เป็นอาหารสำหรับผลิต PHB ในถังหมัก



รูปที่ 9 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อและใช้ MSM เป็นอาหารสำหรับการผลิต PHB ในถังหมัก

จากการเปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 และอาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ทั้งในขวดเขย่าและในถังหมัก (จากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2) พบว่าเมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ แล้วย้ายลงสู่อาหารสำหรับการผลิต PHB เชื้อสามารถผลิต PHB ได้สูงกว่าเมื่อใช้อาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ และเมื่อเปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB เมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อในขวดเขย่าและในถังหมัก พบว่าในถังหมัก *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้ปริมาณมากกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า ดังแสดงในรูปที่ 10 กล่าวคือที่เวลา 36 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในขวดเขย่าเท่ากับ 0.79 และ 0.62 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และเพิ่มขึ้นเป็น 2.67 และ 1.56 กรัม/ลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในถังหมัก

เนื่องจากในการเลี้ยงกล้าเชื้อ มีจุดประสงค์ที่จะเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนที่จะนำลงเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิต PHB (อาหารMSM) จากที่กล่าวมาทั้งจากข้อ 3.1 และ 3.2 เห็นได้ว่าอาหารสูตรที่ 2 มีความเหมาะสมในการเพิ่มปริมาณเซลล์ในขั้นตอนการเลี้ยงกล้าเชื้อ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ



รูปที่ 10 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 โดยใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ และใช้ MSM เป็นอาหารสำหรับการผลิต PHB เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่าและในถังหมัก

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

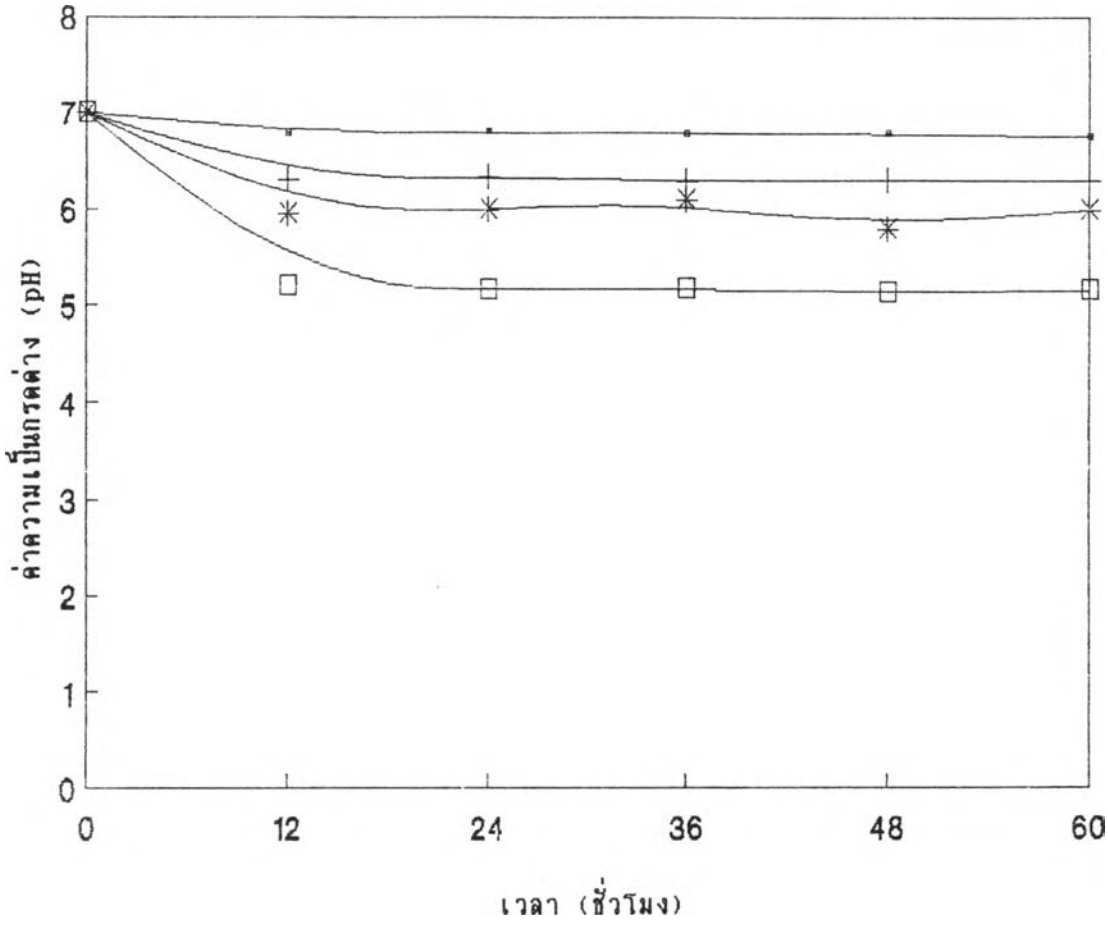
การหาสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณ PHB ที่ผลิตขึ้นโดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักนั้นใช้อาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHB และใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ผลการวิจัยจากข้อ 3.1 และ 3.2) เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง โดยควบคุมสภาวะในถังหมักดังนี้ ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2.5 ลิตร อุณหภูมิ30°ซ (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2536) อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.8 vvm ตลอดทุกการทดลอง นอกจากจะระบุเป็นอย่างอื่น

3.3.1 pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงถังหมักซึ่งมี MSM เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1.1 ผลของปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อค่า pH ของน้ำหมัก เมื่อความเข้มข้นของฟรุคโตสเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร

เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 0.1 ถึง 1.0 กรัม/ลิตร โดยปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 พบว่าค่า pH ของน้ำหมักจะเริ่มลดลงเมื่อมีการเติบโตของเชื้อ จนถึงประมาณชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้น ค่า pH จะค่อนข้างคงที่และสังเกตได้ว่าเมื่อแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณสูง ค่า pH ซึ่งวัดที่เวลา 12 ชั่วโมง มีค่าต่ำลง ดังแสดงในรูปที่ 11 และตารางที่ 7



รูปที่ 11 ค่า pH ของน้ำหมักที่เวลาต่าง ๆ กัน เมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ต่างกัน

ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	ค่า pH ที่เวลาเริ่มต้น	ค่า pH ที่เวลา 12 ชั่วโมง
0.1	7.0	6.78
0.3	7.0	6.30
0.5	7.0	5.95
1.0	7.0	5.20

ตารางที่ 7 ค่า pH ของน้ำหมักที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่างกัน

หมายเหตุ ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสทุกสภาวะเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร

3.3.1.2 เปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ผลิตขึ้น เมื่อมีการควบคุม pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่มีการควบคุม pH ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

จากผลการวิจัยที่ได้จากข้อ 3.3.1.1 ทำให้ทราบว่า ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้ค่า pH ของน้ำหมักเปลี่ยนแปลง จึงอาจต้องควบคุม pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ทำการศึกษาโดยเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหาร MSM ซึ่งมีปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร และใช้ 3M NaOH และ 1.5M H_2SO_4 สำหรับควบคุม pH ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงกว่าเมื่อไม่ควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (แสดงในตารางที่ 8) กล่าวคือ เมื่อใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร ได้ปริมาณ PHB สูงสุด และปริมาณ PHB/โปรตีน สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง และปริมาณ PHB ที่ได้เมื่อควบคุม pH เท่ากับ 58.53%/น้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อไม่ควบคุม pH ได้เท่ากับ 57.76%/น้ำหนักเซลล์แห้ง

เมื่อเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเป็น 0.5 กรัม/ลิตร *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้ปริมาณสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง โดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 68.94%/น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อควบคุม pH และเท่ากับ 65.41%/น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อไม่ควบคุม pH

เมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร พบว่า *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงสุดโดยใช้เวลาเพียง 18 ชั่วโมง โดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 65.71%/น้ำหนักเซลล์แห้ง และ 58.38%/น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อควบคุม pH และไม่ควบคุม pH ตามลำดับ

ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (% PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง)		ปริมาณ PHB/โปรตีน	
	ควบคุม pH	ไม่ควบคุม pH	ควบคุม pH	ไม่ควบคุม pH
0.1	58.53	57.76	3.53	3.14
0.5	68.94	65.41	4.54	4.15
1.0	65.71	58.38	3.38	3.30

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบปริมาณ PHB และปริมาณ PHB/โปรตีน ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อควบคุมและไม่ควบคุม pH ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ที่เวลาซึ่งได้ PHB ปริมาณสูงสุดคือ 48 36 และ 18 ชั่วโมง เมื่อปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยมีฟรุคโตสปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร ทุกการทดลอง

ควบคุม pH : ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ตลอดการทดลอง

ไม่ควบคุม pH : ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0

3.3.2 ผลของการควบคุมปริมาณออกซิเจนในน้ำหมัก ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

จากที่ได้มีผู้รายงานไว้ (Groom และคณะ,1988; Mulchandani และคณะ, 1989) ว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีผลต่อการผลิต PHB โดยที่แต่ละเชื้อที่ใช้จะมีระดับค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB แตกต่างกัน ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงได้แปรผันปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ให้มีค่าสูงต่ำแตกต่างกัน

เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ 30°ซ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อใส่ลงในถังหมักที่มีอาหาร MSM โดยควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30°ซ ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ แล้วแปรผันอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ ซึ่งมีผลต่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ผลของการแปรผันอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่ทำให้ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีค่าต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 9

อัตราการกวน (รอบ/นาที)	อัตราการให้อากาศ (vvm)	ปริมาณออกซิเจนในน้ำหมัก (ppm) (ที่อุณหภูมิ 30°ซ)	%อิ่มตัวของออกซิเจน (ที่อุณหภูมิ 30°ซ)
600	1.8	7.6	100
300	0.6	6.1	80
200	1.6	5.3	70
200	0.2	3.8	50

ตารางที่ 9 ปริมาณของออกซิเจนในน้ำหมัก เมื่อแปรผันอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ เมื่อควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30°ซ

เมื่อปรับอัตราการกวน และการให้อากาศในอัตราที่ทำให้ปริมาณการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักเท่ากับ 100% ของค่าการละลายอิ่มตัว ดังแสดงในรูปที่ 12ก.และตารางที่ 10 พบว่า *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้ 1.56 กรัม/ลิตร หรือ 58.54% /น้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่ ปริมาณPHB/โปรตีน เท่ากับ 3.64 และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.0930 และพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีฟรุคโตสเหลืออยู่เท่ากับ 6.0 กรัม/ลิตร

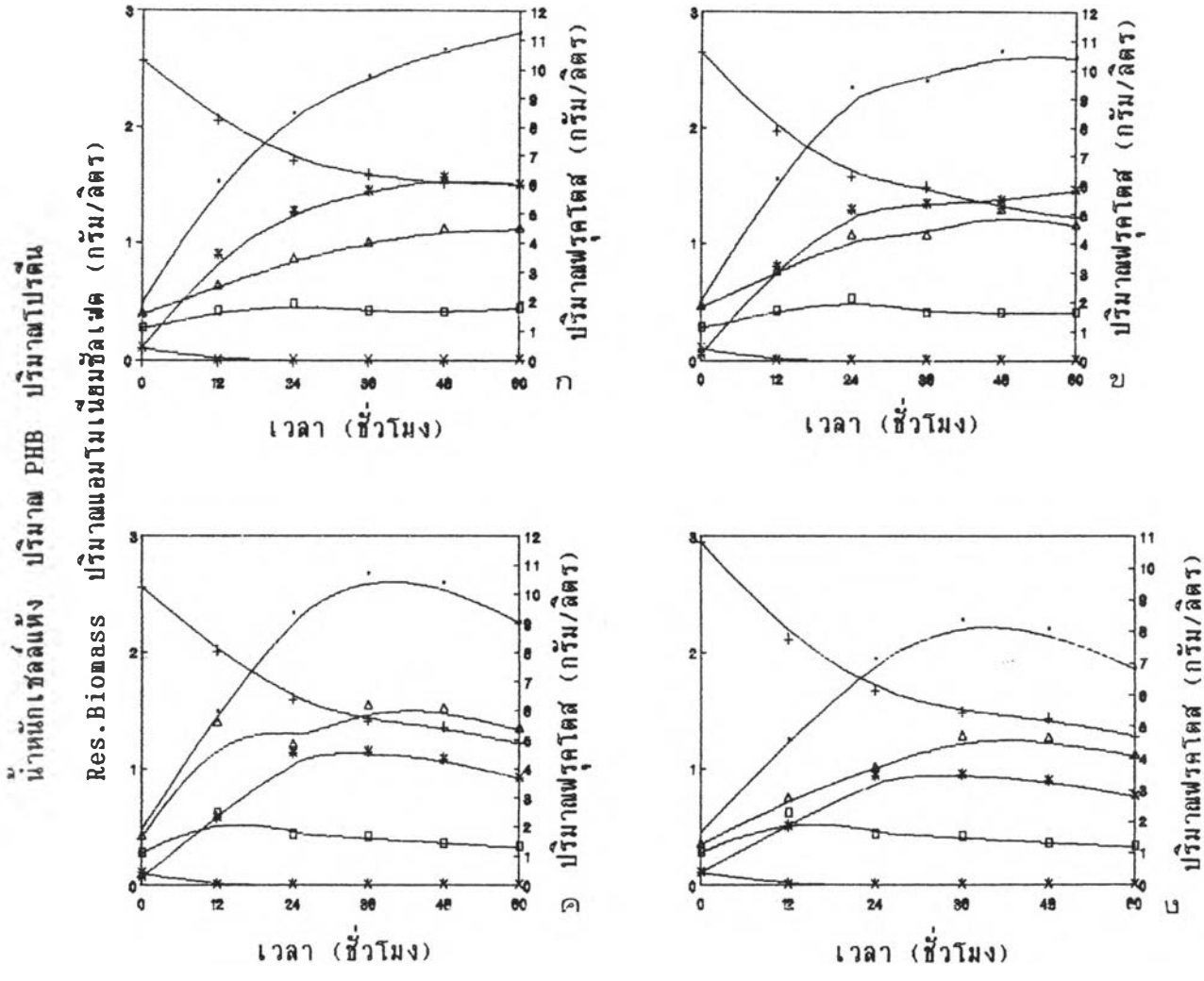
เมื่อปรับอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ ในอัตราที่ให้ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักเท่ากับ 80% ของค่าการละลายอิ่มตัว ดังแสดงในรูปที่ 12ข. และตารางที่ 10 พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้ 1.45 กรัม/ลิตร คิดเป็น 55.76% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง หลังจากนั้นปริมาณ PHB จะเริ่มคงที่ ปริมาณของ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.56 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.0926 และพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีฟรุคโตสเหลืออยู่เท่ากับ 4.89 กรัม/ลิตร

เมื่อปรับอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ ในอัตราที่ทำให้ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักที่เวลาเริ่มต้นเท่ากับ 70% ของค่าการละลายอิ่มตัว เมื่อถึงชั่วโมงที่ 12 ปรับอัตราการกวน และการให้อากาศ ทำให้ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก ลดลงเป็น 50% ของค่าการละลายอิ่มตัวเหตุที่ปรับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเช่นนี้เนื่องจาก ได้พบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักปริมาณนี้ยังคงทำให้เชื้อสายพันธุ์ที่ใช้มีอัตราการเจริญจำเพาะใกล้เคียงกับสภาวะที่ปริมาณออกซิเจนเท่ากับ 100% และ 80% ของค่าการละลายอิ่มตัว แสดงว่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักปริมาณนี้ ยังไม่มีผลต่ออัตราการเจริญจำเพาะ ดังนั้นจึงได้ปรับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 50% ของค่าการละลายอิ่มตัวที่เวลา 12 ชั่วโมง เพื่อศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนต่อการผลิต PHB ของเชื้อสายพันธุ์ที่ใช้ ดังแสดงในรูปที่ 12ค. และตารางที่ 10 พบว่าที่เวลา 36 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 1.14 กรัม/ลิตร คิดเป็น 42.70% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 2.77 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.0942 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีฟรุคโตสเหลืออยู่เท่ากับ 4.86 กรัม/ลิตร

เมื่อปรับอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศที่ให้ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักตั้งแต่เริ่มต้นเท่ากับ 50% ของค่าการละลายอิ่มตัว ดังแสดงในรูปที่ 12 ง. และตารางที่ 10 พบว่าที่เวลา 36 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 0.95 กรัม/ลิตรคิดเป็น 41.67% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยที่ปริมาณของ PHB/โปรตีน เท่ากับ 2.31 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.0845 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีฟรุคโตสเหลืออยู่ 4.70 กรัม/ลิตร

จากผลการทดลองเห็นได้ว่าเมื่อแปรผันปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100% 80% 70% กับ 50% (ที่ 0 และ 12 ชั่วโมง) และ 50% ของค่าการละลายอิ่มตัว พบว่าปริมาณ PHB จะลดลงตามลำดับ คือ 1.56 1.45 1.14 และ 0.95 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 13 คิดเป็น 58.54% 55.76% 42.70% และ 41.67% ของน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ และปริมาณ PHB/โปรตีน ก็ลดลงด้วยตามลำดับคือ 3.64 3.56 2.77 และ 2.31 เป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราการเจริญจำเพาะใน 3 สภาวะแรกมีค่าไม่แตกต่างกัน คือ 0.0930 0.0926 และ 0.0942 ตามลำดับ แต่สภาวะที่ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 50% ของค่าการละลายอิ่มตัว อัตราการเจริญจำเพาะลดลงเท่ากับ 0.0845 ดังแสดงในตารางที่ 11 สรุปได้ว่าเมื่อลดปริมาณการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก จาก 100% ถึง 70% ของค่าการละลายอิ่มตัว ไม่มีผลต่ออัตราการเติบโตของ *Alcaligenes* sp. A-04 แต่มีผลต่อการผลิตและสะสม PHB แต่เมื่อลดปริมาณออกซิเจนลงเป็น 50% มีผลทำให้อัตราการเจริญจำเพาะ การผลิต และสะสม PHB ลดลงด้วย สำหรับปริมาณโปรตีนนั้นพบว่า มีปริมาณสูงสุดที่ระยะเวลาเดียวกันกับระยะเวลาที่แอมโมเนียมซัลเฟตหมดลง ส่วน residual biomass นั้นเพิ่มขึ้นในระยะเวลาที่เซลล์มีการแบ่งตัว จนสูงสุดที่ระยะเวลาใกล้เคียง หรือระยะเวลาเดียวกันกับระยะเวลาที่โปรตีนมีปริมาณสูงสุด

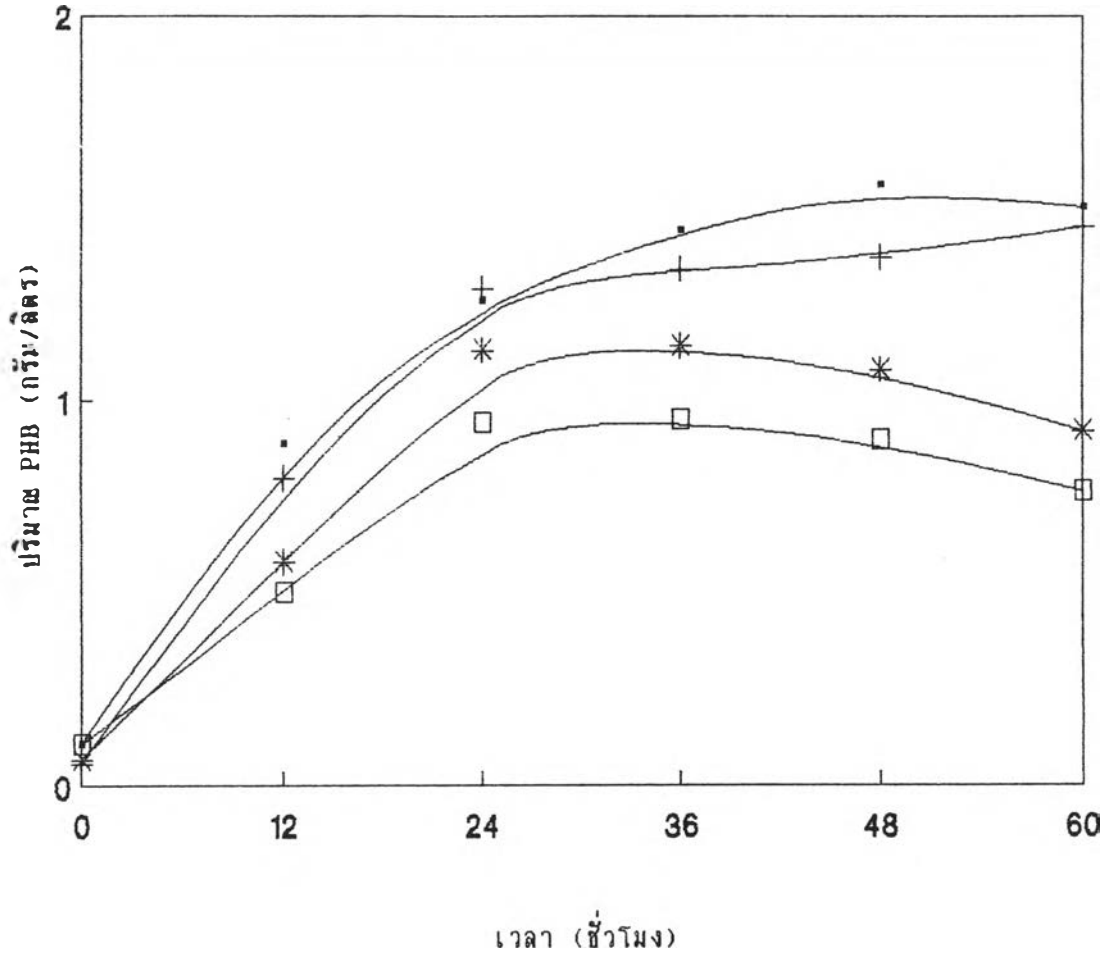
จากผลการวิจัยที่กล่าวมา เมื่อควบคุมให้ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีค่าเท่ากับ 100% ของค่าการละลายอิ่มตัว *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้สูงสุด (1.56 กรัม/ลิตร หรือ 58.54% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ ที่ทำให้ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100% ของค่าการละลายอิ่มตัว (คืออัตราการกวน 600 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศ 1.8 vvm) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 12 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100% (ก.) เมื่อให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 80% (ข.) และเมื่อให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 70 และ 50% ที่ 0-12ชม.และ 12-60ชม. ตามลำดับ (ค.) และเมื่อให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 50% (ง.)

เวลา ชม.	ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (% ของค่าการละลายอิ่มตัว)											
	100			80			70 ที่เวลา 0 ชม. 50 ที่เวลา 12ชม.			50		
	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส
0	0.49	0.11	10.31	0.51	0.06	10.60	0.48	0.07	10.24	0.45	0.11	10.82
12	1.51	0.89	8.19	1.55	0.80	7.87	1.49	0.58	8.01	1.24	0.50	7.75
24	2.11	1.26	6.81	2.35	1.29	6.30	2.33	1.13	6.36	1.94	0.94	6.15
36	2.43	1.44	6.30	2.40	1.34	5.93	2.67	1.14	5.63	2.28	0.95	5.44
48	2.66	1.56	6.02	2.65	1.37	5.22	2.59	1.08	5.41	2.20	0.90	5.23
60	2.81	1.50	6.00	2.60	1.45	4.89	2.25	0.92	4.86	1.86	0.77	4.70

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB และปริมาณฟรุคโตส แปรผันปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100% 80% 70% (ที่เวลาเริ่มต้น และปรับเป็น 50% ที่ชั่วโมงที่ 12) และ 50% ของค่าการละลายอิ่มตัว (น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณฟรุคโตส เป็น กรัม/ลิตร)



รูปที่ 13 ปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก เมื่อแปรผันปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%อิ่มตัว)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	%PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB/โปรตีน	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)
100	1.56	58.54	3.64	0.0930
80	1.45	55.76	3.56	0.0926
70 ที่ 0-12 ชม.				
50 ที่12-60 ชม.	1.14	42.70	2.77	0.0942
50	0.95	41.67	2.31	0.0845

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน และอัตราการเจริญจำเพาะ เมื่อแปรผันปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก

3.3.3 การหาปริมาณฟรุคโตสที่เหมาะสำหรับการเติบโต และการผลิต PHB

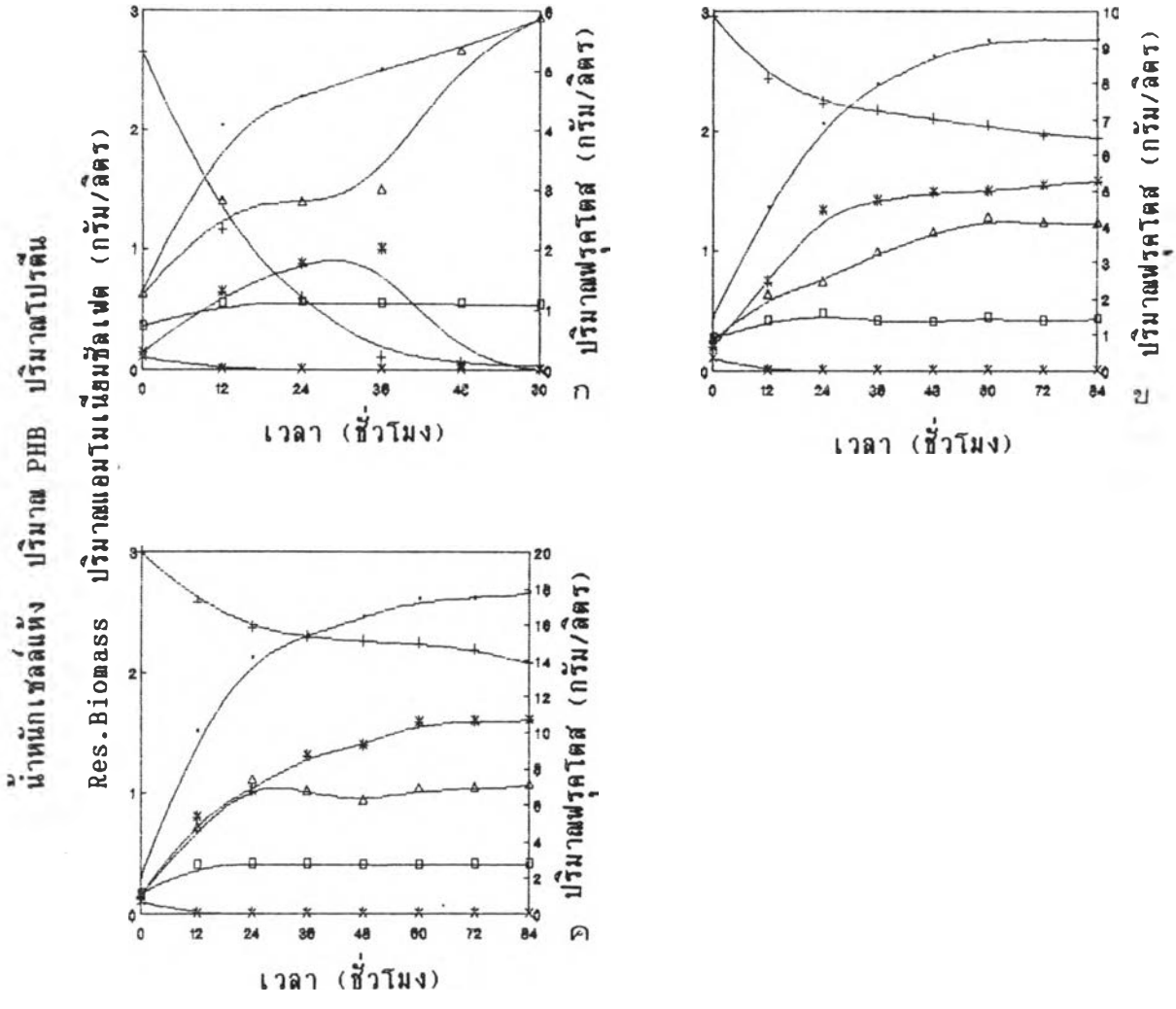
เลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ 30°ซ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงถังหมักที่มีอาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน ควบคุม pH ของน้ำหมักเท่ากับ 7.0 ตลอดการทดลอง (ตามผลการวิจัยข้อ 3.3.1) และควบคุมให้ปริมาณของออกซิเจนในน้ำหมักเท่ากับ 100% อิ่มตัวตลอดการทดลอง (ตามผลการวิจัยข้อ 3.3.2) แปรผันปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร

เมื่อใช้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 กรัม/ลิตร พบว่าที่เวลา 36 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุด 0.99 กรัม/ลิตร คิดเป็น 39.84% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตสหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และ 36 ตามลำดับ ปริมาณของ PHB เริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 ปริมาณของ PHB/โปรตีน เท่ากับ 1.81 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.0937 ดังแสดงในรูปที่ 14ก. และตารางที่ 12

เมื่อใช้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร พบว่าเวลา 84 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้ 1.58 กรัม/ลิตร คิดเป็น 56.23% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณของ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.69 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.0930 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่12 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีฟรุคโตสเหลือในน้ำหมักเท่ากับ 6.45 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 14ข. และตารางที่ 12

เมื่อใช้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร พบว่าที่เวลา 84 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้ 1.60 กรัม/ลิตร คิดเป็น 60.15%ของน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB เริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 60 ปริมาณของ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.74 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.1324 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีฟรุคโตสเหลือในน้ำหมักเท่ากับ 14 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 14ค. และตารางที่ 12

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร เปรียบเทียบระหว่างเมื่อมีฟรุคโตส 10.0 กรัม/ลิตร และ 20.0 กรัม/ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า ได้ปริมาณ PHB ใกล้เคียงกันคือ 1.58 และ 1.60 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และยังพบอีกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงขึ้นเมื่อปริมาณฟรุคโตสเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร (เท่ากับ 0.1324) ขณะที่เมื่อปริมาณฟรุคโตสเท่ากับ 5.0 และ 10.0 กรัม/ลิตร อัตราการเจริญจำเพาะใกล้เคียงกัน (เท่ากับ 0.0937 และ 0.0930 ตามลำดับ) ดังแสดงในรูปที่ 15 และตารางที่ 13 แต่เมื่อพิจารณาปริมาณฟรุคโตสที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อพบว่า เมื่อใช้ฟรุคโตส 10.0 กรัม/ลิตร มีฟรุคโตสเหลือประมาณ 6.0 กรัม/ลิตร ในขณะที่เมื่อใช้ฟรุคโตส 20.0 กรัม/ลิตร มีฟรุคโตสเหลือมากถึง 14.0 กรัม/ลิตร ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ปริมาณฟรุคโตสที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB คือ 10.0 กรัม/ลิตร ส่วนปริมาณโปรตีนและ residual biomass นั้นพบว่ามีปริมาณสูงสุดที่ระยะเวลาเดียวกับระยะเวลาที่แอมโมเนียมซัลเฟตหมดลง



รูปที่ 14 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร

(ก.) ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 5.0 กรัม/ลิตร

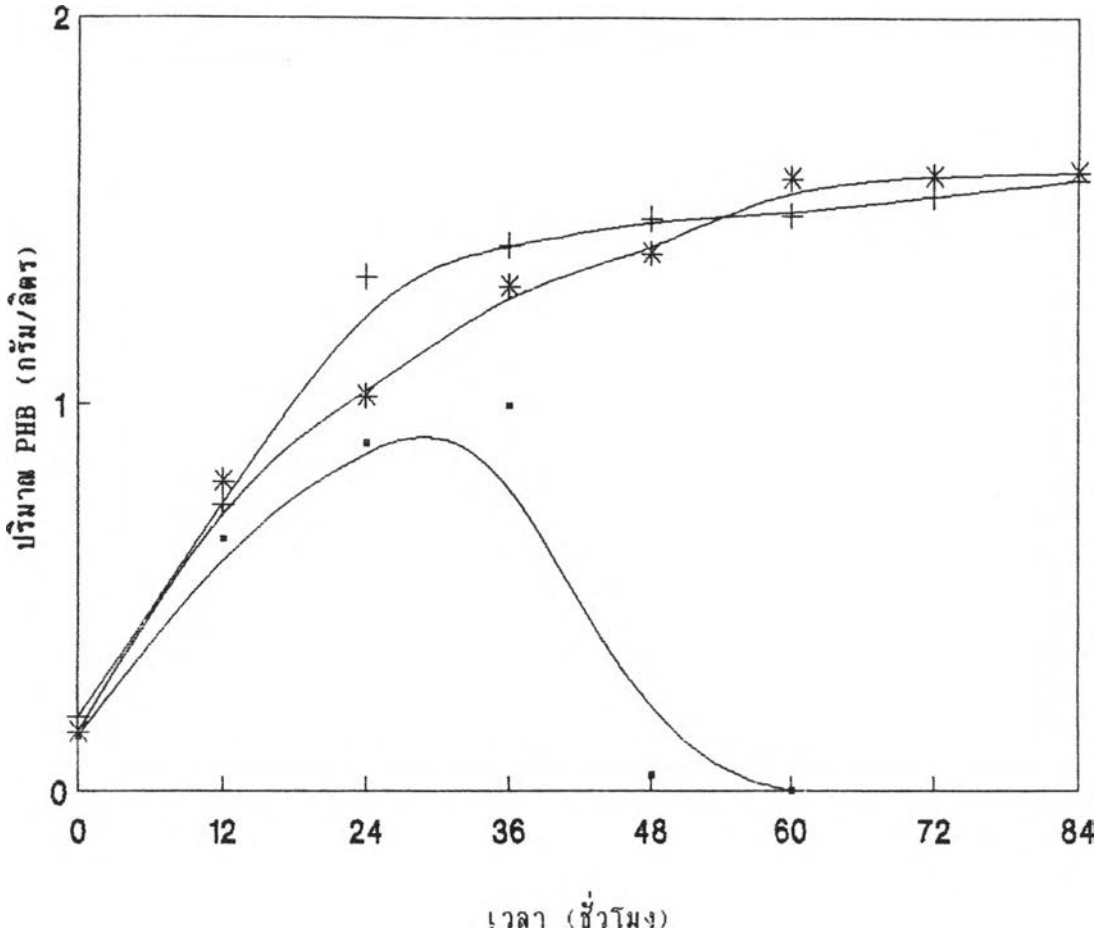
(ข.) ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร

(ค.) ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณฟรุคโตส (กรัม/ลิตร)								
	5.0			10.0			20.0		
	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส
0	0.66	0.03	5.01	0.45	0.19	9.86	0.31	0.15	19.98
12	2.03	0.65	2.02	1.36	0.74	8.12	1.51	0.80	17.30
24	2.27	0.89	0.89	2.06	1.33	7.43	2.12	1.02	15.85
36	2.48	0.99	0.00	2.39	1.41	7.25	2.31	1.31	15.30
48	2.69	0.04	0.00	2.62	1.48	7.00	2.46	1.39	15.05
60	2.93	0.00	0.00	2.76	1.49	6.80	2.61	1.59	14.96
72	*	*	*	2.77	1.54	6.50	2.62	1.59	14.60
84	*	*	*	2.77	1.58	6.45	2.66	1.60	13.91

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB และปริมาณฟรุคโตส เมื่อแปรผันปริมาณฟรุคโตส 5.0 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณฟรุคโตส เป็น กรัม/ลิตร)

* ไม่ได้วิเคราะห์ตัวอย่างในช่วงเวลาดังกล่าว เนื่องจากฟรุคโตสหมด



■ ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 5.0 กรัม/ลิตร

\+ ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร

✳ ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร

รูปที่ 15 ปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก เมื่อมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร แปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร

ความเข้มข้นของฟรุคโตส (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	% PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB/โปรตีน	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)
5.0	0.99	39.84	1.81	0.0937
10.0	1.58	56.23	3.69	0.0930
20.0	1.60	60.15	3.74	0.1324

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบ ปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน และอัตราการเจริญจำเพาะของ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักเมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร แปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 5.0 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร

3.3.4 การหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม สำหรับการเติบโตและการผลิต PHB

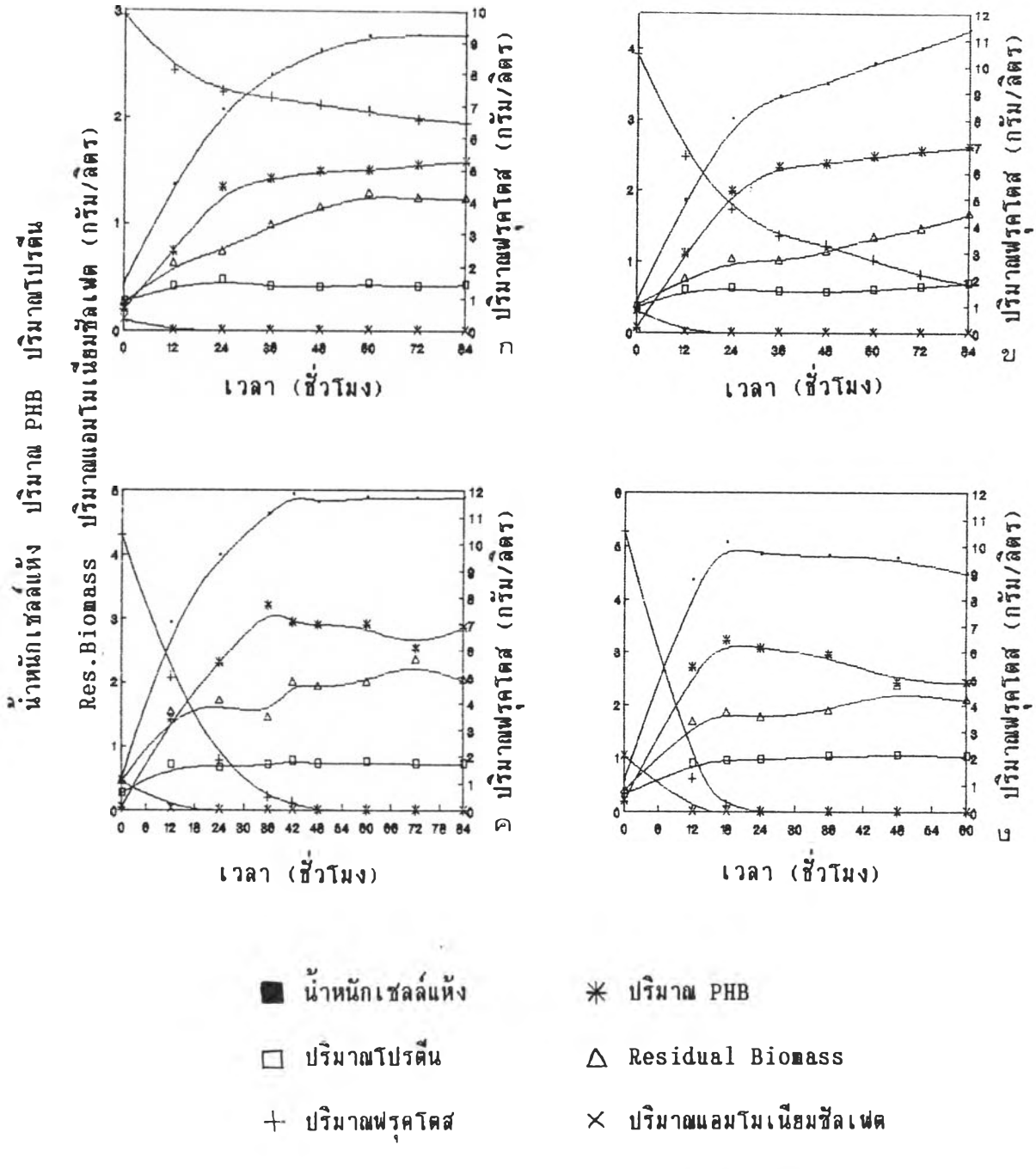
เลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงถังหมักที่มีอาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ควบคุม pH ของน้ำหมักที่ 7.0 ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ (ตามผลการวิจัยข้อ3.3.1) และควบคุมให้ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100% ของค่าการละลายอิ่มตัวตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ (ตามผลการวิจัยข้อ 3.3.2) ใช้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น10.0กรัม/ลิตร (ตามผลการวิจัยข้อ 3.3.3) แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 0.3 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 0.1 กรัม/ลิตร พบว่าที่ 48 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้ 1.48 กรัม/ลิตร คิดเป็น 56.57% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB เริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 โดยที่ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.65 และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.0930 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีฟรุคโตสเหลือในน้ำหมักเท่ากับ 6.45 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 16ก. และตารางที่ 14

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 0.3 กรัม/ลิตร พบว่าที่ 48 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้ 2.37 กรัม/ลิตร คิดเป็น 67.71% ของน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าปริมาณ PHB เริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.87 และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.1175 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีฟรุคโตสเหลืออยู่ในน้ำหมักประมาณ 2 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 16ข. และตารางที่ 14

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 0.5 กรัม/ลิตร ได้ปริมาณ PHB สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 3.19 กรัม/ลิตร คิดเป็น 68.94% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และ PHB ก็ได้ลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 42 เป็นต้นไป พบว่าฟรุคโตสเหลืออยู่เพียง 1.27 กรัม/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 42 และหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 4.38 ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งนั้นค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.1497 พบว่าแอมโมเนียมหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ดังแสดงในรูปที่ 16ค. และตารางที่ 14

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร ปริมาณ PHB สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 18 เท่ากับ 3.22 กรัม/ลิตร คิดเป็น 65.71% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง PHB ลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป พบว่าฟรุคโตสเหลืออยู่น้อยมากที่ชั่วโมงที่ 18 และหมดลงประมาณชั่วโมงที่ 24 ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.37 รวมทั้งน้ำหนักเซลล์แห้งก็ลดลงด้วย อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.170 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 16ง. และตารางที่ 14



รูปที่ 16 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น (ก.) 0.1 กรัม/ลิตร (ข.) 0.3 กรัม/ลิตร (ค.) 0.5 กรัม/ลิตร (ง.) 1.0 กรัม/ลิตร

เวลา ชม.	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)											
	0.1			0.3			0.5			1.0		
	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส
0	0.45	0.19	9.86	0.45	0.06	10.43	0.48	0.04	10.33	0.56	0.19	10.54
12	1.36	0.74	8.12	1.85	1.10	6.58	2.93	1.42	4.99	4.37	2.70	1.23
18	*	*	*	*	*	*	*	*	*	5.06	3.22	0.22
24	2.06	1.33	7.43	3.01	1.99	4.63	3.98	2.29	1.87	4.83	3.07	0.00
36	2.39	1.41	7.25	3.33	2.33	3.60	4.63	3.19	0.50	4.82	2.95	0.00
42	*	*	*	*	*	*	4.93	2.94	0.27	*	*	*
48	2.62	1.48	7.00	3.50	2.37	3.27	4.81	2.89	0.01	4.78	2.44	0.00
60	2.76	1.49	6.80	3.80	2.47	2.73	4.89	2.91	0.00	4.49	2.41	0.00
72	2.77	1.54	6.50	4.00	2.55	2.16	4.87	2.53	0.00	**	**	**
84	2.77	1.58	6.45	4.27	2.61	1.81	4.89	2.86	0.00	**	**	**

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB และปริมาณฟรุคโตส เมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.1 0.3 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร โดยให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 10.0 กรัม/ลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณฟรุคโตส เป็น กรัม/ลิตร)

* ไม่ได้เก็บตัวอย่างในช่วงเวลาดังกล่าว

** ไม่ได้วิเคราะห์ตัวอย่างในช่วงเวลาดังกล่าว เนื่องจากฟรุคโตสหมด

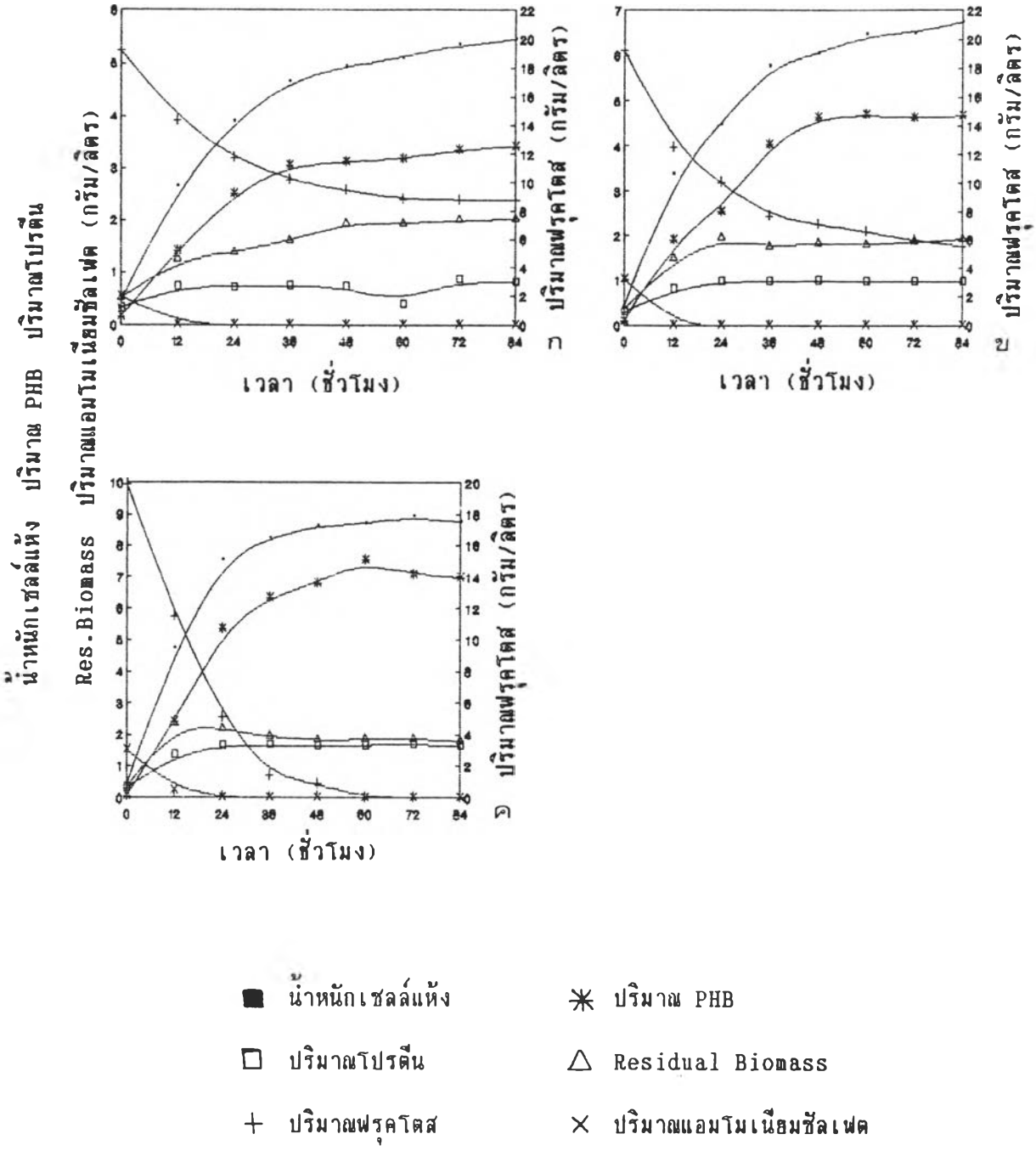
จากผลการวิจัยที่กล่าวมาสรุปได้ว่าเมื่อใช้ฟรุคโตสปริมาณ 10.0 กรัม/ลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร ปริมาณฟรุคโตสไม่เพียงพอสำหรับใช้ในการเติบโตและการผลิต PHB PHB และน้ำหนักเซลล์แห้งจะลดลงเมื่อฟรุคโตสหมด แต่เมื่อใช้ฟรุคโตส 10.0 กรัม/ลิตร ควรใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัม/ลิตร เพราะได้ PHB สูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณน้อยกว่านี้ คือได้ PHB 3.22 กรัม/ลิตร ที่เวลาเพียง 18 ชั่วโมง ดังนั้นจึงคาดว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นของฟรุคโตส อาจทำให้มีการผลิตและสะสม PHB ได้มากขึ้น จึงได้เพิ่มความเข้มข้นของฟรุคโตสเริ่มต้นเป็น 20.0 กรัม/ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 1.0 และ 1.5 กรัม/ลิตร

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 0.5 กรัม/ลิตร และฟรุคโตสความเข้มข้นเริ่มต้น 20.0 กรัม/ลิตร พบว่าที่ 48 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุด 3.11 กรัม/ลิตร คิดเป็น 63.08% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 4.34 และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.1474 และพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าฟรุคโตสเหลืออยู่ในน้ำหมักเท่ากับ 8.72 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 17ก. และตารางที่ 15

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร และฟรุคโตสความเข้มข้นเริ่มต้น 20.0 กรัม/ลิตร พบว่าปริมาณ PHB จะเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 และที่ 48 ชั่วโมงนี้ *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุด 4.63 กรัม/ลิตร คิดเป็น 76.53% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 4.82 และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.1727 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าฟรุคโตสเหลืออยู่ในน้ำหมัก 8.72 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 17ข. และตารางที่ 15

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 1.5 กรัม/ลิตร และฟรุคโตส ความเข้มข้นเริ่มต้น 20.0 กรัม/ลิตร พบว่าที่ 60 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุด 7.32 กรัม/ลิตร คิดเป็น 84.25% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 4.49 และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.2017 ฟรุคโตสหมดที่ชั่วโมงที่ 60 หลังจากนั้น PHB และน้ำหนักเซลล์แห้งก็ลดลง แอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 17ค. และตารางที่ 15

จากผลการวิจัยที่กล่าวมาแล้วสรุปได้ว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟรุคโตส เป็น 20.0 กรัม/ลิตร จะทำให้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้น กล่าวคือได้ PHB เท่ากับ 3.35 กรัม/ลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง 4.63 กรัม/ลิตร ที่ 48 ชั่วโมง และ 7.32 กรัม/ลิตร ที่ 60 ชั่วโมง เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นปริมาณ 0.5 1.0 และ1.5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัม/ลิตร พบว่าปริมาณฟรุคโตสในน้ำหมักหมดก่อนที่จะสิ้นสุดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อคือ ที่เวลาประมาณ 60 ชั่วโมง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเพิ่มความเข้มข้นของฟรุคโตสเริ่มต้นเป็น 30.0กรัม/ลิตร เพื่อให้เพียงพอที่ *Alcaligenes* sp. A-04 จะนำไปใช้สำหรับ การเติบโต และการผลิต PHB ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเป็น 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร



รูปที่ 17 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 20.0 กรัม/ลิตร แปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (ก.) 0.5 กรัม/ลิตร (ข.) 1.0 กรัม/ลิตร และ (ค.) 1.5 กรัม/ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)								
	0.5			1.0			1.5		
	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส
0	0.45	0.16	19.22	0.43	0.09	19.20	0.42	0.06	19.91
12	2.65	1.41	15.57	3.37	1.90	12.45	4.72	2.39	11.[illegible]
24	3.88	2.51	12.66	4.47	2.53	10.01	7.52	5.36	5.09
36	4.64	3.04	10.98	5.76	4.02	7.67	8.24	6.33	1.42
48	4.93	3.11	9.40	6.05	4.63	7.05	8.62	6.82	0.88
60	5.10	3.17	8.79	6.47	4.70	6.54	8.69	7.32	0.00
72	5.34	3.35	8.77	6.50	4.64	5.95	8.92	7.07	0.00
84	5.44	3.42	8.72	6.70	4.82	5.51	8.76	6.97	0.00

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณฟรุคโตส เมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.5 1.0 และ 1.5 กรัม/ลิตร โดยให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณฟรุคโตส เป็น กรัม/ลิตร)

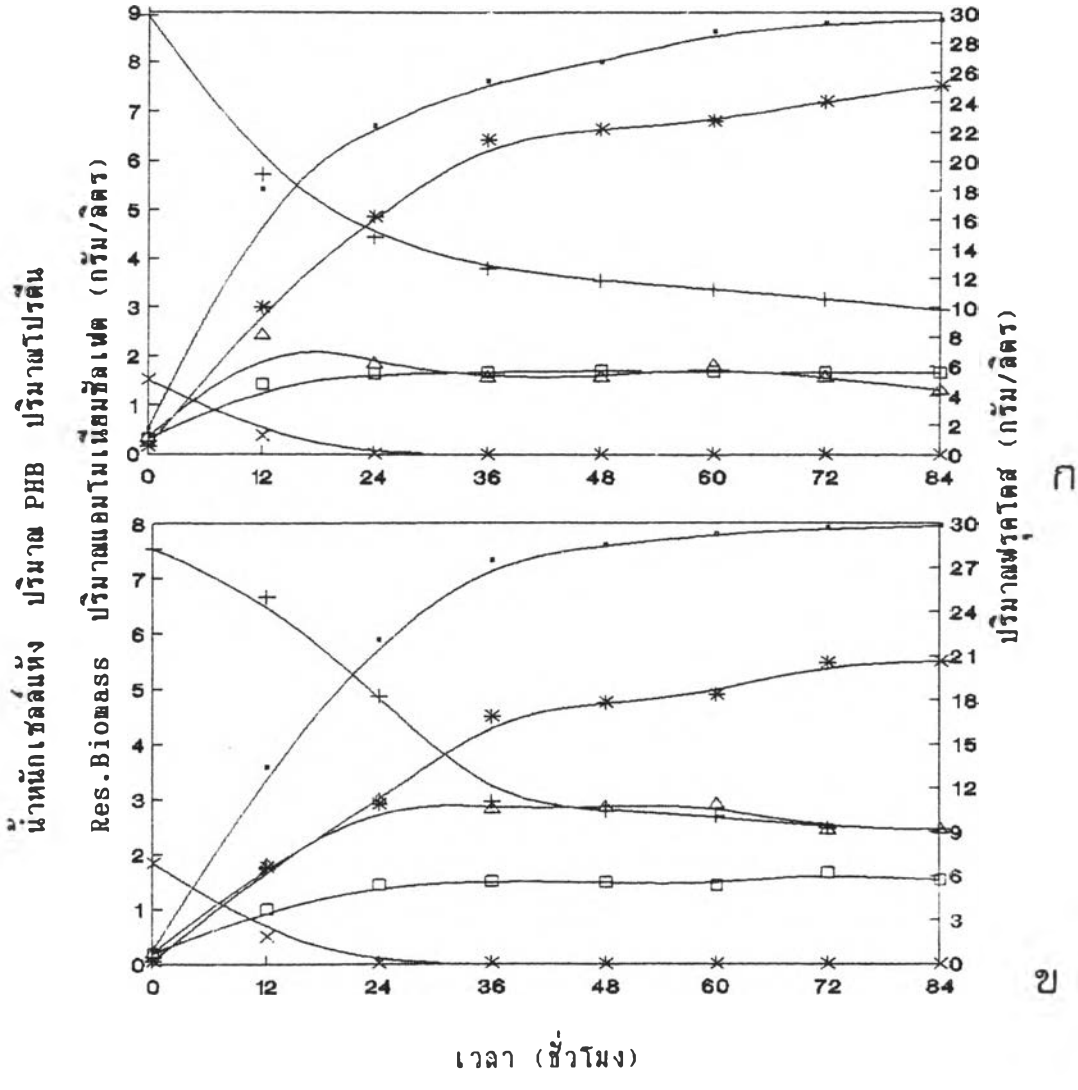
เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 1.5 กรัม/ลิตรและฟรุคโตส ความเข้มข้นเริ่มต้น 30.0 กรัม/ลิตร พบว่าที่ 72 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุด 7.21 กรัม/ลิตรคิดเป็น82.12% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าปริมาณ PHB จะเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 4.45 และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.199 และพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตใกล้หมดที่ชั่วโมงที่ 24 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าฟรุคโตสเหลืออยู่ 9.84 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 18ก. และตารางที่ 16

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 2.0 กรัม/ลิตร พบว่าที่ 72 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุด 5.47 กรัม/ลิตร คิดเป็น 69.92% ของน้ำหนักเซลล์แห้งและพบว่าปริมาณ PHB เริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.60 และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.245 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดที่ชั่วโมงที่ 36 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าฟรุคโตสเหลืออยู่ 9.20 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 18ข. และตารางที่ 16

จากรูปที่ 19 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิตขึ้นที่เวลาต่าง ๆ เมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเพิ่มปริมาณฟรุคโตสให้มากเพียงพอสำหรับการเติบโต และการผลิต PHB ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อซึ่งได้ผลว่า *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 7.54 กรัม/ลิตร หรือคิดเป็น 85.20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 84 ชั่วโมง เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัม/ลิตร และฟรุคโตส 30.0 กรัม/ลิตร ผลการเปรียบเทียบปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน และอัตราการเจริญจำเพาะ ดังแสดงในตารางที่ 17

จากผลการวิจัยเมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจาก 0.1 จนถึง 2.0 กรัม/ลิตร ในสภาวะที่มีฟรุคโตสเพียงพอตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อ พบว่า ปริมาณโปรตีน และ residual biomass มีความสัมพันธ์กับปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น โดยพบว่าปริมาณโปรตีนที่สูงสุดในแต่ละการทดลอง(การทดลองที่มีการแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต)เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นสูงขึ้น และช่วงเวลาที่โปรตีนมีปริมาณสูงสุด เป็นเวลาเดียวกันกับเวลาที่แอมโมเนียมซัลเฟตหมด เช่นเดียวกับโปรตีน ปริมาณของ residual biomass ที่สูงสุดในแต่ละการทดลอง มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นสูงขึ้น และช่วงเวลาที่ residual biomass มีปริมาณสูงสุดเป็นเวลาเดียวกับเวลาที่แอมโมเนียมซัลเฟตหมดลง

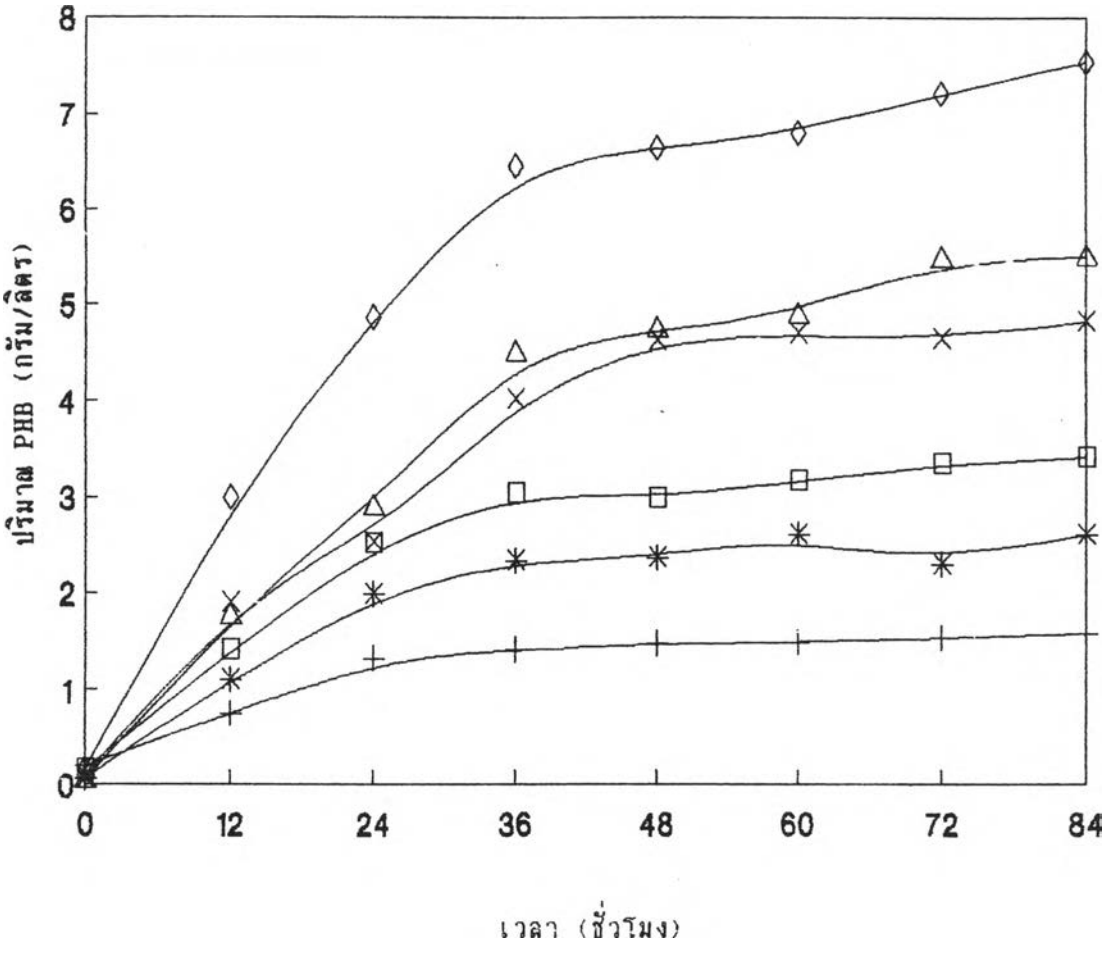
ดังนั้นเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีน และ residual biomass เป็นตัวแปรที่บอกถึงการเติบโตของเซลล์ โดยมีความสัมพันธ์กับการใช้อาหารไนโตรเจนของเซลล์



รูปที่ 18 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 30.0 กรัม/ลิตร เมื่อแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (ก.) 1.5 กรัม/ลิตร และ (ข.) 2.0 กรัม/ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)					
	1.5			2.0		
	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส
0	0.50	0.16	29.78	0.31	0.05	28.29
12	5.42	2.99	19.12	3.57	1.76	25.03
24	6.71	4.87	14.78	5.88	2.90	18.21
36	7.62	6.45	12.66	7.32	4.50	11.04
48	8.00	6.64	11.79	7.59	4.74	10.45
60	8.61	6.80	11.23	7.80	4.89	10.05
72	8.78	7.21	10.54	7.91	5.47	9.26
84	8.85	7.54	9.84	7.95	5.50	9.20

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณฟรุคโตส เมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร โดยให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 30.0 กรัม/ลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณโปรตีน เป็น กรัม/ลิตร)



+ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัม/ลิตร
✳ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.3 กรัม/ลิตร
□ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม/ลิตร
× แอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัม/ลิตร
◇ แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัม/ลิตร
△ แอมโมเนียมซัลเฟต 2.0 กรัม/ลิตร

รูปที่ 19 เปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิตขึ้น โดยแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต และเพิ่มความเข้มข้นของฟรุคโตสให้เพียงพอสำหรับการเติบโต และการผลิต PHB ดังนี้

แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 และ 0.3 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 10.0 กรัม/ลิตร

แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 20.0 กรัม/ลิตร

แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 30.0 กรัม/ลิตร

ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นของฟรุคโตส (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	%PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB/โปรตีน	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)
0.1	10.0	1.48	56.57	3.65	0.0930
0.3	10.0	2.37	67.71	3.87	0.1175
0.5	20.0	3.11	63.08	4.34	0.1474
1.0	20.0	4.63	76.53	4.82	0.1727
1.5	30.0	7.21	82.12	4.45	0.1990
2.0	30.0	5.47	69.92	3.60	0.2448

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบ ปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน และอัตราการเจริญจำเพาะ เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1-2.0 กรัม/ลิตร และเพิ่มความเข้มข้นของฟรุคโตสเป็น 10.0-30.0 กรัม/ลิตร เพื่อให้เพียงพอ สำหรับการเติบโต และการผลิต PHB

หมายเหตุ เมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 0.3 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร PHB มีปริมาณสูงสุด ที่เวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร PHB มีปริมาณสูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง

ผลการวิจัยเมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจาก 0.1-2.0 กรัม/ลิตร โดยให้ฟรุคโตสปริมาณที่เพียงพอที่จะใช้สำหรับการเติบโตและการผลิต PHB ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ สรุปได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น จะทำให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงขึ้นตามไปด้วย รวมทั้งปริมาณ PHB ก็ได้สูงขึ้นเช่นกัน แต่เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเพิ่มมากขึ้นเป็น 2.0 กรัม/ลิตร ปริมาณ PHB ที่ได้มีค่าต่ำกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.5 กรัม/ลิตร

ดังนั้นเห็นได้ว่าเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.5 กรัม/ลิตร *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้ปริมาณ สูงที่สุดเท่ากับ 7.21 กรัม/ลิตร หรือ 82.12% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 72 ชั่วโมง แต่ปริมาณ PHB/โปรตีน ที่เวลาเดียวกัน(4.45) พบว่ามีปริมาณที่ต่ำกว่า สภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร(4.82) และใกล้เคียงกับสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เริ่มต้น 0.5 กรัม/ลิตร(4.34) ซึ่งเป็นสภาวะที่ให้ปริมาณ PHB ต่ำกว่าถึง 4 กรัม/ลิตร หรือ ต่ำกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาแบบ fed-batch จึงได้เลือกสภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.5 1.0 และ 1.5 กรัม/ลิตร ไปศึกษาการเลี้ยงแบบ fed-batch cultivation ในลำดับต่อไป

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษา การหาปริมาณอาหารแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB แต่การหาปริมาณอาหารแบบเป็นสัดส่วน (C/N ratio) นั้นไม่สามารถจะได้ค่าที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB เพราะฉนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาหาปริมาณของฟรุคโตส และแอมโมเนียมซัลเฟต (อาหารแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน) โดยมิได้กำหนดเป็นอัตราส่วน อีกประการหนึ่ง อัตราส่วนที่เป็นค่าเดียวกัน อาจจะได้มาจากสัดส่วนของปริมาณฟรุคโตส และแอมโมเนียมซัลเฟตที่แตกต่างกันก็ได้ ดังแสดงในตารางที่ 18

ก่อนที่จะศึกษาการเลี้ยงแบบ fed-batch ได้ศึกษาการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 แบบ batch โดยนำกากน้ำตาลมาใช้เป็นอาหารคาร์บอน แทนฟรุคโตส ซึ่งผลการวิจัยได้แสดงไว้ข้อที่ 3.4

C/N ratio	ปริมาณฟรุคโตส (กรัม/ลิตร)	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)
10	10.0	1.0	0.170	3.22
13.33	20.0	1.5	0.2017	7.32
15	30.0	2.0	0.2450	5.47
20	10.0	0.5	0.1497	3.19
20	20.0	1.0	0.1727	4.63
20	30.0	1.5	0.1990	7.21
33.33	10.0	0.3	0.1175	2.37
40	20.0	0.5	0.1474	3.11
50	5.0	0.1	0.0937	0.99
100	10.0	0.1	0.0930	1.58
200	20.0	0.1	0.1324	1.60

ตารางที่ 18 แสดงค่า C/N ratio ที่มีผลต่ออัตราการเจริญจำเพาะ และปริมาณ PHB เมื่อแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตส และแอมโมเนียมซัลเฟต ตามปริมาณจริงที่ใช้ในการทดลอง

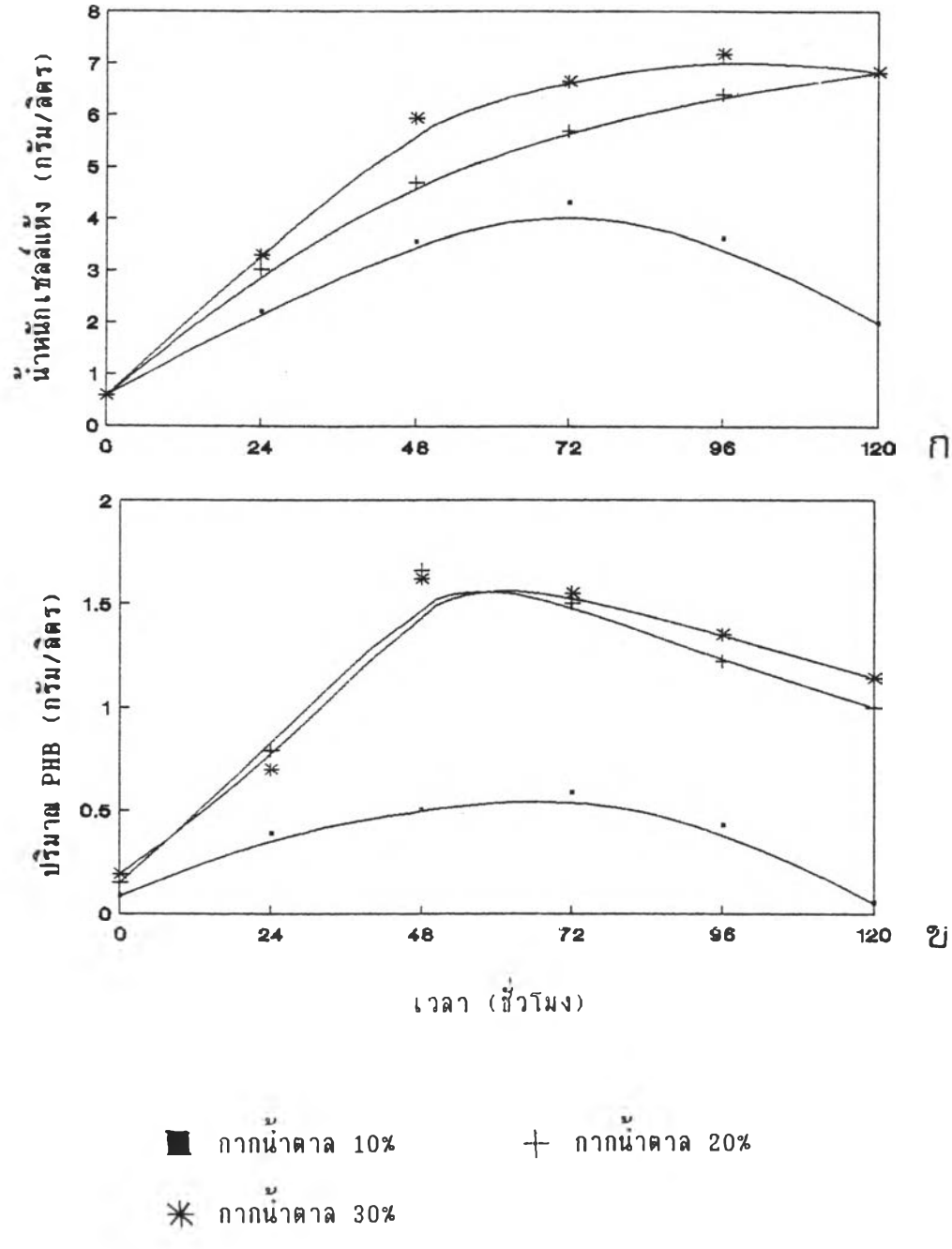
3.4 การนำกากน้ำตาลมาใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน

เนื่องจากการผลิต PHB ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ยังมีต้นทุนสูง เหตุผลที่สำคัญประการหนึ่งคือ สารอาหารที่ใช้มีราคาแพง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารอาหารที่ใช้ในปริมาณมากได้แก่ อาหารแหล่งคาร์บอน ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้น้ำตาลบริสุทธิ์ เช่น กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ซึ่งมีราคาสูง ถ้าสามารถใช้อาหารแหล่งคาร์บอนที่มีราคาต่ำได้เช่น กากน้ำตาล จะทำให้ต้นทุนมีราคาลดลง ในการวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการนำกากน้ำตาลมาใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน

3.4.1 การศึกษาปริมาณของกากน้ำตาลที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน

เลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงขวดทดลองขนาด 250 มล.ที่มีอาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 50 มล. โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน แปรผันปริมาณแหล่งอาหารคาร์บอนโดยใช้ stock ของกากน้ำตาลปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 10% 20% และ 30 % (w/v) จากนั้นนำ stock มาใส่ในถังหมักปริมาณเท่ากับ 20% (v/v) ของอาหาร MSM

ผลการวิจัยเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของกากน้ำตาล 10% 20% และ 30% พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาล 30% เป็นอาหารคาร์บอนได้น้ำหนักแห้งของเซลล์มากที่สุด โดยได้ปริมาณเท่ากับ 7.10 กรัม/ลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง ส่วนกากน้ำตาล 20% ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ 120 ชั่วโมง และเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยกากน้ำตาล 10% เป็นอาหารคาร์บอน ได้น้ำหนักเซลล์แห้งต่ำสุดทุกช่วงเวลาของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 20ก. และผลการวิจัยเปรียบเทียบปริมาณ PHB ของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของกากน้ำตาล 10 20 และ 30% พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมงเมื่อใช้กากน้ำตาลปริมาณ 20% จะได้ปริมาณ PHB สูงสุด 1.66 กรัม/ลิตร คิดเป็น 35.34% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนกากน้ำตาลปริมาณ 30% ก็ให้ PHB สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมงเช่นกันคือ 1.62 กรัม/ลิตร คิดเป็น 27.23%ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนกากน้ำตาลปริมาณ 10% นั้นให้ PHB ปริมาณสูงสุดที่ 72 ชั่วโมงเพียง 0.584 กรัม/ลิตร คิดเป็น 13.58% ของน้ำหนักเซลล์ แห้ง ดังแสดงในรูปที่ 20ข.



รูปที่ 20 น้ำหนักเซลล์แห้ง (ก.) และปริมาณ PHB (ข.) ของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า โดยแปรผันปริมาณกากน้ำตาล

3.4.2 การศึกษารูปแบบการเติบโต และการผลิต PHB โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ 30°ซ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงถังหมักที่มีอาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ควบคุม pH ที่ 7.0 ตลอดระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ และควบคุมให้ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100% ของค่าการละลายอิ่มตัวตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อ แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร สำหรับการหาปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในกากน้ำตาลจะวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC จากการวิเคราะห์ในเบื้องต้นทำให้ทราบว่า ในกากน้ำตาลที่ใช้นี้มีฟรุคโตส กลูโคส และซูโครสอยู่ 10.53 5.33 และ 34.5%(w/w) ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อใช้กากน้ำตาล 20% (w/v) เป็นอาหารแหล่งคาร์บอนจะมีฟรุคโตส กลูโคส และซูโครส 4.21 2.13 และ 13.8 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

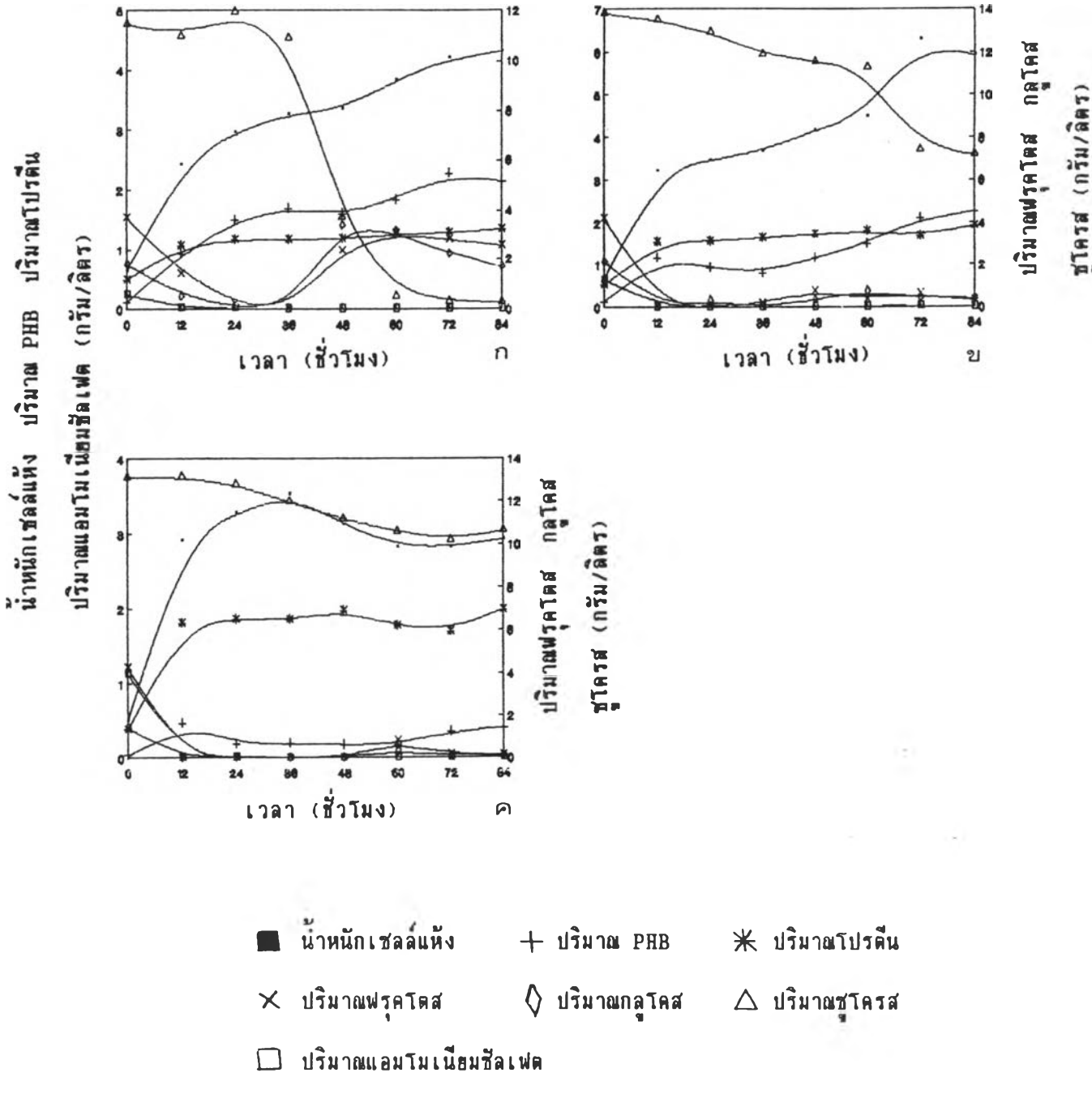
3.4.2.1 เมื่อใช้กากน้ำตาล 20% เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 0.1 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 21ก. พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นเป็นสองช่วง ช่วงแรกชั่วโมงที่ 0-48 โดยมีการใช้กลูโคสและฟรุคโตส คาดว่าซูโครสถูกย่อยทำให้ปริมาณของกลูโคส และฟรุคโตสเพิ่มขึ้นทำให้น้ำหนักเซลล์แห้ง และ PHB เพิ่มขึ้นอีกช่วงคือ 48-84 ชั่วโมง ที่ชั่วโมงที่ 72 เชื้อสามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 2.27 กรัม/ลิตร คิดเป็น 53.86% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีนเท่ากับ 1.76 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.1126 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 โปรตีนมีปริมาณสูงสุด และคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24เป็นปริมาณเท่ากับ 1.17 กรัม/ลิตร เมื่อสิ้นสุดระยะการเลี้ยงเชื้อพบว่ามีฟรุคโตส กลูโคส และซูโคส เหลืออยู่ 2.55 1.68 และ 0.23 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 0.5 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 21ข. พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และ PHB เพิ่มขึ้นเป็นสองช่วง น้ำหนักเซลล์แห้งนั้นเพิ่มขึ้นที่ 0-72 ชั่วโมง PHB เพิ่มขึ้นจนถึงที่เวลา 12 ชั่วโมง แล้วลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 36 จึงเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอจนสูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าเชื้อสามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 2.11 กรัม/ลิตร คิดเป็น 33.49% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 1.26 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.1320 แอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 โปรตีนมีปริมาณสูงสุดและคงที่ ที่ชั่วโมงที่ 24 เป็นปริมาณเท่ากับ 1.56 กรัม/ลิตร ปริมาณของกลูโคสและฟรุคโตสลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 12 แล้วเพิ่มขึ้น ส่วนซูโครสลดลงอย่างสม่ำเสมอ จนถึงชั่วโมงที่ 72 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ฟรุคโตส กลูโคส และซูโครส เหลืออยู่ 0.29 0.38 และ 7.18 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 21ค. พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ 36 ชั่วโมง PHB สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง แล้วลดลงจนคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นและคงที่ ที่ชั่วโมงที่ 72 เชื้อสร้าง PHB ได้สูงสุดเพียง 0.35 กรัม/ลิตร คิดเป็น 12.42% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณPHB/โปรตีน เท่ากับ 0.21 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.1465 แอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และโปรตีนมีปริมาณสูงสุดและคงที่ ที่ชั่วโมงที่ 24 เป็นปริมาณเท่ากับ 1.81 กรัม/ลิตร ส่วนฟรุคโตส และกลูโคสหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 แล้วเพิ่มขึ้นอีกครั้งที่ชั่วโมงที่ 60 แล้วลดลงจนคงที่ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ซูโครสลดลงอย่างสม่ำเสมอตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ฟรุคโตส กลูโคส และซูโครส เหลืออยู่ 0.11 0.19 และ 10.63 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

เปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่สร้างขึ้นเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.1 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร และใช้กากน้ำตาล 20% เป็นอาหารคาร์บอน แสดงในรูปที่ 22 พบว่าสภาวะที่แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 0.5 และ1.0 กรัม/ลิตร จะให้ปริมาณ PHB สูงสุดที่ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 2.27 2.11 และ 0.35 กรัม/ลิตร ตามลำดับ %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB/โปรตีน ลดลงตามลำดับ แต่อัตราการเจริญจำเพาะยังคงเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 19

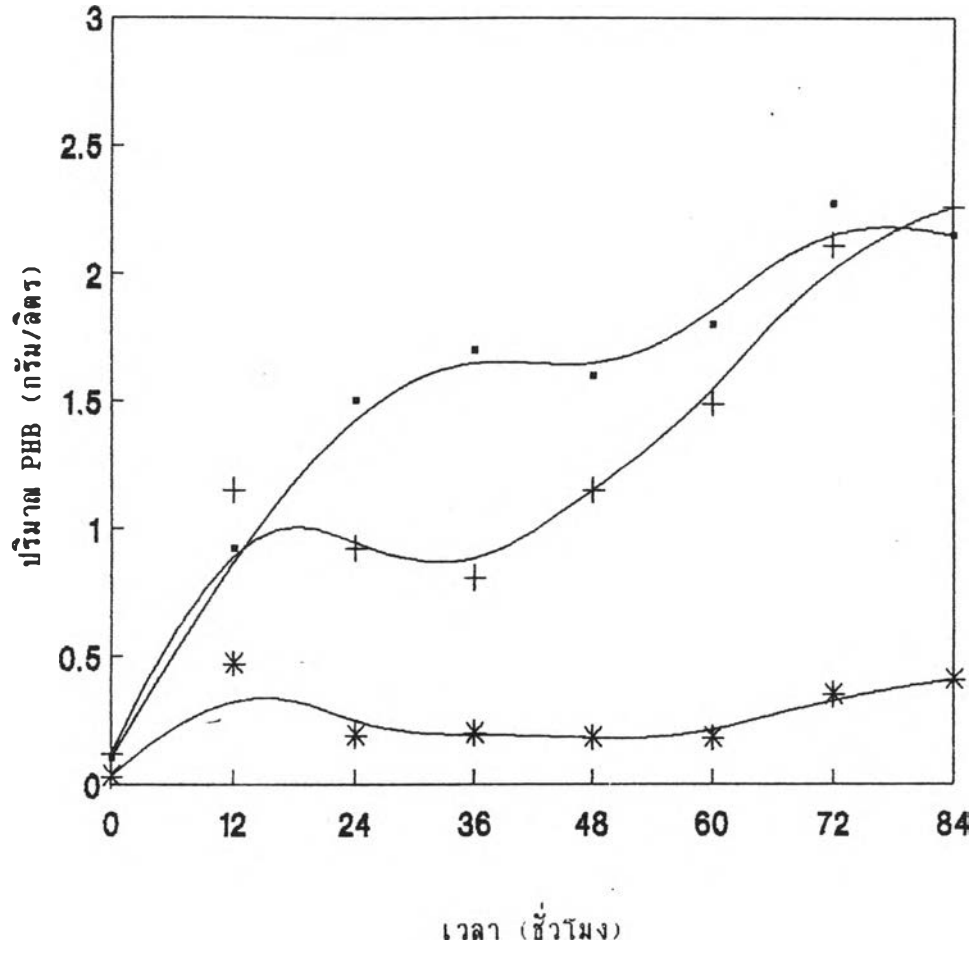


รูปที่ 21 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 ใช้กากน้ำตาล 20% เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน เมื่อ

(ก.) แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร

(ข.) แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 กรัม/ลิตร

(ค.) แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร



รูปที่ 22 เปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่เวลาต่าง ๆ โดยใช้กากน้ำตาล 20% เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน เมื่อให้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร

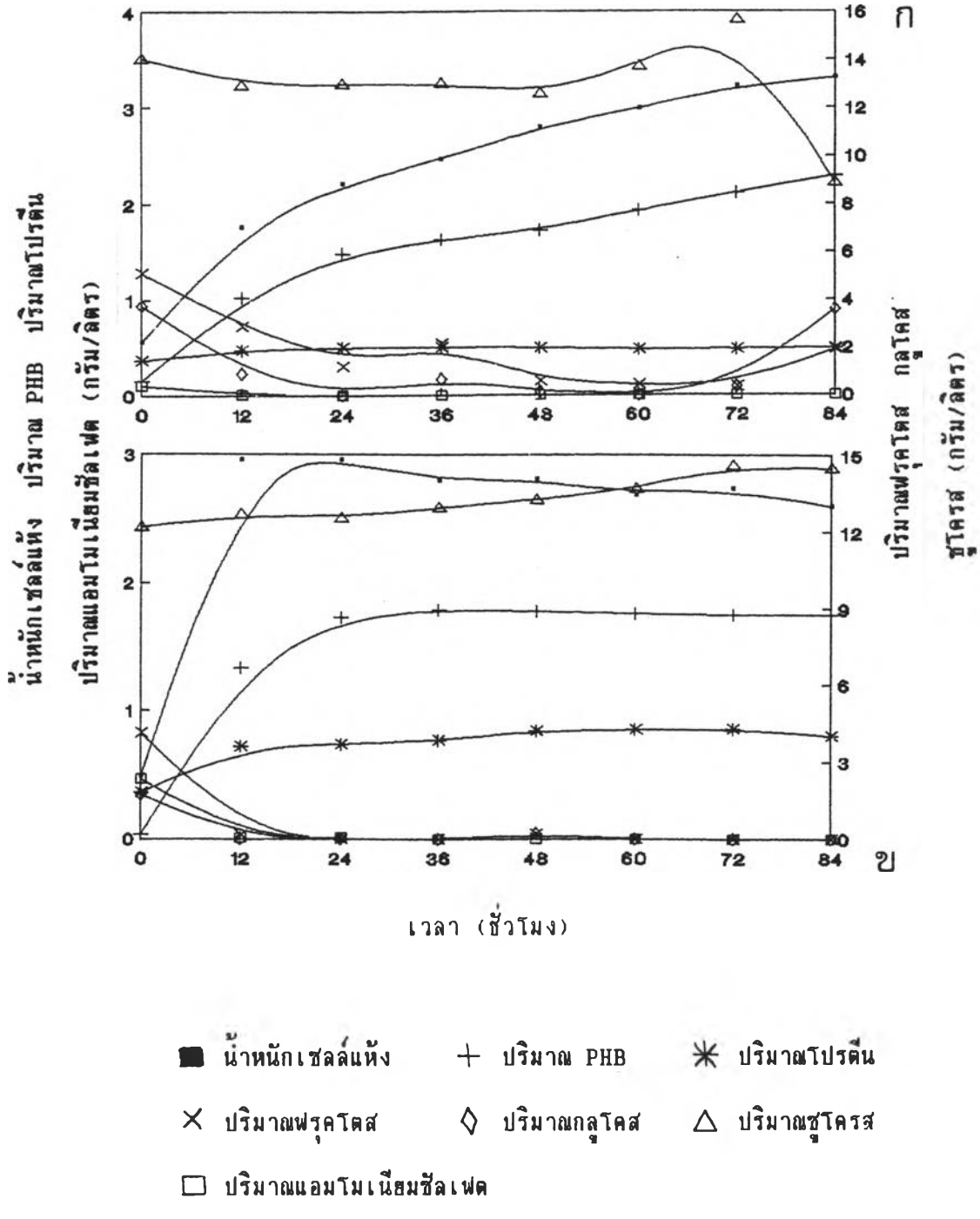
ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	%PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB/โปรตีน	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)
0.1	2.27	53.86	1.76	0.1126
0.5	2.11	33.49	1.26	0.1320
1.0	0.35	12.42	0.21	0.1465

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน และอัตราการเจริญจำเพาะ เมื่อใช้กากน้ำตาล 20% เป็นอาหารคาร์บอน โดยแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น

น้ำตาลจากกากน้ำตาลอาจจะแตกต่างจากน้ำตาลบริสุทธิ์ เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ทราบว่า น้ำตาลที่สำคัญในกากน้ำตาล ได้แก่ ฟรุคโตส กลูโคส และซูโครส ดังนั้นจึงได้เปรียบเทียบโดยใช้ฟรุคโตส กลูโคส และซูโครส บริสุทธิ์ ในปริมาณเท่ากับ 5.10 3.77 และ 14.03 กรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และ 0.5 กรัม/ลิตร

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 0.1 กรัม/ลิตร และใช้ฟรุคโตส กลูโคส และซูโครสบริสุทธิ์ เป็นอาหารคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 23ก. พบว่า ทั้งน้ำหนักเซลล์แห้ง และ PHB จะเพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง ที่ชั่วโมงที่ 84 พบว่าเชื้อผลิต PHB ได้เท่ากับ 2.29 กรัม/ลิตร คิดเป็น 69.18% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 4.63 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.0951 แอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และโปรตีนมีปริมาณสูงสุด และคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นปริมาณเท่ากับ 0.50 กรัม/ลิตร พบว่าฟรุคโตส และ กลูโคส ลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 72 ก็เพิ่มขึ้น โดยที่ซูโครสคงที่ตลอด และ ลดลงที่ชั่วโมงที่ 72 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีฟรุคโตส กลูโคส และซูโคส เหลือ 1.91 3.56 และ 8.87 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 0.5 กรัม/ลิตร และใช้ฟรุคโตส กลูโคส และซูโครสบริสุทธิ์ เป็นอาหารคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 23ข. และพบว่าน้ำหนัก เซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 24 แล้วคงที่ ส่วน PHB นั้นเพิ่มขึ้นจนสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง โดยที่ 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสร้าง PHB ได้ 1.73 กรัม/ลิตร คิดเป็น 58.45% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 2.35 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.150 แอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 โปรตีนมีปริมาณสูงสุด และคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นปริมาณเท่ากับ 0.74 กรัม/ลิตร พบว่ากลูโคส ฟรุคโตส หมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ซูโครสคงที่ตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อ เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีเฉพาะซูโครส ที่เหลืออยู่เท่ากับ 14.49 กรัม/ลิตร



รูปที่ 23 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยใช้ ฟรุคโตส กลูโคส และซูโครส บริสุทธิ์ เป็นอาหารคาร์บอน เมื่อ

(ก.) แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร

(ข.) แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 กรัม/ลิตร

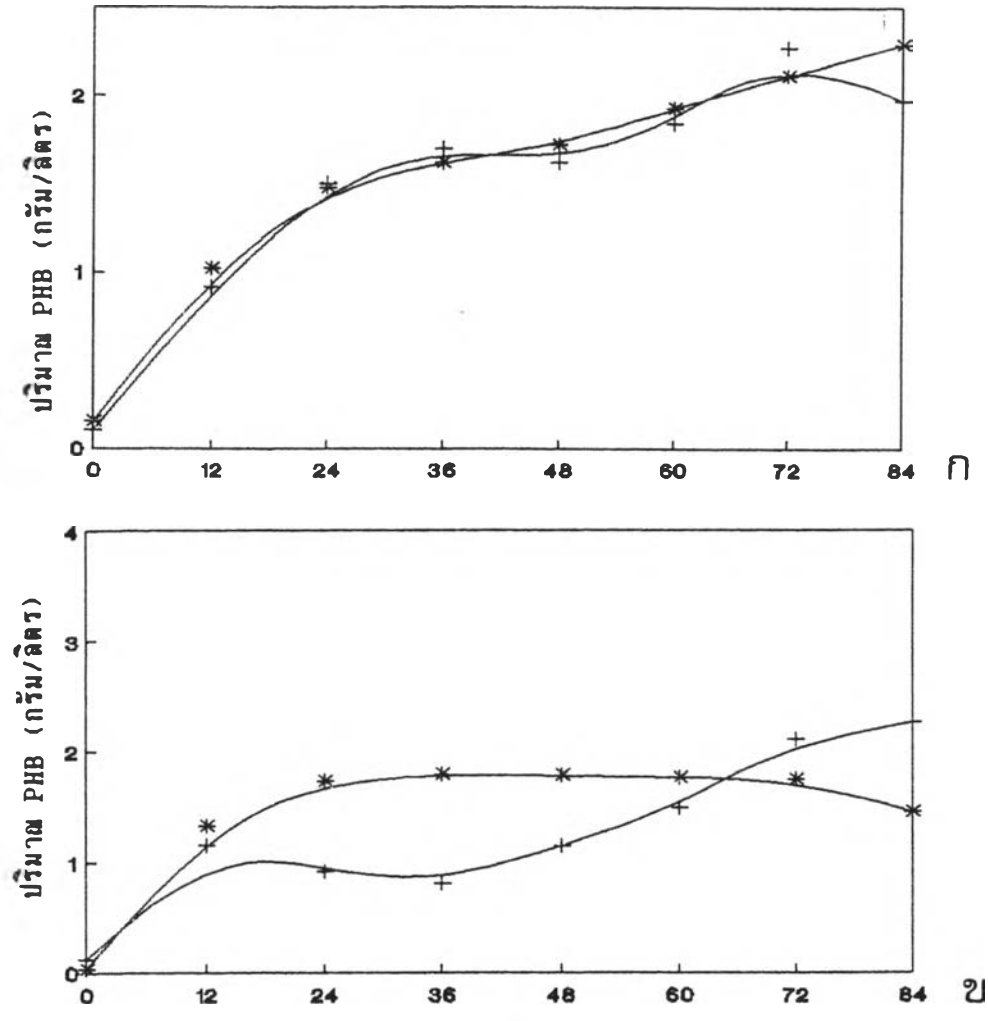
เปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิตขึ้นที่เวลาต่าง ๆ เมื่อให้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 0.1 กรัม/ลิตร เปรียบเทียบระหว่างการใช้ กากน้ำตาล 20% และ ฟรุคโตส กลูโคส และซูโครสบริสุทธิ์ ปริมาณเท่ากับ 5.10 3.77 และ 14.03 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 24ก.

เปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิตขึ้นที่เวลาต่าง ๆ เมื่อให้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 0.5 กรัม/ลิตร เปรียบเทียบระหว่างการใช้ กากน้ำตาล 20% และ ฟรุคโตส กลูโคส และซูโครสบริสุทธิ์ เป็นอาหารคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 24ข.

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัม/ลิตร โดยใช้กากน้ำตาล 20% และฟรุคโตส กลูโคส และซูโคส บริสุทธิ์ จะให้ PHB ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แต่สภาวะที่ใช้กากน้ำตาล 20% ให้ปริมาณ PHB สูงสุดเร็วกว่าสภาวะที่ใช้ฟรุคโตส กลูโคส และซูโครสบริสุทธิ์ถึง 12 ชั่วโมง และทั้ง2 สภาวะพบว่ามีอัตราการเจริญจำเพาะใกล้เคียงกัน (.01126 และ 0.0951 เมื่อใช้กากน้ำตาล 20% และน้ำตาลบริสุทธิ์ ตามลำดับ)

เมื่อให้แอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณที่สูงขึ้นจะพบว่า เมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 กรัม/ลิตร ในสภาวะที่ใช้กากน้ำตาล 20% ปริมาณ PHB สูงสุดที่ได้ (ที่เวลา 72 ชั่วโมง)สูงกว่าเมื่อใช้ ฟรุคโตส กลูโคส และซูโครสบริสุทธิ์ แต่ระยะเวลาที่ใช้เพื่อให้ได้ปริมาณ PHB สูงสุดใช้เวลานานกว่าเมื่อใช้น้ำตาลฟรุคโตส กลูโคส และซูโครส บริสุทธิ์ ซึ่งได้ปริมาณ PHB สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง และพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของทั้ง 2 สภาวะใกล้เคียงกัน (0.1320 และ 0.150 เมื่อใช้กากน้ำตาล และ น้ำตาลบริสุทธิ์ เป็นอาหารคาร์บอนตามลำดับ)

จากการวิจัยสรุปได้ว่า น้ำตาลสำคัญในกากน้ำตาล (ฟรุคโตส กลูโคส และซูโครส) เป็นน้ำตาลที่เชื้อสามารถนำไปใช้เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน เพื่อการเติบโตและการผลิต PHB ได้ เช่นเดียวกับน้ำตาลฟรุคโตส กลูโคส และซูโครสบริสุทธิ์



รูปที่ 24 เปรียบเทียบปริมาณ PHB เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 โดยใช้กากน้ำตาล 20% และ ฟรุคโตส กลูโคส ซูโคส บริสุทธิ์ เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน เมื่อ

(ก.) ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.1 กรัม/ลิตร

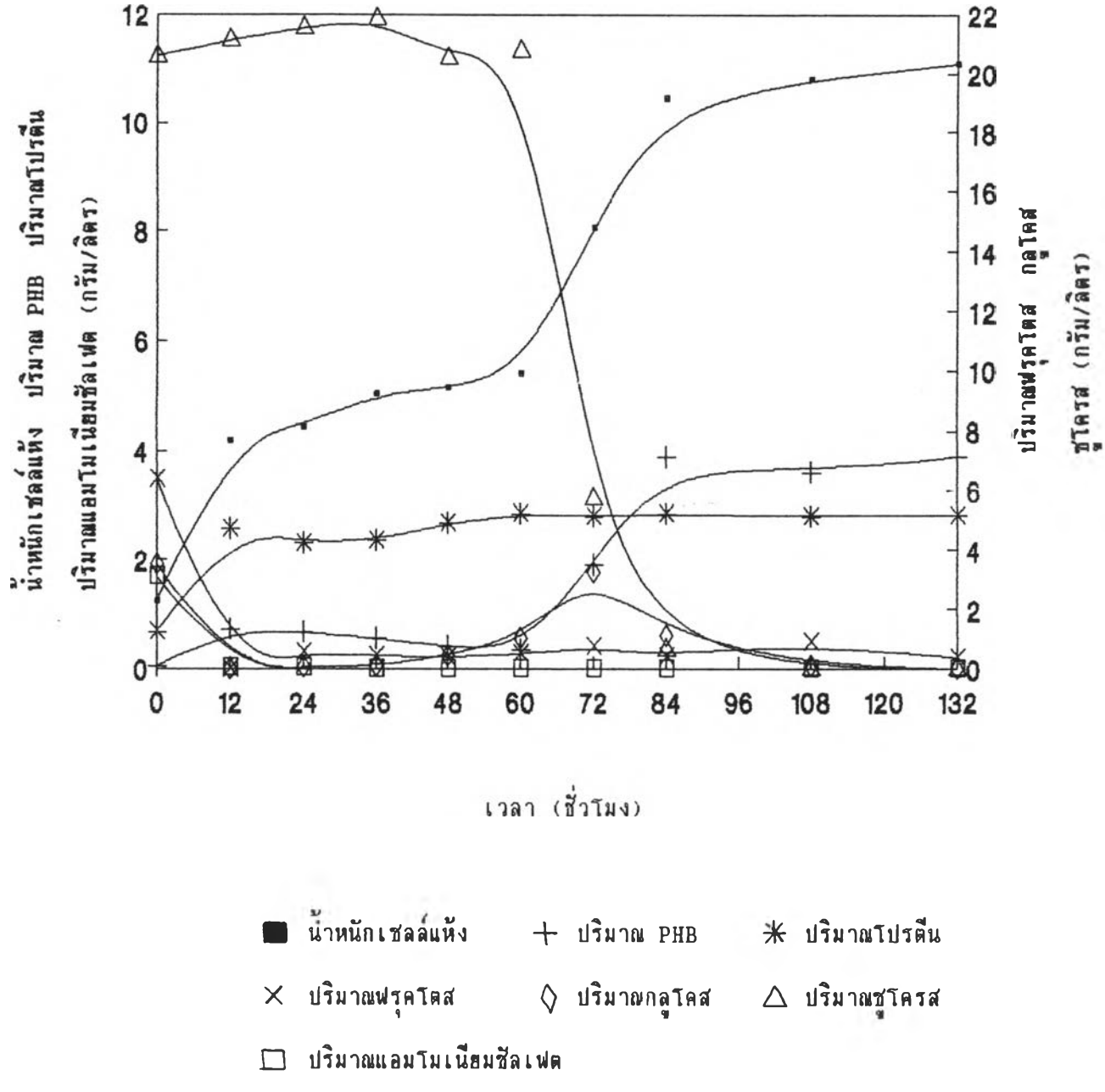
(ข.) ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.5 กรัม/ลิตร

3.4.2.2 เมื่อใช้กากน้ำตาล 30% เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน

จากการวิเคราะห์กากน้ำตาลที่ใช้ในการวิจัยนี้ โดยวิธี HPLC ได้ผลว่า เมื่อใช้กากน้ำตาล 30% เป็นอาหารคาร์บอน จะทำให้ในน้ำหมักมีความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตส กลูโคส และซูโครส เท่ากับ 5.19 3.77 และ 14.02 กรัม/ลิตร

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 1.5 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 25 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นสองช่วง ช่วงแรก 0-60 ชั่วโมง มีการใช้กลูโคส และฟรุคโตส จนหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ช่วงที่ 2 ที่เวลา 60-84 ชั่วโมง (ซูโครสเริ่มสลายตั้งแต่ชั่วโมงที่ 60) หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งมีปริมาณคงที่ สำหรับ PHB ในช่วงแรกปริมาณ PHB สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง (0.72 กรัม/ลิตร) แล้วลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 60 (0.33 กรัม/ลิตร) จากนั้นในช่วงที่ 2 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 60 ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 84 พบว่า PHB มีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 3.88 กรัม/ลิตร คิดเป็น 37.15% น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีนเท่ากับ 1.37 อัตราการเจริญจำเพาะ 0.101 แอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 โปรตีนมีปริมาณสูงสุดและคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นปริมาณเท่ากับ 2.57 กรัม/ลิตร เมื่อสิ้นสุดระยะการเลี้ยงเชื้อ พบว่าฟรุคโตส กลูโคส และซูโครสเหลืออยู่ 0.36 0 และ0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

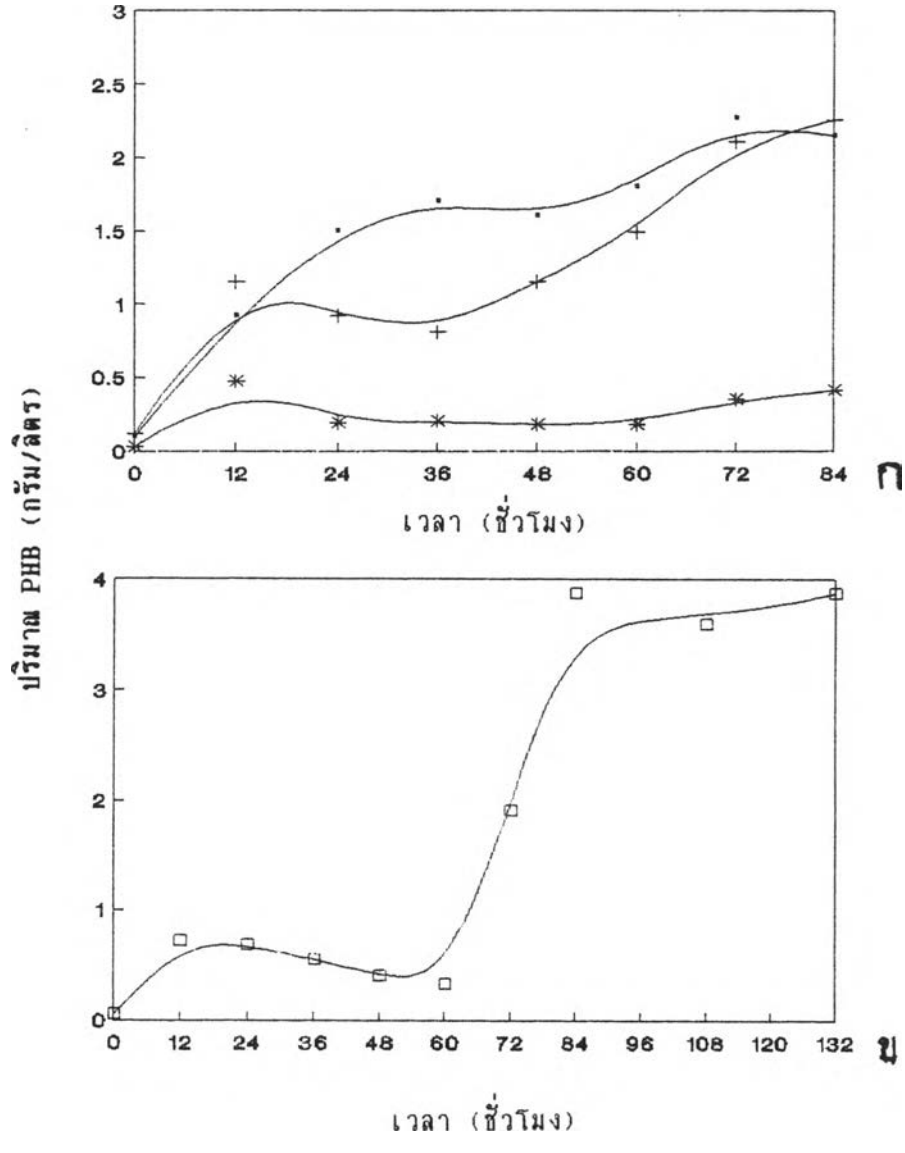
สรุปได้ว่าเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.5 กรัม/ลิตร เชื้อสามารถใช้กากน้ำตาล 30% เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต PHB ให้ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 3.88 กรัม/ลิตร ใช้เวลาถึง 84 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่นานเมื่อเทียบกับสภาวะที่ใช้กากน้ำตาล 20% เป็นอาหารคาร์บอน แต่อย่างไรก็ตามปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ยังคงสูงกว่าทุกสภาวะที่ใช้กากน้ำตาลเป็นอาหารคาร์บอน



รูปที่ 25 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัม/ลิตร และกากน้ำตาล 30% เป็นอาหาร

จากผลการวิจัยข้อ 3.4.2.1 และ 3.4.2.2 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่เซลล์สร้างขึ้นที่เวลาต่าง ๆ เมื่อแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 0.5 และ 1.0กรัม/ลิตร เมื่อใช้กากน้ำตาล 20% เป็นอาหารคาร์บอน และ1.5 กรัม/ลิตร เมื่อใช้กากน้ำตาล 30% เป็นอาหารคาร์บอน แสดงในรูปที่ 26 ส่วนปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน และอัตราการเจริญจำเพาะ แสดงไว้ในตารางที่ 20

จากการเปรียบเทียบพบว่า เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัม/ลิตร และกากน้ำตาล 30% เป็นอาหารเริ่มต้น พบว่าปริมาณ PHB ที่ได้มากกว่า ทุกสภาวะที่ใช้กากน้ำตาลด้วยกัน และจากผลการวิจัยทั้งหมดจากข้อ 3.4 สรุปได้ว่า กากน้ำตาลไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นอาหารแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อการผลิต PHB เพราะเชื้อสามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณที่ต่ำ และใช้ระยะเวลานาน เห็นได้จากสภาวะที่ผลิต PHB ได้ปริมาณสูงสุดใช้ระยะเวลาถึง 84 ชั่วโมง



■ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร ก. + $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.5 กรัม/ลิตร ก.

✳ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร ก. □ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1.5 กรัม/ลิตร ข.

รูปที่ 26 ปริมาณ PHB ที่เซลล์สร้างขึ้นที่เวลาต่าง ๆ เมื่อ (ก.) แปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร และใช้กากน้ำตาล 20% เป็นอาหารคาร์บอน และ (ข.) เมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.5 กรัม/ลิตร และใช้กากน้ำตาล 30% เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน

ความเข้มข้นอาหารคาร์บอน (กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นแอมโมเนียม (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	%PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB/โปรตีน	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)
กากน้ำตาล	0.1	2.27	53.86	1.76	0.1126
20%	0.5	2.11	33.49	1.26	0.1320
	1.0	0.35	12.42	0.21	0.1465
30%	1.5	3.88	37.15	1.37	0.1009

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบ ปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน และอัตราการเจริญจำเพาะ เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 0.5 1.0 และ 1.5 กรัม/ลิตร โดยใช้กากน้ำตาลเป็นอาหารคาร์บอน

3.5 การปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ และเพิ่มการผลิต PHB โดยวิธีการเลี้ยงแบบ fed-batch cultivation

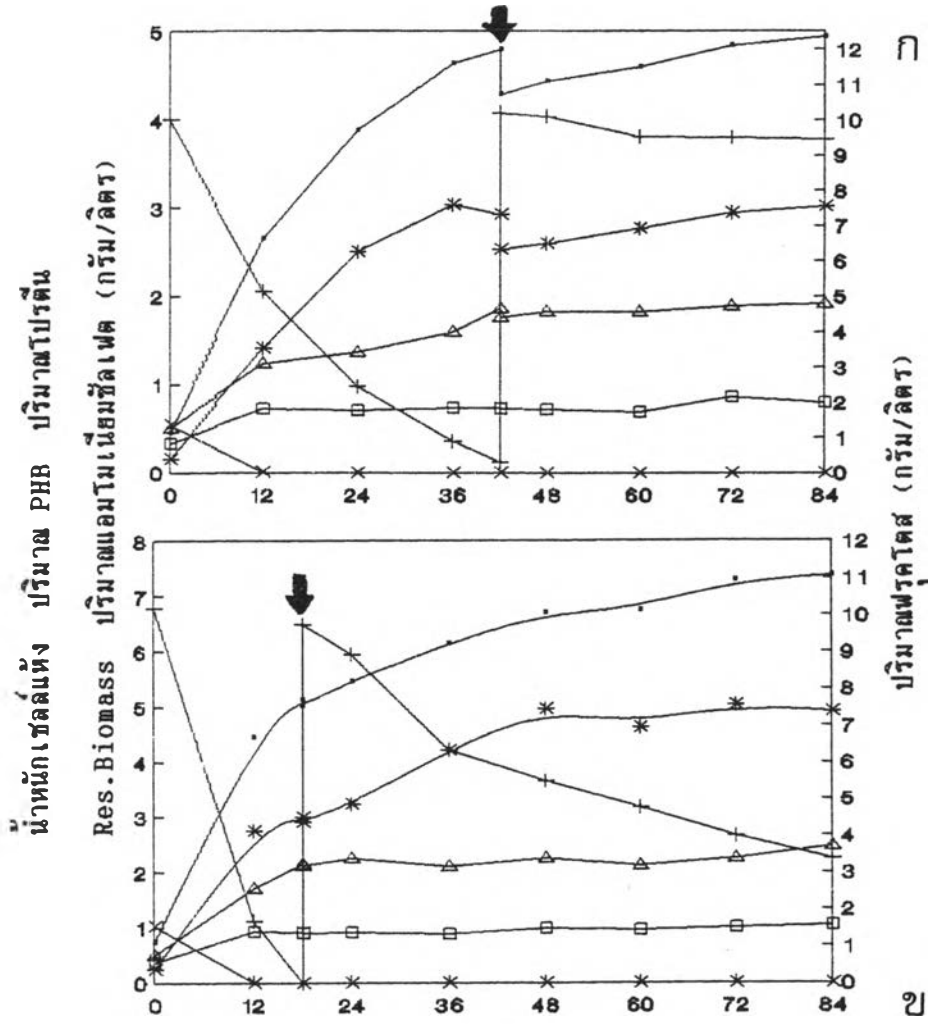
จากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยวิธี batch cultivation พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร ได้ผลว่าเมื่อใช้ฟรุคโตสความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร นั้นไม่เพียงพอที่จะใช้สำหรับการเติบโตและการผลิต PHB ตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อ กล่าวคือ เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 กรัม/ลิตร และฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร พบว่าฟรุคโตสหมดที่เวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร ฟรุคโตสเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร พบว่าฟรุคโตสหมดที่เวลา 24 ชั่วโมง

ดังนั้นจึงได้ศึกษาถึงการเติบโต และการผลิต PHB ของ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยวิธีการเลี้ยงแบบ fed-batch ด้วยการ (1) เติมฟรุคโตสลงไป เมื่อฟรุคโตสใกล้หมด (ใช้ข้อมูลจากการศึกษาในbatch cultivation ข้อ3.3.4) โดยเติมฟรุคโตสให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นของฟรุคโตสเริ่มต้น ซึ่งคาดว่าฟรุคโตสปริมาณนี้เพียงพอสำหรับ *Alcaligenes* sp. A-04 นำไปใช้ตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อ (2) เติมทั้งแอมโมเนียมซัลเฟต และฟรุคโตส เมื่อสารทั้งสองหมดลง (3) และด้วยการเติมเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อแอมโมเนียมซัลเฟตหมดลง แต่ยังมีฟรุคโตสปริมาณมากพอที่ใช้ในการเติบโต และการผลิต PHB ตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง และถ่ายเชื้อลงถังหมักที่มีอาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ควบคุม pH ที่ 7.0 ปรับอัตราการกวน และการให้อากาศ เพื่อให้ได้ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100% และใช้ฟรุคโตสความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 และเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร

3.5.1 การเติมฟรุคโตสระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เมื่อฟรุคโตสหมด

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตสความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 และ 10.0 กรัม/ลิตร จากข้อมูลที่ได้จากผลการวิจัยข้อ 3.3.4 พบว่าฟรุคโตสใกล้จะหมดลงที่ชั่วโมงที่ 42 (0.27 กรัม/ลิตร) ดังนั้นจึงได้เติม ฟรุคโตสลงไปที่เวลานี้ โดยเติมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของฟรุคโตสเท่ากับความเข้มข้นเริ่มต้นคือ 10.0 กรัม/ลิตร แสดงในรูปที่ 27ก. พบว่าหลังจากเติมฟรุคโตสลงไป พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและ PHB เพิ่มขึ้น การผลิต PHB เริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่60 โดยพบว่า *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้สูงสุดที่เวลา 60 ชั่วโมง เท่ากับ 2.77 กรัม/ลิตร คิดเป็น 60.27% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.65 อัตราการเจริญจำเพาะ 0.1474 แอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 โปรตีนมีปริมาณสูงสุด และคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 มีปริมาณเท่ากับ 0.72 กรัม/ลิตร residual biomass นั้นมีปริมาณสูงสุด และคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เป็นปริมาณเท่ากับ 1.83 กรัม/ลิตร เมื่อสิ้นสุดระยะการเลี้ยงเชื้อพบว่ามีปริมาณฟรุคโตสเหลืออยู่ 9.5 กรัม/ลิตร

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 10.0 กรัม/ลิตร จากข้อมูลที่ได้จากผลการวิจัยข้อ 3.3.4 พบว่าฟรุคโตสใกล้จะหมดลงที่ชั่วโมงที่ 18 (0.22 กรัม/ลิตร) ดังนั้นจึงได้เติมฟรุคโตสลงไปที่เวลานี้ โดยเติมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของฟรุคโตสเท่ากับความเข้มข้นเริ่มต้นคือ 10.0 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 27ข. หลังจากเติมฟรุคโตสแล้ว น้ำหนักเซลล์แห้ง และ PHB มีปริมาณเพิ่มขึ้น และ PHB เริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 โดยพบว่า *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 4.97 กรัม/ลิตร คิดเป็น 74.18% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 5.01 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.170 แอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 โปรตีนและ residual biomass มีปริมาณสูงสุดและคงที่ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นปริมาณเท่ากับ 0.91 และ 2.24 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดระยะการเลี้ยงเชื้อพบว่ามีฟรุคโตสเหลืออยู่ 3.5 กรัม/ลิตร



รูปที่ 27 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร

(ก.) เมื่อแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.5 กรัม/ลิตร และเติมฟรุคโตสให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 42

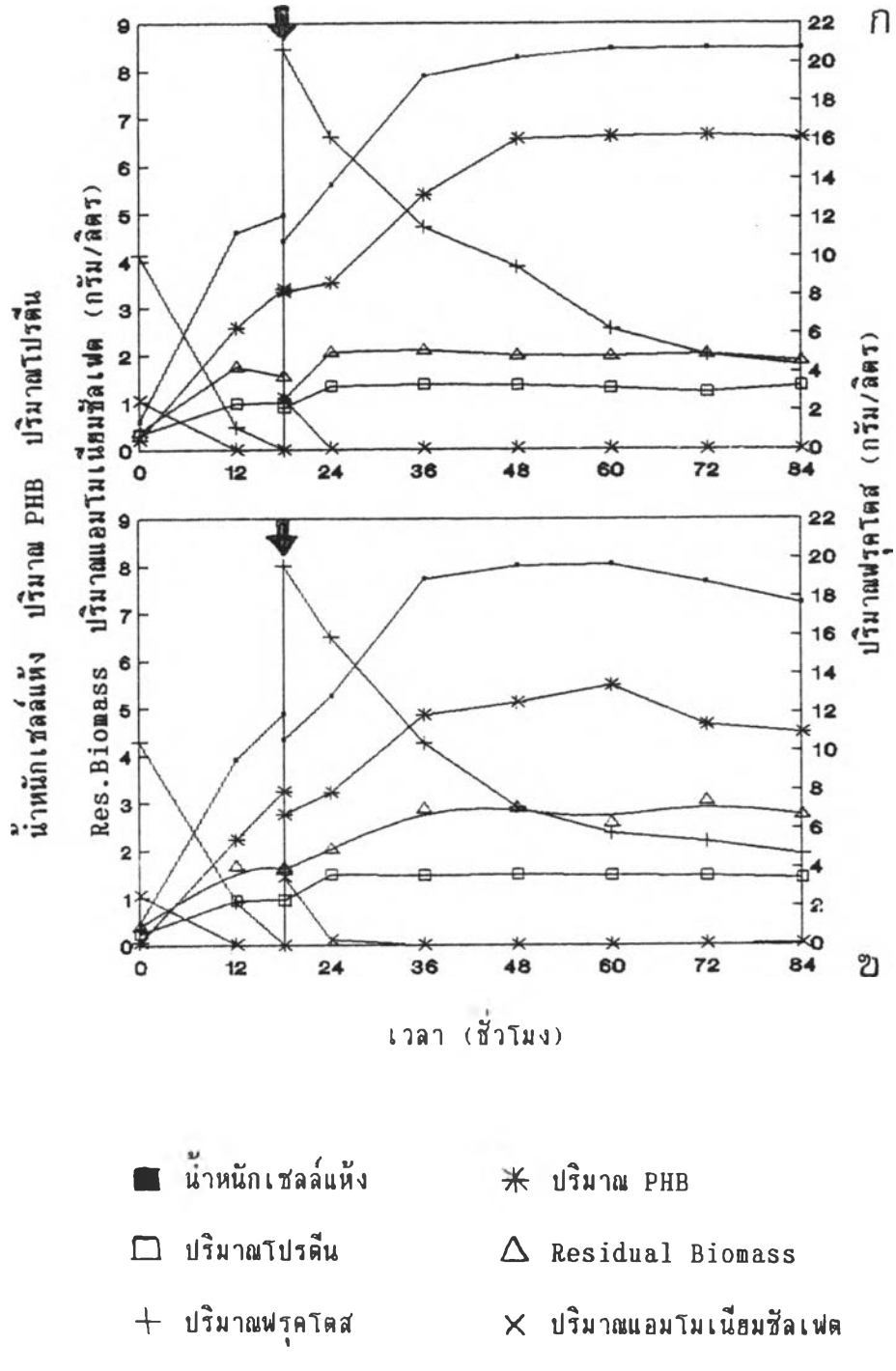
(ข.) เมื่อแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร และเติมฟรุคโตสให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 18

3.5.2 การเติมฟรุคโตสและแอมโมเนียมซัลเฟตระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เมื่อฟรุคโตสและแอมโมเนียมซัลเฟตใกล้จะหมด

จากผลการวิจัยข้อ 3.3.4 พบว่าเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร และฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถเติบโตและผลิต PHB ได้เป็นอย่างดี ดังนั้นในการเลี้ยงแบบ fed-batch เพื่อที่จะเพิ่มปริมาณ PHB ให้สูงขึ้นไปอีกจึงเติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปที่ชั่วโมงที่ 18 ซึ่งเป็นระยะเวลาที่แอมโมเนียมซัลเฟตใกล้หมด และยังเป็นเวลาเดียวกับที่ฟรุคโตสใกล้หมดดังนั้นการทดลองในขั้นนี้ จะเติมทั้งแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตส ที่เวลา 18 ชั่วโมง โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 และ 1.5 กรัม/ลิตร และเติมฟรุคโตสให้ได้ 20.0 กรัม/ลิตร เพื่อที่จะได้มีฟรุคโตสเพียงพอตลอดระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 10.0 กรัม/ลิตร จากข้อมูลที่ได้จากผลการวิจัยข้อ 3.3.4 พบว่าฟรุคโตสใกล้จะหมด ที่ชั่วโมงที่ 18 ดังนั้นจึงได้เติม ฟรุคโตส และแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปที่เวลานี้ โดยเติมฟรุคโตสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของฟรุคโตสเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร ส่วนแอมโมเนียมซัลเฟตนั้นเติมลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 28ก. หลังจากเติมฟรุคโคสและแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปแล้วพบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งและ PHB มีปริมาณเพิ่มขึ้น ที่ชั่วโมงที่ 48 พบว่า *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 6.56 กรัม/ลิตร คิดเป็น 79.23% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงไปหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 5.09 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.170 โปรตีนและ residual biomass เพิ่มขึ้นจนมีปริมาณสูงสุด และคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นปริมาณเท่ากับ 1.3 และ 2.07 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดระยะการเลี้ยงเชื้อพบว่าฟรุคโตสเหลือในน้ำหมักเท่ากับ 4.36 กรัม/ลิตร

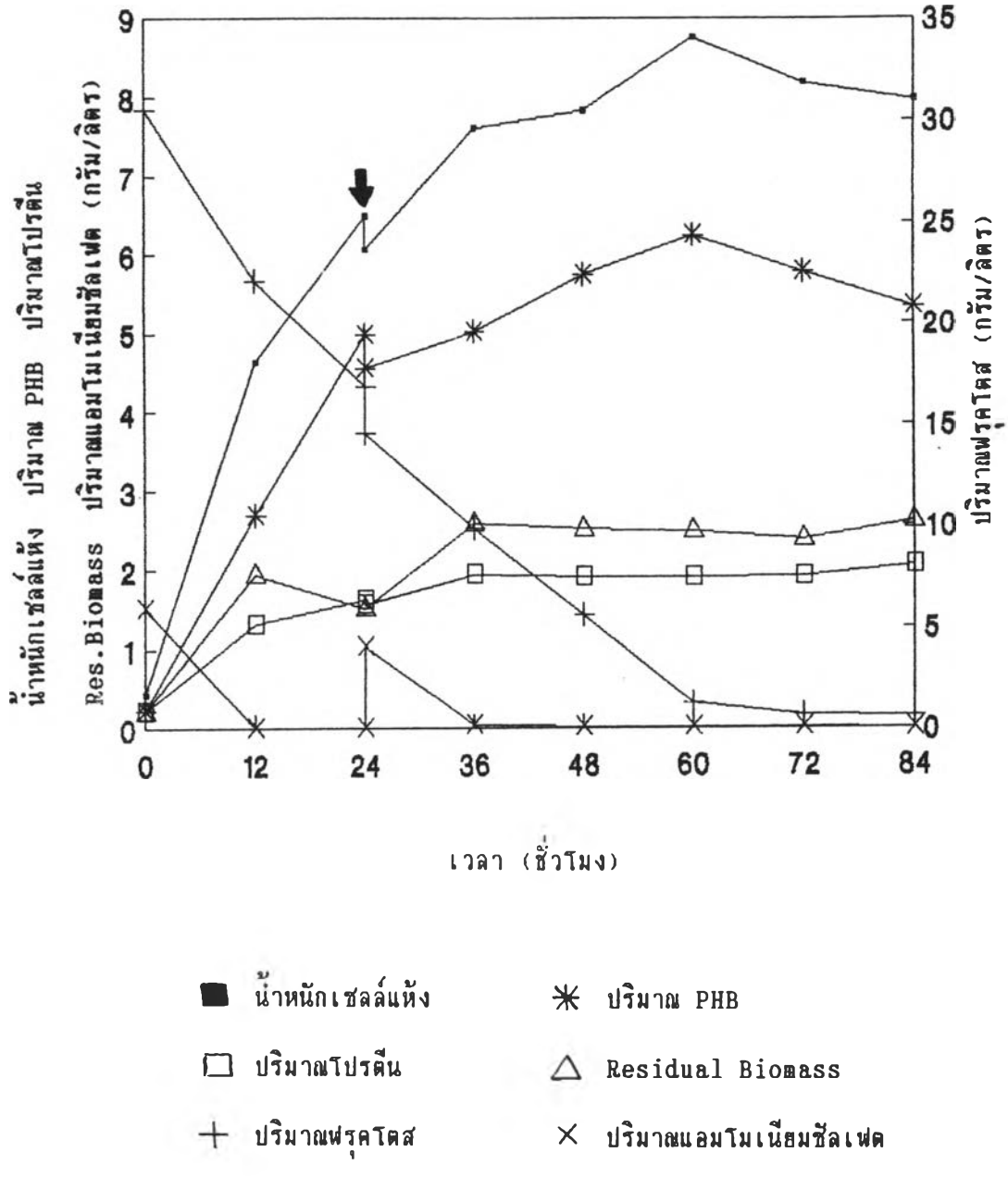
เมื่อเติมฟรุคโตส และแอมโมเนียมซัลเฟต ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20.0 และ 1.5 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 28ข. หลังจากเติมฟรุคโตสและแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปแล้วพบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งและ PHB เพิ่มขึ้น โดย PHB เพิ่มขึ้นจนได้ปริมาณสูงสุดที่ 60 ชั่วโมง หลังจากนั้นทั้งน้ำหนักเซลล์แห้งและ PHB ลดลง ที่ชั่วโมงที่ 60 พบว่า *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 5.48 กรัม/ลิตร คิดเป็น 68.07% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.75 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.180หลังเติม แอมโมเนียมซัลเฟตหมดที่ชั่วโมงที่ 36 หลังจากเติมพบว่า โปรตีนเพิ่มขึ้นจนมีปริมาณสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1.46 กรัม/ลิตร ในทำนองเดียวกัน residual biomass ก็เพิ่มขึ้นจนมีปริมาณสูงสุดที่ 36 ชั่วโมง เท่ากับ 2.88 กรัม/ลิตร เมื่อสิ้นสุดระยะการเลี้ยงเชื้อมีฟรุคโตสเหลือในน้ำหมักเท่ากับ 5.08 กรัม/ลิตร



รูปที่ 28 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร และความเข้มข้นของฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร เมื่อ (ก.) ที่ 18 ชั่วโมงเติมแอมโมเนียมซัลเฟต และฟรุคโตสให้ได้ 1.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ข.) ที่ 18 ชั่วโมงเติมแอมโมเนียมซัลเฟต และฟรุคโตสให้ได้ 1.5 และ 20.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

3.5.3 การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตระหว่างการเลี้ยงเชื้อเมื่อแอมโมเนียมซัลเฟตหมดลง

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 1.5 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 30.0 กรัม/ลิตร จากข้อมูลที่ได้จากผลการวิจัยข้อ 3.3.4 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตเหลืออยู่น้อยมากที่ 24 ชั่วโมง จึงเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 24 ชั่วโมงให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 29 หลังจากเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นจนสูงสุดที่ 60 ชั่วโมง เท่ากับ 6.26 กรัม/ลิตร คิดเป็น 71.46% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ลดลง ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.26 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.20 หลังการเติม แอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 โปรตีนและ residual biomass เพิ่มขึ้นจนมีปริมาณสูงสุดและคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 เป็นปริมาณเท่ากับ 1.95 และ 2.59 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดระยะการเลี้ยงเชื้อพบว่ามีฟรุคโตสเหลือในน้ำหมักเท่ากับ 0.59 กรัม/ลิตร



รูปที่ 29 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อให้แอมโมเนียมซัลเฟต และฟรุคโตสเริ่มต้น เท่ากับ 1.5 และ 30.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ 1.0 กรัม/ลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง

จากผลการทดลองที่ได้ ได้นำผลมาเปรียบเทียบปริมาณ PHB เมื่อให้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.5 กรัม/ลิตร โดยให้ฟรุคโตสในปริมาณและวิธีที่ต่างกัน คือ (ก.) ให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 10.0 กรัม/ลิตร (จากผลการวิจัยข้อ 3.3.4) (ข.) ให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 20.0 กรัม/ลิตร (จากผลการวิจัยข้อ 3.3.4) และ (ค.) ให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 10.0 กรัม/ลิตร แล้วเติมฟรุคโตสที่ชั่วโมงที่ 42 ให้ได้ปริมาณฟรุคโตส 10.0 กรัม/ลิตร พบว่า (ก.) เป็นสภาวะที่ดีที่สุด เพราะเป็นสภาวะที่เชื้อสามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 3.19 กรัม/ลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง

และเมื่อได้เปรียบเทียบปริมาณ PHB เมื่อให้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร โดยให้ฟรุคโตสในปริมาณและวิธีที่ต่างกันคือ (ก.) ให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 10.0 กรัม/ลิตร (จากผลการวิจัยข้อ 3.3.4) (ข.) ให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 20.0 กรัม/ลิตร (จากผลการวิจัยข้อ 3.3.4) และ (ค.) ให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 10.0 กรัม/ลิตร แล้วเติมฟรุคโตสที่ชั่วโมงที่ 18 ให้ได้ปริมาณฟรุคโตส 10.0 กรัม/ลิตร(จากผลการวิจัยข้อ 3.5.1) พบว่าสภาวะ (ค.) เป็นสภาวะที่ดีที่สุดเพราะที่สภาวะนี้ เชื้อสามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 4.97 กรัม/ลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง

จากผลการทดลองข้อ 3.5.2 พบว่าเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงไปจนได้ความเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร และเติมฟรุคโตสลงไปให้ได้ความเข้มข้น 20.0 กรัม/ลิตร ซึ่งเพียงพอที่จะใช้จนสิ้นสุดระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ สภาวะนี้จะทำให้เชื้อสามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 6.56 กรัม/ลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่อีกสภาวะหนึ่งเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตสลงไปจนได้ความเข้มข้น 1.5 และ 20.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับพบว่า เชื้อสามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเพียง 5.48 กรัม/ลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง

สรุปได้ว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร และฟรุคโตสเริ่มต้น 10.0 กรัม/ลิตร เมื่อถึงเวลาที่สารอาหารใกล้จะหมดลง ควรเติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในถังหมักไม่เกิน 1.0 กรัม/ลิตร ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงศึกษาการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 แบบ fed-batch ในสภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตสเริ่มต้น 1.5 และ 30.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ จากผลการวิจัยข้อ 3.5.3 ใน

สภาวะดังกล่าวเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปให้ได้ความเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 6.26 กรัม/ลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงแบบ fed-batch ที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงไป (จากผลการวิจัยข้อ 3.5.2 และ 3.5.3) พบว่าสภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 และ 10.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ แล้วเติมแอมโมเนียมซัลเฟต และฟรุคโตสลงไปให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เป็นสภาวะที่ทำให้เชื้อสามารถผลิต PHB ได้สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 21

สภาวะการเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	%PHB/ น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB/โปรตีน	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)
ก.	6.61	78.13	5.01	0.170
ข.	5.48	68.07	3.75	0.180
ค.	6.26	71.46	3.26	0.20

ตารางที่ 21 เปรียบเทียบปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 แบบ fed-batch ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตสเท่ากับ 1.0 และ 10.0 กรัม/ลิตร

(ก.) เติมแอมโมเนียมซัลเฟต และฟรุคโตส 1.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร

(ข.) เติมแอมโมเนียมซัลเฟต และฟรุคโตส 1.5 และ 20.0 กรัม/ลิตร

(ค.) เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตส 1.5 และ 30.0 กรัม/ลิตร แล้วเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัม/ลิตร

จากผลการวิจัยข้อ 3.3.4 และ 3.5 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ *Alcaligenes* sp. A-04 สร้างขึ้นที่เวลาต่าง ๆ ระหว่างการเลี้ยงแบบ batch และ fed-batch cultivation พบว่า

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 และ 10.0 กรัม/ลิตร ในการเลี้ยงแบบ fed-batch ทั้งจากผลการวิจัยข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ปริมาณ PHB ที่ผลิตขึ้น สูงกว่าการเลี้ยงแบบ batch เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร และฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร ทั้งสิ้น โดยสภาวะที่ดีที่สุดคือสภาวะที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตส ให้ได้ความเข้มข้น 1.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง โดยที่เวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้เท่ากับ 6.56 กรัม/ลิตร คิดเป็น 79.23% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงในตารางที่ 22

เมื่อใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 1.5 และ 30.0 กรัม/ลิตร พบว่าในการเลี้ยงแบบ fed-batch เมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 จะได้ปริมาณ PHB สูงที่สุด 6.26 กรัม/ลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง ขณะที่เวลาเดียวกัน เมื่อเลี้ยงแบบ batch สามารถผลิต PHB ได้ถึง 6.8 กรัม/ลิตร จะเห็นว่าสภาวะที่เลี้ยงเชื้อแบบ fed-batch สภาวะนี้ผลิต PHB ได้ต่ำกว่าสภาวะที่เลี้ยงแบบ batch เมื่อปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากัน ดังแสดงในตารางที่ 23

สภาวะการเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	%PHB/ น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB/โปรตีน	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)
ก.	4.63	76.53	4.82	0.173
ข.	4.97	74.18	5.01	0.170
ค.	6.56	79.23	5.09	0.170
ง.	5.48	68.07	3.75	0.180

ตารางที่ 22 เปรียบเทียบ ปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน และอัตราการเจริญจำเพาะ ในสภาวะต่าง ๆ ดังนี้

เมื่อเลี้ยงแบบ batch cultivation

(ก.) เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต และฟรุคโตสเท่ากับ 1.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

เมื่อเลี้ยงแบบ fed-batch cultivation โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตสเท่ากับ 1.0 และ 10.0 กรัม/ลิตร แล้ว

(ข.) เติมเฉพาะฟรุคโตสให้ได้ความเข้มข้น 10.0 กรัม/ลิตร ที่ 18 ชั่วโมง

(ค.) เติมทั้งแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตส ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 18

(ง.) เติมทั้งแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตส ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5 และ 20.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 18

สภาวะการเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	%PHB/ น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB/โปรตีน	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)
ก.	6.80	79.0	4.15	0.20
ข.	6.26	71.46	3.26	0.20

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบ ปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน และอัตราการเจริญจำเพาะ โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต และฟรุคโตส เท่ากับ 1.5 และ 30.0 กรัม/ลิตร เมื่อ

(ก.) เลี้ยงแบบ batch cultivation ตามผลการวิจัยข้อ 3.3.4

(ข.) เลี้ยงแบบ fed-batch cultivation โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ 24 ชั่วโมงตามผลการวิจัยข้อ 3.5.3