บทที่4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการเพิ่มปริมาณการผลิต PHB โดยใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก และหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร จากนั้นศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 แบบ fed-batch ในถังหมัก โดยใช้เทคนิค pH-stat เป็น feedback parameter เพื่อควบคุมการป้อนสารอาหารเข้าสู่ระบบ ศึกษาหาองค์ประกอบของสารอาหารป้อนเข้า และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ได้ผลว่าสามารถเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ได้สูงขึ้น เพิ่มปริมาณ PHB และอัตราการผลิต PHB ได้มากขึ้นอย่างชัดเจน

4.1 การศึกษาผลของซับสเตรทต่อการเติบโตและการผลิต PHB

ผลการวิจัยพบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวนี้มีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ 6 ชั่วโมง จึงเลือกใช้กล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมง สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเพื่อการผลิต PHB

การวิจัยนี้ศึกษาเปรียบเทียบการผลิต PHB โดยใช้น้ำตาลทรายและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้กากน้ำตาลให้ผลการผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 ดีกว่าการใช้น้ำตาลทรายทั้งในด้านของปริมาณ PHB ที่ผลิตได้และในด้านการเติบโตของเซลล์ โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของ PHB เพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้น้ำตาลทราย 2.5 และ 4 เท่าตามลำดับ การใช้กากน้ำตาลให้ผลการเติบโตของเซลล์และการผลิต PHB ที่ดีกว่า อาจเนื่องมาจากในกากน้ำตาลยังมีองค์ประกอบอื่นๆนอกเหนือจากน้ำตาลซูโครส กลูโคสและฟรักโตส เช่น วิตามินชนิดต่างๆ ได้แก่ ไทอะมีน ไรโบฟลาวิน และไพริดอกซีน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้เป็น growth factor ของเซลล์ Beaulieu และคณะ(1995)รายงานว่าการเติมกากน้ำตาลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHB จากเชื้อ *A. eutrophus* มีผลให้เซลล์เติบโตได้เพิ่มขึ้น และให้ผลการผลิต PHB สูงกว่าการทดลองที่ไม่มีการเติมกากน้ำตาล นอกจากนี้ประสิทธิภาพการผลิต PHB ขึ้นกับ metabolic flux ของวิถีการสังเคราะห์ PHB เนื่องจากถึงแม้ซับสเตรทแต่ละชนิดจะมีวิถีเมตาบอลิกส่วนใหญ่เหมือนกัน แต่ flux distribution อาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของซับสเตรทและระบบเอนไซม์ของจุลินทรีย์ (Shiและคณะ,1997) Lee(1996b)รายงานว่าการใช้กากน้ำตาลเป็น

แหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต PHB มีต้นทุนซับสเตรทเท่ากับ 0.52 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ซึ่งถูกกว่าการใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.2 และ 0.78 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ข้อดีอีกประการหนึ่งของการใช้กากน้ำตาล คือ เป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่าย และมีปริมาณมากในประเทศไทย ซึ่งจัดเป็นการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาเพิ่มมูลค่าขึ้น และเป็นวัตถุดิบที่สามารถสร้างขึ้นทดแทนได้ใหม่ (renewable resource)

จากรายงานของ ChoiและLeeในปี 1997 และ 1999 ซึ่งกล่าวว่าปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อต้นทุนการผลิต PHB คือราคาของซับสเตรทที่นำมาใช้ในการผลิต PHB ซึ่งแหล่งคาร์บอนมีผลต่อราคาของซับสเตรท คิดเป็น 70-80 % ของต้นทุนวัตถุดิบทั้งหมด ดังนั้นถ้าสามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกนำมาผลิต PHB มีผลทำให้ต้นทุนของการผลิต PHB ลดลงได้มาก ซึ่งทำให้มีความเป็นไปได้ในการแข่งขันด้านราคากับพลาสติกที่สังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น PE และ PP ได้ ความพยายามในการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกได้มีการศึกษามาอย่างต่อเนื่อง โดยใช้จุลินทรีย์หลายชนิด เนื่องจากความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน Page(1992) ศึกษาการผลิต PHB โดยเชื้อ *Azotobacter vinelandii* UWD ในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน พบว่าการผลิต PHB โดยใช้น้ำตาลบริสุทธิ์เช่น กลูโคส ฟรักโตส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนจะผลิต PHBได้น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อใช้กากน้ำตาลจากหัวบีทหรืออ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต PHB สามารถผลิต PHBได้สูงกว่าโดยได้เท่ากับ 7.4 กรัมต่อลิตรและ3.2 กรัมต่อลิตรตามลำดับ Bourque และคณะ(1995) รายงานการผลิต PHB จากเชื้อ *Methylobacterium extorquens* โดยใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตความหนาแน่นของเซลล์ได้เท่ากับ 115 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณ PHB คิดเป็น 46 %ต่อความหนาแน่นของเซลล์ Martinez-Toledo และคณะ(1995) รายงานการผลิต PHB จากเชื้อ *Azotobacter chroococcum* H23 โดยใช้ alpechin ซึ่งเป็นน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันมะกอก (olive oil mills) สามารถผลิต PHBได้ 50% ต่อความหนาแน่นของเซลล์ Ramsay และคณะ (1995) รายงานการใช้เชื้อ *Pseudomonas cepacia* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลส สำหรับการผลิต PHB Son และLee (1996) ศึกษาการใช้น้ำทิ้งจากโรงงานกลั่นแอลกอฮอล์เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิต PHBโดยจุลินทรีย์ *Actinobacillus* sp.EL-9 Kim และ Chang(1998) ศึกษาการผลิต PHBจากแป้ง โดยใช้ *Azotobacter chroococcum* พบว่าสามารถผลิต PHBได้ในปริมาณ 46% ต่อความหนาแน่นของเซลล์ Liu และคณะ(1998) ศึกษาการผลิต PHB โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนจากเชื้อ recombinant *Escherichia coli* โดยกระบวนการหมักแบบ fed-batch ได้ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณ PHB และอัตราการผลิต PHB เท่ากับ 39.5 กรัมต่อลิตร 80% ต่อความหนาแน่นของเซลล์ และ 1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ Yu และคณะ(1999)รายงานการศึกษาการใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารสำหรับผลิต PHB พบ

ว่าเชื้อ *Alcaligenes latus* DSM1124 สามารถใช้ malt wastes จากโรงงานผลิตเบียร์กับน้ำตาลซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต PHB โดยให้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 32.4 กรัมต่อลิตร และได้ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 22.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 70.1 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์

เมื่อพิจารณาถึงแหล่งไนโตรเจนเปรียบเทียบระหว่างการใช้ยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเพื่อการผลิต PHB ที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เซลล์สามารถเติบโตและผลิต PHB ได้ดีกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ สุดา สุภาชวินสวัสดิ์(2542) ซึ่งพบว่าเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้เชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ผลิต PHBV ได้ในปริมาณสูงขึ้น การที่แหล่งไนโตรเจนทั้งสองให้ผลต่างกัน อาจเนื่องมาจากอัตราการนำสารเข้าสู่เซลล์แตกต่างกัน และประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ PHB ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งไนโตรเจนด้วย (Beaulieuและคณะ ,1995) Bormann และคณะ(1998a) และGrotheและคณะ(1999) รายงานว่าการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกก็จะช่วยลดต้นทุนการผลิต ซึ่งยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก และนิยมใช้กันในอุตสาหกรรมการหมัก โดยยูเรียมีราคาถูกกว่าแอมโมเนียมซัลเฟตประมาณ 3.6 เท่า แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB แตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ Page(1992) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อนต่อการผลิต PHB พบว่าการใช้ fish peptone proteose no.3 หรือ yeast extract เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter vinelandii* UWD ให้ผลการผลิต PHB ดีกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อนอื่นๆ ต่อมาPageและCornish(1993)รายงานถึงการผลิต PHB โดยเชื้อ *Azotobacter vinelandii* สายพันธุ์เดียวกัน พบว่าเมื่อมีการเติม fish peptone ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน จะช่วยให้มีการสังเคราะห์PHB เพิ่มมากขึ้น Beaulieu และคณะ(1995) ศึกษาผลของเกลือแอมโมเนียมต่อการเติบโตและการผลิต PHB จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* โดยเปรียบเทียบระหว่างเกลือแอมโมเนียม 4 ชนิดคือ ซัลเฟต ไนเตรต ฟอสเฟต และคลอไรด์ พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลทำให้ได้การเติบโตของเซลล์ ปริมาณ PHB และอัตราการผลิต PHB สูงกว่าการใช้แกลือแอมโมเนียมชนิดอื่นเป็นแหล่งไนโตรเจน Lee และ Chang(1995) ศึกษาการผลิต PHB จากเชื้อ recombinant *E. coli* โดยการใช้แหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อนชนิดต่างๆ เช่น tryptose yeast extract peptone casamino acids และ beef extract เป็นต้น พบว่า tryptose ทำให้เชื้อมีการเติบโตและการผลิต PHB ที่สูงที่สุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 6.63 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น PHB เท่ากับ 4.45 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ67.1% ต่อความหนาแน่นของเซลล์ Bormann และคณะ(1998a) ศึกษาการผลิตPHBโดยเชื้อ *Azotobacter beijerinckii* จากแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนคือ casein peptone yeast extract casamino acids และยูเรีย พบว่าเชื้อมีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน

Bormann และคณะ(1998b) ศึกษาเปรียบเทียบการผลิต PHB โดย *A. eutrophus* DSM11348 ระหว่างการใช้ casein peptone หรือ casamino acids เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการใช้ casein peptone ทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 65 กรัมต่อลิตร และมีการสะสม PHB ได้เท่ากับ 60-80 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ Grothe และคณะ(1999)พบว่าเชื้อ *A. latus* ไม่สามารถใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเติบโตและการผลิต PHBได้ แต่การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตโดยแบคทีเรียชนิดนี้ ทำให้เชื้อมีให้การเติบโตและการผลิต PHB สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ

ส่วนแร่ธาตุ (trace elements) ซึ่งเป็นสารอาหารอีกประเภทหนึ่งที่มีความจำเป็นต่อจุลินทรีย์ ในการวิจัยนี้พบว่า การใช้แร่ธาตุสูตรที่ 2 ให้ผลผลิต PHB จากเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 สูงกว่าการใช้แร่ธาตุสูตรอื่น โดยได้ความหนาแน่นเซลล์ ความเข้มข้นของ PHB และปริมาณ PHB สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แร่ธาตุสูตรอื่น จากการศึกษาของ Bourque และคณะ (1995)ซึ่งศึกษาผลของแร่ธาตุแต่ละชนิด พบว่าการที่ไม่มีแมงกานีสเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Methylobacterium extroquens* เพื่อการผลิตPHB จะส่งผลต่อการผลิตเซลล์และอัตราการเติบโตจำเพาะอย่างมาก โดยทำให้ประสิทธิภาพการเติบโตลดลง การทดสอบผลของแร่ธาตุร่วมกันพบว่าในสารผสมของเกลือ(salt mixture) ที่ไม่มีแคลเซียมคลอไรด์ เฟอรัสซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟต และซิงค์ซัลเฟต เป็นสาเหตุให้การผลิตมวลชีวภาพและอัตราการเติบโตจำเพาะลดลงอย่างมาก การที่เซลล์เติบโตได้น้อยและได้มวลชีวภาพในปริมาณต่ำ จะส่งผลต่อความเข้มข้นและปริมาณ PHBที่ผลิตได้โดยตรง Grotheและคณะ(1999)ศึกษาผลของชนิดและปริมาณของธาตุแต่ละชนิด พบว่าการมีปริมาณแร่ธาตุมากเกินไปทำให้ไม่สามารถผลิตมวลชีวภาพและ PHB ได้ในปริมาณสูง และธาตุเหล็กอาจจะมีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนของ PHB ภายในเซลล์ Bormannและคณะ(1998b) ศึกษาพบว่าถ้าไม่มีการเติมแร่ธาตุลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHB จะมีผลให้ผลผลิต PHB ที่ได้ต่ำ Grotheและคณะ(1999)รายงานว่าการเติมแร่ธาตุในปริมาณที่เหมาะสม ทำให้ได้อัตราการผลิต PHB และผลผลิต PHB สูง อย่างไรก็ตามถ้าความเข้มข้นของแร่ธาตุต่ำหรือสูงเกินไป ก็ทำให้อัตราการผลิต PHB ลดลง

จากผลการทดลองการเติมกรดซิตริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHB พบว่าการเติมกรดซิตริกเท่ากับ 0.75 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ให้ผลการผลิต PHB ดีที่สุด โดยได้ปริมาณ PHB ประมาณ 60 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ ทั้งนี้การเติมกรดซิตริกอาจส่งผลต่อกลไกการสังเคราะห์ PHB ภายในเซลล์ ซึ่งวิถีการสังเคราะห์ PHB โดย *Bacillus* sp. ยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัด ดังนั้นการอธิบายวิถีการสังเคราะห์ PHB จะใช้งานวิจัยที่ศึกษาจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เช่น *Alcaligenes eutrophus* *Zoogloea ramigera* และ *Azotobacter beijerinckii* เป็นต้น (Doi, 1990)

สันนิษฐานว่าการเติมกรดซิตริกอาจช่วยให้เซลล์ไม่ต้องนำอะเซติล-โคเอมาสังเคราะห์กรดซิตริกเพื่อเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ในปริมาณมาก จึงทำให้มีปริมาณอะเซติล-โคเอเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHB ได้เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากอะเซติล-โคเอเป็นสารตั้งต้นของวิถีการสังเคราะห์ PHB Kimและคณะ(1996) รายงานว่าการเติมไพรูเวตหรือลิวซีน ช่วยเพิ่มอัตราส่วนNADH/NADและ NADPH/NADP ภายในเซลล์ของ *A. eutrophus* และมีปริมาณโคเอนไซม์เอลดลง ในทำนองเดียวกันการเติมกรดซิตริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 เพื่อการผลิต PHB อาจให้ผลเช่นเดียวกันกับการเติมไพรูเวตหรือลิวซีน การที่เซลล์มี NADH ปริมาณมากจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซิเตรตซินเตส (citrate synthase) และไอโซซิเตรต ดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) ซึ่งมีผลให้อะเซติล-โคเอเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHB ได้เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การที่โคเอนไซม์เอลดลง จะทำให้เอนไซม์ 3-คีโตไธโอเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ควบคุมปฏิกิริยาการรวมอะเซติล-โคเอ 2 ตัว ไปเป็น อะเซโตอะเซติล-โคเอ ที่มีความสำคัญในวิถีการสังเคราะห์ PHB ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการมีโคเอนไซม์เอมากเกินไปจะมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว Yong-Hyunและคณะ(1996) รายงานว่าการเติมกรดซิตริกปริมาณเล็กน้อย จะกระตุ้นการสังเคราะห์ PHB โดยเชื้อ *Alcaligenes latus* แต่ถ้าเติมกรดซิตริกมากเกินไปการสะสม PHB จะลดลง LeafและSrienc(1998) ศึกษาแบบจำลองเมตาบอลิกของวิถีการสังเคราะห์ PHB พบว่า อะเซติล-โคเอหรือ Coenzyme A และอัตราส่วน NADH/NAD ส่งผลควบคุมการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญ 2 ชนิดในวิถีการสังเคราะห์ PHB ได้แก่ 3-คีโตไธโอเลส และ อะเซโตอะเซติล-โคเอ รีดักเตส ในงานวิจัยต่างๆที่ผ่านมาจะมีการเติมกรดซิตริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ Martinez-Toledoและคณะ(1995)เติมเฟอริกซิเตรต 0.02 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเพื่อการผลิต PHBโดยเชื้อ *Azotobacter chroococum* H23 การวิจัยของKimและคณะ(1994)และของ Ryuและคณะ(1997)เติมกรดซิตริก 1.7 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHB ด้วยการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* H16 แบบ fed-batch JangและRogers(1996)เติมกรดซิตริก 2 กรัมต่อลิตรเป็นองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHB WangและLee(1997a)เติมกรดซิตริก 0.1 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes latus* เพื่อการผลิต PHB WangและLee(1997b)ใช้กรดซิตริก 0.8 กรัมต่อลิตรเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHB จาก recombinant *E. coli* KimและChang (1998)เติมกรดซิตริก 1 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter chroococcum* H23 สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ fed-batch Savenkovaและคณะ(1999)เติมโซเดียมซิเตรต 0.5 กรัมต่อลิตรเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ*Az. chroococcum* H23

4.2 การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ในระดับถังหมัก

ผลการวิจัยพบว่า การใช้กล้าเชื้อที่มีปริมาณมากกว่า 0.2 กรัมต่อลิตร ทำให้การเติบโตและการผลิต PHB โดยเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 สูงภายในระยะเวลาอันสั้น จะเห็นได้ว่าปริมาณกล้าเชื้อมีผลต่อประสิทธิภาพการหมัก โดยมีผลต่อระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ซึ่งตรงกับการรายงานของYamaneและคณะ(1996)ที่พบว่าการใช้กล้าเชื้อปริมาณมากจะช่วยลดเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเพื่อให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูง โดยพบว่าการเพาะเลี้ยง *Alcaliigenes latus* แบบ fed-batch ซึ่งใช้ปริมาณของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 13.7 กรัมต่อลิตร ทำให้เซลล์มีการเติบโตและได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 125 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 16.5 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใช้ระยะเวลาน้อยกว่าการใช้ปริมาณของเซลล์เริ่มต้น 1.1 กรัมต่อลิตร และ 4.4 กรัมต่อลิตร เพื่อให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากัน

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 โดยการควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ส่งผลให้เซลล์มีความสามารถในการเติบโตและการผลิต PHB ได้ดีที่สุด ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากการที่ในระหว่างการเติบโตของเชื้อขณะหมักค่า pH จะเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจทำให้เชื้อเติบโตได้ช้าลง หรือผลิตสารที่ต้องการได้น้อยลง เนื่องจาก pH มีผลต่อระบบเอนไซม์ในปฏิกิริยาต่างๆของเซลล์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมค่า pH ให้คงที่ในระดับที่เหมาะสมต่อการเติบโตของเชื้อ (Scragg, 1991; Boze และคณะ, 1992) Grotheและคณะ(1999)รายงานถึงผลของ pH เริ่มต้นต่อการเติบโตและการผลิต PHB พบว่าถ้าค่า pH เปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อย จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการเลี้ยงเชื้อลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากค่า pH เริ่มต้นอาจจะมีผลต่อความสามารถในการทนำแร่ธาตุบางตัวไปใช้เพื่อกิจกรรมต่างๆของเซลล์

สำหรับปริมาณออกซิเจนละลายที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ในระดับถังหมักเท่ากับ 60 % ของอากาศอิ่มตัว การที่ปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญมากต่อกระบวนการหมัก เนื่องจากส่งผลต่อการเติบโตของเซลล์ และการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ซึ่งปริมาณออกซิเจนละลายที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน Bitar และ Underhill(1990) ศึกษาพบว่าเชื้อ *A. eutrophus* H16เติบโตด้วยอัตราการเติบโตจำเพาะสูงที่สุดเมื่อใช้ออกซิเจนละลาย 60%ของอากาศอิ่มตัวในการเลี้ยงเชื้อ Page(1992)รายงานการศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิต PHB โดยเชื้อ *Azotobacter vinelandii* UWD พบว่านอกจากการให้อากาศจะมีผลต่อการผลิต PHB แล้ว การใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน มีผลให้ระดับการให้อากาศที่เหมาะสมแตกต่างกันด้วย นอกจากปริมาณออกซิเจนละลายมีผลต่อการเติบโตแล้ว ยังส่งผลต่อการผลิต PHB และน้ำหนักโมเลกุลของ PHBตามรายงานของ Quaglianoและ

Miyazaki(1997) โดยพบว่าน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น 100 เท่ เมื่ออัตราการให้อากาศลดลงจาก 2.5 vvm เป็น 0.5vvm และปริมาณ PHB ก็เพิ่มขึ้นเช่นกันประมาณ 10 เท่า Kimและ Chang (1998) รายงานว่า *Azotobacter chroococcum* สามารถผลิต PHBได้ในปริมาณมากขึ้นเมื่อมีการจำกัดออกซิเจนในการเลี้ยงเชื้อ Savenkovaและคณะ(1999) ศึกษาการให้อากาศต่อการผลิต PHB จากเชื้อ *Azotobacter chroococcum* พบว่าการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีปริมาณอากาศต่ำส่งผลให้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า สุดา สุภาชวินสวัสดิ์(2542) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 เพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ในระดับขวดเขย่าให้มีปริมาณอากาศแตกต่างกัน โดยแปรผันปริมาตรอาหารในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่าปริมาณอากาศมีผลต่อการเติบโตและการผลิต PHA โดยพบว่าออกซิเจนละลายปริมาณค่อนข้างต่ำ (ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 75 มิลลิลิตร) มีผลให้ได้ปริมาณ PHBV สูงกว่าการให้ออกซิเจนละลายปริมาณสูงหรือต่ำกว่านี้

ในงานวิจัยนี้พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิต PHB ในถังหมักเท่ากับ 25 โมลต่อโมล เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาระหว่างการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าและถังหมักที่ใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เท่ากัน (50โมลต่อโมล) พบว่าปริมาณ PHB ที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักน้อยกว่าในขวดเขย่า ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าในถังหมักมีการให้อากาศปริมาณสูงกว่าขวดเขย่ามาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสุดา สุภาชวินสวัสดิ์(2542) ที่ศึกษาการผลิต PHBV โดยเชื้อชนิดเดียวกัน ซึ่งศึกษาผลของปริมาณอากาศ พบว่าเมื่อใช้ปริมาณของสารอาหารมากขึ้นเป็น 75 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ได้สารผลิตภัณฑ์สูงกว่าเมื่อใช้ปริมาณสารอาหารเท่ากับ 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณอากาศน้อยในระดับหนึ่งที่เหมาะสมมีผลให้การสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์สูงกว่าการให้ปริมาณอากาศมากกว่า จุลินทรีย์ชนิดต่างๆมีประสิทธิภาพในการเติบโตและการผลิต PHB โดยการใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ดังตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Quagliano และ Miyazaki(1997) รายงานว่าเมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงมีผลให้ผลผลิต PHB ที่ได้ต่อกลูโคสที่ใช้ไปเพิ่มขึ้น และเมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 68.9 โมลต่อโมล ในการเพาะเลี้ยง *Azotobacter chroococcun* 6B แบบ fed-batch ได้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 63.5 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ Grotheและคณะ(1999)รายงานว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนส่งผลต่อการผลิตเซลล์และการผลิต PHB โดยพบว่าเมื่อใช้ซูโครสและแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมเท่ากับ 28.3 โมลต่อโมล

สรุปได้ว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ในระดับถังหมัก คือ ใช้กล้าเชื้อปริมาณ 0.3 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 และควบคุมค่าออกซิเจนละลาย 60 %ของอากาศอิ่มตัวตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิควบคุมที่ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งการควบคุมอุณหภูมิมีความสำคัญต่อการเติบโตของเซลล์ โดยมีผลต่ออัตราการเติบโต กระบวนการเมตาบอลิซึม และองค์ประกอบภายในเซลล์ ในระหว่างการหมักจะเกิดพลังงานความร้อนขึ้น ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์แต่ละชนิด

4.3 การศึกษาการผลิต PHB โดยการเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 แบบมีการป้อนสารอาหาร

ผลการทดลองพบว่าการใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบในสารอาหารป้อนเข้า ให้ผลการเติบโตของเซลล์และการผลิต PHB ดีกว่าการใช้แต่แหล่งคาร์บอนหรือแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารป้อนเข้า ถึงแม้ว่าปริมาณ PHB ที่ได้จากการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน หรือแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุเป็นสารอาหารป้อนเข้าให้ผลใกล้เคียงกัน แต่อัตราการผลิตPHBเมื่อใช้สารอาหารป้อนเข้าครบทั้งสามชนิดจะสูงที่สุด จึงสรุปได้ว่าเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 จำเป็นต้องได้รับสารอาหารครบถ้วนเพื่อใช้ในการเติบโตและการผลิต PHB เนื่องจากผลการวิจัยที่ได้พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 เป็นจุลินทรีย์ที่มีการผลิต PHB ได้ในปริมาณสูงในขณะที่เซลล์มีการเติบโต โดยไม่ต้องมีการจำกัดปริมาณสารอาหาร ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวแบบ fed-bateh จึงไม่จำเป็นต้องใช้การเพาะเลี้ยง 2 ขั้นตอนเหมือนจุลินทรีย์ชนิดที่จำเป็นต้องมีการจำกัดสารอาหารบางชนิดและมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ จึงจะเกิดการสะสม PHB ในปริมาณมาก ผลการวิจัยที่ได้สอดคล้องกับผลของ Yamane และคณะ(1996) ผู้วิจัยดังกล่าวได้ทำการเพาะเลี้ยง *A. latus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ไม่จำเป็นต้องจำกัดสารอาหารบางชนิดเพื่อการผลิต PHB โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ที่มีการใช้เทคนิค pH-stat ควบคุมการป้อนสารอาหาร การวิจัยดังกล่าวนี้ไม่ใช้การเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนเช่นกัน และมีการเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบในสารอาหารป้อนเข้า ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงเท่ากับ 142 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 68.4 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB 50 %ต่อความหนาแน่นของเซลล์ และมีอัตราการผลิต PHB สูงถึง 4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Kim และคณะ(1996) ศึกษาการผลิตPHBโดยเลี้ยง *Methylobacterium organophilum* แบบ fed-batch ใช้สารป้อนเข้าที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุเช่นกัน จากการวิจัยของทั้งสองคณะผู้วิจัยนี้ และงานวิจัยอื่น ๆ สามารถผลิต PHB ได้ความเข้มข้นและอัตราการผลิต PHB เพิ่มสูงขึ้น ในผลงานวิจัยนี้การเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลเป็น 400 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับการใช้กากน้ำตาลที่มีน้ำตาลทั้ง

หมดเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 31.31 กรัมต่อลิตร เป็น 58.93 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ PHB เพิ่มขึ้นจาก 12.42 กรัมต่อลิตร เป็น 25.17 กรัมต่อลิตร จากนั้นเมื่อเปลี่ยนอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนจาก 25 โมลต่อโมล เป็น 10 โมลต่อโมล พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10 โมลต่อโมล ให้ผลการผลิต PHB ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด คือได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 72.57 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 30.52 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิต PHB สูงขึ้นเท่ากับ 1.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อนำผลการวิจัยที่ได้เปรียบเทียบกับบางการวิจัย แสดงดังตารางที่ 44 พบว่าผลการวิจัยได้ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของ PHB และอัตราการผลิต PHB ต่ำกว่าบางการวิจัย และได้ผลการวิจัยใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Liu และคณะ(1998) ซึ่งผลิต PHB โดยการเพาะเลี้ยง recombinant *E. coli* แบบ fed-batch โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ แหล่งสารอาหาร และวิธีการเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

สรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ใหม่ โดยวิธี fed-batch ใช้กากน้ำตาลและยูเรีย ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกเป็นสารอาหารหลัก และมีการเติมสารแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน รวมทั้งแร่ธาตุ โดยใช้ pH-stat ควบคุมการป้อนสารอาหาร และใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม เป็นผลให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของ PHB และอัตราการผลิต PHB เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ คือได้ความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มจาก 5.09 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่า เป็น 72.57 กรัมต่อลิตร และได้ความเข้มข้น PHB เพิ่มขึ้นจาก 2.24 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่า เป็น 30.52 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 44. เปรียบเทียบการผลิต PHB โดยใช้จุลินทรีย์และเทคนิคการเพาะเลี้ยงต่างกัน

จุลินทรีย์	ซับสเตรท	วิธีการเพาะเลี้ยง	เวลา (h)	ความเข้มข้นเซลล์ (ก/ล)	ความเข้มข้น PHB (ก/ล)	ปริมาณ PHB (% ต่อนน.)	อัตราการผลิต PHB (ก/ล-ชม.)	เอกสารอ้างอิง
Bacillus sp. BA-019	กากน้ำตาล	pH-stat fed-batch	24	72.57	30.52	42.06	1.27	งานวิจัยนี้
recombinant *E.coli*	กากน้ำตาล	pH-DO-stat fed-batch	32	39.50	31.60	80.00	1.00	Liu และคณะ ,1998
recombinant *E.coli*	กลูโคส + LB	pH-stat fed-batch	42	117.00	89.00	76.00	2.11	Kim และคณะ, 1992
A. latus	ซูโครส	pH-stat fed-batch	18	143.00	71.40	50.00	3.97	Yamane และคณะ, 1996
A. eutrophus	กลูโคส	pH-stat fed-batch	30	122.00	79.30	65.00	2.64	Lee และคณะ, 1994
A. eutrophus	กลูโคส	glucose control fed-batch	50	164.00	121.00	76.00	2.42	Kim และคณะ, 1994
A. eutrophus	กรดบิวทีริก	fed-batch	35	11.33	8.50	75.00	0.24	Shimizu และคณะ, 1993
Az. vinelandii	กลูโคส	fed-batch	47	31.65	25.00	78.99	0.53	Page และ Cornish, 1993
Az. chroococcum	แป้ง	fed-batch	71	54.00	25.00	46.00	0.35	Kim และ Chang, 1998