บทที่3

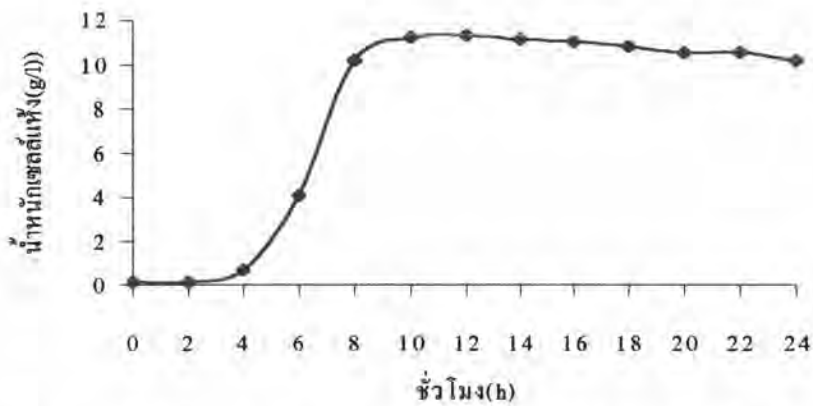
ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาการเติบโตของ *Bacillus* sp BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ตามวิธีการทดลองข้อ 5 ติดตามการเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp BA-019 ทุกๆ 2 ชั่วโมง โดยการหาความหนาแน่นของเซลล์และคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 8 และรูปที่ 7 พบว่าเซลล์ *Bacillus* sp BA-019 มีการเติบโตจนถึงชั่วโมงที่ 10 จากนั้นปริมาณเซลล์ค่อนข้างคงที่และลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการทดลอง เมื่อคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ พบว่ากล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมงให้อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.9 ต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกกล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมง นำไปใช้ในการวิจัยขั้นต่อไป

ตารางที่ 8. การเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ

อายุเชื้อ (h)	DCW (g/l)	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})
0	0.11	-
2	0.14	0.12
4	0.68	0.79
6	4.09	0.90
8	10.20	0.46
10	11.24	0.05
12	11.34	0.004
14	11.14	-0.01
16	11.03	-0.01
18	10.83	-0.01
20	10.55	-0.01
22	10.57	0.001
24	10.20	-0.02



รูปที่7. การเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

3.2 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต PHB

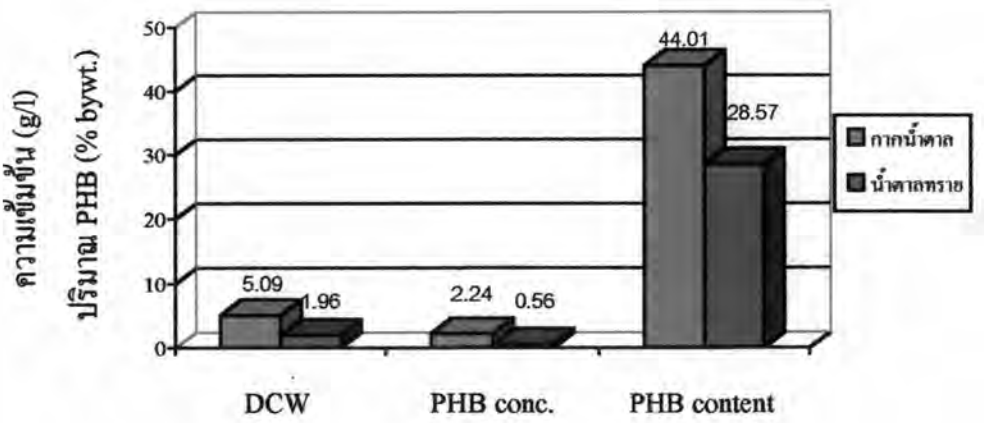
แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHB มีผลต่อต้นทุนการผลิต PHB อย่างมากดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิต PHBจะแตกต่างกันไปขึ้นกับความสามารถของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ดังนั้นถ้าสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเช่น กากน้ำตาล หางเนย เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เป็นต้น หรือใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมต่างๆ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิต PHBจะเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถลดต้นทุนการผลิต PHB รัตนศิริ มุทิตากุล(2538) ได้คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHBได้จากแหล่งธรรมชาติ คัดเลือกได้สายพันธุ์ BA-019 ซึ่งสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่น และสามารถจำแนกชนิดเป็น *Bacillus* sp. เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อ *Bacillus* sp.ที่แยกได้ใหม่นี้สามารถใช้ซูโครสและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB ได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่น ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงศึกษาเปรียบเทียบการผลิต PHBโดยใช้กากน้ำตาลหรือน้ำตาลทรายที่มีปริมาณน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร เพื่อยืนยันผลการวิจัยของรัตนศิริ มุทิตากุล(2538) ซึ่งอาจจะทำให้สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตระดับขยายขนาดต่อไป

จากผลการวิจัยการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ตามวิธีการทดลองในข้อ 6 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที pHเริ่มต้น 6.0 เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 18 24 30 และ 36 นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ PHBที่ผลิตได้ ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 9 และรูปที่ 8 พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนการเติบโตของเซลล์และการผลิต PHB สูงกว่าเมื่อใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนอย่างเห็นได้ชัด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 5.09 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 2.24 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHBเท่ากับ 44.01% ต่อความหนาแน่นของเซลล์ ดังนั้นจึงเลือกใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการวิจัยในขั้นต่อไป

ตารางที่9. เปรียบเทียบการผลิต PHB ระหว่างการใช้น้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตรและกากน้ำตาล ที่มีน้ำตาลทั้งหมด 20 กรัมต่อลิตร

แหล่งคาร์บอน	เวลา(h)	DCW(g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
น้ำตาลทราย	18	1.89	0.50	26.46
	24	**1.96** [a]	**0.56** [a]	**28.57** [a]
	30	1.89	0.53	28.04
	36	1.86	0.48	25.81
กากน้ำตาล	18	3.45	1.15	33.25
	24	4.15	1.53	36.87
	30	4.67	2.02	43.26
	36	**5.09** [b]	**2.24** [b]	**44.01** [b]

a , b ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.01$



รูปที่8. เปรียบเทียบการผลิต PHB ระหว่างการใช้กากน้ำตาล และน้ำตาลทราย

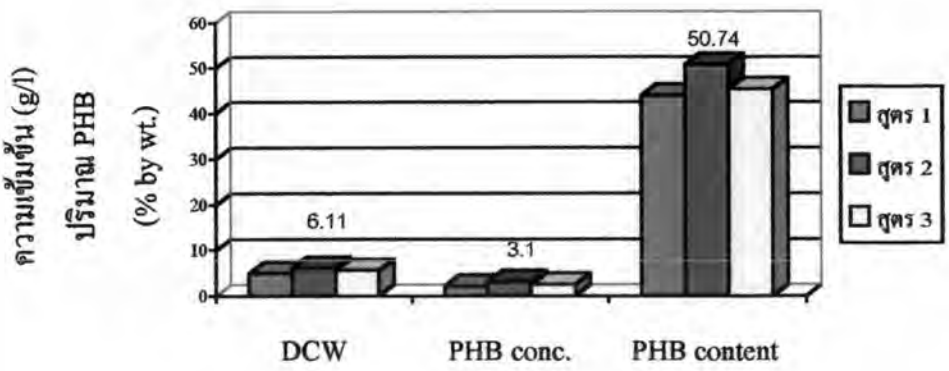
3.3 การศึกษาผลของชนิดและปริมาณของแร่ธาตุในสารละลาย trace element

จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สามารถสร้างและสะสม PHB ได้ภายในเซลล์มีความต้องการชนิดและปริมาณของแร่ธาตุแตกต่างกัน จากผลการวิจัยการปรับปรุงชนิดและปริมาณแร่ธาตุประเภท trace element เพื่อให้เชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 มีการเติบโตและการสังเคราะห์ PHB ที่สูงขึ้น ดังวิธีทดลองในข้อที่ 7 โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ผลการแปรผันชนิดและปริมาณแร่ธาตุ ดังแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 9 พบว่าเมื่อใช้สารละลาย trace element สูตรที่2 เชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 มีการเติบโตของเซลล์ได้สูงกว่าการใช้ trace element สูตรอื่น รวมทั้งได้ปริมาณ PHB สูงที่สุดด้วย คือได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 6.11 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 3.1 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB 50.74 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ จากผลการวิจัยดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการที่มีแร่ธาตุอื่นๆในสารละลาย trace element นอกเหนือจากสูตรที่ใช้โดยรัตนศิริ มุทิตากุล(2538) เช่น แมงกานีส โคบอลต์ ทองแดงและนิกเกิล ทำให้เซลล์ *Bacillus* sp.BA-019 มีความสามารถในการเติบโตและผลิต PHB เพิ่มมากขึ้น จึงเลือกใช้ trace element สูตรที่ 2 สำหรับการวิจัยในขั้นต่อไป

ตารางที่10.ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของ PHB และปริมาณ PHB เมื่อใช้ trace element ต่างกัน

trace element	เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (%DCW)
สูตร1(สูตรเดิม)	24	4.24	1.57	37.03
	30	4.59	1.95	42.48
	36	**4.95**[a]	**2.18**[a]	**44.04**[a]
สูตร2	24	4.65	1.91	41.08
	30	5.48	2.49	45.44
	36	**6.11**[b]	**3.10**[b]	**50.74**[b]
สูตร3	24	4.31	1.76	40.84
	30	4.87	2.12	43.53
	36	**5.62**[c]	**2.55**[c]	**45.37**[a]

a , b , c ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.01$



รูปที่9. เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อใช้ trace element สูตรต่างกัน

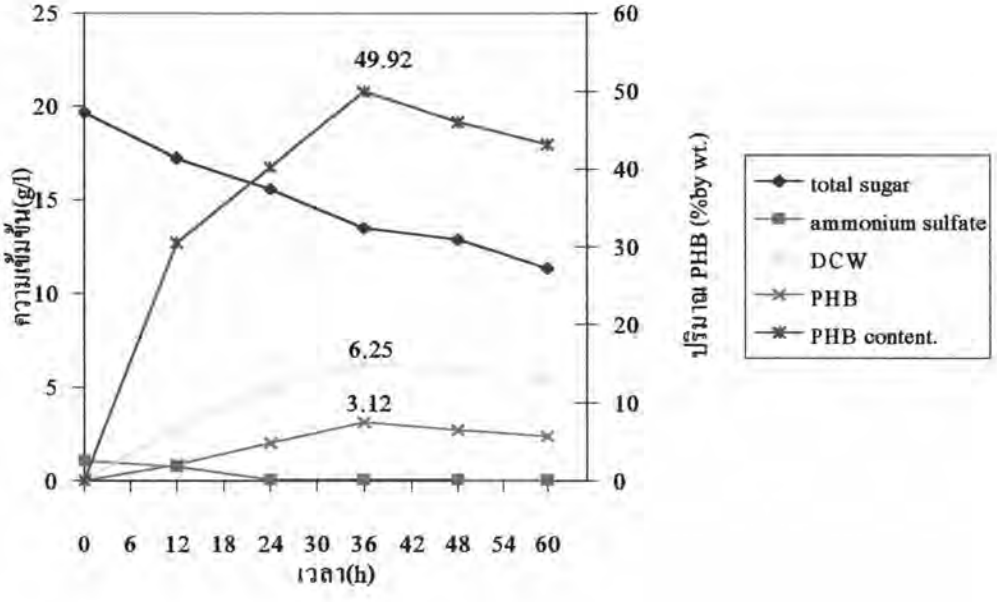
3.4 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต PHB

แหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่สำคัญต่อการเติบโตของจุลินทรีย์เช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน สำหรับการผลิต PHB โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆมีรายงานจำนวนมากที่ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเติบโตและการสังเคราะห์ PHB ซึ่งส่วนใหญ่แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิต PHB คือแอมโมเนียมซัลเฟต ทั้งนี้ขึ้นกับความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนของจุลินทรีย์ รัตนศิริ มุทิตากุล(2538)ได้ศึกษาการผลิตPHB จากเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 โดยเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนระหว่างอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆและเกลือแอมโมเนียมหลายชนิด พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตทำให้ *Bacillus* sp.BA-019 สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB ได้ดีกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น โดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 31.73 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) ศึกษาการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ สารสกัดจากยีสต์ และ ยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp.BA-019 พบว่าเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมีผลให้เชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 สามารถผลิต PHBV ได้สูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ดังนั้นในงานวิจัยขั้นตอนนี้จึงศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนระหว่างการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตกับยูเรียที่มีต่อการผลิต PHB โดยเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019

จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนทั้งสองชนิด โดยปริมาณที่ใช้มีธาตุไนโตรเจนปริมาณเท่ากันตามวิธีการทดลองข้อ 8 โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ผลดังแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่10 พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณไนโตรเจนลดลงจนเกือบหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 6.25 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 3.12 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งคิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 49.92 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ ตารางที่ 12 และรูปที่ 11 แสดงผลการวิจัยเมื่อใช้ยูเรีย 0.46 กรัมต่อลิตรต่อการผลิต PHB *Bacillus* sp.BA-019 มีการเติบโตเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 จนได้ความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของ PHBสูงที่สุดเท่ากับ 7.05 กรัมต่อลิตรและ 3.91 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 55.46 %ต่อความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นรูปแบบเดียวกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางที่11. ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

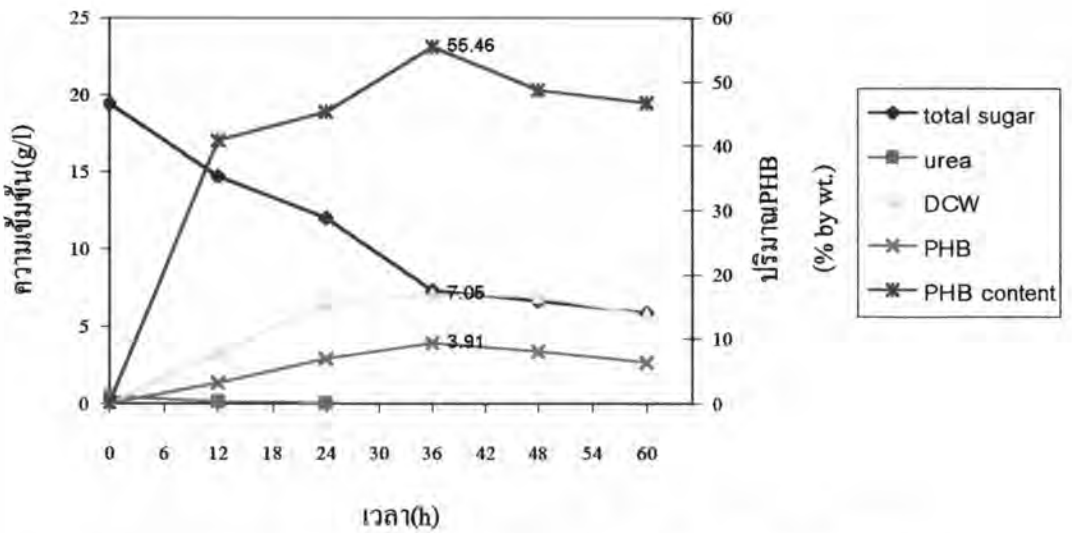
เวลา (h)	total sugar (g/l)	$[(NH_4)_2SO_4]$ (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)
0	19.68	1.05	0.01	-	-
12	17.24	0.75	2.82	0.86	30.50
24	15.61	0.08	5.04	2.03	40.28
36	13.49	0.08	**6.25**	**3.12**	**49.92**
48	12.88	0.08	5.89	2.71	46.01
60	11.35	0.05	5.54	2.39	43.14



รูปที่10. การผลิต PHB โดย*Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

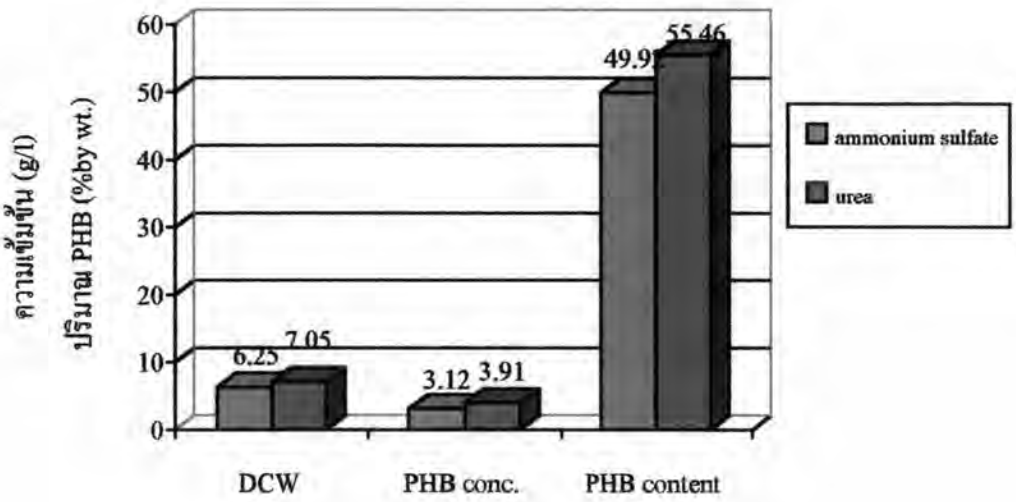
ตารางที่12. ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (h)	total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% by wt.)
0	19.40	0.44	0.01	-	-
12	14.69	0.10	3.26	1.33	40.80
24	12.00	0.02	6.48	2.94	45.37
36	7.31	0	**7.05**	**3.91**	**55.46**
48	6.60	0	6.89	3.36	48.77
60	5.85	0	5.74	2.68	46.68



รูปที่11. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

เมื่อนำผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย มาเปรียบเทียบกัน ดังแสดงในรูปที่ 12 พบว่าเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 สามารถเติบโตและผลิต PHB ได้ดีกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งผลการวิจัยที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของสุดา สุภาชวินสวัสดิ์(2542) ซึ่งศึกษาการผลิต PHBV โดย *Bacillus* sp.BA-019 ในระดับขวดเขย่า จึงเลือกใช้ยูเรียสำหรับการผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 ในการวิจัยขั้นต่อไป



รูปที่12. เปรียบเทียบการผลิต PHB โดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน

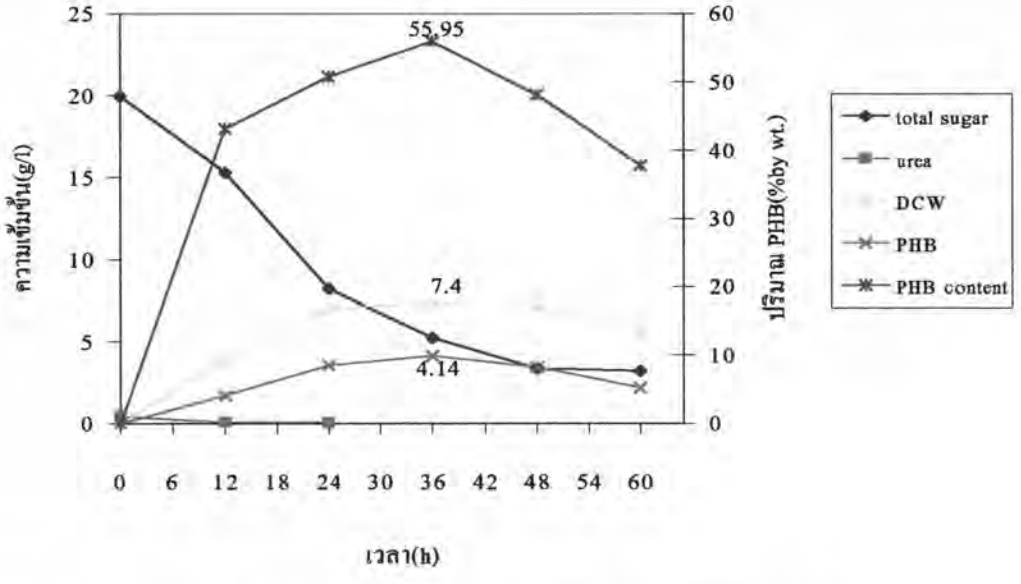
3.5 การศึกษาผลของกรดซิตริกต่อการผลิต PHB

มีรายงานผลการวิจัยเกี่ยวกับการเติมกรดซิตริกปริมาณต่างๆลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHB โดยเชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกัน ทั้งนี้คาดว่าการเติมกรดซิตริกจะส่งผลต่อกลไกการสังเคราะห์ PHB ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์

จากการศึกษาตามวิธีในข้อ 9 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที pHเริ่มต้น 6.0 เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ใช้ปริมาณกรดซิตริกตั้งแต่ 0.2-1.0 กรัมต่อลิตร และเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่มีการเติมกรดซิตริก เมื่อเติมกรดซิตริกปริมาณ 0.2 กรัมต่อลิตรและ 0.5 กรัมต่อลิตรลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ผลดังแสดงในตารางที่ 14 และรูปที่ 14 และตารางที่ 15 และรูปที่ 15 ตามลำดับ ผลการวิจัยทั้งสองชุดนี้มีลักษณะเช่นเดียวกัน คือเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจนได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ 36 ชั่วโมงและได้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากันคือประมาณ 57% ต่อความหนาแน่นของเซลล์ หลังจากนั้นเซลล์และ PHB ลดลงจนสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงจากประมาณ 20 กรัมต่อลิตรลดลงเหลือประมาณ 4 กรัมต่อลิตร และปริมาณยูเรียหมดไปตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ สำหรับการวิจัยการเติมกรดซิตริกปริมาณ 0.75 กรัมต่อลิตรและ 1 กรัมต่อลิตรให้ผลใกล้เคียงกัน คือได้ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของPHB และปริมาณPHBที่ได้ใกล้เคียงกันและสูงกว่าการทดลองที่ไม่เติมกรดซิตริก คือได้ปริมาณ PHB 60% ต่อความหนาแน่นของเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 16 และรูปที่ 16 และตารางที่ 17 และรูปที่ 17 สำหรับผลการทดลองที่ไม่มีการเติมกรดซิตริกแสดงดังตารางที่ 13 และรูปที่ 13 พบว่าได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 7.4 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 4.14 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB 55.95% ต่อความหนาแน่นของเซลล์ที่ 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่13. ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อไม่มีการเติมกรดซิตริก

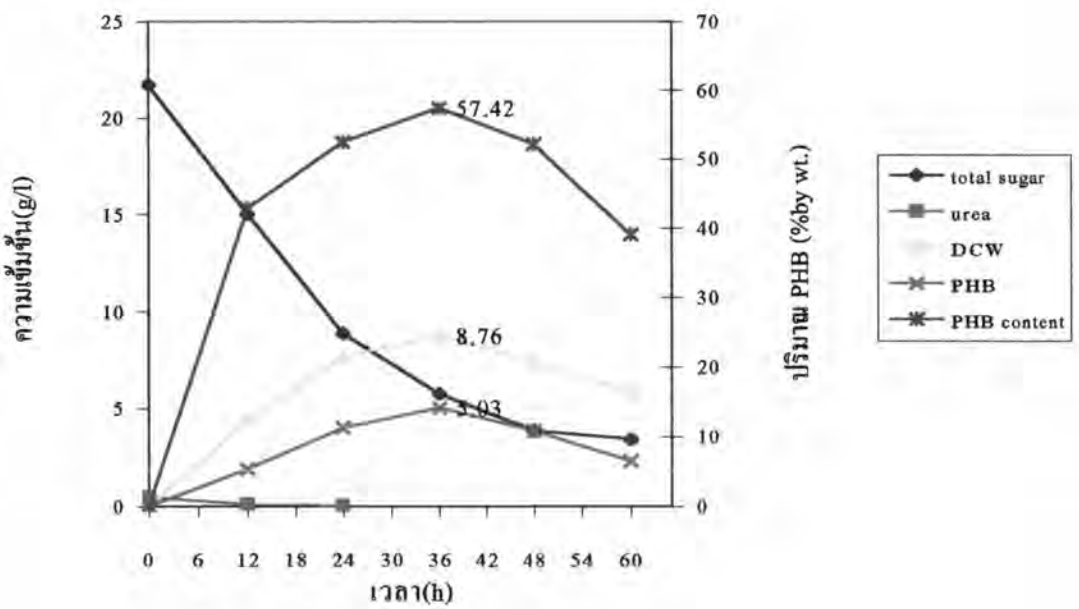
เวลา (h)	total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	19.97	0.44	0.01	-	-
12	15.31	0.09	3.96	1.71	43.18
24	8.21	0.05	6.99	3.55	50.79
36	5.25	0	**7.40**	**4.14**	**55.95**
48	3.34	0	7.16	3.45	48.18
60	3.19	0	5.80	2.19	37.76



รูปที่13. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อ ไม่มีการเติมกรดซิตริก

ตารางที่14. ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเติมกรดซิตริก 0.2 กรัมต่อลิตร

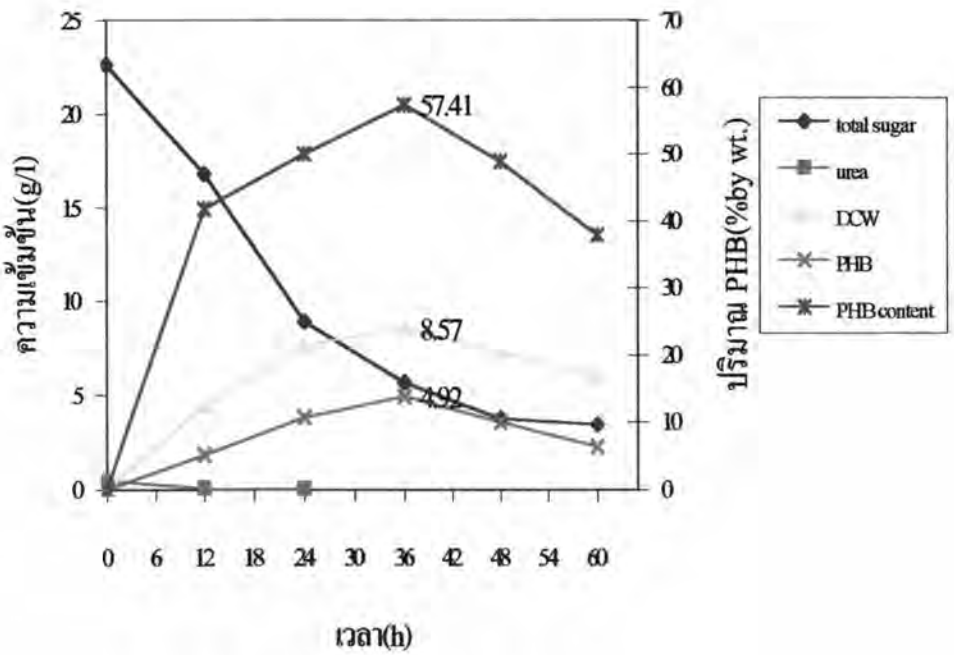
เวลา (h)	Total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	21.73	0.45	0.01	-	-
12	15.02	0.09	4.43	1.90	42.89
24.	8.87	0.03	7.67	4.03	52.54
36	5.76	0	**8.76**	**5.03**	**57.42**
48.	3.87	0	7.40	3.86	52.16
60	3.42	0	5.85	2.29	39.15



รูปที่14. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเติมกรดซิตริก 0.2 กรัมต่อลิตร

ตารางที่15. ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเติมกรดซิตริก 0.5 กรัมต่อลิตร

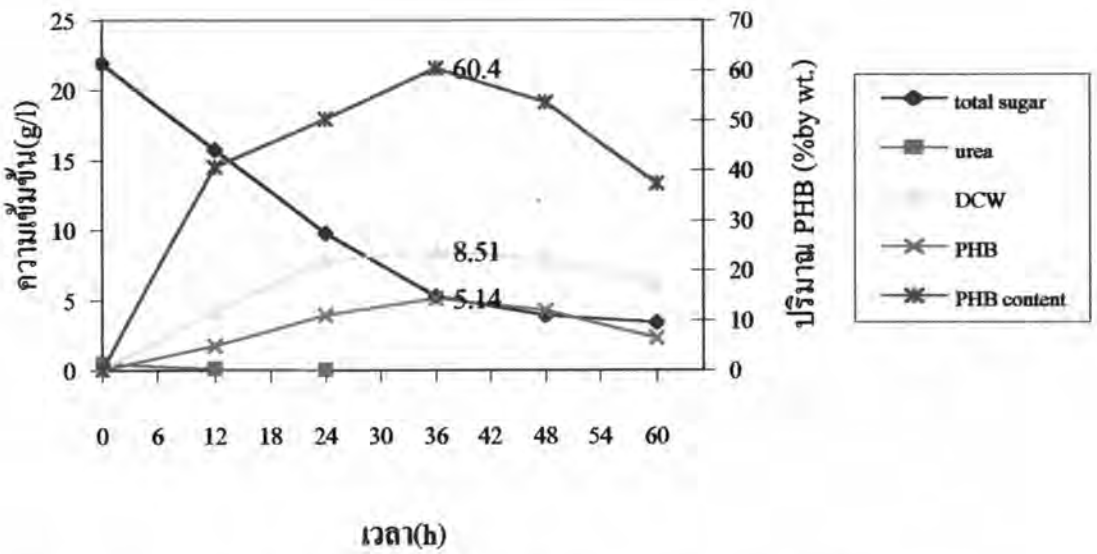
เวลา (h)	Total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	22.63	0.46	0.01	-	-
12	16.78	0.07	4.45	1.86	41.80
24.	8.90	0.04	7.64	3.82	50.00
36	5.67	0	**8.57**	**4.92**	**57.41**
48.	3.78	0	7.30	3.57	48.90
60	3.43	0	6.05	2.29	37.85



รูปที่15. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเติมกรดซิตริก 0.5 กรัมต่อลิตร

ตารางที่16.ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเติมกรดซิตริก 0.75 กรัมต่อลิตร

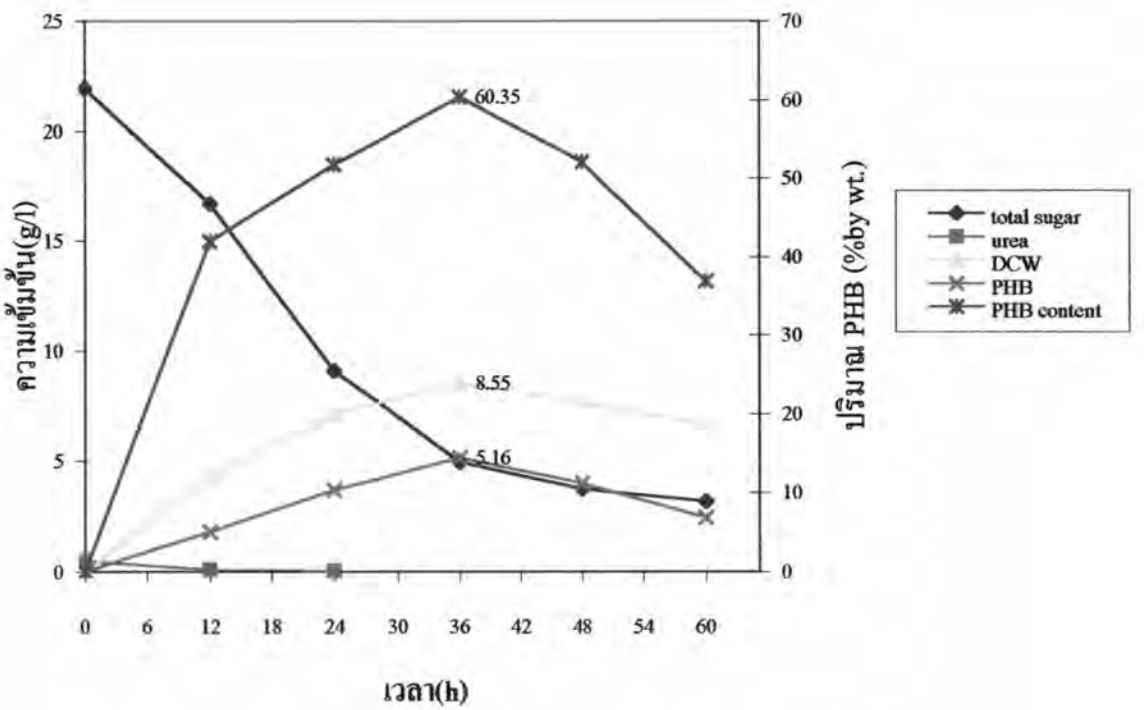
เวลา (h)	total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	21.94	0.45	0.01	-	-
12	15.79	0.08	4.25	1.73	40.71
24.	9.76	0.01	7.83	3.94	50.32
36	5.25	0	**8.51**	**5.14**	**60.40**
48.	3.87	0	7.89	4.23	53.61
60	3.39	0	6.16	2.30	37.34



รูปที่16. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อเติมกรดซิตริก 0.75 กรัมต่อลิตร

ตารางที่17. ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเติมกรดซิตริก 1 กรัมต่อลิตร

เวลา (h)	total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	21.94	0.46	0.01	-	-
12	16.69	0.08	4.32	1.81	41.90
24	9.10	0.02	7.13	3.69	51.75
36	4.94	0	**8.55**	**5.16**	**60.35**
48	3.72	0	7.66	3.99	52.09
60	3.19	0	6.65	2.45	36.84



รูปที่17. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อเติมกรดซิตริก 1.00 กรัมต่อลิตร

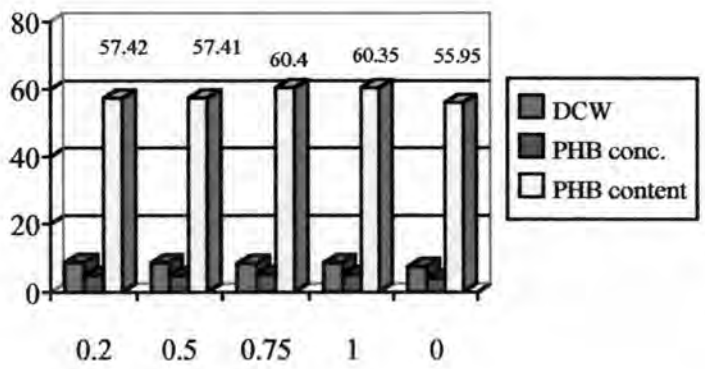
ตารางที่ 18 และรูปที่ 18 เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเติมกรดซิตริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยปริมาณต่างกัน พบว่าทุกการทดลองให้ความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของPHBสูงสุดชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองที่มีการเติมกรดซิตริกจะช่วยให้เซลล์ *Bacillus* sp.BA-019เติบโตและสังเคราะห์PHBได้ดีกว่าการที่ไม่มีกรดซิตริกเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเห็นได้ชัด อัตราการผลิตPHBและ Yp/s ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน สำหรับปริมาณ PHBในการทดลองที่เติมกรดซิตริก 0.75กรัมต่อลิตรและ 1 กรัมต่อลิตร ให้ผลเท่ากันคือประมาณ 60%ต่อความหนาแน่นของเซลล์ ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้กรดซิตริก 0.75 กรัมต่อลิตรเป็นองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต

จากการทดลองในระดับขวดเขย่า สรุปได้ว่าองค์ประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 คือ ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรียเท่ากับ 0.46 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน สารละลาย trace element สูตรที่2 และมีการเติมกรดซิตริก 0.75 กรัมต่อลิตร

ตารางที่18. เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยเติมกรดซิตริกเท่ากับ 0.2-1.0 กรัมต่อลิตร และไม่เติมกรดซิตริก

กรดซิตริก (g/l)	เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB (g/l)	PHB (% by wt.)	productivity (g/l-h)	Yp/s
0.20	36	8.76[a]	5.03[a]	57.42[a]	0.14	0.32
0.50	36	8.57[a,b]	4.92[a]	57.41[a]	0.14	0.29
0.75	36	**8.51**[b]	**5.14**[a]	**60.40**[b]	0.14	0.31
1.00	36	8.55[a,b]	5.16[a]	60.35[b]	0.14	0.30
ไม่เติม	36	7.40[c]	4.14[b]	55.95[c]	0.12	0.28

a , b, c ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.01$



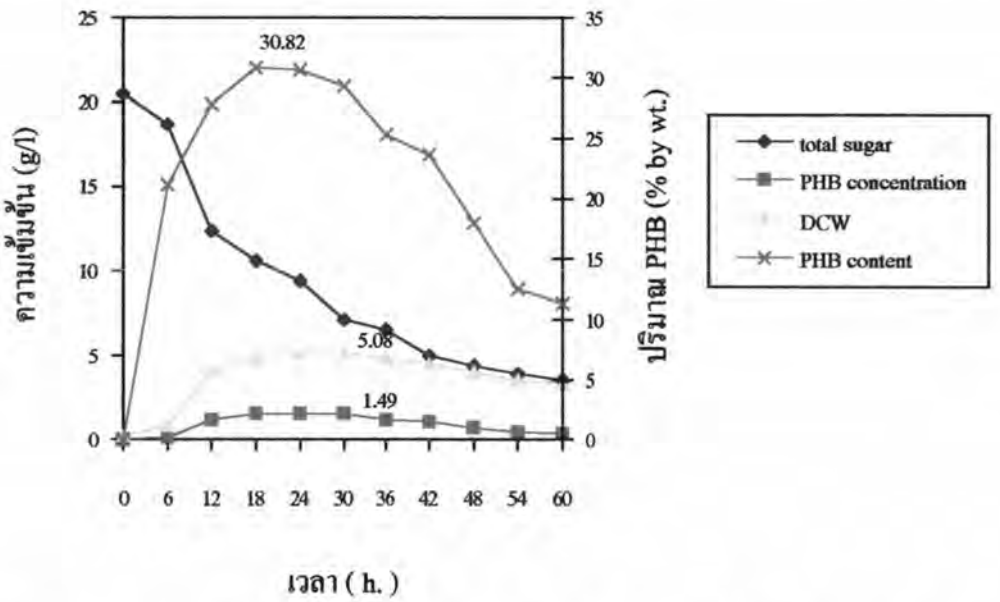
รูปที่18. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA019ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดซิตริกปริมาณต่างๆ

3.6 การศึกษาปริมาณของกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิต PHB ในถังหมัก

จากผลการวิจัยนี้ ได้ศึกษาปริมาณกล้าเชื้อของ *Bacillus* sp BA-019 ที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิต PHBในถังหมัก โดยแปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 0.3 และ 0.5 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นความหนาแน่นของเซลล์) เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp BA-019 ตามวิธีการทดลองในข้อ 5 จากนั้น ถ่ายกล้าเชื้อลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 3 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH 6.0 และค่าออกซิเจนละลาย 60 % ของอากาศอิ่มตัวตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง พบว่าปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 5.06 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น PHB เท่ากับ 1.55 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB 30.63 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 19 และรูปที่ 19 เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 0.5 กรัมต่อลิตร ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 5.93 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และได้ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 1.78 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB 30.02 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 21 และรูปที่ 21 และเมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 0.3 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของ PHB สูงกว่าการทดลองอื่นๆ โดยปริมาณที่สูงสุดเท่ากับ 7.08 กรัมต่อลิตร และ 2.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ คิดเป็นปริมาณ PHB 31.22 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 20 และรูปที่ 20 เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบการเติบโต และการสร้าง PHB ของเชื้อ *Bacillus* sp BA-019 จากรูปที่ 19 20 และ 21 ทำให้สามารถสรุปได้ว่าการผลิต PHB โดยเชื้อ *Bacillus* sp BA-019 มีรูปแบบการสร้างและสะสม PHB ควบคู่ไปกับการเติบโต จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้ไปคำนวณอัตราการผลิต PHB และผลผลิต PHB ต่อน้ำตาลที่ถูกใช้ไป (Yp/s) สรุปได้ดังตารางที่ 22 พบว่าเมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 0.3 กรัมต่อลิตร และ 0.5 กรัมต่อลิตร ให้อัตราการผลิต PHB และค่า Yp/s ใกล้เคียงกัน และให้ค่าดังกล่าวมากกว่าการใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณ PHBที่ได้จากการทดลองทั้งสามชุดได้ผลใกล้เคียงกันคือ ได้ปริมาณ PHB ประมาณ 30 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ แต่การใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 0.3 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของ PHB ที่เวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าเมื่อใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาณอื่น ดังแสดงในรูปที่22 ดังนั้นจึงเลือกปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 0.3 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้สำหรับการวิจัยในถังหมัก

ตารางที่19. ปริมาณ PHB น้ำตาลทั้งหมด และ ความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 0.2 กรัมต่อลิตร

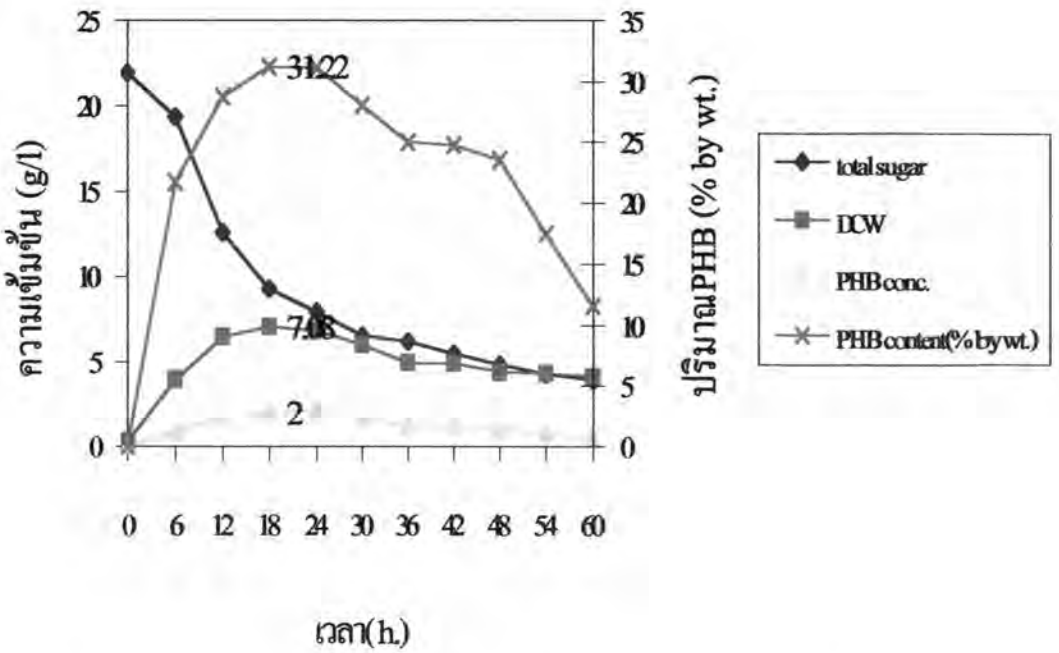
เวลา (h)	total sugar (g/l)	PHB conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB content (% DCW)
0	20.47	-	0.20	-
6	18.64	0.17	0.80	21.25
12	12.35	1.17	4.21	27.79
18	10.57	1.51	4.90	30.82
24	9.40	**1.55**	**5.06**	**30.63**
30	7.20	1.49	5.08	29.33
36	6.55	1.25	4.92	25.41
42	5.01	1.08	4.56	23.68
48	4.43	0.73	4.07	17.94
54	3.92	0.45	3.59	12.54
60	3.59	0.38	3.33	11.41



รูปที่19. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร

ตารางที่20. ปริมาณ PHB น้ำตาลทั้งหมด และ ความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้ปริมาณเกล้าเชื้อ 0.3 กรัมต่อลิตร

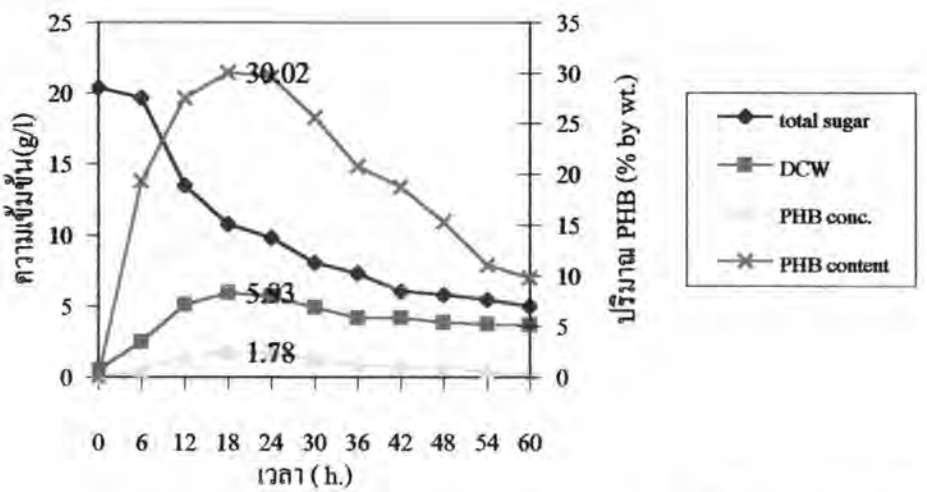
เวลา (h.)	total sugar (g/l)	PHB conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB content (% DCW)
0	21.92	-	0.29	-
6	19.34	0.86	3.95	21.77
12	12.60	1.85	6.46	28.79
18	9.29	**2.21**	**7.08**	**31.22**
24	7.95	2.14	6.87	31.15
30	6.52	1.69	6.03	28.03
36	6.21	1.24	4.95	25.05
42	5.48	1.22	4.92	24.80
48	4.83	1.04	4.42	23.53
54	4.27	0.76	4.34	17.51
60	3.94	0.48	4.15	11.57



รูปที่20. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้ปริมาณเกล้าเชื้อ 0.3 กรัมต่อลิตร

ตารางที่21.ปริมาณ PHB , น้ำตาลทั้งหมด และ ความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 0.5 กรัมต่อลิตร

เวลา (h)	total sugar (g/l)	PHB conc. (g/l)	DCW (g/l)	PHB content (% DCW)
0	20.37	-	0.50	-
6	19.65	0.48	2.49	19.28
12	13.48	1.40	5.09	27.51
18	10.74	**1.78**	**5.93**	**30.02**
24	9.80	1.68	5.68	29.58
30	8.03	1.25	4.88	25.62
36	7.31	0.87	4.19	20.76
42	6.05	0.78	4.17	18.71
48	5.79	0.59	3.86	15.28
54	5.44	0.41	3.70	11.08
60	4.99	0.36	3.67	9.81

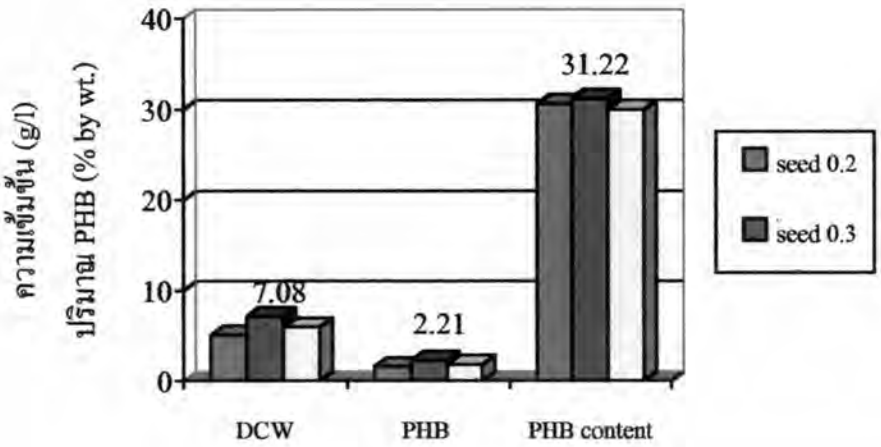


รูปที่21. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp. เมื่อใช้กล้าเชื้อเริ่มต้น 0.5 กรัมต่อลิตร

ตารางที่22. เปรียบเทียบการผลิตPHBเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก โดยแปรผันปริมาณกล้าเชื้อ

ความเข้มข้นกล้าเชื้อ	เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB (g/l)	PHB (% by wt.)	Productivity (g/l-h)	Yp/s
0.2 g/l	24	5.06[a]	1.55[a]	30.63	0.07	0.14
0.3g/l	18	**7.08**[b]	**2.21**[b]	**31.22**	0.12	0.18
0.5 g/l	18	5.93[c]	1.78[a]	30.02	0.10	0.19

a , b , c ความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.01$



รูปที่22. การเปรียบเทียบการผลิต PHB โดย Bacillus sp. BA-019 เมื่อใช้ความเข้มข้นกล้าปริมาณเชื้อต่างกัน

3.7 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตPHB

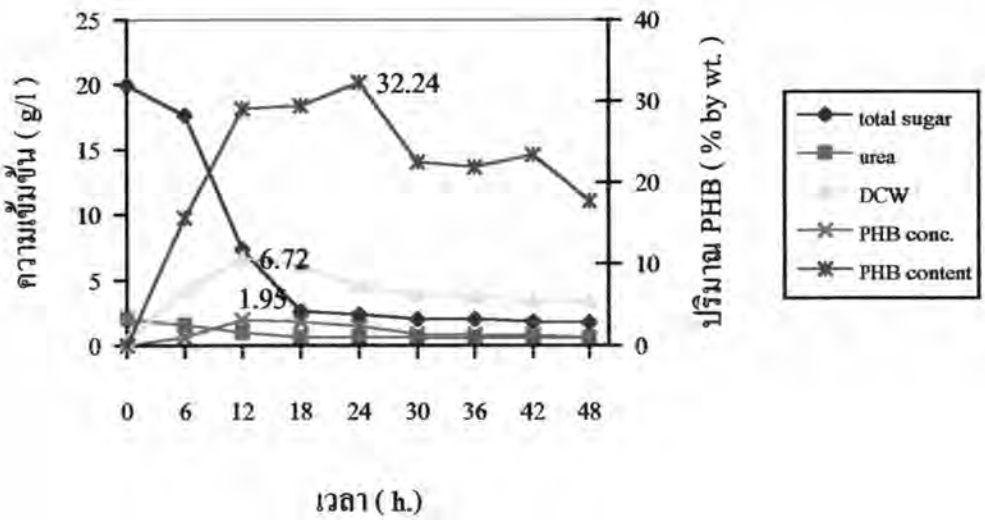
Mulchandani และคณะ(1989) รายงานว่าอัตราการเติบโตจำเพาะของ *A. eutrophus* ATCC17697 ขึ้นกับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำจะเหมาะสมต่อการเติบโต ทำให้ได้อัตราการเติบโตสูง ส่วนการผลิต PHB มีประสิทธิภาพสูงเมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง Parkและคณะ(1995) ศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตPHBของ *A. eutrophus* พบว่าการสะสมPHBจะเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง QuaglianoและMiyazaki(1997) ศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter chroococcum* 6B โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ137.7 พบว่าได้ปริมาณ PHB สูงกว่าเมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ระดับต่ำ และได้ค่า Yp/s สูงที่สุดด้วย นอกจากนี้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนยังส่งผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของ PHB ที่ผลิตด้วย โดยน้ำหนักโมเลกุลของ PHB เมื่อใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงจะต่ำกว่าเมื่อใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ

การวิจัยขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีต่อการเติบโตและการผลิต PHB ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ดังแสดงในวิธีการทดลองข้อ 11.2 ใช้กากน้ำตาลและยูเรียเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ สารละลาย trace element สูตรที่ 2 ซึ่งได้จากผลการวิจัยในข้อ 3.3 และเติมกรดซิตริกตามผลการวิจัยในข้อ 3.5 แปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 10 25 50 และ 100 โมลต่อโมล ผลการวิจัยเมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10 โมลต่อโมล แสดงดังตารางที่23 และรูปที่ 23 พบว่าเซลล์มีการเติบโตอย่างรวดเร็วภายใน 12 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อจนได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 6.72 กรัมต่อลิตร และได้ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 1.95 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB สูงสุดได้เท่ากับ 32.24% ต่อความหนาแน่นของเซลล์ ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นปริมาณเซลล์และPHBที่ผลิตได้โดย *Bacillus* sp.BA-019 ลดลงตามลำดับจนค่อนข้างคงที่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นปริมาณน้ำตาลจะค่อนข้างคงที่ โดยเหลือความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 1.78 กรัมต่อลิตรเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณยูเรียถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกันในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นปริมาณยูเรียที่เหลือค่อนข้างคงที่ ทั้งนี้อาจเนื่องจากเซลล์หยุดการเติบโตซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่สารอาหารจำเป็นบางชนิด เช่น แร่ธาตุหมดไป เมื่อเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 25 โมลต่อโมล ได้ผลแสดงดังตารางที่ 24 และรูปที่ 24 พบว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนดังกล่าวเซลล์ *Bacillus* sp.BA-019มีการเติบโตและผลิตPHBสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าอื่นๆ โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 8.24 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นPHBเท่ากับ 4.16กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 50.45% ต่อความ

หนาแน่นของเซลล์ ที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณยูเรียถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วภายใน 12 ชั่วโมง สำหรับผลการวิจัยเมื่อเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนให้สูงขึ้นเท่ากับ 50 และ 100 โมลต่อโมล ดังแสดงในตารางที่25 และรูปที่ 25 และตารางที่26และรูปที่ 26 ตามลำดับ พบว่ารูปแบบการเติบโตและการผลิตPHBของ *Bacillus* sp.BA-019 รวมทั้งการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนให้ผลในลักษณะเดียวกัน และพบว่าเซลล์เติบโตและผลิต PHBได้ในปริมาณต่ำ ทั้งนี้เมื่อพิจารณารูปแบบการเติบโตและการผลิตPHBของผลการวิจัยที่ได้ศึกษามานี้ เห็นได้ว่าการผลิตPHBจากเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 เกิดควบคู่พร้อมกับการเติบโตของเซลล์ นั่นคือถ้าเชื้อมีการเติบโตได้มากการผลิต PHB ก็จะมีปริมาณมากตามด้วย

ตารางที่23. ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมล

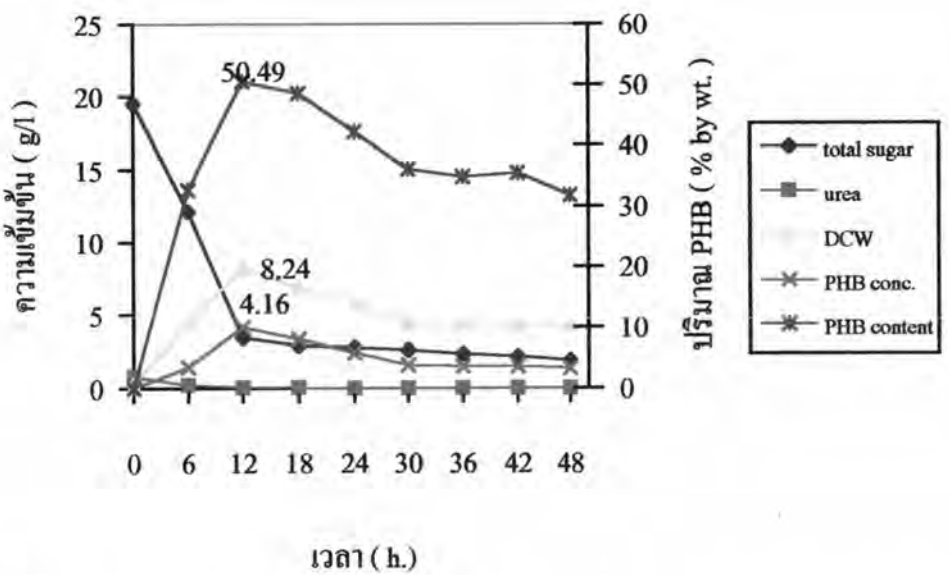
เวลา (h)	total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	19.89	2.00	0.33	-	-
6	17.67	1.60	4.17	0.65	15.59
12	7.34	0.97	**6.72**	**1.95**	29.02
18	2.60	0.65	6.11	1.80	29.46
24	2.35	0.65	4.56	1.47	**32.24**
30	2.03	0.62	3.92	0.88	22.45
36	2.00	0.61	3.75	0.82	21.87
42	1.82	0.59	3.43	0.80	23.32
48	1.78	0.58	3.40	0.60	17.65



รูปที่23. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมล

ตารางที่24. ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล

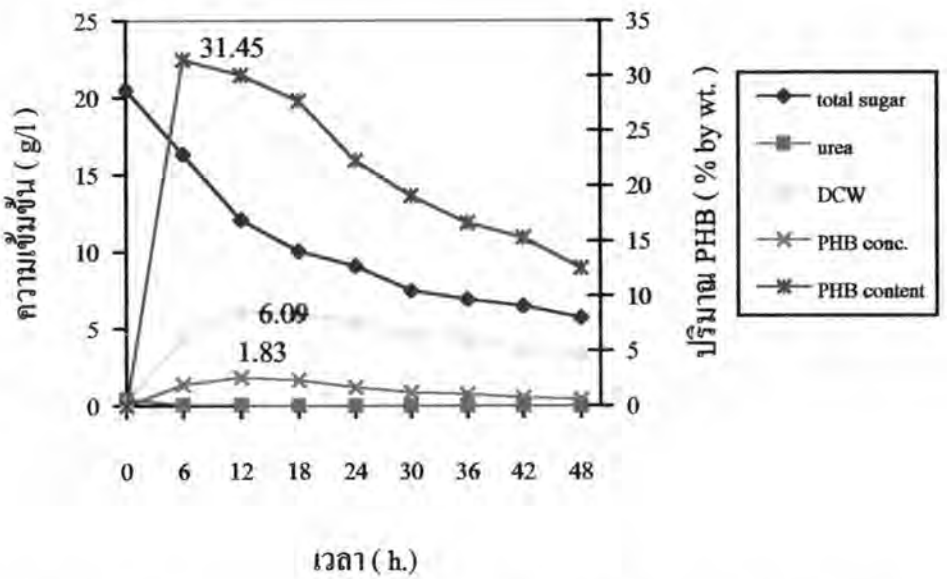
เวลา (h)	total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	19.52	0.79	0.30	-	-
6	12.12	0.23	4.44	1.45	32.66
12	3.46	0.03	**8.24**	**4.16**	**50.49**
18	2.93	0.04	6.88	3.34	48.55
24	2.79	0	5.73	2.42	42.23
30	2.60	0	4.41	1.59	36.05
36	2.32	0	4.37	1.52	34.78
42	2.14	0	4.26	1.51	35.45
48	1.88	0	4.25	1.35	31.76



รูปที่24. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล

ตารางที่25. ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50 โมลต่อโมล

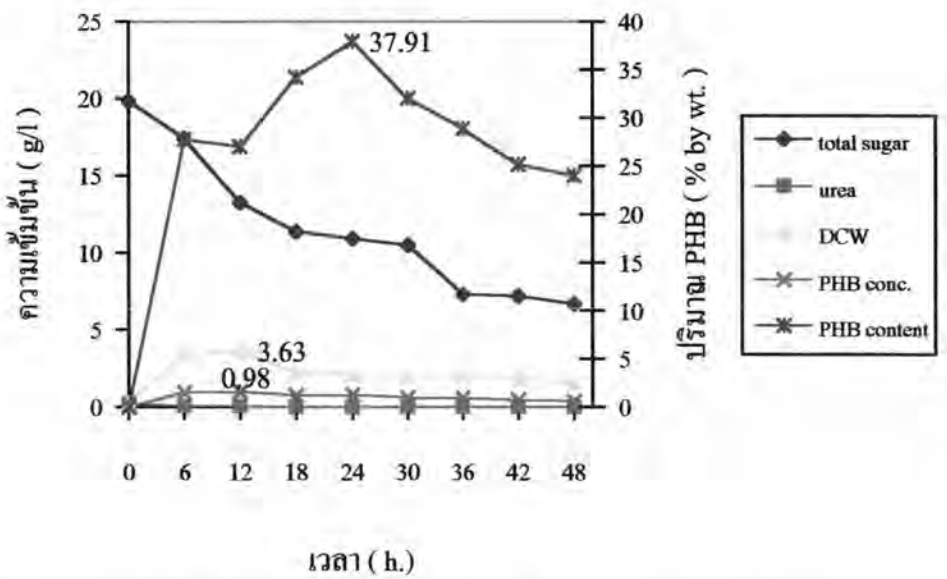
เวลา (h)	total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	20.48	0.43	0.29	-	-
6	16.33	0.04	4.42	1.39	31.45
12	12.10	0.03	**6.09**	**1.83**	**30.05**
18	10.05	0.02	5.95	1.65	27.73
24	9.09	0	5.43	1.21	22.28
30	7.44	0	4.67	0.89	19.06
36	6.87	0	4.39	0.73	16.63
42	6.46	0	3.66	0.56	15.30
48	5.69	0	3.42	0.43	12.57



รูปที่25. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50 โมลต่อโมล

ตารางที่26.ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100 โมลต่อโมล

เวลา (h)	total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	19.85	0.19	0.30	-	-
6	17.42	0.03	3.46	0.96	27.75
12	13.25	0.04	**3.63**	**0.98**	27.00
18	11.36	0	2.22	0.76	34.23
24	10.91	0	2.11	0.80	**37.91**
30	10.52	0	2.00	0.64	32.00
36	7.31	0	2.01	0.58	28.86
42	7.15	0	1.83	0.46	25.14
48	6.67	0	1.54	0.37	24.03



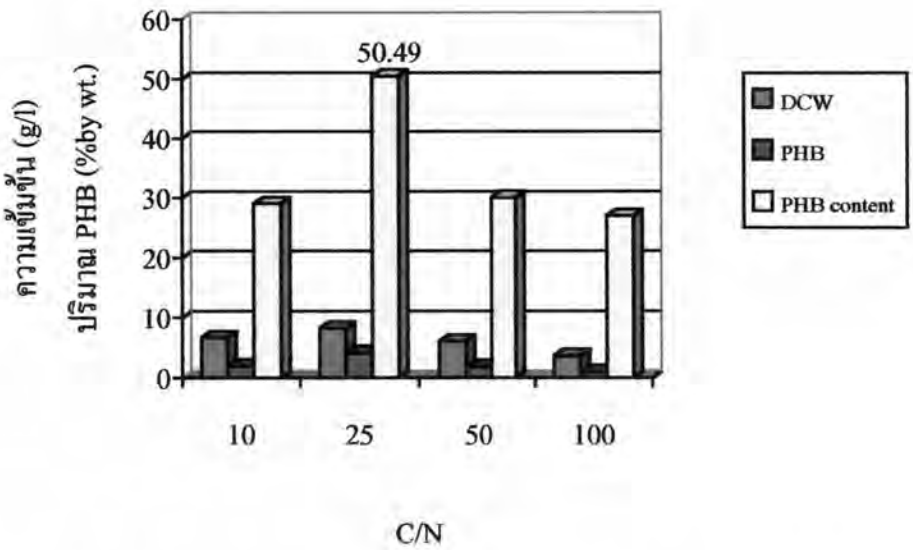
รูปที่26. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100 โมลต่อโมล

เมื่อนำผลการทดลองทั้ง 4 การทดลองมาคำนวณอัตราการผลิต PHB และค่า Yp/s โดยเปรียบเทียบกันดังแสดงในตารางที่ 27 และรูปที่27 พบว่าทุกการทดลองได้ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ PHB สูงสุดอย่างรวดเร็วที่เวลาเพียง 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เวลาน้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า ซึ่งใช้เวลาถึง 36 ชั่วโมง พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณ PHB และอัตราการผลิต PHB สูงกว่าการใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าอื่นๆ ได้แก่ ความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของPHBสูงที่สุด คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 50.49%ต่อความหนาแน่นของเซลล์ อัตราการผลิต PHB และYp/s เท่ากับ 0.35 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและ 0.26 ตามลำดับ ส่วนการใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 และ 50 โมลต่อโมล พบว่ามีผลทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ PHB ใกล้เคียงกัน และพบว่าการใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100 โมลต่อโมล ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่มีปริมาณไนโตรเจนน้อยที่สุด มีผลให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณ PHB และอัตราการผลิต PHB ต่ำกว่าทุกการทดลอง

ตารางที่27. เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10-100 โมลต่อโมล

C/N (mol/mol)	เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB (g/l)	PHB (% by wt.)	Productivity (g/l-h)	Yp/s
10	12	6.72[a]	1.95[a]	29.02[a]	0.16[a]	0.16
25	12	**8.24**[b]	**4.16**[b]	**50.49**[b]	**0.35**[b]	**0.26**
50	12	6.04[a]	1.83[c]	30.05[a]	0.15[a]	0.22
100	12	3.63[c]	0.98[d]	27.00[c]	0.08[c]	0.15

a , b , c , d ความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.01$



รูปที่27. เปรียบเทียบปริมาณ PHB และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10-100 โมลต่อโมล

3.8 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตPHB

การวิจัยขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาหาภาวะในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตPHBได้แก่ pH และค่าออกซิเจนละลาย สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เป็นเชื้อที่คัดแยกได้ใหม่และศึกษาการผลิต PHB ในระดับขวดเขย่าโดยรัตนศิริ มุทิตากุล(2538) การวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อเนื่องเพื่อเพิ่มขนาดการผลิตPHBโดย *Bacillus* sp.BA-019โดยการเพาะเลี้ยงในถังหมัก ดังนั้นจึงต้องศึกษาภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้เชื้อมีความสามารถในการเติบโตและการผลิต PHB ในถังหมักได้อย่างมีประสิทธิภาพ

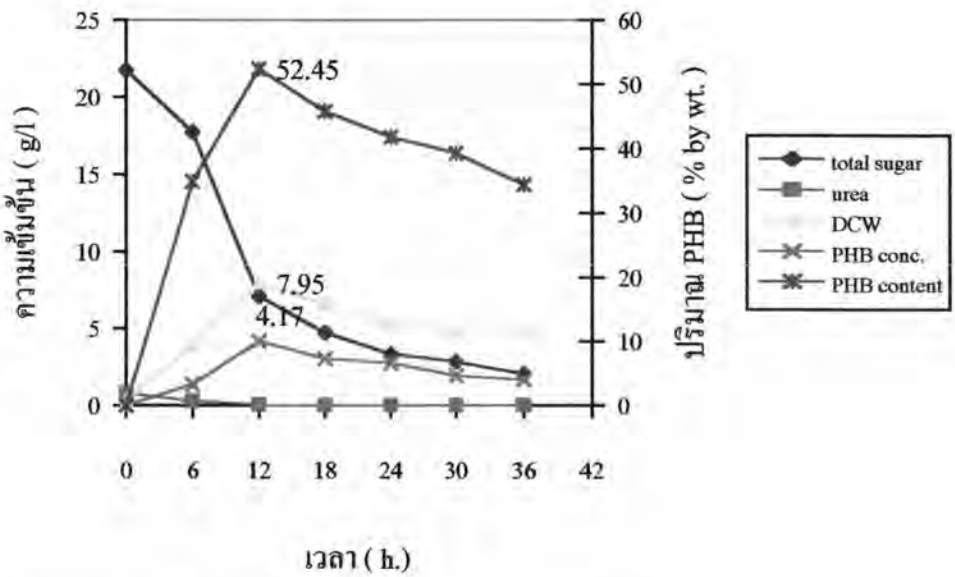
3.8.1 ค่า pH

จากผลการศึกษาเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ตามวิธีการทดลองข้อ 10.3 ใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และค่าออกซิเจนละลายไม่ต่ำกว่า 60 % ของอากาศอิ่มตัว โดยการควบคุมค่า pH เท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0 และไม่ควบคุมpH(ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0) โดยมีการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริก เพื่อควบคุมให้ค่า pH ของระบบเท่ากับค่าที่ต้องการ เมื่อควบคุมค่า pH เท่ากับ 6.0ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 28 และรูปที่ 28 พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 มีการเติบโตสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 7.95 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของPHB 4.17 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณPHB 52.45%ต่อความหนาแน่นของเซลล์ หลังจากนั้นพบว่าเซลล์หยุดการเติบโตและความหนาแน่นของเซลล์ลดลงเล็กน้อย รวมทั้งปริมาณ PHB ก็ลดลงเช่นกัน ตารางที่ 29 และรูปที่ 29 แสดงผลการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อควบคุมค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 พบว่าเซลล์มีการเติบโตพร้อมกับการผลิต PHB ดีที่สุดมีเทียบกับการทดลองอื่นๆ คือได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 8.54 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ PHB เพิ่มขึ้นเป็น 5.2 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณPHB 60.89% ต่อความหนาแน่นของเซลล์ จากนั้นเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 โดยควบคุมค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 ผลการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 30 และรูปที่ 30 พบว่าเชื้อมีการเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมง 18 โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.49 กรัมต่อลิตร แต่ได้ความเข้มข้น PHB ลดลงเท่ากับ 2.74 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เพียง 28.87%ต่อความหนาแน่นของเซลล์ สำหรับชุดการทดลองที่ไม่มีการควบคุมค่าpH ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 31 และรูปที่ 31 ค่า pH ของน้ำหมักเพิ่มขึ้นจาก pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 จนมีค่า pH เท่ากับ 7.45 ที่ 12 ชั่วโมง จากนั้นค่า pH ค่อนข้างคงที่ การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019ในภาวะนี้เซลล์มีการเติบโตสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่มีการควบคุม pH ค่าอื่นๆ โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์ 9.75 กรัมต่อลิตร แต่ความเข้มข้นของPHBที่ได้ต่ำกว่าการทดลองอื่นๆมาก คือได้เพียง 2.38 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณPHB 24.41% ต่อความหนาแน่นของเซลล์ รูปแบบของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณยูเรียที่เหลือในน้ำหมักของทุก

การทดลอง ในการวิจัยนี้พบว่าอยู่ในลักษณะเดียวกัน คือความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ และพบว่ายูเรียถูกใช้หมดภายในเวลา 12 ชั่วโมง

ตารางที่28.ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อควบคุมค่าpHเท่ากับ 6.0

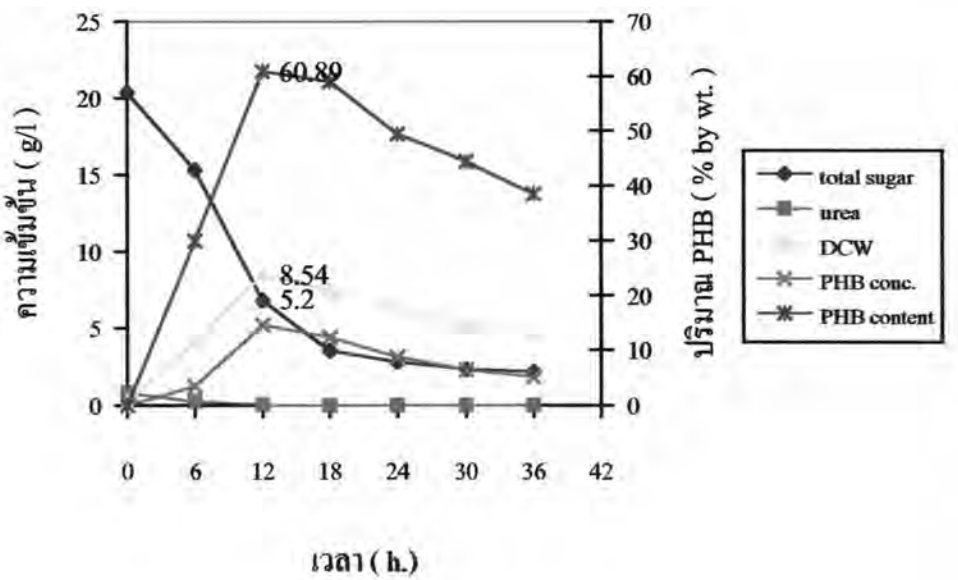
เวลา (h)	total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	21.76	0.81	0.32	-	-
6	17.76	0.28	3.96	1.38	34.88
12	7.10	0.05	**7.95**	**4.17**	**52.45**
18	4.70	0	6.63	3.04	45.85
24	3.34	0	5.23	2.77	41.78
30	2.85	0	4.86	1.91	39.30
36	2.05	0	4.88	1.68	34.43



รูปที่28. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อควบคุม pH เท่ากับ 6.0

ตารางที่29.ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อควบคุมค่าpH เท่ากับ7.0

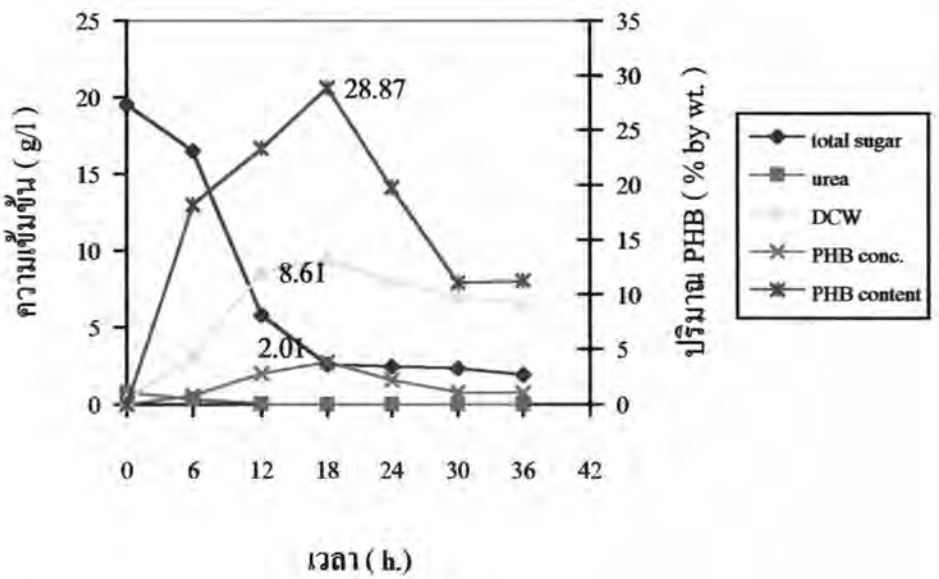
เวลา (h)	total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	20.39	0.80	0.28	-	-
6	15.34	0.25	4.14	1.24	29.95
12	6.80	0.04	**8.54**	**5.20**	**60.89**
18	3.55	0	7.49	4.42	59.01
24	2.80	0	6.35	3.14	49.45
30	2.32	0	5.15	2.29	44.47
36	2.15	0	4.76	1.83	38.45



รูปที่29. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่30.ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อควบคุมค่าpH เท่ากับ8.0

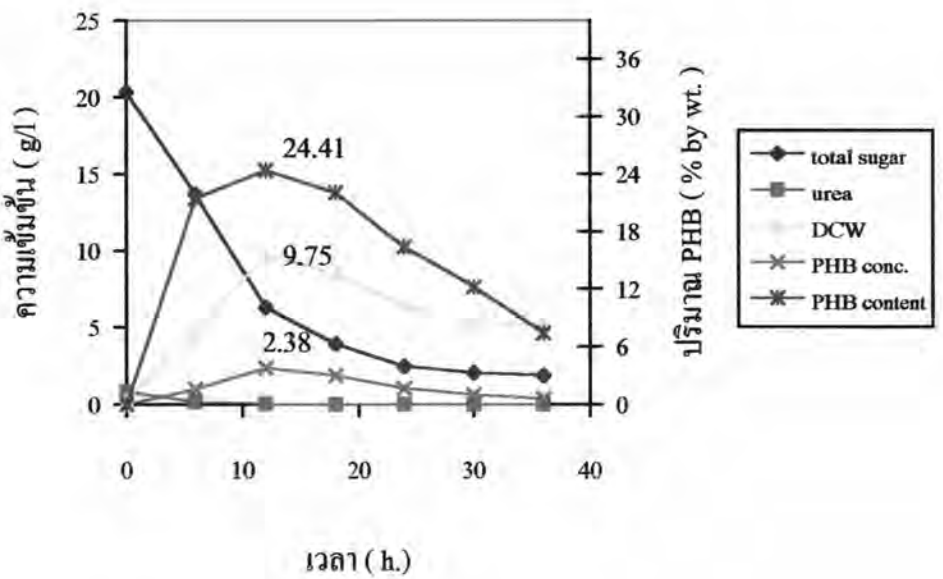
เวลา (h)	total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	19.55	0.78	0.33	-	-
6	16.48	0.34	3.13	0.57	18.21
12	5.78	0.04	8.61	2.01	23.34
18	2.58	0	**9.49**	**2.74**	**28.87**
24	2.46	0	7.99	1.58	19.77
30	2.32	0	7.02	0.78	11.11
36	21.92	0	6.56	0.74	11.28



รูปที่30. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อควบคุม pH เท่ากับ 8.0

ตารางที่31. ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อไม่ควบคุมค่า pH

เวลา (h)	pH	total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB concentration (g/l)	PHB content (% DCW)
0	6.0	20.35	0.85	0.31	-	-
6	6.7	13.71	0.18	4.71	1.01	21.44
12	7.45	6.28	0.04	**9.75**	**2.38**	**24.41**
18	7.4	3.93	0	8.53	1.88	22.04
24	7.48	2.46	0	6.40	1.05	16.41
30	7.46	2.05	0	5.16	0.63	12.21
36	7.48	1.89	0	5.15	0.38	7.38



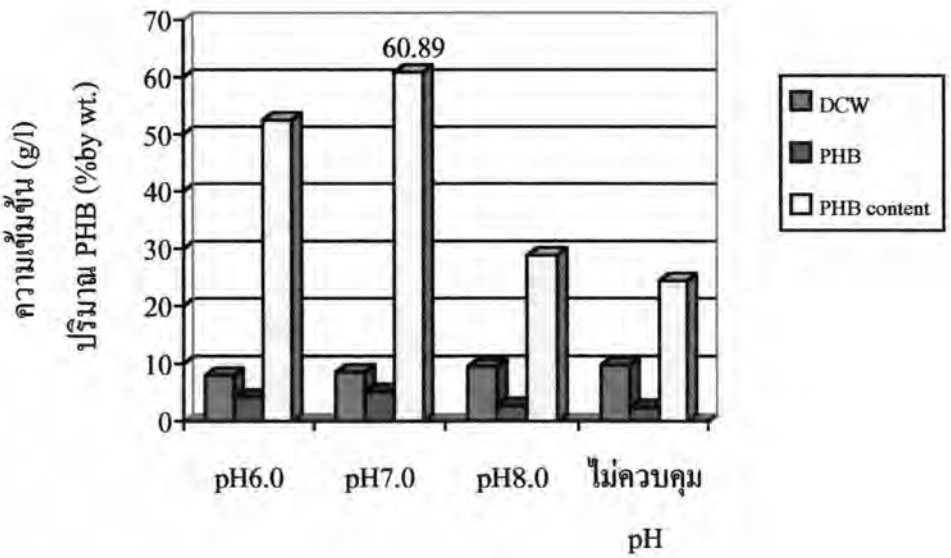
รูปที่31. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อไม่ควบคุม pH

เมื่อนำผลการวิจัยที่ได้มาคำนวณอัตราการผลิต PHB และ Yp/s แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน ดังแสดงในตารางที่ 32 และรูปที่ 32 การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 โดยควบคุมค่า pH ให้การผลิตPHBมีประสิทธิภาพมากกว่าการไม่ควบคุมค่า pH โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลจากการควบคุมค่า pH เท่ากับ 6.0 และ 7.0 ซึ่งทำให้ได้ปริมาณ PHB มากกว่า 50% ต่อความหนาแน่นของเซลล์ โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของ PHB ปริมาณ PHB อัตราการผลิต PHB และค่าYp/s สูงกว่าที่ค่า pH อื่นๆ และชุดที่ไม่ควบคุม pH การควบคุมการเลี้ยงเชื้อให้มีค่า pH เท่ากับ 7.0 เป็นค่าที่เหมาะสม โดยมีอัตราการผลิต PHB เท่ากับ 0.43 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และค่า Yp/sเท่ากับ 0.38 ดังนั้นจึงเลือกภาวะการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมักโดยควบคุมค่า pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่32. เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก เมื่อควบคุมค่า pH ต่างกัน

ค่า pH	เวลา (h)	DCW (g/l)	PHA (g/l)	PHA (% by wt.)	productivity (g/l-h)	Yp/s
6	12	7.95[a]	4.17[a]	52.45[a]	0.35[a]	0.28[a]
7	12	**8.54**[b]	**5.20**[b]	**60.89**[a]	**0.43**[b]	**0.38**[b]
8	18	9.49[c]	2.74[c]	28.87[b]	0.15[c]	0.16[c]
ไม่ควบคุม	12	9.75[c]	2.38[c]	24.41[b]	0.20[c]	0.17[c]

a , b , c ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.01$



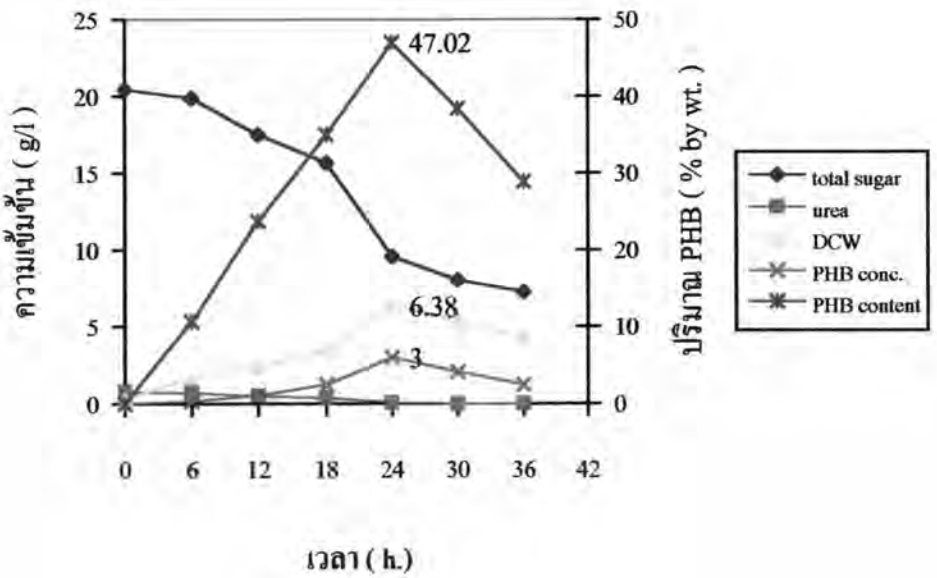
รูปที่32. เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019ในถังหมักโดยควบคุมค่า pH ต่างกัน

3.8.2 ปริมาณออกซิเจนละลาย

การวิจัยขั้นตอนนี้ได้ศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนละลายต่อการเติบโตและการผลิต PHB โดยการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรตามวิธีการทดลองข้อ 10.4 ใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 โดยให้ปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 40 60 และ 80% ของอากาศอิ่มตัว ตารางที่33 และรูปที่ 33 แสดงผลการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 โดยควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 40%ของอากาศอิ่มตัว พบว่าเซลล์มีการเติบโตค่อนข้างช้า ความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้นจนกระทั่งสูงสุดเท่ากับ 6.38 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และได้ความเข้มข้นของ PHB 3 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB 47%ต่อความหนาแน่นของเซลล์ เนื่องจากเซลล์มีการเติบโตช้า ดังนั้นการใช้น้ำตาลและยูเรียโดย *Bacillus* sp.BA-019 จึงต่ำ ที่สิ้นสุดเวลาการเลี้ยงเชื้อมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือเท่ากับ 7.27 กรัมต่อลิตรและปริมาณยูเรียหมดที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นเป็น 60%ของอากาศอิ่มตัว ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 34 และรูปที่ 34 พบว่าการใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนี้ให้ผลการทดลองที่มีลักษณะเดียวกันกับเมื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนเป็น 80% ของอากาศอิ่มตัว ซึ่งผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 35 และรูปที่ 35 นั้นคือเซลล์มีการเติบโตอย่างรวดเร็วควบคู่ไปกับการผลิต PHB โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้น PHB สูงสุดที่ 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วจากชั่วโมงเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อสิ้นสุดการทดลองเหลือปริมาณน้ำตาลทั้งหมดประมาณ 2-3 กรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณยูเรียถูกใช้หมดไปตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 การควบคุมค่าออกซิเจนละลายที่ 60% ของอากาศอิ่มตัวในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 เพื่อการผลิต PHB ทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 8.78 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นPHB 5.41 กรัมต่อลิตรคิดเป็นปริมาณPHB 61.62%ต่อความหนาแน่นของเซลล์ ส่วนการใช้ปริมาณออกซิเจนละลายเพิ่มเป็น 80% ของอากาศอิ่มตัวได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 8.26 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 4.79 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 51.99% ต่อความหนาแน่นของเซลล์ แต่การเลี้ยงเชื้อโดยให้ปริมาณออกซิเจนละลายสูงถึง 80 % ของอากาศอิ่มตัวนั้น ในช่วงที่เซลล์มีการเติบโตสูงสุด (ชั่วโมงที่ 11 ถึง ชั่วโมงที่ 14) ปริมาณออกซิเจนละลายลดลงต่ำกว่า 80 % ของอากาศอิ่มตัว หลังจากนั้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 15 จึงควบคุมให้ปริมาณออกซิเจนละลายคงที่ได้จนสิ้นสุดการทดลอง

ตารางที่33.ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้ปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 40 % ของอากาศอิ่มตัว

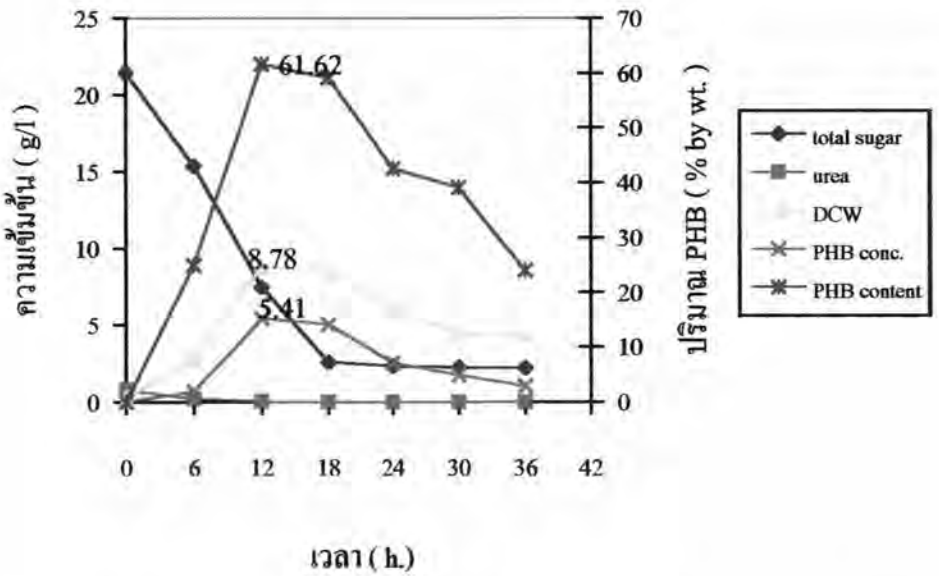
เวลา (h)	toal sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	20.45	0.78	0.30	-	-
6	19.88	0.69	1.69	0.18	10.65
12	17.52	0.51	2.36	0.56	23.73
18	15.67	0.38	3.54	1.24	35.03
24	9.60	0.07	**6.38**	**3.00**	**47.02**
30	8.05	0	5.41	2.08	38.45
36	7.27	0	4.25	1.23	28.94



รูปที่33. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 40% ของอากาศอิ่มตัว

ตารางที่34.ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้ปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 60 % ของอากาศอิ่มตัว

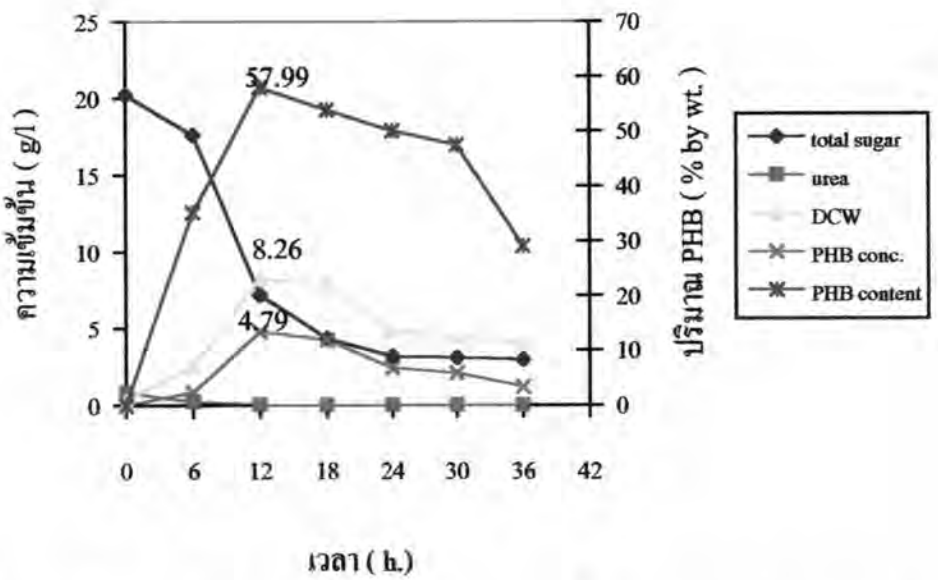
เวลา (h)	toal sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	21.47	0.79	0.32	-	-
6	15.37	0.20	2.88	0.70	25.00
12	7.46	0.05	**8.78**	**5.41**	**61.62**
18	2.58	0	8.53	5.05	59.20
24	2.35	0	6.01	2.56	42.60
30	2.23	0	4.45	1.74	39.10
36	2.19	0	4.36	1.05	24.08



รูปที่34. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 60% ของอากาศอิ่มตัว

ตารางที่35.ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อให้ปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 80% ของอากาศอิ่มตัว

เวลา (h)	togal sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	20.23	0.84	0.34	-	-
6	17.61	0.25	2.53	0.89	35.18
12.	7.15	0.04	**8.26**	**4.79**	**57.99**
18	4.33	0	7.90	4.26	53.92
24	3.17	0	4.83	2.42	50.10
30	3.10	0	4.36	2.07	47.48
36	2.97	0	4.10	1.19	29.02



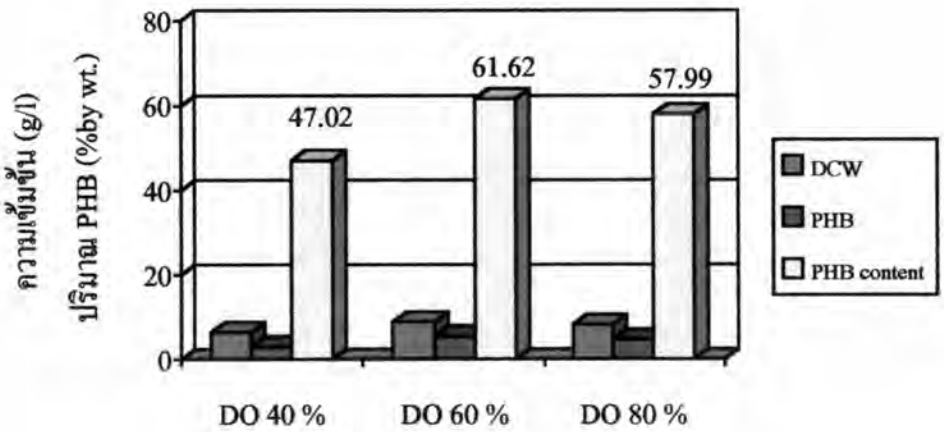
รูปที่35. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80% ของอากาศอิ่มตัว

เมื่อนำผลการวิจัยดังกล่าวมาเปรียบเทียบกันสรุปผลดังตารางที่ 36 และรูปที่ 36 พบว่าถ้าเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ด้วยปริมาณออกซิเจนละลายที่ต่ำเกินไปมีผลให้เซลล์เติบโตได้ช้า ซึ่งทำให้การผลิต PHB เกิดขึ้นได้ต่ำ แต่ถ้าใช้ปริมาณออกซิเจนละลายที่สูงเกินไปนอกจากจะทำให้ปริมาณเซลล์และ PHB ต่ำแล้วยังเป็นการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายด้านพลังงาน ซึ่งถือเป็นต้นทุนการผลิตอีกด้วย จะเห็นได้ว่าสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 เพื่อการผลิต PHB ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาณออกซิเจนละลายที่เหมาะสมเท่ากับ 60%ของอากาศอิ่มตัว ซึ่งทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของ PHB สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการใช้ปริมาณออกซิเจนละลายค่าอื่น โดยอัตราการผลิตPHBและ Yp/s สูงกว่าด้วย โดยได้เท่ากับ 0.45 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.39 ตามลำดับ

ตารางที่36.เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก เมื่อแปรผันปริมาณออกซิเจนละลาย

DO (% air saturation)	เวลา (h.)	DCW (g/l)	PHB (g/l)	PHB (% by wt.)	productivity (g/l-h)	Yp/s
40	24	6.38^{a}	3.00^{a}	47.02^{a}	0.13^{a}	0.28^{a}
60	12	**8.78^{b}**	**5.41^{b}**	**61.62^{b}**	**0.45^{b}**	**0.39^{b}**
80	12	8.26^{b}	4.79^{b}	57.99^{c}	0.40^{b}	0.37^{b}

a , b , c ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.01$



รูปที่36. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักโดยแปรผันค่าออกซิเจนละลายต่างกัน

3.9การผลิต PHB โดยการเติมสารอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง

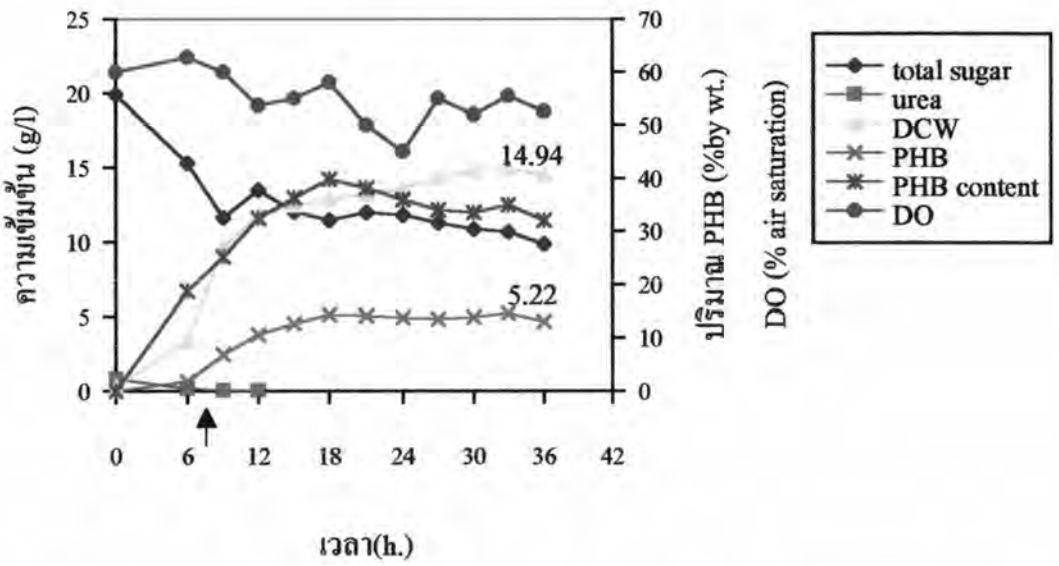
การผลิตสารผลิตภัณฑ์ในระดับอุตสาหกรรมใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบมีการเติมสารอาหารเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้เนื่องจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยวิธีดังกล่าวนี้ ทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูง และมีอัตราการผลิตสารผลิตภัณฑ์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมสารอาหาร นอกจากนี้ยังไม่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และความไม่เสถียรของสายพันธุ์เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง การเพาะเลี้ยงแบบนี้ยังมีข้อดีอีกหลายประการ เช่น สามารถประยุกต์ใช้กับสารอาหารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ป้องกันการยับยั้งการเติบโตจากผลของการใช้สารอาหารที่มีความเข้มข้นสูง เป็นต้น การพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ ด้วยเทคนิคการป้อนสารอาหารแบบต่างๆเพื่อการผลิต PHB ได้มีการศึกษาโดยผู้วิจัยคณะต่างๆมาอย่างต่อเนื่อง

3.9.1การศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารป้อนเข้าเพียงอย่างเดียว

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหารเริ่มต้น เท่ากับ 2.5 ลิตร โดยใช้อาหาร MSM ที่ปรับปรุงจากงานวิจัยนี้ โดยมีกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7.0 ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร เป็นสารอาหารป้อนเข้า โดยใช้เทคนิค pH-stat ควบคุมการป้อนสารอาหารเข้าสู่ระบบ ควบคุมออกซิเจนละลายที่ 60 % ของอากาศอิ่มตัว พบว่า pH เริ่มเปลี่ยนจากค่าที่กำหนดประมาณชั่วโมงที่ 8 จึงเริ่มป้อนสารอาหารเข้าสู่ถังหมักโดยอัตโนมัติ จนกระทั่งค่า pH เท่ากับค่าที่ตั้งไว้การเติมสารอาหารจะหยุดลง และเมื่อค่า pH เปลี่ยนแปลงจากค่าที่ตั้งไว้ก็จะมีการเติมสารอาหารอัตโนมัติอีก ดังนั้นรูปแบบของค่า pH ของน้ำหมักจึงคงที่เท่ากับค่าที่กำหนดตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 37 และรูปที่ 37 พบว่า *Bacillus* sp.BA-019 มีการเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่12 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจนกระทั่งได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 14.94 กรัมต่อลิตร ที่ 33 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และได้ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 5.22 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB 34.94 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อ *Bacillus* sp.BA-019 มีการเติบโตมากขึ้น ค่าออกซิเจนละลายของระบบการเลี้ยงเชื้อไม่สามารถควบคุมให้เท่ากับ 60 % ของอากาศอิ่มตัวได้ เนื่องจากประสิทธิภาพของการให้อากาศมีจำกัด ดังนั้นปริมาณออกซิเจนละลายจึงลดลง โดยค่าออกซิเจนละลายอยู่ในช่วง 45- 55 %ของอากาศอิ่มตัวตั้งแต่ประมาณ 10 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อจนสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ และปริมาณยูเรียถูกใช้หมดภายในเวลา 9 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่37. ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร เป็นสารป้อนเข้า

เวลา (h)	togal sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	19.89	0.81	0.32	-	-
6	15.29	0.17	3.36	0.63	18.75
9	11.63	0.05	9.71	2.45	25.23
12	13.48	0.06	11.75	3.82	32.51
15	12.02	0	12.47	4.53	36.33
18	11.45	0	12.89	5.14	**39.88**
21	11.96	0	13.25	5.05	38.11
24	11.79	0	13.64	4.91	36.00
27	11.30	0	14.28	4.86	34.03
30	10.84	0	14.78	4.96	33.56
33	10.67	0	**14.94**	**5.22**	34.94
36	9.85	0	14.52	4.66	32.10



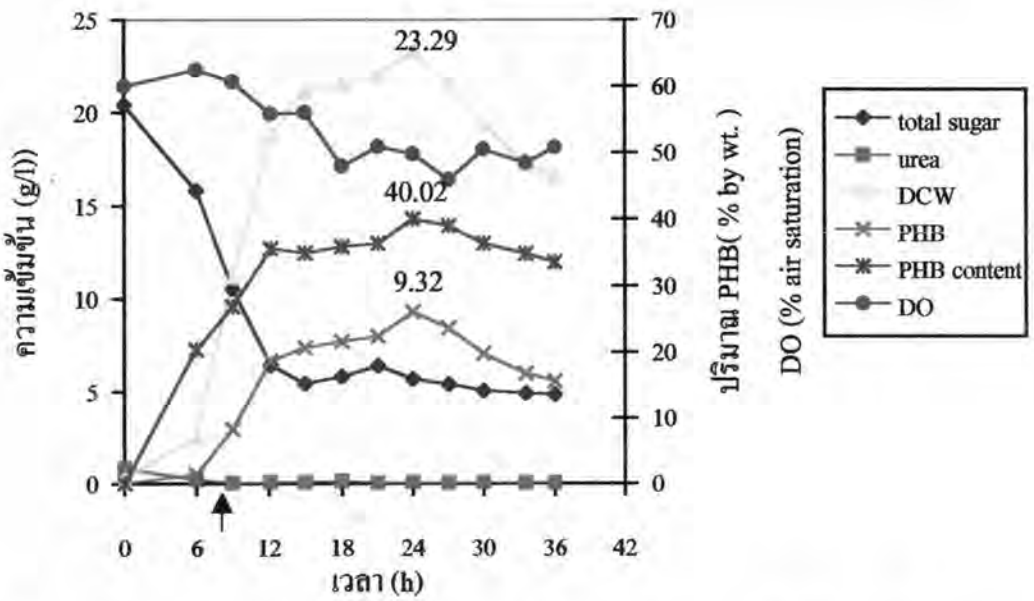
รูปที่37. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารอาหารป้อนเข้า (↑ เริ่มมีการป้อนสารอาหารชั่งโมงที่ 8)

3.9.2 การศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารป้อนเข้า

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 2.5 ลิตร โดยใช้อาหารเพื่อการผลิตเช่นเดียวกับที่บรรยายไว้ในข้อ 3.9.1 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7.0 ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร และยูเรียเป็นสารอาหารป้อนเข้า โดยมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารละลายป้อนเข้าเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ซึ่งอัตราส่วนนี้ได้มาจากการศึกษาขั้นตอนก่อน และควบคุมการป้อนสารอาหารโดยใช้เทคนิค pH-stat ควบคุมออกซิเจนละลายที่ 60 % ของอากาศอิ่มตัว พบว่า pH เริ่มเปลี่ยนจากค่าที่กำหนดประมาณชั่วโมงที่ 8.5 ของการเลี้ยงเชื้อ จึงเริ่มมีการป้อนสารอาหารเข้าสู่ถังหมักโดยอัตโนมัติ ผลการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 38 และรูปที่ 38 จากผลการทดลองนี้สรุปว่าการเติมสารอาหารที่มีทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ได้ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ PHB เพิ่มสูงขึ้นกว่าการเติมสารอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว พบว่า *Bacillus* sp.BA-019 เติบโตอย่างรวดเร็วจนได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 23.29 กรัมต่อลิตร ภายใน 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และได้ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 9.32 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณ PHB 40.02 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ และปริมาณยูเรียลดลงจากเริ่มต้นการเลี้ยงเชื้อจนมีปริมาณต่ำใกล้เป็นศูนย์ ปริมาณออกซิเจนละลายไม่คงที่ที่ระดับ 60 % ของอากาศอิ่มตัว ตั้งแต่ประมาณชั่วโมงที่ 10 เนื่องจากน้ำหมักมีความหนาแน่นของเซลล์สูง ซึ่งเป็นลักษณะของการเลี้ยงเชื้อแบบมีการป้อนสารอาหารเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อโดยไม่ป้อนสารอาหาร ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ได้ที่ 12 ชั่วโมง เท่ากับ 8.78 กรัมต่อลิตร(ตารางที่ 34) ส่วนการทดลองนี้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ที่ 12 ชั่วโมงเท่ากับ 18.78 กรัมต่อลิตร และได้สูงสุดเท่ากับ 23.29 กรัมต่อลิตรที่ 24 ชั่วโมง

ตารางที่38.ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้ กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร และยูเรีย เป็นสารละลายป้อนเข้า

เวลา (h)	togal sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	20.42	0.83	0.29	-	-
6	15.82	0.21	2.51	0.51	20.32
9	10.57	0.05	11.15	2.99	26.82
12	6.45	0.07	18.78	6.69	35.62
15	5.43	0.06	21.14	7.38	34.91
18	5.81	0.15	21.55	7.73	35.87
21	6.40	0.05	22.03	8.00	36.31
24	5.69	0.08	**23.29**	**9.32**	**40.02**
27	5.40	0.04	21.67	8.45	38.99
30	5.05	0.06	19.46	7.08	36.38
33	4.91	0.05	17.26	6.00	34.76
36	4.85	0.05	16.58	5.56	33.53



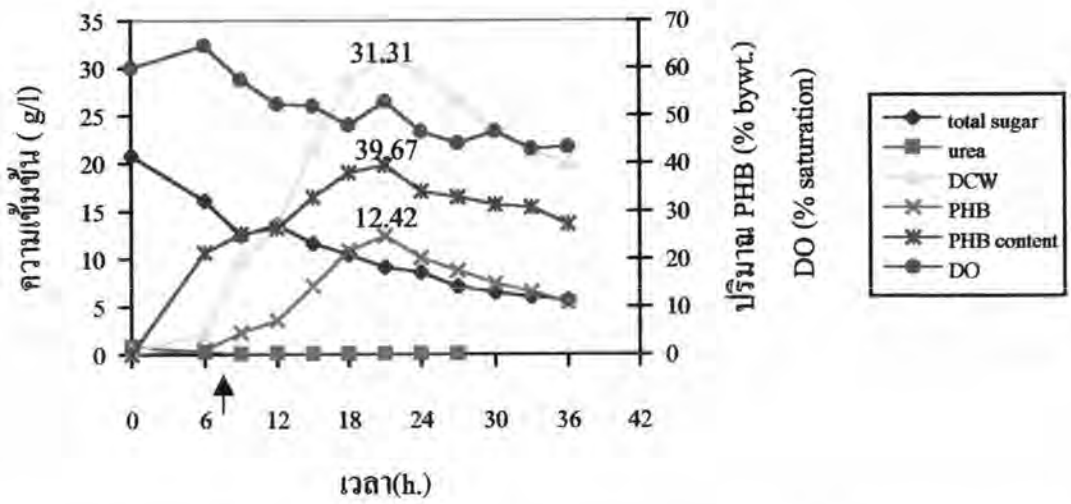
รูปที่38. การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นสารอาหารป้อนเข้า (↑ เริ่มมีการป้อนสารอาหารชั่วโมงที่ 8.5)

3.9.3การศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยการเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุอื่นๆ เป็นสารอาหารป้อนเข้า

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 2.5 ลิตร โดยใช้สารอาหารเพื่อการผลิตเช่นเดียวกับที่บรรยายไว้ข้อ 3.9.1 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7.0 ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ยูเรีย และแร่ธาตุ เป็นสารอาหารป้อนเข้า โดยมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารละลายป้อนเข้าเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ใช้เทคนิค pH-stat ควบคุมการป้อนสารอาหาร และควบคุมออกซิเจนละลายที่ 60 % ของอากาศอิ่มตัว เมื่อเลี้ยงเชื้อถึงชั่วโมงที่ 8 ค่า pH เปลี่ยนแปลงจากค่าที่ตั้งไว้ จึงเริ่มมีการป้อนสารอาหารเข้าสู่ถังหมักอัตโนมัติ ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 39 และรูปที่ 39 พบว่าผลการวิจัยที่ได้มีรูปแบบเช่นเดียวกันกับการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ที่ได้ผลตามข้อ 3.9.1 และ3.9.2 คือ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ และยูเรียถูกใช้หมดไปอย่างรวดเร็ว แต่การเติมแร่ธาตุผสมลงในสารละลายป้อนเข้าส่งผลให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ PHB สูงขึ้น รวมทั้งใช้ระยะเวลาสั้นกว่าการทดลองที่เติมเฉพาะแหล่งคาร์บอนหรือเติมแหล่งคาร์บอนรวมกับแหล่งไนโตรเจนแต่ไม่มีการเติมแร่ธาตุเป็นสารอาหารป้อนเข้า โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเพิ่มขึ้นเป็น 31.31 กรัมต่อลิตร และได้ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 12.42 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 39.67 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ ที่เวลา 21 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่39.ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ยูเรีย และแร่ธาตุเป็นสารอาหารป้อนเข้า

เวลา (h)	total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	20.84	0.79	0.31	-	-
6	16.15	0.28	2.16	0.46	21.30
9	12.47	0.08	9.90	2.27	25.22
12	13.55	0.15	13.49	3.56	26.39
15	11.61	0.07	21.79	7.16	32.86
18	10.45	0.08	28.65	10.89	38.01
21	9.11	0.07	**31.31**	**12.42**	**39.67**
24	8.54	0.05	29.57	10.09	34.12
27	7.05	0.05	26.61	8.74	32.85
30	6.45	0	23.57	7.39	31.35
33	6.03	0	21.31	6.55	30.74
36	5.64	0	20.03	5.46	27.26



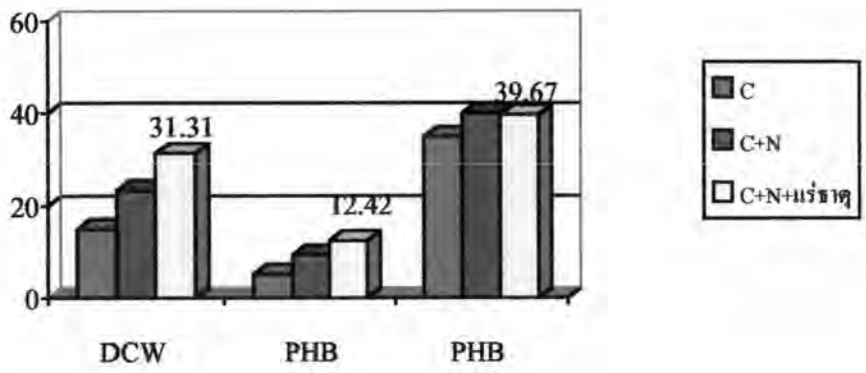
รูปที่39.การผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุเป็นสารอาหารป้อนเข้า (↑ เริ่มมีการป้อนสารอาหารชั่วโมงที่ 8)

เมื่อนำผลที่ได้จากการเพาะเลี้ยง*Bacillus* sp.BA-019 โดยใช้สารอาหารป้อนเข้าแตกต่างกันมาคำนวณอัตราการผลิต PHB และนำมาเปรียบเทียบกัน ดังแสดงในตารางที่ 40 และรูปที่ 40 พบว่าในการทดลองที่ใช้ทั้งแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ เป็นองค์ประกอบในสารอาหารที่ใช้ป้อนเข้า ทำให้เซลล์ *Bacillus* sp.BA-019 มีการเติบโตได้สูงที่สุด โดยใช้ระยะเวลาสั้นและการผลิต PHB ก็สูงกว่าการทดลองอื่นด้วย ทำให้สรุปได้ว่า *Bacillus* sp.BA-019 เป็นแบคทีเรียที่ไม่จำเป็นต้องมีการจำกัดสารอาหารบางชนิดเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสะสม PHB ในปริมาณมาก ดังนั้นเมื่อเซลล์มีการเติบโตอย่างรวดเร็วการผลิต PHB ที่เกิดควบคู่ไปพร้อมกัน และมีอัตราการผลิต PHB ที่สูงที่สุดเท่ากับ 0.59 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ตารางที่40. เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมัก เมื่อใช้อาหารป้อนเข้าต่างกัน

สารอาหารป้อนเข้า	เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB (g/l)	PHB (% by wt.)	Productivity (g/l-h)
แหล่ง C	33	14.94[a]	5.22[a]	34.94[a]	0.16[a]
แหล่ง C+N	24	23.29[b]	9.32[b]	40.02[b]	0.39[b]
แหล่งC+N+MSM	21	**31.31**[c]	**12.42**[c]	39.67[b]	**0.59**[c]

a , b , c ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.01$



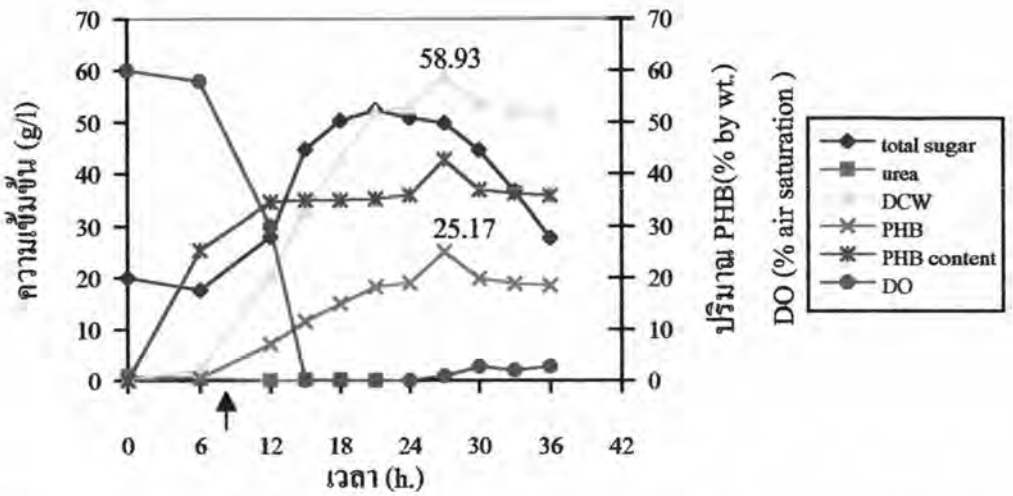
รูปที่40. เปรียบเทียบการผลิต PHB โดยเลี้ยงเชื้อ Bacillus sp.BA-019 ซึ่งมีการเติมสารอาหารต่างกัน

3.9.4การศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดที่มีในกากน้ำตาลเพิ่มขึ้น

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 2.5 ลิตร โดยใช้อาหารเพื่อการผลิตเช่นเดียวกับที่บรรยายไว้ข้อ 3.9.1 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pHเท่ากับ 7.0 ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นเป็น 400 กรัมต่อลิตร ยูเรีย และแร่ธาตุ เป็นสารอาหารป้อนเข้า เนื่องจากการใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ทำให้การควบคุมการป้อนสารอาหารโดยใช้เทคนิค pH-stat ไม่ทันต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของระบบ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารละลายป้อนเข้าเท่ากับ 25 โมลต่อโมล และควบคุมออกซิเจนละลายที่ 60 % ของอากาศอิ่มตัว เมื่อเลี้ยงเชื้อถึงชั่วโมงที่ 8 เริ่มมีการป้อนสารอาหารเข้าสู่ถังหมัก เนื่องจากค่า pH เปลี่ยนจากค่าที่กำหนดไว้ มีการเติมสารอาหารจนกระทั่งค่า pH เท่ากับค่าที่ต้องการ และเมื่อค่า pH มีการเปลี่ยนแปลงไปจากค่าที่ตั้งไว้จะมีการเติมสารอาหารอัตโนมัติ เพื่อควบคุมค่า pH ให้ได้ตามต้องการ ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 41 และรูปที่ 41 พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นเป็น 400 กรัมต่อลิตร *Bacillus* sp.BA-019จะมีการเติบโตเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว นับตั้งแต่เริ่มมีการเติมสารอาหารป้อนเข้าประมาณชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ คือความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มจาก 1.97 กรัมต่อลิตร ที่ 6 ชั่วโมง เป็น 20.48 กรัมต่อลิตร ที่ 12 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์มีการเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ 27 ชั่วโมง เท่ากับ 58.93 กรัมต่อลิตร การผลิต PHB เกิดขึ้นพร้อมกับการเติบโตของเซลล์ ดังนั้นรูปแบบของการผลิต PHB จึงเพิ่มขึ้นในรูปแบบเดียวกับการเติบโต โดยได้ความเข้มข้นของ PHB สูงสุดเท่ากับ 25.17 กรัมต่อลิตร ที่ 27 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 42.71 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด พบว่าความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 28 กรัมต่อลิตร ที่ 12 ชั่วโมง เป็น 50 กรัมต่อลิตร ที่ 18 ชั่วโมง จากนั้นความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดค่อนข้างคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 27 ของการเลี้ยงเชื้อและลดลงจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจากมีการเติมกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเป็นองค์ประกอบในสารอาหารป้อนเข้าตามเทคนิค pH-stat จนกระทั่งปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักเพิ่มขึ้นมากที่ประมาณชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อพิจารณาปริมาณของยูเรียพบว่า *Bacillus* sp.BA-019 ใช้ยูเรียเพื่อการเติบโตและการผลิต PHB จนกระทั่งยูเรียหมดไปอย่างรวดเร็ว ผลการวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นว่าควรเพิ่มปริมาณยูเรียให้มากขึ้นเพื่อให้เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการสร้างเซลล์เพื่อการผลิต PHB พบว่าค่าออกซิเจนละลายมีค่าเท่ากับ 60 % ของอากาศอิ่มตัวเป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นปริมาณออกซิเจนละลายจะลดลงเรื่อยๆจนกระทั่งเป็นศูนย์ เนื่องจากเซลล์มีความเข้มข้นสูงและประสิทธิภาพการให้อากาศของระบบมีจำกัด

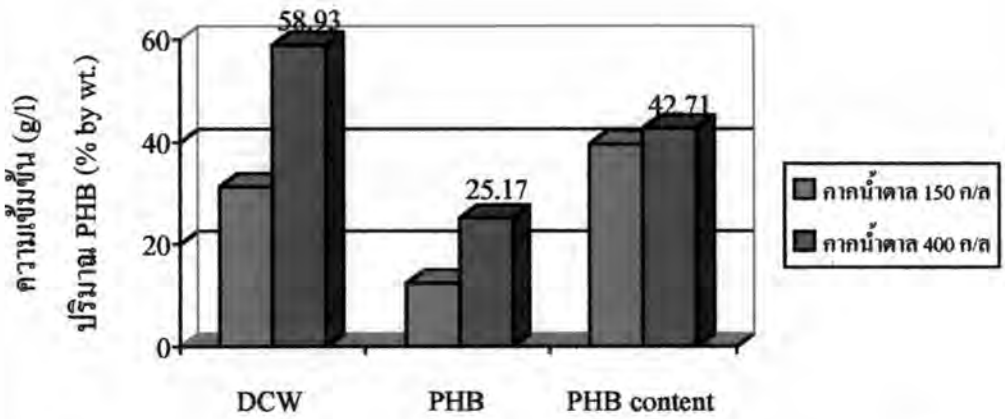
ตารางที่41. ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้ กากตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 400 กรัมต่อลิตร ยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล) และแร่ธาตุเป็นสารอาหารป้อนเข้า

เวลา (h)	total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	19.96	0.84	0.29	-	-
6	17.70	0.33	1.97	0.50	25.38
12	28.03	0.05	20.48	7.09	34.62
15	44.78	0.14	33.04	11.56	34.99
18	50.30	0.09	42.88	15.00	34.98
21	52.39	0.04	52.00	18.28	35.15
24	50.90	0	53.00	19.06	35.96
27	49.88	0	**58.93**	**25.17**	**42.71**
30	44.69	0	53.76	19.87	36.96
33	36.69	0	52.29	18.92	36.19
36	27.73	0	51.75	18.55	35.85



รูปที่41. การผลิต PHB โดยการเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด 400 กรัมต่อลิตร และสารอาหารป้อนเข้ามีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล (↑ เริ่มมีการป้อนสารอาหารชั่วโมงที่ 8)

รูปที่42 แสดงการเปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดต่างกัน พบว่าการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 แบบ fed-batch โดยใช้สารอาหารป้อนเข้าที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดสูงเท่ากับ 400 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้เซลล์สามารถเติบโตได้สูงอย่างรวดเร็ว และมีการผลิต PHB สูงกว่าการใช้สารป้อนเข้าที่มีปริมาณน้ำตาลต่ำกว่า(150 กรัมต่อลิตร) จึงมีผลให้การเติบโตและการผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลเท่ากับ 400 กรัมต่อลิตร ดีกว่าการใช้อาหารที่มีน้ำตาลเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร



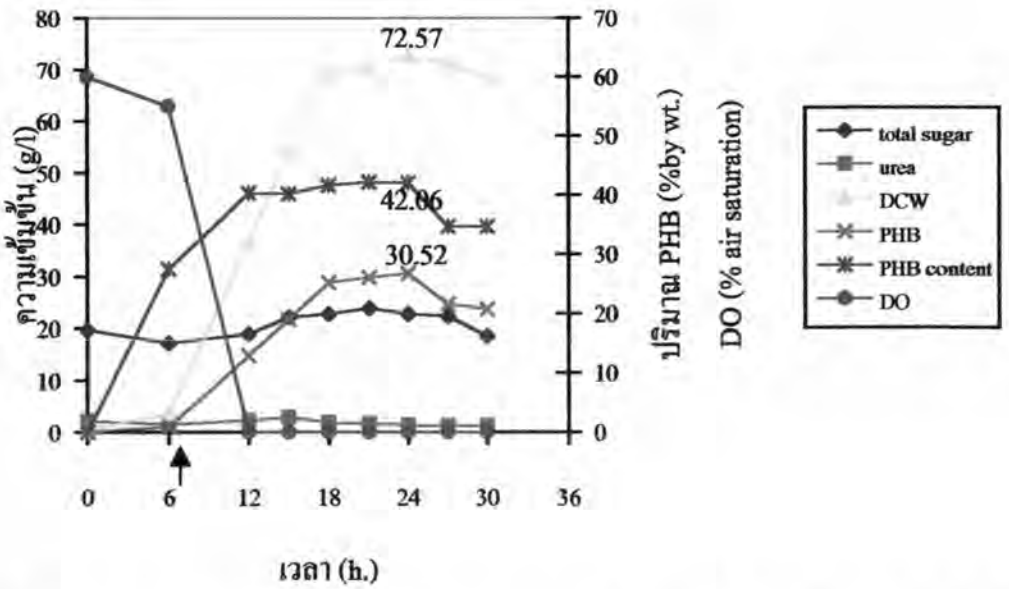
รูปที่42.เปรียบเทียบการผลิต PHB โดยการเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 แบบ fed-batch โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 150 และ 400 กรัมต่อลิตร

3.9.5การศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 10 โมลต่อโมล

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 2.5 ลิตร ซึ่งเป็นอาหาร MSM ที่ปรับปรุงแล้วจากการศึกษานี้ โดยมีน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมล ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pHเท่ากับ 7.0 ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 400 กรัมต่อลิตร ยูเรีย และแร่ธาตุ เป็นสารอาหารป้อนเข้า โดยมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารละลายป้อนเข้าเท่ากับ 10 โมลต่อโมล ควบคุมการป้อนสารอาหารโดยใช้เทคนิค pH-stat และควบคุมออกซิเจนละลายที่ 60 % ของอากาศอิ่มตัว พบว่าค่า pH เริ่มเปลี่ยนจากค่าที่กำหนดประมาณชั่วโมงที่ 7.5 จึงเริ่มมีการป้อนสารอาหารเข้าสู่ถังหมักโดยอัตโนมัติ ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 42 และรูปที่ 43 เมื่อเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้า ซึ่งทำให้มีแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้น พบว่า *Bacillus* sp.BA-019 เติบโตอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 72.57 กรัมต่อลิตรภายใน 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และได้ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 30.52 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 42.06 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดถูกใช้ไปมากกว่าการใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ในสารอาหารป้อนเข้า เนื่องจากในการทดลองนี้ *Bacillus* sp.BA-019 เติบโตได้มากกว่า สำหรับการใช้ยูเรียของเซลล์ พบว่าปริมาณยูเรียลดลงจนเหลือประมาณ 1 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการหมัก การที่มีแหล่งไนโตรเจนเหลือ อาจมีสาเหตุมาจากการที่ปริมาณออกซิเจนในระบบไม่เพียงพอต่อปริมาณของเซลล์ที่มีความหนาแน่นสูง เซลล์จึงไม่สามารถมีกิจกรรมภายในเซลล์ เพื่อนำสารอาหารไปใช้สร้างองค์ประกอบของเซลล์ได้ โดยพบว่าหลังจาก 8 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ค่าออกซิเจนละลายลดลงต่ำกว่า 60 % ของอากาศอิ่มตัว และลดลงจนเป็นศูนย์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อจนสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งทั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่าเนื่องจากในการทดลองนี้เป็นภาวะที่ทำให้เซลล์มีการเติบโตได้ดีที่สุด จึงได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงมาก และอุปกรณ์ในการให้อากาศในห้องปฏิบัติการมีขีดจำกัด กล่าวคือ อัตราการกวนสูงสุดของถังหมักได้เท่ากับ 800 รอบต่อนาที และเครื่องอัดอากาศมีความสามารถสูงสุดในการอัดอากาศได้เท่ากับ 5 นอร์มอลลิตรต่อนาที

ตารางที่42.ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 400 กรัมต่อลิตร ยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10 โมลต่อโมล) และแร่ธาตุ เป็นสารอาหารป้อนเข้า

เวลา (h)	total sugar (g/l)	ยูเรีย (g/l)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (%by wt.)
0	19.64	2.15	0.33	-	-
6	17.10	1.49	3.57	0.98	27.45
12	18.90	2.24	36.63	14.76	40.29
15	22.12	2.90	54.01	21.72	40.22
18	22.73	1.83	69.20	28.77	41.58
21	23.82	1.67	70.75	29.86	42.20
24	22.75	1.34	**72.57**	**30.52**	**42.06**
27	22.39	1.25	71.34	24.75	34.69
30	18.51	1.23	68.22	23.67	34.70



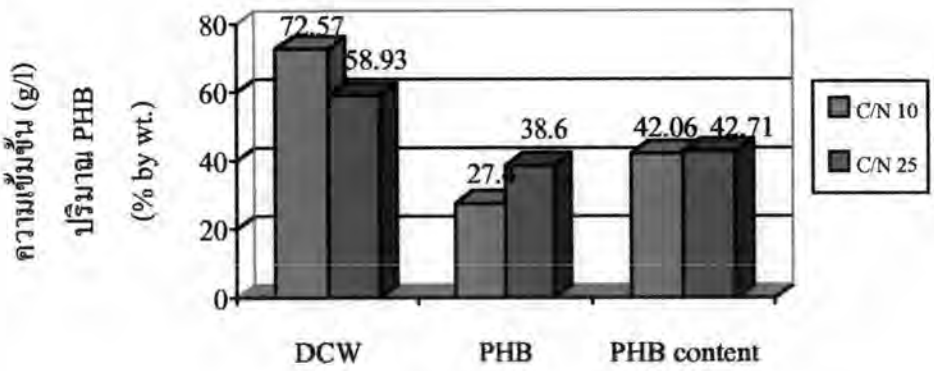
รูปที่43.การผลิต PHB โดยการเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด 400 กรัมต่อลิตร และสารอาหารป้อนเข้ามีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ10 โมลต่อโมล (↑ เริ่มมีการป้อนสารอาหารชั่วโมงที่ 7.5)

เมื่อนำผลการวิจัยการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ที่ใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าที่แตกต่างกัน มาคำนวณอัตราการผลิต PHB และนำมาเปรียบเทียบกันให้ผลแสดงดังตารางที่43 และรูปที่44 พบว่าการใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมล มีผลให้การเติบโตของเซลล์ รวมทั้งการผลิต PHB สูงกว่าการใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล เนื่องจากมีแหล่งไนโตรเจนที่มากขึ้นเพียงพอต่อการเติบโตและการผลิตPHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 และได้พบว่าอัตราการผลิต PHB เพิ่มสูงขึ้นเป็น 1.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ตารางที่43.เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าต่างกัน

อัตราC/N (โมลต่อโมล)	เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB (g/l)	ปริมาณ PHB (% by wt.)	productivity (g/l-h)
10	24	**72.57**[a]	**30.52**[a]	42.06	**1.27**[a]
25	27	58.93[b]	25.17[b]	42.71	0.93[b]

a , b ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.01$



รูปที่44. เปรียบเทียบการผลิต PHB โดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้าต่างกัน