บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 การศึกษาองค์ประกอบของน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังที่เหลือจากการผลิตน้ำตาลกลูโคส

เมื่อนำน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังที่เหลือจากโรงงานผลิตน้ำตาลกลูโคส จังหวัดนครปฐม มาวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ และความเป็นกรดด่างด้วยแฮนดี้รีแฟรกโตมิเตอร์ วิธีฟีนอลซัลฟูริก วิธีดีเอ็นเอส และเครื่องวัดความเป็นกรดด่างตามลำดับ พบว่ามีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 27.2 องศาบริกซ์ ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ และความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 209.13 กรัมต่อลิตร 110.05 กรัมต่อลิตร และ 4.44 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) จากองค์ประกอบของน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังดังกล่าว พบว่าน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์เพียงพอต่อการผลิต PHB โดยจากการทดลองของ Patwardhan and Srivastava (2008) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *W. eutropha* NRRLB-14690 ในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตส 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิต PHB ได้ชีวมวล และ PHB สูงสุด เท่ากับ 14.0 และ 6.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสะสม PHB ในเซลล์เท่ากับ 43.6% โดยน้ำหนักแห้ง ในปี 2003 Ruan *et al.* ได้ศึกษาการใช้น้ำตาลฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *A. eutrophus* พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตพอลิเมอร์ได้ 12.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปี 2007 Yezza *et al.* ได้ศึกษาการผลิต PHB จากแบคทีเรีย *A. latus* ในระดับฟลาสก์เขย่าโดยใช้ maple sap ซึ่งมีน้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุกโตสเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 20.0 0.8 และ 0.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าได้ ชีวมวลของ *A. latus* สูงสุดเท่ากับ 4.4 ± 0.5 กรัมต่อลิตร และมี PHB สะสมอยู่ภายในเซลล์ 77.6 ± 1.5 % โดยน้ำหนักแห้ง จากงานวิจัยต่างๆจะพบว่าการผลิต PHB นั้นจะใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงประมาณ 20 ถึง 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังมีเพียงพอต่อการศึกษาการผลิต PHB ด้วย *A. eutrophus* ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังที่เหลือจากการผลิตน้ำตาลกลูโคส

องค์ประกอบ	**ปริมาณ***
ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด	27.20 ± 0.00 องศาบริกซ์
น้ำตาลทั้งหมด	209.13 ± 23.51 กรัมต่อลิตร
น้ำตาลรีดิวซ์	110.05 ± 11.25 กรัมต่อลิตร
ความเป็นกรดด่าง	4.44 ± 0.01

*หมายเหตุ ทำการวิเคราะห์แบบ 2 ซ้ำ

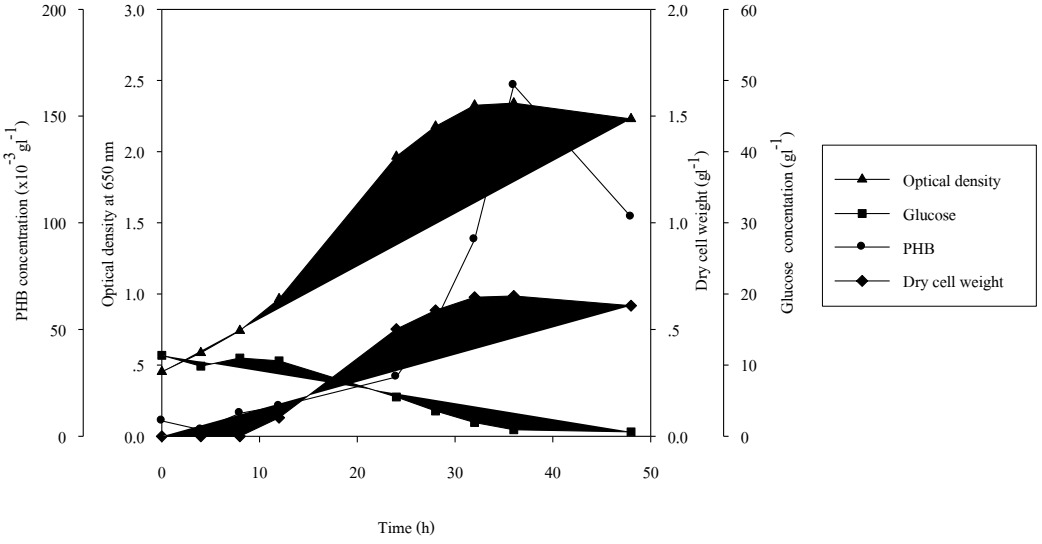
4.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสในอาหารสังเคราะห์ต่อการผลิต PHB ด้วยการหมักแบบ กะในระดับฟลาสก์เขย่า

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในอาหารสูตรผลิต PHB ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร (Sirisansaneekul and Mahasubpaiboon , n.d.) พบว่า แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากชั่วโมงที่ 12 แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเข้าสู่ช่วง log phase จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 36 โดยมีการสะสมมวลเซลล์ เท่ากับ 0.657 กรัมต่อลิตร *A. eutrophus* เริ่มมีการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วง stationary phase และเข้าสู่ช่วง death phase ในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปก็มีแนวโน้มเช่นเดียวกับการเจริญของ *A. eutrophus* โดยแบคทีเรียมีการใช้น้ำตาลกลูโคสอย่างรวดเร็วเมื่อ *A. eutrophus* มีการเจริญเข้าสู่ช่วง log phase (ชั่วโมงที่ 12 ถึง 36) และมีน้ำตาลที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 10.76 กรัมต่อลิตร จากการทดลองยังพบว่า *A. eutrophus* มีอัตราการผลิต PHB สูงขึ้นเมื่อการเพาะเลี้ยงเข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 และได้ PHB สูงสุดเท่ากับ 164.42 x 10^{-3} กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 36 และ ความเข้มข้นของ PHB ลดลงในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 3)

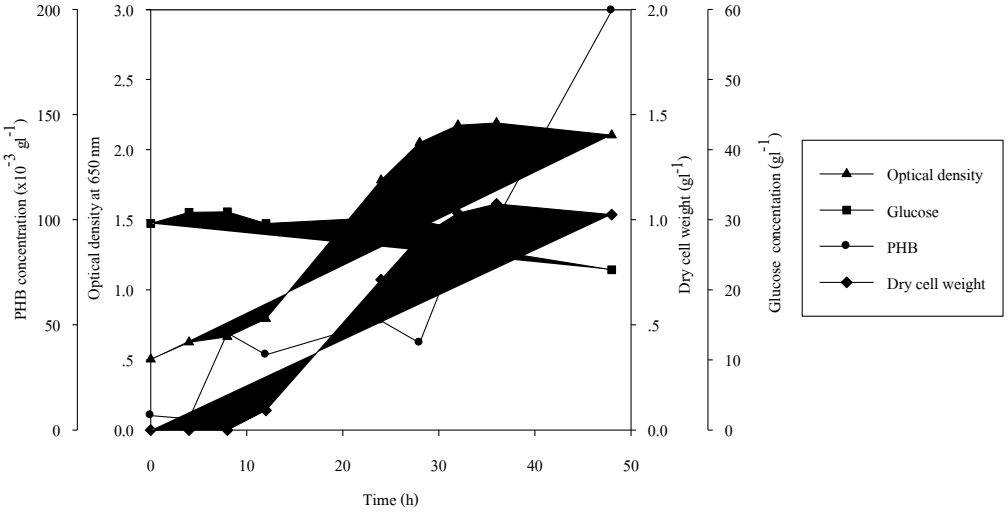
เมื่อเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในอาหารสูตรผลิต PHB ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากชั่วโมงที่ 12 แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเข้าสู่ช่วง log phase จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 36 โดยมีการสะสมมวลเซลล์ เท่ากับ 1.074 กรัมต่อลิตร *A. eutrophus* เริ่มมีการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วง stationary phase และเข้าสู่ช่วง death phase ในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก และ *A. eutrophus* มีการใช้น้ำตาลกลูโคสอย่างรวดเร็วเมื่อการเจริญเข้าสู่ช่วง

log phase (ชั่วโมงที่ 12 ถึง 36) และมีน้ำตาลที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 6.58 กรัมต่อลิตร และยังพบว่า *A. eutrophus* มีการผลิต PHB สูงสุดได้เท่ากับ 199.35 x 10^{-3} กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4)

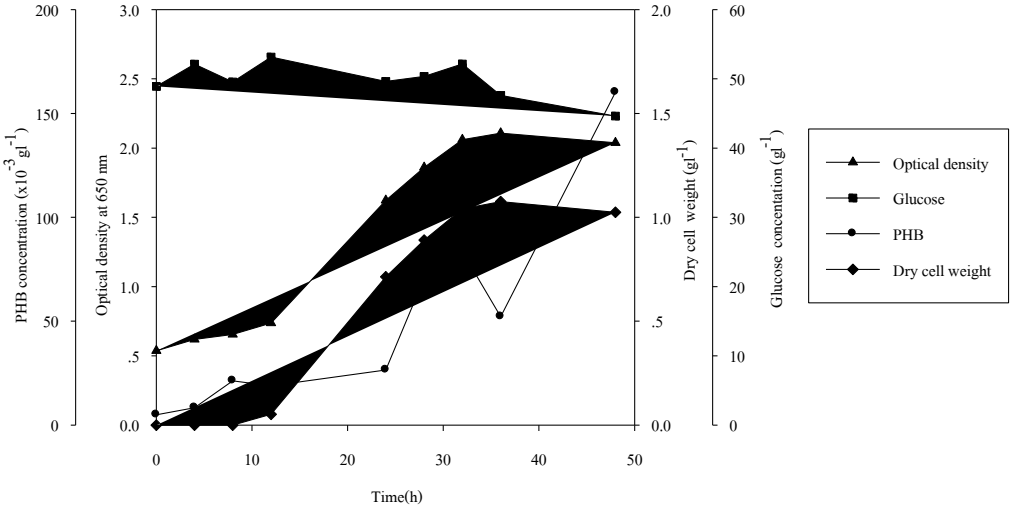
ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารสูตรผลิต PHB ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร พบว่า แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากชั่วโมงที่ 12 แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเข้าสู่ log phase จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 36 โดยมีการสะสมมวลเซลล์ เท่ากับ 1.076 กรัมต่อลิตร และ *A. eutrophus* เริ่มมีการเติบโตเข้าสู่ช่วง stationary phase และเข้าสู่ช่วง death phase ในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก และแบคทีเรียมีการใช้น้ำตาลกลูโคสอย่างรวดเร็ว เมื่อมีการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วง log phase (ชั่วโมงที่ 12 ถึง 36) และมีน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 4.29 กรัมต่อลิตร และยังพบว่า *A. eutrophus* มีการผลิต PHB เท่ากับ 160.17 x 10^{-3} กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 3 การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในอาหารสูตรผลิต PHB ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร



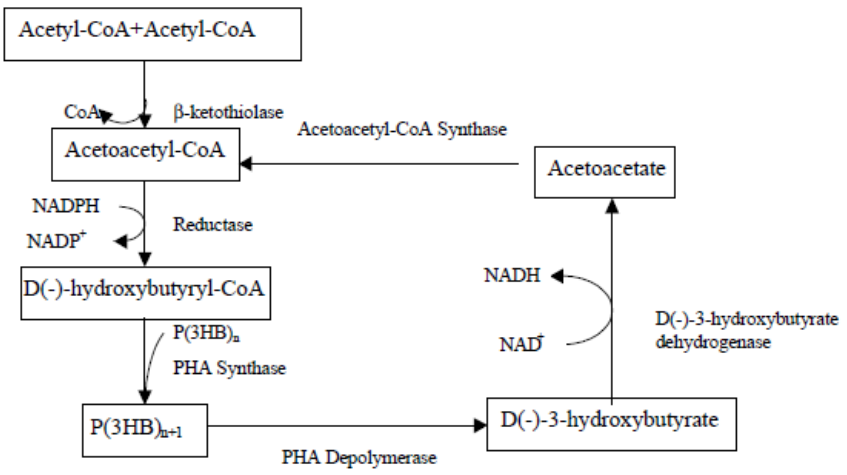
ภาพที่ 4 การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในอาหารสูตรผลิต PHB ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 5 การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในอาหารสูตรผลิต PHB ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสในอาหารสังเคราะห์ต่อการผลิต PHB ด้วยการหมักแบบกะในระดับฟลาสก์เขย่า พบว่า ในทุกสภาวะมีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* คล้ายคลึงกัน โดยน้ำตาลกลูโคสค่อยๆ ลดลงในขณะที่ *A. eutrophus* มีการเจริญเติบโตและผลิต PHB ขึ้น แสดงว่า *A. eutrophus* มีการใช้น้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลล์

และผลิต PHB ในระหว่างการเจริญเติบโตในทุกสภาวะ และการทดลองที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร ยังพบว่า ในชั่วโมงที่ 48 ปริมาณ PHB ได้ลดลงเนื่องจากแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลกลูโคส) ใกล้จะหมด แบคทีเรียจึงนำ PHB กลับมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งพลังงานใหม่ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Macrae and Wilkenson (1958) ซึ่งถูกอ้างอิงโดยสุปริญญา ในปี 2546 และ Khanna and Srivastsva (2005) ได้รายงานว่า เมื่อแหล่งคาร์บอนใกล้จะหมด แบคทีเรียจะเปลี่ยน PHB เป็น D(-) -3-hydroxybutyrate โดยเอนไซม์ PHA depolymerase และ D(-)-3-hydroxybutyrate จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ D(-)-3-hydroxybutyrate กลายเป็น acetoacetate และถูกเร่งปฏิกิริยาด้วย acetoacetyl-CoA synthase เกิดเป็น acetoacety-CoA ก่อนเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA เข้าสู่วัฏจักรเครปส์ต่อไป (ภาพที่ 6) ยังพบอีกว่าเมื่อระดับของน้ำตาลเริ่มต้นสูงขึ้น แบคทีเรียมีเปอร์เซ็นต์การใช้น้ำตาลกลูโคสลดลง (ตารางที่ 4) เช่นเดียวกับการทดลองของ Shang *et al.* (2003) ซึ่งได้แปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ 2.5 9.0 16.0 และ 40.0 กรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นสูงขึ้นการผลิต PHB จะลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในระดับสูงจะทำให้เกิดแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) สูงขึ้นด้วย ส่งผลให้การเจริญและการนำสารอาหารต่าง ๆ เข้าออกเซลล์ถูกยับยั้ง การเจริญเติบโตและการผลิต PHB ของแบคทีเรียจึงลดลง โดยแบคทีเรียมีอัตราการผลิต PHB สูงสุดเท่ากับ 3.1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีความเข้มข้นของเซลล์และ PHB เท่ากับ 208 และ 139 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในการหมักแบบกึ่งกะที่มีการให้น้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นถึง 700 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 6 วิถีการสังเคราะห์และการสลาย PHB ในแบคทีเรีย *R. eutropha*

ที่มา : Khanna and Srivastava (2005)

และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHB พบว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร มีผลได้ PHB ต่อมวลเซลล์ ($Y_{P/X}$) สูงสุด เท่ากับ 0.250 และมีน้ำตาลกลูโคสเหลือในกระบวนการผลิตน้อยที่สุด (5.32 เปอร์เซ็นต์) ขณะที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร มีการผลิต PHB สูงที่สุดเท่ากับ 199.35 x 10^{-3} กรัมต่อลิตร คิดเป็น $Y_{P/S}$ และ $Y_{P/X}$ เท่ากับ 0.03 และ 0.19 ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลกลูโคสเหลือในกระบวนการผลิตมากที่สุด และมี $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.037 และยังพบว่า ทุกสภาวะให้อัตราการผลิต (Q_p) ที่ใกล้เคียงกัน แต่จากการทดลองได้เลือกสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตรไปใช้ในการทดลองถัดไป เนื่องจากมี $Y_{P/X}$ การสะสม PHB ในเซลล์สูงสุด และมีน้ำตาลกลูโคสเหลือน้อยที่สุด ทำให้สามารถลดต้นทุนในการผลิตได้มี ดังนั้นจึงเลือกระดับความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ 10 กรัมต่อลิตร มาใช้ในการศึกษาแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และอัตราการเขย่า ที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB จากน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังต่อไป

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพการผลิต PHB ในอาหารสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสในระดับต่างๆ

Glucose concentration (gl^{-1})	PHB concentration (x 10^{-3} gl^{-1})	Glucose consumption (%)	$Y^{a}_{P/S}$	$Y^{b}_{P/X}$	PHB content (%)	Q_p ($gl^{-1}h^{-1}$)
10	164.42	94.68	0.015	0.250	25.03	0.005
30	199.35	22.36	0.030	0.357	35.66	0.004
50	160.17	8.77	0.037	0.301	30.11	0.003

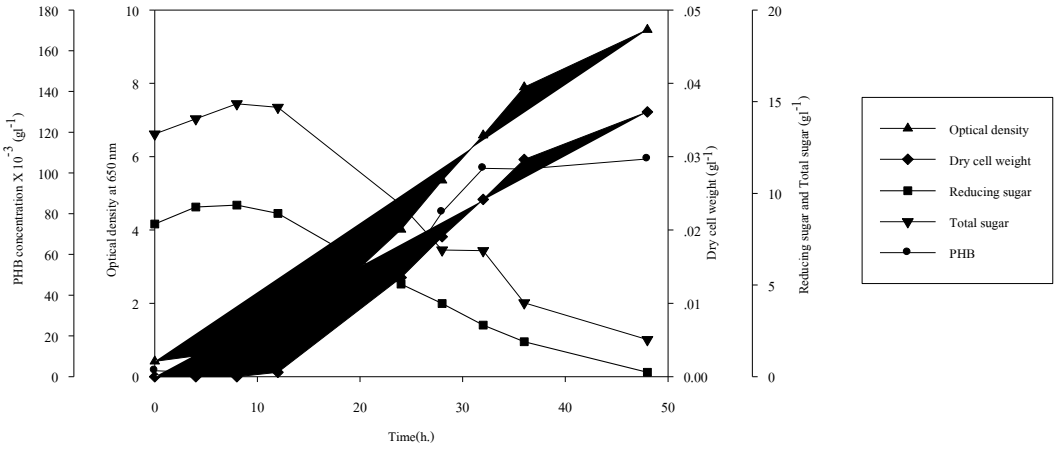
[a]Gram PHB per gram of glucose consumed, [b]Gram PHB per gram of dry cell weight

4.3 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต PHB ในน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยการหมักแบบกะในระดับฟลาสก์

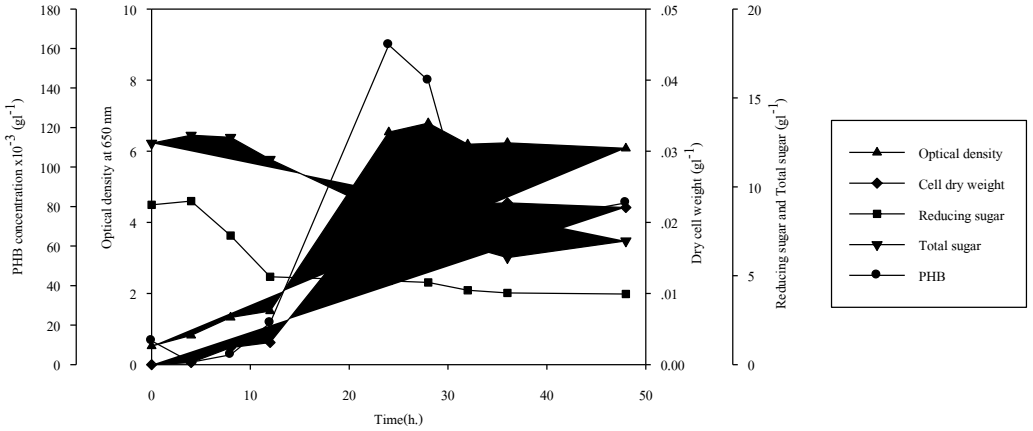
เมื่อเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 1 องศาบริกซ์ คิดเป็นน้ำตาลทั้งหมดประมาณ 12-14 กรัมต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต($(NH_4)_2SO_4$) และสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 1.2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน แบคทีเรียมีการ

เจริญเติบโตอย่างช้าๆ ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากชั่วโมงที่ 12 แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วง log phase อย่างรวดเร็ว โดยมีการสะสมมวลเซลล์เท่ากับ 0.060 กรัมต่อลิตร ในขณะที่น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้ไปเท่ากับ 11.21 และ 8.09 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ *A. eutrophus* มีการผลิต PHB อย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไปและมีการผลิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 32 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งได้ PHB เท่ากับ 106.88 x 10^{-3} กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 7)

ในขณะที่การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในสภาวะเดียวกันแต่ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า แบคทีเรียมีรูปแบบการเจริญคล้ายคลึงกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่เซลล์มีการเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการทดลอง ขณะที่น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงจนเท่ากับ 5.49 และ 5.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ PHB ถูกผลิตขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 161.76 x 10^{-3} กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง และเริ่มลดลงจนคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 32 จนเสร็จสิ้นการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังที่มีการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 8 การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังที่มีการใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน

จากตารางที่ 5 พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน แบคทีเรียผลิต PHB ได้ 106.88 x10^{-3} กรัมต่อลิตร คิดเป็น $Y_{P/S}$ $Y_{P/X}$ และ Q_P เท่ากับ 0.010 0.030 และ 0.002 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์การสะสม PHB ในเซลล์เท่ากับ 2.96 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน แบคทีเรียมีประสิทธิภาพการผลิต PHB สูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหลไนโตรเจน โดยได้ PHB เท่ากับ 161.76 x 10^{-3} กรัมติอลิตร คิดเป็น $Y_{P/S}$ $Y_{P/X}$ และ Q_P เท่ากับ 0.029 0.068 และ 0.007 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ แสดงว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ให้ประสิทธิภาพการผลิต PHB สูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์สูงๆ จะมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สูง เพราะว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนให้เซลล์นั้นก็เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตเพราะสารสกัดจากยีสต์นั้นจะมีผลต่อการจำกัดการเจริญเติบโตของเซลล์ ส่วนการส่งเสริมให้เกิดการสะสม PHB เพิ่มในเซลล์มากขึ้นหรือปรับปรุงความเข้มข้นของเซลล์นั้นจะมีผลเนื่องมาจากส่วนประกอบในอาหาร (Quillaguaman *et al.*, 2007)

จากผลการทดลองของ Quillaguaman *et al.* (2007) เพื่อศึกษาการเติมสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณสูงต่อการผลิต PHB ของ *H. boliviensis* ด้วยการหมักแบบกะ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ จะได้ CDW และ PHB เพิ่มขึ้นสูงสุด ที่ 44 wt.% และ 12 g l^{-1} ตามลำดับ จะเห็นว่าการเพิ่มสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณที่สูงขึ้น ส่งเสริมการ ผลิต PHB และ มวลเซลล์ เนื่องจากว่าสารสกัดจากยีสต์สามารถถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เพียงพอสำหรับเซลล์ อีกทั้งการ

ใช้สารสกัดจากยีสต์จะจำกัดการเจริญเติบโตของเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิต PHB ขึ้นในเซลล์ สอดคล้องกับการทดลองของ Khanna and Srivastava (2005) อ้างถึง Page (1992) ได้ศึกษาการผลิต PHB จากแบคทีเรีย *Azotobacter vinelandii* UWD พบว่า การใช้แหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อน เช่น สารสกัดจากยีสต์จะสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตของ PHB ได้

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการผลิต PHB ในน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน

Nitrogen Source ($1.2\ gl^{-1}$)	PHB concentration ($x10^{-3}\ gl^{-1}$)	$Y^{a}_{P/S}$	$Y^{b}_{P/X}$	PHB content (%)	Q_P ($gl^{-1}h^{-1}$)
Ammonium sulfate	106.88	0.010	0.030	2.96	0.002
Yeast extract	161.76	0.029	0.068	6.75	0.007

[a]Gram PHB per gram of glucose consumed, [b]Gram PHB per gram of dry cell weight

ตารางที่ 6 การผลิต PHB ในแหล่งไนโตรเจนต่างๆ

Nitrogen source	PHB concentration (gl^{-1})	PHB content (%)	PHB productivity ($g_{PHB}l^{-1}h^{-1}$)	Organism	Reference
$(NH_4)_2HPO_4$	149.70	73.0	3.40	*E. coli* XL1-Blue	Wang and Lee (1997)
$(NH_4)_2SO_4$	-	88.0	4.94	*A. latus* DSM 1123	Wang and Lee (1997)
$(NH_4)_2SO_4$	3.41	77.6	-	*A. latus*	Yezza *et al.* (2007)
Yeast extract	11.66	-	0.45	*Azotobacter beijerinckii* DSM 1041	Bormann *et al.* (1998)
Yeast extract	12.00	44.0	-	*H. boliviensis*	Quillaguaman *et al.* (2007)
Yeast extract + Peptone	8.04	60	-	Recombinant *E. coli*	Mahishi *et al.* (2003)

Khanna and Srivastava (2005) อ้างถึง Nakamura *et al.* (1992) และ Fujita *et al.* (1993) ว่ากรดอะมิโนบางชนิดสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง PHB ในเซลล์ของ *R. eutropha* ได้ ซึ่งสารสกัดจากยีสต์จะมีโปรตีนและกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบได้ ทำให้สารสกัดจากยีสต์ถูกใช้เป็นแหล่งวิตามินและปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่แบคทีเรียได้

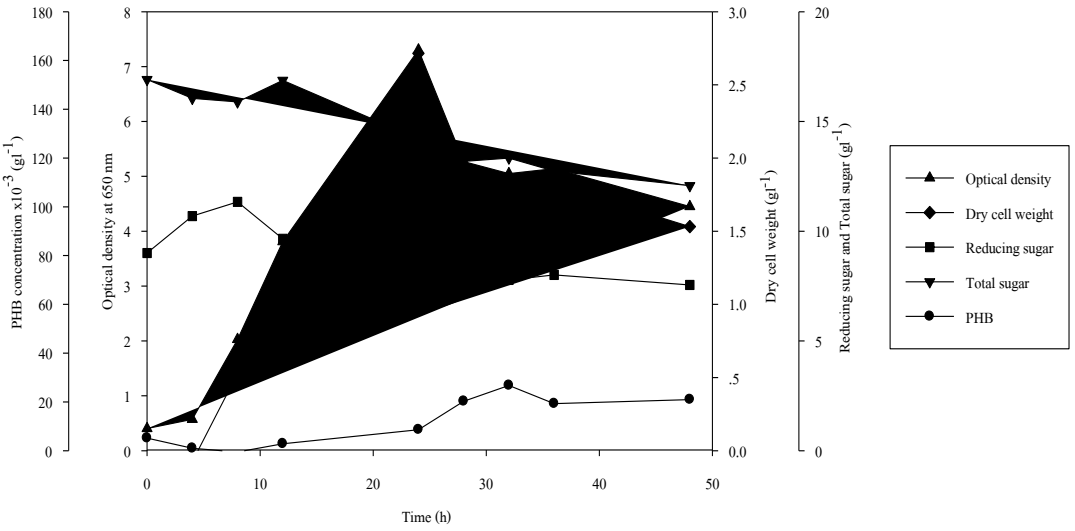
4.4 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHB จากน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลัง ด้วยการหมักแบบกะในระดับฟลาสก์

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB จากน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยทำการปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมตามการทดลองที่4.2 และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน (จากผลการทดลองที่ 4.3) จากนั้นทำการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักที่ 25 30 หรือ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 24 และมีการสะสมมวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.715 กรัมต่อลิตร จากนั้นการเจริญเติบโตค่อยๆลดลง ในขณะที่น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์นั้นเริ่มลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง โดยถูกใช้ไปเท่ากับ 4.838 และ 1.454 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ *A. eutrophus* มีการผลิต PHB อย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และมีการผลิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 32 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีการผลิต PHB เท่ากับ 26.740×10^{-3} กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 9)

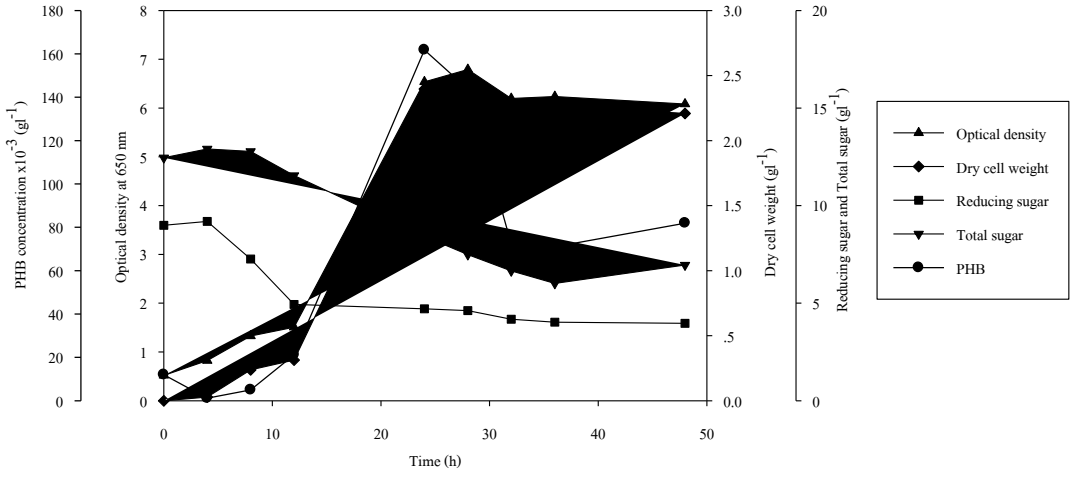
ในขณะที่การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในสภาวะเดียวกันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญเข้าสู่ช่วง log phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการทดลอง ขณะที่น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงจนเท่ากับ 5.49 และ 5.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ PHB ถูกผลิตขึ้นพร้อมกับการเจริญของแบคทีเรียตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 161.76×10^{-3} กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง และเริ่มลดลงจนคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 32 จนเสร็จสิ้นการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 10)

และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ ในช่วงชั่วโมงแรกจนถึงชั่วโมงที่ 12 และเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนชั่วโมงที่ 28 มีการสะสมมวลเซลล์สูงสุดที่ 2.683 กรัมต่อลิตร ขณะที่น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์นั้นลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 เป็นต้นไป จนเหลือ 8.819 และ 5.641 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ PHB ถูกผลิตขึ้น

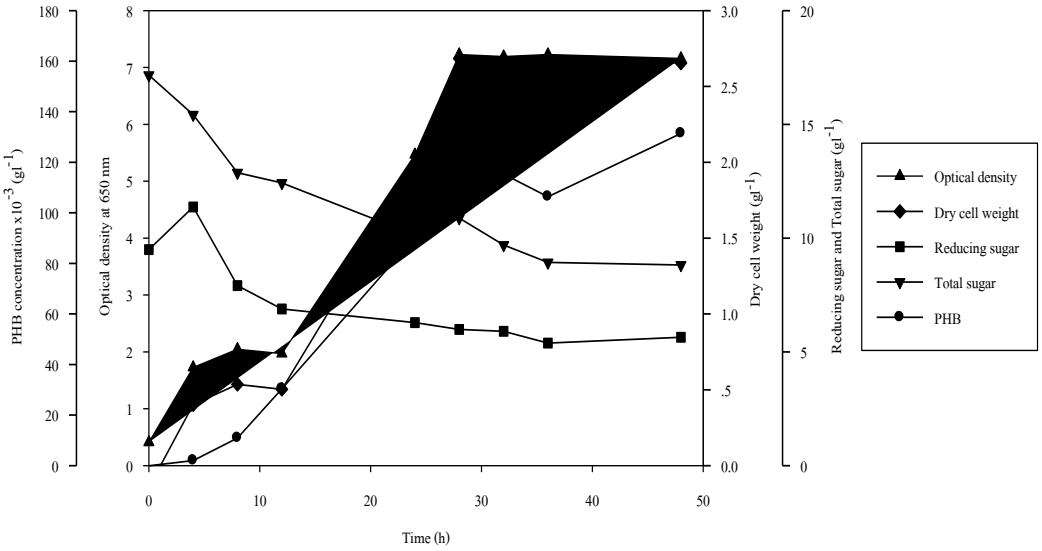
ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 120.325 x 10^{-3} กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 28 ของการเพาะเลี้ยง จนเสร็จสิ้นการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 9 การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 10 การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 11 การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

จากตารางที่ 7 พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส *A. eutrophus* สามารถผลิต PHB ได้เพียง 26.740 x10^{-3} กรัมต่อลิตร คิดเป็น $Y_{P/S}$ และ $Y_{P/X}$ เท่ากับ 0.006 และ0.015 ตามลำดับ เนื่องจากยีน *cI*857 ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีนที่ส่งเสริมการผลิต PHB ถูกยับยั้งการทำงานอันเนื่องมาจากอุณหภูมิต่ำ ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Shi *et al.*, 2001)

เมื่ออุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงสูงขึ้น พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้สูงขึ้นเท่ากับ 161.760 x 10^{-3} กรัมต่อลิตร คิดเป็น $Y_{P/S}$ และ $Y_{P/X}$ เท่ากับ 0.029 และ 0.068 ตามลำดับ และมี *Qp* สูงสุดเท่ากับ 0.007 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากรายงานของ Tamdogan and Sidal (2011) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ PHB ขณะที่เพิ่มอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเป็น 35 องศาเซลเซียส พบว่า ประสิทธิภาพในการผลิต PHB ลดลงเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นนั้น จะทำให้อัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรียลดลง (ไม่แสดงข้อมูล) ทำให้การผลิต PHB ลดลงด้วย และเมื่อพิจารณาจากการสะสมมวลเซลล์จะพบว่า มีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ผลิต PHB น้อย แบคทีเรียอาจมีการเอาน้ำตาลไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นที่ไม่ได้ทำการวัดระหว่างการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Tripathi and Srivastava (2011) ซึ่งศึกษาการผลิต PHB

จาก *A. eutrophus* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB คือ30 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 6.25 กรัมต่อลิตร และงานวิจัยของ Beaulieu *et al*. (1995) ได้รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต PHB คือ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 13.0 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพการผลิต PHB จากน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังที่อุณหภูมิต่างๆ

Temperature (^oC)	PHB concentration (x 10^{-3} gl^{-1})	$Y^a_{P/S}$	$Y^b_{P/X}$	PHB content (%)	Qp ($gl^{-1}h^{-1}$)
25	26.740	0.006	0.015	1.50	0.001
30	161.760	0.029	0.068	6.75	0.007
35	120.325	0.014	0.045	4.53	0.004

[a]Gram PHB per gram of glucose consumed, [b]Gram PHB per gram of dry cell weight

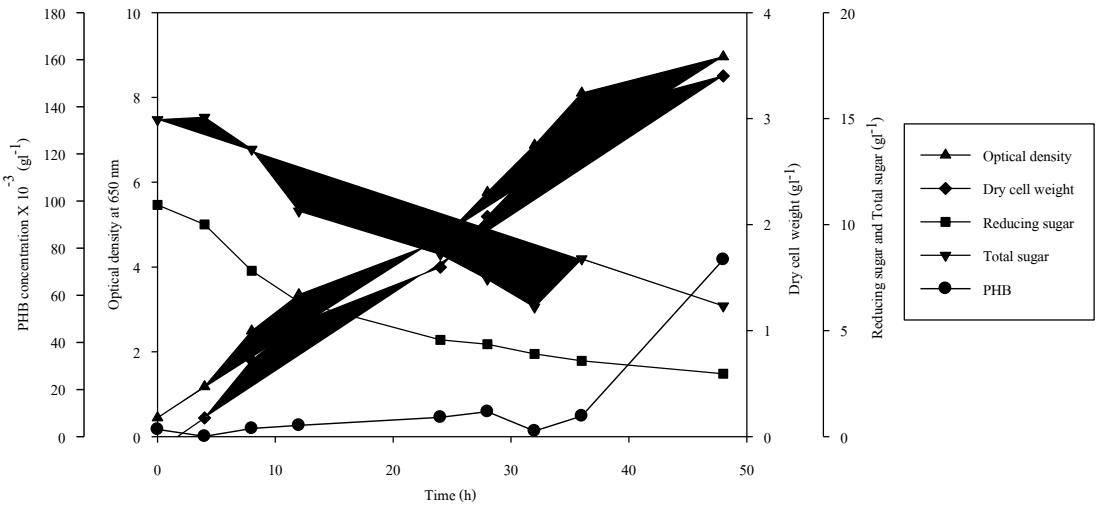
4.5 ผลของอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB จากน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยการหมักแบบในระดับฟลากส์

การศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* ทำการทดลองโดยใช้ระดับของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมจากการทดลอง 4.2 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ และทำการแปรผันอัตราการเขย่าระหว่างการเพาะเลี้ยงที่ 100 200 หรือ 300 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่าที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องโดยไม่พบช่วง lag phase จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมงที่ 48) โดยมีการสะสมมวลเซลล์ เท่ากับ 3.40 กรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ มีแนวโน้มลดลงจนเท่ากับ 8.787 และ 7.966 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจากการทดลองยังพบว่า *A. eutrophus* มีการผลิต PHB เพียงเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 32 และเริ่มผลิต PHB สูงสุดเท่ากับ 75.120 x10^{-3} กรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 12)

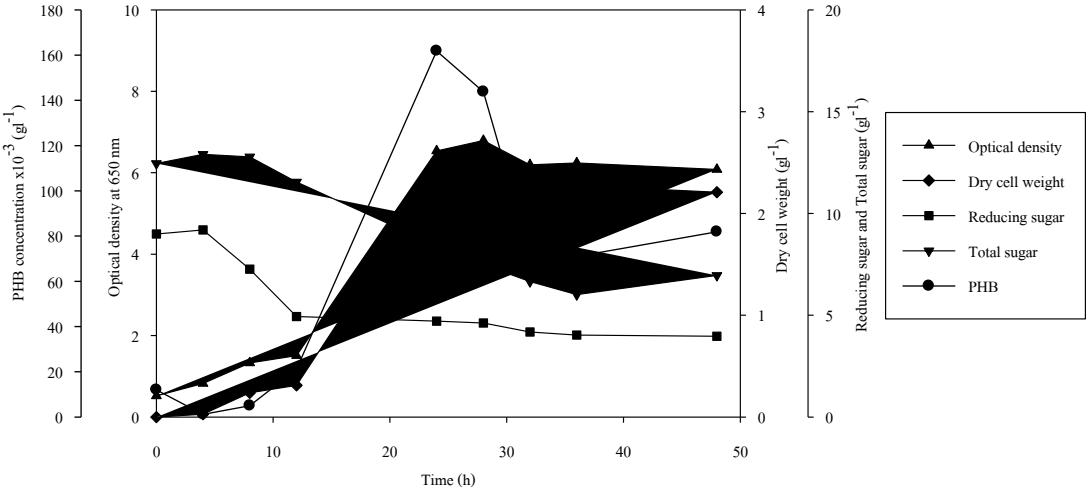
เมื่อเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ที่สภาวะเดียวกันกับการทดลองข้างต้นและมีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ระหว่างการเพาะเลี้ยง ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นแบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วง

log phase จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 28 จึงมีการสะสมมวลเซลล์ เท่ากับ 2.500 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้น *A. eutrophus* มีการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วง stationary phase และเข้าสู่ช่วง death phase ในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง และ *A. eutrophus* มีการใช้น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์อย่างรวดเร็วเมื่อการเจริญเข้าสู่ช่วง log phase (ชั่วโมงที่ 12 ถึง 28) และพบว่า *A. eutrophus* มีการผลิต PHB สูงสุดเท่ากับ 161.760 x 10^{-3} กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 13)

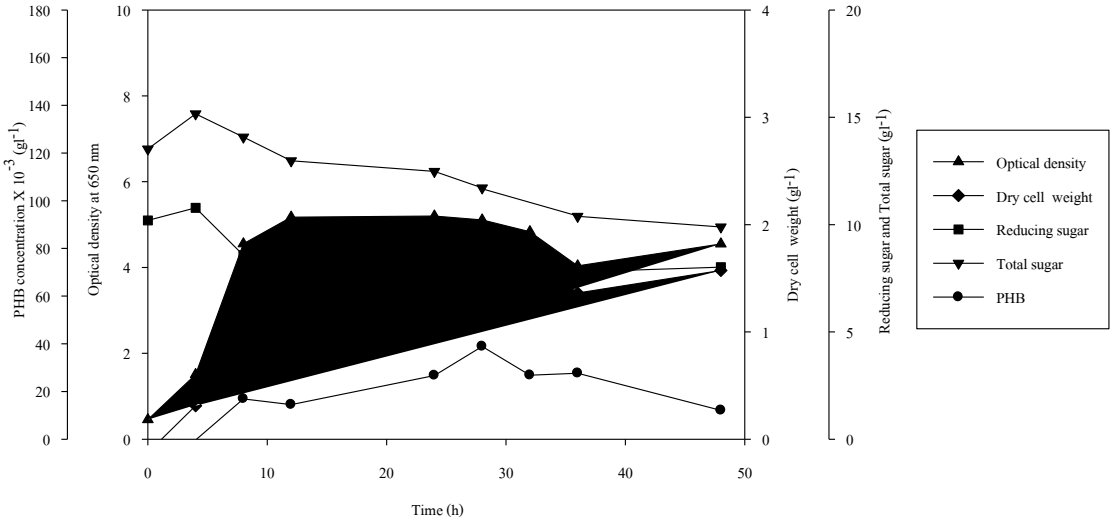
และการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* โดยใช้อัตราการเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและมีการเจริญเติบโต โดยเข้าสู่ stationary phase ภายใน 8 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง โดยมีการสะสมมวลเซลล์ เท่ากับ 1.840 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ช่วง death phase ในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง และ *A. eutrophus* มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์สัมพันธ์กับการเจริญ ขณะที่น้ำตาลทั้งหมดค่อยๆ ลดลงตลอดการเพาะเลี้ยง และแบคทีเรียมีการผลิต PHB ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 เป็นต้นไป และมีการผลิตสูงสุดเท่ากับ 38.900 x 10^{-3} กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 28 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 12 การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที



ภาพที่ 13 การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที



ภาพที่ 14 การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยอัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที

จากตารางที่ 8 พบว่าที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที แบคทีเรียมีการสะสม PHB เท่ากับ 75.120 x10^{-3} กรัมต่อลิตร คิดเป็น $Y_{P/S}$ และ $Y_{P/X}$ เท่ากับ 0.009 และ 0.022 ตามลำดับ เมื่อเพิ่มอัตราการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที พบว่า แบคทีเรียมีการสร้าง PHB สูงที่สุดเท่ากับ 161.760 x10^{-3} กรัมต่อลิตร คิดเป็น $Y_{P/S}$ $Y_{P/X}$ และ Q_P เท่ากับ 0.029 0.068 และ 0.007 กรัมต่อลิตรต่อ

ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่ง *A. eutrophus* มีประสิทธิภาพการผลิต PHB สูงกว่าที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เนื่องจากเมื่ออัตราการเขย่าสูงขึ้นจะทำให้แบคทีเรียได้รับออกซิเจนสูงขึ้น จนถึงระดับที่ส่งผลต่อการสร้าง PHB และเมื่อเพิ่มการเขย่าเป็น 300 รอบต่อนาที แบคทีเรียมีการผลิต PHB น้อยที่สุดเท่ากับ 38.904 x10^{-3} กรัมต่อลิตร คิดเป็น $Y_{P/S}$ $Y_{P/X}$ และ Q_P เท่ากับ 0.011 0.022 และ 0.001 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่าเมื่ออัตราการเขย่าเพิ่มขึ้น PHB จะสูงขึ้น และหากอัตราการเขย่าเพิ่มขึ้น ถึง 300 รอบต่อนาทีประสิทธิภาพการผลิต PHB จะลดลง ซึ่ง Luengo *et al*. (2003) รายงานว่า การรักษาปริมาณออกซิเจนในระดับที่จำกัด (oxygen limitation) จะทำให้เอนไซม์ซิเตรทซินเทส (citrate synthase) และไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) ถูกยับยั้ง ส่งผลให้อะซิติลโคเอ (acetyl CoA) ไม่สามารถเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) acetyl CoA จึงถูกนำไปสร้างเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอ (acetoacetyl CoA) และ PHB ตามลำดับ และ Savenkova *et al.* (1999) ยังรายงานว่า การสะสม PHB ถูกชักนำจากปริมาณออกซิเจนที่จำกัด และได้อ้างถึง Hine and Lees (1976) ว่าการเจริญของแบคทีเรีย *Azotobacter chroococcum* จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการให้อากาศ การเจริญและการสะสม PHB จะสูงขึ้นเมื่อมีการให้อากาศอย่างเพียงพอ โดยต้องรักษาการให้ออกซิเจนให้ต่ำกว่าระดับการจำกัดออกซิเจน (oxygen limiting condition) จะทำให้มีการผลิต PHB สูง แสดงว่าที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที สามารถรักษาระดับของออกซิเจนอยู่ในระดับที่เหมาะสมจึงสามารถทำให้แบคทีเรียผลิต PHB ได้สูงที่สุด และเมื่ออัตราการเขย่าเพิ่มขึ้นเป็น 300 รอบต่อนาที อัตราการผลิต PHB ลดลง เนื่องจากเมื่อมีออกซิเจนสูง แบคทีเรียจะสามารถนำเอา PHB ที่ผลิตขึ้นกลับมาใช้ในการเจริญเติบโตอีกครั้ง ทำให้ปริมาณ PHB สุทธิในระหว่างการเพาะเลี้ยงต่ำ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตลดลงด้วย

Wei *et al*. (2011) ได้ทำการศึกษาการผลิต PHB โดยใช้อัตราเขย่าที่ 150 200 250 และ 300 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่า การใช้อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีให้การผลิต PHB และมวลเซลล์สูงสุดที่ 1.05 และ 2.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มอัตราการเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที พบว่าเกิดการผลิต PHB และมวลเซลล์ ได้เพียง 0.4 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เนื่องมาจากแรงเฉือนที่เกิดขึ้นทำให้การเจริญเติบโตและการผลิต PHB ลดลง ในขณะที่ สุปริญญา (2546) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้อัตราการเขย่าที่ 100 200 และ 300 รอบต่อนาที โดยมีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อคงที่เท่ากับ 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยให้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อ

นาที ให้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 53.81 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้ความเร็วรอบสูงหรือต่ำกว่าพบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHB ได้ต่ำกว่าที่ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพการผลิต PHB จากน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังที่อัตราการเขย่าต่างๆ

Agitation rate (rpm)	PHB concentration (x 10^{-3} gl^{-1})	$Y^{a}_{P/S}$	$Y^{b}_{P/X}$	PHB content (%)	Qp ($gl^{-1}h^{-1}$)
100	75.120	0.009	0.022	2.20	0.002
200	161.760	0.029	0.068	6.75	0.007
300	38.904	0.011	0.022	2.20	0.001

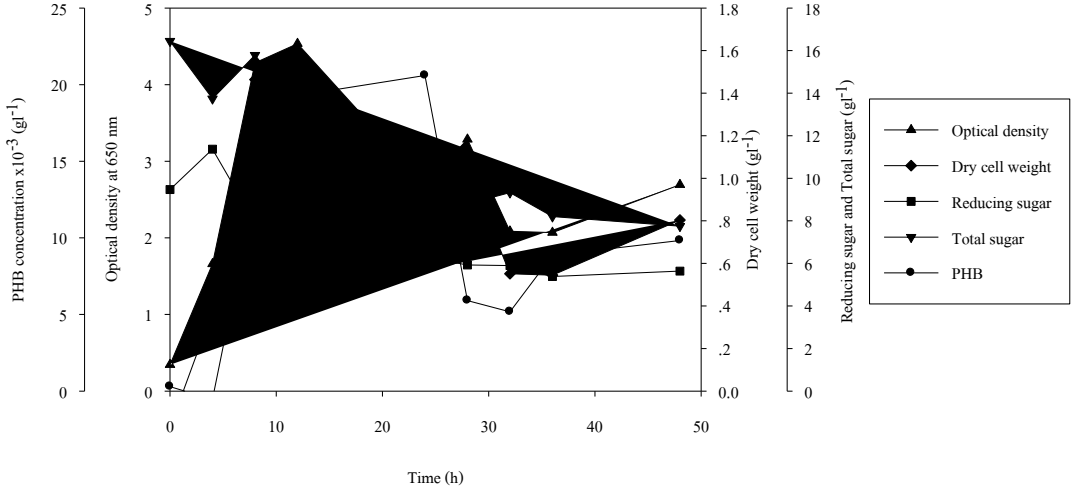
[a]Gram PHB per gram of glucose consumed, [b]Gram PHB per gram of dry cell weight

4.6 การศึกษาการผลิต PHB จากน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 1 องศาบริกซ์ คิดเป็นน้ำตาลทั้งหมดประมาณ 12.0-14.0 กรัมต่อลิตร และใช้สารสกัดจากยีสต์ 1.2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตรทำงาน 3 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ ในช่วง 8 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากชั่วโมงที่ 8 แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วง log phase อย่างรวดเร็ว โดยมีการสะสมมวลเซลล์เท่ากับ 0.591 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 32 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้อย่างรวดเร็ว แต่จากการทดลองไม่พบการผลิต PHB ภายในเซลล์ของ *A. eutrophus* ซึ่งอาจจะเกิดจากการควบคุมอัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที ภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร ไม่สามารถเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้แก่แบคทีเรียในระดับที่เหมาะสมได้ แบคทีเรียจึงไม่มีการผลิต PHB ซึ่งจากผลการทดลองยังพบว่า แบคทีเรียนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญเติบโตเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการผลิต PHB ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ศิริวรรณ (2552) ว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อัตราการกวน 100 และ 200 รอบต่อนาที โดยไม่มีการให้อากาศเพิ่มเติม จะไม่สามารถเพิ่มปริมาณออกซิเจนในระบบได้ ต่อมาจึงได้ทำการทดลองโดยเพิ่มการพ่นอากาศเข้าไปในระบบด้วยอัตรา 1.0 วีวีเอ็ม (vvm) และควบคุมสภาวะการทดลองอื่นๆตามข้างต้น

ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง จนมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีการสะสมมวลเซลล์เท่ากับ 1.567 กรัมต่อลิตร หลังจากชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป *A. eutrophus* เริ่มมีการเจริญลดลงจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วใน 24 และ12 ชั่วโมง ตามลำดับ และ *A. eutrophus* มีอัตราการผลิต PHB สูงขึ้นในช่วง log phase และสูงสุดเท่ากับ 20.60 x 10^{-3} กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้น PHB จึงค่อยๆลดลง และคงที่ในช่วงท้ายของการทดลอง (ภาพที่ 15)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การขยายขนาดการผลิต PHB จากระดับฟลาสก์เป็นการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตรนั้น จำเป็นต้องมีการคำนึงถึงอัตราการให้อากาศแก่ *A. eutrophus* ด้วย ซึ่งหากทำการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้นต้องเพิ่มอัตราการให้อากาศแก่ระบบในระดับที่สัมพันธ์กับความต้องการของแบคทีเรีย โดยจากการทดลอง 4.5 พบว่า หากให้อากาศน้อยหรือมากเกินไปจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการผลิต PHB ของแบคทีเรียมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Satoh *et al.* (1998) โดยรายงานว่า การเพิ่มอากาศจะทำให้มีการผลิต PHA มากขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม Arunpan (1998) ยังได้อธิบายว่า อากาศและอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA นั้นยังขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน โดยอากาศจะช่วยส่งเสริมการเจริญและการผลิต PHA ส่วนอัตราการกวนนั้นจะช่วยผสมอาหารกับเซลล์ และทำให้จุลินทรีย์สามารถดูดซึมอาหารและอากาศได้ดีขึ้น



ภาพที่ 15 การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยวิธีการหมักแบบกะ

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพการผลิต PHB ในน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร

PHB concentration ($x\ 10^{-3}\ gl^{-1}$)	Glucose consumption (%)	$Y^{a}_{P/S}$	$Y^{b}_{P/X}$	PHB content (%)	Q_p ($gl^{-1}h^{-1}$)
20.60	52.88	0.002	0.025	2.56	0.001

[a]Gram PHB per gram of glucose consumed, [b]Gram PHB per gram of dry cell weight

ดังนั้นการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิต PHB ในถังหมักควรศึกษาอัตราการให้อากาศและการกวนที่เหมาะสม ซึ่งจะส่งเสริมให้เกิดการผลิต PHB จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียได้มากขึ้น

4.7 การศึกษาการผลิต PHB จากไฮโดรไลเซตของมันสำปะหลังด้วยการหมักแบบกึ่งกะในระดับฟลาสก์

การศึกษาอัตราการส่วนของอาหารเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแบบกึ่งกะเพื่อผลิต PHB โดยแปรผันอัตราส่วนที่ 14 2/4 หรือ 3/4 ส่วนของปริมาตรอาหารทั้งหมด ผลการทดลองพบว่า ที่อัตราการส่วน 1/4 แบคทีเรียมีการผลิต PHB ได้สูงสุดในช่วงที่ 1 เท่ากับ 4.71×10^{-3} กรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง และเมื่อมีการเติมอาหารเข้าไปในช่วงที่ 2 3 และ 4 แบคทีเรียมีการผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 0.70×10^{-3} 0.48×10^{-3} และ 0.30×10^{-3} กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งปริมาณ PHB ที่ผลิตขึ้นมีแนวโน้มลดลงในทุกๆช่วง เนื่องจาก ปริมาณอาหารที่เติมลงไปนั้นอาจจะไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียนำเอา PHB กลับมาใช้ในการเจริญเติบโตปริมาณ PHB จึงลดลงอย่างต่อเนื่อง

ขณะที่อัตราการส่วน 2/4 แบคทีเรียมีการผลิต PHB ได้สูงสุดในช่วงที่ 1 เท่ากับ 8.46×10^{-3} กรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมงของการผลิต และเมื่อมีการเติมอาหารเข้าไปในช่วงที่ 2 และ 3 แบคทีเรียมีการผลิตสะสม PHB ลดลงเรื่อยๆ โดยเวลาสุดท้ายของช่วงการเติมอาหารมี PHB สะสมอยู่เท่ากับ 4.18×10^{-3} และ 1.32×10^{-3} กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งปริมาณ PHB ที่ผลิตขึ้นมีแนวโน้มลดลงในทุกๆช่วงเช่นเดียวกับที่อัตราส่วน 1/4 แต่มีการสะสม PHB แต่มีการสะสม PHB ในปริมาณที่สูงกว่าอัตราส่วน 1/4 และเมื่อทำการทดลองในอัตราส่วน 3/4 พบว่า *A. eutrophus* สามารถผลิต PHB ในช่วงที่ 1 เท่ากับ 17.22×10^{-3} กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการหมัก และในช่วงที่ 2 มีการสะสม PHB เท่ากับ 18.39×10^{-3} กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมงของการผลิต

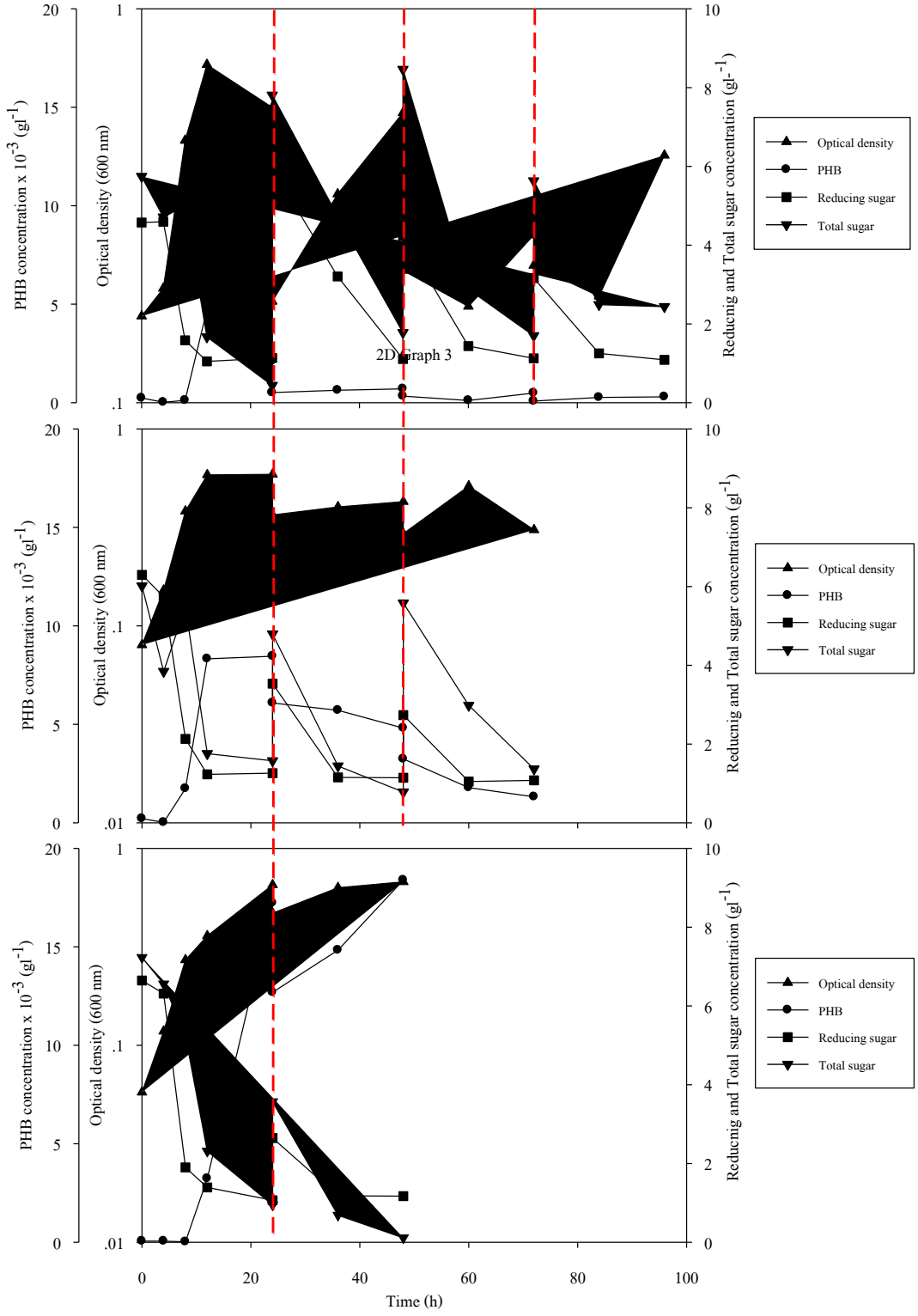
จากผลการทดลองผลิต PHB แบบกึ่งกะพบว่า หากมีการเติมอาหารใหม่ลงไปในช่วงเวลาที่ไม่เหมาะสม และปริมาณอาหารไม่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะทำให้แบคทีเรียมีการสะสม PHB น้อยลงเนื่องจากมีการนำ PHB ที่สะสมเอาไว้ภายในเซลล์กลับมาใช้ใหม่ทำให้ปริมาณPHB ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์มีปริมาณลดลง (Khanna and Srivastsva, 2005) (ตารางที่ 10) และจากผลการทดลองพบว่าที่อัตราส่วน 3/4 แบคทีเรียสามารถสะสม PHB ได้สูงสุดจึงทำการทดลองผลิต PHB ในระดับขยายขนาดต่อไป

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพการผลิต PHB จากน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยการหมักแบบกึ่งกะในสภาวะที่มีอัตราส่วนการเติมอาหารต่างกัน

Feeding Ratio	PHB concentration (x 10^{-3} gl^{-1})	$Y^{a}_{P/S}$ (x 10^{-3})	Qp (x 10^{-3} $gl^{-1}h^{-1}$)
1/4	5.26	0.364	0.088
2/4	8.25*	1.862	0.344
3/4	22.87	2.348	0.476

* Calculated in first period of Fed-batch fermentation only.

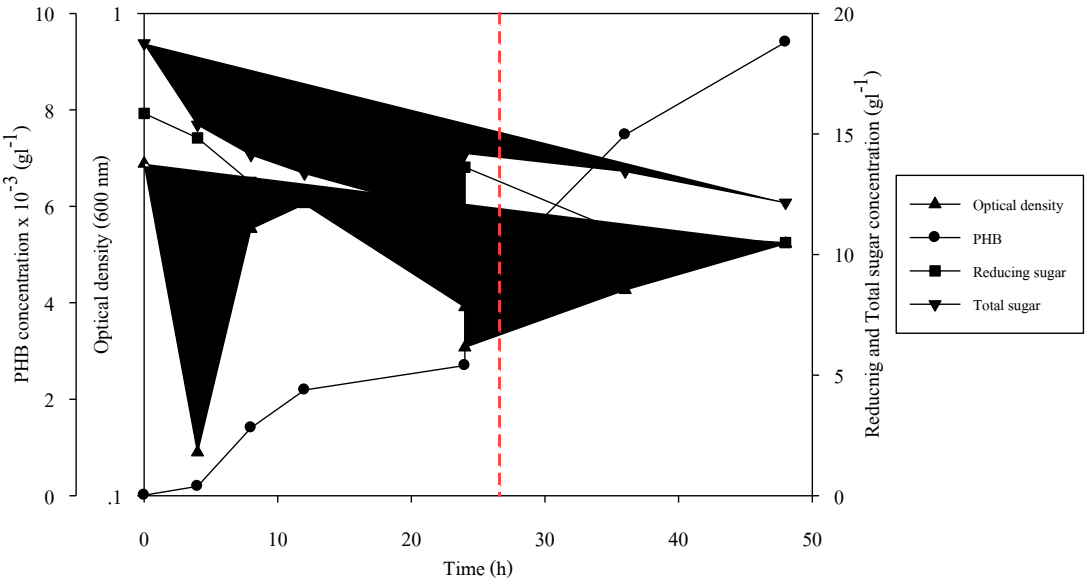
[a]Gram PHB per gram of glucose consumed, [b]Gram PHB per gram of dry cell weight



ภาพที่ 16 การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ด้วยวิธีการหมักแบบกึ่งกะในระดับฟลาสก์ที่อัตราส่วนต่างๆ

4.8 การศึกษาการผลิต PHB จากไฮโดรไลเซตของมันสำปะหลังด้วยการหมักแบบกึ่งกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร

การศึกษาการขยายขนาดการผลิตPHB ด้วยอัตราการส่วนของอาหารเริ่มต้นที่ 3/4 ของปริมาตรอาหารทั้งหมดทำในถังหมักขนาด 5 ลิตร ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียมีการผลิต PHB ได้สูงสุดในช่วงที่ 1 เท่ากับ 4.12 x 10^{-3} กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง และเมื่อมีการเติมอาหารเข้าไปในช่วงที่ 2 แบคทีเรียมีการผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 9.41 x 10^{-3} กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ คิดเป็น $Y^{a}_{P/S}$ และ Q_P ตลอดระยะเวลา เท่ากับ 1.167 x 10^{-3} และ 0.225 x 10^{-3} ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกับการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์พบว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักมีประสิทธิภาพต่ำกว่า เนื่องจากการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้นต้องเพิ่มอัตราการให้อากาศแก่ระบบในระดับที่สัมพันธ์กับความต้องการของแบคทีเรียด้วยโดยหากให้อากาศน้อยหรือมากเกินไป จะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการผลิต และการสะสม PHB ของแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Satoh *et al.* (1998) โดยรายงานว่า การเพิ่มอากาศจะทำให้มีการผลิต PHA มากขึ้นด้วย



ภาพที่ 17 การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ด้วยวิธีการหมักแบบกึ่งกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพการผลิต PHB จากน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยการหมักแบบกึ่งกะในสภาวะที่มีอัตราส่วนการเติมอาหารต่างกัน

Feeding Ratio	PHB concentration (x 10^{-3} gl^{-1})	$Y^{a}_{P/S}$ (x 10^{-3})	Qp (x 10^{-3} $gl^{-1}h^{-1}$)
3/4*	10.82	1.167	0.225

* Calculated in all periods of Fed-batch fermentation.

[a]Gram PHB per gram of glucose consumed, [b]Gram PHB per gram of dry cell weight

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพการผลิต PHB ในสภาวะต่างๆ

Substrate	Condition	Cell conc. (gl^{-1})	PHB conc. (gl^{-1})	PHB content (%)	PHB Productivity ($gl^{-1}h^{-1}$)	Reference
Glucose	*R. eutropha* NCIMB 11599 30°C, DO 20%, 1.0 vvm, 950 rpm, pH 6.7	208.00	139.00	67.00	3.10	Shang *et al.* (2003)
Glucose	*A. eutrophus* DSM 545 34 °C, 1.0 vvm, 1000 rpm, pH 6.8			75.00	0.15	Sirisansaneekul and Mahasubpaiboon (n.d.)
Maltose and Sucrose	*A. latus* DSM 1124 35 °C, DO 20%, pH 7.0	32.36	22.68	70.69	0.44	Yu *et al.* (1999)
Maple sap	*A. latus* 33 °C, DO 30%,	4.20	3.26	77.00		Yezza *et al.* (2007)
Whey	Recombinant *E. coli* Oxygem limitation, pH 7.1	31.00	25.00	80.00	0.48	Kim (2000)
Fructose	*W. eutropha* DO 30%		6.10	43.61		Patwardhan and Srivastsva (2008)
Strach hydrolysate (flask)	*A. eutrophus* TISTR 1095 30°C, 200 rpm	2.400	0.162	6.75	0.007	This research
Strach hydrolysate (5 L fermentor)	*A. eutrophus* TISTR 1095 30°C, 1.0 vvm, 200 rpm	0.806	Strach hydrolysate (5 L fermentor)	*A. eutrophus* TISTR 1095 30°C, 1.0 vvm, 200 rpm	0.806	Strach hydrolysate (5 L fermentor)

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพการผลิต PHB ในสภาวะต่างๆ (ต่อ)

Substrate	Condition	Cell conc. (gl^{-1})	PHB conc. (gl^{-1})	PHB content (%)	PHB Productivity ($gl^{-1}h^{-1}$)	Reference
Strach hydrolysate (flask)	*A. eutrophus* TISTR 1095 30°C, 200 rpm	2.400	0.162	6.75	0.007	This research
Strach hydrolysate (5 L fermentor)	*A. eutrophus* TISTR 1095 30°C, 1.0 vvm, 200 rpm	0.806	0.021	2.56	0.001	This research
Strach hydrolysate (5 L fermentor)	*A. eutrophus* TISTR 1095 30°C, 1.0 vvm, 200 rpm (Fed-batch fermentation)	-	0.011	-	0.002	This research