

การขยายส่วนการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)
ในเฟด-เบตซ์โดย *Bacillus megaterium* BA-019

นายปวดี กาญจนชุมพล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5 0 7 2 6 4 8 0 2 3

SCALING UP PRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTIC, POLY(3-HYDROXYBUTYRATE),
IN FED-BATCH BY *Bacillus megaterium* BA-019

Mr. Pawut Kanjanachumpol

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การขยายส่วนการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ในเฟด-แบคซ์ โดย *Bacillus megaterium* BA-019

โดย

นายปวุติ กาญจนชุมพล

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. ส่องศรี กุลปรีชา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

อาจารย์ ดร. ณีฎฐา ทองจุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่องศรี กุลปรีชา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. ณีฎฐา ทองจุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฉมิตานนท์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชานิช)

ปฐุติ กากูญจนซุมพล : การขยายส่วนการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ในเฟด-แบตช์โดย *Bacillus megaterium* BA-019. (SCALING UP PRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTIC, POLY(3-HYDROXYBUTYRATE), IN FED-BATCH BY *Bacillus megaterium* BA-019) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. ส่งศรี กุลปริษา, อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ. ดร. ณีฎฐา ทองจุล, 123 หน้า.

ในงานวิจัยนี้ ได้ศึกษาปัจจัยและเกณฑ์สำหรับการขยายส่วนการหมักพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB) โดย *Bacillus megaterium* BA-019 เพื่อบรรลุวัตถุประสงค์ กล่าวคือ ใ้อัตราการผลิต และ $Y_{p/s}$ สูง ข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาในถังหมักขนาด 10 ลิตรถูกนำมาใช้ในการทำนายภาวะที่ใช้ในการหมักในถังหมักขนาด 90 ลิตร โดยมีปัจจัยทางวิศวกรรมที่ใช้ในการคำนวณ ได้แก่ อัตราส่วนของกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (P/V) ความเร็วรอบปลายใบพัด (N_r) และค่าเรย์โนลด์ส์นัมเบอร์ (Re_r) โดยเริ่มจากการทดลองหมัก P(3HB) ในถังหมัก 10 ลิตรแบบแบตช์ พบว่า การเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในสูตรอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นองค์ประกอบทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นและยังมีการสังเคราะห์ P(3HB) ได้ในปริมาณมาก โดยแปรความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดที่มีอยู่ในกากน้ำตาล ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 60 กรัมของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล จะได้ปริมาณเซลล์สูงสุดที่ 32.48 กรัมต่อลิตร และปริมาณ P(3HB) สูงสุดที่ 8.75 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (0.23 h^{-1}) ค่า $Y_{x/s}$ (0.66) $Y_{P(3HB)/s}$ (0.19) และ $Y_{P(3HB)/x}$ (0.28) เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเฟด-แบตช์ พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตของเซลล์และ P(3HB) ได้มากขึ้น และได้ศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และเทคนิคการป้อนอาหารที่มีต่อการสร้างเซลล์และการสะสม P(3HB) ในการหมักแบบเฟด-แบตช์ด้วย โดยพบว่าการป้อนอาหารที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน 12.5 ต่อ 1 (โดยน้ำหนัก) แบบ exponential ให้ผลผลิตเซลล์สูงสุดที่ 72.97 กรัมต่อลิตร และ P(3HB) 38.56 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 21 โดยอัตราการผลิต P(3HB) เพิ่มขึ้นเป็น 1.84 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเทียบกับการผลิตแบบแบตช์ (0.73 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) เมื่อเปลี่ยนเทคนิคการป้อนอาหารเป็นแบบครั้งคราวโดยใช้สูตรอาหารเดียวกับที่ใช้ในการป้อนแบบ exponential โดยเริ่มป้อนที่ชั่วโมงที่ 9 พบว่าได้ผลผลิตของเซลล์และ P(3HB) เพิ่มขึ้นเป็น 90.71 และ 41.58 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยคิดเป็นอัตราการผลิต P(3HB) เท่ากับ 1.73 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ภายใน 24 ชั่วโมง การขยายส่วนการผลิตสู่ถังหมัก 90 ลิตร อาศัยข้อมูลพื้นฐานด้านเทคนิคการหมักและภาวะการเลี้ยงเชื้อทั้งแบบแบตช์และเฟด-แบตช์ที่เหมาะสมจากถังหมัก 10 ลิตร เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการหมักทั้ง 2 ระดับ พบว่าความเร็วรอบปลายใบพัดเป็นปัจจัยทางวิศวกรรมที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้เป็นเกณฑ์คงที่ในการขยายส่วนการผลิต P(3HB) จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ

ภาควิชา..... จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา..... จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทางอุตสาหกรรม..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา..... 2553..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5072648023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : *Bacillus megaterium* BA-019/ P(3HB)/ FED-BATCH

PAWUT KANJANACHUMPOL : SCALING UP PRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTIC, POLY(3-HYDROXYBUTYRATE), IN FED-BATCH BY *Bacillus megaterium* BA-019. ADVISOR : ASSOC. PROF. SONGSRI KULPREECHA, Ph.D., CO-ADVISOR : NUTTHA THONGCHUL, Ph.D., 123 pp.

In this research, the important factors and criteria for scaling up the fermentation of poly(3-hydroxybutyrate) or P(3HB) were determined in order to achieve high production rate and yield of P(3HB) by *Bacillus megaterium* BA-019. The preliminary fermentation data obtained from the study in a 10 L stirred fermentor were used for the prediction of the process conditions tested in a 90 L stirred fermentor. The related engineering parameters used in the calculation include power input per unit volume (P/V), impeller tip speed (N_p), and impeller Reynold's number (Re_p). Initially, the fermentation study in the 10 L stirred fermentor was carried out. It was observed that high production rate and yield of P(3HB) could be achieved from high cell density of *B. megaterium* BA-019 cultivated in the simple medium containing molasses. Among 4 initial concentrations of molasses present in the medium, 60 g/L total sugars initially present in the molasses medium gave the maximum cell growth (32.48 g/L) and P(3HB) production (8.75 g/L) at 12 h with the corresponding specific growth rate of 0.23 h^{-1} , biomass yield to substrate ($Y_{x/s}$) of 0.66, P(3HB) yield to substrate ($Y_{P(3HB)/s}$) of 0.19, and P(3HB) yield to cell ($Y_{P(3HB)/x}$) of 0.28 in batch cultivation. Further increasing cell and P(3HB) production were accomplished in fed-batch cultivation. The effects of C/N ratios and feeding techniques on cell and P(3HB) production were investigated during fed-batch fermentation. Using exponential feeding, the optimal feeding medium with the C/N ratio of 12.5:1 gave maximum cell concentration of 72.97 g/L and P(3HB) concentration of 38.56 g/L at 21 h cultivation with the increasing P(3HB) productivity of $1.84 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ as compared to $0.73 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ obtained from batch culture. After batch cultivation for 9 h, feeding the fermentor with the molasses medium (C/N of 12.5:1) using rectangular pulse technique yielded the high biomass and P(3HB) production of 90.71 g/L and 41.58 g/L, respectively with the corresponding P(3HB) productivity of $1.73 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ within 24 h. From the optimal operating condition to achieve high biomass and P(3HB) production, the batch fermentations in the 90 L stirred bioreactor were tested for determining the well-suited engineering parameter for scaling up P(3HB) fermentation. Comparing the results in both batch and fed-batch cultivations in 10 L stirred fermentor with those in 90 L stirred fermentation, it was evident that the impeller tip speed is the most suitable scaling up criteria for P(3HB) production from the molasses medium.

Department :Microbiology..... Student's Signature.....

Field of Study : ...Industrial Microbiology... Advisor's Signature.....

Academic Year :2010..... Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. ณัฐฐา ทองจุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่เสียสละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้สามารถทำงานวิจัยได้สำเร็จ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โหมยิตานนท์ และรองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ว่าสนา โตเลี้ยง และอาจารย์ในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ ในห้องวิจัย 462 รวมถึงเพื่อนๆ ระดับปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยา สำหรับกำลังใจ ความช่วยเหลือ และน้ำใจที่มีให้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาคจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับการอำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และนายกมลชัย มังกรฤทธิ์ วิศวกรประจำ สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและมีส่วนร่วมในงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของข้าพเจ้า สำหรับความรัก ความห่วงใย และกำลังใจที่ดีเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ต
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ด
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 มุลเหตุจูงใจในการวิจัย.....	2
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.5 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
2. ทัศนัวรรณกรรม.....	4
2.1 พลาสติก (Plastics).....	4
2.2.1 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	5
2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (polyhydroxyalkanoate; PHA).....	8
2.2.1 โครงสร้างของ PHA.....	9
2.2.2 การจัดจำแนกชนิดของ PHA.....	10
2.2.3 ประโยชน์ของ PHA.....	11
2.3 พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทีเรต (poly- β -hydroxybutyrate).....	13
2.3.1 โครงสร้างและคุณสมบัติของ P(3HB).....	14
2.3.2 วิธีเมแทบอลิซึมเพื่อผลิต P(3HB).....	19
2.3.3 หน้าที่ของ P(3HB) ในจุลินทรีย์.....	21
2.3.4 ปัจจัยที่มีผลต่อต้นทุนการผลิต P(3HB).....	22
2.4 การผลิต P(3HB) จากจุลินทรีย์.....	29
2.4.1 กระบวนการหมักแบบแบตช์ (batch fermentation).....	29
2.4.2 กระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์ (fed-batch fermentation).....	29

บทที่	หน้า
2.5 การผลิต P(3HB) ในระดับอุตสาหกรรม.....	35
2.5.1 การขยายส่วนการผลิต (scale-up of production scale).....	36
2.5.2 เกณฑ์ทางกายภาพที่เป็นพารามิเตอร์ที่มีประโยชน์ในการขยายส่วน.....	38
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	42
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	42
3.2 เคมีภัณฑ์.....	43
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	44
3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา.....	44
3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	45
3.3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์.....	46
3.3.4 สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) จาก <i>B. megaterium</i> BA-019 โดยการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร.....	46
3.3.5 ผลิต P(3HB) จาก <i>B. megaterium</i> BA-019 โดยใช้สภาพที่เหมาะสมสำหรับการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.4 โดยการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ในถังหมักขนาด 90 ลิตร.....	48
3.4 วิธีวิเคราะห์.....	50
3.4.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	50
3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด.....	50
3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีเจลดาลด์ (Kjeldahl protein)...	50
3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography; GC).....	51
4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	52
4.1 สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) จาก <i>B. megaterium</i> BA-019 โดยการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร.....	52
4.1.1 เลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 แบบแบตช์ เพื่อศึกษาจลนศาสตร์ (kinetics) ของการเจริญและการผลิต P(3HB).....	52
4.1.2 ผลิต P(3HB) จาก <i>B. megaterium</i> BA-019 แบบเฟด-แบตช์ โดยการป้อนด้วยวิธี exponential feeding.....	59
4.1.3 ผลิต P(3HB) จาก <i>B. megaterium</i> BA-019 แบบเฟด-แบตช์ โดยการป้อนกาน้ำตาลและยูเรียแบบครั้งคราว.....	86

บทที่	หน้า
4.2 ผลิต P(3HB) จาก <i>B. megaterium</i> BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยงแบบเฟด-เบดซ์ ในถังหมักขนาด 90 ลิตร.....	91
4.2.1 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต.....	91
4.2.2 หาเกณฑ์คงที่ที่เหมาะสมสำหรับการขยายส่วนการผลิต P(3HB) จากถังหมักขนาด 10 ลิตร ไปสู่ถังหมักขนาด 90 ลิตร.....	93
4.2.3 ผลิต P(3HB) จาก <i>B. megaterium</i> BA-019 โดยการเลี้ยงแบบเฟด-เบดซ์.....	102
5. สรุปผลการทดลอง.....	106
รายการอ้างอิง	108
ภาคผนวก.....	115
ภาคผนวก ก การเตรียมวัตถุดิบและสารที่ใช้ในการวิจัย.....	116
ภาคผนวก ข สูตรคำนวณ.....	118
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน.....	119
ภาคผนวก ง โครมาโทแกรม.....	120
ภาคผนวก จ การคำนวณค่าความเร็วยวของการกวนเมื่อใช้เกณฑ์คงที่ในการกำหนดการขยายส่วนของถังหมัก.....	121
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	123

สารบัญญัตราง

ตารางที่		หน้า
2.1	เปรียบเทียบคุณสมบัติของ PHA, PLA และ PBS.....	7
2.2	สัญลักษณ์ที่บ่งถึงพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพและมาตรฐานรับรองการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	8
2.3	จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างและสะสม PHA.....	15
2.4	สมบัติการละลายของ P(3HB).....	17
2.5	สมบัติทางกายภาพและความร้อนของ P(3HB) เทียบกับพอลิพรอพิลีน.....	18
2.6	ส่วนประกอบส่วนใหญ่ของกากน้ำตาลในประเทศไทย.....	26
2.7	ราคาต้นทุนการผลิต P(3HB) เมื่อกำลังการผลิต และผลผลิตของ P(3HB) แตกต่างกัน..	28
2.8	ผลของต้นทุนซับสเตรทและผลผลิต P(3HB) ที่มีต่อราคา P(3HB).....	28
4.1	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร.....	54
4.2	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร.....	55
4.3	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร.....	56
4.4	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร.....	57
4.5	เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต P(3HB) ของ <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลต่างกัน.....	58
4.6	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรเป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 6.....	61

ตารางที่	หน้า
4.13 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต P(3HB) ของ <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าต่างกันที่ชั่วโมงที่ 12.....	77
4.14 ค่าจลนศาสตร์ของการเจริญและการผลิต P(3HB) ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 แบบแบตช์ ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร.....	79
4.15 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 9.....	80
4.16 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 15.....	82
4.17 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 9.5.....	84
4.18 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 9 แบบครึ่งคราว.....	87
4.19 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต P(3HB) ของ <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 12.5 ที่ชั่วโมงต่างๆกัน แบบเฟด-แบตช์.....	89
4.20 เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) โดยใช้จุลินทรีย์และเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน...	90

ตารางที่	หน้า
4.21 การเติบโตของ <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร.....	92
4.22 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ <i>B. megaterium</i> BA-019 เมื่อให้อัตราการกวนที่ 424 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมักขนาด 90 ลิตร (กำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ของถังหมัก 90 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน).....	95
4.23 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ <i>B. megaterium</i> BA-019 เมื่อให้อัตราการกวนที่ 357 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมักขนาด 90 ลิตร (กำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) ของถังหมัก 90 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน).....	97
4.24 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ <i>B. megaterium</i> BA-019 เมื่อให้อัตราการกวนที่ 212 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมักขนาด 90 ลิตร (กำหนดให้ค่าเรย์โนลด์ส์นัมเบอร์ (N_{RE}) ของถังหมัก 90 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน).....	99
4.25 เปรียบเทียบค่าจลนศาสตร์ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 90 ลิตร เมื่อผลิต P(3HB) ที่กำหนดเกณฑ์การขยายส่วนคงที่เหมือนในถังหมักขนาด 10 ลิตร.....	101
4.26 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 90 ลิตร เมื่อกำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) ของถังหมัก 90 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน โดยเริ่มป้อนกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) ที่ชั่วโมงที่ 9 แบบครั้งคราว.....	103
4.27 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต P(3HB) ของ <i>B. megaterium</i> BA-019 แบบแบตช์ และแบบเฟด-แบตช์ (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 12.5 ที่ชั่วโมงที่ 9 แบบครั้งคราว) ในถังหมักขนาด 10 ลิตร และ 90 ลิตร โดยใช้อาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร.....	105

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	5
2.2	9
2.3	10
2.4	13
2.5	14
2.6	14
2.7	20
2.8	21
2.9	31
3.1	44
3.2	44
3.3	44
4.1	54
4.2	55
4.3	56
4.4	57
4.5	62
4.6	64

รูปที่	หน้า
4.14 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 9.5.....	85
4.15 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 9 แบบครั้งคราว.....	88
4.16 การเติบโตของ <i>B. megaterium</i> BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร.....	92
4.17 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 90 ลิตร เมื่อให้อัตรากวนที่ 424 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (กำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ของถังหมัก 90 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน).....	96
4.18 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 90 ลิตร เมื่อให้อัตรากวนที่ 357 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (กำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) ของถังหมัก 90 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน).....	98
4.19 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 90 ลิตร เมื่อให้อัตรากวนที่ 212 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (กำหนดให้ค่าเรย์โนลด์์นัมเบอร์ (N_{RE}) ของถังหมัก 90 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน).....	100
4.20 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ในถังหมักขนาด 90 ลิตร เมื่อกำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) ของถังหมัก 90 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน โดยเริ่มป้อนกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) ที่ชั่วโมงที่ 9 แบบครั้งคราว.....	104

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ตัวย่อ	คำอธิบาย
DCW	น้ำหนักเซลล์แห้ง
g/l	กรัมต่อลิตร
g/l-h	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
h	ชั่วโมง
PHB / P(3HB)	พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตหรือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)
P(3HB) conc.	ความเข้มข้นของ P(3HB)
P(3HB) prod.	อัตราการผลิต P(3HB)
$Y_{x/S}$	ผลของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป
$Y_{P/S}$	ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป
$Y_{P/X}$	ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหนึ่งหน่วยเซลล์
% by wt.	เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
μ	อัตราการเติบโตจำเพาะ

บทที่ 1

บทนำ

พลาสติกที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันเป็นวัสดุที่มีน้ำหนักเบา มีความคงทนแข็งแรง สีสันสวยงาม ราคาถูก และเป็นวัสดุที่สามารถปรับแต่งให้มีลักษณะพิเศษตามต้องการได้ จึงถูกนำมาใช้เป็นวัสดุ อุปกรณ์ เครื่องใช้ต่างๆเป็นจำนวนมาก แต่เนื่องจากพลาสติกเหล่านั้นเป็นพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี (petroleum based plastic) เช่น พอลิพรอพิลีน (polypropylene; PP) พอลิเอทิลีน (polyethylene; PE) และพอลิไวนิลคลอไรด์ (polyvinylchloride; PVC) ซึ่งย่อยสลายได้ยากหรือไม่ย่อยสลายเลย จึงทำให้ขยะพลาสติกเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งบรรจุภัณฑ์พลาสติกที่มีอายุการใช้งานสั้นและมีปริมาณการใช้เป็นจำนวนมากในสังคมเมือง เช่น ถุงพลาสติก ฟิล์มห่ออาหาร และกล่องโฟมบรรจุอาหาร เป็นต้น พลาสติกจึงก่อให้เกิดปัญหาขยะเหลือทิ้งจากชุมชนและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากพลาสติกที่ใช้แล้วเหล่านี้มีการปนเปื้อนจากการใช้งานค่อนข้างมาก จึงไม่ได้รับความนิยมนำไปหมุนเวียนเพื่อแปรรูปนำกลับมาใช้งานใหม่ อีกทั้งการกำจัดพลาสติกสังเคราะห์นี้ทำได้ยากและจุลินทรีย์ในธรรมชาติไม่สามารถย่อยสลายได้ง่าย ดังนั้นเพื่อลดปัญหาของพลาสติกสังเคราะห์ที่เป็นมลพิษในสิ่งแวดล้อม จึงจำเป็นต้องทำการวิจัยเพื่อผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ เช่น พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates; PHAs) พอลิแลคติกแอซิด (polylactic; PLA) พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (polybutylene succinate; PBS) รวมถึงโคพอลิเมอร์และอนุพันธ์ผสมของพอลิเมอร์เหล่านี้ (Zakaria และคณะ, 2010) เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมีที่ย่อยสลายไม่ได้ ซึ่งพลาสติกชีวภาพเหล่านี้ผลิตได้จากแหล่งวัตถุดิบที่สามารถปลูกทดแทนใหม่ได้ เช่น พืชผลทางการเกษตร จำพวกแป้งและน้ำตาล โดย PHAs เป็นกลุ่มพลาสติกที่ย่อยสลายได้เพียงประเภทเดียวที่กระบวนการสังเคราะห์ทั้งหมดเกิดขึ้นในจุลินทรีย์ (microbial polymers)

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตหรือพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB) เป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดหนึ่งในกลุ่ม PHAs ซึ่งมีสูตรเคมี คือ $[C_4H_6O_2]_n$ เป็นพอลิเอสเทอร์ของกรดไฮดรอกซีบิวทิริกที่สร้างและสะสมขึ้นภายในเซลล์จุลินทรีย์หลายชนิดเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน โดยสะสมภายในเซลล์ในรูปของแกรนูล ซึ่งมีขนาดและจำนวนแกรนูลต่อเซลล์แตกต่างกันในแต่ละชนิดของจุลินทรีย์ โดยในการสังเคราะห์ P(3HB) เกิดขึ้นในภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปและมีการจำกัดปริมาณหรือขาดแคลนสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือแร่ธาตุ เป็นต้น (Lee, 1996; Jiang และคณะ, 2008) P(3HB) เป็นเทอร์โมพลาสติกที่มีสมบัติทางเคมี กายภาพ และเชิงกลที่ใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีบางชนิด คือ PP และ PE ซึ่งเป็นพลาสติกที่นิยมใช้กันมากที่สุดในปัจจุบัน ทั้งค่าจุดหลอมเหลว ความสามารถเป็นผลึก และความสามารถในการต้านแรง

ดิ่ง เป็นต้น ซึ่ง P(3HB) มีความต้านทานต่อรังสียูวีได้ดีและมีความสามารถให้ออกซิเจนแพร่ผ่านได้ต่ำกว่า จึงอาจนำไปใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ที่ไวต่อออกซิเจนได้ดี แม้ความสามารถในการขยายตัวของ P(3HB) จะต่ำกว่า เป็นผลให้ P(3HB) มีความแข็งและเปราะง่าย แต่ P(3HB) ยังสามารถนำไปผสมกับพอลิเมอร์อื่นๆ เพื่อให้มีสมบัติตามต้องการได้ (Kulpreecha และคณะ, 2009) ดังนั้นจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในหลายด้าน ทั้งในด้านการแพทย์และเกษตรกรรม ได้แก่ การนำมาใช้เป็นวัสดุทางศัลยกรรม เช่น หลอดเลือดเทียม กระดูกเทียม เข็ม ไหมเย็บแผล แคปซูลบรรจุยา เป็นต้น เนื่องจาก P(3HB) มีสมบัติที่เข้ากันได้กับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) หรืออาจนำ P(3HB) มาประยุกต์ใช้ในงานด้านเกษตรกรรม เช่น เป็นวัสดุทำแคปซูลบรรจุยาฆ่าแมลง ปุ๋ย และฮอร์โมนพืช ใช้ทำแหจับปลาสำหรับใช้ใต้น้ำทะเล และสามารถใช้เป็นวัสดุคลุมดินในการเพาะเลี้ยงต้นกล้า (mulch film) เป็นต้น นอกจากนี้สามารถนำ P(3HB) มาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุประเภทบรรจุภัณฑ์หรืออุปกรณ์ใช้สอยอื่นๆ ได้แก่ ขวดแชมพู บรรจุภัณฑ์สำหรับบรรจุอาหารประเภทถั่ว ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป แผ่นฟิล์มถนอมอาหาร หรืออาจใช้ทำเป็นวัสดุที่ใช้ครั้งเดียวทิ้ง เช่น ผ้าอ้อม ผ้าอนามัย ด้ามมีดโกน เป็นต้น (Braunegg และคณะ 1998; Steinbüchel และ Fuchtenbusch, 1998) อีกประการสำคัญคือ P(3HB) เป็นพลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์โดยธรรมชาติ (biodegradable plastics) และผลจากการย่อยสลายของพลาสติกนี้ได้สารที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ได้แก่ น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์และกรดคาร์บอกซิลิก (Suriyamongkol และคณะ, 2007) ทำให้ P(3HB) ได้รับความสนใจที่จะนำมาผลิตเป็นพลาสติกเพื่อใช้ทดแทนพลาสติกที่ใช้กันในปัจจุบัน

มูลเหตุจูงใจในการวิจัย

เนื่องจากปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งของการประยุกต์ใช้ P(3HB) คือ ต้นทุนในการผลิตที่ยังสูงกว่าพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการผลิต P(3HB) ที่มีประสิทธิภาพและต้นทุนต่ำมีหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ กระบวนการหมักและวิธีสกัดแยกผลิตภัณฑ์ รวมทั้งการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก (Choi และ Lee, 1999) เพื่อลดต้นทุนการผลิต งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต P(3HB) เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งในกากน้ำตาลจะประกอบไปด้วยปริมาณน้ำตาลรวม 45-55% โดยมีน้ำตาลซูโครส 30-35% และน้ำตาลรีดิวิซ์ 10-25% (มิตรผล, 2552) จึงสามารถนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Beaulieu และคณะ, 1995) และนอกจากนี้ยังใช้การเลี้ยง *Bacillus megaterium* BA-019 แบบเฟด-แบดจ์ ซึ่งเป็นกระบวนการเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งหลักการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบนี้คือ มีการเติมสารอาหารในระหว่างกระบวนการหมัก โดยในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้กระบวนการหมักแบบนี้ เนื่องจากทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์และผลผลิตในปริมาณมาก (Sun และคณะ, 2007)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อหาภาวะเหมาะสมในการขยายส่วนการผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดย *Bacillus megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 90 ลิตร

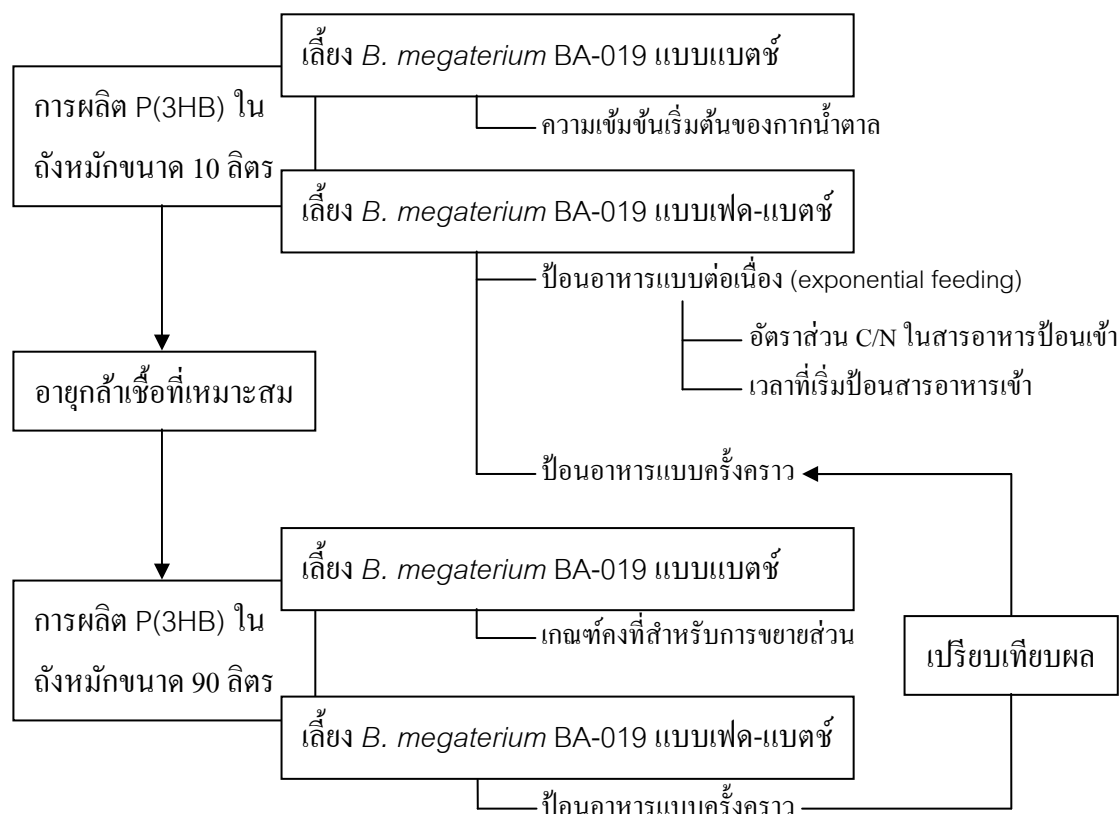
ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. หาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงแบบเฟด-แบดจ์ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร
2. ผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้จากข้อ 1 โดยการเลี้ยงแบบเฟด-แบดจ์ ในถังหมักขนาด 90 ลิตร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบภาวะการผลิต P(3HB) ที่เหมาะสมและเกณฑ์สำหรับการขยายส่วนการผลิต P(3HB) โดย *Bacillus megaterium* BA-019 ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ขอบเขตของงานวิจัย



บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 พลาสติก (Plastic) (อรสา อ่อนจันทร์, 2549)

“พลาสติก” ตามพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน หมายถึง สารประกอบอินทรีย์ที่สังเคราะห์ขึ้นใช้แทนวัสดุธรรมชาติ บางชนิดเมื่อเย็นก็แข็งตัว เมื่อถูกความร้อนก็อ่อนตัว (Thermoplastic) บางชนิดแข็งตัวถาวร (Thermoset)

พลาสติก คือพอลิเมอร์ (polymer) ชนิดหนึ่ง ซึ่งคำว่า “พอลิเมอร์” มาจากคำกรีกสองคำ คือ poly แปลว่าหลายๆ หรือมาก และ mer แปลว่าหน่วยหรือส่วน หากเป็นโมเลกุลที่มี “เมอร์” เพียง 1 หน่วยก็จะเรียกว่า “มอนอเมอร์” (Monomer) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของพอลิเมอร์ ดังนั้น “พอลิเมอร์” คือสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงโดยมีโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยซ้ำๆ ของเมอร์

พอลิเมอร์แบ่งตามเกณฑ์การเกิดออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. พอลิเมอร์ธรรมชาติ เป็นพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เช่น โปรตีน แป้ง เซลลูโลส และยางธรรมชาติ

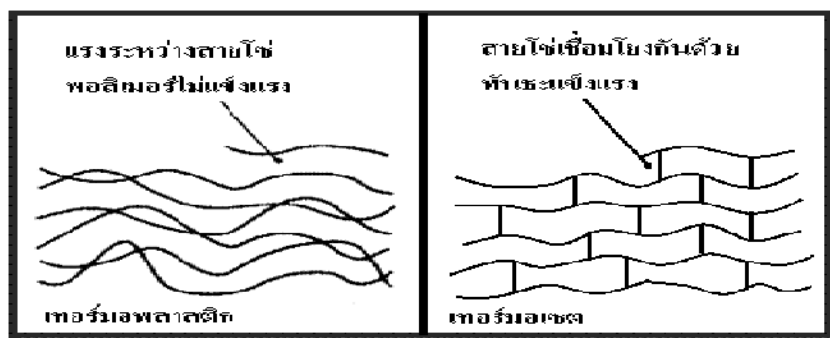
2. พอลิเมอร์สังเคราะห์ เป็นพอลิเมอร์ที่เกิดจากการสังเคราะห์ เพื่อใช้ประโยชน์ต่างๆ เช่น พลาสติก ไนลอน คาร์บอน และลูซิเต้

พลาสติกแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. เทอร์มอพลาสติก (thermoplastics; thermo แปลว่า ความร้อน และ plastic แปลว่า อ่อนนุ่ม) พลาสติกชนิดนี้ เมื่อได้รับความร้อนจะอ่อนตัว และเมื่ออุณหภูมิลดลงจะแข็งตัว ถ้าให้ความร้อนอีกก็จะอ่อนตัว สามารถทำให้กลับเป็นรูปเดิมหรือเปลี่ยนเป็นรูปอื่นได้ โดยสมบัติของพลาสติกเหมือนเดิม พลาสติกประเภทนี้ โครงสร้างโมเลกุล เป็นโซ่ตรงยาว มีการเชื่อมต่อระหว่างโซ่พอลิเมอร์น้อยมาก จึงสามารถหลอมเหลว หรือเมื่อผ่านการอัดแรงมากๆ โดยจะไม่ทำลายโครงสร้างเดิม ตัวอย่างของเทอร์มอพลาสติก คือ พอลิเอทิลีน (polyethylene) พอลิโพรพิลีน (polypropylene) และพอลิสไตรีน (polystyrene) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนสถานะทางกายภาพเท่านั้น เปรียบเหมือนการเปลี่ยนสถานะของน้ำและน้ำแข็ง ซึ่งสามารถเปลี่ยนไป-กลับได้หลายครั้ง

2. พลาสติกเทอร์มอเซต (thermosetting plastics หรือ thermoset; thermo แปลว่า ความร้อน และ set แปลว่า ทำให้แข็ง) พลาสติกชนิดนี้จะคงรูปภายหลังจากการผ่านความร้อน หรือแรงดันเพียงครั้งเดียว เมื่อเย็นลงจะแข็งตัว มีความแข็งแรงมาก ทนความร้อนและความดัน ไม่อ่อนตัวและเปลี่ยนรูปร่างไม่ได้ แต่ถ้าอุณหภูมิสูงพอ ก็จะแตกและไหม้เป็นขี้เถ้า พลาสติกประเภทนี้ โมเลกุลจะเชื่อมโยงกันเป็นร่างแหจับกันแน่น แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลแข็งแรงมาก จึงไม่สามารถนำมาหลอมเหลวได้ ตัวอย่างของเทอร์มอเซต คือ เมลามีน พอลิยูรีเทน อีพอกซี (เป็นการ

เปลี่ยนสภาวะทางเคมี เปรียบเหมือนการอบเค้ก ซึ่งเมื่อให้ความร้อนสารจะเปลี่ยนสภาพทางเคมี และคงรูปอย่างนั้นไม่สามารถเปลี่ยนรูปได้อีก)



รูปที่ 2.1 เปรียบเทียบรูปร่างของเทอร์โมพลาสติก และเทอร์โมเซต

2.1.1 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ หมายถึง พลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยการย่อยที่มีผลมาจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ สาหร่าย เป็นต้น โดยพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพนี้ สามารถจัดเป็นกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ

1. พลาสติกที่ย่อยสลายได้บางส่วน เช่น พอลิเอทิลีน พอลิพรอพิลีน และพอลิสไตรีน เนื่องจากพลาสติกประเภทนี้เป็นพลาสติกสังเคราะห์ที่ใส่สารเติมแต่งทางธรรมชาติบางชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด แป้ง และเซลลูโลส เป็นต้น ทำให้ชิ้นส่วนพลาสติกมีขนาดเล็กลง เมื่ออนุภาคของแป้งถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ พลาสติกจะอ่อนตัวลง มีความพรุนและมีพื้นที่ผิวมากขึ้นซึ่งจะช่วยให้การทำลายร่างแหของพลาสติก (Reddy และคณะ, 2003)

2. พลาสติกที่ถูกสลายตัวโดยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV degradable plastic) เนื่องจากพลาสติกชนิดนี้มีหมู่คาร์บอนิล (C=O) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีความไวสูงต่อแสง UV ทำให้เกิดการแตกตัวในสายโซ่ของพอลิเมอร์ เป็นผลให้โมเลกุลของพลาสติกเล็กลง และแบคทีเรียจะเข้าย่อยสลายได้ที่บริเวณนี้ พลาสติกจึงกรอบและแตกได้ หรืออาจมีการเติมสารที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (photoactivative) เช่น เหล็ก หรือทองแดง เพื่อเร่งการทำลายสายพอลิเมอร์เมื่อได้รับแสง UV (Reddy และคณะ, 2003)

3. พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพอย่างสมบูรณ์ ได้แก่ พลาสติกชนิดเทอร์โมพอลิเอสเทอร์ที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradable thermoplastic) เช่น พอลิแลคติกแอซิด (polylactic, PLA) และ พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates; PHAs) ซึ่งเทอร์โมพอลิเอสเทอร์นี้มีคุณสมบัติของเทอร์โมพลาสติก และสามารถย่อยสลายในธรรมชาติอย่างสมบูรณ์ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) น้ำ (H₂O) และกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) ซึ่งไม่ทำให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม (Lee, 1996; Reddy และคณะ, 2003; Suriyamongkol และคณะ, 2007)

พลาสติกชีวภาพ ซึ่งในปัจจุบันมีการผลิตได้หลายชนิด หากแบ่งตามกลไกการสลายตัวสามารถจำแนกได้ดังนี้ (ปรกรณ์ โอภาประกาศิต และมันทนา โอภาประกาศิต, 2551)

1. Biodegradable คือ พอลิเมอร์ที่สลายตัวได้โดยการใช้เอนไซม์ จากจุลินทรีย์ในการตัดสายโซ่ แล้วได้ผลิตผลเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กที่มีตามธรรมชาติ เช่น น้ำ แอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น

2. Compostable จัดเป็นพอลิเมอร์ชนิด Biodegradable ซึ่งการสลายตัวเกิดขึ้นแบบจำเพาะโดยการหมักที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 °C

3. Hydro-biodegradable พอลิเมอร์ที่สลายตัวได้โดยการสลายพันธะเมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำ (hydrolysis)

4. Photo-biodegradable พอลิเมอร์ที่สลายตัวได้เมื่อได้รับพลังงานจากแสง

5. Bioerodable พอลิเมอร์ที่สลายตัวได้โดยไม่ต้องพึ่งพาจุลินทรีย์ โดยจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางเคมีต่างๆ เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นต้น

พลาสติกชีวภาพ 2 ประเภทหลักในปัจจุบันที่มีการศึกษาวิจัยและนำมาผลิตใช้ประโยชน์คือ (ปรกรณ์ โอภาประกาศิต และมันทนา โอภาประกาศิต, 2551)

1. พอลิเมอร์ประเภทที่มีส่วนผสมของแป้ง (polysaccharide) เกิดจากการผสมพอลิเมอร์บางชนิด เข้ากับสายโซ่พอลิเมอร์ของแป้งที่เกิดจากการเรียงต่อกันของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส เชื่อมกันด้วยพันธะ glucosidic โดยใช้อัตราส่วนผสมได้ตั้งแต่ 10-90% ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ในการใช้งาน ซึ่งหากส่วนผสมของแป้งมากกว่า 60% จะทำให้พลาสติกผสมสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ หากส่วนผสมต่ำกว่า 60% ส่วนผสมที่เป็นแป้งจะทำหน้าที่เป็นจุดที่ทำให้เกิดการแตกตัวของชิ้นส่วนพอลิเมอร์ผสมให้มีขนาดเล็กลง ตัวอย่างพอลิเมอร์ที่นำมาผสมกับแป้งประกอบด้วย พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ พอลิเอสเทอร์ เป็นต้น

2. พอลิเอสเทอร์ (polyesters) เป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้เนื่องจากประกอบด้วยพันธะเอสเทอร์อยู่ในสายโซ่เป็นจำนวนมาก ซึ่งพันธะนี้มีความแข็งแรงน้อย สามารถแตกตัวได้ง่ายโดยทำปฏิกิริยากับน้ำ (hydrolysis) ดังนั้นจึงสามารถย่อยสลายเป็นสาร โมเลกุลเล็กลงได้ ซึ่งพอลิเอสเทอร์ยังสามารถจำแนกตามส่วนประกอบของสายโซ่เป็น 2 ประเภท คือ aliphatic และ aromatic polyester ในปัจจุบันมีการผลิตพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ในกลุ่มนี้หลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพอลิเมอร์ประเภท aliphatic polyester เพราะสายโซ่มีความเหมาะสมต่อการสลายพันธะดีกว่า ในส่วนของ aromatic polyester จะต้องทำการปรับปรุงโครงสร้างให้เหมาะสมขึ้น โดยอาจต่อสายโซ่กับ aliphatic polyester ให้เป็นโคพอลิเมอร์ (aliphatic-aromatic copolyester) ก่อนจึงจะสามารถย่อยสลายได้ ซึ่งในการนี้มีการใช้ polyethylene terephthalate (PET) เป็นส่วนประกอบหลัก

Aliphatic polyester ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 4 ประเภทใหญ่ คือ polybutylene succinate (PBS), polycaprolactone (PCL), polyhydroxyalkanoates (PHA), polylactic acid (PLA) ซึ่ง 2 ชนิด

แรกต้องใช้มอนอเมอร์จากปิโตรเคมี ส่วน PLA ใช้วัตถุดิบทดแทนแต่ยังคงอาศัยปฏิกิริยาเคมีในการสังเคราะห์สายโซ่ของพอลิเมอร์ในขั้นตอนสุดท้าย ในขณะที่ PHA เป็นพอลิเมอร์ประเภทเดียวที่กระบวนการสังเคราะห์ทั้งหมดเกิดขึ้นในจุลินทรีย์




ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบคุณสมบัติของ PHA, PLA และ PBS (Chen, 2010)

Properties	PHA	PLA	PBS
Biosynthesized monomers	Hydroxyalkanoates	D,L-Lactic acids	Succinic acid
Polymerization approach	Biological	Chemical	Chemical
$M_w \times 10^4$	10-1000	5-50	3-20
Polydispersity	1.2-6.0	1.8-2.6	2.0-6.3
T_m (°C)	60-177	175	115.8-146.5
T_g (°C)	-50-4	60	-36.6 to -33
$T_{d(5\%)}$ (°C)	227-256	339	353
Young's modulus (MPa)	Flexible	384-481	268.0
Elongation at break (%)	2-1000	5.2-2.4	175.2
Tensile strength (MPa)	17-104	49.6-61.6	24.8

M_w molecular weight measured by gel permeation chromatography, $T_{d(5\%)}$ temperature at 5% weight loss determined by thermogravimetric analysis, T_g glass transition temperature, T_m melting temperature

ในปัจจุบันมีการนำพอลิเมอร์เหล่านี้มาใช้ทางการค้าซึ่งจะมีสัญลักษณ์บ่งบอกถึงพลาสติกที่ย่อยสลายได้ดังตารางที่ 2.2 โดยมีผลิตภัณฑ์ออกสู่ตลาดบ้างแล้วคือ PLA ที่สามารถนำไปทดแทนพลาสติกประเภทบรรจุภัณฑ์ เช่น ขวด PET ถุงพลาสติก เป็นต้น โดยพอลิเมอร์ชนิดนี้สังเคราะห์ได้จากวัตถุดิบที่เป็นแป้ง เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง เป็นวัตถุดิบ โดยต้องนำแป้งมาผ่านกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ lactic acid monomer จากนั้นจึงนำไปผ่านกระบวนการสังเคราะห์เป็นพอลิเมอร์ แต่ข้อจำกัดของ PLA คือไม่คงรูปเมื่อได้รับความร้อน ส่วนอีกชนิดคือ PHA ที่มีสมบัติทางกลดีกว่า เหมาะกับการขึ้นรูปด้วยความร้อน (thermal forming) โดยพอลิเมอร์ชนิดนี้มีอนุพันธ์หลายชนิดด้วยกัน เช่น P(3HB) ส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์ได้โดยตรงโดยจากสารจำพวกแป้ง และน้ำตาล แล้วได้เป็นสายโซ่ยาวของพอลิเมอร์ โดยการใช้จุลินทรีย์ตลอดกระบวนการ จึงเรียกพอลิเมอร์ประเภทนี้ว่า microbial polymers

ตารางที่ 2.2 สัญลักษณ์ที่บ่งถึงพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพและมาตรฐานรับรองการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Reddy และคณะ, 2003)

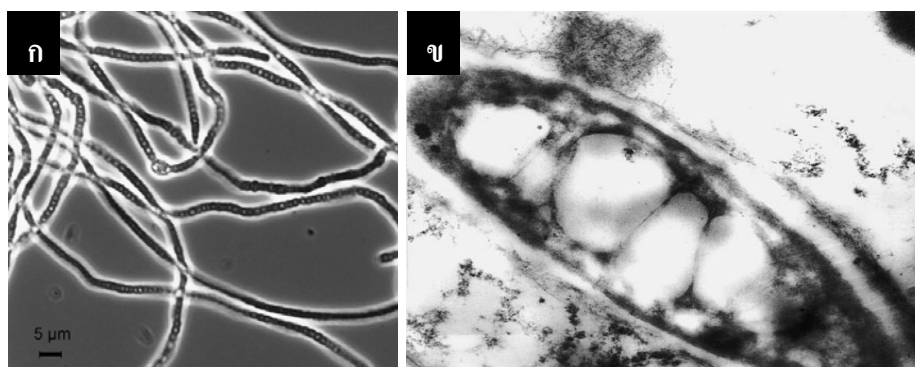
สัญลักษณ์	สถาบันรับรอง/ประเทศ	มาตรฐานรับรอง
OK Compost 	AIB-Vincotte International (AVI) เบลเยียม	ผลิตภัณฑ์ต้องผ่านสมบัติตามมาตรฐาน EN 13432:2000
Compostable 	DIN CERTCO เยอรมนี	ผลิตภัณฑ์ต้องผ่านสมบัติตามมาตรฐาน ASTM 6400 DIN EN 13432
Compostable 	BPI (Biodegradable Product Institute) สหรัฐอเมริกา	ผลิตภัณฑ์ต้องผ่านสมบัติตามมาตรฐาน ASTM 6400 ASTM 6868
GreenPla 	PBS (Biodegradable Plastics Society) ญี่ปุ่น	ผลิตภัณฑ์ต้องผ่านสมบัติตามมาตรฐาน OECD301C JIS K 6950 (ISO 14851) JIS K 6951 (ISO 14852) JIS K 6953 (ISO 14855)

2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (polyhydroxyalkanoate; PHA)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (polyhydroxyalkanoates) หรือที่มีชื่อย่อเรียกว่า PHA เป็นกลุ่มพอลิเมอร์ที่เก็บสะสมพลังงาน และแหล่งคาร์บอนที่ผลิตจากจุลินทรีย์หลายชนิด โดยจะนำมาใช้เพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่อสิ่งแวดล้อม หรือสภาวะที่ขาดความสมดุลคือในสภาพที่มีแหล่งคาร์บอนหรือพลังงานมากเกินไป ในขณะที่มีการจำกัดสารอาหารหรือปัจจัยที่มีความจำเป็นต่อการเจริญอื่นๆ มักจะพบอยู่ในรูปแกรนูล (granule) ภายในเซลล์ไซโตพลาสซึมของเซลล์ (Anderson และ Dawes, 1990; Shrivastav และคณะ, 2010) โดยจำนวนและขนาดของแกรนูลในแต่ละเซลล์จะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ดังแสดงในรูปที่ 2.2

พลาสติกกลุ่มนี้สามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ซึ่งมีเอนไซม์ดีพอลิเมอร์เอส (depolymerase) และเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) และผลผลิตจากการย่อยสลายจะให้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก (Evans และ Sikdar, 1990)

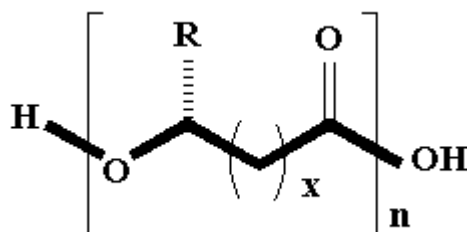
PHA ที่ถูกค้นพบเป็นชนิดแรกได้แก่ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (polyhydroxybutyrate; PHB) ที่ถูกสร้างขึ้นและสะสมใน *Bacillus megaterium* โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสชื่อ Lemoigne (Braunegg, 1998; Zinn, 2001) ซึ่ง PHB ที่ถูกสร้างและสะสมขึ้นนี้ พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ (sporulation) ซึ่งมีการสะสมของก้อนไขมัน (lipid inclusion) ในช่วงที่มีการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) ของแบคทีเรีย สำหรับการตรวจหา PHA ในจุลินทรีย์จะอาศัยเทคนิค fat stain ซึ่งเป็นการย้อมสีสารประเภทไขมันที่สะสมอยู่ในเซลล์แบคทีเรียโดยใช้เทคนิคการย้อมด้วยสีซูดานแบล็ค บี (Sudan black B) หรือไนล์บลู เอ (Nile Blue A) (López-Cortés และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.2 PHA แกรนูลที่สะสมภายในเซลล์ของ filamentous bacteria (ก) (Bengtsson และคณะ, 2008) และ *Bacillus megaterium* (ข) (Gouda และคณะ, 2001)

2.2.1 โครงสร้างของ PHA

PHA มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (aliphatic polyester) ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกันโดยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของมอนอเมอร์ตัวหนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของมอนอเมอร์อีกตัวหนึ่งตรงตำแหน่งปีต้า-คาร์บอน ซึ่งเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) ที่แสดงโครงสร้างเป็น R-configuration และการเชื่อมต่อกันของแต่ละมอนอเมอร์จะเป็นแบบหัวต่อหาง (isotactic) เช่นเดียวกับพอลิพรอพิลีน (Brandl และคณะ, 1990) สำหรับหมู่ alkyl (R) อาจจะเป็นแบบพันธะไม่อิ่มตัว (unsaturated) แบบอะโรมาติก (aromatic) แบบฮาโลเจน (halogenate) หรือแบบแตกกิ่งก้านก็ได้ (branched) (Madison และ Huisman, 1999)



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHA (Brandl และคณะ, 1990)

เมื่อ $x = 1$	เมื่อ R = ไฮโดรเจน (H) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต)	; P(3HP)
	เมื่อ R = เมทิล (CH_3) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	; P(3HB)
	เมื่อ R = เอทิล (C_2H_5) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	; P(3HV)
	เมื่อ R = โพรพิล (C_3H_7) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต)	; P(3HHX)
	เมื่อ R = บิวทิล (C_4H_9) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต)	; P(3HHP)
	เมื่อ R = เพนทิล (C_5H_{11}) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต)	; P(3HO)
	เมื่อ R = เฮกซิล (C_6H_{13}) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีนอนาโนเอต)	; P(3HN)
	เมื่อ R = เฮปทิล (C_7H_{15}) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีเดคาโนเอต)	; P(3HD)
	เมื่อ R = ออกซิล (C_8H_{17}) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีอันเดคาโนเอต)	; P(3HUD)
	เมื่อ R = โนนิล (C_9H_{19}) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีโดเดคาโนเอต)	; P(3HDD)
เมื่อ $x = 2$	เมื่อ R = ไฮโดรเจน(H) สารนี้คือ	พอลิ(4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	; P(4HB)
เมื่อ $x = 3$	เมื่อ R = ไฮโดรเจน(H) สารนี้คือ	พอลิ(5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	; P(5HV)

2.2.2 การจัดจำแนกชนิดของ PHA

การจัดจำแนกชนิดตามองค์ประกอบทางเคมีของมอนอเมอร์ (Luengo และคณะ, 2003)

1. พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีอนุพันธ์ของกรดไขมันแบบอะโรมาติก (aromatic)
 2. พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีอนุพันธ์ของกรดไขมันทั้งแบบอะลิฟาติก (aliphatic) และแบบอะโรมาติก (aromatic)
 3. พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีสารประกอบอื่น เช่น poly- γ -glutamic acid
- การจัดจำแนกชนิดตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในหน่วยมอนอเมอร์ (Keshavarz และ Roy, 2010) สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. short-chain-length (SCL) PHAs คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยมอนอเมอร์ ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 3-5 อะตอม เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) พอลิ(3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) เป็นต้น

2. medium-chain-length (MCL) PHAs คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยมอนอเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 6-14 อะตอม เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต) เป็นต้น

3. long-chain-length (LCL) PHAs คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยมอนอเมอร์ ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมมากกว่า 14 อะตอม

การจัดจำแนกชนิด โดยแบ่งตามชนิดของมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์ แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน ตัวอย่างเช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB)

2. เฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ ดังนี้

- โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) หรือ P(3HB-co-3HV) พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB-co-4HB) เป็นต้น

- เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB-co-3HV-co-4HB) เป็นต้น

2.2.3 ประโยชน์ของ PHA

1. การประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์และเกษตรกรรม (Chen และ Wu, 2005)

เนื่องจาก PHA มีสมบัติในการเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) และสามารถย่อยสลายได้ในสิ่งมีชีวิต โดยสามารถนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น

1.1 วัสดุสิ้นเปลืองในงานด้านศัลยกรรม เช่น ใช้ทำหลอดเลือดเทียม เข็มเย็บแผล ไหมเย็บแผล ผ้าซับเลือด และผ้าสमानแผล เป็นต้น

1.2 วัสดุเพื่อการบำบัดและรักษาโรค ได้แก่ แคปซูลบรรจุยาหรือวัคซีนที่ต้องการให้ตัวยาค่อยๆถูกปล่อยออกมาในปริมาณน้อยๆเป็นเวลานาน หรือใช้ทำเป็นกระดูกเทียมโดยอาศัยสมบัติการเป็น piezoelectric ของ PHA ซึ่งคล้ายกับสมบัติที่มีในกระดูกธรรมชาติ จึงใช้เป็นแผ่นยึดกระดูกซึ่งจะมีผลต่อการสร้างกระดูกขึ้นมาทดแทน

1.3 ด้านทันตกรรม จะนำ PHA มาใช้เป็นวัสดุตัวนำที่ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นใหม่ในโรคด้านปริทันต์ (periodontitis)

1.4 ใช้ PHA เป็นสารตั้งต้นในการผลิต R-(-)-3-hydroxybutyric acids ซึ่งสารนี้เป็นส่วนประกอบสำคัญที่พบในเลือดโดยปกติ มีความเข้มข้นระหว่าง 0.3-1.3 มิลลิโมลาร์ (Zinn และคณะ, 2001) โดยสาร R-(-)-3-hydroxybutyric acids สามารถใช้เป็น chiral building blocks สำหรับสังเคราะห์สารเคมีบริสุทธิ์ เช่น ยาปฏิชีวนะ วิตามิน และฟีโรโมน (pheromone) (Madison และ Huisman, 1999; Luengo และคณะ, 2003)

2. การประยุกต์ใช้ในทางด้านเกษตรกรรมและปศุสัตว์ (Steinbuechel และ Fuchtenbush, 1998)

2.1 ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุยาโรกและวัคซีนต่างๆในสัตว์เลี้ยง เช่น วัคซีนป้องกันโรคระบาด ยาถ่ายพยาธิ และบรรจุยาประเภทที่มีกลไกการออกฤทธิ์นาน และสามารถกำจัดเมื่อเลิกใช้โดยทิ้งลงใต้ทะเลได้เนื่องจากสามารถย่อยสลายอย่างรวดเร็ว

2.2 ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุปุ๋ย ฮอร์โมน growth factors ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช แคปซูลจะค่อยๆสลายทีละน้อย โดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินพร้อมกับสารที่บรรจุข้างในถูกปล่อยออกมาให้สารดังกล่าวคงอยู่ในดินหรือตำแหน่งที่ต้องการใช้งานได้เป็นเวลานาน จึงเป็นการช่วยประหยัดเวลา แรงงาน และลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้ยังใช้เป็นพลาสติกคลุมดินรักษาความชื้นซึ่งเมื่อหมดเวลาการใช้งานจะค่อยๆ ถูกสลายไปโดยธรรมชาติ (Lee, 1996)

2.3 ใช้ทำแหจับปลา สำหรับใช้ในน้ำทะเลได้เป็นเวลานาน และสามารถกำจัดเมื่อเลิกใช้ได้โดยทิ้งลงใต้ทะเล (ค่าความถ่วงจำเพาะ 1.25) เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว (Brandl และคณะ, 1990)

3. การประยุกต์ใช้เป็นวัสดุประเภทบรรจุภัณฑ์ หรือส่วนประกอบของอุปกรณ์บางประเภท

3.1 ใช้ผลิตขวดแชมพูที่ประกอบด้วยส่วนฝาที่ต้องการความแข็งแรงและปิดได้ดี

3.2 ใช้ทำบรรจุภัณฑ์บรรจุอาหารประเภทถุง ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป แผ่นฟิล์มถนอมอาหาร

3.3 ใช้ทำหมวกนิรภัยสำหรับจักรยาน รวมทั้งใช้ทำวัสดุที่ใช้ครั้งเดียวทิ้ง เช่น ผ้าอ้อม ผ้าอนามัย ด้ามมีดโกน เป็นต้น

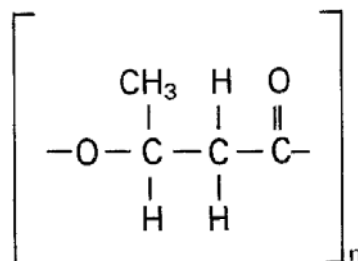
3.4 ใช้ทำวัสดุอื่นๆ เช่น ที่วางลูกกอล์ฟ กาวที่ละลายด้วยความร้อน สารเคลือบผิวแผ่นฟิล์ม บัตรเครดิต วัสดุเส้นใย โดยถ้าผสม P(3HB) ลงในเส้นใยฝ้าย จะช่วยให้สมบัติในการรับความร้อนและคายความร้อนของเส้นใยช้าลงและเพิ่มความแข็งแรงให้กับเส้นใย เป็นต้น (Lee, 1996; Madison และ Huisman, 1999; Luengo และคณะ, 2003)

จากประโยชน์ต่างๆ ของ PHA ที่กล่าวมาแล้ว แสดงให้เห็นว่า PHA สามารถนำมาใช้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีในการใช้งานด้านต่างๆ ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังเป็นวิธีการแก้ปัญหาขยะตกค้างในสิ่งแวดล้อม ถึงแม้ว่า PHA จะมีประโยชน์มากทางด้านสิ่งแวดล้อม แต่ยังไม่เป็นที่นิยมแพร่หลาย เนื่องจากต้นทุนในการผลิตสูงเมื่อเทียบกับพลาสติกที่ได้จากปิโตรเคมี (Byrom, 1987) จึงทำให้พลาสติกชีวภาพมีราคาแพง ถ้าสามารถลดต้นทุนค่าใช้จ่ายในขั้นตอนต่างๆ ลงได้ ก็จะทำให้พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพนี้เป็นที่นิยมของคนทั่วโลก และเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่ง

2.3 พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทีเรต (poly- β -hydroxybutyrate)

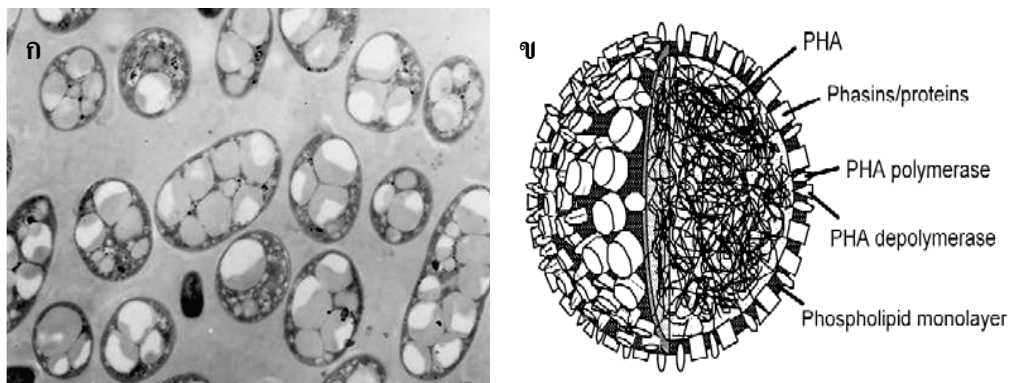
พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทีเรต หรือที่มีชื่อย่อเรียกว่า P(3HB) จัดเป็นพอลิเมอร์ประเภทอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ (aliphatic polyester) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม PHA

P(3HB) จัดเป็น homopolymer ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของ 3-hydroxybutyric acid (หมู่คาร์บอนิล ออกซิเจน และหมู่เมทิล) ต่อกันเป็นสายด้วยพันธะเอสเทอร์ โดยจำนวนมอนอเมอร์ที่ประกอบกันเป็นสาย P(3HB) มีประมาณ 23,000-25,000 ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.4 (Byrom, 1987)



รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ P(3HB) (Byrom, 1987)

P(3HB) มีคุณสมบัติทางกายภาพเช่นเดียวกับเทอร์โมพลาสติก จึงสามารถนำมาทำเป็นฟิล์มห่อของ ไฟเบอร์หรือนำมาหลอมเป็นภาชนะต่าง ๆ ได้ และจากการศึกษาพบว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ไว้ได้ภายในเซลล์มีหลายชนิด (ตารางที่ 2.3) โดย P(3HB) จะถูกสร้างและสะสมอยู่ภายในแกรนูล (granule) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2-0.5 ไมโครเมตร และมีเมมเบรนที่ประกอบด้วยไลปิดและโปรตีนหุ้มอยู่โดยรอบ หนาประมาณ 2 นาโนเมตร ดังรูปที่ 2.5 (Zinn และคณะ, 2001; Jiang และคณะ, 2008)

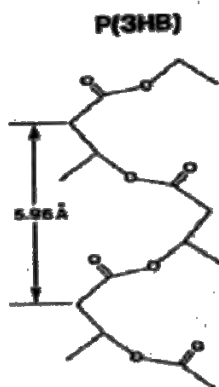


รูปที่ 2.5 ภาพตัดของเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* A2a5 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดง P(3HB) แกรนูลภายในเซลล์ (ก) (Jiang และคณะ, 2008) และส่วนประกอบของ P(3HB) แกรนูล (ข) (Zimm และคณะ, 2001)

2.3.1 โครงสร้างและคุณสมบัติของ P(3HB)

1. โครงสร้างผลึก (crystal structure)

Cornibert และ Marchessault (1972) (อ้างถึงใน Doi, 1990) ได้ศึกษาโครงสร้างผลึกของ P(3HB) โดยใช้เทคนิค X-ray diffraction พบว่าโครงสร้าง (conformation) ของโมเลกุล P(3HB) เป็นแบบอัดตัวแน่นและแบบเกลียวเวียนขวา (right-handed helix) และมีหน่วยซ้ำ (fiber repeat) เท่ากับ 0.596 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 โครงสร้างผลึกของ P(3HB) (Doi, 1990)

ตารางที่ 2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างและสะสม PHA (Brandl และคณะ, 1990)

การจำแนกสายพันธุ์โดย Bergey's Manual	จีโนม	ปริมาณ PHA สูงสุด (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	แหล่งคาร์บอนสำหรับ การผลิต PHA
Group 1	<i>Chloroflexus</i>	<1	yeast extract /glycylglycine
Phototrophic bacteria	<i>Chromatium</i>	20	acetate
	<i>Ectothiorhodospira</i>	ND	NS
	<i>Lamprocystis</i>	ND	NS
	<i>Rhodobacter</i>	80	acetate
	<i>Rhodospirium</i>	47	acetate
	<i>Thiocapsa</i>	ND	NS
	<i>Thiocystis</i>	ND	NS
	<i>Thiodictyon</i>	ND	NS
	<i>Thiopedia</i>	ND	NS
	<i>Thiosphaera</i>	ND	acetone/CO ₂
	Group 2 Gliding bacteria	<i>Beggiatia</i>	57
<i>Leptothrix</i>		67	pyruvate
<i>Sphacrotilus</i>		45	glucose/peptone
Group 3 Sheathed bacteria	<i>Caulbacter</i>	36	glucose/glutamate
	<i>Azospirillum</i>	75	malate
	<i>Oceanospirillum</i>	ND	NS
	<i>Spirillum</i>	40	lactate
Group 4 Budding and/or curved bacteria	<i>Alcaligenes</i>	96	fructose
	<i>Azotobacter</i>	73	glucose
	<i>Beijerinckia</i>	38	glucose
	<i>Derxia</i>	26	glucose
	<i>Methylobacterium</i>	47	methanol
	<i>Methylosinus</i>	25	methanol
	<i>Pseudomonas</i>	67	methanol
	<i>Rhizobium</i>	57	methanol
	<i>Xanthobacter</i>	ND	NS
	<i>Zoogloea</i>	ND	yeast extract/casamino

การจำแนกสายพันธุ์โดย Bergey's Manual	จีโนส	ปริมาณ PHA สูงสุด (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	แหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต PHA
Group 8 Gram-negative facultative anaerobic rods	<i>Chromobacterium</i>	37	glucose/peptone
	<i>Escherichia</i>	ND	tryptone/yeast extract
	<i>Haemophilus</i>	ND	yeastextract/glucose
	<i>Photobacterium</i>	ND	brain heart infusion
	<i>Vibrio</i>	ND	NS
Group 9 Gram-negative anaerobic bacteria	<i>Syntrophomonas</i>	30	gluconate
Group 10 Gram- negative cocci and cocibacilli	<i>Acinetobacter</i>	<1	glucose
	<i>Lampromedia</i>	ND	NS
	<i>Moraxella</i>	ND	NS
	<i>Paracoccus</i>	ND	NS
Group 12 Gram- negative chemolithotrophic	<i>Nitrobacter</i>	ND	NS
	<i>Nitrococcus</i>	ND	NS
	<i>Thiobacillus</i>	ND	Glucose
Group 13 Archaeobacteria	<i>Halobacterium</i>	38	glucose
Group 14 Gram-possitive cocci	<i>Micrococcus</i>	28	peptone/tryptone
Group 15 Endospore- forming rods and cocci	<i>Bacillus</i>	25	glucose
	<i>Clostridium</i>	13	trptone/peptone/glucose
Group 17 Actinomycetes Cyanobacteria	<i>Mycoplana</i>	ND	methanol
	<i>Nocardia</i>	14	butane
	<i>Streptomyces</i>	4	glucose
	<i>Aphanothece</i>	<1	NS
	<i>Chlorogloea</i>	10	acetate, CO ₂
	<i>Gamphosphaeria</i>	ND	ND
	<i>Microcoleus</i>	<1	ND
	<i>Microcystis</i>	ND	ND
<i>Spirulina</i>	6	CO ₂	

หมายเหตุ ND = ปริมาณ PHA สูงสุดไม่ได้ทำการวิเคราะห์ NS = แหล่งคาร์บอนไม่จำเพาะ

2. สมบัติทางกายภาพและความร้อน (physical และ thermal property)

P(3HB) เป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรเอซีเตต เป็นต้น แต่ P(3HB) ไม่สามารถละลายได้ในสารละลายมีขี้ว ตัวอย่างเช่น น้ำ เมทานอล เอทานอล (ตารางที่ 2.4)

สำหรับความหนาแน่นของ P(3HB) จะอยู่ในช่วงระหว่าง 1.171-1.260 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร โดย P(3HB) ที่มีความหนาแน่นต่ำจะมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน แต่ถ้าหากมีความหนาแน่นสูงจะสามารถตกผลึกได้ ส่วนจุดหลอมเหลวจะแปรผันระหว่าง 157-188 องศาเซลเซียส โดยเมื่อผลึกเย็นลงอย่างช้าๆ หลังจากการหลอมเหลวจะได้เป็นสเฟียรูไลต์ (spherulites) ขนาดใหญ่ ทำให้ P(3HB) มีสถานะเป็นของแข็งคล้ายแก้ว (glass state) ที่อุณหภูมิกลาสทรานสิชัน (glass transition) ประมาณ 4 องศาเซลเซียส และหากตกตะกอน P(3HB) ด้วยสารละลายเจือจางจะได้ผลึกเป็นชั้นบางๆ ซึ่งความหนาแน่นของชั้นผลึกจะขึ้นกับอุณหภูมิในการเกิดผลึก (crystallization temperature) และน้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าค่า Young 's modulus และค่าความทนแรงดึง (tensile strength) ของ P(3HB) จะมีความใกล้เคียงกับพอลิพรอพิลีน ซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี (ตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.4 สมบัติการละลายของ P(3HB) (Lafferty และคณะ, 1988)

ละลายได้ดีมาก	ละลายได้ดี	ละลายไม่ได้
คลอโรฟอร์ม	ไดโอเซน	น้ำ
ไดคลอโรฟอร์ม	ออกทานอล	เมทานอล
ไดคลอโรอะซีเตต	โทลูอีน	เอทานอล
ทรีโอลีน	ฟิรีดีน	1-โพรพานอล
เอทิลีนคาร์บอเนต		2-โพรพานอล
โพรพิลีนคาร์บอเนต		กรดเกลือแร่เจือจาง
ทรีฟลูโอโรเอทานอล		อัลคาไลน์ไฮเปอร์คลอไรด์
แอซิดิกแอนไฮไดรด์		ไดเอทิลอีเทอร์
โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล		เอทิลีนอะซีเตต
ไดเมทิลฟอร์มามิน		เอทิลเมทิลคีโตน
เอทิลอะซีโตอะซีเตต		เททราไฮโดรฟูราน
ได-, ไตร-, เทตรา-, คลอโรอีเทน		เอทิลโพรพีลีน
กรดอะซิดิก		บิวทิลอะซีเตต
แอลกอฮอล์(คาร์บอนมากกว่า 3 อะตอม)		เฮกเซน

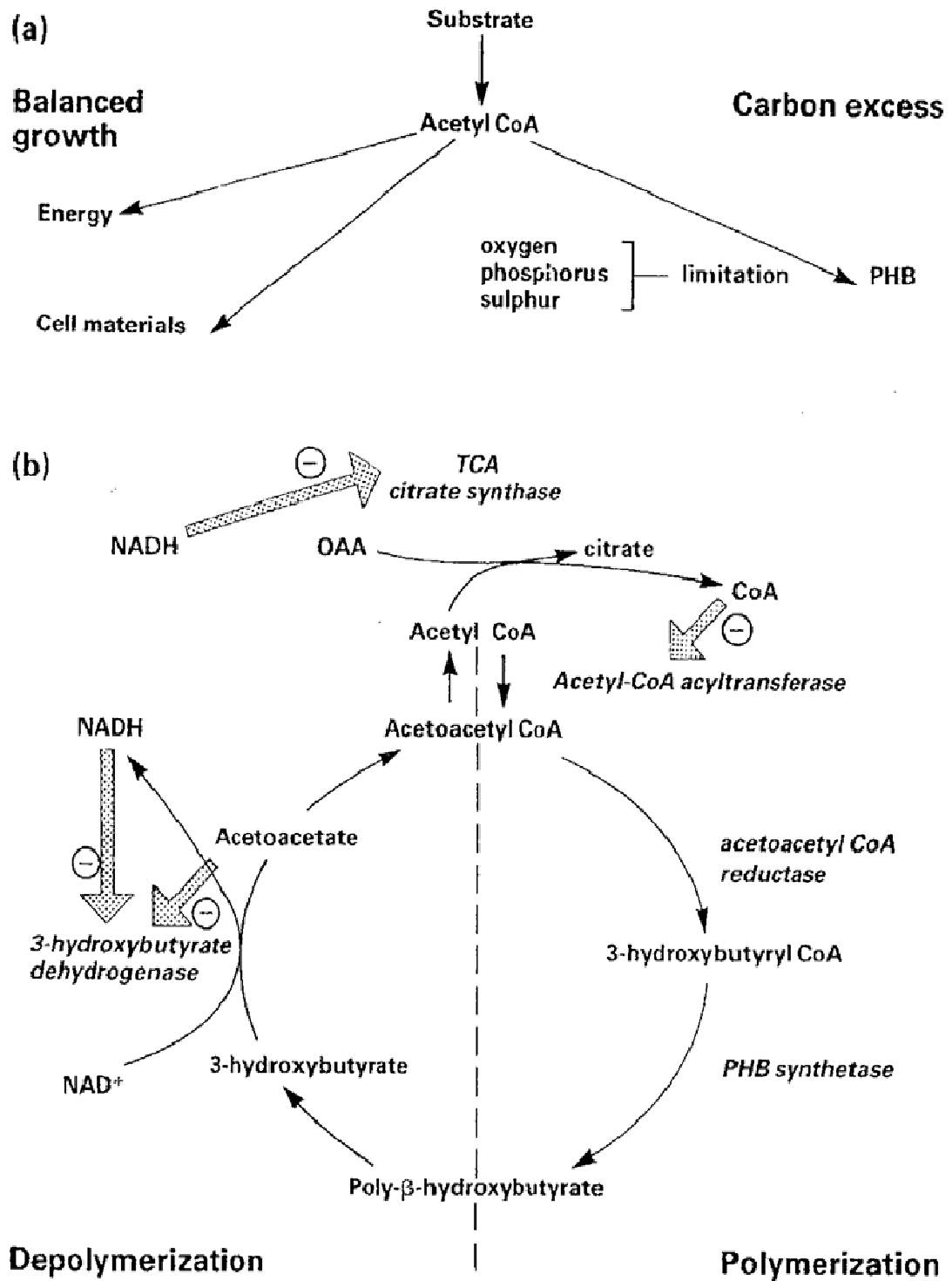
ตารางที่ 2.5 สมบัติทางกายภาพและความร้อนของ P(3HB) เทียบกับพอลิพรอพิลีน (Doi, 1990)

คุณสมบัติ	PP	P(3HB)
จุดหลอมเหลว ($^{\circ}\text{C}$)	171 – 186	171 – 182
ความสามารถเป็นผลึก (%) (crystallinity)	65 – 70	65 – 80
ความหนาแน่น (g/cm^3)	0.94 – 0.95	1.23 – 1.25
น้ำหนักโมเลกุล ($\times 10^5$)	2.2 – 7	1 – 8
การกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution)	5 – 12	2.2 – 3
ความแข็ง (GPa) (flexural modulus)	1.7	3.5 – 4
ความสามารถในการต้านแรงดึง (MPa) (tensile strength)	39	40
ความสามารถในการขยายตัว (%) (extension to break)	400	6-8
ความทนทานต่อแสงอุลตราไวโอเลต (UV resistance)	ไม่ดี	ดี
ความทนทานต่อตัวทำละลาย (solvent resistance)	ดี	ไม่ดี
ความสามารถให้ออกซิเจนผ่าน ($\text{cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ atm}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (oxygen permeability)	1700	45

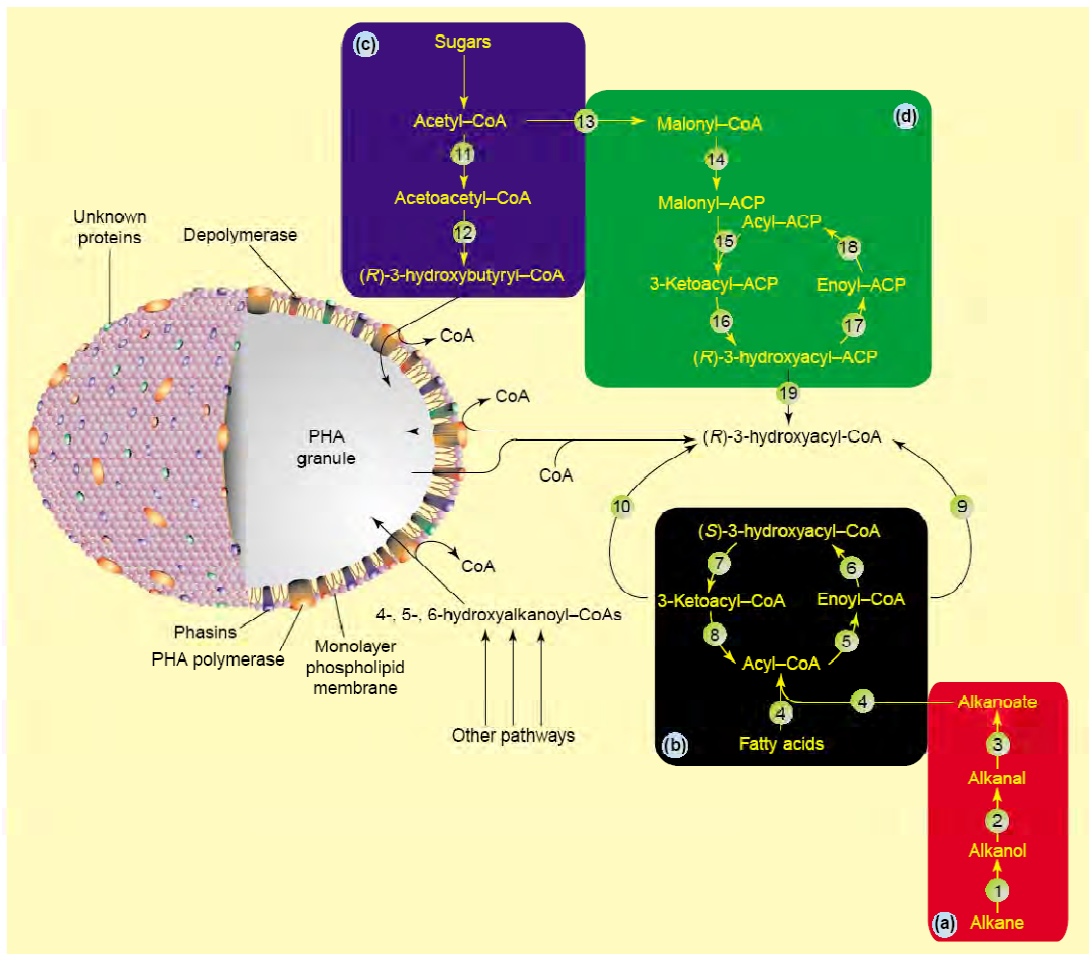
2.3.2 วิธีเมแทบอลิซึมเพื่อผลิต P(3HB)

การสังเคราะห์ P(3HB) และการควบคุมการสังเคราะห์ P(3HB) เกิดขึ้นโดยผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งสารตั้งต้นของวิธีการสังเคราะห์ P(3HB) คือ อะเซทิลโคเอ (acetyl-CoA) โดยปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์ 3 ตัว ได้แก่ เอนไซม์แอซีทิลโคเอแอซีทิลทรานเฟอร์เรส (acetyl-CoA acetyltransferase) หรือเอนไซม์ 3-คีโตไทโอเลส (3-ketothiolase) โดยเอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวกันของอะเซทิลโคเอ 2 โมเลกุล ให้เป็นอะเซโตอะเซทิลโคเอ (acetoacetyl-CoA) จากนั้นสารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์เป็น ดี(-)-3-ไฮดรอกซีบิวทิลโคเอ (D(-)-3-hydroxybutyryl CoA) โดยการเร่งของเอนไซม์ เอนไซม์แอซีโทแอซีทิลโคเอรีดักเทส (acetoacetyl-CoA reductase) และเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ไปเป็น P(3HB) โดยเอนไซม์ PHB ซินเทส (PHB synthase) วิธีการสังเคราะห์ PHB จากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ แสดงในรูปที่ 2.7 และรูปที่ 2.8 (Byrom, 1987; Luengo และคณะ, 2003)

โดยทั่วไปแล้วพบว่า การสังเคราะห์และการสะสม P(3HB) ของจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นสูงหลังจากการเติบโตของจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงตัว (stationary phase) และจุลินทรีย์จะต้องอยู่ภายใต้สภาวะการเติบโตที่มีสารอาหารไม่สมดุล โดยจากรูป Acetyl-CoA ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแหล่งคาร์บอนจะถูกเมแทบอลิท์เป็นสารอื่นในวัฏจักรกรดคาร์บอกซิลิก (TCA cycle) และสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ P(3HB) เซลล์จะเข้าสู่วัฏจักร TCA โดยเปลี่ยน acetyl-CoA ให้ได้เป็นพลังงานออกมาเพื่อใช้ในการเจริญรวมทั้งได้ CoA อิสระ เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะที่มีอาหารสมดุล แต่ถ้าปริมาณ CoA อิสระมีมากจะมีผลไปยับยั้งการทำงานของ acetyl-CoA acetyltransferase หรือ 3-ketothiolase ซึ่งเป็นเอนไซม์เริ่มต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ P(3HB) แต่เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล คือ มีปริมาณสารอาหารบางชนิดจำกัดหรือขาดสารอาหารชนิดนั้น เช่น ออกซิเจน ฟอสฟอรัส ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ หรือ trace elements (เช่น แมกนีเซียม แคลเซียม เหล็ก) แต่มีแหล่งอาหารคาร์บอนมากเกินไป จะมีผลทำให้เกิดการสังเคราะห์ P(3HB) ขึ้นและสืบเนื่องจากภาวะนี้จะทำให้กิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ NADH oxidase ลดลง ทำให้ปริมาณ NADH เพิ่มขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NADH ไปเป็น NAD^+ ที่ต้องอาศัยเอนไซม์ NADH oxidase ลดลง ปริมาณ NADH ที่เพิ่มขึ้นนี้จะมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ citrate synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน acetyl-CoA ไปเป็น citrate ในวัฏจักร TCA โดยเมื่อเอนไซม์นี้ถูกยับยั้ง ทำให้ปริมาณของ acetyl-CoA เพิ่มขึ้นถึงระดับที่ทำให้ผลการยับยั้งของ CoA อิสระต่อเอนไซม์ acetyl-CoA acetyltransferase หรือ 3-ketothiolase หดหายไป การสังเคราะห์ P(3HB) จึงเกิดขึ้นได้ (Senior และคณะ, 1972 อ้างถึงในสงศรี กุลปรีชา, 2536)



รูปที่ 2.7 สภาวะการเติบโตของเซลล์ที่มีสารอาหารสมดุลและไม่สมดุล (a) และวิถีการสังเคราะห์ P(3HB) (b) (Byrom, 1987)



Current Opinion in Microbiology

รูปที่ 2.8 วิธีการสังเคราะห์ P(3HB) โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (Luengo และคณะ, 2003)

2.3.3 หน้าที่ของ P(3HB) ในจุลินทรีย์

1. เป็นแหล่งพลังงานหรือแหล่งคาร์บอน (Dawes และ Senior, 1973; Doi, 1990; Brauneegg และคณะ, 1998)

จุลินทรีย์จะใช้ P(3HB) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในภาวะขาดแคลนสารอาหารเพื่อความอยู่รอด Macrae และ Wikenson (1958) กล่าวว่า *B. megaterium* ที่มีปริมาณ P(3HB) สูงจะช่วยชะลอการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) และการตายเนื่องจากการขาดไนโตรเจน ต่อมา Sierra และ Gibbons (1962) ศึกษาบทบาทของ P(3HB) ต่อการหายใจและการอยู่รอดของ *Micrococcus halodenitrificans* ซึ่งผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการอยู่รอดมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณ P(3HB) นอกจากนี้ Stokes และ Parson (1968) ยังได้พบว่า *Sphaerotilus discophorus* ที่มีปริมาณ P(3HB) สะสมอยู่มากจะอยู่รอดได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่มี P(3HB) หรือมี

ปริมาณน้อย เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Tal และ Oken (1985) ที่พบว่าเซลล์ *Azospirillum brasilense* ที่มีปริมาณ P(3HB) สูง จะมีความสามารถในการอยู่รอดได้ดีกว่าเซลล์ที่มี P(3HB) ต่ำ

2. การสร้างสปอร์ (sporulation) และการสร้างซีสต์ (encystment) (Dawes และ Senior, 1973)

P(3HB) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์และการสร้างซีสต์ Juni และ Heym (1956) พบว่า *B. cereus* สายพันธุ์ T นำ P(3HB) ไปใช้ในการสร้างสปอร์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่าพีเอชสูง ต่อมา Kominok และ Halvorson (1965) รายงานว่า *B. cereus* สร้างและสะสม P(3HB) โดยใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณ P(3HB) สูงสุดจะอยู่ในช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (exponential phase) หลังจากนั้น ปริมาณ P(3HB) จะลดลงเนื่องจากการสร้างสปอร์ และยังสามารถเก็บเกี่ยวของ P(3HB) และอะซิโตนิน (acetoin) ในเชื้อชนิดเดียวกันนี้พบว่าการสังเคราะห์ P(3HB) จะเริ่มต้นขึ้นหลังจากเชื้อหยุดเจริญเติบโตและสามารถสะสม P(3HB) ได้สูงสุดก่อนเกิดการสร้างสปอร์ เพราะในระหว่างกระบวนการสร้างสปอร์ P(3HB) จะถูกย่อยสลาย นอกจากนี้ Stevenson และ Socolofsky (1996) ได้พบว่าการสะสม P(3HB) โดย *Azotobacter vinelandii* จะเกิดขึ้นในระยะการเจริญเติบโตที่ไม่สมดุล โดยเซลล์จะใช้แหล่งคาร์บอนภายนอกเพื่อใช้ในการสร้างซีสต์ได้เร็วกว่าการตรึงไนโตรเจน

3. เป็นแหล่งอิเล็กตรอน (electron sink)

Jackson และ Dawes (1976) รายงานว่า *Azotobacter beijerinckii* จะมี activity ของ NADH oxidase ต่ำลงเมื่อมีการจำกัดปริมาณออกซิเจน แต่อัตราส่วน NADH/NAD ภายในเซลล์จะเพิ่มขึ้นทันทีเมื่อออกซิเจนหมดไป แสดงให้เห็นว่าในภาวะที่การจำกัดปริมาณออกซิเจนและมีอิเล็กตรอนมากเกินไป เซลล์จะเกิดการทำลายอิเล็กตรอนที่มากเกินไปโดยนำไปใช้ในปฏิกิริยารีดักชันแทนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ดังนั้นกรณีที่ออกซิเจนจำกัดจึงทำให้เกิดการสร้าง P(3HB) ขึ้น

2.3.4 ปัจจัยที่มีผลต่อต้นทุนการผลิต P(3HB)

1. อัตราการผลิต P(3HB)

อัตราการผลิต P(3HB) คือ ปริมาณ P(3HB) ต่อหนึ่งหน่วยหน่วยปริมาตรต่อหนึ่งหน่วยเวลา สำหรับการผลิต P(3HB) ในปริมาณที่เท่ากันในอัตราการผลิตต่อปี พบว่าในกระบวนการผลิตที่อัตราการผลิต P(3HB) ต่ำจะต้องใช้ขนาดถังหมักที่ใหญ่ขึ้น ยกตัวอย่างเช่นถ้าต้องการผลิต P(3HB) ในปริมาณ 10 ตัน ภายใน 250 ชั่วโมง สำหรับระบบที่สามารถผลิต P(3HB) ได้ 100 กรัม ในเวลา 50 ชั่วโมง (อัตราการผลิต P(3HB) เท่ากับ 2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) จะต้องการถังหมักขนาด 20 ลูกบาศก์เมตร แต่ถ้าระบบผลิต P(3HB) ได้ 50 กรัม ในเวลา 50 ชั่วโมง (อัตราการผลิต P(3HB) 1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ถังหมักที่ใช้จะต้องมีขนาด 40 ลูกบาศก์เมตร (Choi และ Lee, 1999)

เมื่อเปรียบเทียบกระบวนการผลิต P(3HB) จาก recombinant *E. coli* โดย 2 กระบวนการที่มีอัตราการผลิต P(3HB) แตกต่างกัน พบว่าเมื่ออัตราการผลิต P(3HB) เพิ่มขึ้นจาก 1.98 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงเป็น 3.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ต้นทุนการผลิต PHB ลดลงจาก 5.37 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัมเหลือ 4.91 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม

2. ปริมาณ P(3HB) ภายในเซลล์

ปริมาณ P(3HB) ส่งผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการ recovery เช่นเดียวกับผลได้ P(3HB) (P(3HB) yield) โดยส่งผลต่อ recovery yield และความบริสุทธิ์ของ P(3HB) ปริมาณการใช้สารที่ใช้สำหรับย่อยเซลล์ (digesting agent) เพื่อแยกแგრนูล P(3HB) จากเซลล์ที่มีปริมาณ P(3HB) สูงจะน้อยกว่าเซลล์ที่มีปริมาณ P(3HB) ต่ำ Mudliar และคณะ (2007) รายงานว่าเมื่อปริมาณ P(3HB) ภายในเซลล์มีค่ามากขึ้นพบว่าราคาการผลิต P(3HB) (ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม) มีค่าลดลง โดยถ้าเซลล์สามารถสะสม P(3HB) ได้ 44% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ราคาการผลิตจะเท่ากับ 11.806 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม แต่ถ้าเซลล์สามารถสะสม P(3HB) ได้ 70% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ราคาการผลิตจะลดลงเหลือ 7.42 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม เมื่อพิจารณาที่กำลังการผลิต 100 ลูกบาศก์เมตรต่อวัน

3. ราคาแหล่งคาร์บอนและการผลิต P(3HB)

P(3HB) ซึ่งผลิตได้โดย Biomer[®] บริษัท Biomer มีราคาประมาณ 20 ยูโร/กิโลกรัม และ PHBV ซึ่งผลิตได้โดย Biopol[®] จากบริษัท Metabolix มีราคาประมาณ 10-12 ยูโร/กิโลกรัม ซึ่งแพงกว่าพอลิเมอร์ที่มีแปงเป็นองค์ประกอบพื้นฐาน หรือพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดอื่นอยู่มากเนื่องจากวัตถุดิบมีราคาแพง เป็นผลให้ราคาต้นทุนการผลิตสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำให้บริสุทธิ์ (product recovery) และกำลังการผลิตที่น้อย ปัจจุบันค่าใช้จ่ายจากวัตถุดิบคิดเป็นร้อยละ 40-50 ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด การใช้แหล่งคาร์บอนที่ต้นทุนต่ำช่วยทำให้ราคาของ P(3HB) ต่ำลง

บริษัท Imperial Chemical Industries (ICI) ของอังกฤษ ผลิต P(3HB) จากแบคทีเรียที่ชื่อว่า *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียนี้ในถังหมักที่มีกลูโคสและสารอาหารอื่นๆ อีกทั้งถ้าเติมกรดอินทรีย์บางชนิดลงไปในช่วงตอนการผลิต นักวิทยาศาสตร์สามารถปรับเปลี่ยนคุณสมบัติของ P(3HB) ให้เหมาะสมกับการใช้งานต่างๆ ได้ แต่พบว่าการใช้ประโยชน์จากพลาสติกชีวภาพยังไม่เป็นที่นิยมอย่างกว้างขวาง เนื่องจากต้นทุนการผลิต P(3HB) ยังสูงอยู่มาก จึงทำให้พลาสติกชีวภาพแข่งขันตลาดกับพลาสติกสังเคราะห์ไม่ได้ หลายปีก่อนการผลิต P(3HB) ออกมาจำหน่ายในทางการค้า โดยมีราคา กิโลกรัมละ 4-8 เหรียญสหรัฐ ส่วนพลาสติกสังเคราะห์มีราคาเพียง กิโลกรัมละ 0.6-0.9 เหรียญสหรัฐ (Schubert และคณะ, 1991) จึงควรมีงานทดลองเพื่อขยายส่วนการผลิต P(3HB) และหาวัตถุดิบที่ราคาถูกลงใช้ในกระบวนการผลิต

โรงงานต้นแบบพลาสติกชีวภาพในบราซิลนั้นเป็นพลาสติกประเภท PHA ที่มีอยู่เป็นวัตถุดิบ โดย ศ. เจอรัลด์ เบอเนกค์ (Prof. Gerhart Braunnegg) จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีกราซ (Graz University of Technology) ประเทศออสเตรีย ร่วมพัฒนาการผลิตพลาสติกชีวภาพให้ได้

สัดส่วนของพลาสติกต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้เลี้ยงเชื้อให้สูงขึ้น รวมทั้งได้พัฒนาเทคนิคการแยกพลาสติกออกจากผนังเซลล์แบคทีเรียให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วย อีกทั้งที่ออสเตรเลียยังทดลองเปลี่ยนของเสียจากโรงงานชีสที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบให้เป็นพลาสติกชีวภาพได้ ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการกำจัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ในขณะที่ประเทศไทยเองปัจจุบันมีการพัฒนาเทคโนโลยีเองแต่ยังอยู่ในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น (ผู้จัดการออนไลน์, 2550)

ราคาของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อต้นทุนการผลิต P(3HB) อย่างมากในบรรดาสารอาหารทั้งหมดที่ใช้ในกระบวนการผลิต P(3HB) (Yamanè, 1993) แหล่งคาร์บอนส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิตมากที่สุด โดยแหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้มีมากมายหลายชนิดขึ้นอยู่กับความสามารถของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต น้ำมัน แอลกอฮอล์ ไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น นอกจากนี้ประสิทธิภาพของการเปลี่ยนซับสเตรทไปเป็น P(3HB) ก็มีความสำคัญต่อต้นทุนการผลิตเช่นเดียวกัน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสร้างเซลล์ สำหรับแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่

- ผลผลิตจากการเกษตรที่ให้แป้ง เช่น ข้าวเจ้า มันสำปะหลัง และข้าวโพด เมื่อผ่านกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพแล้วจะเปลี่ยนแป้งเป็นพอลิเมอร์ประเภทต่างๆ

- กากน้ำตาล (molasses) โดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 2 ชนิดตามแหล่งที่มา คือ กากน้ำตาลอ้อย (sugar cane molasses) และกากน้ำตาลบีต (beet molasses) ซึ่งการจะเลือกใช้กากน้ำตาลชนิดใดเป็นวัตถุดิบนั้น ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศของแต่ละประเทศ สำหรับประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศร้อนชื้น ส่วนใหญ่จึงมีการปลูกอ้อยและมีโรงงานผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยเป็นจำนวนมาก กากน้ำตาลอ้อยที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจึงมีปริมาณมาก หาง่าย และราคาถูก สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิต P(3HB) ได้ (Solaiman และคณะ, 2006)

กากน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายมีลักษณะเป็นของเหลวข้นเหนียวสีน้ำตาลปนดำเป็นของเหลวที่เหลือจากการแยกเอาผลึกน้ำตาลออก โดยทั่วไปแบ่งตามกรรมวิธีการผลิตน้ำตาลจะสามารถแบ่งกากน้ำตาลได้เป็น 3 ชนิด คือ

- blackstrap molasses หรือ final molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว มีปริมาณน้ำตาลประมาณ 50-60 % ซึ่งในอุตสาหกรรมการหมักจะใช้น้ำตาลชนิดนี้เป็นวัตถุดิบ

- refinery molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (refine sugar) มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบประมาณ 48%

- highest molasses หรือ invert molasses จะผลิตโดยนำน้ำอ้อยมาแปรรูปเป็นน้ำตาลโดยเอนไซม์อินเวอร์เทส ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส แล้วระเหยให้ข้นเป็นน้ำเชื่อม คังนั้น

highest molasses จึงไม่ใช่กากน้ำตาลที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาล เป็นการผลิตกากน้ำตาลโดยตรง (สันทนต์ ซีร็อนันต์ไพบูลย์, 2550) ซึ่งมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบประมาณ 77%

กากน้ำตาลมีองค์ประกอบซับซ้อนเนื่องจากประกอบด้วยส่วนที่เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส ราฟฟิโนส และเกลือแร่ต่างๆ ส่วนที่เหลือจะประกอบด้วยสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ใช่ น้ำตาลซึ่งละลายได้ในด่าง (alkali soluble nonsugar ingredient) สารประกอบอินทรีย์และน้ำ กากน้ำตาลต่างชนิดก็จะมีส่วนประกอบที่แตกต่างกันตามลักษณะพันธุ์อ้อย ฤดูกาล สภาพดิน การเก็บรักษาและกรรมวิธีการผลิตของโรงงาน รวมทั้งสารที่เติมในกระบวนการผลิตน้ำตาลก็มีผลทำให้องค์ประกอบของกากน้ำตาลมีความแตกต่างกัน

องค์ประกอบของกากน้ำตาลแสดงในตารางที่ 2.6 โดยค่าที่ได้เป็นค่าที่พบในกากน้ำตาลของหลายประเทศที่มีการผลิตน้ำตาล องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาลที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล คือคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส กากน้ำตาลบีทจะมีน้ำตาลซูโครสและฟรุกโตสในปริมาณน้อย แต่จะมีน้ำตาลราฟฟิโนสเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งต่างจากกากน้ำตาลอ้อย กากน้ำตาลอ้อยและน้ำคั้นบีทมีส่วนที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ในปริมาณสูง วิตามินและสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญ (growth factors) ในปริมาณที่ต่างกัน รวมทั้งสารประกอบไนโตรเจนและสารประกอบอินทรีย์อื่นๆอีกหลายชนิด เช่น chlorogenic, caffeic acids, uronic acids, sugar, alcohol, organic acids, amino acids, nucleotides, sterols, tannins, plant pigments, gums, waxes และ lipids โดยเฉพาะกากน้ำตาลบีทจะมีสารประกอบพวก non amino acids nitrogen-containing substances อยู่ในปริมาณที่สูง เช่น betaine และ polyamine ชนิดต่างๆ (ปริญญาศักดิ์ วงศ์ปราชญ์, 2547)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเลือกใช้แหล่งคาร์บอน

- ผลผลิตที่ต้องการ การเลือกใช้ชนิดของแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก อาจพิจารณาจากผลผลิตหลักที่ต้องการ โดยเฉพาะในกรณีที่ผลผลิตนั้นเกิดจากการสลายตัวของแหล่งคาร์บอนโดยตรง

- ราคา กระบวนการหมักโดยส่วนใหญ่ต้นทุนการผลิตหลักคือค่าวัตถุดิบที่ใช้เป็นสับสเตรต ดังนั้นราคาของผลผลิตที่ได้จึงขึ้นกับราคาของแหล่งคาร์บอน จึงควรเลือกใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก

- กฎหมาย เช่น ประเทศในกลุ่มตลาดร่วมยุโรป จะมีการส่งเสริมการใช้น้ำตาลหรือกากน้ำตาลจากหัวบีท โดยมีการควบคุมราคาต่ำสุดของน้ำตาลบีทและควบคุมปริมาณการนำเข้าน้ำตาลหรือกากน้ำตาลอ้อยอย่างเข้มงวด รวมทั้งมีการควบคุมราคาไม่ให้แข่งขันกับน้ำตาลบีทได้

- วิธีการสเตอริไลซ์อาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการสเตอริไลซ์อาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความร้อนภายใต้ความดันสูงจะมีผลต่อแหล่งคาร์บอน เช่น ถ้าใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ควรสเตอริไลซ์น้ำตาลแยกจากส่วนประกอบอื่นๆ เพราะที่พีเอชเป็นกลางและอุณหภูมิสูงน้ำตาลจะทำปฏิกิริยา

กับกรดอะมิโนได้เป็นสารประกอบไนโตรเจน ทำให้อาหารมีสีน้ำตาลเข้มและอาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้บางส่วนหรือหากใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนมักจะมีปัญหาเมื่อใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อเนื่องจากแป้งจะเกิดเป็นเจลทำให้มีความหนืดสูง

ตารางที่ 2.6 ส่วนประกอบส่วนใหญ่ของกากน้ำตาลในประเทศไทย

ส่วนประกอบ	ร้อยละ
น้ำ (water)	17-25
น้ำตาลซูโครส (sucrose)	30-40
น้ำตาลอินเวิร์ท (invert sugar)	10-25
เถ้า (ash)	7-15
สารอินทรีย์ซึ่งมีในน้ำตาล	10-20
นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุต่างๆอีก คือ	
ไนโตรเจน	0.86
ฟอสฟอรัส	0.18
โพแทสเซียม	3.00
แคลเซียม	0.50
เหล็ก	0.045
ทองแดง	0.45
โซเดียม	0.38

4. ปัจจัยอื่นๆ

4.1 แหล่งไนโตรเจน

นอกจากแหล่งคาร์บอนแล้วแหล่งไนโตรเจนก็มีผลต่อราคาการผลิต P(3HB) เช่นกัน โดยแหล่งไนโตรเจนที่นิยมนำมาใช้ในการผลิต P(3HB) ได้แก่ NH_4Cl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ NH_4NO_3 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ โมโนโซเดียมกลูตาเมต และยูเรีย (Groom และคณะ, 1998; Quillaguamán และคณะ, 2008) โดยในบรรดาแหล่งไนโตรเจนที่กล่าวมา พบว่ายูเรียมีราคาถูกที่สุด Loo และ Sudesh (2007) รายงานว่านอกจากยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิต P(3HB) เนื่องจากมีราคาถูกและยังส่งเสริมการสร้าง P(3HB) ดังนั้นถ้าสามารถหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต P(3HB) โดยใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ จะทำให้ราคาการผลิตลดลงได้

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่

- แอมโมเนีย อาจใช้ในรูปแก๊สหรือสารละลายแอมโมเนียความเข้มข้นร้อยละ 25 การใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนจะต้องระวังในการเก็บรักษา เนื่องจากแอมโมเนียระเหยง่าย จึงต้องเก็บในภาชนะบรรจุที่ป้องกันการระเหยและทนต่อการกัดกร่อนได้

- ไนเตรตและเกลือแอมโมเนียม โดยเกลือแอมโมเนียมที่มีราคาถูกที่สุด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรียก็ได้ โดยทั่วไป จุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน จุลินทรีย์บางชนิด โดยเฉพาะมิวแคนท์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตกรดอะมิโน จะเจริญได้เฉพาะในอาหารที่มีกรดอะมิโนชนิดที่มันต้องการอยู่ด้วยเท่านั้น แต่เนื่องจากกรดอะมิโนบริสุทธิ์มีราคาแพง ดังนั้นจึงนิยมใช้กรดอะมิโนจากสารประกอบเชิงซ้อน เช่น การผลิตไลซีน จะใช้ soya bean hydrolysate เป็นแหล่งเมทไธโอนีนและทรีโอนีน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีวัตถุดิบอื่นๆ ที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง ฟาร์มาซีเคีย Distiller's soluble, casein hydrolysate, fish meal, yeast extract เป็นต้น

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจน

- ชนิดของจุลินทรีย์
- ราคาของแหล่งไนโตรเจน
- ประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิต

4.2 ขนาดการผลิต

ราคาของ P(3HB) จะลดลงเมื่อขนาดการผลิตเพิ่มขึ้นดังแสดงในตารางที่ 2.7 พบว่าเมื่อขนาดการผลิตสูงขึ้นราคาการผลิต P(3HB) จะลดลง เมื่อขนาดการผลิตเปลี่ยนแปลงต้นทุนการผลิตต่างๆ จะเปลี่ยนแปลงไปด้วย โดยราคาของแหล่งคาร์บอนจะมีผลต่อต้นทุนการผลิตมากที่สุด คิดเป็นปริมาณ 50% ของต้นทุนทั้งหมด ดังนั้นต้นทุนด้านวัตถุดิบจึงมีความสำคัญมากต่อการผลิต P(3HB) ดังตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.7 ราคาต้นทุนการผลิต P(3HB) เมื่อกำลังการผลิต และผลผลิตของ P(3HB) แตกต่างกัน (Mudliar และคณะ, 2007)

Serial no.	Plant capacity (fermentation capacity m ³ /day)	Production cost US\$/kg			
		% PHB yield			
		44	50	60	70
1	100	11.806	10.388	8.658	7.420
2	200	10.510	9.249	7.708	6.606
3	300	9.906	8.716	7.264	6.226
4	400	9.548	8.402	7.002	6.002
5	500	9.290	8.176	6.814	5.840
6	600	9.086	7.996	6.663	5.711
7	700	8.929	7.858	6.548	5.612
8	800	8.772	7.720	6.433	5.514
9	900	8.656	7.617	6.348	5.441
10	1,000	8.560	7.534	6.278	5.380

ตารางที่ 2.8 ผลของต้นทุนซับสเตรทและผลผลิต P(3HB) ที่มีต่อราคา P(3HB) (Lee, 1996)

Substrate	Approximate price (US \$ kg ⁻¹)	P(3HB) yield [g P(3HB) (g substrate) ⁻¹]	Substrate cost {US \$ [kg P(3HB)] ⁻¹ }
Glucose	0.493 ^a (0.220 ^c)	0.38 ^b	1.30 (0.58)
Sucrose	0.290 ^d	0.40	0.72
Methanol	0.180 ^e	0.43	0.42
Acetate	0.595 ^e	0.38	1.56
Ethanol	0.502 ^a	0.50	1.00
Cane molasses	0.220 ^a	0.42	0.52
Cheese whey	0.071 ^a	0.33	0.22
Hemicellulose hydrolysate	0.069 ^a	0.20	0.34

^a Data taken from Hocking and Marchessault (1994)

^b Calculated by multiplying the theoretical yield by 0.8 (assuming 80% polymer accumulation) (Yamanae 1992, 1993)

^c Estimate of the value of hydrolyzed corn starch

^d International market price of raw sugar

^e International market price from Chemical Journal (Korea)

4.3 กระบวนการ recovery

ภายหลังจากการผลิต P(3HB) โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดต่างๆด้วยกระบวนการหมัก แบคทีเรียที่เลี้ยงต้องถูกแยกออกจากน้ำหมักโดยการ centrifuge จากนั้นมีการแยก P(3HB) ออกจากเซลล์แบคทีเรีย วิธีการ recovery และสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการนี้ส่งผลต่อสมบัติบางประการและความบริสุทธิ์ของ P(3HB) รวมทั้งยังส่งผลต่อต้นทุนการผลิต P(3HB) อีกด้วย โดยทั่วไปผู้วิจัยส่วนใหญ่นิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัด P(3HB) ออกจากเซลล์แบคทีเรียโดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้นั้นได้แก่ คลอโรฟอร์ม ไคคลอโรอีเทน ไตรคลอโรเอทิลีน ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ เมทิลีนคลอไรด์ อะซิโตน (Terada และ Marchessaut, 1999) วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีข้อดีคือ P(3HB) ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง เหมาะที่จะนำไปใช้ในทางการแพทย์ (Chen และ Wu, 2005) อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีข้อเสียคือ ตัวทำละลายอินทรีย์มีความเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม และตัวทำละลายอินทรีย์มีราคาสูงทำให้ราคาการผลิต P(3HB) สูงตามไปด้วย นอกจากนี้หากต้องติดตั้งระบบ recovery ตัวทำละลายอินทรีย์ก็ทำให้ราคา P(3HB) สูงขึ้นอีก ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการสกัด P(3HB) แบบไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น การใช้เอนไซม์ในการสกัด (Kapritchkoff และคณะ, 2006; Lakshman และ Shamala, 2006) การใช้แอมโมเนีย (Page และ Cornish, 1993) การใช้ surfactant-hypochlorite (Ryu และคณะ, 2000) ซึ่งวิธีนี้มีข้อเสียคือทำให้มวลโมเลกุลของ P(3HB) ลดลง การย่อยด้วยด่าง (Choi และ Lee, 1997) วิธี super critical fluid extraction (Hejazi และคณะ, 2003; Khosravi-Darani และคณะ, 2004) วิธี dissolved-air flotation (Van Hee และคณะ, 2006) และวิธี selective dissolution of cell mass (Yu และ Chen, 2006)

2.4 การผลิต P(3HB) จากจุลินทรีย์

2.4.1 กระบวนการหมักแบบแบตช์ (batch fermentation)

กระบวนการหมักแบบแบตช์ เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เติบโตในระบบปิด ซึ่งส่วนใหญ่ทำในขวดเขย่าหรือถังหมักที่มีสารอาหารเหมาะสมต่อการเติบโต และเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสม กระบวนการหมักแบบนี้ไม่มีการเติมสารอาหาร เซลล์จะเติบโตจนกระทั่งองค์ประกอบของสารอาหารที่จำเป็นหมดไปหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม เนื่องจากสะสมสารพิษหรือ pH เปลี่ยนแปลง เป็นต้น

2.4.2 กระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์ (fed-batch fermentation)

กระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์ คือกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยมีการเติมสารอาหารลงภาชนะที่ใช้ในการหมักในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่มีการนำของเหลวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อออกจากระบบจนถึงสิ้นสุดการหมัก ทำให้ปริมาณของของเหลวในกระบวนการหมักแบบนี้จะเพิ่มขึ้น ในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้กระบวนการหมักแบบนี้เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์และทำให้ได้ผลผลิตที่สูง (Sun และคณะ, 2007) ความเข้มข้นของสารอาหารป้อนเข้าในอาหาร

เลี้ยงเชื้อสามารถควบคุมได้โดยการเปลี่ยนอัตราการป้อนเข้า ดังนั้นกระบวนการหมักแบบเฟด-แบดจ์ จึงได้เปรียบกว่ากระบวนการหมักแบบแบดจ์ เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของสารอาหารเปลี่ยนแปลง มีผลทำให้ผลผลิตที่ได้ หรืออัตราการผลิตของเมแทบอลิท์ที่ต้องการให้เพิ่มสูงขึ้น (Asenjo และ Merchuk, 1995)

ปัจจัยที่ส่งผลให้กระบวนการหมักแบบเฟด-แบดจ์ มีประสิทธิภาพมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบแบดจ์

1. สามารถใช้สาร เช่น เมทานอล เอทานอล กรดอะซิติก และสารประกอบอะโรมาติก ซึ่งยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์แม้ว่าใช้ที่ความเข้มข้นต่ำเป็นสารอาหารเลี้ยงเชื้อได้ กระบวนการหมักแบบเฟด-แบดจ์ สามารถลดผลการยับยั้งได้โดยการเติบสารอาหารดังกล่าวครั้งละน้อยๆ ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารไม่สูงเกินไป

2. สามารถเพาะเลี้ยงแบบให้ความหนาแน่นของเซลล์สูง เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบบแบดจ์ที่มีความเข้มข้นของเซลล์สูง อาจจะไปยับยั้งการเติบโตของเซลล์ ทำให้ได้ความเข้มข้นเซลล์ต่ำ

3. เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยแหล่งคาร์บอนที่ให้พลังงานอย่างรวดเร็ว เช่น กลูโคส อาจเกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ เป็นสาเหตุให้เมแทบอลิซึมของแหล่งพลังงานเกิดขึ้นได้ช้าลง ซึ่งเรียกว่าการยับยั้งแบบนี้ว่า catabolite repression ดังนั้นกระบวนการหมักแบบเฟด-แบดจ์สามารถควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารให้ต่ำได้โดยการควบคุมการป้อนเข้า มีผลให้กระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ไม่ถูกยับยั้ง

4. สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสังเคราะห์สารจำเป็นบางชนิดได้ (autotrophic mutants) ให้เติบโตภายใต้การควบคุมการป้อนสารอาหารที่จำเป็น เพื่อให้สามารถสะสมเมแทบอลิท์ที่ต้องการในปริมาณมากได้ ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวนี้ การให้สารอาหารที่จำเป็นในปริมาณมากเกินไปส่งผลให้มีการเติบโตสูงแต่การสะสมผลิตภัณฑ์ต่ำ เนื่องจากการยับยั้งแบบ feedback inhibition หรือ end-product repression

5. สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารที่ต้องการเมื่อเปลี่ยนภาวะการเลี้ยงเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้กระบวนการหมักแบบเฟด-แบดจ์ 2 ขั้นตอน

การจัดจำแนกกระบวนการหมักแบบเฟด-แบดจ์ โดยอาศัยเทคนิคการป้อนสารอาหาร

จุดประสงค์หลักของการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบดจ์ คือการควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นวิธีการป้อนสารอาหารให้เหมาะสมจะมีผลต่อประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงสามารถแบ่งกระบวนการหมักแบบนี้ออกเป็น 2 ประเภท คือแบบ with feedback control และ without feedback control

1. แบบ without feedback control

กระบวนการหมักแบบนี้อัตราการป้อนเข้าจะเปลี่ยนแปลงระหว่างการเพาะเลี้ยงตามข้อมูลที่ได้มีการศึกษามาก่อน ส่วนใหญ่การเพาะเลี้ยงแบบนี้ในยุคเริ่มต้นจะมีการป้อนสารอาหาร

เป็นช่วงๆ เนื่องจากเป็นวิธีการง่าย การป้อนสารอาหารเป็นช่วงที่มีความถี่ให้ผลที่มีลักษณะใกล้เคียงกับการป้อนสารอาหารแบบต่อเนื่อง

2. แบบ with feedback control

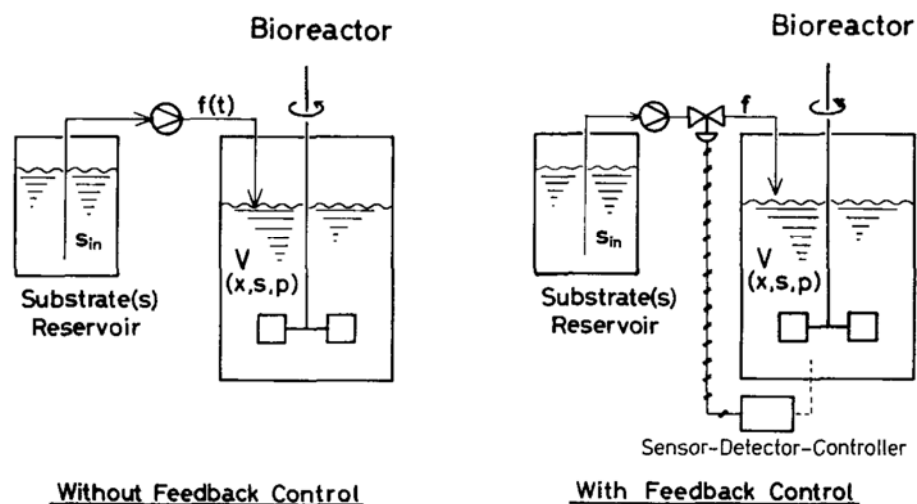
กระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์ ที่ใช้เทคนิคแบบนี้ แบ่งได้เป็น 2 ประเภท (รูปที่ 2.9)

2.1 with indirect feedback control

กระบวนการหมักแบบนี้ ใช้พารามิเตอร์ที่สามารถสังเกตได้ซึ่งมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับลักษณะของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ พารามิเตอร์ที่ใช้เช่น ค่าการละลายออกซิเจน ค่า pH ความเข้มข้นเมตาบอลไลท์ และความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ในกรณีของ pH แบ่งออกได้เป็น 2 วิธีการคือ low limit เมื่อ pH มีแนวโน้มลดลงระหว่างการเพาะเลี้ยงและ high limit เมื่อ pH มีแนวโน้มสูงขึ้นในระหว่างการหมัก จะมีการป้อนสารอาหารเข้าสู่ระบบ

2.2 with direct feedback control

ความเข้มข้นของสารอาหารป้อนเข้าในอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกวัดแบบต่อเนื่องหรือแบบเป็นช่วงๆ ซึ่งข้อมูลที่ได้ใช้เป็น feedback parameter โดยตรง กระบวนการหมักแบบนี้ จำเป็นต้องมีการตรวจวัดความเข้มข้นของสารป้อนเข้าที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยระบบการวัดด้วยเซนเซอร์ (sensor detector system) ซึ่งมีการวิจัยและคิดค้นไปโอเซนเซอร์หลายชนิดเพื่อนำมาประยุกต์ใช้กับระบบดังกล่าว ถ้าสารอาหารที่ใช้เป็นสารป้อนเข้าเป็นสารระเหย เช่น แอลกอฮอล์ สามารถใช้ tubing sensor ได้ดี



รูปที่ 2.9 เทคนิคการป้อนสารอาหารในการเลี้ยงเชื้อแบบเฟด-แบตช์ (Asenjo และ Merchuk, 1995)

การศึกษาวิจัยการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด หลังจาก Lemoigne ค้นพบ P(3HB) จาก *B. megaterium* ในปี 1926 เป็นต้นมา Wakisaka และคณะ (1982) พบว่า *B. thuringiensis* สร้าง P(3HB) เมื่อมีความเข้มข้นของโปแตสเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ และแอมโมเนียมซัลเฟตกระตุ้นให้เกิดการสร้างแกรนูล P(3HB) เพิ่มมากขึ้นในสายพันธุ์ 290-1 Chen และคณะ (1991) รายงานผลการศึกษาการผลิต P(3HB) ใน *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้ *B. megatarium* DSM90 *B. laterosporus* DSM335 *B. subtilis* DSM10 *B. sphaericus* DSM20 *B. cereus* DSM31 *B. amyloliquifaciens* DSM7 *B. licheniformis* DSM394 *B. macerans* DSM2892 *B. circulans* DSM1529 *B. thuringiensis* DSM 2046 และ *B. mycoides* DSM2048 โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยง 2 ขั้นตอน ซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในขั้นตอนแรกให้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆเติบโตในอาหารที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วของเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ขั้นตอนที่ 2 เก็บเซลล์มาล้างด้วยน้ำ จากนั้นนำเซลล์ที่ล้างแล้วถ่ายลงในอาหารที่ขาดไนโตรเจน เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์พอลิเอสเทอร์ พบว่าเมื่อจุลินทรีย์เติบโตในอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ สามารถสังเคราะห์ P(3HB) ได้ในปริมาณเล็กน้อย ซึ่งปริมาณ P(3HB) ภายในเซลล์อยู่ในช่วง 5-20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เมื่อควบคุมการหมักให้อยู่ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินไปและมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน แบคทีเรียสามารถผลิต P(3HB) ได้เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมอะซิเตตและ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรตลงไปมีผลทำให้การสังเคราะห์ P(3HB) เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารที่เติมเพิ่มลงไปทำให้ปริมาณของอะเซติลโค-เอ และ 3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโค-เอภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น

Kim และคณะ (1992) รายงานการผลิต P(3HB) โดยการเพาะเลี้ยง recombinant *E. coli* แบบเฟด-แบดจ์ โดยใช้เทคนิค pH-stat ควบคุมการป้อนสารอาหาร ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส yeast extract และ tryptone การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้ด้วยวิธีการดังกล่าวสามารถผลิต P(3HB) ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 88.8 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) 76.2% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง Shimizu และคณะ (1993) ศึกษาการผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยงเชื้อ *A. eutrophus* H-16 แบบเฟด-แบดจ์ โดยใช้กรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการป้อนกรดบิวทิริกแบบคงที่เพื่อให้มีความเข้มข้นของกรดเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร และควบคุม pH เท่ากับ 8.0 ได้อัตราการผลิต P(3HB) จำเพาะผลผลิต P(3HB) และปริมาณ P(3HB) ภายในเซลล์สูงที่สุด

Tanaka และคณะ (1995) รายงานการผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* IO-1 และ *A. eutrophus* แบบ 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเลี้ยงเชื้อ *L. lactis* IO-1 ให้ผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลส จากนั้นมีการแยกแบคทีเรียดังกล่าวออก แล้วเติมเซลล์ *A. eutrophus* ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เกิดการผลิต P(3HB) พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบดจ์ที่มีการเติมกรดแลคติกเพื่อรักษาความเข้มข้นของกรดให้อยู่ที่ 3 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 41 กรัม

ต่อลิตร และสามารถผลิต P(3HB) ได้เท่ากับ 28.7 กรัมต่อลิตรภายในเวลา 17 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ช่วยลดผลการยับยั้งการเติบโตจากความเป็นพิษของกรดแลคติกต่อเซลล์ Liu และคณะ (1998) ผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยง recombinant *E. coli* แบบเฟด-แบตช์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กากน้ำตาลจากหัวบีทเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กล้าเชื้อ 10% ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 6.8 และรักษาระดับของค่าออกซิเจนละลายให้สูงกว่า 20% ของอากาศอิ่มตัว ใช้ pH-DO-stat เป็น feedback parameter สารอาหารป้อนเข้าประกอบด้วยกากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าเมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 31.5 ชั่วโมง ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 39.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 80% ต่อความหนาแน่นของเซลล์และอัตราการผลิต P(3HB) เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Tsuage และคณะ (1999) ศึกษาการเติมกรดแลคติกที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยง *A. eutrophus* แบบเฟด-แบตช์ พบว่าการใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมล เหมาะสมในการเติบโตของจุลินทรีย์ จากนั้นเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 โมลต่อโมล ระหว่างการสะสม P(3HB) สามารถผลิตเซลล์ได้เท่ากับ 103 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 57.6% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งการผลิต P(3HB) ให้มีประสิทธิภาพยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ อีก เช่น ภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ องค์ประกอบของสารป้อนเข้า และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นต้น

Gouda และคณะ (2001) รายงานผล การศึกษาการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ ฟรุกโตส กลูโคส ไซโลส แล็กโทส ซูโครส มอลโตส โซเดียมกลูโคเนต และกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ากากน้ำตาลสามารถผลิต P(3HB) ได้ในปริมาณสูงใกล้เคียงกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1-5 เปอร์เซ็นต์ที่เติมลงในอาหารสำหรับการผลิต พบว่ากากน้ำตาลความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ดีที่สุดและกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์เชื้อสามารถผลิต P(3HB) ได้มากที่สุด คือ 46.3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เมื่อมีเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลมากขึ้น ทำให้การผลิต P(3HB) ลดลง

Valappil และคณะ (2007) ใช้ *B. cereus* SPV ในการผลิต P(3HB) ในระดับขวดเขย่าที่ อุณหภูมิ 30°C บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ให้ค่าความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุด 38% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 60 ชั่วโมงของการเลี้ยงเซลล์ โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่าสภาพอาหารที่เป็นกรดสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ ซึ่งการเกิดสปอร์นั้นมิผลทำให้การสร้าง P(3HB) ต่ำลงได้ ต่อมาศึกษาการผลิต P(3HB) ในถังหมักขนาด 20 ลิตร แบบแบตช์ พบว่า P(3HB) จะเริ่มสร้างเมื่อเข้าสู่ระยะ log phase และมีค่าสูงสุด 29% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 48 ชั่วโมงและไม่พบการสร้างสปอร์เช่นกัน ส่วนการผลิต P(3HB) ในถังหมักขนาด 20 ลิตร แบบเฟด-แบตช์ พบว่าเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase และมวลเซลล์มีค่ามากที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง

pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงต่ำสุดอยู่ที่ 5.2 และสามารถผลิต P(3HB) ได้ 38% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ที่มีการเติมกลูโคสลงไป ทำให้สามารถเพิ่มค่า overall volumetric yield ได้ถึง 31% เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงแบบแบตช์

Nath และคณะ (2008) ได้แยกเชื้อ *Methylobacterium* sp. ZP24 มาเลี้ยงด้วยอาหาร MM1 ที่เติม cheese whey และ ammonium sulfate เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าการเลี้ยงแบบแบตช์ ให้ค่า P(3HB) สูงสุด 2.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 62% ของน้ำหนักแห้ง และประสิทธิภาพการผลิต P(3HB) 0.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่การเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ มีการเติม cheese whey เมื่อเลี้ยงไป 30 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิต P(3HB) ได้ 3.54 กรัมต่อลิตร (64% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) และประสิทธิภาพการผลิต P(3HB) 0.09 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ค่ามากกว่าการเลี้ยงแบบแบตช์ถึง 1.7 เท่า หรือมากกว่า 4.58 เท่า เมื่อเทียบกับการเลี้ยงแบบ shake flask โดยอาหาร MM1 ที่มีการเติม pure lactose จนถึง การเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ที่มีการเติม cheese whey ในถังหมักระดับ 2 ลิตร

Jiang และคณะ (2008) รายงานว่า *Pseudomonas fluorescens* A2a5 สามารถใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนในการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยจากการทดลองเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 32 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 22 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 96 ชั่วโมง และค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Pandian และคณะ (2010) ได้คัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ SRKP-3 จากน้ำกร่อย โดยจากลักษณะสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกสปีชีส์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA พบว่าคือ *B. megaterium* จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำเสียจากโรงนม และน้ำทะเล ที่ใช้เป็นแหล่งของสารอาหารและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสะสม P(3HB) พบว่าเมื่อนำน้ำเสียจากโรงนมเป็นแหล่งของสารอาหารที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 9 เชื้อสามารถเจริญได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์ 6.37 กรัมต่อลิตรในระดับขวดเขย่า และเมื่อทดลองเลี้ยงในถังหมักขนาด 3 ลิตร ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อแบบเฟด-แบตช์ โดยเติมน้ำเสียจากการทำนมที่ชั่วโมงที่ 0 12 และ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้เพิ่มขึ้นเป็น 11.32 กรัมต่อลิตร ที่ 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต P(3HB) ได้จากแหล่งธรรมชาติจำนวน 30 สายพันธุ์ ซึ่งคัดเลือกได้สายพันธุ์ BA-019 สามารถผลิต P(3HB) ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่น และสามารถจำแนกชนิดเป็น *Bacillus* sp. เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ และกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Bacillus* sp. ที่แยกได้ใหม่นี้สามารถใช้น้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต P(3HB) ได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่น และเมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM โดยใช้กากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถผลิต P(3HB)

ได้ 31.84 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (1 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน อติพล บุญเรืองถาวร (2543) ได้ศึกษาการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์และการผลิต P(3HB) โดยศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ) และภาวะการเลี้ยงเชื้อ พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิต P(3HB) ได้ดี โดยใช้กากน้ำตาลและยูเรีย ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก เมื่อใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลทรายที่มีปริมาณน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร กากน้ำตาลให้ผลการเติบโตของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) ดีกว่าน้ำตาลทรายเท่ากับ 2.5 และ 4.0 เท่าตามลำดับ พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถใช้ยูเรียเพื่อการเติบโตของเซลล์และการผลิต P(3HB) ได้ดีกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 แบบเฟด-แบดจ์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีการควบคุมการป้อนสารอาหารด้วยวิธี pH-stat โดยใช้กากน้ำตาลซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 400 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมลในสารป้อนเข้า โดยเริ่มมีการป้อนสารอาหารชั่วโมงที่ 7.5 ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 72.57 กรัมต่อลิตร ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 30.52 กรัมต่อลิตรคิดเป็น 42.06% โดยน้ำหนักที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีอัตราการผลิต P(3HB) (productivity) 1.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง กุสุมา กมลจรัส โสภา (2547) ได้จัดจำแนกสปีชีส์ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BA-019 พบว่า คือ *B. megaterium* ต่อมาบุญฤทธิ์ เมฆศิริพร (2551) ได้ศึกษาเกณฑ์และปัจจัยที่สำคัญต่อการขยายส่วนการผลิต P(3HB) โดย *B. megaterium* BA-019 จากการศึกษาในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่าความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณ P(3HB) ผลได้ของเซลล์ต่อซับสเตรทที่ใช้ไป (Y_{XS}) ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อซับสเตรทที่ใช้ไป (Y_{PS}) และอัตราการผลิต P(3HB) มีค่ามากที่สุดเมื่อให้อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที จึงใช้ภาวะดังกล่าวในการผลิต P(3HB) แบบเฟด-แบดจ์ โดยการป้อนอาหารด้วยวิธี exponential feeding ในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของ P(3HB) และอัตราการผลิต P(3HB) มีค่าเท่ากับ 90.42 กรัมต่อลิตร 35.45 กรัมต่อลิตร และ 1.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 27 ของการเลี้ยงเชื้อ และศึกษาการขยายส่วนการผลิต P(3HB) จากถังหมัก 10 ลิตร ไปสู่ถังหมักขนาด 300 ลิตร โดยใช้เกณฑ์คงที่ได้แก่ อัตราส่วนของกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (P/V) ความเร็วรอบปลายใบพัด (πnD) และค่าเรย์โนลด์นัมเบอร์ (N_{RE}) พบว่าอัตราส่วนของกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเกณฑ์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ในการขยายส่วน

2.5 การผลิต P(3HB) ในระดับอุตสาหกรรม

ปี 1976 บริษัท ICI ของประเทศอังกฤษเริ่มให้ความสนใจการวิจัยเกี่ยวกับ P(3HB) เนื่องจากสมบัติของ P(3HB) ที่สามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติและมีความสามารถเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต

การพัฒนาการผลิตเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีการจดสิทธิบัตรการผลิต P(3HB) ช่วงต้นของทศวรรษที่ 80 (Braunegg และคณะ, 1998) บริษัท ZENCA Bio Products ซึ่งเป็นบริษัทในเครือ ICI ผลิต P(3HB) และ PHBV ทางการค้าโดยการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* แบบเฟด-แบดจ์

หน่วยวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพของ Biotechnology Forschungsgesellschaft (BtF, Austria) ได้พัฒนากระบวนการผลิต P(3HB) ปริมาณ 1 ตัน ภายในเวลา 1 สัปดาห์ ในถังหมักขนาด 15 ลูกบาศก์เมตร (Lee, 1996) โดยการเพาะเลี้ยง *A. latus*

บริษัท Chemie Linz ประเทศออสเตรียผลิต P(3HB) ทางการค้าโดยการเพาะเลี้ยง *A. latus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้รวดเร็วและสามารถสังเคราะห์ P(3HB) ได้ปริมาณสูงในระหว่างการผลิตตามปกติ (Lee, 1996; Braunegg และคณะ, 1998)

บริษัท Metabolix ผลิต Biopol® ในโรงหมักขนาด 50 ลูกบาศก์เมตร ด้วยกรรมวิธีที่ประหยัดเวลาหมัก (เวลาในการหมักน้อยกว่า 40 ชั่วโมง และมีความเข้มข้นสุดท้าย 100 กรัมต่อลิตร) ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้สำหรับประสิทธิภาพของแบคทีเรีย และให้กำลังการผลิตประมาณ 1,100 ตันต่อปี และเพื่อจะผลักดันให้ Biopol® อยู่ในตลาดการค้าได้ Metabolix ได้รับเงินทุนจาก Department of Commerce's Advance Technology Program ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีโครงการ Reengineering the Central Metabolism ของ *E. coli* ให้มีประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็น PHAs ให้เพิ่มมากขึ้น ปี ค.ศ. 2001 บริษัท Metabolix เริ่มโครงการร่วมกับกระทรวงพลังงานของสหรัฐอเมริกา ด้วยเงินทุนสนับสนุน 15 ล้านดอลลาร์สหรัฐในเวลา 5 ปีในการศึกษาวิจัยการผลิต PHAs ในเนื้อเยื่อของพืช เช่น ยาสูบ Alfalfa Swtichgrass เป็นต้น

2.5.1 การขยายส่วนการผลิต (scale-up of production scale)

เนื่องจากปัจจุบันความต้องการสารทางชีวภาพมีมากขึ้น ทำให้ต้องมีการเพิ่มผลผลิตซึ่งทำได้โดยการขยายส่วนกำลังการผลิตการผลิตที่ได้จากกระบวนการหมัก ในการขยายส่วนกำลังการผลิตต้องอาศัยความรู้ เทคนิค และข้อมูลจากการทำงานในระดับห้องปฏิบัติการที่ได้ผลผลิตในระดับที่น่าพอใจ อย่างไรก็ตามการนำข้อมูลจากห้องปฏิบัติการไปใช้ในการขยายส่วนการผลิตนั้นพบว่าเกิดปัญหาหลายอย่าง แต่ปัญหาหนึ่งที่สำคัญคือ ผลผลิตที่ได้ในระดับขยายส่วนนั้นมักไม่ดีเท่ากับในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งสาเหตุเกิดจากความแตกต่างในด้านต่างๆ ได้แก่ เทคนิคการให้อากาศและการกวน การทำให้อาหารปลอดเชื้อ การเตรียมหัวเชื้อ การกำจัดฟอง ชนิดของวัสดุ และวัตถุดิบที่ใช้ โดยปัจจัยที่มีผลต่อการขยายส่วนมี 3 ปัจจัย คือ ปัจจัยทางกายภาพ ปัจจัยทางเคมี และปัจจัยทางชีวภาพ

ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะทางเรขาคณิตของถังหมัก การให้อากาศ การปั่นกวน การทำให้อาหารปลอดเชื้อ การควบคุมอุณหภูมิ ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการควบคุม pH (ชนิดและความเข้มข้นของกรดและเบส) คุณภาพของอาหารและน้ำที่ใช้ ปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่

การเตรียมกล้าเชื้อ (inoculum development) เนื่องจากในระดับการผลิตขนาดใหญ่มีขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อหลายขั้นจึงอาจเกิดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่น และการกลายพันธุ์

โดยทั่วไปแล้วลำดับขั้นในการขยายขนาดควรจะน้อยที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ อย่างไรก็ตามถ้าทำเช่นนั้นจะเป็นการขยายขนาดโดยที่ปริมาตรต่างกันมากเกินไปซึ่งอาจทำให้การขยายส่วนการผลิตผิดพลาดได้มาก โดยทั่วไปแล้วจำนวนลำดับขั้นที่เหมาะสมควรเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้ ขวดเขย่า (shake flask) ปริมาตรระหว่าง 50-1000 มิลลิลิตร ถังหมักแบบกวนในระดับห้องปฏิบัติการ (lab stirred fermentor) ปริมาตรระหว่าง 5-20 ลิตร ถังหมักขนาดต้นแบบ (pilot-scale fermentor) ปริมาตรระหว่าง 50-5000 ลิตร ถังหมักขนาดเพื่อการผลิต (production fermentor) ปริมาตรระหว่าง 25-1000 ลิตร ลูกบาศก์เมตร โดยจะต้องทำการขยายขนาดจากระดับห้องปฏิบัติการไปสู่ระดับเพื่อการผลิตเพียง 3 ครั้งเท่านั้น ได้แก่ (Wiseman, 1983)

1. ขวดเขย่า (shake flask)

การเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าเป็นการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวเพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และสามารถทราบผลของตัวแปรในการศึกษาโดยใช้เวลาน้อย การศึกษาทำได้สะดวก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อย โดยตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรดค่าเริ่มต้น อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ทำให้สามารถหาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ได้ในการทดลองระดับนี้

2. ถังหมักแบบกวนในระดับห้องปฏิบัติการ (lab stirred fermentor)

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการเป็นการเลี้ยงเชื้อโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ เพิ่มปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และอื่นๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการผลิต (production process) ที่ต้องการ ข้อได้เปรียบของการเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมักมีหลายประการ ได้แก่ สามารถให้อากาศ (ออกซิเจน) แก่ระบบได้มากกว่าระดับขวดเขย่า เนื่องจากมีการให้อากาศและการกวน ซึ่งมีผลให้มีการผสม (mixing) ได้ดีระหว่างเซลล์ สารอาหาร และออกซิเจน ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญได้ดี สามารถควบคุมภาวะในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้มากกว่าการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า เช่น ค่าความเป็นกรดค่าเริ่มต้นและอุณหภูมิตลอดการเลี้ยงเชื้อ ค่าออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen) ทราบการเปลี่ยนแปลงของค่าตัวแปรเหล่านี้ได้ตลอดการศึกษาโดยมีการบันทึกโดยเครื่องอัตโนมัติ สามารถเติมสารอาหารระหว่างการเลี้ยงเชื้อ (fed-batch และ continuous cultivation) ทำให้การเลี้ยงเชื้อได้นานขึ้น โดยไม่ต้องเริ่มต้นใหม่ แต่ส่งผลให้ได้ผลผลิตมากขึ้น รวมทั้งหลีกเลี่ยงการยับยั้งการเจริญจากความเข้มข้นของสารเริ่มต้น (feed back inhibition)

3. ถังหมักระดับโรงงานต้นแบบ (pilot-scale fermentor)

การทดลองในถังหมักระดับนี้เป็นขั้นตอนหนึ่งในกระบวนการขยายขนาด ในขั้นตอนนี้จะศึกษาการเตรียมกล้าเชื้อที่เหมาะสม และหาภาวะในการฆ่าเชื้อใหม่ที่เหมาะสมก่อนที่จะเริ่มทำการหมักในระดับต้นแบบเพื่อการผลิตต่อไป

2.5.2 เกณฑ์ทางกายภาพที่เป็นพารามิเตอร์ที่มีประโยชน์ในการขยายส่วน

เกณฑ์ทางกายภาพที่นิยมใช้กำหนดการขยายส่วนของถังหมัก ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร ($K_L a$) ความเร็วรอบของปลายใบพัด ($\pi n D_i$) ค่าเรย์โนลด์ (Reynolds number; N_{RE}) และอัตราการไหลของเหลวภายในถังหมัก (liquid circulation rate)

1. อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V)

นิยมใช้ในระบบที่มีการกวนเพื่อให้ระบบที่ขยายส่วนการผลิตนั้นมีอัตราการถ่ายเทออกซิเจน (oxygen transfer rate) เท่ากับระบบต้นแบบ โดยทั่วไปค่า P/V ที่ใช้ในการขยายขนาดจะมีค่าอยู่ในช่วง 1.5-2.0 กิโลวัตต์ต่อลูกบาศก์เมตร สำหรับการขยายส่วนโดยการกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักคงที่โดยที่ภายในถังหมักมีการไหลแบบปั่นป่วน (turbulent flow) สามารถแสดงได้ดังสมการ

$$P \propto n^3 D_i^5 \quad (1)$$

$$V \propto D_i^3 \quad (2)$$

ดังนั้น

$$P/V \propto n^3 D_i^2 \quad (3)$$

เมื่อให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักคงที่จะได้

$$n_2 = n_1 (D_{i1}/D_{i2})^{2/3} \quad (4)$$

เมื่อ n = ความเร็วรอบของการกวน (s^{-1})

D_i = เส้นผ่าศูนย์กลางของใบพัด (m)

P = กำลังของมอเตอร์ที่ใช้ในการปั่นกวน (W)

V = ปริมาตรในถังหมัก (m^3)

2. สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร ($K_L a$)

สำหรับการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศปัญหาที่สำคัญ คือ การละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องควบคุม เนื่องจากจุลินทรีย์ต้องการออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึมสำหรับการสร้างพลังงาน ซึ่งประสิทธิภาพของการถ่ายเทออกซิเจนของถังหมักนั้นสามารถแสดงได้ดังสมการ

$$OTR = K_L a (C_L^* - C_L) \quad (5)$$

- เมื่อ $OTR =$ อัตราการถ่ายเทออกซิเจน (mmol/l-h)
 $K_L a =$ สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร (h^{-1})
 $C_L^* =$ ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายที่สมดุล (mmol/l)
 $C_L =$ ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในน้ำหมัก (mmol/l)

เนื่องจากรูปแบบและขนาดของถังหมักมีความสัมพันธ์กับการกำหนดสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ได้ดังสมการ

$$K_L a = f([P_g/D_Q^3]^a [V_s]^b [B/6]^{0.8} [J/D_i]^{0.3}) \quad (6)$$

- เมื่อ $P_g =$ กำลังที่ใช้ในการกวน (hp)
 $V_s =$ ความเร็วของอากาศ (m/s)
 $D_i =$ เส้นผ่าศูนย์กลางของใบพัด (m)
 $B =$ จำนวนใบพัด
 $J =$ ความกว้างของครีป (baffle) (m)
 $D_Q^3 =$ ปริมาตรในถังหมัก (m^3)

สำหรับการขยายส่วนการกำหนดให้ลักษณะทางเรขาคณิตของถังหมักมีลักษณะเหมือนกัน จะได้ความสัมพันธ์ใหม่เป็น

$$K_L a = f([P_g/D_Q^3]^a [V_s]^b) \quad (7)$$

จากสมการนี้ค่า a และ b นั้นจะเปลี่ยนตามขนาดของถังหมักและลักษณะทางเรขาคณิต

$K_L a$ นิยมใช้ในกระบวนการหมักที่มีการให้อากาศแก่เชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ระบบที่ทำการขยายขนาดมีอัตราการถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับระบบต้นแบบเช่นเดียวกับการใช้ค่า P/V ซึ่งสามารถทำได้โดยหาภาวะอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศในถังหมักแต่ละขนาดที่เหมาะสม และให้ค่า $K_L a$ ที่ต้องการ จากสมการที่ 7 พบว่าค่า $K_L a$ มีความสัมพันธ์กับ P/V ดังนั้นจึงสามารถใช้แทนกันได้ในการขยายขนาดเนื่องจากทั้ง 2 เกณฑ์ต่างมีผลโดยตรงกับอัตราการถ่ายเทออกซิเจนเหมือนกัน (Aiba และคณะ, 1973)

3. ความเร็วรอบของปลายใบพัด ($\pi n D_i$)

เครื่องหมักแบบถังกวนจะเกิดแรงเฉือนขึ้นภายใน ซึ่งแรงเฉือนนี้มีผลต่อการละลายของออกซิเจน การกระจายของสารอาหารและเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีผลกระทบต่อเซลล์เป็นอย่างมาก เนื่องจากแรงเฉือนอาจทำอันตรายต่อเซลล์ได้ โดยเฉพาะเซลล์สัตว์และเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีสายใย เช่น รา *Streptomyces* sp. ซึ่งอันตรายที่เกิดจากแรงเฉือนนั้นจะเกิดที่บริเวณปลายใบพัด ซึ่งสามารถแสดงได้ดังสมการ (Aiba และคณะ, 1973)

$$\text{Tip speed} \propto n D_i \quad (8)$$

- เมื่อ $n =$ ความเร็วรอบของการกวน (s^{-1})
 $D_i =$ เส้นผ่าศูนย์กลางของใบพัด (m)

ซึ่งสมการนี้เกิดขึ้นในกรณีที่ถังหมักมีขนาดเล็ก โดยมีค่า N_{RE} อยู่ในช่วง 10^4 - 10^5 ส่วนในถังหมักขนาดใหญ่ที่มีค่า N_{RE} สูงกว่า 10^5 คือมีลักษณะการกวนเป็นแบบปั่นป่วน (turbulent) จะมีความสัมพันธ์เป็น

$$\text{Turbulent head} = (nD_i)^2 \quad (9)$$

ซึ่งการขยายส่วนการผลิตที่กำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัดมีค่าคงที่นั้นเนื่องจากคำนึงถึงอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์โดยเฉพาะเชื้อราที่มีความไวต่อแรงเฉือนมาก

4. ค่าเรย์โนลด์ (Reynolds number; N_{RE})

ค่าเรย์โนลด์เป็นค่าที่แสดงถึงความรุนแรงในการกวน โดยที่ค่าเรย์โนลด์แสดงในสมการที่ 10 สำหรับการขยายส่วนการผลิตที่กำหนดให้ค่าเรย์โนลด์คงที่ในการผลิตที่มีขนาดแตกต่างกัน แสดงได้ดังสมการที่ 11

$$\begin{aligned} \text{Reynolds number} &= \text{Inertial force/Viscous force} \\ &= D_i^2 n \rho / \mu \end{aligned} \quad (10)$$

เมื่อ D_i = เส้นผ่าศูนย์กลางของใบพัด (m)
 n = ความเร็วรอบของการกวน (sec^{-1})
 ρ = ความหนาแน่นของน้ำหมัก (kg/m^3)
 μ = ความหนืดของน้ำหมัก (Pa s)

$$\begin{aligned} \text{Reynolds number} &\propto nD_i^2 \\ n_1 D_{i1}^2 &= n_2 D_{i2}^2 \end{aligned} \quad (11)$$

5. อัตราการไหลของของเหลวภายในถังหมัก (liquid circulation rate)

การขยายส่วนการผลิตโดยใช้อัตราการไหลของของเหลวภายในถังหมักคงที่แสดงได้ดังสมการที่ 12 อัตราการไหลของของเหลวจะใช้ในการขยายส่วนการผลิตเมื่อต้องการให้เวลาในการกวนผสมของทั้งระบบต้นแบบและระบบที่ขยายขนาดเท่ากัน ซึ่งจะทำให้ทั้งสองระบบมีระดับการผสมที่เท่ากัน

$$F/V \propto n \quad (12)$$

เมื่อ n = ความเร็วรอบของการกวน (s^{-1})

เมื่อขยายขนาดโดยควบคุมให้ค่า F/V คงที่ จะทำให้อัตราการกวนคงที่ แต่จะมีค่า P/V และความต้องการกำลังงาน (P) สูงมาก ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากเกินไปจึงไม่เหมาะในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม สำหรับการขยายขนาดโดยควบคุมให้ค่าความเร็วรอบของปลายใบพัด (nD_i) คงที่ จะทำให้อัตราการกวนและค่า P/V ลดลง และค่า F/V จะลดลงมากซึ่งจะก่อให้เกิดปัญหาในการขยายขนาดได้ ส่วนการขยายขนาดโดยการควบคุมให้ค่าเรย์โนลด์คงที่ในทั้งสองระบบนั้นพบว่าค่า P/V ลดลงอย่างมาก ซึ่งหมายถึงระบบที่ทำการขยายขนาดต้องการกำลังงานให้กับใบกวน

น้อยมาก ทำให้พารามิเตอร์เกือบทุกชนิดมีค่าลดลงด้วย ซึ่งเป็นการขยายขนาดที่ไม่ประสบความสำเร็จและไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการปฏิบัติจริง

จะเห็นได้ว่าการขยายขนาดโดยเลือกพารามิเตอร์ที่เหมาะสมให้มีค่าคงที่ระหว่างระบบต้นแบบและระบบที่ขยายขนาดจะทำให้พารามิเตอร์บางชนิดเกิดการเปลี่ยนแปลงเกินกว่าที่จะสามารถยอมรับได้และไม่สามารถนำมาใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นการจะเลือกพารามิเตอร์ใดในการขยายขนาดนั้นต้องพิจารณาอย่างรอบคอบเพื่อให้ผลที่ได้จากการขยายขนาดตรงกับวัตถุประสงค์ที่ต้องการ

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี (gas chromatography) รุ่น 3400CX	Varian, USA
แคปพิลลารี คอลัมน์ (capillary column) ชนิด CP-WAX 52CB เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 60 ม.	Varian, USA
เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen generator) รุ่น 9200	Packard, USA
เครื่องกลั่น (Distillation Unit) รุ่น K-350	Buchi, Switzerland
เครื่องย่อย (Digester) รุ่น K-424	Buchi, Switzerland
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychotherm incubator shaker) รุ่น G27 แบบหมุน (rotary)	New Brunswick Scientific, USA
เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S	Sartorius, Germany
เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P	Sartorius, Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P	Kubota, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ รุ่น Centrikon T-42K	Kubota, Japan
เครื่องระเหิดแห้ง (lyophilizer) รุ่น Eyela FD1	Tokyo Rikakikai, Japan
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (VIS spectrophotometer) รุ่น Novaspec II	Pharmacia Biotech, England
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 2000	Cyberscan, Singapore
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124	ISSCO, USA
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL-60	Memmert, Germany
ตู้อบแห้ง (dryer oven) รุ่น UL-80	Memmert, Germany
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325	Tomy, Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W760	Memmert, Germany
ถังหมัก (fermentor) ขนาด 10 ลิตร และ 90 ลิตร	B.E. Marubishi, Japan

3.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4)	Reidel, England
กรดซิตริก ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	E. Merck Damstadt, Germany
กรดบอริก (H_3BO_3)	E. Merck Damstadt, Germany
กรดบิวทิริก ($C_5H_{10}O_2$)	E. Merck Damstadt, Germany
กากน้ำตาล	มิตรผล, ไทย
กรดเบนโซอิก ($C_7H_6O_2$)	Nacalai Tesque, Japan
คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$)	E. Merck Damstadt, Germany
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	J.T. Baker, USA
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	E. Merck Damstadt, Germany
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	Carlo Erba, Italy
ซิงค์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	Carlo Erba, Italy
โซเดียมคลอไรด์ ($NaCl$)	E. Merck Damstadt, Germany
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	Carlo Erba, Italy
โซเดียมไฮดรอกไซด์ ($NaOH$)	Carlo Erba, Italy
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	Fluka, Germany
นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	E. Merck Damstadt, Germany
น้ำตาลทราย	มิตรผล, ไทย
แบคทีเรียทริปโตส (Bacto tryptose)	Difco, USA
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	Carlo Erba, Italy
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	Univar, Australia
เฟอร์รัสซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	Unilab, USA
เมทานอล (CH_3OH)	E. Merck Damstadt, Germany
แมกนีเซียมซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	Carlo Erba, Italy
แมงกานีสคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์ ($MnCl_2 \cdot 6H_2O$)	Unilab, USA
ยูเรีย (N_2H_6CO)	E. Merck Damstadt, Germany
สารมาตรฐานพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต	Sigma Chemical, USA
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	Difco, USA
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	Difco, USA
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$]	J.T. Baker, USA

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Bacillus megaterium* BA-019 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้โดย รัตน์ศิริ มุทิตากุล (2538) และจัดจำแนกสปีชีส์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA โดยกฤษมา กมลจรัส โสภา (2547)



รูปที่ 3.1 *B. megaterium* BA-019 เมื่อย้อมสีแกรม กำลังขยาย 1,000 เท่า



รูปที่ 3.2 *B. megaterium* BA-019 เมื่อย้อมสีซูดาน แบลค บี กำลังขยาย 1,000 เท่า



รูปที่ 3.3 *B. megaterium* BA-019 เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง (Nutrient agar)

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.2.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

beef extract	3	กรัม
bacto tryptose	5	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

3.3.2.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) ใช้สูตรของ Doi และคณะ (1986) ซึ่งศึกษาปรับปรุงโดย สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

yeast extract	10	กรัม
bacto tryptose	10	กรัม
beef extract	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
น้ำตาลทราย	10	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายน้ำตาลนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.3.2.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการสร้างและสะสม P(3HB) คืออาหาร MSM (Mineral salt medium) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

กากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar)	20.0	กรัม
ยูเรีย	0.8	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
กรดซิตริก	0.75	กรัม
โซเดียมอะซิเตต	2.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
กรดบิวทิริก	0.8	มิลลิลิตร
สารละลาย trace element	1.0	มิลลิลิตร

แยกละลายเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตและสารละลาย trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับ pH เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนของสารละลายน้ำตาลแยกหนึ่งมาเชื้อที่ ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย trace element ใน 1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	20.0	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.30	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.20	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต	0.60	กรัม
กรดบอริก	0.60	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์	0.08	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.50	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	0.05	กรัม
นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.02	กรัม

3.3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.3.3.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอลที่ผ่านการนิ่งมาเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.4 ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

3.3.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อและเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต P(3HB)

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 3.3.3.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียงใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85%) เพื่อทำให้เป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) และปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร (4% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (อดิพล บุญเรืองถาวร, 2543) จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อที่เลี้ยงไว้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ซึ่งมีอาหารเหลว MSM ปริมาตรเริ่มต้น 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7 ± 0.1 โดยให้อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที (บุญฤทธิ์ เมฆศิริพร, 2551)

3.3.4.2 เลี้ยง *B. megaterium* BA-019 แบบแบตช์ เพื่อศึกษาจลนศาสตร์ (kinetics) ของการเจริญและการผลิต P(3HB)

เลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ตามวิธีในข้อ 3.3.4.1 เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) และการเจริญเติบโต เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกันโดยใช้ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร (เพิ่มปริมาณยูเรียในอัตราส่วนเดียวกัน) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณยูเรียที่มีในน้ำหมัก นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่า $Y_{X/S}$ $Y_{P/S}$ และค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ)

3.3.4.3 ผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 แบบเฟด-แบตช์ โดยการป้อนแบบ exponential feeding

เลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ตามวิธีการในข้อ 3.3.4.1 โดยถ่ายกล้าเชื้อที่เลี้ยงไว้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ซึ่งมีอาหารเหลว MSM ปริมาตรเริ่มต้น 4 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากในข้อ 3.3.4.2 ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7 ± 0.1 ให้อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที และพิจารณาเวลาที่เริ่มป้อนอาหารเข้าจากเวลาที่ได้ค่าปริมาณความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด หรือค่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดโดยอาศัยข้อมูลจากข้อ 3.3.4.2 ป้อนสารอาหารเข้าด้วยวิธี exponential feeding เพื่อศึกษาจลนศาสตร์ของการเจริญและการผลิต P(3HB) โดยหยุดป้อนสารอาหารเมื่อปริมาตรในถังหมักเท่ากับ 6 ลิตร เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณยูเรียที่มีในน้ำหมัก โดยศึกษาผลของการป้อนอาหารในสภาวะต่างกัน ดังนี้

ก. ป้อนกากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

ข. อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้า โดยใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้า คือ 5 10 12.5 15 และ 20 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย

ค. เวลาที่เริ่มป้อนอาหารเข้า โดยใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.4.3 (ข) และพิจารณาเวลาที่เริ่มป้อนอาหารเข้าในเวลาที่ต่างกัน คือ 9 9.5 และ 15 ชั่วโมง

อัตราการป้อนอาหารด้วยวิธี exponential feeding กำหนดโดยกำหนดให้การเจริญของเซลล์และการสะสม P(3HB) ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนเท่านั้น (limiting substrate) ซึ่งคัดแปลงมาจาก Yamanè และ Shimizu (1984) ดังสมการ

$$F(t) = [1/Y_{X/S} + Y_{P/X}/Y_{P/S}] (V_0 \mu X_0 e^{\mu t})/S_F$$

เมื่อ	$F(t)$	=	อัตราการป้อนอาหารที่ชั่วโมงใดๆ (l/h)
	$Y_{X/S}$	=	ผลของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป
	$Y_{P/S}$	=	ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป
	$Y_{P/X}$	=	ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหนึ่งหน่วยเซลล์
	V_0	=	ปริมาตรเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (l)
	μ	=	อัตราการเติบโตจำเพาะ (h^{-1})
	X_0	=	ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น (g/l)
	S_F	=	ความเข้มข้นของน้ำตาลในสารอาหารป้อนเข้า (g/l)
	t	=	เวลา (h)

3.3.4.4 ผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 แบบเฟด-แบตช์ โดยการป้อน น้ำตาลและยูเรียแบบครั้งคราว (rectangular pulse feeding)

ผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 และพิจารณาเวลาที่เริ่มป้อนอาหาร เข้าตามข้อมูลที่ศึกษาในข้อ 3.3.4.3 ใช้กากน้ำตาลร่วมกับการป้อนยูเรียแบบครั้งคราว โดยแบ่ง ปริมาตรของอาหารที่ต้องป้อนเข้าทั้งหมด (2 ลิตร) เป็นส่วนๆที่เท่ากันโดยใช้อัตราส่วนของ คาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าตามที่ศึกษาได้ในข้อ 3.3.4.3 (ข) เทอาหารลงในถัง หมักทุก 0.5 ชั่วโมงและหยุดป้อนอาหารเมื่อปริมาณในถังหมักเท่ากับ 6 ลิตร เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักรวมเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาล ทั้งหมด และปริมาณยูเรียที่มีในน้ำหมัก

3.3.5 ผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.4 โดยการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ในถังหมักขนาด 90 ลิตร

3.3.5.1 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต

เตรียมกล้าเชื้อในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อตามวิธีข้อ 3.3.4.1 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยนำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 3.3.3.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียงใหม่ บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85%) เพื่อทำให้เป็นเซลล์แขวนลอยและปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโน เมตร เท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (4% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อที่เลี้ยงไว้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10% ต่อปริมาตร อาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ซึ่งมีอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตรเริ่มต้น 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7 ± 0.1 โดยให้อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เก็บ

ตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาหาค่าหน้าเซลล์หนึ่ง นับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย (plate count) และคำนวณอัตราการเติบโตเฉพาะ พิจารณาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมโดยดูจากเวลาที่ให้ค่าอัตราการเติบโตเฉพาะสูงสุด เปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณน้ำตาล และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือกับค่าที่ได้จากการเลี้ยงกล้าเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.3.5.2 หาเกณฑ์คงที่ที่เหมาะสมสำหรับการขยายส่วนการผลิต P(3HB) จากถังหมักขนาด 10 ลิตร ไปสู่ถังหมักขนาด 90 ลิตร

ก. การผลิต P(3HB) โดยกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ของถังหมักขนาด 90 ลิตร และถังหมักขนาด 10 ลิตร มีค่าเท่ากัน

เตรียมกล้าเชื้อในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อในวิธีข้อ 3.3.5.1 ตามเวลาที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ ปริมาตร 5 ลิตร (คิดเป็น 10% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ในถังหมักขนาด 10 ลิตร จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ลงในถังหมักขนาด 90 ลิตรที่มีอาหารเหลวที่ใช้ในการผลิต P(3HB) ปริมาตรเท่ากับ 50 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7.0 อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที อัตราการกวน 424 รอบต่อนาที (จากการคำนวณตามภาคผนวก จ) เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หน้าเซลล์หนึ่ง ปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ข. การผลิต P(3HB) โดยกำหนดให้ค่าความเร็วรอบของปลายใบกวน (impeller tip speed) ของถังหมักขนาด 90 ลิตร และถังหมักขนาด 10 ลิตร มีค่าเท่ากัน

เลี้ยง *B. megaterium* BA-019 เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.3.5.2 (ก) แต่ใช้อัตราการกวนในถังหมักเท่ากับ 357 รอบต่อนาที (จากการคำนวณตามภาคผนวก จ)

ค. การผลิต P(3HB) โดยกำหนดให้ค่าเรย์โนลด์์ของถังหมักขนาด 90 ลิตร และถังหมักขนาด 10 ลิตร มีค่าเท่ากัน

เลี้ยง *B. megaterium* BA-019 เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.3.5.2 (ก) แต่ใช้อัตราการกวนในถังหมักเท่ากับ 212 รอบต่อนาที (จากการคำนวณตามภาคผนวก จ)

พิจารณาค่าเกณฑ์คงที่ที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบค่า $Y_{P/X}$ $Y_{P/S}$ $Y_{X/S}$ และอัตราการผลิต P(3HB) กับค่า $Y_{P/X}$ $Y_{P/S}$ $Y_{X/S}$ และอัตราการผลิต P(3HB) ที่ได้จากการคำนวณในถังหมักขนาด 10 ลิตร

3.3.5.3 ผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์

เลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ตามภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.5.2 โดยถ่ายกล้าเชื้อที่เลี้ยงไว้ปริมาตร 4 ลิตร (คิดเป็น 10% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในถังหมักขนาด 90 ลิตร ซึ่งมีอาหารเหลว MSM ปริมาตรเริ่มต้น 40 ลิตร โดยใช้เกณฑ์คงที่ที่เหมาะสมและป้อนอาหารเข้าตามภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.4 ในการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ และหยุดป้อนอาหาร

เมื่อปริมาตรในถังหมักเท่ากับ 60 ลิตร เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์น้ำหมักเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่า $Y_{P/X}$ $Y_{P/S}$ $Y_{X/S}$ และอัตราการผลิต P(3HB)

3.4 วิเคราะห์

3.4.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ โดยการเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปใส่ในถ้วยอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์อบแห้ง คำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข) ในหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid ของ Dubois และคณะ (1956) โดยเติมสารละลายฟินอล 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำตาลซูโครสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีเจลดาล์ (Kjeldahl protein)

ตามวิธีของ A.O.A.C. (1975) โดยนำน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกลั่นขนาด 500 มิลลิลิตร เติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วยโพแทสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟตอัตราส่วน 95:5 ลงไปน้ำหนัก 7 กรัม จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมจนสารละลายใส เป็นเวลา 40 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปประกอบเข้ากับเครื่องกลั่นไนโตรเจน และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 32 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50-60 มิลลิลิตร หรือจนสารละลายเป็นสีดำ แล้วกลั่นจับก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมอินดิเคเตอร์ 2 หยด ซึ่งเป็นเมทิลเรดเมทิลีนบลู (methyl red methylene blue) กลั่นจนสารละลายบอริกมีปริมาตร 150 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่กลั่นได้มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรต แล้วคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography; GC)

ตามวิธีของ Comeau และคณะ (1988) โดยการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์มาละลายในน้ำกลั่น เทใส่ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นำไประเหิดแห้งภายใต้สุญญากาศ ซึ่งเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียวเติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 3 (3% acidified methanol) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน ความเข้มข้นเท่ากับปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 5 นาที และนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของ โมนาเมอร์ ไปสกัดแยกกรดและกากเซลล์ตามวิธีข้างต้นอีกครั้ง ถ้ายังชั้นคลอโรฟอร์มใส่หลอดฝาเกลียวสำหรับวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี แล้ววิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธี GC ภายใต้ภาวะ ดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด CP-WAX 52CB เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 60 เมตร
อุณหภูมิของ injector	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของคอลัมน์	: 130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียส ต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ Detector (FID)	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
Split ratio	: 50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	: ก๊าซไนโตรเจนอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	: 1 ไมโครลิตร

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 หาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

4.1.1 เลี้ยง *B. megaterium* BA-019 แบบแบตช์ เพื่อศึกษาจลนศาสตร์ (kinetics) ของการเจริญและการผลิต P(3HB)

จากการศึกษาของ อติพล บุญเรืองถาวร (2543) ซึ่งศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 โดยใช้อาหารสูตร MSM พบว่าการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตรและการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่มีราคาถูกทำให้ได้ปริมาณ P(3HB) และความหนาแน่นของเซลล์สูงที่สุด

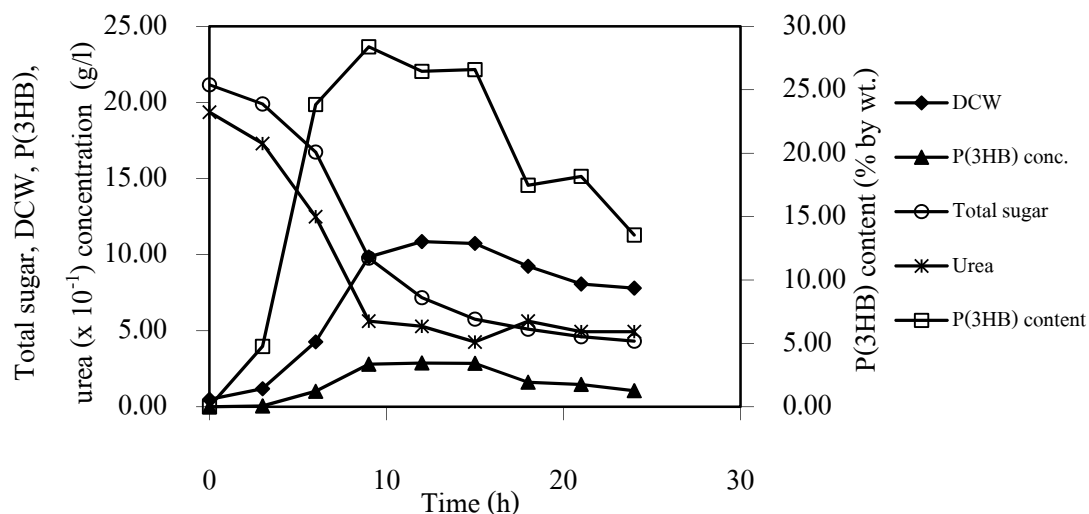
ในงานวิจัยนี้จึงเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 เพื่อศึกษาจลนศาสตร์ของการเจริญและการผลิต P(3HB) ตามวิธีในข้อ 3.3.4.2 จากผลเมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร (ตารางและรูปที่ 4.1) พบว่าความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 คือ 10.86 และ 2.87 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงเริ่มต้น พบว่า อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ประมาณ 10 กรัม น้ำตาลต่อกรัมยูเรีย จึงศึกษาต่อโดยเปรียบเทียบการเจริญและการผลิต P(3HB) ของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกันคือที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเพิ่มปริมาณยูเรียในอาหารให้เป็นอัตราส่วนเดียวกับในอาหารสูตร MSM ที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้เพื่อหาความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของเซลล์ ดังแสดงผลการวิจัยในตารางและรูปที่ 4.2-4.4 พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เซลล์มีความหนาแน่นสูงสุดเท่ากับ 32.48 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 8.75 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 12 และเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลรวม 20 และ 40 กรัมต่อลิตร พบว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลรวม 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์และอัตราการผลิต P(3HB) ที่สูงกว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลรวม 20 และ 40 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.5) แม้ว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร จะมีการเจริญและปริมาณ P(3HB) ที่มากกว่า แต่ที่ความเข้มข้นนี้มีผลทำให้การเจริญของ *B. megaterium* BA-019 มีช่วง lag phase ที่ยาวนานขึ้น อีกทั้งเมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิต P(3HB) ของการเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร มีค่าเพียง 0.10 ต่อชั่วโมงและ 0.67 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ตามลำดับ ซึ่งยังมีค่าต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากการศึกษาของ Sun และคณะ (2007) ทราบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการเติบโตจำเพาะของ *Pseudomonas putida* KT2440 จาก 0.15 ต่อชั่วโมงเป็น 0.25 ต่อชั่วโมง ในการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ที่ป้อนอาหารเข้าด้วยวิธี exponential feeding มีผลทำให้เชื้อมีการเจริญและการสะสม P(3HB) ได้เร็วขึ้น โดยการทดลองนี้ถือเป็นการผลิต P(3HB) แบบแบตช์ได้ในปริมาณที่สูง เช่น การศึกษาของ ศรีบุญญา แก้วประดับ (2553) เมื่อผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 ที่ใช้น้ำอ้อยความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 9.97 และ 3.31 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยง ตามลำดับ ส่วน Gouda และคณะ (2001) ผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 3.60 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิต P(3HB) ได้มากที่สุดเท่ากับ 2.14 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ และพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลมากขึ้น มีผลทำให้ปริมาณการผลิต P(3HB) ลดลง แต่จากผลการทดลองนี้ทราบว่าเมื่อยิ่งเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลในอาหารมากขึ้น ทำให้ปริมาณความหนาแน่นของเซลล์สูงขึ้นตามไปด้วย โดยความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดจะมีค่าเป็นประมาณครึ่งหนึ่งของปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้นในอาหาร และการผลิต P(3HB) จะอยู่ประมาณ 27-32 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งในทุกการทดลอง เป็นผลมาจากการที่ไม่ได้เปลี่ยนแปลงอัตราส่วนกากน้ำตาลต่อยูเรียในอาหาร ซึ่งแสดงถึงความสำคัญของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารต่อการผลิต P(3HB) (Lee, 1996; Jiang และคณะ, 2008; Pandian และคณะ, 2010)

งานวิจัยนี้จึงพิจารณาเลือกการผลิต P(3HB) โดยใช้อาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่าจลนศาสตร์ต่างๆ ดังนี้ $Y_{x/s}$ เท่ากับ 0.66 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล $Y_{p/s}$ เท่ากับ 0.19 กรัม P(3HB) ต่อกรัมน้ำตาล $Y_{p/x}$ เท่ากับ 0.28 กรัม P(3HB) ต่อกรัมเซลล์ และค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.23 ต่อชั่วโมงที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่ได้ค่าความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุด ไปใช้ในการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ต่อไป

ตารางที่ 4.1 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร

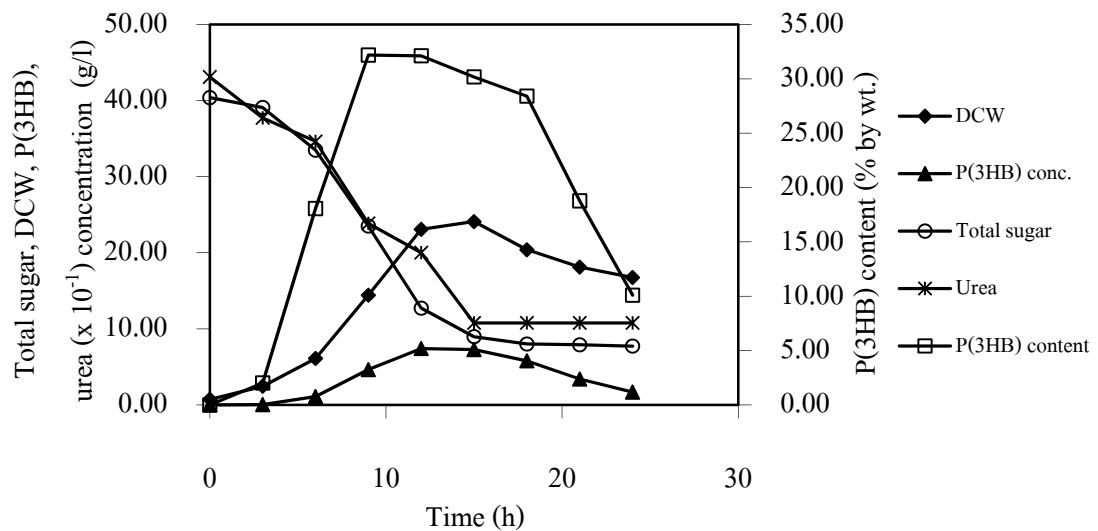
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.49	21.16	1.94	0.00	0.00
3	1.19	19.90	1.73	0.06	4.76
6	4.27	16.74	1.25	1.02	23.83
9	9.85	9.77	0.56	2.80	28.39
12	10.86	7.17	0.53	2.87	26.45
15	10.74	5.76	0.43	2.85	26.59
18	9.24	5.10	0.56	1.61	17.47
21	8.07	4.61	0.49	1.47	18.17
24	7.80	4.31	0.49	1.06	13.55



รูปที่ 4.1 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.2 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร

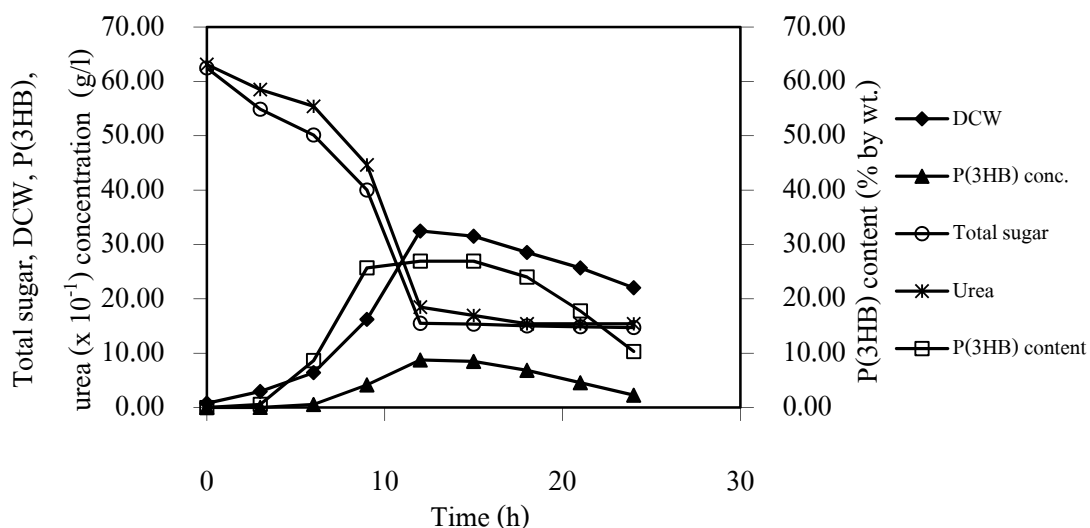
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.72	40.39	4.31	0.00	0.00
3	2.45	39.09	3.77	0.05	2.02
6	6.10	33.49	3.46	1.10	18.07
9	14.42	23.50	2.39	4.64	32.19
12	23.08	12.72	2.00	7.41	32.12
15	24.10	8.97	1.08	7.27	30.17
18	20.40	8.01	1.08	5.79	28.41
21	18.11	7.90	1.08	3.40	18.77
24	16.75	7.73	1.08	1.69	10.10



รูปที่ 4.2 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.3 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร

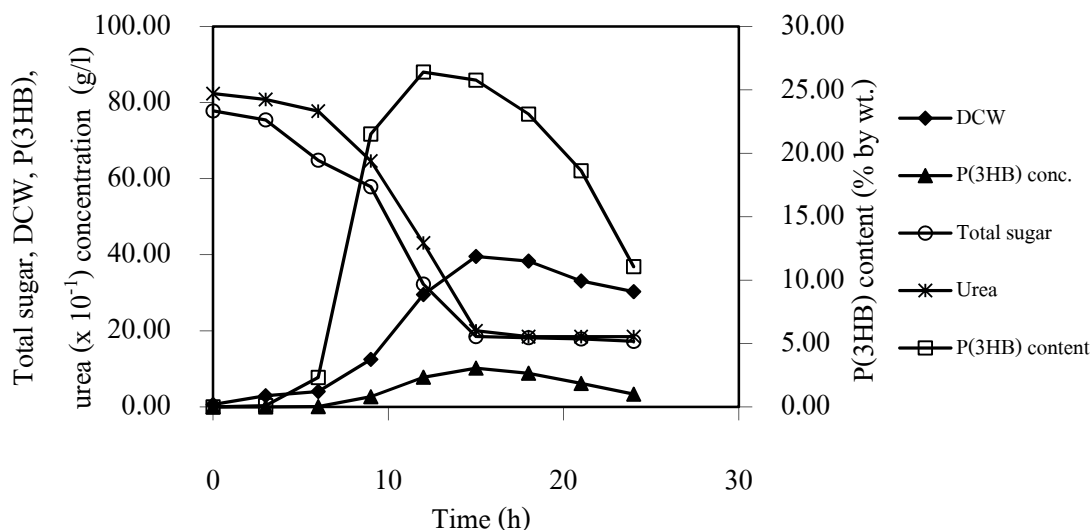
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.78	62.48	6.31	0.00	0.00
3	2.94	54.89	5.85	0.02	0.58
6	6.41	50.14	5.54	0.55	8.64
9	16.22	40.02	4.46	4.17	25.70
12	32.48	15.50	1.85	8.75	26.93
15	31.53	15.34	1.69	8.49	26.94
18	28.54	15.02	1.54	6.85	24.01
21	25.70	14.86	1.54	4.57	17.78
24	22.04	14.71	1.54	2.27	10.31



รูปที่ 4.3 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.4 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.61	77.82	8.24	0.00	0.00
3	2.95	75.45	8.08	0.00	0.11
6	4.05	64.85	7.77	0.09	2.32
9	12.48	57.89	6.47	2.69	21.52
12	29.54	32.27	4.31	7.80	26.41
15	39.56	18.51	2.00	10.19	25.77
18	38.34	18.19	1.85	8.85	23.09
21	33.11	17.87	1.85	6.17	18.63
24	30.30	17.24	1.85	3.35	11.06



รูปที่ 4.4 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต P(3HB) ของ *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลต่างกัน

Initial sugar conc. (g/l)	Culture time (h)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) productivity (g/l-h)
20	12	10.86	2.87	0.24
40	15	24.10	7.27	0.48
60	12	32.48	8.75	0.73
80	15	39.56	10.19	0.67

4.1.2 ผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 แบบเฟด-แบตช์ โดยการป้อนด้วยวิธี exponential feeding

4.1.2.1 ผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 โดยป้อนกากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

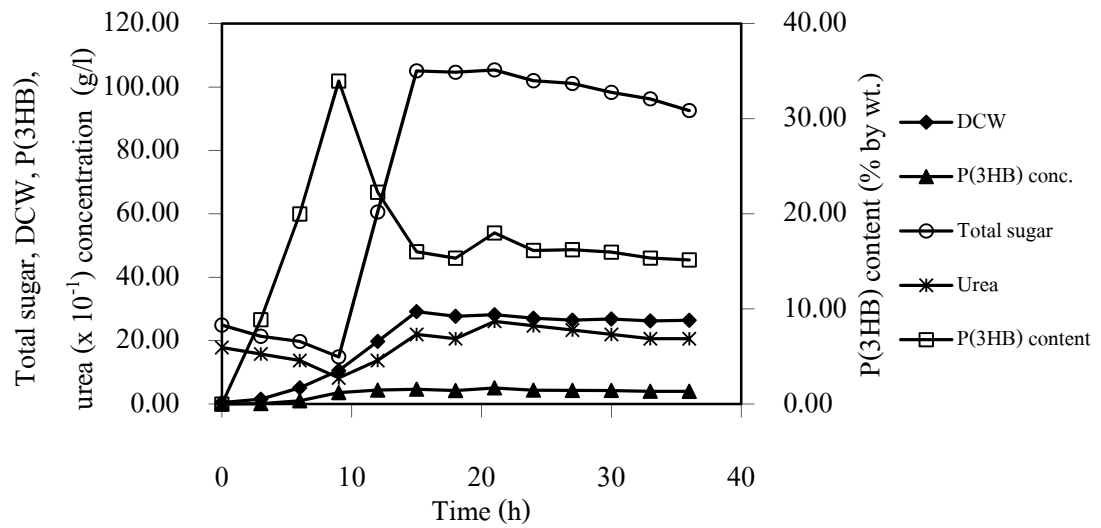
งานวิจัยในขั้นตอนนี้ผลิต P(3HB) โดย *B. megaterium* BA-019 ตามวิธีการในข้อ 3.3.4.3 ในอาหารสูตร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ว่าเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต P(3HB) (อดิพล บุญเรืองถาวร, 2543) โดยป้อนเพียงกากน้ำตาลที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นชั่วโมงที่ค่าการเติบโตจำเพาะสูงสุด คือ 0.43 ต่อชั่วโมงและใช้ค่าจลนศาสตร์ต่างๆ ดังนี้ $Y_{X/S}$ เท่ากับ 0.97 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.30 กรัม P(3HB) ต่อกรัมน้ำตาลและ $Y_{P/X}$ เท่ากับ 0.31 กรัม P(3HB) ต่อกรัมเซลล์ ป้อนกากน้ำตาลเข้าด้วยวิธี exponential feeding ได้ผลดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.5 พบว่าการเจริญและการผลิต P(3HB) ไม่สูงมากนัก อาจเนื่องจากปริมาณของเซลล์เริ่มต้นก่อนที่จะเริ่มป้อนอาหารเข้ามีความหนาแน่นของเซลล์เพียงเล็กน้อย (5.13 กรัมต่อลิตร) และไม่มีแหล่งไนโตรเจนเพียงพอในการเจริญของเซลล์ ซึ่งการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ควรเป็นกระบวนการต่อเนื่อง ที่ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกจุลินทรีย์จะมีการเจริญในแหล่งคาร์บอนโดยการนำสารอาหารนั้นไปสร้างองค์ประกอบของเซลล์ ส่วนในขั้นตอนที่สอง มีการเติมสารอาหารเพื่อใช้ในการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เซลล์ที่เจริญขึ้นในขั้นตอนแรกก็จะใช้สารอาหารนั้นเพื่อนำไปสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยอาจจะมีการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรืออาจไม่เจริญขึ้น แต่ขนาดของเซลล์จะใหญ่ขึ้น เนื่องจากการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ภายในเซลล์ เพราะฉะนั้นการเพิ่มปริมาณของเซลล์ในขั้นตอนแรกจะส่งผลทำให้ได้ปริมาณ P(3HB) เพิ่มขึ้นเช่นกัน (Keshavarz และ Roy, 2010) จึงทดลองผลิต P(3HB) *B. megaterium* BA-019 ตามวิธีการเดียวกัน โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยพิจารณาเริ่มป้อนกากน้ำตาลเพียงอย่างเดียวเข้าที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นเวลาที่ได้ค่าปริมาณความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด ได้ผลดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้นหลังการป้อนกากน้ำตาลเข้าที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ คือความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 29.24 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 12 เป็น 43.13 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 15 จากนั้นเซลล์มีการเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ 30 ชั่วโมง เท่ากับ 53.54 กรัมต่อลิตรและได้ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 22.59 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 42.19 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด พบว่าน้ำตาลมีการสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่สูงมาก โดยสูงถึง 117.98 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ และเมื่อพิจารณาปริมาณยูเรียพบว่า ปริมาณยูเรียค่อนข้างคงที่หรือเริ่มถูกใช้หมดไปหลังชั่วโมงที่ 18 ทำให้เกิดการสะสมของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณมากและความเข้มข้นของน้ำตาลอาจส่งผลให้ไป

ยับยั้งการเจริญของเซลล์ ดังนั้นปริมาณยูเรียจึงเป็นสารที่จำกัดการเติบโตของเซลล์และการสร้าง P(3HB) จึงควรเพิ่มปริมาณยูเรียในสารอาหารป้อนเข้าให้มากขึ้น เพื่อให้เพียงพอต่อการนำไปใช้สร้างเซลล์และเพื่อผลิต P(3HB) ทั้งนี้จากผลพบว่าปริมาณน้ำตาลยังคงลดลง เนื่องจากถูกเซลล์นำไปใช้ในการสังเคราะห์ P(3HB) ภายใต้สถานะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปและมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน จึงเป็นผลทำให้ปริมาณ P(3HB) ยังเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ ชั่วโมงที่ 36 (รูปที่ 4.6)

จากผลการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 แบบเฟลค-แบคซ์ โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร และป้อนเพียงกากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ ชั่วโมงที่ 12 เปรียบเทียบกับการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 แบบเฟลค-แบคซ์ โดยเลี้ยงในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร และป้อนกากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวที่ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.5) พบว่า ได้ผลในแนวโน้มเดียวกับการเลี้ยงเชื้อแบบเฟลค-แบคซ์ที่ใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณ P(3HB) และความหนาแน่นของเซลล์ต่ำกว่ามาก คือ ความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุด เท่ากับ 5.07 กรัมต่อลิตรและความหนาแน่นของเซลล์ เท่ากับ 28.19 กรัมต่อลิตรที่ ชั่วโมงที่ 21 ซึ่งมีปริมาณ P(3HB) เพียง 17.99 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณเซลล์ก่อนที่จะเริ่มป้อนกากน้ำตาลมีเพียง 5.13 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ไม่มีปริมาณยูเรียเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ อีกทั้งความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในน้ำหมักที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากการป้อนกากน้ำตาลเข้าอย่างต่อเนื่อง อาจเป็นเหตุให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และสังเคราะห์ P(3HB) ได้ในปริมาณน้อย จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นก่อนเริ่มป้อนอาหารเข้าและปริมาณยูเรียในอาหาร มีผลต่อการเจริญและการสร้าง P(3HB) ของเซลล์เป็นอย่างมาก จึงเลือกใช้การเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นก่อนเริ่มป้อนอาหารที่สูง (32.48 กรัมต่อลิตร) และมีอัตราการเติบโตจำเพาะที่เหมาะสม (0.23 ต่อชั่วโมง) ที่ ชั่วโมงที่ 12 มาศึกษาการเลี้ยงเชื้อแบบเฟลค-แบคซ์ โดยป้อนกากน้ำตาลร่วมกับยูเรียในอัตราส่วนที่แตกต่างกันในการทดลองขั้นต่อไป เพื่อหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019

ตารางที่ 4.6 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรเป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 6

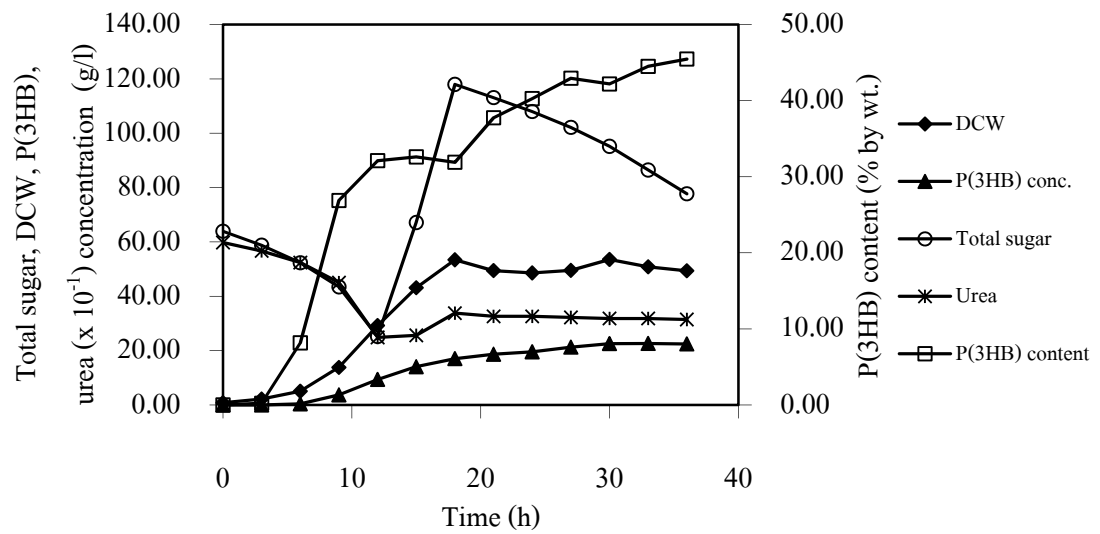
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.46	24.91	1.79	0.00	0.00
3	1.52	21.37	1.58	0.14	8.87
6	5.13	19.75	1.37	1.03	19.98
9	10.59	14.89	0.82	3.60	33.96
12	19.76	60.58	1.37	4.40	22.27
15	29.17	105.10	2.20	4.67	16.01
18	27.69	104.66	2.06	4.25	15.34
21	28.19	105.40	2.61	5.07	17.99
24	27.10	102.00	2.47	4.38	16.14
27	26.46	101.12	2.33	4.30	16.23
30	26.83	98.32	2.20	4.29	15.97
33	26.24	96.26	2.06	4.03	15.35
36	26.44	92.57	2.06	4.01	15.15



รูปที่ 4.5 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรเป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 6

ตารางที่ 4.7 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรเป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 12

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.81	63.93	5.98	0.00	0.00
3	2.19	58.78	5.67	0.01	0.23
6	5.06	52.34	5.24	0.41	8.16
9	13.82	43.46	4.50	3.71	26.88
12	29.24	25.17	2.49	9.39	32.11
15	43.13	67.15	2.56	14.06	32.61
18	53.40	117.98	3.38	17.03	31.89
21	49.43	113.11	3.26	18.66	37.74
24	48.57	107.98	3.26	19.55	40.26
27	49.52	102.15	3.22	21.26	42.94
30	53.54	95.17	3.18	22.59	42.19
33	50.83	86.47	3.18	22.62	44.50
36	49.37	77.70	3.15	22.44	45.47



รูปที่ 4.6 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรเป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 12

4.1.2.2 ผลผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้า คือ 5 10 12.5 15 และ 20 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย

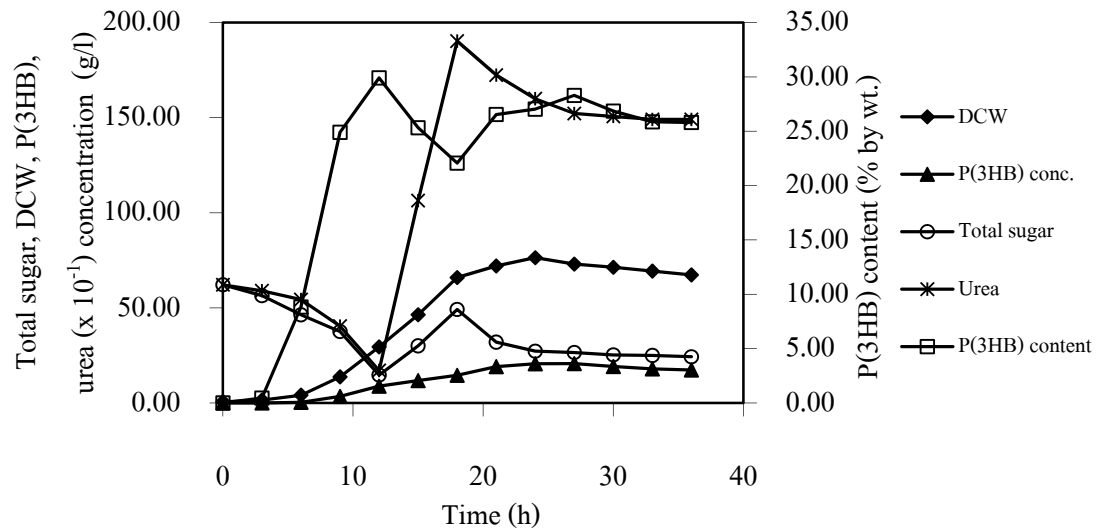
การผลัด P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 ตามวิธีการในข้อ 3.3.4.3 (ข) โดยใช้อาหารเหลว MSM ที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 350 กรัมต่อลิตรและยูเรียเป็นสารอาหารป้อนเข้าด้วยวิธี exponential feeding ที่ชั่วโมงที่ 12 เพื่อเพิ่มปริมาณความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) ซึ่งผลการวิจัยแสดงได้ดังตารางที่ 4.8-4.12 และรูปที่ 4.7-4.11 พบว่า เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 76.38 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 20.65 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.7) มีค่าอัตราการผลัด P(3HB) เท่ากับ 0.86 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และยังพบว่าได้ผลการศึกษาไปในแนวโน้มนี้นี้เกี่ยวกับการใช้กากน้ำตาลป้อนเข้าร่วมกับยูเรียในอัตราส่วน 10 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย (ตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.8) คือได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดและความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 78.12 กรัมต่อลิตร และ 25.70 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 21 ของการเลี้ยงเชื้อ ได้อัตราการผลัด P(3HB) เท่ากับ 1.22 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อทดลองให้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย (ตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.9) พบว่าได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 72.45 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 32.77 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 45.24 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ชั่วโมงที่ 21 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนการศึกษาต่อโดยเพิ่มอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเป็น 15 และ 20 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย พบว่าการศึกษาโดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 20 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย (ตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.11) สามารถเพิ่มปริมาณ P(3HB) ได้ถึง 50.73 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ชั่วโมงที่ 33 ของการเลี้ยงเชื้อ ความหนาแน่นของเซลล์และอัตราการผลัด P(3HB) เท่ากับ 59.83 กรัมต่อลิตร และ 0.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 15 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย ให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 66.33 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 22.00 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.10)

จากผลการทดลองทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.13 พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ที่ได้มีค่าลดลงเมื่อให้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้ามากขึ้น โดยเมื่อให้อัตราส่วนของคาร์บอนในสารอาหารป้อนเข้าสูงขึ้น มีผลทำให้การผลัด P(3HB) ได้ในปริมาณที่สูงขึ้นด้วย โดยสังเกตจากปริมาณ P(3HB) ที่เพิ่มขึ้นจาก 27.24 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อให้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย เป็น 50.73 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อให้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหาร

ป้อนเข้าเท่ากับ 20 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย แต่สำหรับผลการป้อนกากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 42.19 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 20 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรียนั้น อาจเนื่องจากการผลิต P(3HB) โดยป้อนกากน้ำตาลเพียงอย่างเดียว พบว่ามีแหล่งไนโตรเจนไม่เพียงพอ ซึ่งสามารถสังเกตได้จากรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรวมและปริมาณยูเรียในน้ำหมักของการทดลองที่ป้อนกากน้ำตาลเข้าเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4.6) และการป้อนกากน้ำตาลร่วมกับยูเรีย (รูปที่ 4.7-4.11) แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดว่าการป้อนเพียงกากน้ำตาลนั้น มีปริมาณไนโตรเจนไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้เพิ่มจำนวนเซลล์ มีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลรวมสะสมเพิ่มสูงขึ้นมากในน้ำหมัก เซลล์จึงนำแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ไปใช้ในการสร้างพลังงานเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ และหลังจากเซลล์ตอบสนองต่อภาวะที่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจนในขณะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปจึงเปลี่ยนวิถีไปเพื่อการสะสม P(3HB) แทน (Lee, 1996; Jiang และคณะ, 2008) แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากการป้อนกากน้ำตาลเพียงอย่างเดียวมีผลทำให้ปริมาณเซลล์น้อยที่สุด จึงส่งผลต่อปริมาณความเข้มข้นของ P(3HB) ให้ไม่สูงมากนัก และที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 20 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรียนั้น พบว่าได้ความเข้มข้นของ P(3HB) สูงถึง 30.35 กรัมต่อลิตร แต่ค่าอัตราการผลิต P(3HB) และความเข้มข้นของ P(3HB) ยังต่ำกว่าค่าที่ได้จากอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย ซึ่งมีค่ามากที่สุด คือ 1.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 32.77 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จึงใช้การป้อนสารอาหารโดยให้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรียเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิต P(3HB) ของ *B. megaterium* BA-019 ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.8 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 12

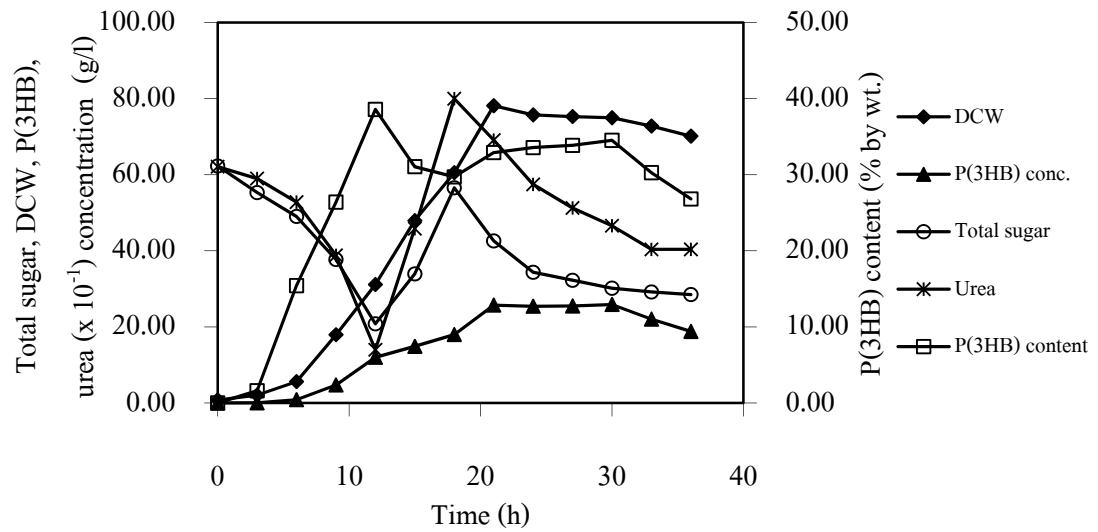
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.61	62.15	6.21	0.00	0.00
3	1.52	56.42	5.90	0.01	0.45
6	4.08	46.37	5.44	0.36	8.83
9	13.71	37.57	4.04	3.41	24.90
12	29.47	14.66	1.71	8.81	29.91
15	46.39	30.03	10.64	11.75	25.32
18	65.96	49.16	19.02	14.55	22.07
21	72.07	31.98	17.24	19.13	26.54
24	76.38	27.23	16.00	20.65	27.03
27	73.03	26.54	15.22	20.67	28.30
30	71.35	25.28	15.06	19.16	26.85
33	69.34	25.00	14.91	17.94	25.87
36	67.32	24.30	14.91	17.37	25.80



รูปที่ 4.7 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในภาคน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กาน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 12

ตารางที่ 4.9 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ ชั่วโมงที่ 12

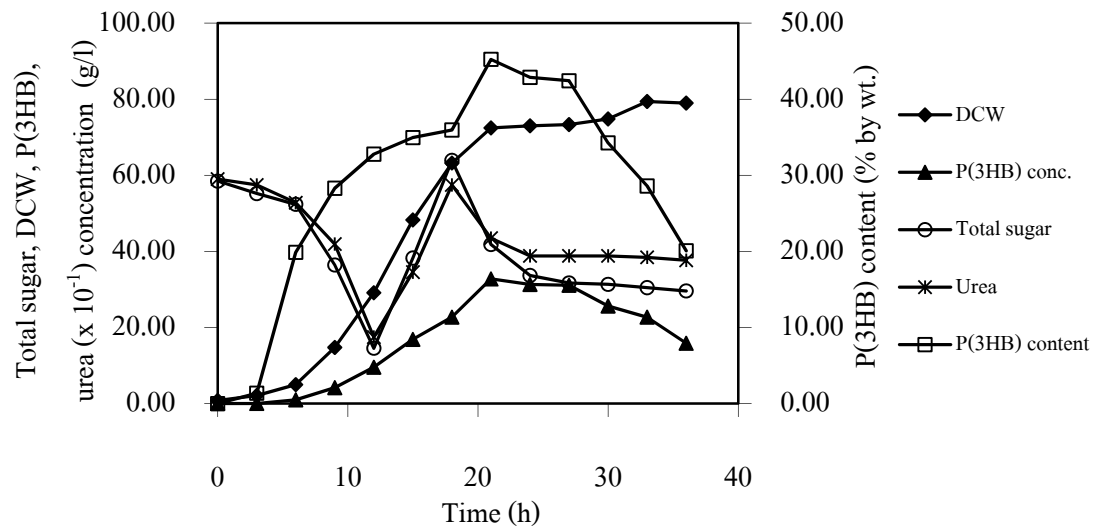
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.77	62.29	6.21	0.00	0.00
3	2.05	55.31	5.90	0.03	1.60
6	5.60	49.02	5.28	0.86	15.42
9	17.93	37.71	3.88	4.73	26.40
12	31.12	20.81	1.40	12.01	38.58
15	47.91	33.94	4.58	14.88	31.05
18	60.52	56.56	8.00	17.98	29.71
21	78.12	42.60	6.91	25.70	32.90
24	75.72	34.36	5.75	25.42	33.57
27	75.27	32.26	5.13	25.48	33.86
30	74.96	30.17	4.66	25.87	34.52
33	72.78	29.19	4.04	22.03	30.27
36	70.13	28.49	4.04	18.80	26.81



รูปที่ 4.8 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในภาคน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กาน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 กรัม น้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 12

ตารางที่ 4.10 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ ชั่วโมงที่ 12

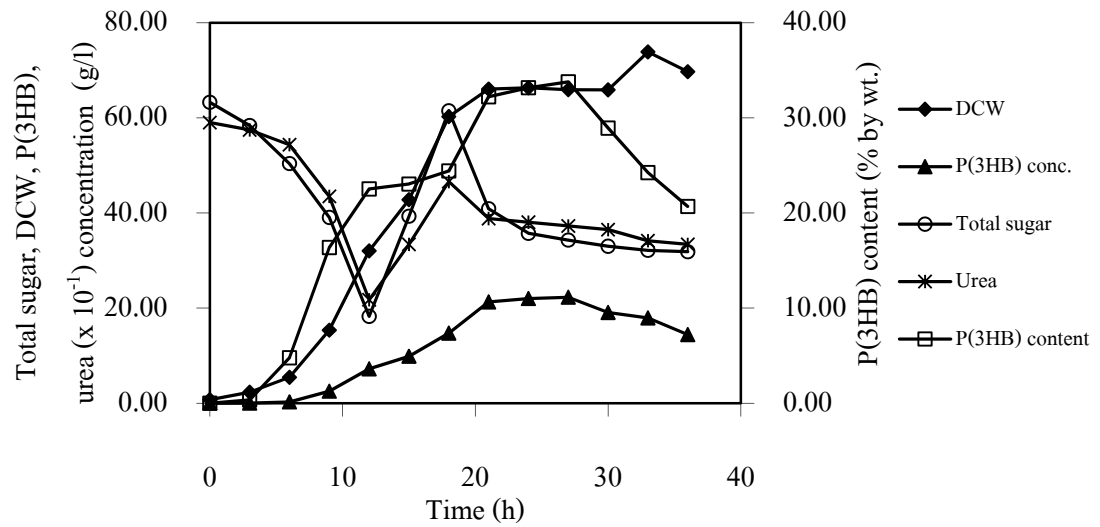
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.80	58.47	5.90	0.00	0.00
3	2.13	55.19	5.75	0.03	1.36
6	4.97	52.36	5.28	0.99	19.87
9	14.76	36.43	4.19	4.18	28.30
12	29.13	14.54	1.75	9.55	32.78
15	48.28	38.25	3.46	16.88	34.96
18	63.22	63.92	5.75	22.73	35.96
21	72.45	41.81	4.35	32.77	45.24
24	73.02	33.67	3.88	31.31	42.88
27	73.33	31.70	3.88	31.11	42.43
30	74.81	31.34	3.88	25.63	34.26
33	79.41	30.47	3.84	22.71	28.60
36	78.99	29.60	3.77	15.86	20.07



รูปที่ 4.9 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในภาคน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กาน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัม น้ำตาลต่อกรัม ยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 12

ตารางที่ 4.11 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ ชั่วโมงที่ 12

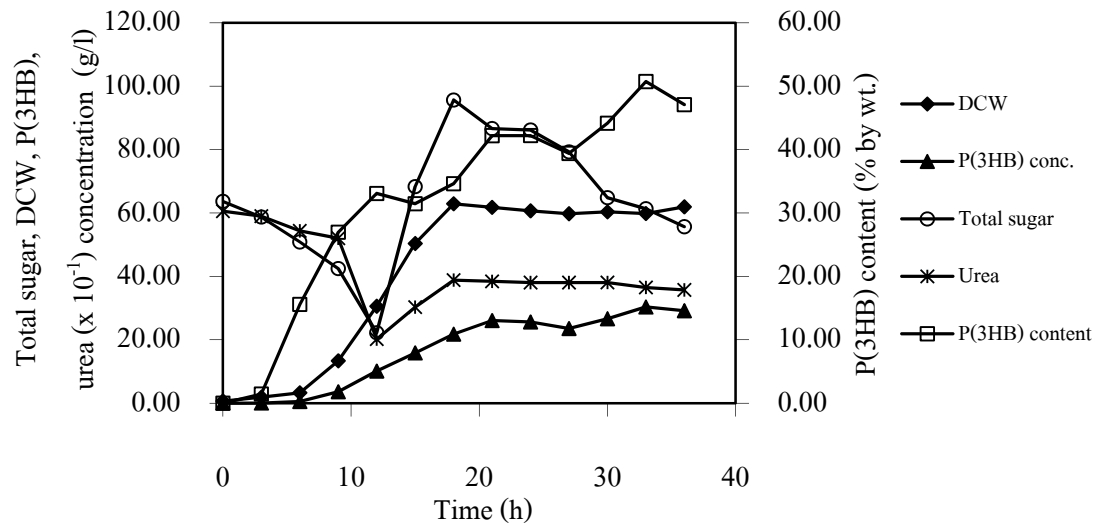
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.72	63.27	5.90	0.00	0.00
3	2.31	58.39	5.75	0.01	0.34
6	5.44	50.38	5.44	0.26	4.77
9	15.35	39.06	4.35	2.51	16.36
12	32.03	18.26	2.17	7.22	22.53
15	42.79	39.31	3.34	9.86	23.04
18	60.26	61.47	4.66	14.71	24.42
21	66.05	40.89	3.88	21.28	32.21
24	66.33	35.72	3.81	22.00	33.17
27	65.92	34.29	3.73	22.27	33.78
30	65.89	33.00	3.65	19.05	28.92
33	73.88	32.14	3.42	17.91	24.24
36	69.71	31.85	3.34	14.42	20.69



รูปที่ 4.10 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในภาคน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กาน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 12

ตารางที่ 4.12 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ ชั่วโมงที่ 12

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.66	63.65	6.06	0.00	0.00
3	1.90	58.71	5.90	0.03	1.44
6	3.28	50.86	5.44	0.51	15.57
9	13.34	42.45	5.20	3.60	26.96
12	30.57	22.23	2.02	10.11	33.08
15	50.36	68.30	3.03	15.84	31.46
18	62.91	95.62	3.88	21.78	34.62
21	61.76	86.61	3.84	26.06	42.19
24	60.69	86.17	3.81	25.61	42.20
27	59.77	79.27	3.81	23.55	39.40
30	60.34	64.81	3.81	26.64	44.15
33	59.83	61.32	3.65	30.35	50.73
36	61.94	55.66	3.57	29.16	47.09



รูปที่ 4.11 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในภาคน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กาน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20 กรัม น้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 12

ตารางที่ 4.13 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต P(3HB) ของ *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในภาคน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าต่างกันที่ชั่วโมงที่ 12

C/N weight ratio (g sugar/g urea)	Culture time (h)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)	PHB productivity (g/l-h)
5:1	24	76.38	20.65	27.03	0.86
10:1	21	78.12	25.70	32.90	1.22
12.5:1	21	72.45	32.77	45.24	1.56
15:1	24	66.33	22.00	33.17	0.92
20:1	33	59.83	30.35	50.73	0.92
Only molasses	30	53.54	22.59	42.19	0.75

4.1.2.3 ผลผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย ที่ชั่วโมงที่ 9 และ 15 ของการเลี้ยง

การทดลองในหัวข้อนี้ ใช้การผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 ตามวิธีการในข้อ 3.3.4.3 (ค) ใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่ง โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) และการเจริญของ *B. megaterium* BA-019 ที่ศึกษาได้ โดยทดลองใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 350 กรัมต่อลิตรและยูเรียเป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 9 และ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ ใช้ค่าจลนศาสตร์ของการเจริญและการผลิต P(3HB) ของการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 แบบแบคทีเรียในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.14 ในการคำนวณอัตราการป้อนสารอาหารเข้าด้วยวิธี exponential feeding

การเริ่มป้อนสารอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 9 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่ให้ค่าการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.31 ต่อชั่วโมง และมีค่าสูงกว่าค่าการเติบโตจำเพาะที่ชั่วโมงที่ 12 (0.23 ต่อชั่วโมง) รวมถึงค่า $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ และ $Y_{p/x}$ (0.97 0.36 และ 0.37 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ) สูงกว่าชั่วโมงอื่น (ตารางที่ 4.14) จากการศึกษาพบว่า ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดและความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 74.49 กรัมต่อลิตรและ 34.96 กรัมต่อลิตร (คิดเป็น 46.93 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.12) แต่เมื่อเลี้ยงแบบเฟด-แบคทีเรีย โดยเริ่มป้อนสารอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 15 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่ให้ค่าการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.11 ต่อชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 27.55 กรัมต่อลิตร และความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 67.79 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 4.16 และรูปที่ 4.13) คิดเป็นค่าอัตราการผลิต P(3HB) ได้เท่ากับ 0.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากผลการทดลองนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการป้อนอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 12 และ 15 เมื่อค่า $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, $Y_{p/x}$ และความหนาแน่นของเซลล์ก่อนเริ่มป้อนอาหารเข้าของที่ชั่วโมงทั้ง 2 มีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.14) แสดงให้เห็นว่าอัตราการเติบโตจำเพาะมีผลต่อการเจริญและการผลิต P(3HB) ของ *B. megaterium* BA-019 กล่าวคือเมื่อเพิ่มค่าการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.11 ต่อชั่วโมง (ที่ชั่วโมงที่ 15) เป็น 0.23 ต่อชั่วโมง (ที่ชั่วโมงที่ 12) มีผลทำให้เมื่อเริ่มป้อนอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 12 มีค่าการเจริญของเซลล์และปริมาณของ P(3HB) (72.45 และ 32.77 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ที่สูงกว่าเมื่อเริ่มป้อนอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 15 (67.79 และ 27.55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการป้อนอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 9 และ 12 พบว่าการป้อนอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 9 มีผลทำให้ค่าอัตราการผลิต P(3HB) เพิ่มสูงขึ้น คือ จาก 1.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงเป็น 1.66 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

เนื่องจากการป้อนสารอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 9 มีค่าการเติบโตจำเพาะที่สูงกว่าชั่วโมงอื่น และการเจริญยังอยู่ในช่วง log phase ต่างจากการป้อนอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 15 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่มีค่า

การเติบโตจำเพาะเพียง 0.11 ต่อชั่วโมงและการเจริญของเซลล์ยังอยู่ในช่วง stationary phase ทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของ P(3HB) และอัตราการผลิต P(3HB) มีค่าต่ำกว่าการป้อนอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 9 และ 12 แสดงถึงอัตราการเติบโตจำเพาะมีผลต่อการเจริญและการผลิต P(3HB) (Sun และคณะ, 2007)

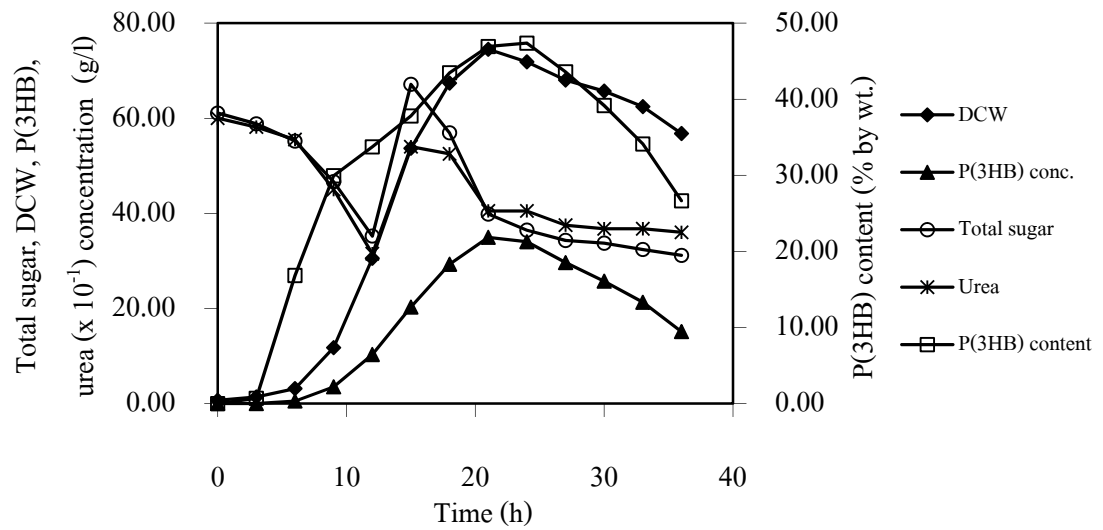
จากการศึกษาผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรียที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อพบว่า ปริมาณน้ำตาลและปริมาณยูเรียในน้ำหมักมีการสะสมสูงขึ้นหลังชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 15 ซึ่งยังเป็นช่วงที่มีการป้อนอาหารเข้าด้วยวิธี exponential feeding ดังรูปที่ 4.12 แสดงให้เห็นว่าการป้อนอาหารเข้าอยู่ในอัตราที่เกินกว่าที่เซลล์จะนำไปใช้ได้ทัน จึงทดลองแก้ปัญหานี้ด้วยการใช้อัตราการป้อนอาหารเข้าเดียวกับค่าที่ใช้ในการป้อนอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 9 แต่เริ่มป้อนอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 9.5 โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย พบว่า ความเข้มข้นของ P(3HB) เพิ่มขึ้นจากเดิม 34.96 กรัมต่อลิตร (ป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 9) เป็น 38.56 กรัมต่อลิตร (คิดเป็น 52.85 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ชั่วโมงที่ 21 ของการเลี้ยงเชื้อ อีกทั้งอัตราการผลิต P(3HB) ยังเพิ่มขึ้นจากเดิม (1.66 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) เป็น 1.84 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าเมื่อป้อนอาหารเข้าช้ากว่าเดิมไปครึ่งชั่วโมง มีผลทำให้ความเข้มข้นและอัตราการผลิต P(3HB) เพิ่มขึ้นจากเดิม แต่เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลและยูเรียที่เหลือในน้ำหมัก (ตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.14) เห็นว่ายังคงมีปริมาณของน้ำตาลและยูเรียสะสมสูงขึ้นในน้ำหมักหลังชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 15 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการป้อนอาหารเข้าด้วยวิธี exponential feeding เช่นเดียวกับผลการทดลองที่เริ่มป้อนอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 9 แสดงให้เห็นถึงการป้อนอาหารด้วยวิธีนี้อาจยังไม่เหมาะสม เนื่องจากการเจริญของ *B. megaterium* BA-019 มีการเปลี่ยนแปลงตามเวลาและภาวะอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับเวลาที่ใช้ในการผลิต P(3HB) กับจุลินทรีย์ชนิดอื่น (ตารางที่ 4.20) ด้วยเหตุนี้เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงทดลองผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 แบบเฟด-แบตช์ โดยการป้อนอาหารเข้าแบบครั้งคราวในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.14 ค่าจลนศาสตร์ของการเจริญและการผลิต P(3HB) ของการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 แบบแบตช์ ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	$Y_{p/x}$	μ (h^{-1})
9	16.215	40.02	4.167	25.699	0.97	0.36	0.37	0.31
12	32.480	15.50	8.748	26.934	0.66	0.19	0.28	0.23
15	31.530	15.34	8.493	26.935	0.62	0.18	0.28	0.11

ตารางที่ 4.15 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ ชั่วโมงที่ 9

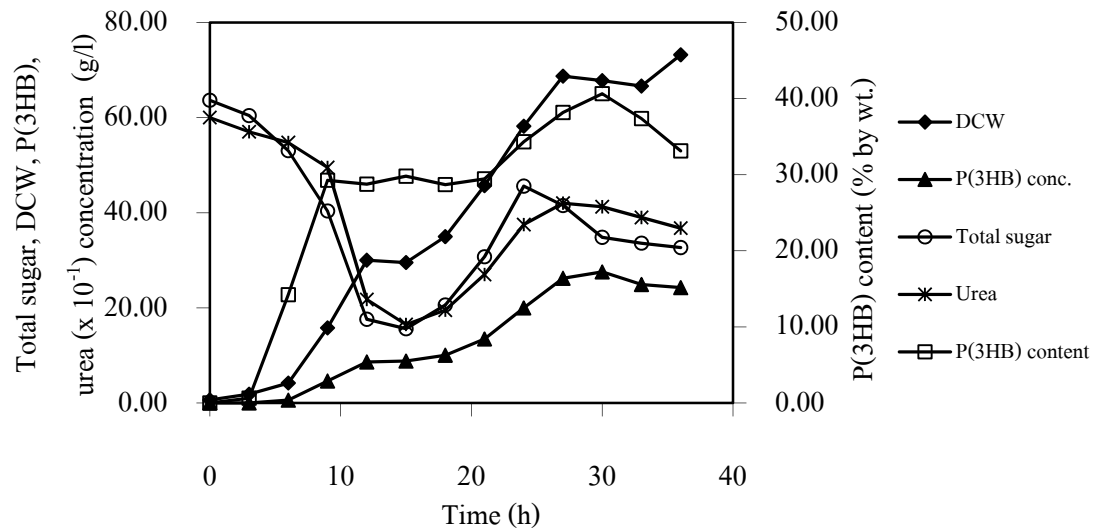
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.67	61.08	6.00	0.00	0.00
3	1.39	58.83	5.81	0.01	0.68
6	3.16	55.19	5.55	0.53	16.84
9	11.76	46.66	4.50	3.52	29.94
12	30.54	35.22	3.15	10.30	33.74
15	53.67	67.13	5.40	20.29	37.80
18	67.39	56.93	5.25	29.30	43.47
21	74.49	39.86	4.05	34.96	46.93
24	71.84	36.46	4.05	34.03	47.37
27	68.03	34.31	3.75	29.66	43.59
30	65.70	33.73	3.68	25.74	39.17
33	62.43	32.40	3.68	21.30	34.12
36	56.79	31.16	3.60	15.13	26.65



รูปที่ 4.12 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในภาคน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กาน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 9

ตารางที่ 4.16 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัม น้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ ชั่วโมงที่ 15

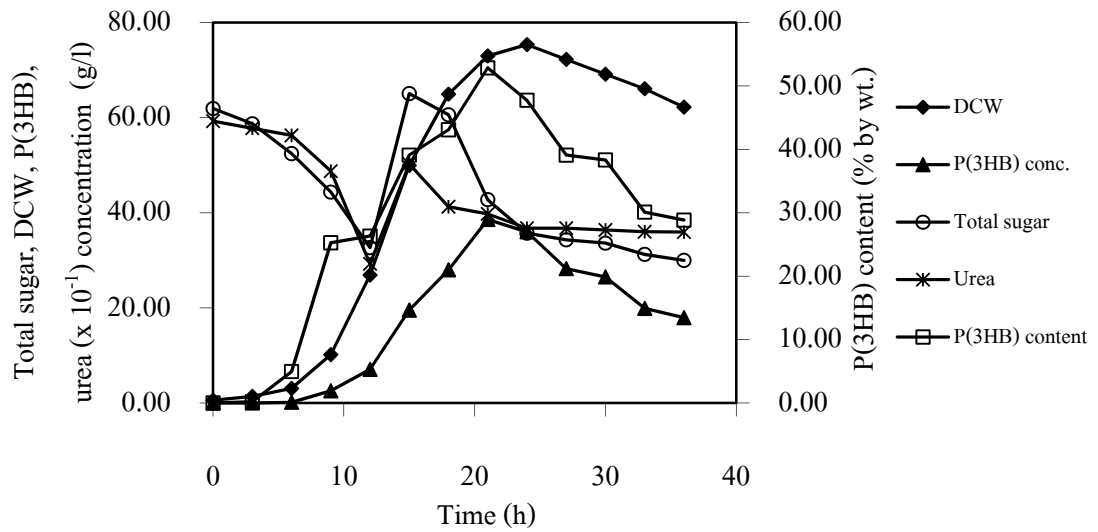
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.63	63.66	6.00	0.00	0.00
3	1.84	60.43	5.70	0.01	0.63
6	4.19	53.05	5.48	0.60	14.24
9	15.78	40.36	4.95	4.62	29.27
12	30.01	17.60	2.18	8.63	28.76
15	29.53	15.61	1.65	8.80	29.81
18	34.98	20.61	1.95	10.04	28.70
21	45.69	30.75	2.70	13.45	29.45
24	58.20	45.60	3.75	19.98	34.33
27	68.72	41.52	4.20	26.23	38.18
30	67.79	34.83	4.13	27.55	40.65
33	66.64	33.60	3.90	24.91	37.38
36	73.21	32.68	3.68	24.25	33.13



รูปที่ 4.13 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในภาคน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กาน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 15

ตารางที่ 4.17 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ ชั่วโมงที่ 9.5

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.56	61.92	5.93	0.00	0.00
3	1.39	58.72	5.78	0.00	0.20
6	3.05	52.44	5.63	0.15	4.95
9	10.16	44.35	4.88	2.57	25.27
12	26.89	32.68	2.93	7.08	26.32
15	49.94	65.06	5.03	19.52	39.09
18	64.93	60.60	4.13	27.98	43.09
21	72.97	42.75	3.98	38.56	52.85
24	75.36	35.70	3.68	35.97	47.74
27	72.24	34.31	3.68	28.24	39.09
30	69.12	33.61	3.64	26.49	38.32
33	66.07	31.25	3.60	19.88	30.09
36	62.21	29.99	3.59	17.94	28.84



รูปที่ 4.14 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในภาคน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กาน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 9.5

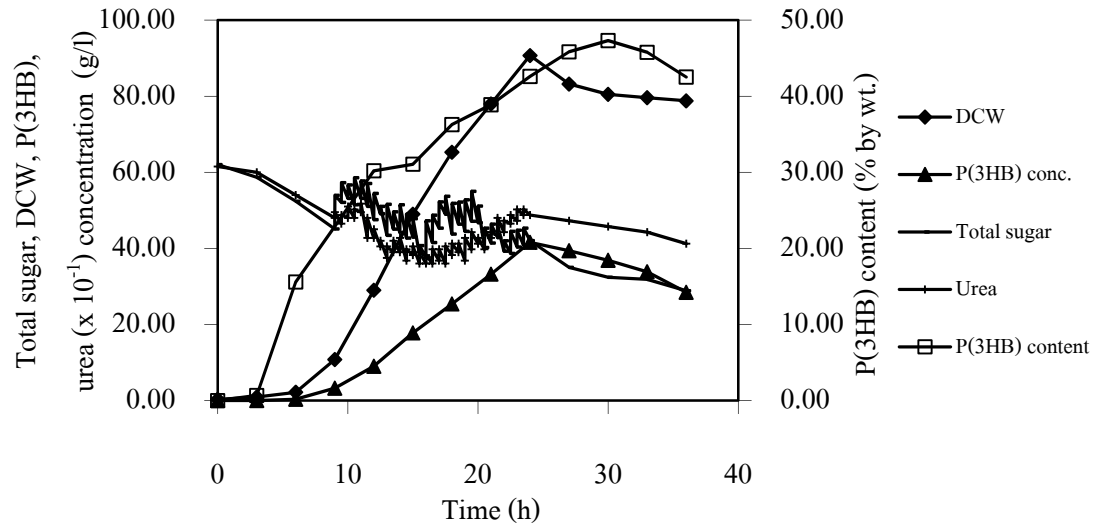
4.1.3 ผลผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 แบบเฟด-แบคซ์ โดยการป้อนกากน้ำตาล และยูเรียแบบครั้งคราว (rectangular pulse feeding)

การทดลองในขั้นนี้ ผลผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 ตามวิธีการในหัวข้อ 3.3.4.4 โดยใช้อาหารเหลว MSM ที่มีน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พิจารณาเวลาที่เริ่มป้อนอาหารเข้าจากข้อมูลที่ได้จากการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรียที่ชั่วโมงที่ 9.5 ของการเลี้ยงด้วยวิธี exponential feeding (ตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.14) พบว่าจากผลการทดลองดังกล่าว เซลล์มีการเจริญและมีการสะสม P(3HB) เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 9 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ จึงแบ่งปริมาณของอาหารที่ต้องป้อนเข้าทั้งหมดคือ 2 ลิตร เป็นส่วนๆที่เท่ากันคือ 30 ส่วน (ป้อนอาหารเข้าทุก 0.5 ชั่วโมงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ถึงชั่วโมงที่ 23.5) โดยใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย เทอาหารที่แบ่งเป็นส่วนๆลงในถังหมักทุก 0.5 ชั่วโมงและหยุดป้อนอาหารเมื่อปริมาณในถังหมักเท่ากับ 6 ลิตร เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณยูเรียที่มีในน้ำหมัก

จากการทดลองนี้แสดงผลในตารางที่ 4.18 และรูปที่ 4.15 พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 90.71 กรัมต่อลิตรและ 41.58 กรัมต่อลิตร (คิดเป็น 45.84 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นชั่วโมงหลังจากหยุดการเทอาหารลงในถังหมักพอดี (หยุดที่ชั่วโมงที่ 23.5) แสดงถึงการเจริญของเซลล์และการผลิต P(3HB) มีความสัมพันธ์กับการเติมอาหารลงไปในถังหมักที่เติมลงไปอย่างต่อเนื่อง อีกทั้งความเข้มข้นของน้ำตาลและยูเรียที่เหลืออยู่ในน้ำหมักก่อนข้างคงที่ตลอดการเลี้ยงแบบเฟด-แบคซ์ ในขณะที่เซลล์สามารถนำน้ำตาลและยูเรียที่ป้อนเข้าไปใช้ในการเจริญและการสะสม P(3HB) ได้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งบ่งบอกถึงประสิทธิภาพที่ดีของการป้อนอาหารเข้าด้วยวิธีนี้ โดยอัตราการผลิต P(3HB) ด้วยวิธีนี้ (1.73 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) จะต่ำกว่ากับการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ที่ป้อนอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 9.5 ด้วยวิธี exponential feeding เล็กน้อย (1.84 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ซึ่งแสดงผลเปรียบเทียบดังในตารางที่ 4.19 แต่เมื่อพิจารณาทั้งการเจริญ การผลิต P(3HB) รวมถึงปริมาณน้ำตาลและยูเรียที่สะสมในน้ำหมัก การป้อนอาหารเข้าด้วยวิธีนี้น่าจะเหมาะสมกว่าการป้อนอาหารเข้าด้วยวิธี exponential feeding จึงเลือกศึกษาใช้การป้อนอาหารเข้าแบบครั้งคราวนี้ทุก 0.5 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 จนถึงชั่วโมงที่ 23.5 โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย ในการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 แบบเฟด-แบคซ์ในถังหมักขนาด 90 ลิตรต่อไป ซึ่งสามารถเปรียบเทียบงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นได้ดังตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.18 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ ชั่วโมงที่ 9 แบบครึ่งครว

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.32	62.03	6.15	0.00	0.00
3	0.93	58.64	6.00	0.01	0.67
6	2.18	52.37	5.40	0.34	15.58
9	10.77	45.12	4.80	3.25	30.20
12	29.00	47.54	4.28	9.01	31.06
15	49.01	42.97	3.83	17.77	36.27
18	65.29	43.75	3.83	25.38	38.88
21	77.99	41.40	4.28	33.22	42.60
24	90.71	42.05	4.88	41.58	45.84
27	83.21	35.00	4.73	39.37	47.32
30	80.51	32.39	4.58	36.85	45.77
33	79.63	31.87	4.43	33.85	42.52
36	78.79	28.86	4.13	28.44	36.10



รูปที่ 4.15 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 9 แบบครั้งคราว

ตารางที่ 4.19 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต P(3HB) ของ *B. megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในภาคน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 12.5 ที่ชั่วโมงต่างกัน แบบเฟด-แบดจ์

Feeding strategy	Time feeding started (h)	Culture time (h)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) productivity (g/l-h)
Exponential	9	21	74.49	34.96	1.66
	12	21	72.45	32.77	1.56
	15	30	67.79	27.55	0.92
	9.5	21	72.97	38.56	1.84
Rectangular pulse	9	24	90.71	41.58	1.73

ตารางที่ 4.20 เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) โดยใช้จุลินทรีย์และเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

Strain	Carbon substrate (initial conc.)	Cultivation time (h)	Culture mode	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% DCW)	Productivity (g/l-h)	Reference
<i>B. megaterium</i> BA-019	Molasses (60 g/l)	12	Batch	32.48	8.75	26.93	0.73	งานวิจัยนี้
<i>B. megaterium</i> BA-019	Molasses (60 g/l)	24	Rectangular pulse	90.71	41.58	46.94	1.73	งานวิจัยนี้
<i>B. megaterium</i> BA-019	Molasses (20 g/l)	27	Exponential feeding	90.42	35.45	39.21	1.31	บุญฤทธิ์ เมฆศิริพร, 2551
<i>B. megaterium</i> BA-019	Molasses (20 g/l)	24	pH-stat fed-batch	72.60	30.52	42.10	1.27	อดิพล บุญเรืองถาวร, 2543
<i>B. megaterium</i> BA-019	Molasses (30 g/l)	15	Batch	9.97	3.31	33.23	0.22	ศรัญญา แก้วประดับ, 2553
<i>B. megaterium</i>	Molasses (20 g/l)	48	Batch	3.60	2.14	59.40	0.04	Gouda et al. (2001)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> A2a5	Sugarcane (20 g/l)	96	Batch	32.00	22.00	70.00	0.23	Jiang et al. (2008)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Tapioca (20 g/l)	59	Fed-batch	106.00	61.50	58.00	1.04	Kim et al. (1995)
recombinant <i>E. coli</i>	Molasses (26.5 g/l)	31.5	pH -DO-stat fed-batch	39.50	31.60	80.00	1.00	Liu et al. (1998)
<i>Wautersia eutropha</i>	Fructose (40 g/l)	48	Fed-batch	22.60	8.20	36.28	0.17	Patwardhan and Srivastava (2008)
<i>Zobellella denitrificans</i> MW1	Glycerol (15 g/l)	50	Fed-batch	81.20	54.32	66.90	1.09	Ibrahim and Steinbüchel (2009)

4.2 ผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ในถังหมักขนาด 90 ลิตร

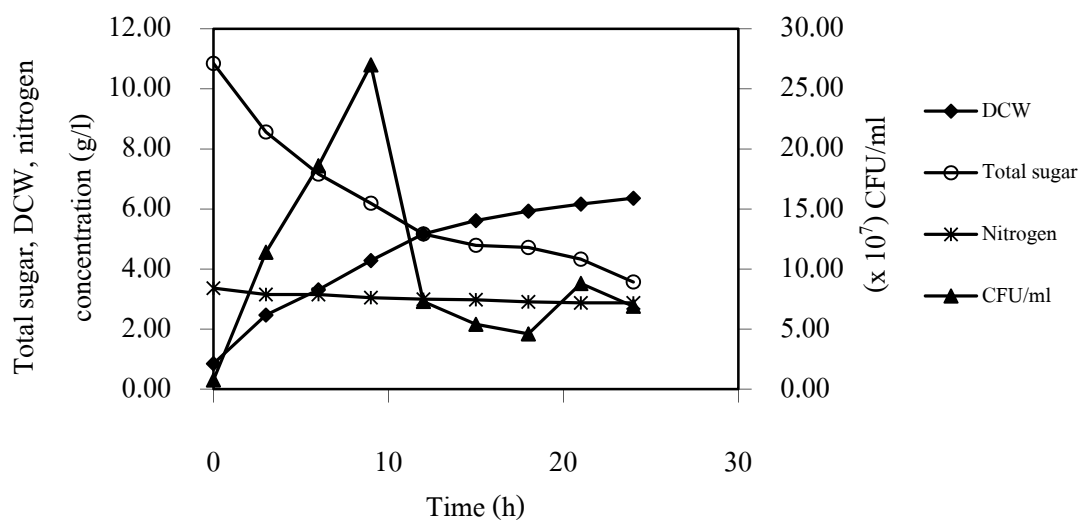
4.2.1 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต

เนื่องจากการเลี้ยงกล้าเชื้อของ *B. megaterium* BA-019 ในระดับขวดเขย่าเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (อดิพล บุญเรืองถาวร, 2543) ก่อนที่จะนำกล้าเชื้อมาถ่ายลงในถังหมัก จะต้องใช้ขวดเขย่าเป็นจำนวนมากในการเลี้ยงกล้าเชื้อให้ได้ปริมาตร 5 ลิตร เพื่อนำไปใช้ในการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 90 ลิตร และโดยส่วนใหญ่การเลี้ยงกล้าเชื้อเพื่อนำไปใช้สำหรับการขยายส่วนการผลิต มักใช้การเลี้ยงกล้าเชื้ออย่างเป็นลำดับขั้น (seed train protocol) เพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตและมีความตื่นตัว (active) ให้มากขึ้นก่อนถูกใช้เป็นกล้าเชื้อที่ได้ปริมาณเพียงพอ การทดลองนี้จึงเริ่มศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ตามวิธีในข้อ 3.3.5.1

จากผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 4.21 และรูปที่ 4.16 พบว่าเซลล์มีน้ำหนักรวมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 6.36 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อพิจารณาจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจากการนับจำนวนด้วยวิธี plate count พบว่าเซลล์เริ่มตายลงตั้งแต่หลังชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการหาน้ำหนักเซลล์แห้งจะเป็นการรวมถึงเซลล์ที่ยังมีชีวิตและไม่มีชีวิตด้วย ส่วนการทำ plate count เป็นการบ่งบอกถึงปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตเพียงอย่างเดียว โดยในการเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสมนี้ต้องการเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น และเมื่อคำนวณหาอัตราการเติบโตจำเพาะของเซลล์ก่อนชั่วโมงที่ 9 พบว่าที่ชั่วโมงที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อให้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด คือ 0.36 ต่อชั่วโมง โดยมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2.47 กรัมต่อลิตร จึงเลือกใช้การเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในถังหมักขนาด 10 ลิตร เป็นกล้าเชื้อสำหรับการเจริญและการผลิต P(3HB) ในถังหมักขนาด 90 ลิตร

ตารางที่ 4.21 การเติบโตของ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	%N	CFU/ml ($\times 10^7$)	μ (h^{-1})
0	0.85	10.85	0.34	0.76	-
3	2.47	8.56	0.32	11.40	0.36
6	3.31	7.16	0.32	18.60	0.10
9	4.29	6.19	0.30	27.00	0.09
12	5.17	5.17	0.30	7.30	0.06
15	5.62	4.79	0.30	5.40	0.03
18	5.93	4.72	0.29	4.60	0.02
21	6.17	4.33	0.29	8.80	0.01
24	6.36	3.57	0.29	6.90	0.01



รูปที่ 4.16 การเติบโตของ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

4.2.2 หาเกณฑ์คงที่ที่เหมาะสมสำหรับการขยายส่วนการผลิต P(3HB) จากถังหมัก ขนาด 10 ลิตร ไปสู่ถังหมักขนาด 90 ลิตร

สำหรับการพิจารณาการขยายส่วนนั้นจะมีเกณฑ์คงที่ที่ใช้ในการขยายส่วนถังหมักแบบ กวนในการทดลองนี้ คือ อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ความเร็วรอบของ ปลายใบพัด (impeller tip speed) และค่าเรย์โนลด์ส์นัมเบอร์ (N_{RE})

เลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 5 ลิตร (คิดเป็น 10% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในถังหมักขนาด 10 ลิตร จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อที่ เตรียมไว้ลงในถังหมักขนาด 90 ลิตรที่มีอาหารเหลวที่ใช้ในการผลิต P(3HB) ปริมาตรเท่ากับ 50 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7.0 อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที โดยให้อัตราการกวน 424 รอบต่อนาทีสำหรับการศึกษา เกณฑ์คงที่ P/V อัตราการกวน 357 รอบต่อนาทีสำหรับการศึกษาเกณฑ์คงที่ impeller tip speed และ อัตราการกวน 212 รอบต่อนาทีสำหรับการศึกษาเกณฑ์คงที่ impeller tip speed เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) ที่ผลิต ได้ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

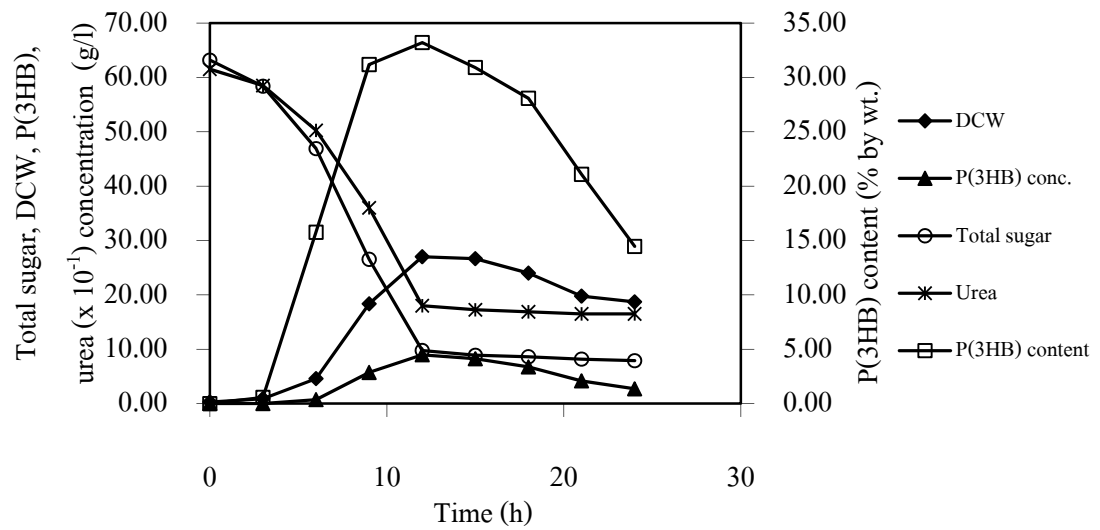
จากผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 4.22-4.24 และรูปที่ 4.17-4.19 พบว่าผลจากการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 เมื่อกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำ หมักของถังหมัก ขนาด 90 ลิตร และถังหมักขนาด 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน ได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและ ปริมาณ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 27.02 กรัมต่อลิตรและ 8.97 กรัมต่อลิตร (คิดเป็น 33.21 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 4.22 และรูปที่ 4.17) ส่วนผลจากการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 เมื่อกำหนดให้ค่าความเร็วรอบของปลายใบกวน ของถังหมักขนาด 90 ลิตร และถังหมักขนาด 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน ได้ค่าความหนาแน่นของเซลล์ สูงสุดเท่ากับ 35.60 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 9.54 กรัมต่อลิตรที่ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 4.23 และรูปที่ 4.18) และเมื่อกำหนดให้ค่าเรย์โนลด์์ของ ถังหมักขนาด 90 ลิตรและถังหมักขนาด 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน พบว่า เซลล์มีการเจริญในช่วง lag phase ที่ยาวนานมาก ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ลดลงอย่างมากเมื่อ เทียบกับเมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก และความเร็วรอบของปลายใบ กวน โดยความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 4.04 กรัมต่อลิตรและความหนาแน่นของเซลล์ เท่ากับ 13.87 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 4.24 และรูปที่ 4.19) ทั้งนี้อาจ เนื่องจากการให้อัตราการกวนเพียง 212 รอบต่อนาที ทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายไม่เพียงพอต่อ การนำไปใช้ในการเจริญและการสร้าง P(3HB) ให้เพิ่มขึ้นได้ สอดคล้องกับ Einsele (1978) ที่ รายงานไว้ว่าการขยายส่วนโดยใช้ค่าเรย์โนลด์์นัมเบอร์เป็นเกณฑ์คงที่ มักไม่ค่อยประสบ

ความสำเร็จ ซึ่งเมื่อจะพิจารณาเกณฑ์คงที่เหมาะสมสำหรับการขยายส่วนการผลิต P(3HB) จากถังหมักขนาด 10 ลิตรมาสู่ถังหมักขนาด 90 ลิตร สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.25

เมื่อนำผลที่ได้จากการขยายส่วนโดยใช้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก ความเร็วรอบปลายใบพัด และค่าเรย์โนลด์นัมเบอร์ เป็นเกณฑ์คงที่ มาเปรียบเทียบกับการผลิต P(3HB) ในถังหมักขนาด 10 ลิตร สามารถสรุปได้ดังในตารางที่ 4.25 ซึ่งพบว่าค่าทางจลนศาสตร์ ได้แก่ค่า $Y_{X/S}$ $Y_{P/S}$ $Y_{P/X}$ และอัตราการผลิต P(3HB) ของเกณฑ์คงที่ความเร็วรอบปลายใบพัด (ให้อัตราการกวนที่ 357 รอบต่อนาที) มีค่าใกล้เคียงกับค่า $Y_{X/S}$ $Y_{P/S}$ และ $Y_{P/X}$ ของการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตรมากที่สุด อีกทั้งยังให้ค่าอัตราการผลิต P(3HB) ที่สูงขึ้นจากเดิม 0.73 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เป็น 0.80 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงอีกด้วย ซึ่งหากเปรียบเทียบการใช้ความเร็วรอบของปลายใบพัดกับอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักเป็นเกณฑ์คงที่ การใช้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักเป็นเกณฑ์คงที่ ต้องให้อัตราการกวนถึง 424 รอบต่อนาที ย่อมเปลืองพลังงานมากกว่าการให้อัตราการกวนที่ 357 รอบต่อนาที อีกทั้งการให้อัตราการกวนสูงถึง 424 รอบต่อนาทีในระหว่างเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน มีผลทำให้เกิดฟองในถังหมักเป็นปริมาณมาก ซึ่งน่าจะเป็นปัญหาต่อการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 แบบเฟด-แบดซ์ อีกทั้งการป้อนสารลดฟองแบบอัตโนมัติในปริมาณที่มากขึ้นจึงอาจมีผลต่อการได้รับออกซิเจนเข้าไปในเซลล์น้อยลง ทำให้ *B. megaterium* BA-019 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) มีกิจกรรมภายในเซลล์ลดต่ำลง จึงเลือกใช้เกณฑ์คงที่ความเร็วรอบปลายใบพัดในการขยายส่วนการผลิต P(3HB) จากถังหมักขนาด 10 ลิตร ไปสู่ถังหมักขนาด 90 ลิตร โดยการเลี้ยงแบบเฟด-แบดซ์ ป้อนกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) ที่ชั่วโมงที่ 9 แบบครั้งคราว ในการศึกษาขั้นต่อไป และเมื่อเปรียบเทียบงานวิจัยนี้กับบุญฤทธิ์ เมฆศิริพร (2551) ที่มีการขยายส่วนการผลิต P(3HB) จากถังหมักขนาด 10 ลิตร ไปสู่ถังหมักขนาด 300 ลิตรแบบแบดซ์ ยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก อาจเนื่องมาจากยังขาดการศึกษาการเตรียมกล้าเชื้ออย่างเป็นลำดับขั้นที่เหมาะสม คือเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 จากบนอาหารแข็งเอียง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85%) แล้วเทเซลล์แขวนลอยลงในอาหารซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 10 ลิตร (ขาดการเลี้ยงกล้าเชื้อในระดับขวดเขย่า) อีกทั้งเมื่อขยายส่วนการผลิต P(3HB) มีการลดปริมาณกล้าเชื้อจาก 10% เป็น 5% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องด้วยขีดจำกัดของขนาดถังหมักที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการในการเตรียมกล้าเชื้อ และเป็นการขยายส่วนการผลิต P(3HB) ที่มีปริมาณแตกต่างกันมากเกินไป ทำให้มีโอกาสเกิดข้อผิดพลาดในการขยายส่วนการผลิตได้ (Wiseman, 1983)

ตารางที่ 4.22 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ *B. megaterium* BA-019 เมื่อให้อัตราการกวนที่ 424 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมักขนาด 90 ลิตร (กำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ของถังหมัก 90 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน)

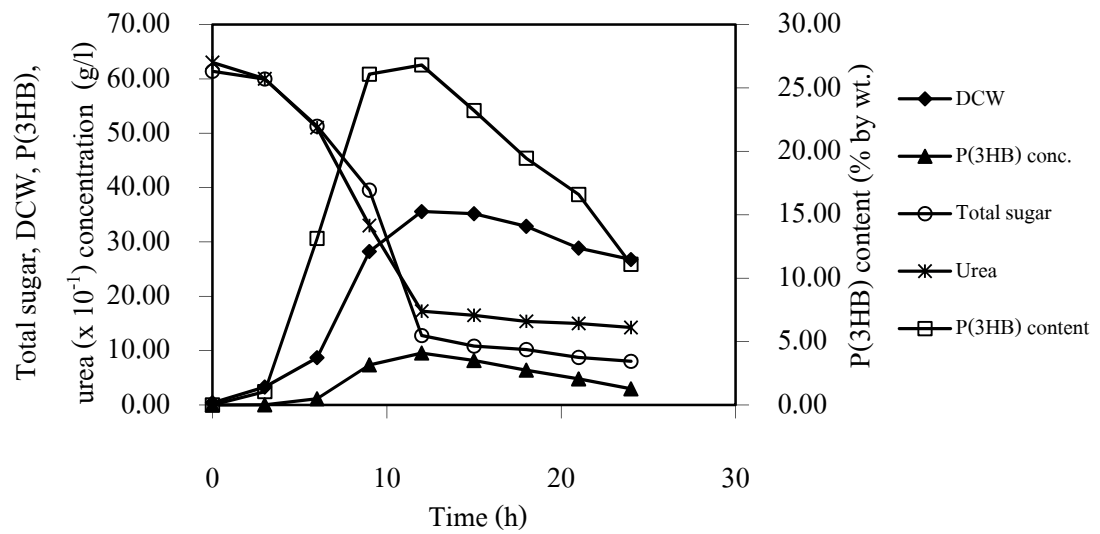
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.28	63.19	6.15	0.00	0.00
3	0.90	58.39	5.85	0.01	0.57
6	4.58	46.91	5.03	0.72	15.76
9	18.35	26.54	3.60	5.72	31.19
12	27.02	9.76	1.80	8.97	33.21
15	26.66	8.89	1.73	8.24	30.92
18	24.01	8.61	1.69	6.74	28.08
21	19.77	8.18	1.65	4.17	21.09
24	18.71	7.89	1.65	2.71	14.46



รูปที่ 4.17 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 90 ลิตร เมื่อให้อัตรา
 กวนที่ 424 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที
 (กำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ของถังหมัก 90 ลิตร และถัง
 หมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน)

ตารางที่ 4.23 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ *B. megaterium* BA-019 เมื่อให้อัตราการกวนที่ 357 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมักขนาด 90 ลิตร (กำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) ของถังหมัก 90 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน)

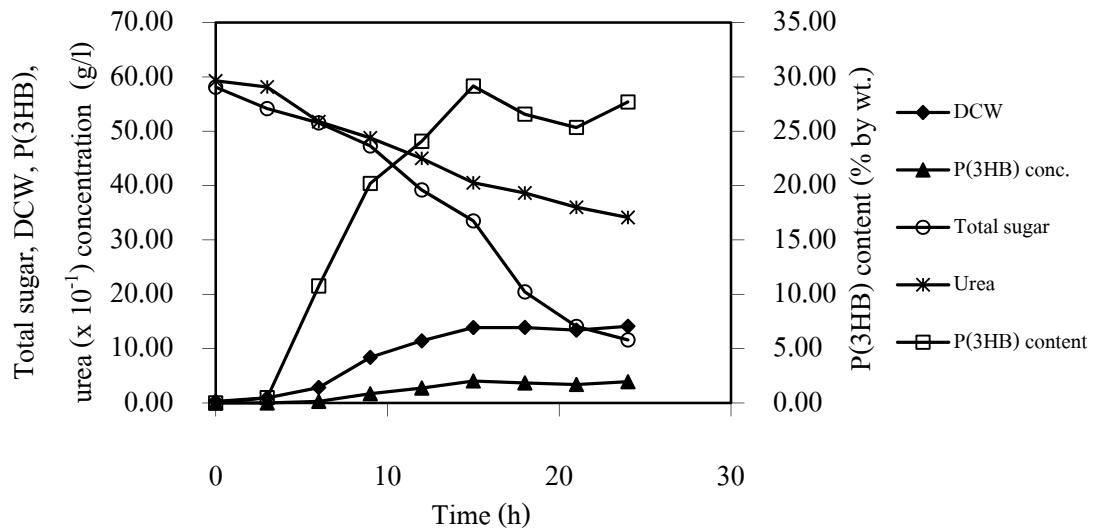
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.39	61.40	6.30	0.00	0.00
3	3.29	59.97	6.00	0.03	1.05
6	8.70	51.29	5.10	1.14	13.13
9	28.24	39.52	3.30	7.37	26.08
12	35.60	12.77	1.73	9.54	26.81
15	35.20	10.83	1.65	8.17	23.22
18	32.88	10.19	1.54	6.40	19.45
21	28.87	8.75	1.50	4.79	16.60
24	26.76	8.03	1.43	2.97	11.10



รูปที่ 4.18 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 90 ลิตร เมื่อให้อัตรากวนที่ 357 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (กำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) ของถังหมัก 90 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน)

ตารางที่ 4.24 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ *B. megaterium* BA-019 เมื่อให้อัตราการกวนที่ 212 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในถังหมักขนาด 90 ลิตร (กำหนดให้ค่าเรย์โนลด์์นัมเบอร์ (N_{RE}) ของถังหมัก 90 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน)

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.31	58.10	5.93	0.00	0.00
3	0.94	54.16	5.81	0.00	0.49
6	2.84	51.53	5.18	0.31	10.76
9	8.39	47.30	4.88	1.69	20.20
12	11.42	39.20	4.50	2.75	24.07
15	13.87	33.50	4.05	4.04	29.15
18	13.89	20.44	3.86	3.69	26.57
21	13.40	14.09	3.60	3.40	25.34
24	14.11	11.61	3.41	3.91	27.69



รูปที่ 4.19 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 90 ลิตร เมื่อให้อัตรา
 กวนที่ 212 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที
 (กำหนดให้ค่าเรย์โนลด์์นัมเบอร์ (N_{RE}) ของถังหมัก 90 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน)

ตารางที่ 4.25 เปรียบเทียบค่าจลนศาสตร์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 90 ลิตร เมื่อผลิต P(3HB) ที่กำหนดเกณฑ์การขยายส่วนลงที่เหมือนในถังหมักขนาด 10 ลิตร

Fermentor (l)	Agitation rate (rpm)	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	P(3HB) productivity (g/l-h)
10	600	0.66	0.19	0.28	0.73
90	424 ^a	0.50	0.17	0.34	0.75
	357 ^b	0.72	0.20	0.27	0.80
	212 ^c	0.55	0.16	0.30	0.27

- a คือ ความเร็วรอบของใบกวนเมื่อกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ของถังหมักขนาด 90 ลิตรและถังหมักขนาด 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน
- b คือ ความเร็วรอบของใบกวนเมื่อกำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) ของถังหมักขนาด 90 ลิตรและถังหมักขนาด 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน
- c คือ ความเร็วรอบของใบกวนเมื่อกำหนดให้ค่าเรย์โนลด์์นัมเบอร์ (N_{RE}) ของถังหมักขนาด 90 ลิตรและถังหมักขนาด 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน

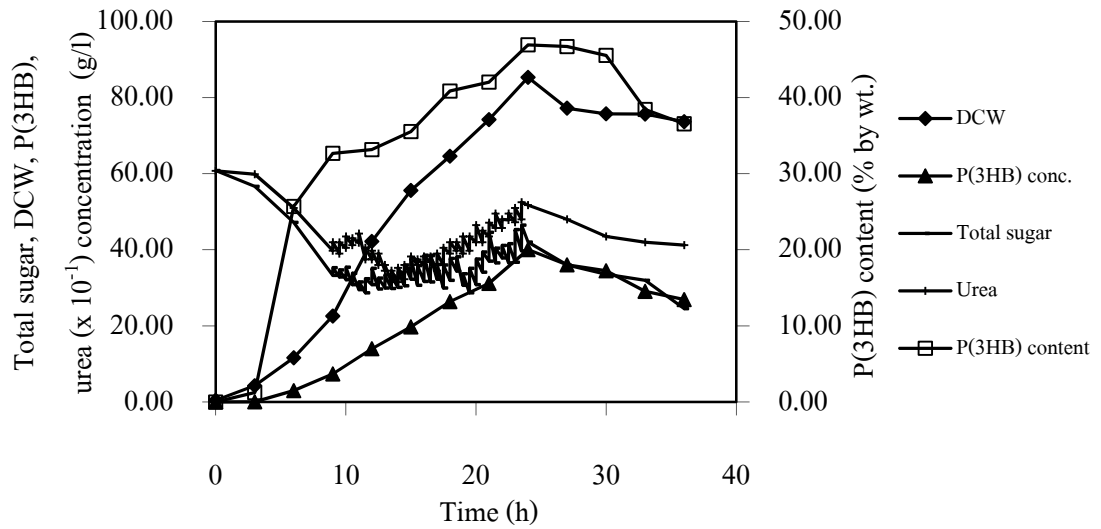
4.2.3 ผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงแบบเฟด-แบดจ์

เลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ตามวิธีการในข้อ 3.3.5.3 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในถังหมักขนาด 10 ลิตร จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ลงในถังหมักขนาด 90 ลิตรที่มีอาหารเหลวที่ใช้ในการผลิต P(3HB) ปริมาตรเท่ากับ 40 ลิตร โดยให้อัตราการกวน 357 รอบต่อนาที (เกณฑ์คงที่ impeller tip speed ที่ศึกษาได้) ในการเลี้ยงแบบเฟด-แบดจ์ โดยแบ่งปริมาณของอาหารที่ต้องป้อนเข้าทั้งหมดคือ 20 ลิตร เป็นส่วนๆที่เท่ากันคือ 30 ส่วน (ป้อนอาหารเข้าและเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณยูเรียในน้ำหมักทุก 0.5 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ถึงชั่วโมงที่ 23.5) โดยใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย เทอาหารที่แบ่งเป็นส่วนๆลงในถังหมักทุก 0.5 ชั่วโมง และหยุดป้อนอาหารเมื่อปริมาณในถังหมักเท่ากับ 60

การทดลองนี้แสดงผลได้ดังตารางที่ 4.26 และรูปที่ 4.20 พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 85.33 กรัมต่อลิตรและ 40.06 กรัมต่อลิตร (คิดเป็น 46.94 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณยูเรียที่เหลือในน้ำหมักก่อนข้างคงที่ตลอดการเลี้ยงแบบเฟด-แบดจ์ ในขณะที่จากการทดลองพบว่า เซลล์ยังมีการเจริญและการสะสม P(3HB) ที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง สัมพันธ์กับการเติมอาหารลงไปในถังหมัก เช่นเดียวกับการเลี้ยงเชื้อแบบเฟด-แบดจ์ ที่มีการป้อนอาหารแบบครั้งคราว ในถังหมักขนาด 10 ลิตร (ตารางที่ 4.18 และรูปที่ 4.15) ซึ่งชี้ให้เห็นถึงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้า วิธีการป้อนอาหาร และเกณฑ์คงที่ที่เหมาะสมสำหรับการขยายส่วนการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 จากถังหมักขนาด 10 ลิตรไปสู่ถังหมักขนาด 90 ลิตร ส่งผลให้การเจริญของเซลล์ ปริมาณ P(3HB) และอัตราการผลิต P(3HB) ในถังหมักทั้ง 2 ขนาดมีค่าใกล้เคียงกัน โดยสามารถเปรียบเทียบผลการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 10 ลิตรและ 90 ลิตร แบบแบดจ์และแบบเฟด-แบดจ์ ได้ดังตารางที่ 4.27

ตารางที่ 4.26 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 90 ลิตร เมื่อกำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) ของถังหมัก 90 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน โดยเริ่มป้อนกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัม น้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) ที่ชั่วโมงที่ 9 แบบครั้งคราว

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.42	60.83	6.08	0.00	0.00
3	4.29	56.67	5.99	0.05	1.24
6	11.63	47.20	5.10	2.99	25.69
9	22.59	33.28	3.98	7.38	32.68
12	42.20	30.84	3.75	14.00	33.17
15	55.60	32.28	3.45	19.76	35.54
18	64.60	31.99	3.90	26.40	40.87
21	74.22	37.01	4.35	31.20	42.04
24	85.33	42.03	5.18	40.06	46.94
27	77.23	36.01	4.80	36.08	46.72
30	75.74	33.57	4.35	34.50	45.55
33	75.69	31.99	4.20	29.10	38.45
36	73.66	24.53	4.13	26.93	36.56



รูปที่ 4.20 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 90 ลิตร เมื่อกำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัด (impeller tip speed) ของถังหมัก 90 ลิตร และถังหมัก 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน โดยเริ่มป้อนกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 350 กรัมต่อลิตรและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัม น้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) ที่ชั่วโมงที่ 9 แบบครั้งคราว

ตารางที่ 4.27 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต P(3HB) ของ *B. megaterium* BA-019 แบบแบคทีเรียและแบบเฟด-แบคทีเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 12.5 ที่ชั่วโมงที่ 9 แบบครึ่งคร่าว) ในถังหมักขนาด 10 ลิตร และ 90 ลิตร โดยใช้อาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร

Fermentor (l)	Culture mode	Culture time (h)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) productivity (g/l-h)
10 ^a	Batch	12	32.48	8.75	0.73
	Fed-batch	24	90.71	41.58	1.73
90 ^b	Batch	12	35.60	9.54	0.80
	Fed-batch	24	85.33	40.06	1.67

a คือ ให้ความเร็วรอบของใบกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

b คือ ให้ความเร็วรอบของใบกวนเท่ากับ 357 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (เมื่อกำหนดให้ความเร็วรอบของปลายใบพัดของถังหมักขนาด 90 ลิตรและถังหมักขนาด 10 ลิตรมีค่าเท่ากัน)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 ในระดับห้องปฏิบัติการไปสู่ระดับนาร่อง โดยการเลี้ยงแบบเฟด-แบคต์ที่ใช้กากน้ำตาลและยูเรีย เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก จากการศึกษาในถังหมักขนาด 10 ลิตรแบบแบคต์ ที่เพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลและเพิ่มปริมาณยูเรียตามอัตราส่วนเดิมในสูตรอาหารที่ใช้ในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัย เพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์เริ่มต้นก่อนที่จะเริ่มป้อนอาหารเข้าในการเลี้ยงแบบเฟด-แบคต์ให้มากขึ้น พบว่า การผลิต P(3HB) โดยใช้อาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตรเหมาะสมที่สุดต่อการผลิต P(3HB) แบบเฟด-แบคต์ โดยการป้อนอาหารเข้าแบบครั้งคราวและใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย เริ่มป้อนอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง ควบคุมอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที มีผลทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของ P(3HB) และอัตราการผลิต P(3HB) เพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับหมักแบบไม่มีการป้อนสารอาหาร คือได้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 32.48 กรัมต่อลิตรในการเลี้ยงแบบแบคต์ เป็น 90.71 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณ P(3HB) เพิ่มขึ้นจาก 8.75 กรัมต่อลิตรในการเลี้ยงแบบแบคต์ เป็น 41.58 กรัมต่อลิตร จึงใช้การป้อนอาหารแบบครั้งคราวนี้ไปใช้ในการขยายส่วนการผลิต P(3HB) แบบเฟด-แบคต์ โดยการศึกษาเกณฑ์คงที่ที่เหมาะสม 3 ค่า สำหรับการขยายส่วนจากถังหมักขนาด 10 ลิตรไปสู่ถังหมักขนาด 90 ลิตร ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก ความเร็วรอบของปลายใบพัด และค่าเรย์โนลด์นัมเบอร์ พบว่า การขยายส่วนการผลิต P(3HB) โดย *B. megaterium* BA-019 จากถังหมักขนาด 10 ลิตรไปสู่ถังหมักขนาด 90 ลิตร ในการเลี้ยงแบบเฟด-แบคต์ของงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ เมื่อใช้ความเร็วรอบปลายใบกวนเป็นเกณฑ์คงที่ในการขยายส่วนโดยให้อัตราการกวนเท่ากับ 357 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และเมื่อเปรียบเทียบผลการผลิต P(3HB) กับงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 ในงานวิจัยนี้มีค่าอัตราการผลิต P(3HB) ที่สูงกว่า จึงเป็นข้อได้เปรียบและเหมาะสม อาจนำไปสู่ความเป็นไปได้ในการผลิต P(3HB) ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

โดยอาจมีปัจจัยอื่นที่ต้องพิจารณา เช่น ขีดจำกัดในการปั่นกวนของถังหมักและขนาดของมอเตอร์ที่ใช้ในแต่ละเครื่อง (Juncker, 2004) อีกทั้งองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น กากน้ำตาลที่ใช้ ซึ่งในการผลิตแต่ละครั้งมีความแตกต่างกันขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ ฤดูกาล สภาพดิน การเก็บรักษาและกรรมวิธีการผลิตของโรงงาน โดยงานวิจัยในขั้นต่อไปอาจเป็นการศึกษาถึงการสกัด

P(3HB) ออกจากเซลล์และทำ P(3HB) ให้บริสุทธิ์ โดยศึกษาหาวิธีที่มีประสิทธิภาพและมีราคาถูกลง เพื่อให้ได้ P(3HB) เป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติเหมาะสม สามารถนำไปขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้ตามต้องการ ซึ่งหลังจากการแยกเอาตัวเซลล์ที่มีการสะสม P(3HB) ออกจากน้ำหมักแล้ว อาจนำน้ำหมักที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเหลืออยู่ (ประมาณ 30 กรัมต่อลิตร) ไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น การทำน้ำหมักชีวภาพ (Effective Microorganisms; EM) หรืออาจนำไปทำปุ๋ยได้อีกด้วย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กุสุมา กมลจรัสโสภา. 2547. การผลิตกรดอาร์(-)-3-ไฮดรอกซีบีวไทริกโดยการดีพอลิเมอไรเซชันในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บุญฤทธิ์ เมฆศิริพร. 2551. การขยายส่วนการผลิตพอลิไฮดรอกซีบีเวรีด โดย *Bacillus megaterium* BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ผู้จัดการออนไลน์. 2550. บราซิลเห็นโอกาส “พลาสติกชีวภาพ” คาดตลาดได้ 100 ล้านๆ ตัน/ปี [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.arda.or.th/news_20070604/บราซิลเห็นโอกาส.pdf [2550, พฤศจิกายน 1].
- ปกรณ์ โอภาประกาศิต และมณฑนา โอภาประกาศิต. 2551. พอลิเมอร์ วัสดุเอนกประสงค์ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.vcharkarn.com/varticle/18774> [2551, มีนาคม 13]
- ปริญญาค์ วงศ์ปราชญ์. 2547. การปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดย *Saccharomyces cerevisiae* ในการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัตนศิริ มุทิตากุล. 2538. การผลิตพอลิบีต้าไฮดรอกซีบีเวรีดโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ที่แยกได้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศรีัญญา แก้วประดับ. 2553. การผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิ(3-ไฮดรอกซีบีวไทรเวรีด) จากน้ำอ้อยโดย *Bacillus megaterium* BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สังศรี กุลปรีชา. 2536. การผลิตพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้โดยธรรมชาติจากจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุดา สุภาชวินสวัสดิ์. 2542. ผลของยับยั้งสเตรททอส์คส่วนของของ 3-ไฮดรอกซีบิวเลอเรดในพอลิ(3-ไฮดรอกซีบีวไทรเวรีด-โค-3-ไฮดรอกซีบิวเลอเรด) ซึ่งผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2550. กากน้ำตาล [ออนไลน์]. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เทคโนโลยี. แหล่งที่มา: http://www.tistr.or.th/t/publication/page_area_show_bc.asp?i1=83&i2=15 [2550, ธันวาคม 4]
- อดิพล บุญเรืองถาวร. 2543. การผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดยการเพาะเลี้ยง *Bacillus sp* BA-019 แบบป้อนเป็นงวดภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อรสา อ่อนจันทร์. 2549. มหัศจรรย์ “พลาสติก” [ออนไลน์]. กรมวิทยาศาสตร์บริการกระทรวงวิทยาศาสตร์. แหล่งที่มา: <http://www.vcharkarn.com/varticle/331> [2551, มีนาคม 13]

ภาษาอังกฤษ

- Anderson, A.J., and Dawes, E.A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol. Rev. 54:450-472.
- A.O.A.C. 1975. Official Methods of Analysis. 12th ed. Washington: The Association of Official Analytical Chemists.
- Aiba, S., Humphrey, A. E., and Millis, N. F. 1973. Biochemical Engineering. Japan: Academic Press. Inc.
- Asenjo, J.A., and Merchuk, J.C. (ed). 1995. Bioreactor system design. Marcel Dekkar. Inc.
- Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S., and Goulet, J. 1995. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. Appl. Environ. Microbiol. 61:165-169.
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., and Welander, T. 2008. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. Bioresource Technol. 99:509-516.
- Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W., and Fuller, R.C. 1990. Plastic from bacterial: Poly(β -hydroxyalkanoates) as natural biocompatible and biodegradable polymers. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 41:77-93.
- Braunegg, G., Lefebvre, G., and Genser, K.F. 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiology and engineering aspects. J. Biotechnol. 65:127-161.
- Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. Tibtech. 5:246-250.

- Chen, G.Q. (ed). 2010. Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications. Heidelberg: Springer Verlag
- Chen, G.Q., and Wu, Q. 2005. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Biomaterials. 26:6565-6578.
- Chen, G.Q., Konig, K.H., and Lafferty, R.M. 1991. Occurrence of poly-(D)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. FEMS Microbiol. Lett. 84:173-176.
- Choi, J., and Lee, S.Y. 1997. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. Bioproc. Eng. 17:335-342.
- Choi, J., and Lee, S.Y. 1999. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. App. Microbiol. Biotechnol. 51:13-21.
- Comeau, Y., Hall, K.J., and Oldham, W.K. 1988. Determination of poly- β -hydroxybutyrate and poly- β -hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography. Appl. Environ. Microbiol. 54:2325-2327.
- Dawes, E.A., and Senior, P.J. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. Adv. Microbiol. Physio. 10:203-206.
- Doi, Y. (ed). 1990. Microbial polyesters. VCH. New York.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.
- Einsele, A. 1978. Scaling-up bioreactors. Process Biochem. 7:13-14.
- Evan, D.J., and Sikadr, K.S. 1990. Biodegradable Plastic. Chemtech. 5:38-42.
- Gouda, M.K., Swellam, A.E., and Omar, S.H. 2001. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. Microbiol. Res. 156:201-207.
- Groom, C.A., Luong, J.H.T., and Mulchandani, A. 1998. On-line culture fluorescence measurement during the batch cultivation of poly- β -hydroxybutyrate producing *Alcaligenes eutrophus*. J. Biotechnol. 8:271-278.
- Hejazi, P., Vasheghani-Farahani, E., and Yamini, Y. 2003. Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly(beta-hydroxybutyrate) recovery. Biotechnol. Prog. 19:1519-1523.
- Ibrahim, M.H.A., and Steinbüchel, A. 2009. Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. Appl. Environ. Microb. 75:6222-6231.

- Jiang, Y., Song, X., Gong, L., Li, P., Dai, C., and Shao, W. 2008. High poly(β -hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates. Enzyme Microb. Technol. 42:167-172.
- Junker, B.H. 2004. Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation process. J. Biosci. Bioeng. 97:347-364.
- Kapritchkoff, F.M., Viotti, A.P., Alli, R.C.P., Zuccolo, M., Pradella, J.G.C., Maiorano, A.E., Miranda, E.A., and Bonomi, A. 2006. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. J. Biotechnol. 122:453-462.
- Keshavarz, T., and Roy, I. 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. Curr. Opin. Microbiol. 13:1-6.
- Khosravi-Darani, K., Vasheghani-Farahani, E., Shojaosadati, S.A., and Yamini, Y. 2004. Effect of process variables on supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* cells for poly(R-hydroxybutyrate) recovery. Biotechnol. Prog. 20:1757-1765.
- Kim, B.S., Lee, S.Y., and Chang, H.N. 1992. Production of poly- β -hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol. Lett. 14:811-816.
- Kim, B.S., Lee, S.Y., and Chang, H.N. 1995. Control of glucose feeding using exit gas data and its application to the production of PHB from tapioca hydrolysate by *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnol. Tech. 9:311-314.
- Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., and Thongchul, N. 2009. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. J. Biosci. Bioeng. 107:240-245.
- Lafferty, R.M., Korsatko, B., and Korsatko, W. 1988. Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid. In Rehm, H.J., and Reed, G. (eds.). Biotechnology. pp. 135-176. vol. 6b. VCH Publishers. Weinheim. 810p.
- Lakshman, K., and Shamala, T.R. 2006. Extraction of polyhydroxyalkanoate from *Sinorhizobium meliloti* cells using *Microbispora* sp. culture and its enzymes. Enzyme. Microb. Technol. 39:1471-1475.
- Lee, S.Y. 1996. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Trends Biotechnol. 14:431-438.
- Liu, F., Li, W., Ridgway, D., and Gu, T. 1998. Production of poly- β -hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol. Lett. 20:345-348.

- Loo, C.Y., and Sudesh, K. 2007. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. Malays. Polym. J. 2:31-57.
- López-Cortés, A., Lanz-Landázuri, A., and García-Maldonado, J.Q. 2008. Screening and isolation of PHB-producing bacteria in a polluted marine microbial mat. Microbial Ecol. 56:112-120.
- Luengo, J.M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G. and Olivera, E.R. 2003. Bioplastics from microorganisms. Curr. Opin. Microbiol. 6:1-10.
- Madison, L.L., and Huisman G.W. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates) from DNA to plastic. Microbiol. Mole. Biol. Rev. 63:21-53.
- Mudliar, S.N., Vaidya, A.N., Suresh, K.M., Dahikar, S., and Chakrabarti, T. 2007. Techno-economic evaluation of PHB production from activated sludge. Clean Techn. Environ. Policy. 77:444-448.
- Nath, A., Dixit, M., Bandiya, A., Chavda, S., and Desai, A.J. 2008. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. Bioresource Technol. 99:5749-5755.
- Page, W.J., and Cornish, A. 1993. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate. Appl. Environ. Microbiol. 59:4236-4244.
- Pandian, S.R., Deepak, V., Kalishwaralal, K., Rameshkumar, N., Jeyaraj, M., and Gurunathan, S. 2010. Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. Bioresource Technol. 101:705-711.
- Patwardhan, P., and Srivastava, A.K. 2008. Fed-batch cultivation of *Wautersia eutropha*. Bioresource Technol. 99:1787-1792.
- Quillaguamán, J., Doan-Van, T., Guzmán, H., Guzmán, D., Martín, J., Everest, A., and Hatti-Kaul, R. 2008. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch culture. Appl. Environ. Biotechnol. 78:227-232.
- Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi, and Kalia, V.C. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresource Technol. 87:137-146.
- Ryu, H.W., Cho, K.-S., Lee, E.G., and Chang, Y.K. 2000. Recovery of Poly(3-hydroxybutyrate) from coagulated *Ralstonia eutropha* using a chemical digestion method. Biotechnol. Prog. 16:676-679.
- Schubert, P., Kruger, N., and Steinbuechel, A. 1991. J. Bacteriol. 173:168-175.

- Shimizu, H., Tamura, S., Shioya, S., and Suga, K.I. 1993. Kinetic study of poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid (PHB) production and its molecular weight distribution control in a fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus*. J. Ferment. Bioeng. 76:465-469.
- Shrivastav, A., Mishra, S., Shethia, B., Pancha, I., Jain, D., and Mishra, S. 2010. Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct. Int. J. Biochem. Cell Biol. 47:283-287.
- Solaiman, D., Ashby, R., Hotchkiss, A., and Foglia, T. 2006. Biosynthesis of medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) from soy molasses. Biotechnol. Lett. 28:57-62.
- Steinbüchel, A., and Fuchtenbusch, B. 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. Tibtech. 16:419-427.
- Sun, Z., Ramsay, J.A., Guay, M., and Ramsay, B.A. 2007. Carbon-limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74:69-77.
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., and Shah, S. 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants. Biotechnol. Adv. 25:148-175.
- Tanaka, K., Katamune, K., and Ishizaki, A. 1995. Fermentative production of poly(β -hydroxybutyric acid) from xylose via L-lactate by a two-stage culture method employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*. Can. J. Microbiol. 41:257-261.
- Terada, M., and Marchessaut, R.H. 1999. Determination of solubility parameters for poly(3-hydroxyalkanoates). Int. J. Biol. Macromol. 25:207-215.
- Tsuge, T., Tanaka, K., Shimoda, M., and Ishizaki, A. 1999. Optimization of L-lactic feeding for the production of poly-D-3-hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in fed-batch culture. J. Biosci. Bioeng. 88:404-409.
- Valappil, S.P., Misra, S.K., Boccaccini, A.R., Keshavarz, T., Bucke, C., and Roy, I. 2007. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterized *Bacillus cereus* SPV. J. Biotechnol. 132: 251-258.
- Van Hee, P., Elumbaring, A.C.M.R., Van der Lans, R.G.J.M., and Van der Wielen, L.A.M. 2006. Selective recovery of polyhydroxyalkanoate inclusion bodies from fermentation broth by dissolved-air flotation. J. Colloid Interface Sci. 297:595-606.

- Wakisaka, Y., Masaki, E., and Nishimoto, Y. 1982. Formation of crystalline γ -endotoxin or poly- β -hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 43:1473-1480.
- Wiseman, A. 1983. Topic in Enzyme and Fermentation Biotechnology. Chichester, Ellis Horwood Limited, pp. 170-226.
- Yamanè, T., and Shimizu, S. 1984. Fed-batch techniques in microbial processes. Adv. Biochem. Eng. 30:147-194.
- Yamanè, T. 1993. Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. Biotechnol. Bioeng. 41:165-170.
- Yu, J., and Chen, L.X.L. 2006. Cost-effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mass. Biotechnol. Prog. 22:547-553.
- Zakaria, M.R., et al. 2010. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer from wild-type *Comamonas* sp. EB172. Polym. Degrad. Stabil. 95:1382-1386.
- Zinn, M., Witholt, B., and Egli, T. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. Adv. Drug Deliv. Rev. 53:5-21.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมวัตถุดิบและสารที่ใช้ในการวิจัย

1. การเตรียมกากน้ำตาล

- 1.1 เจือจางกากน้ำตาลด้วยน้ำประปาในอัตราส่วน 1 ต่อ 1
- 1.2 นำกากน้ำตาลที่เจือจางแล้วมาปั่นแยกตะกอนออกที่ความเร็ว 20,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่อง Tubular bowl centrifuge
- 1.3 นำกากน้ำตาลที่ผ่านการปั่นแยกตะกอนออกแล้วมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและเจือจางให้ได้ตามความเข้มข้นที่เหมาะสม



เครื่อง Tubular bowl centrifuge

2. การเตรียมสารที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาล

- 2.1 สารละลายฟีนอล 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร)
เตรียมจากการละลายฟีนอล 25 กรัม ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. การเตรียมสารที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณยูเรีย

- 3.1 สารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N
เตรียมจากการละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.2 สารละลาย Potassium hydrogen phthalate (KHP)

เตรียมจากการละลาย KHP 20.4 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น (หรือหากต้องการเตรียมสารละลาย KHP 25 มิลลิลิตร ต้องละลายสาร KHP 0.51 กรัม)

3.3 หาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์

นำสารละลาย KHP ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์ฟีนอล์ฟทาลีนลงไป 2 หยด จากนั้นนำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 เมื่อถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต แล้วคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังนี้

N ของ NaOH = (ปริมาตรของ KHP x 1000)/M.W. x ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไทเทรต

3.4 สารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก 0.1 N

เตรียมจากการปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) มาปริมาตร 8.1762 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.5 หาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก

นำสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริกที่เตรียมได้จากข้อ 3.4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจากข้อ 3.3 โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู โดยคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก ดังนี้

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นที่แน่นอนของ NaOH

V_1 = ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไทเทรต

N_2 = ความเข้มข้นของ HCl ที่ต้องการทราบ

V_2 = ปริมาตรของ HCl ที่นำมาไทเทรต

3.6 สารละลายกรดบอริก 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

เตรียมจากการละลายกรดบอริก 40 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.7 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 32% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

เตรียมจากการละลายกรดบอริก 32 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ภาคผนวก ข

สูตรคำนวณ

1. การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์} - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า}}{10} \times 1000$$

2. การคำนวณปริมาณ P(3HB) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี

การคำนวณปริมาณ P(3HB) (กรัมต่อลิตร ต่อ lyophilized cell 20 มิลลิกรัม)

$$\text{ปริมาณ P(3HB) (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าจากการวิเคราะห์ (กรัมต่อลิตร)} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)}}{20}$$

3. การคำนวณปริมาณน้ำตาลรวมในน้ำหมัก

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรวม (กรัมต่อลิตร)} = \text{OD}_{490} \times \text{ความชัน}^{-1} \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

4. การหาปริมาณยูเรียในน้ำหมัก

$$\text{เปอร์เซ็นต์ใน โตรเจน} = \frac{\text{ปริมาตรกรดเกลือ} \times \text{ความเข้มข้นกรดเกลือ} \times 1.4}{\text{ปริมาตรน้ำหมัก}}$$

$$\text{ปริมาณยูเรีย} = \frac{\text{ความเข้มข้นของยูเรีย 1 กรัมต่อลิตร} \times \text{เปอร์เซ็นต์ใน โตรเจน}}{\text{เปอร์เซ็นต์ใน โตรเจนในยูเรีย 1 กรัมต่อลิตร}}$$

6. การคำนวณหา μ , $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ และอัตราการผลิต P(3HB)

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t}$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S_t}$$

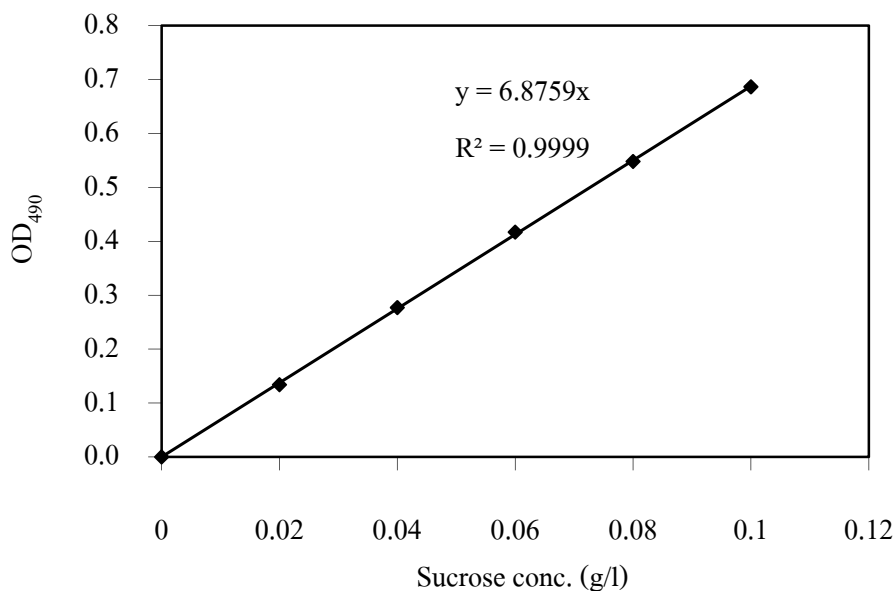
$$Y_{P/X} = \frac{P_t - P_0}{X_t - X_0}$$

$$\text{Productivity} = \frac{P_t - P_0}{t}$$

ภาคผนวก ค

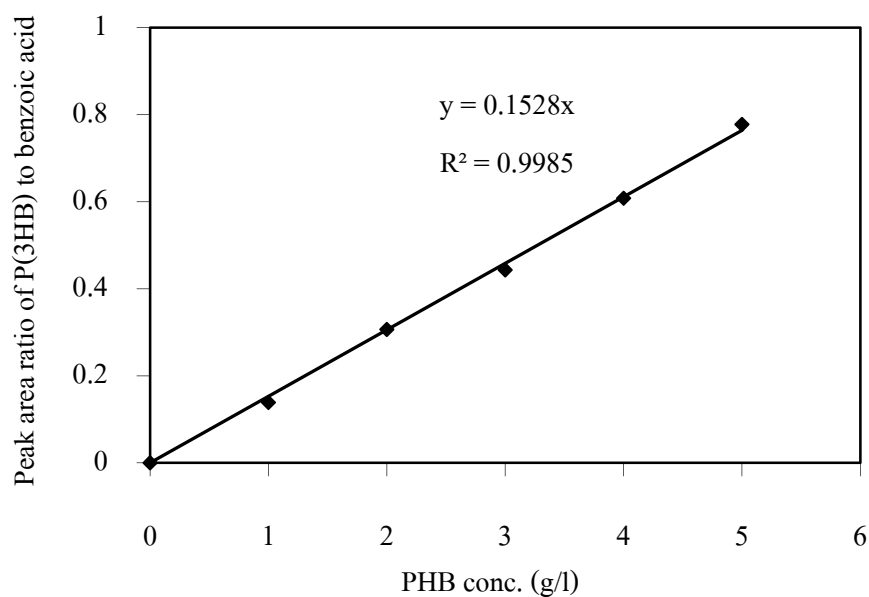
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรวม



กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรวมในช่วง 0-0.1 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 6.8759

2. กราฟมาตรฐาน P(3HB) วิเคราะห์ด้วยวิธี GC

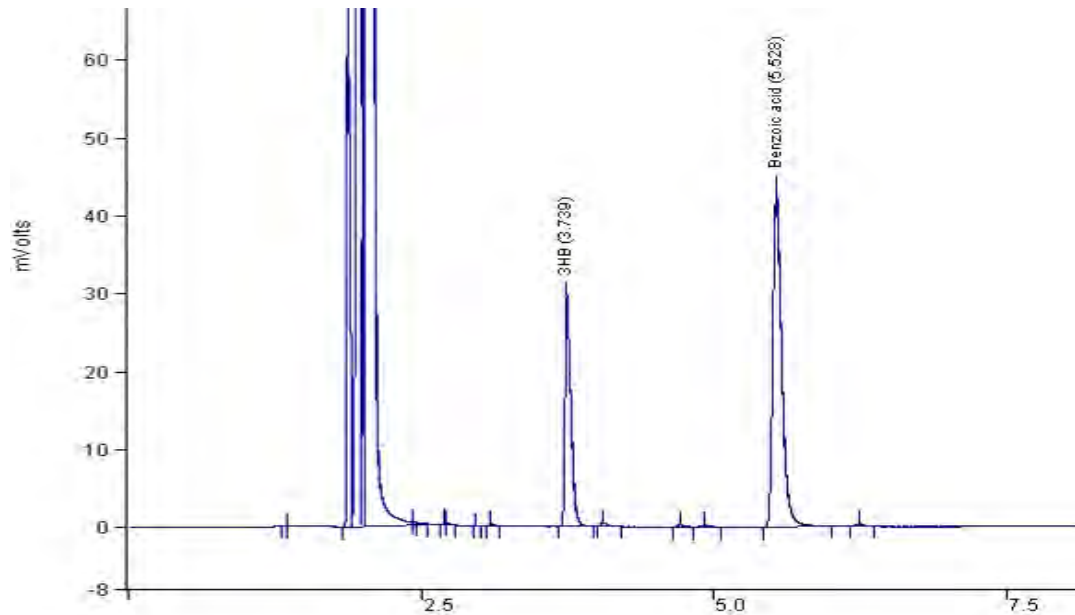


กราฟมาตรฐานของ P(3HB) ความเข้มข้น 0-5 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.1528

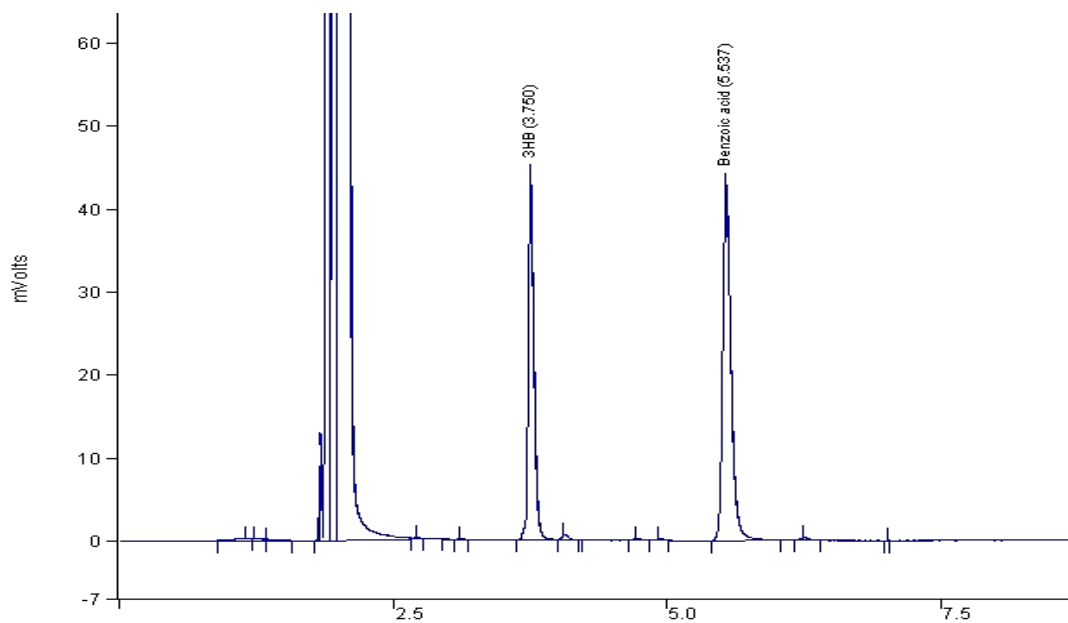
ภาคผนวก ง

โครมาโทแกรม

1. โครมาโทแกรมวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี



โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน



โครมาโทแกรมของ P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน

ภาคผนวก จ

การคำนวณค่าความเร็วรอบของการกววนเมื่อใช้เกณฑ์คงที่ในการกำหนดการขยายส่วนของถังหมัก

1. สัดส่วนของถังหมักมาตรฐาน

1.1 ถังหมักขนาด 10 ลิตร

- เส้นผ่าศูนย์กลางถังหมัก (D_T)	0.190 เมตร
- เส้นผ่าศูนย์กลางใบพัด (D_i)	0.095 เมตร

1.2 ถังหมักขนาด 90 ลิตร

- เส้นผ่าศูนย์กลางถังหมัก (D_T)	0.400 เมตร
- เส้นผ่าศูนย์กลางใบพัด (D_i)	0.160 เมตร

2. การคำนวณความเร็วรอบในการกววน

2.1 อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P/V) ของถังหมัก 10 ลิตร และ 90 ลิตรมีค่าเท่ากัน

จากสมการ

$$n_2 = n_1 (D_{i1}/D_{i2})^{2/3}$$

เมื่อ n_2 = ความเร็วรอบของการกววนในถังหมัก 90 ลิตร

n_1 = ความเร็วรอบของการกววนในถังหมัก 10 ลิตร

D_{i2} = เส้นผ่าศูนย์กลางใบพัดของถังหมัก 90 ลิตร

D_{i1} = เส้นผ่าศูนย์กลางใบพัดของถังหมัก 10 ลิตร

$$n_2 = 600 \times (0.095/0.160)^{2/3} = 423.86 \text{ รอบต่อนาที}$$

ดังนั้นความเร็วรอบของการกววนของถังหมัก 90 ลิตร จะใช้ประมาณ 424 รอบต่อนาที

2.2 ความเร็วรอบของปลายใบพัด ($\pi n D_i$) ของถังหมัก 10 ลิตร และ 90 ลิตร มีค่าเท่ากัน

จากสมการ

$$\text{Tip speed} \propto n D_i$$

ความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นเมื่อความเร็วรอบของปลายใบพัด ($\pi n D_i$) ของถังหมักมีค่าเท่ากันคือ

$$n_2 D_{i2} = n_1 D_{i1}$$

$$n_2 = 600 \times (0.095/0.160) = 356.25 \text{ รอบต่อนาที}$$

ดังนั้นความเร็วรอบของการกววนของถังหมัก 90 ลิตร จะใช้ประมาณ 357 รอบต่อนาที

2.3 ค่าเรย์โนลด์ส์นัมเบอร์ (N_{RE}) ของถังหมัก 10 ลิตร และ 90 ลิตร มีค่าเท่ากัน
จากสมการ

$$\text{Reynolds number} \propto nD_i^2$$

$$n_1 D_{i1}^2 = n_2 D_{i2}^2$$

$$n_2 = 600 \times (0.095/0.160)^2 = 211.52 \text{ รอบต่อนาที}$$

ดังนั้นความเร็วรอบของการกวนของถังหมัก 90 ลิตร จะใช้ประมาณ 212 รอบต่อนาที

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายปวุติ กาญจนชุมพล เกิดเมื่อวันที่ 30 กรกฎาคม พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดชุมพร สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน เมื่อปีการศึกษา 2549 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550

ในระหว่างการศึกษาได้เข้าร่วมเสนอผลงานทางวิชาการในงาน The 20th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB 2008) “Biotechnology for Global Care” ณ โรงแรม ดักศิลา มหาสารคาม ระหว่างวันที่ 14-17 ตุลาคม พ.ศ. 2551 ในหัวข้อ Enhanced Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by High Cell Density Fed-Batch Cultivation of *Bacillus megaterium* BA-019 with Different C/N ratio in Feeding Solution และงาน The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB 2010) “International Conference on Biotechnology for Healthy Living” ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตตรัง ระหว่างวันที่ 20-22 ตุลาคม พ.ศ. 2553 ในหัวข้อ Increased Poly(3-Hydroxybutyrate) Production by High-Cell-Density Fed-Batch Fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019 from Sugarcane Molasses และได้รับรางวัล The Outstanding Poster Presentation Award ในหมวด Bioprocess and Fermentation