

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) ในขวด เขย่า

1.1 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04

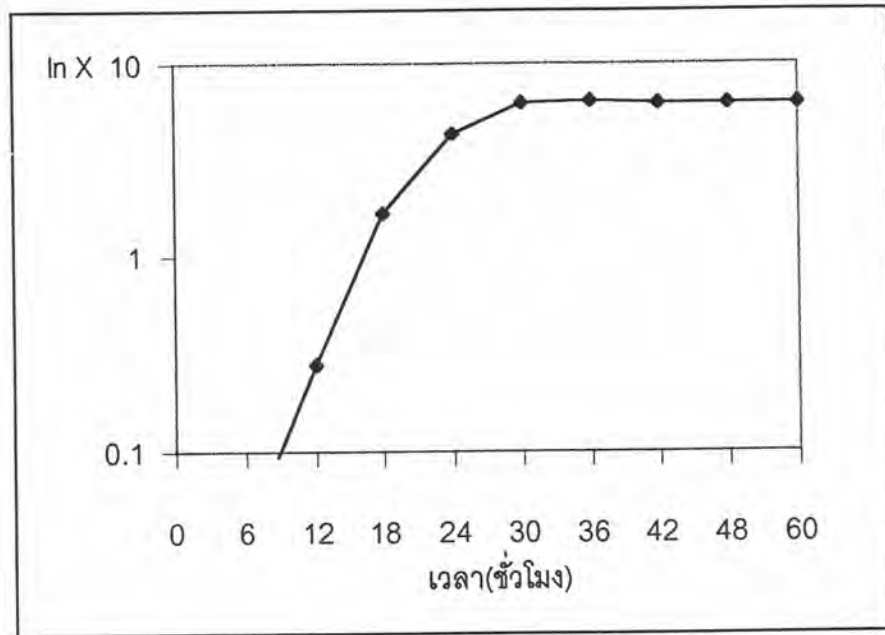
เตรียมเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ตามวิธีในข้อที่ 5 ใส่งในอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.3 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาหาความเข้มข้นของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน(ภาคผนวก ก) ส่วนน้ำใส (supernatant) ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNSA เพื่อหาปริมาณ ฟรักโตส

ผลการวิจัยพบว่าเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 มีการเจริญในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ (exponential growth) ตั้งแต่ช่วงเวลา 18-24 ชั่วโมง หลัง 30 ซึ่งมีการใช้น้ำตาลฟรักโตสอย่างรวดเร็ว และเกือบหมด ตั้งแต่เวลาการเลี้ยงชั่วโมงที่ 42 ถึง 60 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.44 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงใน ตารางที่ 4 และรูปที่ 9

ตารางที่ 4 น้ำหนักเซลล์แห้ง และฟรัก โทสที่เหลือในน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมง

| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรัก โทสในน้ำหมัก (กรัมต่อลิตร) |
|-------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 0 | 0.01 | 10.02 |
| 6 | 0.04 | 9.87 |
| 12 | 0.27 | 9.27 |
| *18 | 1.67 | 7.25 |
| *24 | 4.36 | 4.85 |
| *30 | 6.26 | 3.26 |
| *36 | 6.44 | 1.91 |
| 42 | 6.22 | 0.42 |
| 48 | 6.19 | 0.22 |
| 60 | 6.21 | 0.11 |

* หมายถึง การเจริญของเชื้อที่อยู่ในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ



รูปที่ 9 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมง

1.2 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ

จากผลการวิจัยข้อที่ 1.1 พบว่า *Alcaligenes* sp. A-04 มีการเจริญในช่วงการเจริญแบบทวีคูณในช่วงเวลาดังแต่ 18-24 ชั่วโมง และได้ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง จึงได้เลือกกล้าเชื้ออายุ 18 24 30 และ 36 ชั่วโมง เพื่อนำมาเลี้ยงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ภายใต้ภาวะในการเลี้ยงเชื้อตามวิธีข้อ 4.3 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ติดตามการเจริญทุก 6 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์และโคพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์ผลิตได้

ผลการวิจัยพบว่า อายุกล้าเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อระยะเวลาการเจริญในอาหารสำหรับการผลิต (MSM) โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดปริมาณต่างกัน พบว่ากล้าเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 (6.90 กรัมต่อลิตร) กล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงมีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 (7.44 กรัมต่อลิตร) กล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงมีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 (7.44 กรัมต่อลิตร) กล้าเชื้ออายุ 30 ชั่วโมงมีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 (6.92 กรัมต่อลิตร) และกล้าเชื้ออายุ 36 ชั่วโมงมีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 (6.14 กรัมต่อลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 5 ส่วนกราฟแสดงการเจริญของกล้าเชื้ออายุแตกต่างกันของ *Alcaligenes* sp. A-04 แสดงไว้ผังรูปที่ 10 และสรุปผลในตารางที่ 6 กล่าวคือเมื่อใช้กล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง เลี้ยงเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์เชื้อมีการเติบโต ผลิตโคพอลิเมอร์ และให้อัตราผลผลิตสูงกว่าเมื่อกล้าเชื้ออายุต่างจากนี้ โดยพบว่าให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 7.44 กรัมต่อลิตร ผลิต P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 2.77 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็น 37 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้ อัตราผลผลิต เท่ากับ 0.046 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกใช้กล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง สำหรับการวิจัยขั้นต่อไป

ตารางที่ 5(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง และ PHA โดยใช้อายุกล้าเชื้อเท่ากับ 18 ชั่วโมง

| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) |
|-------------------|-----------------------------------|----------------------|
| 0 | 1.18 | 0.23 |
| 6 | 1.21 | 0.24 |
| 12 | 3.28 | 0.37 |
| 18 | 3.82 | 0.47 |
| 24 | 4.34 | 0.68 |
| 30 | 5.34 | 1.46 |
| 36 | 5.62 | 1.53 |
| 42 | 5.98 | 1.68 |
| 48 | 6.48 | 2.07 |
| 54 | 6.24 | 2.01 |
| 60 | 6.90 | 2.00 |
| 66 | 6.84 | 1.97 |
| 72 | 6.88 | 1.76 |

ตารางที่ 5(ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง และ PHA โดยใช้อายุกล้าเชื้อ เท่ากับ 24 ชั่วโมง

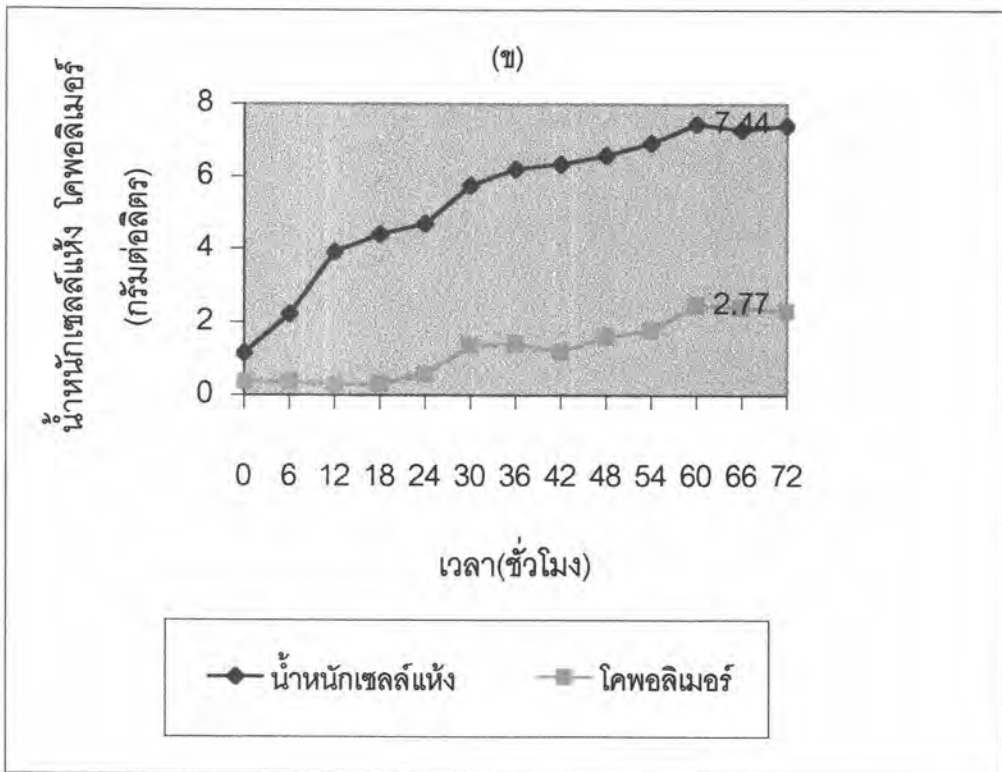
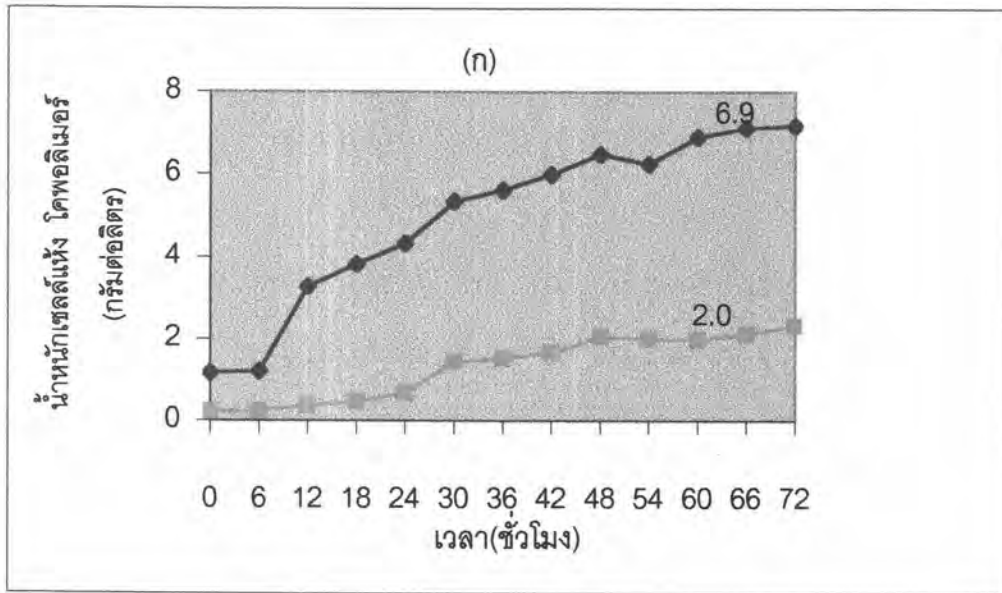
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) |
|-------------------|-----------------------------------|----------------------|
| 0 | 1.16 | 0.35 |
| 6 | 2.22 | 0.36 |
| 12 | 3.90 | 0.28 |
| 18 | 4.39 | 0.32 |
| 24 | 4.69 | 0.57 |
| 30 | 5.76 | 1.36 |
| 36 | 6.20 | 1.42 |
| 42 | 6.34 | 1.20 |
| 48 | 6.58 | 1.60 |
| 54 | 6.92 | 1.98 |
| 60 | 7.44 | 2.77 |
| 66 | 7.29 | 2.51 |
| 72 | 7.40 | 2.30 |

ตารางที่ 5(ค) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโตส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และ PHA โดยใช้อายุกล้าเชื้อเท่ากับ 30 ชั่วโมง

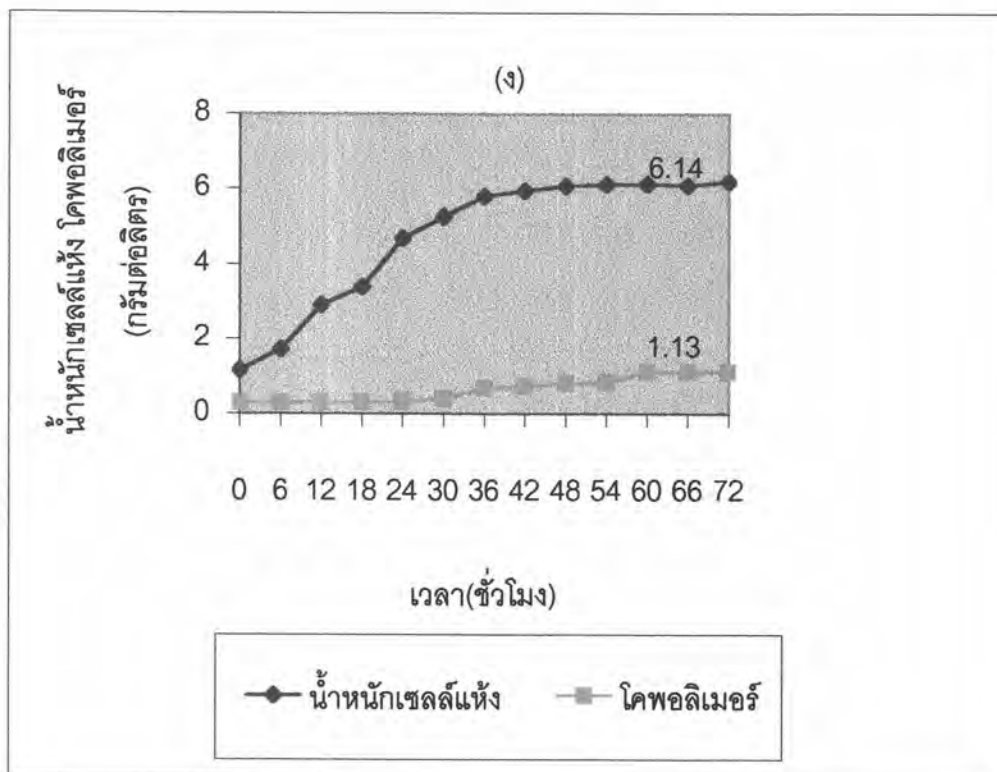
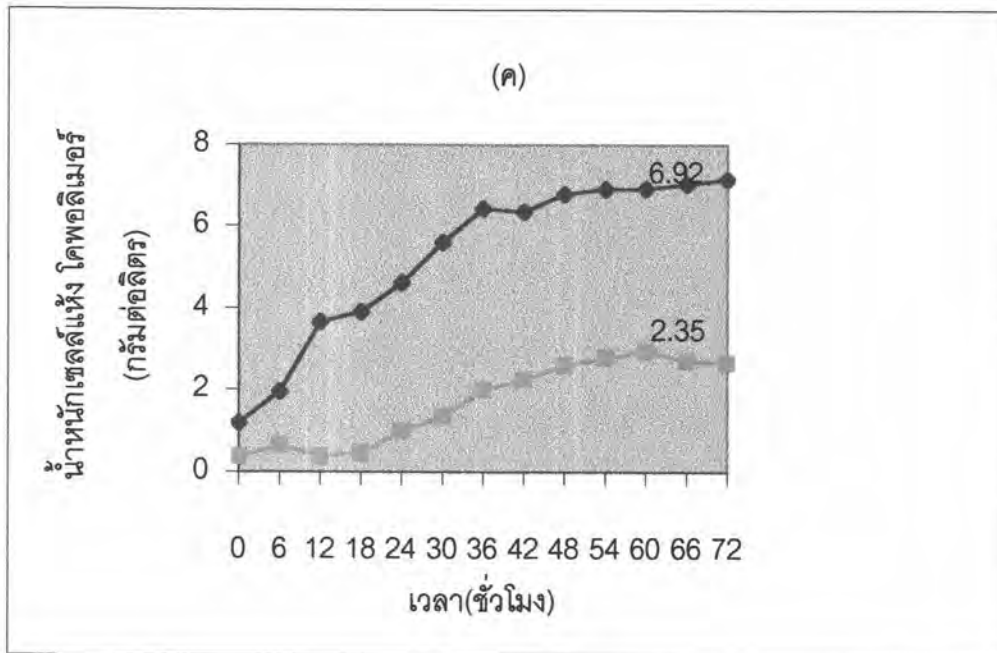
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) |
|----------------|--------------------------------|-------------------|
| 0 | 1.19 | 0.38 |
| 6 | 1.95 | 0.66 |
| 12 | 3.66 | 0.38 |
| 18 | 3.90 | 0.46 |
| 24 | 4.61 | 0.99 |
| 30 | 5.60 | 1.34 |
| 36 | 6.42 | 2.01 |
| 42 | 6.34 | 2.15 |
| 48 | 6.78 | 2.31 |
| 54 | 6.90 | 2.35 |
| 60 | 7.12 | 2.35 |
| 66 | 7.02 | 2.32 |
| 72 | 7.10 | 2.24 |

ตารางที่ 5(ง) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโตส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และ PHA โดยใช้อายุกล้าเชื้อเท่ากับ 36 ชั่วโมง

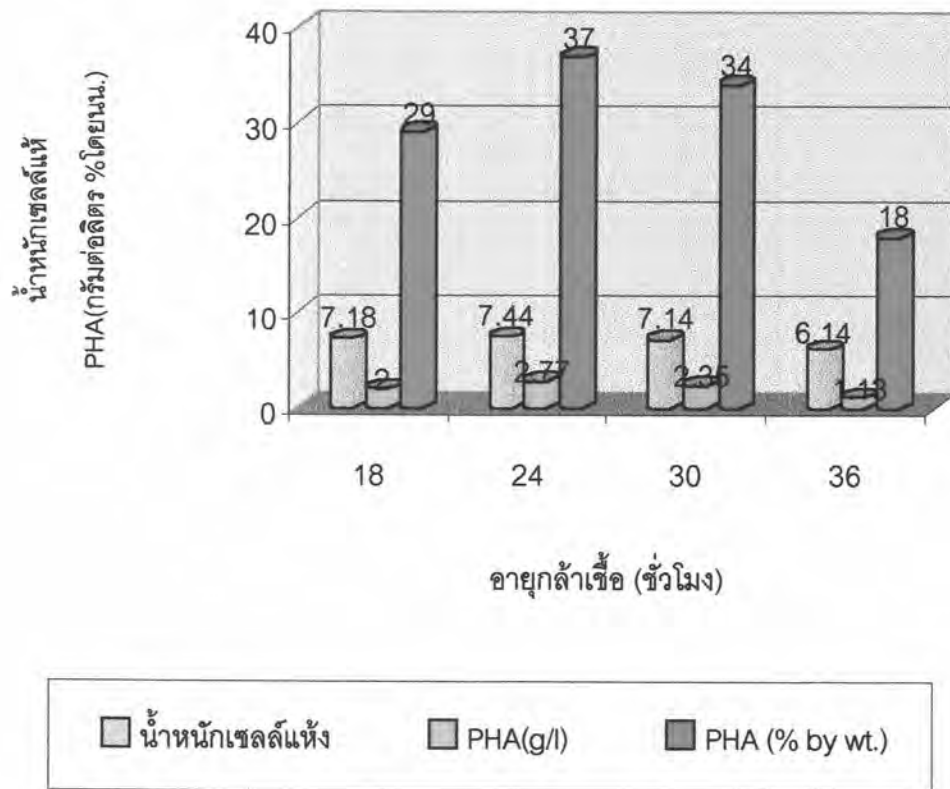
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) |
|----------------|--------------------------------|-------------------|
| 0 | 1.17 | 0.29 |
| 6 | 1.72 | 0.29 |
| 12 | 2.90 | 0.29 |
| 18 | 3.39 | 0.30 |
| 24 | 4.69 | 0.32 |
| 30 | 5.26 | 0.41 |
| 36 | 5.80 | 0.69 |
| 42 | 5.94 | 0.74 |
| 48 | 6.08 | 0.81 |
| 54 | 6.12 | 0.84 |
| 60 | 6.14 | 1.13 |
| 66 | 6.09 | 1.12 |
| 72 | 6.20 | 1.12 |



รูปที่ 10 การเจริญ และการผลิต โคพอลิเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในขวดเขย่าโดยใช้ กล้าเชื้อเริ่มต้น (ก) อายุ 18 ชั่วโมง (ข) อายุ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 10(ต่อ) การเจริญ และการผลิตโคพอลิเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในขวดเขย่า โดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้น (ค) อายุ 30 ชั่วโมง (ง) อายุ 36 ชั่วโมง



รูปที่ 11 เปรียบเทียบน้ำหนักรเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในขวดเขย่า โดยใช้กล้าเชื้ออายุ 18 24 30 และ 36 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการสร้าง PHA เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในขวดเขย่าที่มีอาหาร เพื่อการผลิต โดยแปรผันอายุกล้าเชื้อเป็น 18 24 30 และ 36 ชั่วโมง

| อายุกล้าเชื้อ (ชั่วโมง) | เวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง) | น้ำหนักรเซลล์ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | PHA (% by wt.) | Productivity (g/L.h) |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------|----------------------|
| 18 | 60 | 6.90 | 2.00 | 29 | 0.03 |
| 24 | 60 | 7.44 | 2.77 | 37 | 0.05 |
| 30 | 60 | 6.92 | 2.35 | 34 | 0.04 |
| 36 | 60 | 6.14 | 1.13 | 18 | 0.02 |

2. การหาภาวะที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อการผลิต โคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)

2.1 ผลของปริมาณกล้าเชื้อต่อการเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV)

หลังจากได้อายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นแล้ว ปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมยังเป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ด้วย Yamane และคณะ (1996) ได้ศึกษาขนาดกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Alcaligenes latus* และรายงานว่ากล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาณสูงสามารถทำให้ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อสั้นลง สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการแปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นคือ 1.5 1.7 1.8 และ 1.9 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อตามวิธีการทดลองในข้อ 6.1 ติดตามการเจริญทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 60 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาหาความเข้มข้นของเซลล์ตามวิธีในข้อ 8 หาปริมาณฟรักโทสและกรควาเลอร์ริคในน้ำหมักตามวิธีในข้อ 9 และข้อ 10 ตามลำดับ หาแอมโมเนียมซัลเฟตตามวิธีในข้อ 11 และหาปริมาณโคพอลิเมอร์ตามวิธีในข้อ 12

จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 1.5 กรัมต่อลิตร *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถเจริญอย่างรวดเร็ว โดยปริมาณฟรักโทสค่อยๆลดลง และถูกใช้เกือบหมดในชั่วโมงที่ 48 ส่วนการใช้กรควาเลอร์ริคและแอมโมเนียมซัลเฟตหมดในเวลาชั่วโมงที่ 30 และ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ และให้ปริมาณเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 42 (10.28 กรัมต่อลิตร) ผลิตภัณฑ์สูงสุดคือ 4.67 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 1.8 กรัมต่อลิตร การเจริญเป็นไปอย่างรวดเร็ว ปริมาณฟรักโทสลดลงอย่างรวดเร็วโดยใช้เกือบหมดในชั่วโมงที่ 36 ส่วนการใช้กรควาเลอร์ริคและแอมโมเนียมซัลเฟตหมดในชั่วโมงที่ 24 และ 6 ตามลำดับ ได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 11.26 กรัมต่อลิตร และได้โคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 5.44 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 ส่วนในการทดลองที่ใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 1.8 และ 1.9 กรัมต่อลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุด ต่ำกว่าเมื่อใช้กล้าเชื้อปริมาณ 1.7 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 12 และสรุปผลในตารางที่ 8 จึงเลือกใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาณเท่ากับ 1.7 กรัมต่อลิตร เพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ ซึ่งได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 11.26 กรัมต่อลิตร ผลิตภัณฑ์ P(3HB-co-3HV) ได้เท่ากับ 5.44 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 48 % โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้อัตราการผลิตเท่ากับ 0.15

ตารางที่ 7(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโตส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือในน้ำหมัก และปริมาณ PHA เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก ด้วยกลูต้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร

| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) |
|----------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|---|-------------------|
| 0 | 1.54 | 18.22 | 1.96 | 1.03 | 0.18 |
| 6 | 2.47 | 18.01 | 1.95 | 0.33 | 0.62 |
| 12 | 4.66 | 17.87 | 0.84 | 0.19 | 1.36 |
| 18 | 5.84 | 17.23 | 0.51 | 0.00 | 1.52 |
| 24 | 8.68 | 15.32 | 0.07 | - | 3.58 |
| 30 | 9.22 | 8.35 | 0.02 | - | 4.45 |
| 36 | 9.90 | 5.93 | - | - | 4.67 |
| 42 | 10.28 | 2.19 | - | - | 4.59 |
| 48 | 9.58 | 0.22 | - | - | 4.50 |
| 54 | 8.96 | 0.17 | - | - | 4.45 |
| 60 | 8.78 | 0.12 | - | - | 4.40 |

ตารางที่ 7(ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโตส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือในน้ำหมัก และปริมาณ PHA เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก ด้วยกลูต้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.7 กรัมต่อลิตร

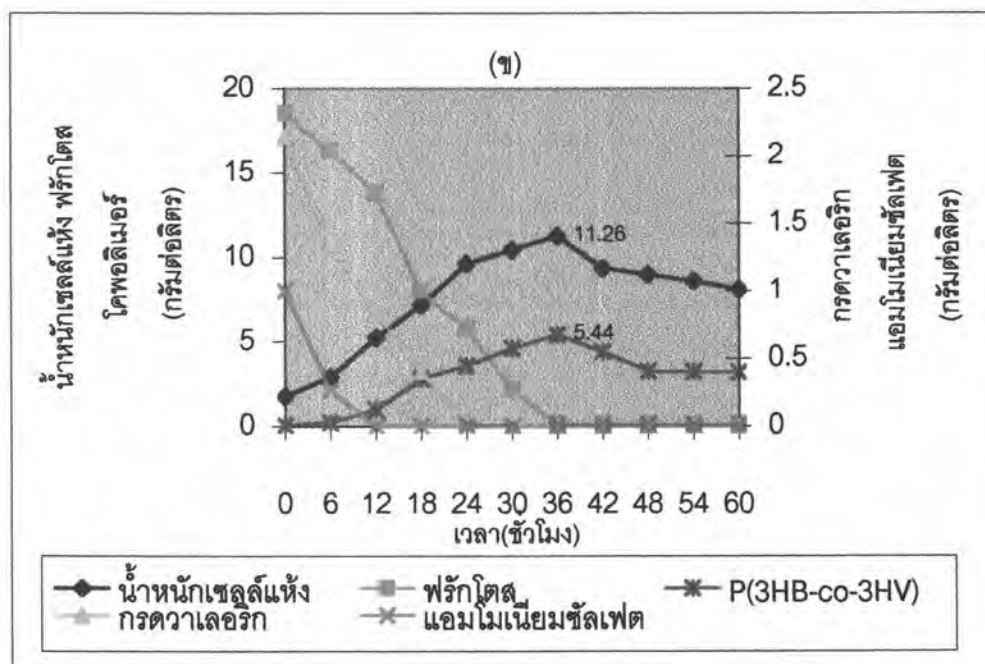
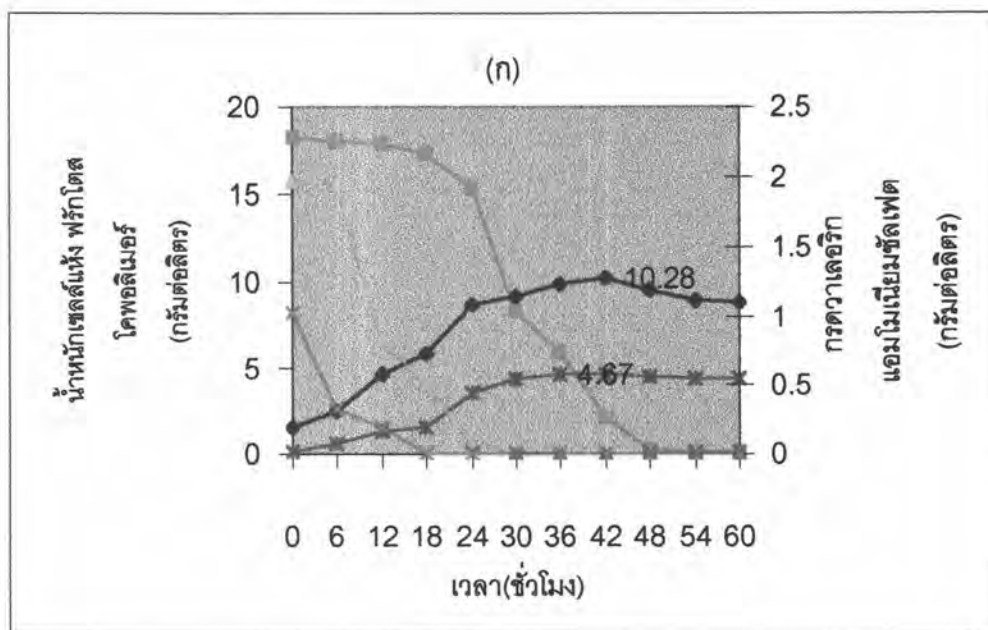
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) |
|----------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|---|-------------------|
| 0 | 1.78 | 18.53 | 2.14 | 1.00 | 0.07 |
| 6 | 2.91 | 16.31 | 1.35 | 0.27 | 0.22 |
| 12 | 5.24 | 13.80 | 0.84 | 0.00 | 1.00 |
| 18 | 7.18 | 7.99 | 0.40 | - | 2.81 |
| 24 | 9.62 | 5.82 | 0.03 | - | 3.58 |
| 30 | 10.42 | 2.22 | - | - | 4.63 |
| 36 | 11.26 | 0.14 | - | - | 5.44 |
| 42 | 9.37 | 0.12 | - | - | 4.41 |
| 48 | 8.98 | 0.12 | - | - | 3.25 |
| 54 | 8.58 | 0.11 | - | - | 3.22 |
| 60 | 8.13 | 0.12 | - | - | 3.21 |

ตารางที่ 7(ค) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรุกโตส กรดวาลेरริก แอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือในน้ำหมัก และปริมาณ PHA เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก ด้วยกลูต้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.8 กรัมต่อลิตร

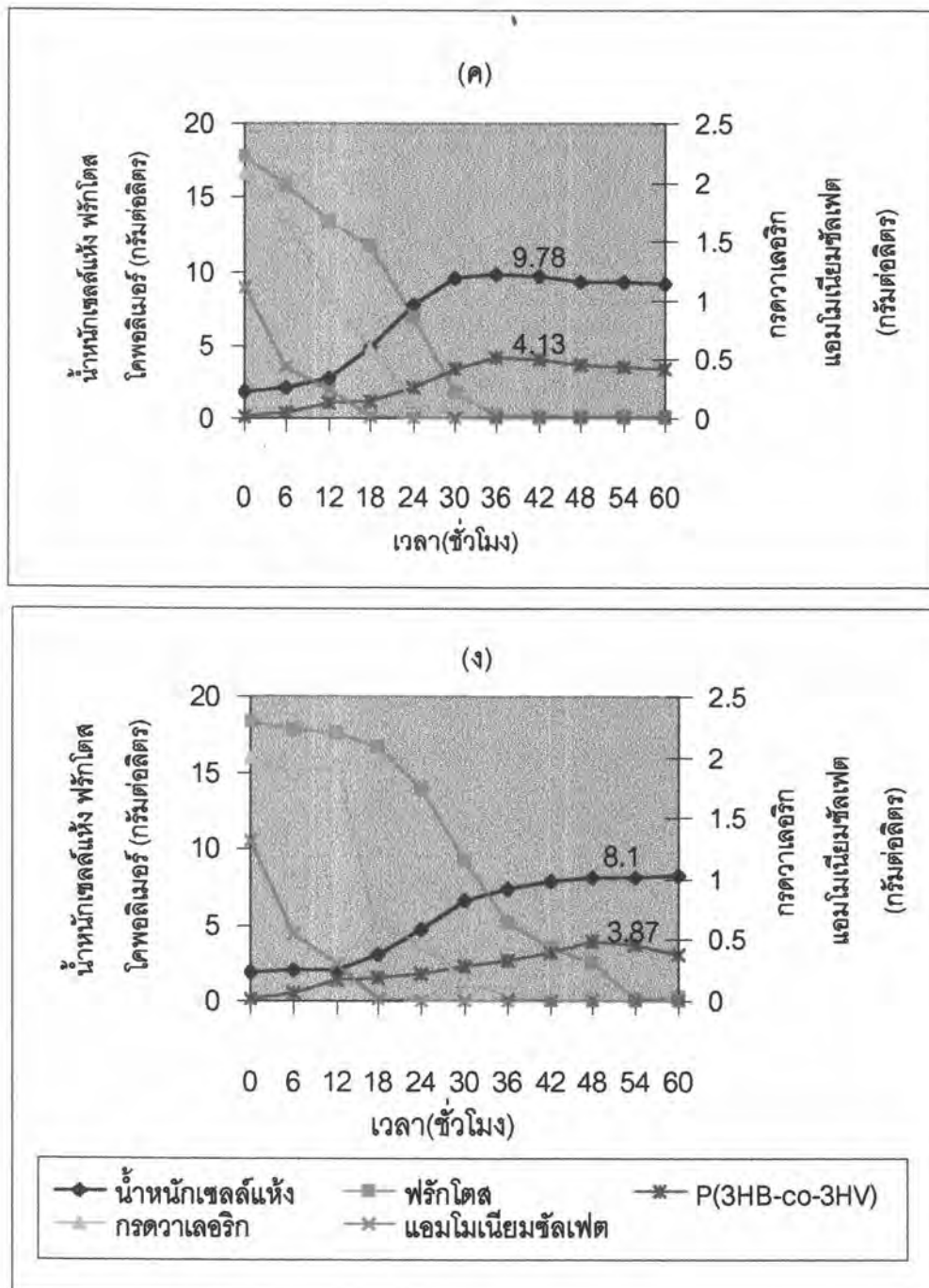
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรุกโตส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาลेरริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) |
|----------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|---|-------------------|
| 0 | 1.84 | 17.74 | 2.08 | 1.12 | 0.09 |
| 6 | 2.06 | 15.77 | 1.73 | 0.44 | 0.39 |
| 12 | 2.69 | 13.38 | 1.04 | 0.25 | 0.98 |
| 18 | 4.90 | 11.75 | 0.60 | 0.02 | 1.13 |
| 24 | 7.66 | 6.98 | 0.14 | - | 2.06 |
| 30 | 9.58 | 1.86 | 0.05 | - | 3.46 |
| 36 | 9.78 | 0.31 | - | - | 4.13 |
| 42 | 9.62 | 0.19 | - | - | 3.99 |
| 48 | 9.26 | 0.11 | - | - | 3.62 |
| 54 | 9.22 | 0.12 | - | - | 3.48 |
| 60 | 9.14 | 0.11 | - | - | 3.34 |

ตารางที่ 7(ง) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรุกโตส กรดวาลेरริก แอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือในน้ำหมัก และปริมาณ PHA เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก ด้วยกลูต้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.9 กรัมต่อลิตร

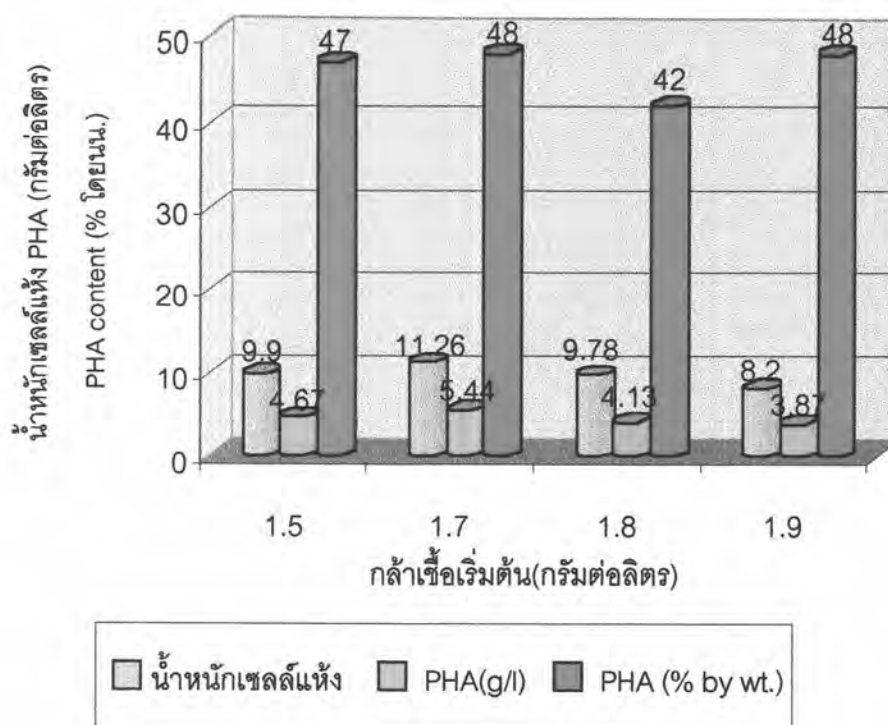
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรุกโตส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาลेरริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) |
|----------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|---|-------------------|
| 0 | 1.91 | 18.33 | 1.99 | 1.32 | 0.14 |
| 6 | 2.01 | 17.88 | 1.87 | 0.55 | 0.49 |
| 12 | 2.09 | 17.63 | 1.93 | 0.30 | 1.41 |
| 18 | 3.09 | 16.73 | 0.62 | 0.01 | 1.46 |
| 24 | 4.74 | 13.97 | 0.48 | - | 1.79 |
| 30 | 6.56 | 9.30 | 0.17 | - | 2.32 |
| 36 | 7.28 | 5.21 | 0.06 | - | 2.66 |
| 42 | 7.79 | 3.53 | - | - | 3.21 |
| 48 | 8.10 | 2.49 | - | - | 3.87 |
| 54 | 8.15 | 0.11 | - | - | 3.65 |
| 60 | 8.20 | 0.27 | - | - | 3.00 |



รูปที่ 12 การเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ (ก) 1.5 กรัมต่อลิตร (ข) 1.7 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 12(ต่อ) การเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักโดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ (ค) 1.8 กรัมต่อลิตร (ง) 1.9 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 13 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ โคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เป็นเวลานาน 60 ชั่วโมงโดยเลี้ยงในถังหมัก

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบการสร้าง PHA เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยแปรผัน ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 1.5 1.7 1.8 และ 1.9 กรัมต่อลิตร

| กล้าเชื้อเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร) | เวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | PHA content (% by wt.) | Productivity (g/L.h) |
|---------------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|----------------------|
| 1.5 | 36 | 9.90 | 4.67 | 47 | 0.13 |
| 1.7 | 36 | 11.26 | 5.44 | 48 | 0.15 |
| 1.8 | 36 | 9.78 | 4.13 | 42 | 0.12 |
| 1.9 | 60 | 8.20 | 3.87 | 48 | 0.08 |

2.2 ผลของความเป็นกรดต่อการเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV)

แปรผันค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยควบคุมค่าความเป็นกรดต่างที่ 6.0 7.0 และ 8.0 กับไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตลอดการทดลอง เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 6.2 ติดตามการเจริญของเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 60 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาหาความเข้มข้นของเซลล์ตามวิธีในข้อ 8 หาปริมาณฟรักโทส และกรควาเลอริกในน้ำหมักตามวิธีในข้อ 9 และข้อ 10 ตามลำดับ หาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตตามวิธีในข้อ 11 หาปริมาณโคพอลิเมอร์ ตามวิธีในข้อ 12

ค่าความเป็นกรดต่าง มีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิต P(3HB-co-3HV) ดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 14 ซึ่งพบว่าเมื่อควบคุมความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0 การเจริญเป็นไปอย่างช้า และเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 36 การใช้น้ำตาลฟรักโทสก็เป็นไปในทำนองเดียวกันคือช้าอย่างช้าและใช้ไม่หมด ยังคงเหลือถึง 9.12 กรัมต่อลิตร ส่วนกรควาเลอริกก็เหลือเล็กน้อย และแอมโมเนียมซัลเฟตถูกใช้หมดในชั่วโมงที่ 24 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเพียง 4.62 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 36 ผลิตโคพอลิเมอร์เท่ากับ 2.12 กรัมต่อลิตร ส่วนการทดลองที่พบว่า *Alcaligenes* sp. A-04 มีการเจริญ และการผลิตโคพอลิเมอร์ได้ดีที่สุด ได้แก่ การเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 ได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 10.98 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 36 สามารถผลิตโคพอลิเมอร์เท่ากับ 5.32 กรัมต่อลิตร สามารถใช้ฟรักโทสหมดในชั่วโมงที่ 48 ใช้กรควาเลอริกหมดในชั่วโมงที่ 30 และแอมโมเนียมซัลเฟตหมดในชั่วโมงที่ 24 สรุปผลการทดลองในตารางที่ 9 โดยพบว่าเมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 โดยควบคุมค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 7.0 ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ และอัตราผลผลิตสูงสุด รองลงมาได้แก่การเลี้ยงเชื้อที่ไม่ควบคุมความเป็นกรดต่าง ส่วนการทดลองที่ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.0 พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งใกล้เคียงกับชุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 และ ชุดที่ไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างแต่ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ต่ำเพียง 3.08 กรัมต่อลิตร และผลสรุปดังแสดงในรูปที่ 15 และในตารางที่ 10 ดังนั้นจึงเลือกเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 5.32 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 48% โดยน้ำหนัก และได้อัตราผลผลิตเท่ากับ 0.15

ตารางที่ 9(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลฟรักโทส กรดวาเลอริก และแอมโมเนียมซัลเฟต ใน น้ำหมัก และปริมาณ PHA เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักโดย ควบคุม pH (pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0)

| เวลา (ชั่วโมง) | pH | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) |
|----------------|-----|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|---|-------------------|
| 0 | 7.0 | 1.74 | 18.21 | 2.03 | 1.24 | 0.06 |
| 6 | 7.1 | 2.03 | 17.11 | 1.76 | 0.77 | 0.22 |
| 12 | 7.3 | 3.50 | 15.06 | 1.03 | 0.47 | 0.79 |
| 18 | 8.2 | 5.86 | 9.96 | 0.40 | 0.04 | 1.21 |
| 24 | 8.4 | 8.74 | 4.77 | 0.17 | 0.00 | 4.15 |
| 30 | 8.4 | 10.22 | 0.53 | 0.06 | - | 4.30 |
| 36 | 8.7 | 9.76 | 0.15 | - | - | 4.85 |
| 42 | 8.7 | 9.26 | 0.11 | - | - | 4.77 |
| 48 | 8.8 | 8.76 | 0.15 | - | - | 3.87 |
| 52 | 8.9 | 8.25 | 0.13 | - | - | 3.46 |
| 60 | 8.9 | 7.92 | 0.15 | - | - | 3.4 |

ตารางที่ 9(ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลฟรักโทส กรดวาเลอริก และแอมโมเนียมซัลเฟต ใน น้ำหมัก และปริมาณ PHA เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักโดย ควบคุม pH เท่ากับ 6.0

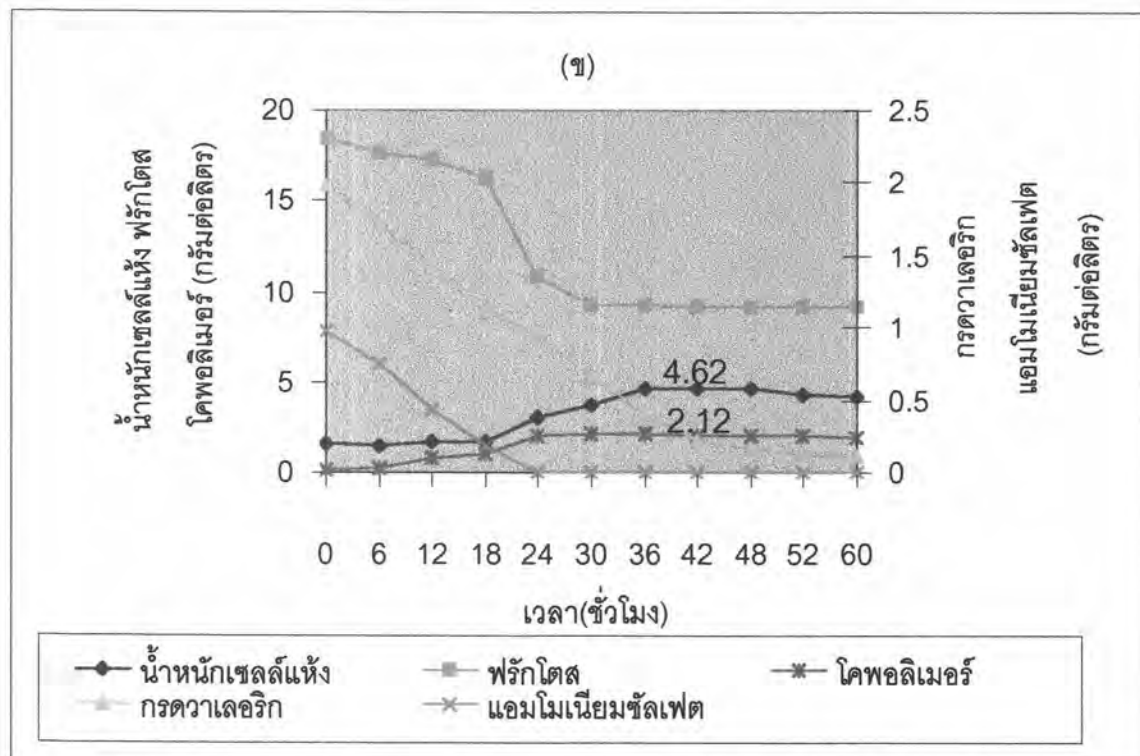
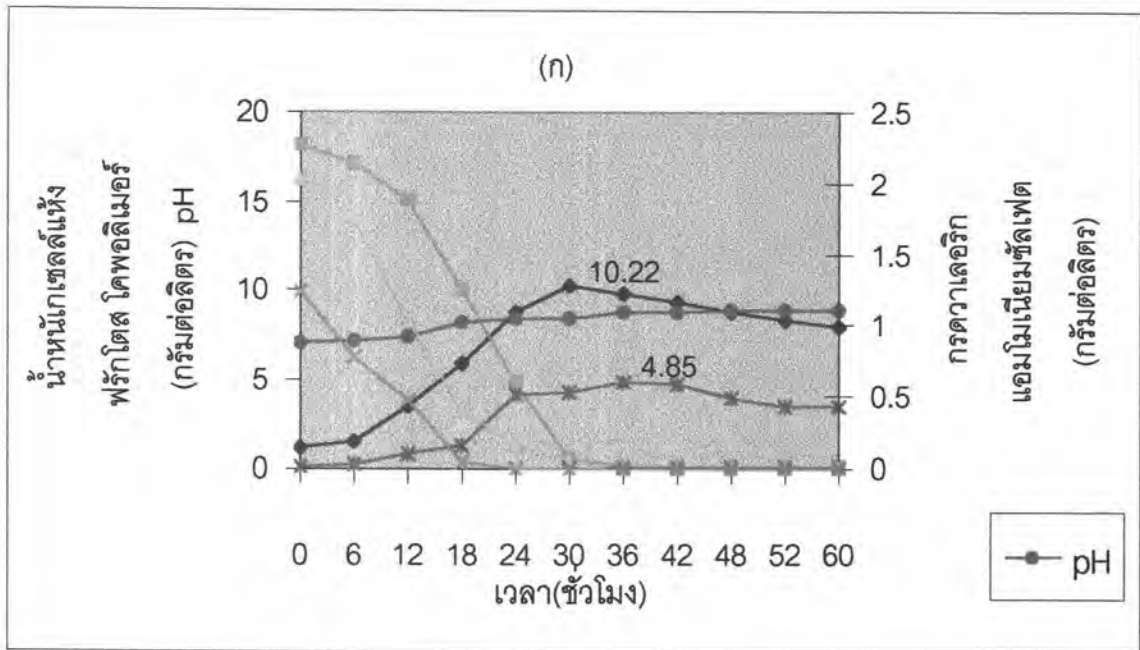
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) |
|----------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|---|-------------------|
| 0 | 1.70 | 18.43 | 1.98 | 0.98 | 0.07 |
| 6 | 1.88 | 17.57 | 1.72 | 0.75 | 0.21 |
| 12 | 2.48 | 17.24 | 1.43 | 0.44 | 0.76 |
| 18 | 2.74 | 16.26 | 1.12 | 0.18 | 1.06 |
| 24 | 3.06 | 10.87 | 0.98 | 0.00 | 2.04 |
| 30 | 3.73 | 9.22 | 0.67 | - | 2.11 |
| 36 | 4.62 | 9.21 | 0.41 | - | 2.12 |
| 42 | 4.60 | 9.16 | 0.23 | - | 2.03 |
| 48 | 4.58 | 9.13 | 0.17 | - | 2.03 |
| 52 | 4.33 | 9.12 | 0.13 | - | 2.01 |
| 60 | 4.16 | 9.12 | 0.11 | - | 1.93 |

ตารางที่ 9(ค) น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลฟรักโทส กรดวาลेरริก และแอมโมเนียมซัลเฟตใน
น้ำหมัก และปริมาณ PHA เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักโดย
ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

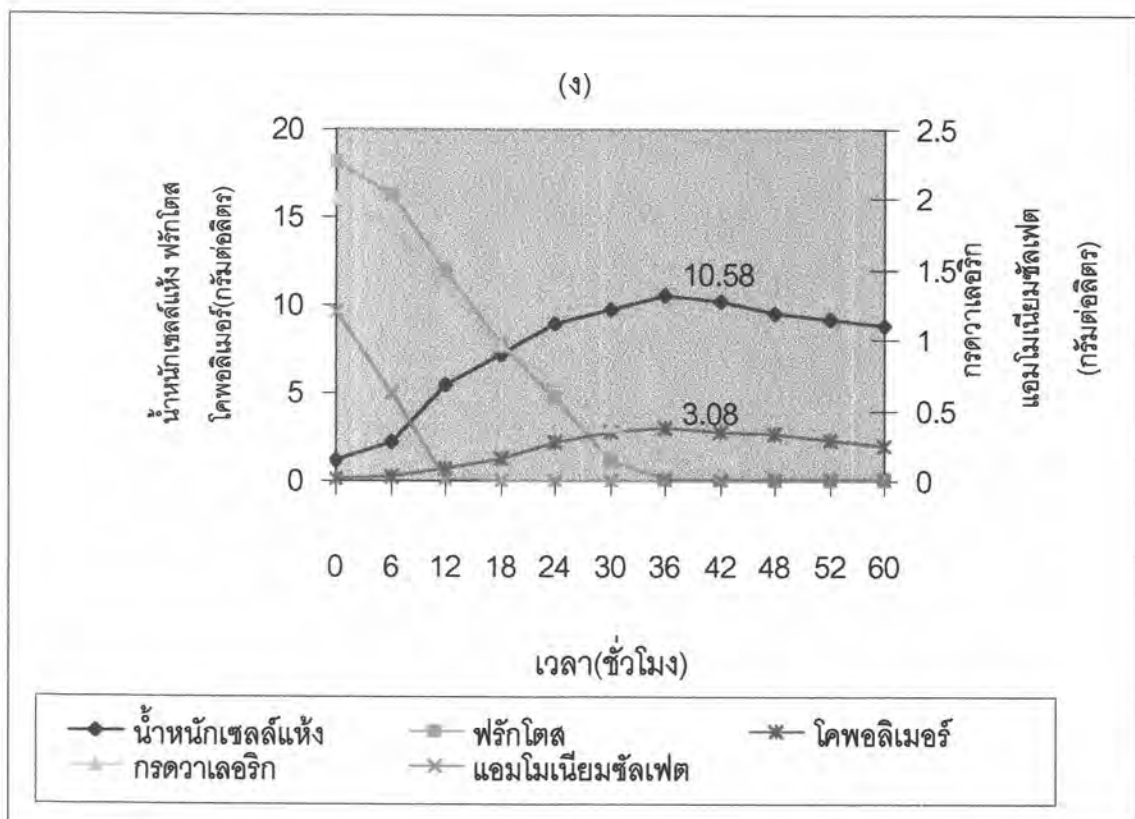
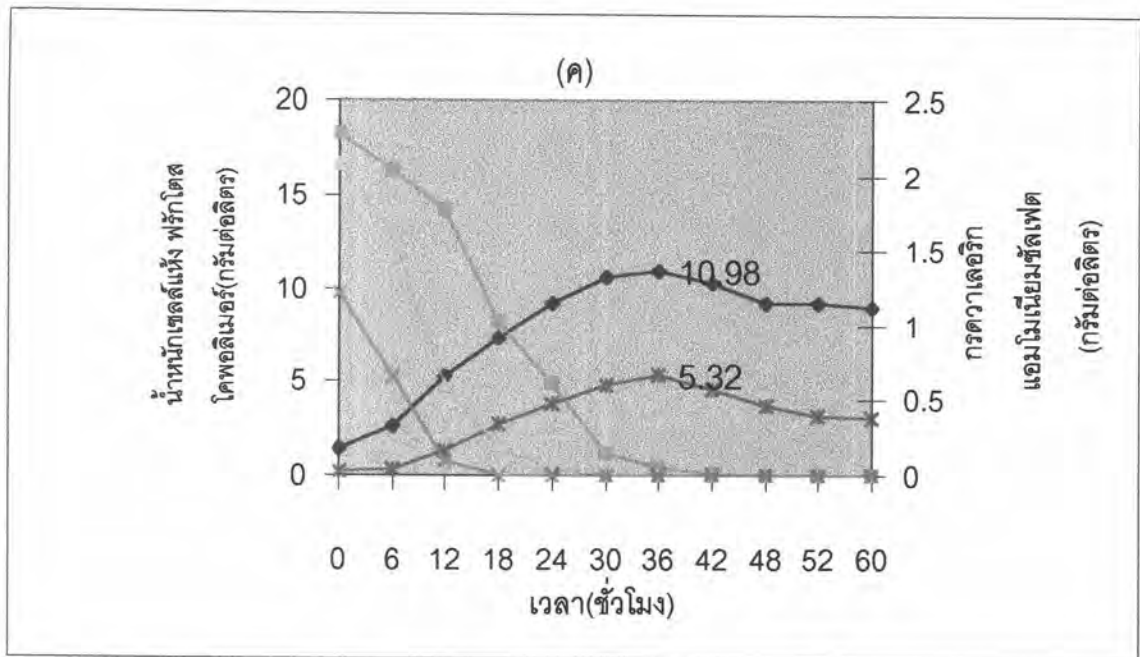
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาลेरริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|----------------------|
| 0 | 1.71 | 18.22 | 2.07 | 1.21 | 0.22 |
| 6 | 2.58 | 16.24 | 1.63 | 0.66 | 0.33 |
| 12 | 5.23 | 14.16 | 0.60 | 0.10 | 1.36 |
| 18 | 7.35 | 8.22 | 0.21 | 0.00 | 2.75 |
| 24 | 9.14 | 4.88 | 0.06 | - | 3.88 |
| 30 | 10.63 | 1.17 | - | - | 4.82 |
| 36 | 10.98 | 0.39 | - | - | 5.32 |
| 42 | 10.25 | 0.12 | - | - | 4.56 |
| 48 | 9.22 | 0.05 | - | - | 3.75 |
| 52 | 9.15 | 0.05 | - | - | 3.22 |
| 60 | 9.02 | 0.05 | - | - | 3.02 |

ตารางที่ 9(ง) น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลฟรักโทส กรดวาลेरริก และแอมโมเนียมซัลเฟตใน
น้ำหมัก และปริมาณ PHA เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักโดย
ควบคุม pH เท่ากับ 8.0

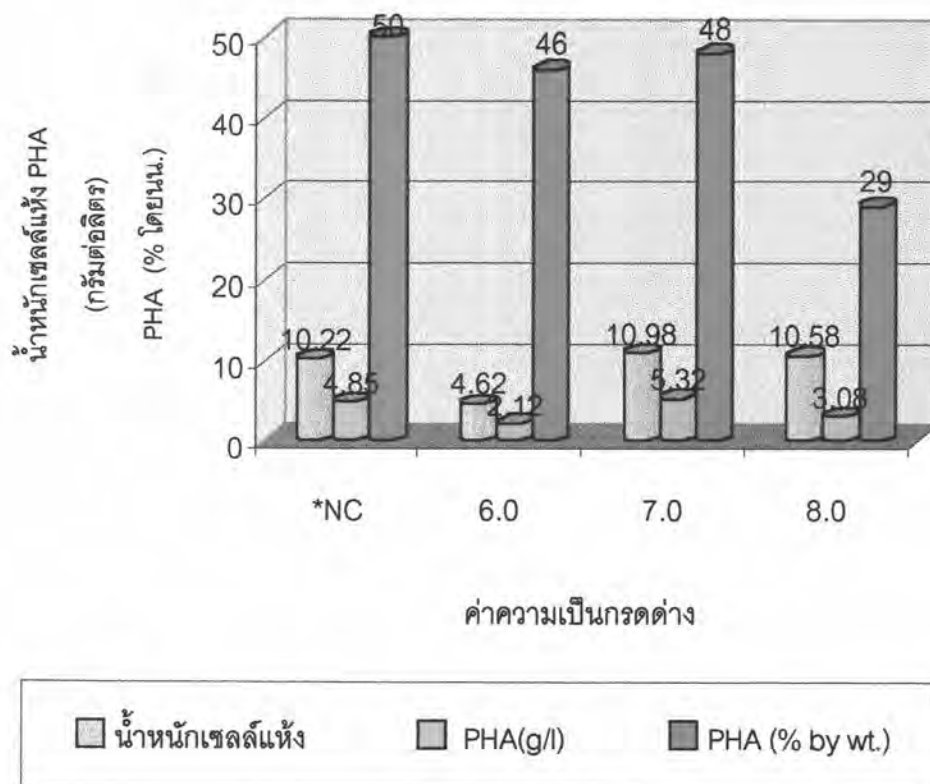
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาลेरริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|----------------------|
| 0 | 1.72 | 18.18 | 2.01 | 1.20 | 0.08 |
| 6 | 2.25 | 16.25 | 1.81 | 0.62 | 0.27 |
| 12 | 5.44 | 11.98 | 1.40 | 0.02 | 0.75 |
| 18 | 7.22 | 7.76 | 0.96 | 0.00 | 1.23 |
| 24 | 8.96 | 4.79 | 0.73 | - | 2.22 |
| 30 | 9.75 | 1.17 | 0.39 | - | 2.77 |
| 36 | 10.58 | 0.14 | 0.21 | - | 3.08 |
| 42 | 10.21 | 0.09 | 0.04 | - | 2.75 |
| 48 | 9.54 | 0.09 | - | - | 2.62 |
| 52 | 9.18 | 0.09 | - | - | 2.37 |
| 60 | 8.86 | 0.09 | - | - | 2.03 |



รูปที่ 14 การเจริญ และการผลิต PHA เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดย (ก) ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดค้าง (ข) ควบคุมความเป็นกรดค้างที่ 6.0



รูปที่ 14(ต่อ) การเจริญ และการผลิต PHA เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดย
 (ค) ควบคุมความเป็นกรดค่าที่ 7.0 (ง) ควบคุมความเป็นกรดค่าที่ 8.0



รูปที่ 15 เปรียบเทียบการเจริญ และปริมาณ โคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ในถังหมักโดยมีค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบการผลิต PHA เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง และควบคุมความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ 6.0 7.0 และ 8.0

| การควบคุม pH | เวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง) | น้ำหนักรีดน้ำ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | PHA content (% by wt.) | Productivity (g/L.h) |
|--------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------|------------------------|----------------------|
| *NC | 36 | 10.22 | 4.85 | 50 | 0.14 |
| 6.0 | 36 | 4.62 | 2.12 | 46 | 0.06 |
| 7.0 | 36 | 10.98 | 5.32 | 48 | 0.15 |
| 8.0 | 36 | 10.58 | 3.08 | 29 | 0.09 |

*NC คือ ไม่มีการควบคุม ความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3 ผลของอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนผสม(ฟรักโตส:กรควาเลอร์ริก) ต่อการเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV)

การผลิตโคพอลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) โดยเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถใช้ซับสเตรทคือฟรักโตสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญ และเป็นโครงสร้างหลักของโมโนเมอร์ 3HB ส่วนโครงสร้างหลักสำหรับโมโนเมอร์ 3HV เป็นกรดอินทรีย์เช่น กรดโพธิโอนิก กรควาเลอร์ริก เป็นต้น สำหรับ เชื้อ *Alcaligenes* sp.A-04 นี้ อัญชนา สุรติขจร(2537) ได้ศึกษาการใช้กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการวิจัยปรากฏว่า กรควาเลอร์ริก สามารถให้ปริมาณโมโนเมอร์ของ 3HV ได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับ กรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ และจากงานวิจัยของ อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) พบว่า ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนรวมที่เหมาะสมคือ 20 กรัมต่อลิตร จากข้อมูลเบื้องต้นพบว่าปริมาณกรควาเลอร์ริกที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนผสมนั้นมีความสำคัญเนื่องจากกรควาเลอร์ริก ที่ความเข้มข้นสูง (มากกว่า 5 กรัมต่อลิตร) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ส่งผลให้การเจริญ และการผลิตโคพอลิเมอร์ลดลง แต่เมื่อใช้กรควาเลอร์ริกความเข้มข้นสูงจะได้สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV สูงด้วย ดังนั้นการทดลองนี้จึงต้องการศึกษาอัตราส่วนระหว่าง ฟรักโตส : กรควาเลอร์ริก ที่เหมาะสม โดยแปรผันปริมาณฟรักโตส : กรควาเลอร์ริก ตั้งแต่ 15:5 ถึง 19:1 โดยเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 6 ควบคุมความเป็นกรดค่าเท่ากับ 7.0 และติดตามการเจริญทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

ผลการวิจัยพบว่า อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนผสม เป็น ฟรักโตส : วาเลอร์ริก เท่ากับ 18 : 2 เป็นอัตราส่วนที่ทำให้เชื้อผลิตโคพอลิเมอร์ได้ปริมาณ มากกว่าอัตราส่วนอื่น คือ ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 5.26 กรัมต่อลิตร ที่ 36 ชั่วโมง โดยมีสัดส่วนของ 3HB : 3HV เป็น 85 : 15 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมเป็น ฟรักโตส : กรควาเลอร์ริก เท่ากับ 19 : 1 พบว่า ได้ปริมาณ P(3HB-co-3HV) สูงใกล้เคียงกันคือ 5.36 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 36 แต่อัตราส่วนของ 3HB:3HV เท่ากับ 91:9 ซึ่งถือว่าสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ยังต่ำไป เมื่ออัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนผสม เป็น ฟรักโตส : วาเลอร์ริก เท่ากับ 15 : 5 *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิตโคพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยสัดส่วนของ โมโนเมอร์ 3HV สูงสุดเท่ากับ 26 โมลเปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณ โคพอลิเมอร์สูงสุดได้เท่ากับ 4.20 กรัมต่อลิตร ส่วนการทดลองที่ใช้ปริมาณวาเลอร์ริกน้อยลงมาพบว่าได้ปริมาณโมโนเมอร์ของ 3HV น้อยลงมาตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 16 สรุปผลในตารางที่ 12 และรูปที่ 17 กล่าวคือ เมื่อใช้อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมเป็น ฟรักโตส : วาเลอร์ริก เท่ากับ 18 : 2 เพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB-co-3HV) และ อัตรา

การผลิตสูงสุด (เท่ากับ 0.15) ซึ่งใกล้เคียงกับเมื่อใช้ ฟรักโตส : กรดวาเลอริก เท่ากับ 19 : 1 แต่จากเหตุผลที่กล่าวมาแล้วคือสัดส่วนของ 3HV คำนวณเมื่อใช้ฟรักโตส : กรดวาเลอริก เท่ากับ 18 : 2 จึงถือว่าฟรักโตส : กรดวาเลอริก 18:2 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมกว่า

ตารางที่ 11(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโตส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และ P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยมีอัตราส่วน ฟรักโตส : กรดวาเลอริก เท่ากับ 15:5

| ชั่วโมง (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|----------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.72 | 14.88 | 5.07 | 1.00 | 0.16 | 100 | 0 |
| 6 | 2.15 | 14.04 | 4.82 | 0.26 | 0.36 | 93 | 7 |
| 12 | 2.74 | 13.27 | 4.21 | 0.01 | 0.41 | 88 | 12 |
| 18 | 3.65 | 12.32 | 3.94 | 0.00 | 0.94 | 82 | 18 |
| 24 | 6.42 | 9.58 | 3.16 | - | 1.18 | 80 | 20 |
| 30 | 8.32 | 4.73 | 2.78 | - | 2.47 | 75 | 25 |
| 36 | 9.58 | 0.21 | 1.77 | - | 4.20 | 75 | 25 |
| 42 | 9.14 | 0.15 | 0.91 | - | 3.76 | 74 | 26 |
| 48 | 8.56 | 0.11 | 0.26 | - | 3.39 | 75 | 25 |
| 54 | 8.25 | 0.08 | 0.15 | - | 3.24 | 75 | 25 |
| 60 | 7.82 | 0.11 | 0.14 | - | 2.83 | 76 | 24 |

ตารางที่ 11(ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโตส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และ P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 โดยเลี้ยงเชื้อในถังหมัก โดยมีอัตราส่วน ฟรักโตส : กรดวาเลอริก เท่ากับ 16 : 4

| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.76 | 16.13 | 4.11 | 1.36 | 0.25 | 100 | 0 |
| 6 | 2.43 | 16.09 | 3.66 | 0.88 | 0.22 | 92 | 8 |
| 12 | 2.77 | 15.43 | 3.18 | 0.75 | 0.39 | 80 | 20 |
| 18 | 4.20 | 12.13 | 2.79 | 0.28 | 0.47 | 80 | 20 |
| 24 | 6.88 | 7.85 | 1.96 | 0.06 | 2.03 | 76 | 24 |
| 30 | 8.66 | 3.29 | 1.13 | 0.01 | 3.46 | 76 | 24 |
| 36 | 9.26 | 0.07 | 0.51 | - | 4.10 | 77 | 23 |
| 42 | 9.27 | 0.07 | 0.15 | - | 4.01 | 76 | 24 |
| 48 | 9.06 | 0.06 | 0.04 | - | 3.99 | 77 | 23 |
| 54 | 9.19 | 0.06 | - | - | 3.84 | 77 | 23 |
| 60 | 9.24 | 0.06 | - | - | 3.60 | 77 | 23 |

ตารางที่ 11(ค) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโตส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และ P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยมีอัตราส่วน ฟรักโตส : กรดวาเลอริก เท่ากับ 17 : 3

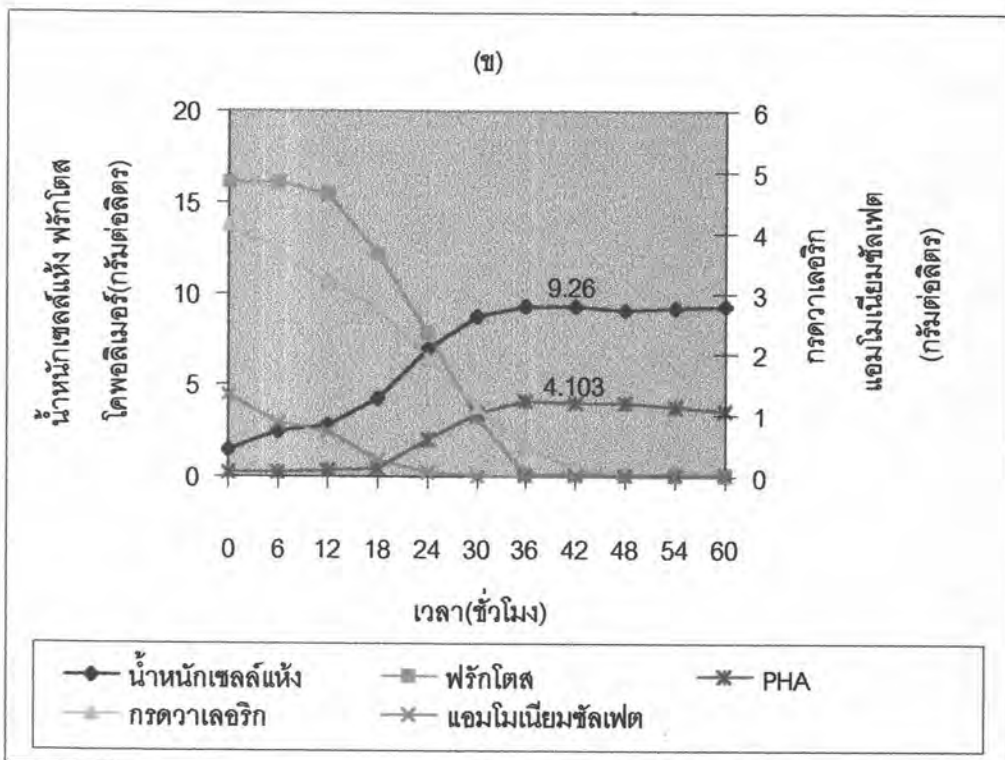
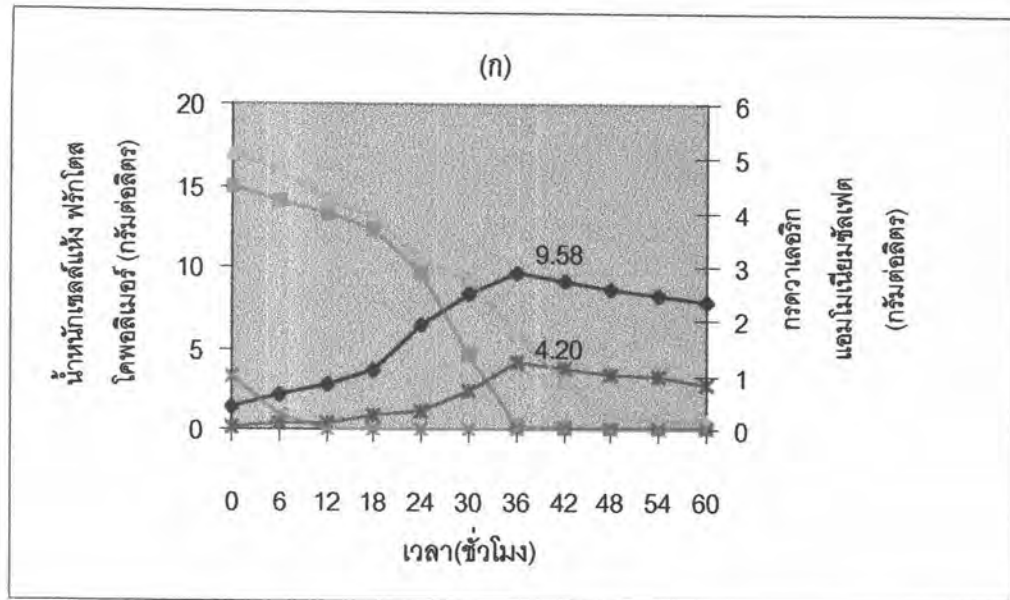
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.74 | 17.11 | 3.24 | 1.16 | 0.23 | 100 | 0 |
| 6 | 2.19 | 17.03 | 3.01 | 0.64 | 0.24 | 93 | 7 |
| 12 | 4.06 | 15.92 | 2.45 | 0.35 | 0.32 | 85 | 15 |
| 18 | 5.90 | 12.57 | 1.63 | 0.11 | 0.51 | 83 | 17 |
| 24 | 7.26 | 8.07 | 0.98 | 0.02 | 0.75 | 81 | 19 |
| 30 | 9.12 | 4.12 | 0.55 | 0.00 | 2.03 | 81 | 19 |
| 36 | 10.02 | 0.06 | 0.36 | - | 4.42 | 80 | 20 |
| 42 | 10.18 | 0.05 | 0.07 | - | 3.43 | 79 | 21 |
| 48 | 9.83 | 0.06 | - | - | 3.24 | 80 | 20 |
| 54 | 9.25 | 0.06 | - | - | 3.30 | 80 | 20 |
| 60 | 9.00 | 0.06 | - | - | 3.05 | 80 | 20 |

ตารางที่ 11(ง) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโตส กรดวาลेरริก แอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และ P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยมีอัตราส่วน ฟรักโตส : กรดวาลेरริก เท่ากับ 18 : 2

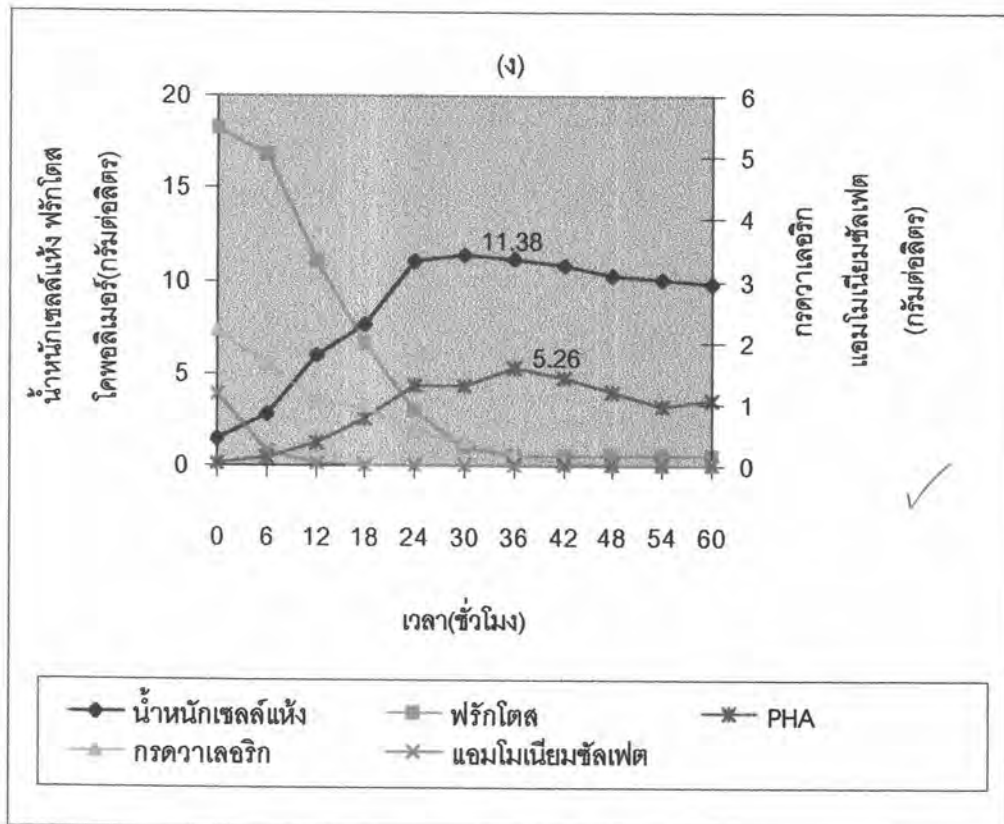
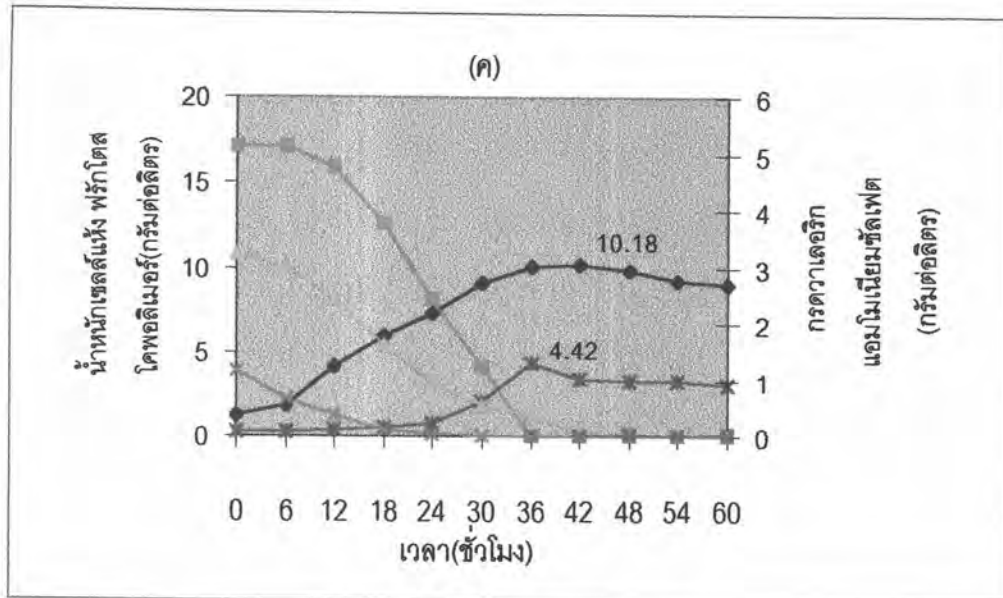
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาลेरริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.64 | 18.21 | 2.18 | 1.16 | 0.10 | 100 | 0 |
| 6 | 2.75 | 16.81 | 0.67 | 0.25 | 0.45 | 98 | 2 |
| 12 | 5.98 | 11.10 | 1.02 | 0.03 | 1.19 | 89 | 11 |
| 18 | 7.61 | 6.58 | 0.95 | 0.00 | 2.53 | 89 | 11 |
| 24 | 11.08 | 2.93 | 0.56 | - | 4.36 | 84 | 16 |
| 30 | 11.38 | 0.95 | 0.40 | - | 4.36 | 84 | 16 |
| 36 | 11.12 | 0.53 | 0.16 | - | 5.26 | 85 | 15 |
| 42 | 10.87 | 0.52 | 0.05 | - | 4.76 | 86 | 14 |
| 48 | 10.26 | 0.51 | - | - | 3.97 | 86 | 14 |
| 54 | 10.01 | 0.50 | - | - | 3.20 | 86 | 14 |
| 60 | 9.87 | 0.50 | - | - | 3.524 | 86 | 14 |

ตารางที่ 11(จ) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโตส กรดวาลेरริก แอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และ P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยมีอัตราส่วน ฟรักโตส : กรดวาลेरริก เท่ากับ 19 : 1

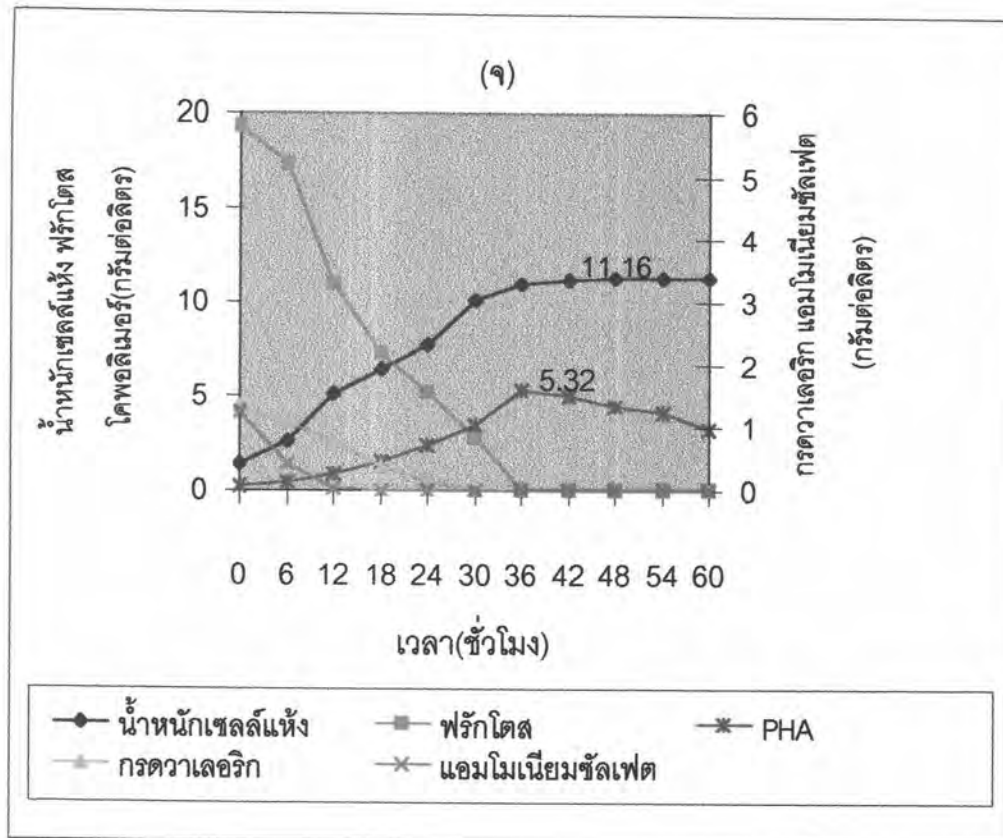
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาลेरริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.70 | 19.35 | 1.33 | 1.24 | 0.24 | 100 | 0 |
| 6 | 2.64 | 17.39 | 1.07 | 0.42 | 0.49 | 97 | 3 |
| 12 | 5.13 | 10.95 | 0.79 | 0.03 | 0.92 | 95 | 5 |
| 18 | 6.43 | 7.24 | 0.40 | 0.00 | 1.54 | 94 | 6 |
| 24 | 7.70 | 5.19 | 0.15 | - | 2.36 | 93 | 7 |
| 30 | 10.16 | 2.79 | - | - | 3.51 | 93 | 7 |
| 36 | 11.02 | 0.13 | - | - | 5.32 | 91 | 9 |
| 42 | 11.16 | 0.13 | - | - | 4.96 | 91 | 9 |
| 48 | 11.30 | 0.13 | - | - | 4.41 | 91 | 9 |
| 54 | 11.32 | 0.13 | - | - | 4.11 | 92 | 8 |
| 60 | 11.34 | 0.13 | - | - | 3.31 | 92 | 8 |



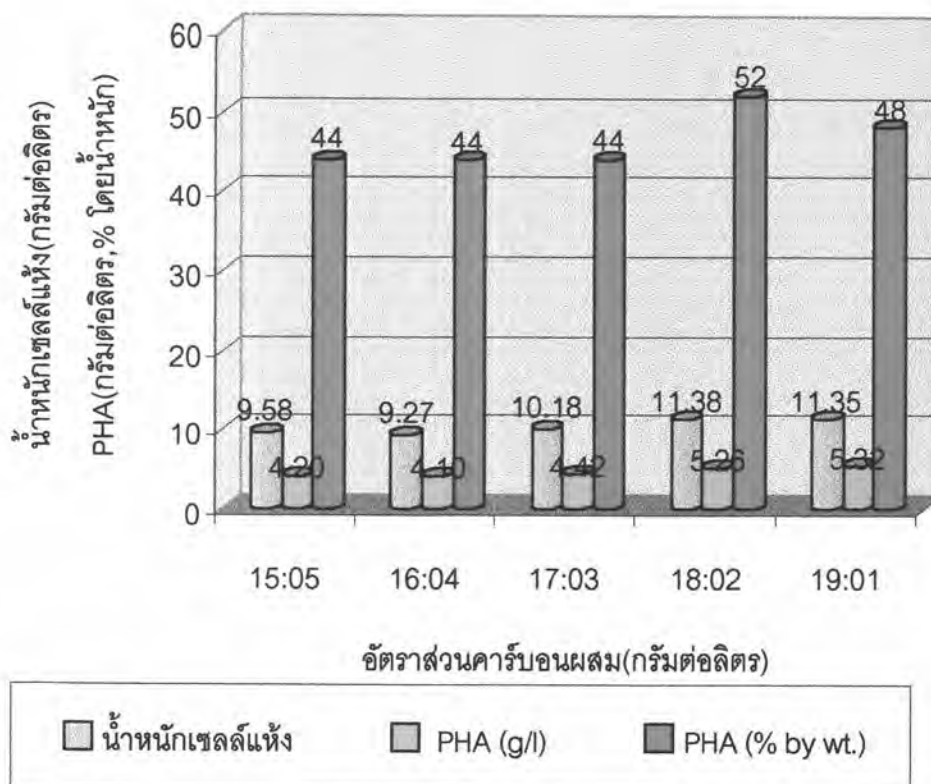
รูปที่ 16 การเจริญ และการผลิต PHA เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นฟรักโตสต่อวาลูเออริก (ก) อัตราส่วนฟรักโตสต่อกรดวาลูเออริก เท่ากับ 15:5 (ข) อัตราส่วนฟรักโตสต่อกรดวาลูเออริก เท่ากับ 16:4



รูปที่ 16(ต่อ) การเจริญ และการผลิต PHA เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยใช้ แหล่งคาร์บอนผสมเป็นฟรักโตสต่อกรควาเลอริก (ค) อัตราส่วนฟรักโตสต่อกรควาเลอริก เท่ากับ 17:3 (ง) อัตราส่วนฟรักโตสต่อกรควาเลอริก เท่ากับ 18:2



รูปที่ 16(ต่อ) การเจริญ และการผลิต PHA เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยใช้ แหล่งคาร์บอนผสมเป็นฟรักโตสต่อกรควาเลอริก (จ) อัตราส่วนฟรัก โตสต่อ กรควาเลอริก เท่ากับ 19:1



รูปที่ 17 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโพลีเมอร์ ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนผสม (ฟรักโตส : กรดวเลอริก) เท่ากับ 15 : 5 16 : 4 17 : 3 18 : 2 19 : 1

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบการผลิต PHA เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยแปรผันอัตราส่วนแหล่งคาร์บอน (ฟรักโตส : กรดวเลอริก) เริ่มต้นของการเลี้ยง ตั้งแต่ 15 : 5 - 19 : 1 กรัมต่อลิตร

| อัตราส่วนแหล่งคาร์บอน | เวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | PHA (% by wt.) | Productivity (g/L.h) |
|-----------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------|----------------|----------------------|
| 15 : 5 | 36 | 9.58 | 4.20 | 44 | 0.11 |
| 16 : 4 | 42 | 9.27 | 4.10 | 44 | 0.11 |
| 17 : 3 | 42 | 10.18 | 4.42 | 44 | 0.12 |
| 18 : 2 | 30 | 11.38 | 5.26 | 52 | 0.15 |
| 19 : 1 | 36 | 11.34 | 5.32 | 48 | 0.15 |

2.4 ผลของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจำกัด ต่อการเจริญและการผลิต P(3HB-co-3HV)

แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กันในการหมักระดับอุตสาหกรรม เพราะว่ามีราคาไม่แพงและหาได้ง่ายในท้องตลาด (Kole และ Gerson, 1988) รวมทั้งพบว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับ *Alcaligenes* sp. A-04 (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ ,2536 และอัญชญา สุรดิขจร, 2537) ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตจำกัดต่อปริมาณแหล่งคาร์บอนเหมาะสมศึกษาได้ โดยแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นตั้งแต่ 0.1 - 2.0 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนโมล C/N เท่ากับ 350 88 47 35 และ 23 โมลต่อโมล) เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 6.4 ติดตามการเจริญของเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาหาความเข้มข้นของเซลล์ตามวิธีในข้อ 8 หาปริมาณฟรักโทส และกรควาเลอริกในน้ำหมักตามวิธีทดลองในข้อ 9 และข้อ 10 ตามลำดับ หาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตตามวิธีในข้อ 11 หาปริมาณโคพอลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) ตามวิธีในข้อ 12

ผลการวิจัยพบว่า ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลต่อการเจริญและการผลิต P(3HB-co-3HV) ดังแสดงในตารางที่ 13 และรูปที่ 18 โดยที่ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจำกัดในอาหารที่เหมาะสมคือ 1.0 กรัมต่อลิตร การเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 จนเริ่มคงที่ ในชั่วโมงที่ 36 แหล่งคาร์บอนคือ น้ำตาลฟรักโทสถูกใช้อย่างรวดเร็วจนเกือบหมดในชั่วโมงที่ 36 ในลักษณะเดียวกันกรควาเลอริกถูกใช้อย่างรวดเร็วจนหมดในชั่วโมงที่ 48 และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมักถูกใช้หมดในชั่วโมงที่ 18 ซึ่งได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 10.95 กรัมต่อลิตร ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 6.76 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 42 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 0.1 และ 0.5 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ต่ำกว่า (4.58 และ 4.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ในทำนองเดียวกัน เมื่อเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เป็น 1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ทั้งน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคพอลิเมอร์ ลดลงต่ำกว่า เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร สรุปผลการทดลองในตารางที่ 14 และรูปที่ 19 โดยพบว่า เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ได้ปริมาณมากกว่ารวมทั้งอัตราการผลิตสูงกว่า เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอื่นๆ โดยได้ปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 6.76 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 62% โดยน้ำหนัก และได้อัตราการผลิตเท่ากับ 0.16

ตารางที่ 13(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโตส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และ ปริมาณ P(3HB-co-3HV) ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร

| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | กรควาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|----------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|---|-------------------|-----------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.76 | 18.01 | 2.02 | 0.13 | 0.11 | 100 | 0 |
| 6 | 2.18 | 17.64 | 1.93 | 0.01 | 0.27 | 98 | 2 |
| 12 | 3.50 | 15.26 | 1.29 | - | 1.00 | 96 | 4 |
| 18 | 4.72 | 12.35 | 0.83 | - | 2.18 | 93 | 7 |
| 24 | 5.46 | 9.27 | 0.47 | - | 2.92 | 91 | 9 |
| 30 | 5.90 | 8.02 | 0.28 | - | 3.01 | 89 | 11 |
| 36 | 6.26 | 5.68 | 0.20 | - | 4.58 | 88 | 12 |
| 42 | 7.84 | 4.43 | 0.03 | - | 4.32 | 88 | 12 |
| 48 | 8.38 | 3.34 | - | - | 4.02 | 87 | 13 |
| 54 | 8.31 | 2.96 | - | - | 3.94 | 87 | 13 |
| 60 | 8.34 | 2.62 | - | - | 4.04 | 88 | 12 |

ตารางที่ 13(ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโตส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และ ปริมาณ P(3HB-co-3HV) ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร

| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | กรควาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|----------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|---|-------------------|-----------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.74 | 18.20 | 2.13 | 0.45 | 0.18 | 100 | 0 |
| 6 | 2.40 | 16.58 | 1.73 | 0.02 | 0.64 | 99 | 1 |
| 12 | 5.50 | 11.22 | 1.25 | 0.01 | 1.75 | 98 | 2 |
| 18 | 7.66 | 8.31 | 0.83 | 0.00 | 2.75 | 98 | 2 |
| 24 | 8.86 | 6.07 | 0.54 | - | 3.18 | 95 | 5 |
| 30 | 9.62 | 3.91 | 0.32 | - | 4.27 | 91 | 9 |
| 36 | 10.32 | 3.28 | 0.16 | - | 4.32 | 90 | 10 |
| 42 | 10.79 | 2.64 | 0.07 | - | 4.21 | 89 | 11 |
| 48 | 10.96 | 1.25 | - | - | 4.11 | 89 | 11 |
| 54 | 11.11 | 1.05 | - | - | 4.18 | 89 | 11 |
| 60 | 11.32 | 1.00 | - | - | 4.06 | 88 | 12 |

ตารางที่ 13(ค) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโทส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และ ปริมาณ P(3HB-co-3HV) ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เริ่มต้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร

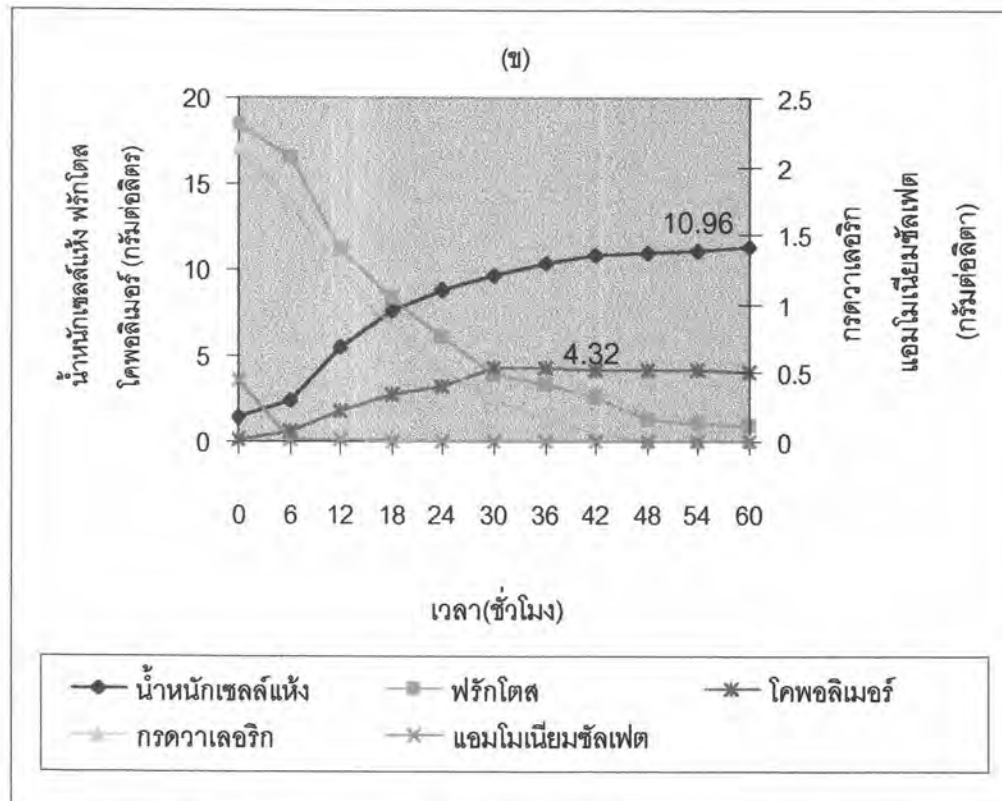
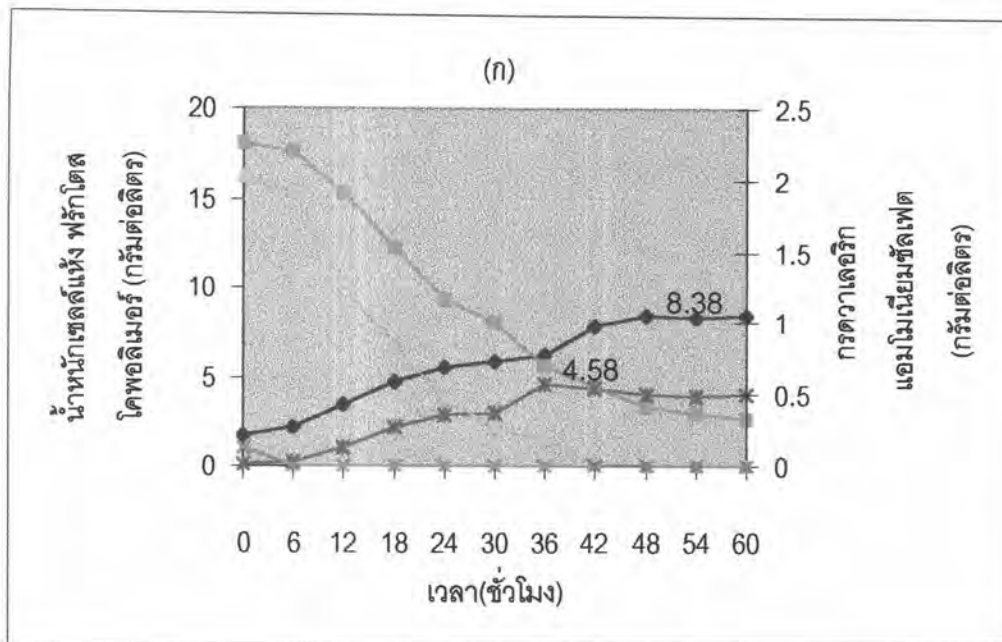
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | กรควาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.63 | 18.01 | 2.00 | 1.19 | 0.10 | 100 | 0 |
| 6 | 2.18 | 13.15 | 1.84 | 0.26 | 0.65 | 98 | 2 |
| 12 | 3.92 | 10.75 | 1.63 | 0.00 | 1.22 | 95 | 5 |
| 18 | 6.81 | 8.26 | 0.97 | - | 1.99 | 92 | 8 |
| 24 | 8.34 | 5.33 | 0.43 | - | 3.18 | 90 | 10 |
| 30 | 9.99 | 1.43 | 0.21 | - | 4.43 | 87 | 13 |
| 36 | 10.81 | 0.12 | 0.11 | - | 6.66 | 88 | 12 |
| 42 | <u>10.95</u> | 0.10 | 0.04 | - | <u>6.76</u> | 88 | 12 |
| 48 | 10.59 | 0.21 | - | - | 6.45 | 89 | 11 |
| 54 | 10.35 | 0.10 | - | - | 6.42 | 89 | 11 |
| 60 | 10.11 | 0.10 | - | - | 6.10 | 88 | 12 |

ตารางที่ 13(ง) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโทส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และ ปริมาณ P(3HB-co-3HV) ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เริ่มต้นเท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร

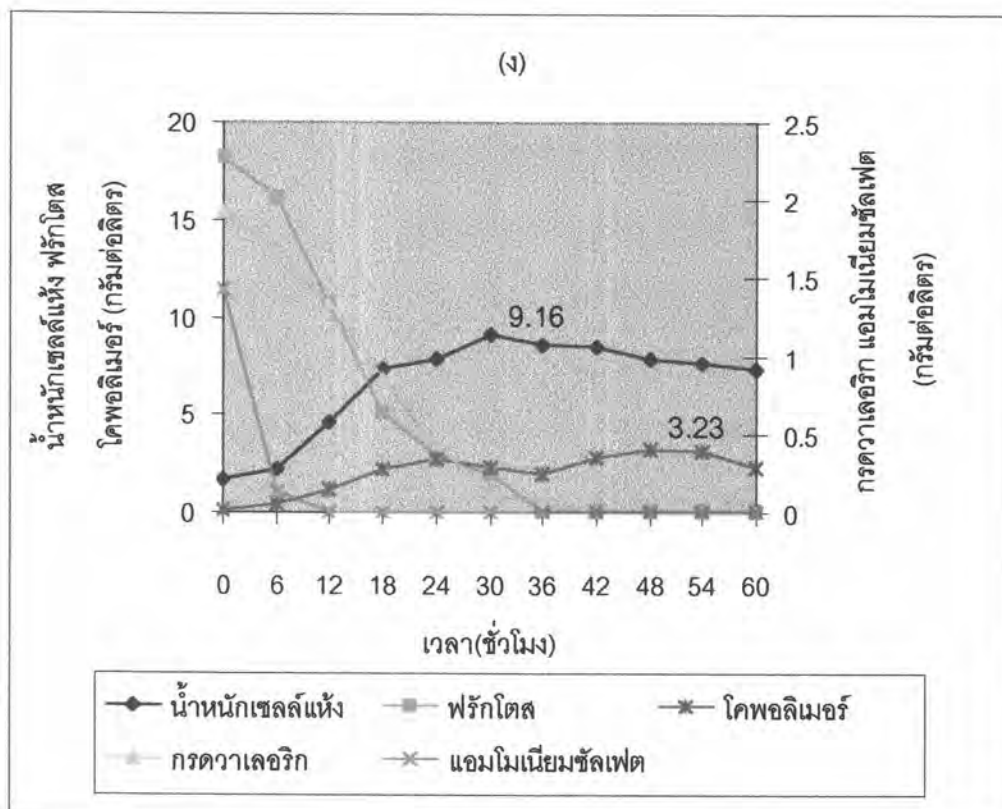
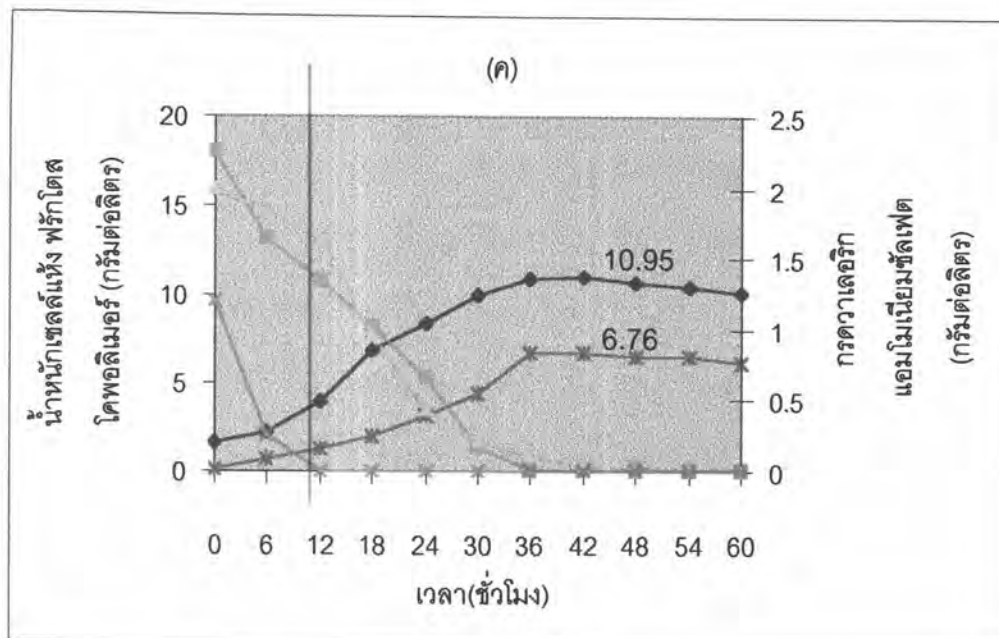
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | กรควาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.72 | 18.18 | 1.93 | 1.42 | 0.13 | 100 | 0 |
| 6 | 2.18 | 16.16 | 1.67 | 0.13 | 0.47 | 98 | 2 |
| 12 | 4.65 | 10.72 | 1.33 | 0.00 | 1.12 | 93 | 7 |
| 18 | 7.38 | 5.15 | 0.86 | - | 2.17 | 94 | 6 |
| 24 | 7.88 | 2.93 | 0.43 | - | 2.68 | 93 | 7 |
| 30 | <u>9.16</u> | 1.98 | 0.13 | - | 2.27 | 90 | 10 |
| 36 | 8.62 | 0.10 | 0.06 | - | 2.00 | 88 | 12 |
| 42 | 8.51 | 0.10 | - | - | 2.84 | 87 | 13 |
| 48 | 7.88 | 0.10 | - | - | <u>3.23</u> | 87 | 13 |
| 54 | 7.63 | 0.08 | - | - | 3.15 | 88 | 12 |
| 60 | 7.28 | 0.10 | - | - | 2.28 | 88 | 12 |

ตารางที่ 13(จ) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโทส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และ ปริมาณ P(3HB-co-3HV) ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เริ่มต้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร

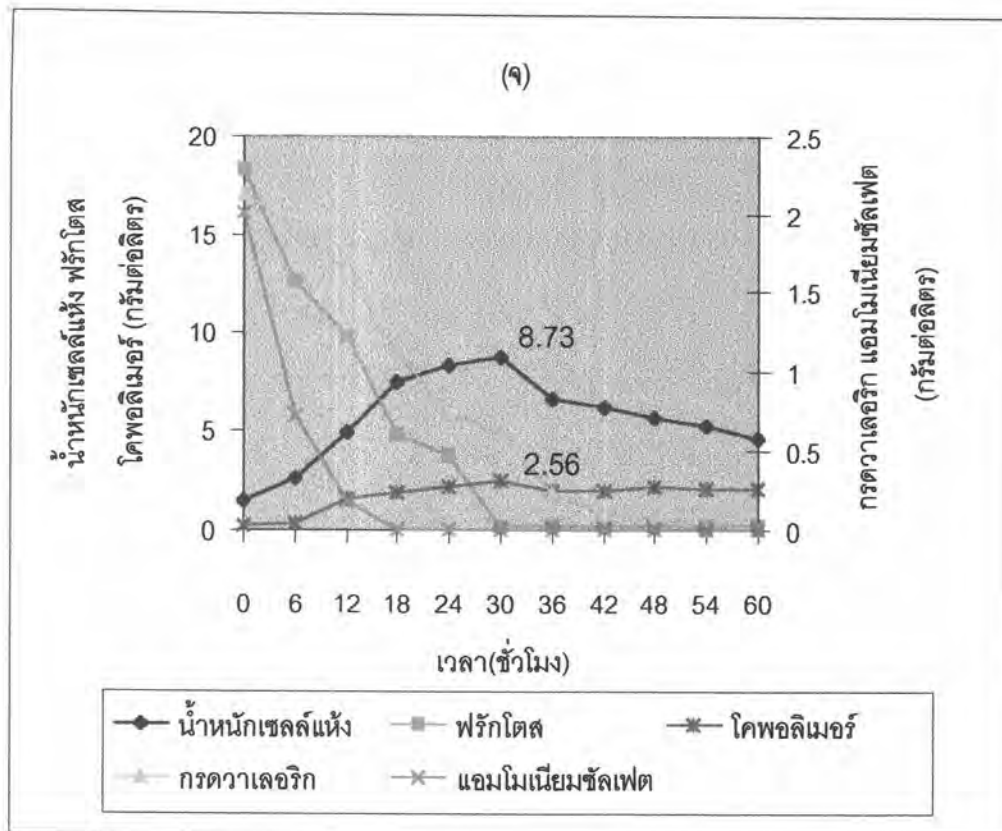
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | กรควาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.76 | 18.31 | 2.14 | 2.05 | 0.16 | 100 | 0 |
| 6 | 2.57 | 12.55 | 1.92 | 0.72 | 0.34 | 99 | 1 |
| 12 | 4.91 | 9.73 | 1.65 | 0.19 | 1.55 | 95 | 5 |
| 18 | 7.48 | 4.88 | 1.12 | 0.00 | 1.92 | 93 | 7 |
| 24 | 8.26 | 3.76 | 0.73 | - | 2.23 | 90 | 10 |
| 30 | 8.73 | 0.18 | 0.61 | - | 2.56 | 90 | 10 |
| 36 | 6.62 | 0.18 | 0.24 | - | 2.03 | 91 | 9 |
| 42 | 6.17 | 0.18 | 0.10 | - | 2.02 | 91 | 9 |
| 48 | 5.66 | 0.18 | 0.08 | - | 2.15 | 91 | 9 |
| 54 | 5.24 | 0.17 | - | - | 2.12 | 91 | 9 |
| 60 | 4.62 | 0.17 | - | - | 2.12 | 91 | 9 |



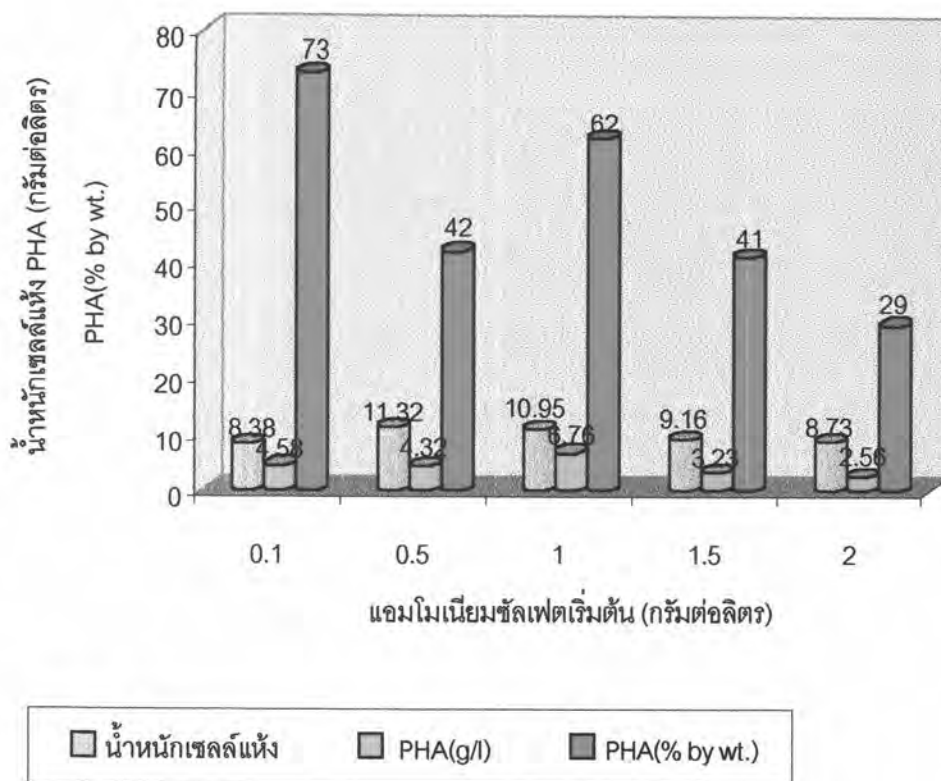
รูปที่ 18 การเจริญ และการผลิต PHA เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยมี ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น (ก) 0.1 กรัมต่อลิตร (ข) 0.5 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 18(ต่อ) การเจริญ และผลิต PHA เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยมี ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น (ค) 1.0 กรัมต่อลิตร (ง) 1.5 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 18(ต่อ) การเจริญ และการผลิต PHA เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดย มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น (จ) 2.0 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 19 เปรียบเทียบน้ำหนักรเซลล์แห้ง ปริมาณ โคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบการผลิต PHA เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 - 2.0 กรัมต่อลิตร

| (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | เวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง) | น้ำหนักรเซลล์ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | PHA (% by wt.) | Productivity (g/L.h) |
|--|----------------------------|--------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------------|
| 0.1 | 48 | 8.38 | 4.58 | 73 | 0.13 |
| 0.5 | 60 | 11.32 | 4.32 | 38 | 0.12 |
| 1.0 | 42 | 10.95 | 6.76 | 62 | 0.16 |
| 1.5 | 30 | 9.16 | 3.23 | 35 | 0.07 |
| 2.0 | 30 | 8.73 | 2.56 | 29 | 0.09 |

2.5 ผลของปริมาณฟอสเฟตจำกัดที่มีต่อการเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV)

การศึกษาผลของฟอสเฟต (KH_2PO_4 : Na_2HPO_4) ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการเจริญและการผลิต P(3HB-co-3HV) ระดับถึงหมัก อรุณ ชาญชัยเขาวัววัฒน์(2536) ได้ศึกษาผลของการจำกัดฟอสเฟตในรูปอัตราส่วนของ KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 ในอาหาร MSM ที่มีต่อการผลิต PHB โดยเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในระดับขวดเขย่า พบว่าอัตราส่วนจำกัดที่เหมาะสมของ KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 ต่อการผลิต PHB มีค่าเท่ากับ 1 และ 0.3 กรัมต่อลิตร โดยได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นจาก 21 เป็น 46.80 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง อัญชญา ศุภศิขจร (2537) รายงานถึงการผลิต P(3HB-co-3HV) โดยเชื้อเดียวกันนี้ในระดับขวดเขย่า พบว่าการจำกัดปริมาณฟอสเฟตไม่มีผลในการเพิ่มปริมาณ โคพอลิเมอร์ โดยปริมาณ โคพอลิเมอร์สูงสุดที่ได้เท่ากับ 47 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งผลิตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนของฟอสเฟตเท่ากับที่ อรุณ ชาญชัยเขาวัววัฒน์(2536) ได้รายงานไว้ Volva และคณะ (1993) ได้รายงานถึงผลของการจำกัดปริมาณฟอสเฟตที่มีต่อการเจริญ และการผลิต PHB โดยเชื้อ *A. eutrophus* Z-I ในระดับถึงหมักกว่าเมื่อมีการจำกัดฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีปริมาณเพียง 45 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิมปริมาณ PHB ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นจาก 9.9 เป็น 23 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นในงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาหาผลของฟอสเฟต ดำเนินการวิจัยตามข้อ 6.5 โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่าง KH_2PO_4 : Na_2HPO_4 เท่ากับ 0.5 : 0.15 1.0 : 0.3 2.0 : 0.6 4.0 : 1.2 กรัมต่อลิตร

ผลการวิจัยพบว่าอัตราส่วนของฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) คือ 1.0 : 0.3 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 15 และรูปที่ 20 โดยการเจริญเป็นไปอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 36 การเจริญจึงลดลงเล็กน้อย เนื่องจากสารอาหารที่ใช้เลี้ยงคือ น้ำตาลฟรักโทส กรดควาเลอริก และ แอมโมเนียมซัลเฟตหมดลงโดยปริมาณ P(3HB-co-3HV) สูงสุดเท่ากับ 5.62 กรัมต่อลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 11.92 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง โดยมีสัดส่วนของ 3HB : 3HV เท่ากับ 87 : 13 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยการทดลองชุดอื่นๆซึ่งมีฟอสเฟตปริมาณมาก หรือน้อยกว่านี้ *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิตโคพอลิเมอร์ได้ปริมาณต่ำกว่า

สรุปผลการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 16 และรูปที่ 21 โดยสรุปได้ว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ (กรัมต่อลิตร) และอัตราผลผลิตสูงสุดเมื่อให้ฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อมีสัดส่วนของ KH_2PO_4 : Na_2HPO_4 เท่ากับ 1.0 : 0.3 กรัมต่อลิตร โดยได้ปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 5.62 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 47 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้อัตราผลผลิตเท่ากับ 0.15

ตารางที่ 15(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลฟรักโตส กรดวาเลอริก และแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักโดยใช้สัดส่วนฟอสเฟต ($\text{KH}_2\text{PO}_4 : \text{Na}_2\text{HPO}_4$) เท่ากับ 0.5 : 0.15 กรัมต่อลิตร

| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วน โมนอเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|---|----------------------|---------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.65 | 18.21 | 2.07 | 1.00 | 0.25 | 100 | 0 |
| 6 | 1.92 | 16.13 | 1.86 | 0.91 | 0.63 | 97 | 3 |
| 12 | 2.57 | 12.62 | 1.45 | 0.32 | 1.19 | 98 | 2 |
| 18 | 3.92 | 10.84 | 0.92 | 0.19 | 2.19 | 90 | 10 |
| 24 | 5.34 | 9.02 | 0.63 | 0.00 | 2.82 | 83 | 17 |
| 30 | 8.26 | 5.21 | 0.48 | - | 4.18 | 86 | 14 |
| 36 | 8.97 | 4.13 | 0.36 | - | 4.36 | 86 | 14 |
| 42 | 7.65 | 3.01 | 0.13 | - | 4.22 | 85 | 15 |
| 48 | 6.38 | 2.83 | 0.03 | - | 4.12 | 86 | 14 |
| 54 | 6.32 | 0.78 | - | - | 4.01 | 87 | 13 |
| 60 | 6.02 | 0.72 | - | - | 3.09 | 87 | 13 |

ตารางที่ 15(ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลฟรักโตส กรดวาเลอริก และแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักโดยใช้สัดส่วนฟอสเฟต ($\text{KH}_2\text{PO}_4 : \text{Na}_2\text{HPO}_4$) เท่ากับ 1.0 : 0.3 กรัมต่อลิตร

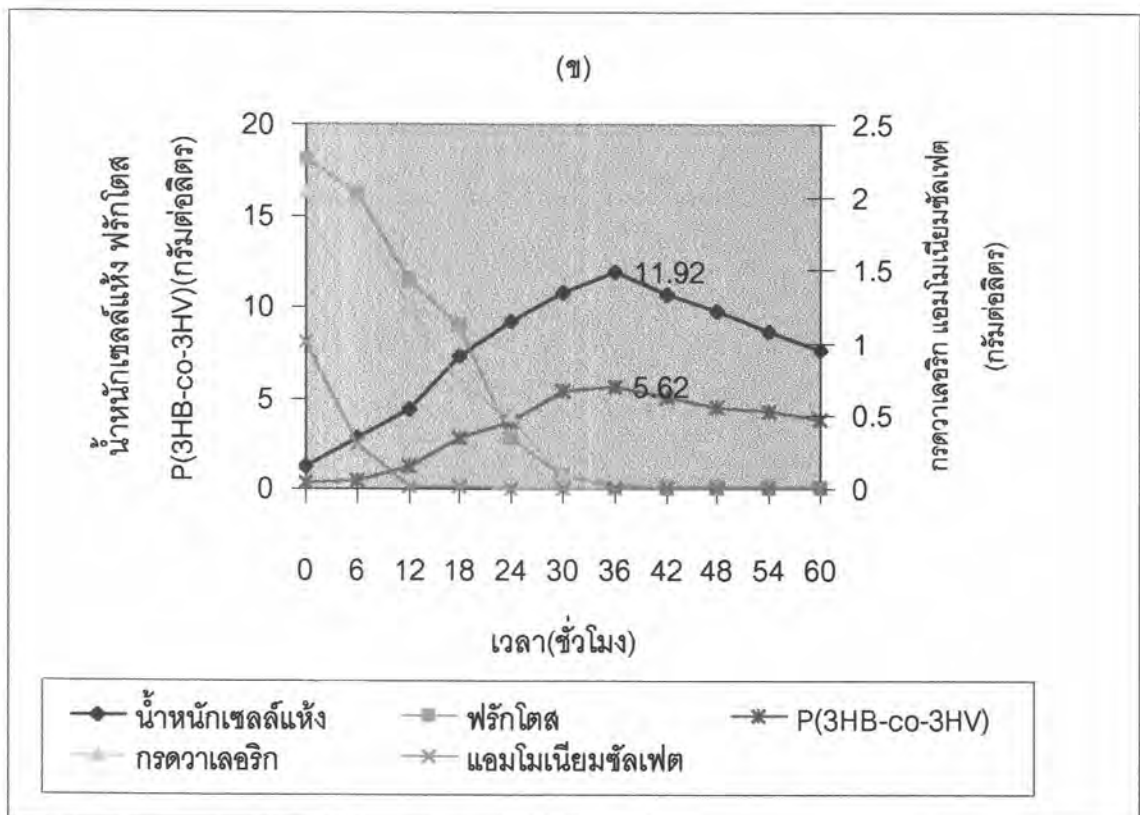
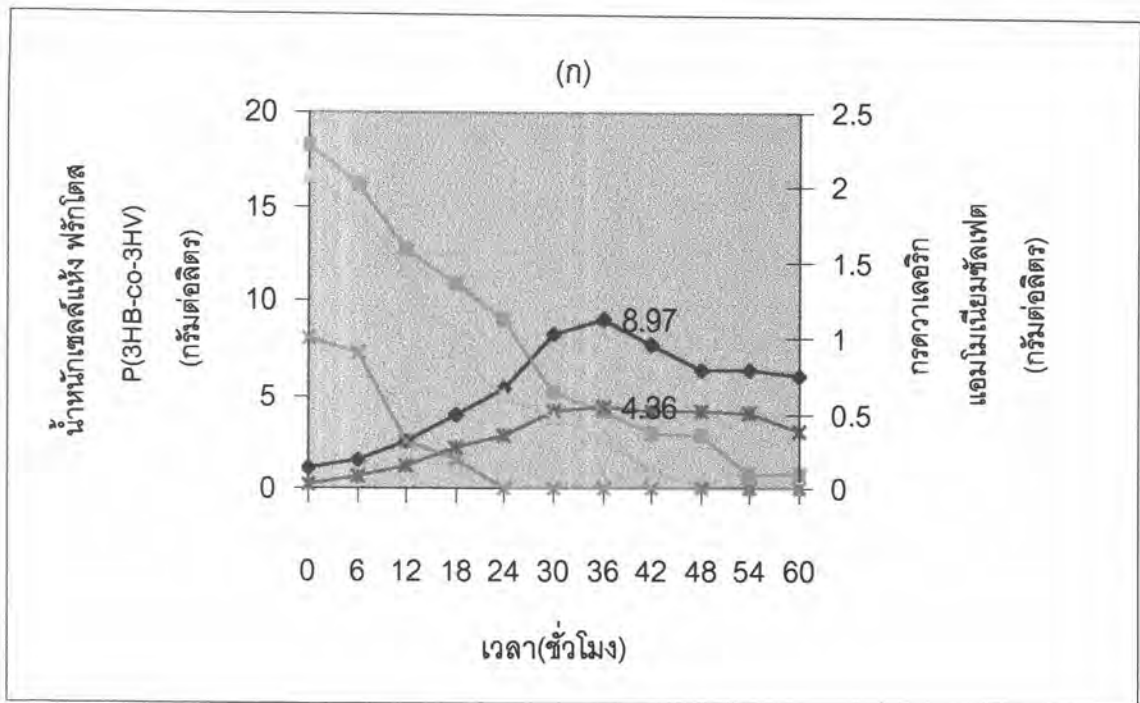
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วน โมนอเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|---|----------------------|---------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.67 | 18.10 | 2.03 | 1.01 | 0.32 | 100 | 0 |
| 6 | 2.76 | 16.21 | 1.89 | 0.32 | 0.49 | 98 | 2 |
| 12 | 4.36 | 11.48 | 1.26 | 0.01 | 1.20 | 98 | 2 |
| 18 | 7.28 | 8.94 | 0.73 | 0.01 | 2.77 | 90 | 10 |
| 24 | 9.17 | 2.85 | 0.51 | - | 3.67 | 86 | 14 |
| 30 | 10.82 | 0.74 | 0.10 | - | 5.43 | 86 | 14 |
| 36 | 11.92 | 0.11 | 0.05 | - | 5.62 | 87 | 13 |
| 42 | 10.72 | 0.11 | - | - | 5.00 | 85 | 15 |
| 48 | 9.82 | 0.11 | - | - | 4.49 | 87 | 13 |
| 54 | 8.6 | 0.11 | - | - | 4.23 | 86 | 14 |
| 60 | 7.66 | 0.08 | - | - | 3.85 | 87 | 13 |

ตารางที่ 15(ค) น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลฟรักโตส กรดวาลेरริก และแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักโดยใช้สัดส่วนฟอสเฟต ($\text{KH}_2\text{PO}_4 : \text{Na}_2\text{HPO}_4$) เท่ากับ 2.0 : 0.6 กรัมต่อลิตร

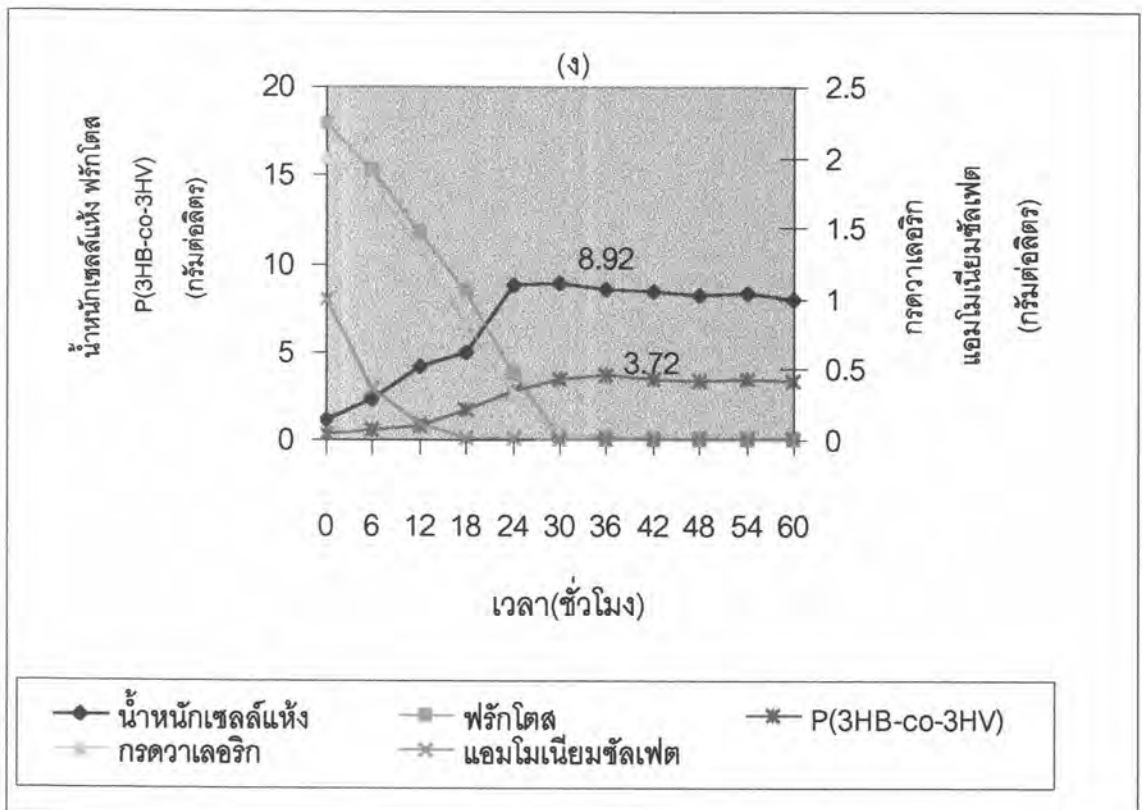
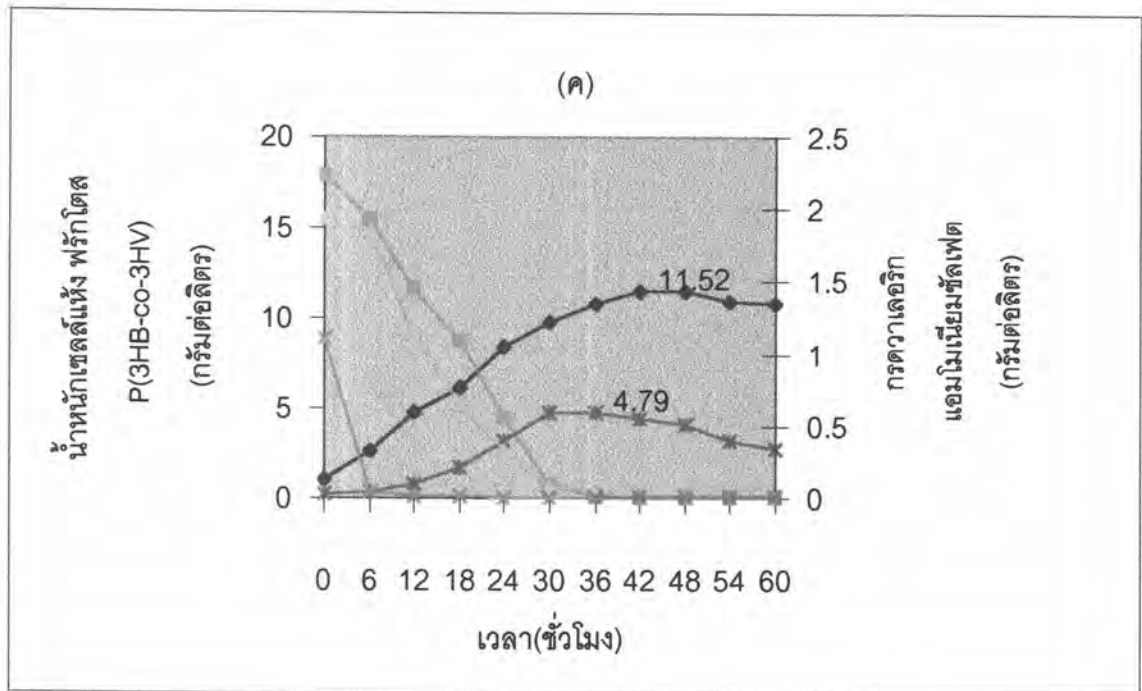
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาลेरริก (กรัมต่อลิตร) | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|---|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.74 | 17.80 | 1.93 | 1.11 | 0.17 | 100 | 0 |
| 6 | 2.61 | 15.43 | 1.86 | 0.05 | 0.32 | 98 | 2 |
| 12 | 4.74 | 11.64 | 1.13 | 0.01 | 0.75 | 95 | 5 |
| 18 | 6.18 | 8.75 | 0.66 | 0.01 | 1.72 | 89 | 11 |
| 24 | 8.36 | 4.51 | 0.34 | - | 3.19 | 85 | 15 |
| 30 | 9.81 | 0.82 | 0.08 | - | 4.75 | 86 | 14 |
| 36 | 10.76 | 0.09 | 0.04 | - | 4.78 | 85 | 15 |
| 42 | 11.52 | 0.09 | - | - | 4.41 | 87 | 13 |
| 48 | 11.42 | 0.07 | - | - | 4.05 | 87 | 13 |
| 54 | 10.93 | 0.08 | - | - | 3.18 | 87 | 13 |
| 60 | 10.82 | 0.07 | - | - | 2.78 | 87 | 13 |

ตารางที่ 15(ง) น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลฟรักโตส กรดวาลेरริก และแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักโดยใช้สัดส่วนฟอสเฟต ($\text{KH}_2\text{PO}_4 : \text{Na}_2\text{HPO}_4$) เท่ากับ 4.0 : 1.2 กรัมต่อลิตร

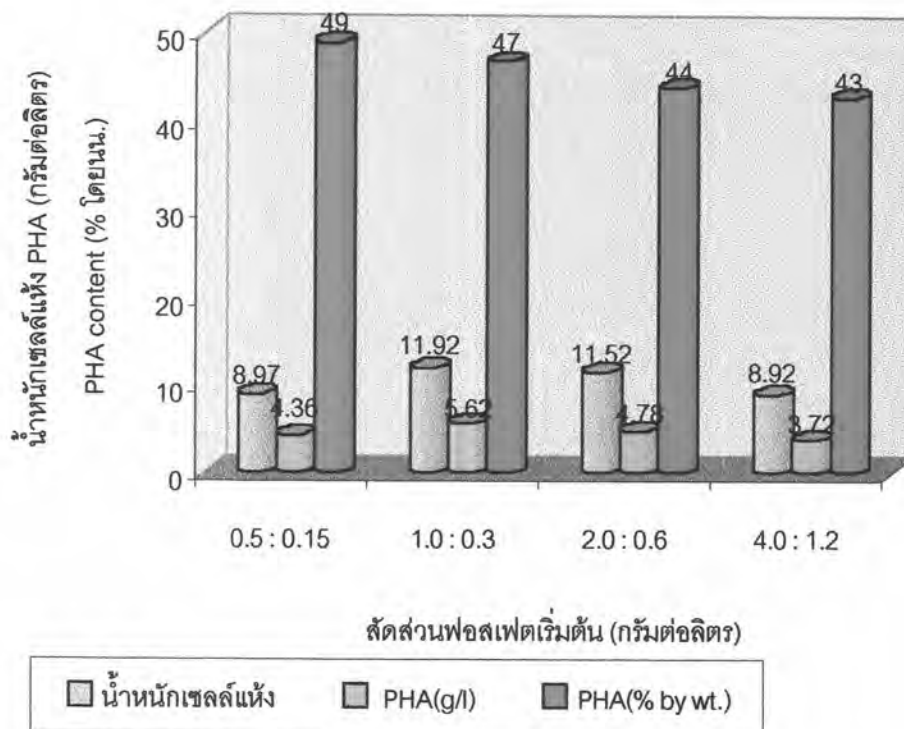
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาลेरริก (กรัมต่อลิตร) | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|---|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.69 | 17.86 | 2.00 | 1.00 | 0.39 | 100 | 0 |
| 6 | 2.26 | 15.28 | 1.83 | 0.36 | 0.52 | 97 | 3 |
| 12 | 4.16 | 11.78 | 1.36 | 0.12 | 0.78 | 95 | 12 |
| 18 | 5.02 | 8.43 | 0.84 | 0.01 | 1.77 | 88 | 14 |
| 24 | 8.82 | 3.82 | 0.33 | 0.01 | 2.82 | 86 | 15 |
| 30 | 8.92 | 0.27 | 0.04 | - | 3.42 | 85 | 14 |
| 36 | 8.57 | 0.18 | - | - | 3.72 | 86 | 14 |
| 42 | 8.42 | 0.11 | - | - | 3.44 | 86 | 14 |
| 48 | 8.22 | 0.12 | - | - | 3.40 | 86 | 14 |
| 54 | 8.32 | 0.12 | - | - | 3.50 | 86 | 14 |
| 60 | 8.02 | 0.12 | - | - | 3.40 | 86 | 14 |



รูปที่ 20 การเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยมีสัดส่วนฟอสเฟต (KH_2HPO_4 : Na_2HPO_4) เท่ากับ (ก) 0.5 : 0.15 กรัมต่อลิตร (ข) 1.0 : 0.3 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 20(ต่อ) การเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp. A-04* ในถังหมัก โดยมีสัดส่วนฟอสเฟต (KH_2PO_4 : Na_2HPO_4) เท่ากับ (ค) 2.0 : 0.6 กรัมต่อลิตร (ง) 4.0 : 1.2 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 21 เปรียบเทียบน้ำหนักรเซลล์แห้ง และปริมาณโคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักโดยแปรผันปริมาณอัตราส่วนฟอสเฟต (KH_2PO_4 : Na_2HPO_4) เท่ากับ 0.5:0.15 1.0:0.3 2.0:0.6 4.0:0.15 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยแปรผันสัดส่วนของฟอสเฟต (KH_2PO_4 : Na_2HPO_4) เท่ากับ 0.5 : 0.15 1.0 : 0.3 2.0 : 0.6 4.0 : 1.2 กรัมต่อลิตร

| ฟอสเฟต (กรัมต่อลิตร) | เวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง) | น้ำหนักรเซลล์ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | PHA (% by wt.) | Productivity (g/L.h) |
|----------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------|----------------------|
| 0.5 : 0.15 | 36 | 8.97 | 4.36 | 49 | 0.12 |
| 1.0 : 0.3 | 36 | 11.92 | 5.62 | 47 | 0.17 |
| 2.0 : 0.6 | 42 | 11.52 | 4.78 | 44 | 0.11 |
| 4.0 : 0.15 | 30 | 8.92 | 3.72 | 43 | 0.10 |

2.6 ผลของปริมาณแมกนีเซียมจำกัดต่อการเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV)

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ได้ศึกษาถึงผลของแมกนีเซียมในรูปแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อผลิต PHB ในระดับขวดเขย่า พบว่า ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมคือ 0.05 กรัมต่อลิตร โดยผลิต PHB ได้เท่ากับ 46.67 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในปี 2537 อัญชญา สุรดิขจร ได้ทำการวิจัยเพื่อผลิต P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในระดับขวดเขย่าซึ่งได้รายงานปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร เช่นกัน งานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของแมกนีเซียมต่อการเจริญและการผลิตโคพอลิเมอร์ โดยเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลฟรักโทสและกรควาเลอร์อิคตราส่วนเท่ากับ 18 : 2 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 : Na_2HPO_4 เท่ากับ 1.0 : 0.3 กรัมต่อลิตร ดำเนินการวิจัยตามข้อ 6.6

ผลการวิจัยแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 22 โดยได้ผลว่า เมื่อให้ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต เท่ากับ 0.05-0.2 กรัมต่อลิตร ได้พบว่าการเจริญใกล้เคียงกัน การผลิตโคพอลิเมอร์ เมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟต เท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร ดีกว่า ที่ใช้ปริมาณอื่นเล็กน้อย การเจริญของเชื้อเมื่อเลี้ยง โดยมีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต เท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร นี้เจริญอย่างรวดเร็ว จนถึงชั่วโมงที่ 30 การเจริญลดลงเล็กน้อย น้ำตาลฟรักโทสถูกใช้เกือบหมดประมาณชั่วโมงที่ 42 กรควาเลอร์อิคถูกใช้หมดในชั่วโมงที่ 36 และแอมโมเนียมซัลเฟตถูกใช้หมดในชั่วโมงที่ 24 โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 9.44 กรัมต่อลิตร ปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 4.84 กรัมต่อลิตร และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 51 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยสัดส่วนของ 3HV ใกล้เคียงกันทุกการทดลอง สรุปผลในตารางที่ 18 และรูปที่ 23 ได้ว่า เมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงกว่าเมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟต เท่ากับ 0.05 และ 0.2 กรัมต่อลิตร และได้อัตราผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.16

ตารางที่ 17(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลฟรักโทส กรดวาลेरริก และแอมโมเนียมซัลเฟต และ การผลิต P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักเมื่อใช้ ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร

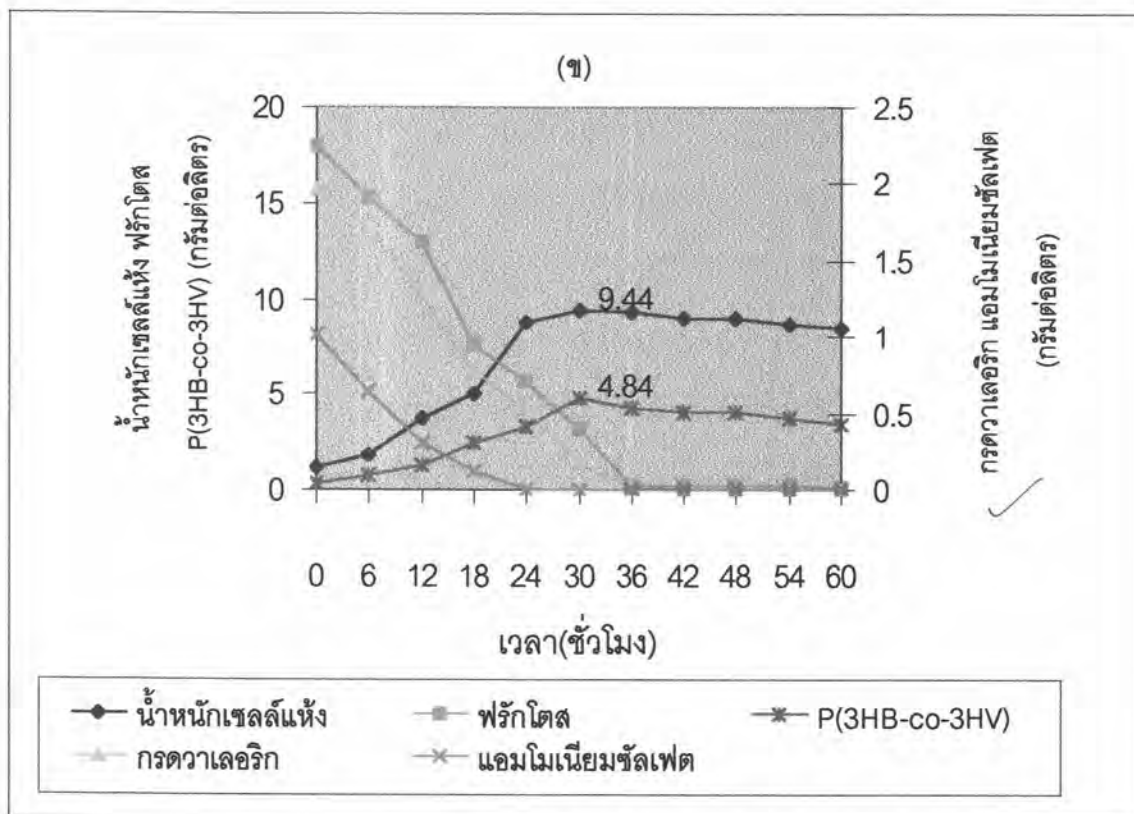
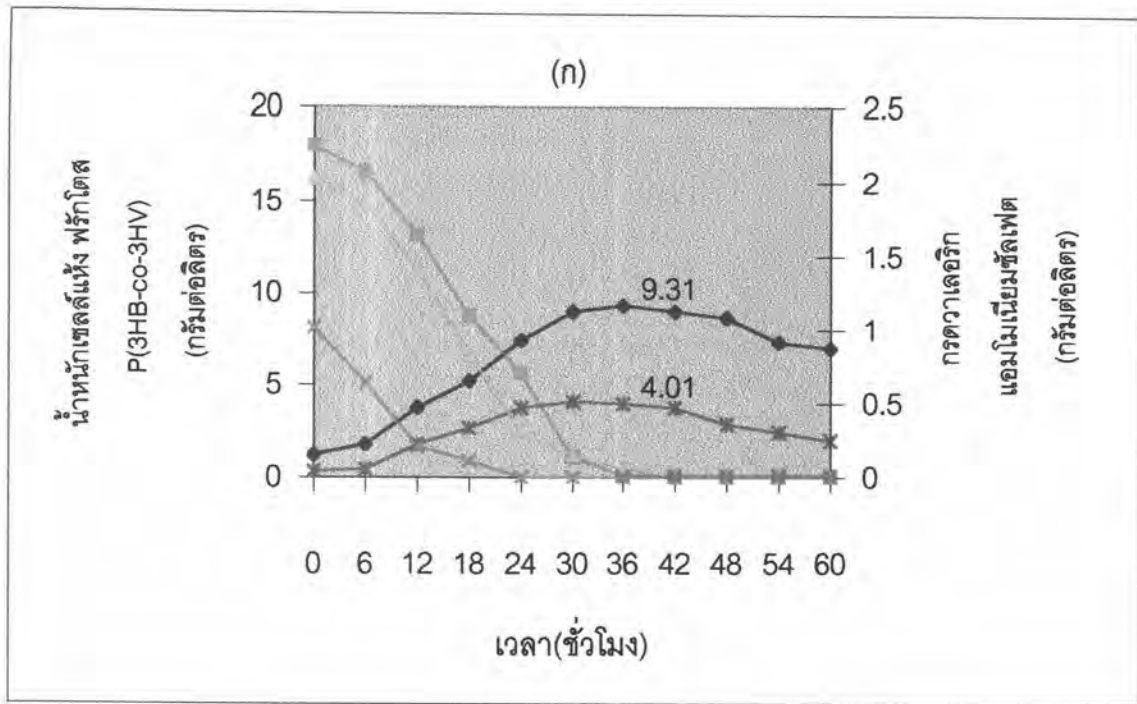
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาลेरริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.68 | 18.00 | 2.03 | 1.02 | 0.33 | 100 | 0 |
| 6 | 2.28 | 16.52 | 1.87 | 0.63 | 0.46 | 99 | 1 |
| 12 | 3.82 | 13.26 | 1.41 | 0.21 | 1.82 | 93 | 7 |
| 18 | 5.27 | 8.80 | 0.83 | 0.11 | 2.62 | 89 | 11 |
| 24 | 7.44 | 5.65 | 0.32 | - | 3.78 | 88 | 12 |
| 30 | 8.97 | 1.11 | 0.15 | - | 4.12 | 88 | 12 |
| 36 | 9.31 | 0.12 | 0.07 | - | 4.01 | 87 | 13 |
| 42 | 9.01 | 0.14 | - | - | 3.77 | 87 | 13 |
| 48 | 8.72 | 0.14 | - | - | 2.86 | 87 | 13 |
| 54 | 7.36 | 0.12 | - | - | 2.46 | 89 | 11 |
| 60 | 7.00 | 0.12 | - | - | 2.00 | 89 | 11 |

ตารางที่ 17(ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลฟรักโทส กรดวาลेरริก และแอมโมเนียมซัลเฟต และ การผลิต P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักเมื่อใช้ ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร

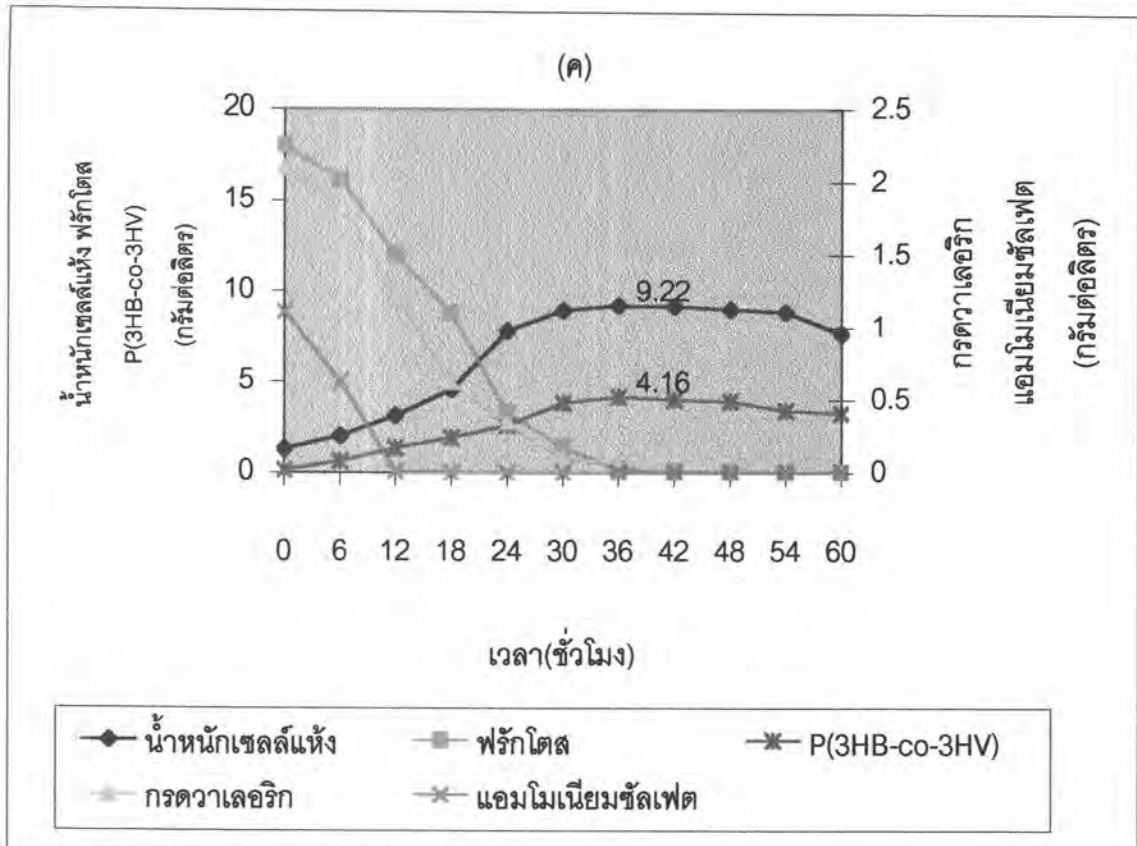
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาลेरริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.71 | 18.01 | 1.96 | 1.02 | 0.32 | 100 | 0 |
| 6 | 2.78 | 15.26 | 1.73 | 0.64 | 0.71 | 99 | 1 |
| 12 | 3.79 | 12.89 | 1.28 | 0.31 | 1.31 | 98 | 2 |
| 18 | 4.98 | 7.63 | 0.77 | 0.12 | 2.49 | 90 | 10 |
| 24 | 8.76 | 5.62 | 0.53 | - | 3.32 | 89 | 11 |
| 30 | 9.44 | 3.22 | 0.19 | - | 4.84 | 87 | 13 |
| 36 | 9.30 | 0.21 | 0.02 | - | 4.31 | 87 | 13 |
| 42 | 9.02 | 0.17 | - | - | 4.11 | 89 | 11 |
| 48 | 9.00 | 0.17 | - | - | 4.02 | 87 | 13 |
| 54 | 8.61 | 0.16 | - | - | 3.72 | 87 | 13 |
| 60 | 8.43 | 0.13 | - | - | 3.41 | 89 | 11 |

ตารางที่ 17(ค) น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลฟรักโทส กรดวาเลอริก และแอมโมเนียมซัลเฟต และ การผลิต P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักเมื่อใช้ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร

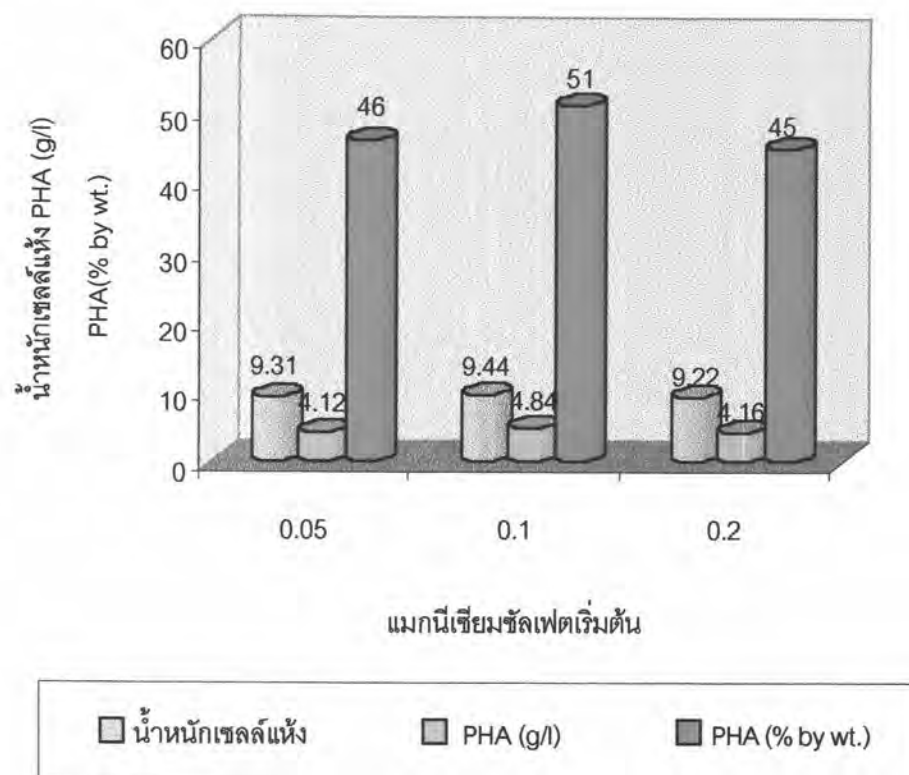
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.69 | 18.02 | 2.10 | 1.11 | 0.14 | 100 | 0 |
| 6 | 2.02 | 16.17 | 1.83 | 0.62 | 0.62 | 99 | 1 |
| 12 | 3.14 | 12.05 | 1.24 | 0.01 | 1.36 | 97 | 3 |
| 18 | 4.57 | 8.80 | 0.62 | - | 1.93 | 89 | 11 |
| 24 | 7.82 | 3.35 | 0.35 | - | 2.61 | 87 | 13 |
| 30 | 8.94 | 1.44 | 0.11 | - | 3.83 | 88 | 12 |
| 36 | 9.22 | 0.22 | 0.06 | - | 4.16 | 86 | 12 |
| 42 | 9.20 | 0.05 | - | - | 4.02 | 88 | 12 |
| 48 | 9.00 | 0.05 | - | - | 3.92 | 88 | 12 |
| 54 | 8.87 | 0.04 | - | - | 3.44 | 88 | 12 |
| 60 | 7.65 | 0.04 | - | - | 3.26 | 88 | 12 |



รูปที่ 22 การเจริญ และการผลิต PHA เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก มีแมกนีเซียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ (ก) 0.05 กรัมต่อลิตร (ข) 0.1 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 22(ต่อ) การเจริญ และการผลิต PHA เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก มี แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ (ค) 0.2 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 23 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ โคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยแปรผันปริมาณแมกนีเซียมเริ่มต้น เท่ากับ 0.05 0.1 และ 0.2 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.05-0.2 กรัมต่อลิตร

| MgSO ₄ (กรัมต่อลิตร) | เวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | PHA (% by wt.) | Productivity (g/L.h) |
|------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------------|
| 0.05 | 36 | 9.31 | 4.12 | 46 | 0.14 |
| 0.1 | 30 | 9.44 | 4.84 | 51 | 0.16 |
| 0.2 | 36 | 9.22 | 4.16 | 45 | 0.12 |

2.7 ผลของปริมาณอากาศต่อการเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV)

ปริมาณอากาศที่ละลายอยู่ในน้ำหมักระหว่างกระบวนการหมัก มีความจำเป็นอย่างมากสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ และการสร้างผลิตภัณฑ์ สำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ได้พบว่าปริมาณอากาศมีผลต่อวิธีการสังเคราะห์และการผลิต ซึ่ง Lefebure (1997) ได้ศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนต่อการผลิต P(3HB-co-3HV) จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 จากแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคสและไซเคียมโพธิโอเนต เมื่อมีการจำกัดปริมาณของออกซิเจนให้ต่ำในช่วงระหว่างที่เชื่อมีการสะสมโคพอลิเมอร์ พบว่ามีผลต่อการผลิตโมโนเมอร์ 3HV แต่ในเชื้อ *Azotobacter beijerinckii* การจำกัดปริมาณออกซิเจนมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ β -ketothiolase และ acetoacetyl-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในวิธีการสังเคราะห์ PHB ลดลง การจำกัดปริมาณออกซิเจนจึงไม่เป็นผลต่อการผลิตพอลิเมอร์ (Carter และ Dawes, 1979) งานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของปริมาณอากาศในน้ำหมักต่อการเจริญและการผลิตโคพอลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) จากผลการศึกษาของ ชนัญ ผลประไพ(2536) ได้รายงานถึงผลการให้อากาศต่อการผลิต PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04 พบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100 80 70 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาเริ่มต้นของการเลี้ยง ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่ใกล้เคียงกัน แต่มีผลโดยตรงกับการผลิต PHB ดังนั้นจึงศึกษาภาวะเดียวกันโดยใช้ค่าอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศเท่ากับที่รายงานไว้โดย ชนัญ ผลประไพ ติดตามการเจริญ การใช้น้ำตาลฟรักโตส การใช้กรควาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟต และการผลิต P(3HB-co-3HV)

ผลการวิจัยพบว่า การเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) ของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อมีการให้อากาศในอัตราสูง คือที่ อัตราการกวน 600 rpm. อัตราการให้อากาศ 1.8 vvm. การเจริญเป็นไปอย่างรวดเร็วได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 10.91 กรัมต่อลิตร ผลิต P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 5.94 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 การใช้น้ำตาลฟรักโตสก็เป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยน้ำตาลฟรักโตสถูกใช้หมดประมาณชั่วโมงที่ 52 ส่วนกรควาเลอริก ก็เป็นไปในทำนองเดียวกันคือถูกใช้หมดภายในชั่วโมงที่ 36 และแอมโมเนียมซัลเฟตถูกใช้หมดในชั่วโมงที่ 24 สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HB และ 3HV ที่ผลิตได้ เท่ากับ 83 และ 17 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 19 และรูปที่ 24 ส่วนการเลี้ยงเชื้อโดยให้อากาศปริมาณต่ำกว่า โดยใช้อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ เท่ากับ 300 rpm. และ 0.6 vvm. ถึง 200 rpm. และ 1.6 vvm. พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด และปริมาณ โคพอลิเมอร์

สูงสุดใกล้เคียงกัน คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 9.90 และ 10.64 กรัมต่อลิตร และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุด เท่ากับ 4.24 และ 4.26 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 40 และ 43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการทดลองที่ให้อากาศปริมาณต่ำสุดคือ อัตราการกวนเท่ากับ 200 rpm. อัตราการให้อากาศ เท่ากับ 0.2 vvm. พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดต่ำกว่าทุก การทดลอง จากตารางที่ 20 และรูปที่ 25 สรุปได้ว่า เมื่อการให้อากาศสูงสุดทำให้ได้น้ำหนัก เซลล์แห้งสูงสุดและการผลิตโคพอลิเมอร์ได้สูงสุด เท่ากับ 10.91 และ 5.94 กรัมต่อลิตร (คิด เป็น 54 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ โดยได้อัตราการผลิต เท่ากับ 0.17

ตารางที่ 19(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลฟรักโทส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำ หมัก และ P(3HB-co-3HV) ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก โดยมีการให้อากาศ เท่ากับ 200 rpm. และ 0.2 vvm.

| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.73 | 18.10 | 2.17 | 1.05 | 0.22 | 100 | 0 |
| 6 | 1.99 | 17.75 | 2.11 | 0.85 | 0.25 | 98 | 2 |
| 12 | 2.10 | 17.68 | 1.86 | 0.68 | 0.31 | 94 | 6 |
| 18 | 3.11 | 15.17 | 1.32 | 0.37 | 0.50 | 91 | 9 |
| 24 | 5.76 | 12.59 | 0.41 | 0.10 | 0.81 | 86 | 14 |
| 30 | 7.48 | 8.50 | 0.15 | 0.00 | 0.97 | 80 | 20 |
| 36 | 7.92 | 7.04 | 0.06 | - | 1.82 | 80 | 20 |
| 42 | 8.76 | 5.17 | - | - | 2.46 | 80 | 20 |
| 48 | 9.56 | 3.23 | - | - | 3.14 | 87 | 13 |
| 52 | 9.21 | 1.01 | - | - | 3.55 | 88 | 14 |
| 60 | 9.22 | 0.16 | - | - | 3.72 | 90 | 10 |

ตารางที่ 19(ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลฟรักโทส กรดวาลเอร์ริก แอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และ P(3HB-co-3HV) ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก โดยมีการให้อากาศ เท่ากับ 200 rpm. และ 1.6 vvm.

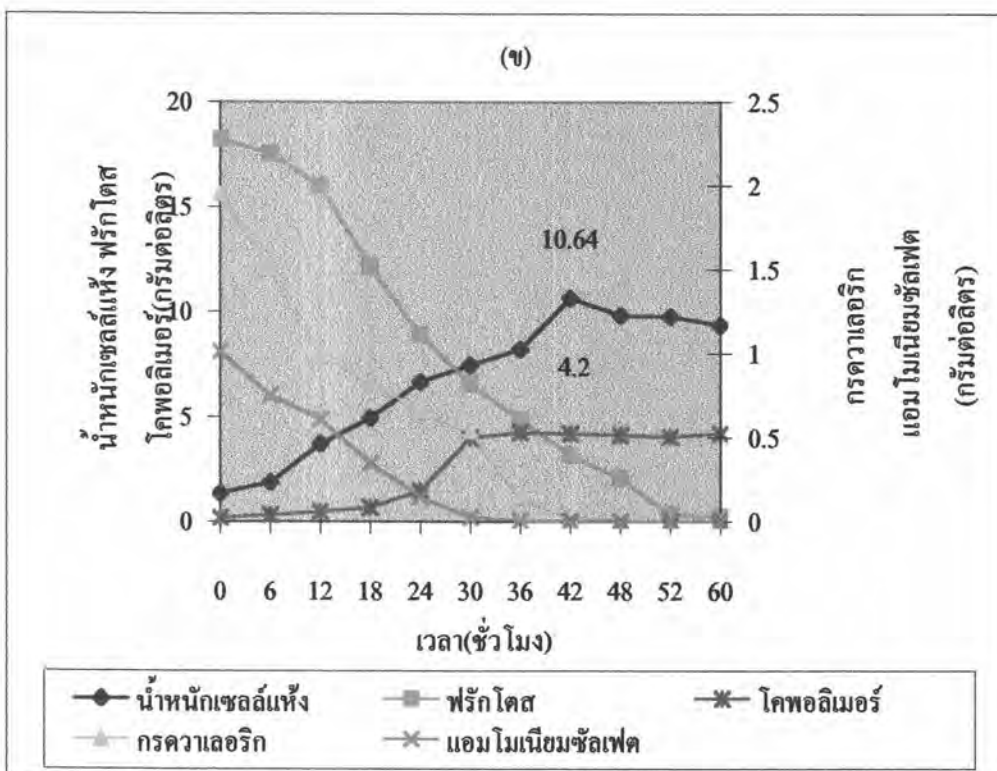
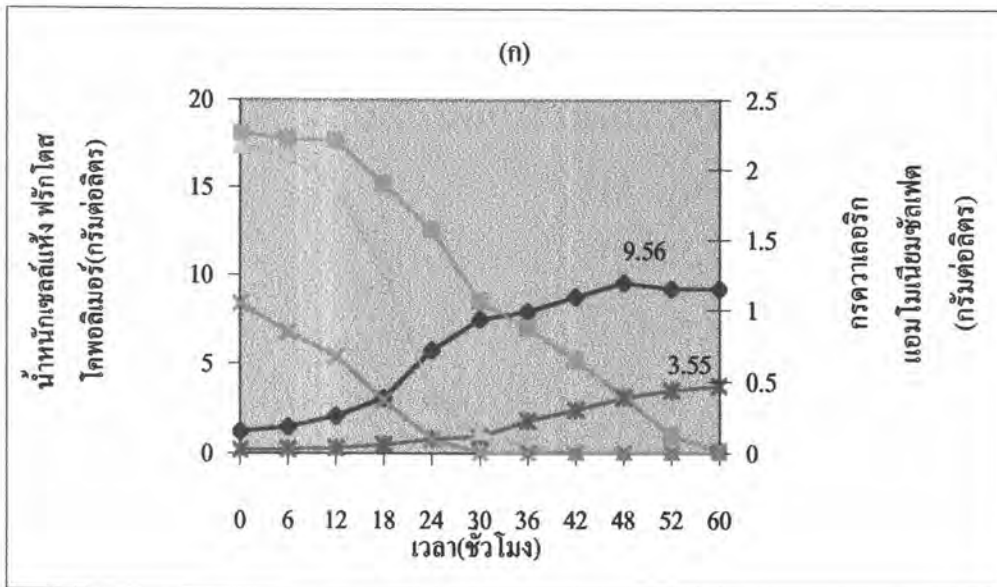
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาลเอร์ริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.74 | 18.22 | 1.95 | 1.01 | 0.15 | 100 | 0 |
| 6 | 1.88 | 17.55 | 1.51 | 0.75 | 0.32 | 96 | 4 |
| 12 | 3.71 | 16.01 | 1.00 | 0.61 | 0.48 | 92 | 8 |
| 18 | 4.93 | 12.15 | 0.83 | 0.35 | 0.68 | 87 | 13 |
| 24 | 6.66 | 8.90 | 0.66 | 0.15 | 1.47 | 88 | 13 |
| 30 | 7.46 | 6.60 | 0.54 | 0.02 | 4.01 | 85 | 15 |
| 36 | 8.20 | 4.89 | 0.15 | 0.01 | 4.26 | 83 | 17 |
| 42 | 10.64 | 3.18 | 0.03 | - | 4.20 | 83 | 17 |
| 48 | 9.82 | 2.08 | - | - | 4.12 | 87 | 13 |
| 52 | 9.77 | 0.34 | - | - | 4.05 | 88 | 12 |
| 60 | 9.34 | 0.24 | - | - | 4.21 | 89 | 11 |

ตารางที่ 19(ค) น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลฟรักโทส กรดวาลเอร์ริก แอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และ P(3HB-co-3HV) ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีการให้อากาศ เท่ากับ 300 rpm และ 0.6 vvm.

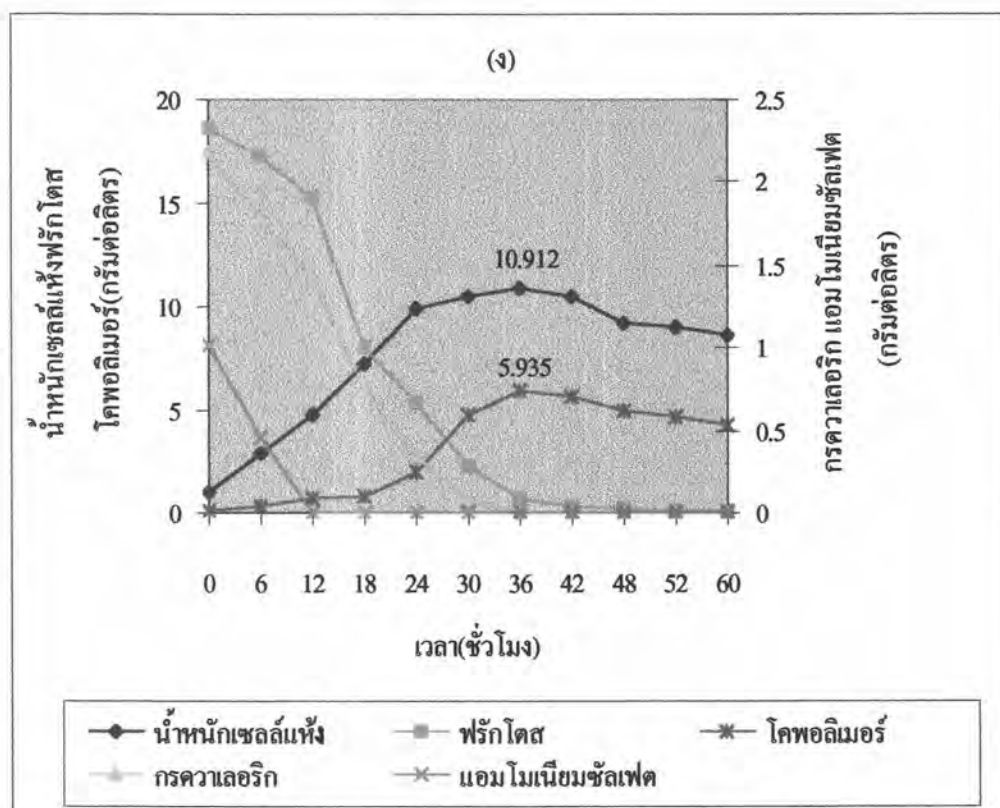
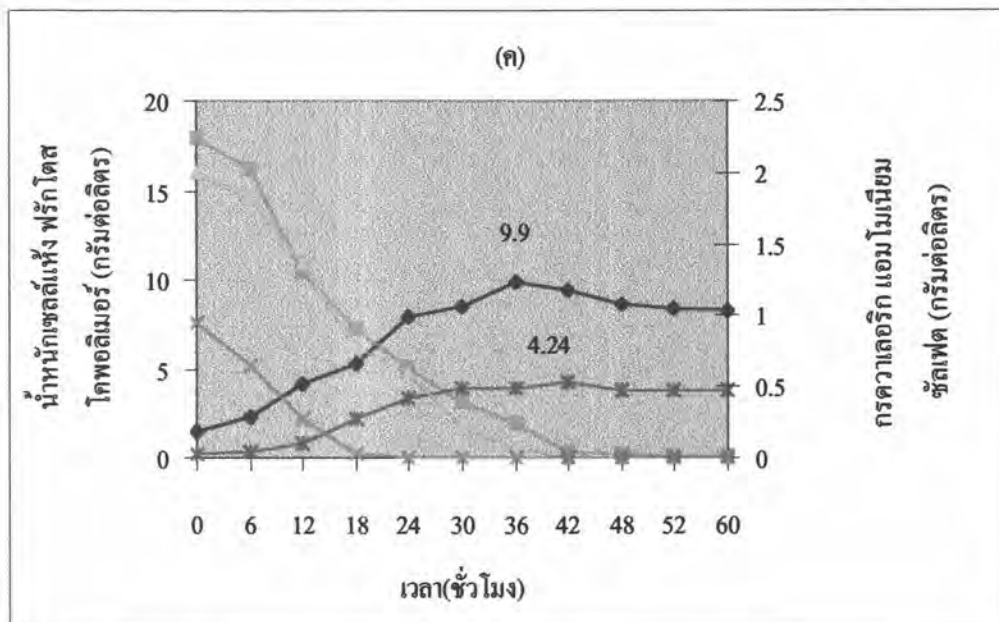
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาลเอร์ริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.77 | 17.93 | 1.99 | 0.95 | 0.25 | 100 | 0 |
| 6 | 2.35 | 16.16 | 1.83 | 0.65 | 0.38 | 96 | 4 |
| 12 | 4.16 | 10.42 | 1.37 | 0.28 | 0.84 | 91 | 9 |
| 18 | 5.23 | 7.26 | 0.78 | 0.02 | 2.17 | 86 | 14 |
| 24 | 7.98 | 5.06 | 0.61 | 0.01 | 3.32 | 85 | 15 |
| 30 | 8.54 | 3.08 | 0.22 | 0.00 | 3.93 | 85 | 15 |
| 36 | 9.90 | 1.90 | 0.09 | - | 3.95 | 84 | 16 |
| 42 | 9.48 | 0.34 | - | - | 4.24 | 88 | 12 |
| 48 | 8.66 | 0.18 | - | - | 3.81 | 89 | 11 |
| 52 | 8.42 | 0.11 | - | - | 3.75 | 92 | 8 |
| 60 | 8.28 | 0.08 | - | - | 3.79 | 92 | 8 |

ตารางที่ 19(ง) น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลฟรักโทส กรดวาลेरริก แอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก และ P(3HB-co-3HV) ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีการให้อากาศ เท่ากับ 600 rpm. และ 1.8 vvm.

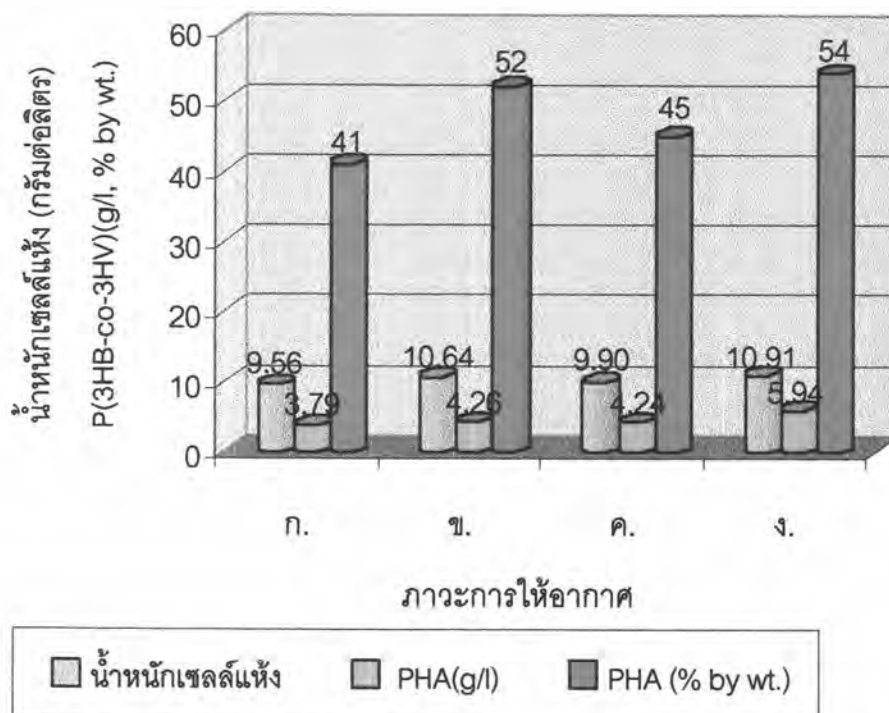
| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | กรดวาลेरริก (กรัมต่อลิตร) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.72 | 18.12 | 2.18 | 1.01 | 0.14 | 100 | 0 |
| 6 | 2.88 | 16.26 | 1.78 | 0.46 | 0.25 | 96 | 4 |
| 12 | 6.74 | 12.59 | 1.43 | 0.00 | 1.60 | 91 | 9 |
| 18 | 7.22 | 8.06 | 0.76 | - | 2.80 | 87 | 13 |
| 24 | 9.86 | 5.38 | 0.35 | - | 3.02 | 86 | 14 |
| 30 | 10.53 | 2.23 | 0.08 | - | 4.73 | 85 | 15 |
| 36 | 10.91 | 0.66 | - | - | 5.94 | 85 | 15 |
| 42 | 10.46 | 0.28 | - | - | 5.65 | 88 | 12 |
| 48 | 9.22 | 0.19 | - | - | 4.99 | 89 | 11 |
| 52 | 9.05 | 0.10 | - | - | 4.68 | 89 | 11 |
| 60 | 8.63 | 0.05 | - | - | 4.26 | 90 | 10 |



รูปที่ 24 การเจริญและการสะสม PHA เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยใช้
 (ก) อัตราการกวน 200 rpm. อัตราการให้อากาศ 0.2 vvm. (ข) อัตราการกวน 200 rpm.
 อัตราการให้อากาศ 1.6 vvm



รูปที่ 24 (ต่อ) การเจริญและการสะสม PHA เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักโดยใช้
 (ค) อัตราการกวน 300 rpm. อัตราการให้อากาศ 0.6 vvm. (ง) อัตราการกวน 600 rpm.
 อัตราการให้อากาศ 1.8 vvm.



รูปที่ 25 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลลส์แห้ง และปริมาณ โพลีเมอร์ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยแปรผันการให้อากาศ

หมายเหตุ ก. 200 rpm และ 0.2 vvm. ข. 200 rpm. และ 1.6 vvm.
ค. 300 rpm. และ 0.6 vvm. ง. 600 rpm. และ 1.8 vvm.

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยแปรผันปริมาณอากาศ

| ภาวะการให้อากาศ | เวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลลส์ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | PHA (% by wt.) | Productivity (g/L.h) |
|-----------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------|----------------------|
| ก. | 48 | 9.56 | 3.79 | 41 | 0.06 |
| ข. | 42 | 10.64 | 4.26 | 52 | 0.12 |
| ค. | 36 | 9.90 | 4.24 | 45 | 0.10 |
| ง. | 36 | 10.91 | 5.94 | 54 | 0.17 |

หมายเหตุ ก. 200 rpm และ 0.2 vvm. ข. 200 rpm. และ 1.6 vvm.
ค. 300 rpm. และ 0.6 vvm. ง. 600 rpm. และ 1.8 vvm.

3. การเพิ่มอัตราการผลิต P(3HB-co-3HV) ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยวิธีการเลี้ยงแบบเฟดแบช

3.1 ผลของอัตราส่วน C/N ต่อการเจริญและการผลิต P(3HB-co-3HV)

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ ต้องการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ให้มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ในด้านปริมาณต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร) และอัตราการผลิต ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ความหนาแน่นเซลล์สูงๆจึงทำให้ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณสูงขึ้นรวมทั้งใช้เวลาในการผลิตสั้นลง การมีสารอาหารเริ่มต้นปริมาณคงที่ในระบบการเลี้ยงเชื้อแบบแบช ตลอดจนการมีสารเมตาบอไลต์ (รวมทั้งสารที่อาจมีพิษต่อเซลล์) ที่เพิ่มมากขึ้นหลังการเจริญ ทำให้การเลี้ยงแบบแบชมีข้อจำกัดที่จะทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงๆ ดังจะเห็นได้จากในการทดลองข้างต้น เมื่อสารอาหารเริ่มต้นถูกใช้หมดไป ทำให้กิจกรรมของจุลินทรีย์ลดลง เป็นผลให้การเจริญโดยรวมของจุลินทรีย์หยุด น้ำหนักเซลล์แห้งและการผลิตโคพอลิเมอร์จึงไม่เพิ่มขึ้น การเลี้ยงจุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณเซลล์สูงๆจึงถูกจำกัด การเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชซึ่งมีการเติมสารอาหารสามารถควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) Yamane และ Shimizu (1984) ได้รายงานว่ากระบวนการหมักแบบเฟดแบชสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ให้สูงขึ้น เพราะเป็นระบบที่สามารถเติมอาหารตามความต้องการ ได้จึงไม่มีผลของปริมาณสารอาหารที่สูงเกินไปจนทำให้มีการยับยั้งการเจริญของเซลล์ รูปแบบการเติมอาหารของการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชก็มีแตกต่างกันแล้วแต่วัตถุประสงค์ของงาน ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการเติมอาหารแบบปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไป (variable volume) แต่ใช้อัตราการเติมอาหารที่คงที่ (Scragg, 1991) ด้วยการนำค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้จากการเลี้ยงแบบแบช ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ดังการทดลองที่ผ่านมา มาใช้สำหรับภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชดังแสดงในตารางที่ 21 ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการทดลองที่มีภาวะการให้อากาศ 600 rpm. 1.8 vvm.

Ryu และคณะ(1996) ได้เปรียบเทียบการผลิต PHB โดยวิธีเฟดแบชของ *A. eutrophus* ที่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจน กับงานวิจัยที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนปริมาณเล็กน้อยขณะการเลี้ยง และจำกัดปริมาณฟอสเฟต ได้พบอัตราการผลิต PHB สูงกว่าโดย Rhee และคณะ(1993) ได้ทำการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. SH-69 เพื่อผลิต P(3HB-co-3HV)

โดยการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าหลังจากการเจริญของเซลล์ชั่วโมงที่ 20 โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 35 กรัมต่อลิตร ได้เติมสารละลาย

ตารางที่ 21 แสดงองค์ประกอบหลักของสารอาหารเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อ ภาวะที่เหมาะสม และพารามิเตอร์ที่ได้จากการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อผลิต P(3HB-co-3HV) แบบแบช

| | |
|---|------------------------------|
| ฟรักโทส : กรดวาเลอริก | 18 : 2 กรัมต่อลิตร |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.0 กรัมต่อลิตร |
| อุณหภูมิจ | 30 องศาเซลเซียส |
| ความเป็นกรดค่า | 7.0 |
| อัตราการให้อากาศ | 1.8 vvm. |
| อัตราการกวน | 600 rpm. |
| ปริมาณกล้ำเชื้อ | 1.7 กรัมต่อลิตร |
| ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ(V) | 2000 มิลลิลิตร |
| *อัตราการเจริญจำเพาะ(μ) | 0.1 ชั่วโมง ⁻¹ |
| *yield ($Y_{x/s}$) | 0.65 กรัมเซลล์ต่อกรัมคาร์บอน |
| *Xr | 4.97 กรัมต่อลิตร |

หมายเหตุ : * เป็นค่าที่ได้จากการทดลองที่มีภาวะการให้อากาศ 600 rpm. 1.8 vvm.

แอมโมเนียมซัลเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมกับการเติมกลูโคส เพื่อรักษาอัตราส่วนของกลูโคสต่อแอมโมเนียม (C/N ratio) ไว้ที่ 4.3 14.3 และ 23.1 โมลต่อโมล ผลที่ได้คือเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีอัตราส่วนของ C/N สูง (ปริมาณแอมโมเนียมต่ำ) ได้ให้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูง ดังนั้นการวิจัยนี้ต้องการศึกษาผลของอัตราส่วน C/N ดังนี้คือ C/N เท่ากับ 5 50 100 200 และ 300 โมล และได้เติมสารอาหารที่มีทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เวลาชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ (เนื่องจากการทดลองศึกษาในการเลี้ยงแบบแบช ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตได้หมดลงในชั่วโมงที่ 12) และได้เติมสารละลาย

สำหรับเลี้ยงเชื้อดั่งรายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 6.1 ทุกๆ 6 ชั่วโมง แล้วได้ติดตามการเจริญ และการผลิตโคพอลิเมอร์

ผลการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 22 และได้พบว่า เมื่อเติมสารอาหารเฉพาะแหล่งคาร์บอน ได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเพิ่มขึ้น จากการเลี้ยงเชื้อแบบแบช โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 12.52 กรัมต่อลิตร ที่ 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.18 ต่อชั่วโมง ที่เวลา 6 ชั่วโมง ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นเป็น 7.55 กรัมต่อลิตร โดยมีสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV สูงขึ้น เป็น 30 โมลเปอร์เซ็นต์ การทดลองที่มีการเติมสารอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 5 โมลต่อโมล มีการเจริญสูงสุดได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 14.77 กรัมต่อลิตร และได้ P(3HB-co-3HV) สูงสุด 3.90 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 42 โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.10 ต่อชั่วโมง ที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อเติมสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 50 โมลต่อโมล ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 12.46 กรัมต่อลิตร และได้ P(3HB-co-3HV) 4.03 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 เมื่ออัตราส่วน C/N โมลต่อโมล เท่ากับ 100 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 12.66 กรัมต่อลิตร ค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.15 ต่อชั่วโมง ปริมาณ P(3HB-co-3HV) เพิ่มขึ้นเป็น 7.89 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 เมื่อให้อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 200 โมลต่อโมล ได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 36 ลดลงเป็น 11.12 กรัมต่อลิตร ค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.10 ต่อชั่วโมง ปริมาณ P(3HB-co-3HV) ลดลงเป็น 6.92 กรัมต่อลิตร และเมื่อให้อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 300 โมลต่อโมล ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 36 คือ 11.85 กรัมต่อลิตร และปริมาณ P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 6.58 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 42 ในการทดลองที่มีการเติมสารอาหารทั้งแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน พบว่า สัดส่วนของ 3HV สูงสุด ใกล้เคียงกัน (8-16) ซึ่งต่ำกว่าในการทดลองที่เติมเฉพาะแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ส่วนการทดลองที่ทำการเติมอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลฟรักโตส กับกรควาเสอริกให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 13.52 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 7.55 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 36 เช่นกัน สรุปผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 23 และรูปที่ 27 โดยสรุปว่าเมื่อควบคุมการเติมสารอาหารที่มีอัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 100 โมลต่อโมล พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุด เท่ากับ 12.67 และ 7.90 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 62 และอัตราผลผลิต เท่ากับ 0.22

ตารางที่ 22(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโทส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือในน้ำหมัก และปริมาณP(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 แบบเฟดแบช และเติมสารอาหารเฉพาะหลังการบอาน

| เวลา (ชั่วโมง) | CDW (กรัมต่อลิตร) | μ (ชั่วโมง ⁻¹) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | | PHA (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|----------------------|-----------------------------------|--------------------------|----------|------------------------------|----------|--|----------|----------------------|--------------------------------------|-----------|
| | | | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.73 | - | 18.12 | - | 2.03 | - | 1.32 | - | 0.47 | 100 | 0 |
| 6 | 4.98 | 0.18 | 16.18 | - | 1.87 | - | 0.61 | - | 1.27 | 93 | 7 |
| 12 | 8.15 | 0.08 | 9.11 | 14.86 | 1.25 | 2.17 | 0.02 | - | 2.47 | 89 | 11 |
| 18 | 10.66 | 0.07 | 8.89 | 12.64 | 1.06 | 2.14 | 0.00 | - | 3.48 | 91 | 9 |
| 24 | 11.15 | 0.01 | 7.53 | 12.18 | 0.67 | 1.76 | - | - | 5.52 | 85 | 15 |
| 30 | 12.48 | 0.00 | 6.96 | 12.67 | 0.75 | 2.24 | - | - | 6.71 | 83 | 17 |
| 36 | 12.52 | 0.00 | 7.34 | 13.12 | 0.97 | 2.20 | - | - | 7.55 | 76 | 24 |
| 42 | 12.47 | 0.00 | 6.35 | 12.82 | 1.43 | 2.37 | - | - | 7.12 | 75 | 25 |
| 48 | 12.54 | 0.00 | 6.28 | 13.47 | 1.51 | 2.43 | - | - | 7.06 | 70 | 30 |
| 54 | 12.48 | -0.00 | 5.62 | 12.01 | 1.46 | 2.63 | - | - | 6.86 | 78 | 22 |
| 60 | 12.52 | 0.00 | 5.42 | 12.00 | 1.23 | 2.17 | - | - | 6.57 | 77 | 22 |

ตารางที่ 22(ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโทส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือในน้ำหมัก และปริมาณP(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 แบบเปิดแบบ และเติมสารอาหารที่มีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 5 โมลต่อโมล

| เวลา (ชั่วโมง) | CDW (กรัมต่อลิตร) | μ (ชั่วโมง ⁻¹) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | | P(3HB-co-3HV) (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|----------------------|-----------------------------------|--------------------------|----------|------------------------------|----------|--|----------|--------------------------------|--------------------------------------|----------|
| | | | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.67 | - | 18.14 | - | 2.10 | - | 0.91 | - | 0.27 | 100 | 0 |
| 6 | 2.19 | 0.05 | 15.13 | - | 1.47 | - | 0.51 | - | 0.78 | 97 | 3 |
| 12 | 4.58 | 0.12 | 10.06 | 17.46 | 0.76 | 1.64 | 0.0 | 1.26 | 1.67 | 96 | 4 |
| 18 | 8.47 | 0.10 | 10.63 | 16.25 | 0.45 | 1.37 | 0.0 | 1.40 | 1.98 | 93 | 7 |
| 24 | 10.27 | 0.03 | 6.53 | 15.47 | 0.51 | 1.43 | 0.0 | 1.22 | 2.33 | 93 | 7 |
| 30 | 13.46 | 0.05 | 5.46 | 15.26 | 0.41 | 1.68 | 0.0 | 1.53 | 3.85 | 92 | 8 |
| 36 | 14.17 | 0.01 | 4.01 | 16.15 | 0.33 | 1.36 | 0.0 | 1.68 | 3.81 | 92 | 8 |
| 42 | 14.77 | 0.01 | 3.63 | 17.25 | 0.36 | 1.46 | 0.0 | 2.05 | 3.85 | 96 | 4 |
| 48 | 14.62 | -0.00 | 5.10 | 16.25 | 0.44 | 1.62 | 0.0 | 1.98 | 3.90 | 95 | 5 |
| 54 | 13.26 | -0.02 | 6.37 | 16.26 | 0.65 | 1.69 | 0.0 | 2.14 | 3.14 | 94 | 6 |
| 60 | 12.41 | -0.01 | 7.46 | 18.09 | 0.82 | 1.86 | 0.0 | 2.37 | 3.24 | 95 | 5 |

ตารางที่ 22(ค) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟริกโตส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือในน้ำหมัก และปริมาณ P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 แบบเฟดแบช และเติมสารอาหารที่มีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 50 โมลต่อโมล

| เวลา (ชั่วโมง) | CDW (กรัมต่อลิตร) | μ (ชั่วโมง ⁻¹) | ฟริกโตส (กรัมต่อลิตร) | | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | | P(3HB-co-3HV) (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------|----------|------------------------------|----------|--|----------|--------------------------------|--------------------------------------|-----------|
| | | | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.68 | - | 18.47 | - | 1.97 | - | 1.15 | - | 0.14 | 97 | 3 |
| 6 | 2.71 | 0.08 | 15.52 | - | 1.64 | - | 0.62 | - | 0.68 | 95 | 5 |
| 12 | 4.86 | 0.10 | 10.06 | 16.06 | 0.95 | 1.87 | 0.0 | 0.21 | 1.31 | 90 | 10 |
| 18 | 8.45 | 0.10 | 10.62 | 15.46 | 0.67 | 1.53 | 0.0 | 0.17 | 1.78 | 91 | 9 |
| 24 | 10.15 | 0.03 | 6.52 | 16.43 | 0.52 | 1.61 | 0.0 | 0.35 | 2.42 | 89 | 11 |
| 30 | 11.24 | 0.01 | 5.45 | 17.43 | 0.57 | 1.68 | 0.0 | 0.24 | 3.82 | 90 | 10 |
| 36 | 12.46 | 0.02 | 4.01 | 17.65 | 0.49 | 1.54 | 0.0 | 0.15 | 4.03 | 90 | 10 |
| 42 | 12.24 | -0.00 | 5.11 | 18.76 | 0.57 | 1.63 | 0.0 | 0.28 | 3.91 | 90 | 10 |
| 48 | 11.88 | -0.01 | 5.70 | 18.25 | 0.85 | 1.74 | 0.0 | 0.31 | 3.82 | 89 | 11 |
| 54 | 11.57 | -0.00 | 7.65 | 19.15 | 0.84 | 1.74 | 0.0 | 0.33 | 4.01 | 86 | 14 |
| 60 | 11.24 | -0.01 | 8.39 | 20.15 | 0.61 | 1.75 | 0.0 | 0.36 | 3.73 | 92 | 8 |

ตารางที่ 22(ง) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโทส กรดวาลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตที่เกลือในน้ำหมัก และปริมาณ P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 แบบพดแบบและเติมสารอาหารที่มีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 100 โมลต่อโมล

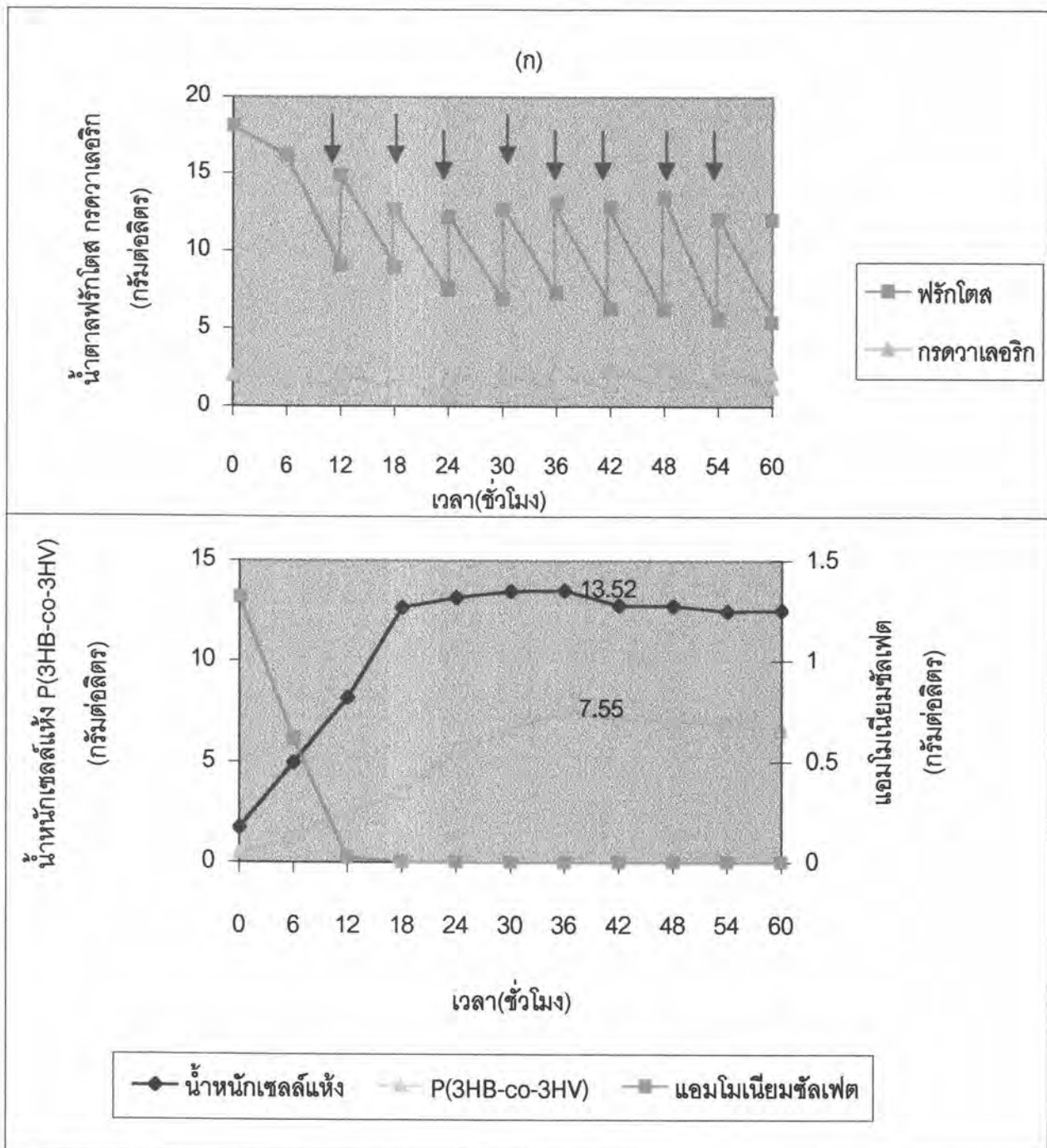
| เวลา (ชั่วโมง) | CDW (กรัมต่อลิตร) | μ (ชั่วโมง ⁻¹) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | | กรดวาลอริก (กรัมต่อลิตร) | | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | | P(3HB-co-3HV) (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|----------------------|-----------------------------------|--------------------------|----------|-----------------------------|----------|--|----------|--------------------------------|--------------------------------------|-----------|
| | | | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.68 | - | 17.91 | - | 2.19 | - | 1.0 | - | 0.39 | 99 | 1 |
| 6 | 3.41 | 0.12 | 15.75 | - | 1.67 | - | 0.00 | - | 0.92 | 96 | 4 |
| 12 | 8.17 | 0.15 | 11.66 | 16.75 | 0.94 | 1.86 | 0.00 | 0.15 | 1.23 | 91 | 9 |
| 18 | 9.11 | 0.02 | 10.58 | 15.77 | 0.72 | 1.73 | 0.00 | 0.12 | 2.46 | 85 | 15 |
| 24 | 11.46 | 0.04 | 11.34 | 16.27 | 0.67 | 1.84 | 0.00 | 0.27 | 4.76 | 84 | 16 |
| 30 | 12.45 | 0.01 | 10.67 | 16.75 | 0.75 | 1.88 | 0.00 | 0.16 | 5.36 | 85 | 15 |
| 36 | 12.66 | -0.00 | 10.98 | 17.22 | 0.84 | 1.96 | 0.00 | 0.17 | 7.89 | 86 | 14 |
| 42 | 12.12 | -0.01 | 10.35 | 17.63 | 0.76 | 1.67 | 0.00 | 0.15 | 6.43 | 87 | 13 |
| 48 | 11.77 | -0.01 | 10.51 | 18.52 | 0.98 | 2.08 | 0.00 | 0.18 | 5.14 | 85 | 15 |
| 54 | 11.68 | -0.00 | 9.15 | 18.45 | 1.11 | 2.78 | 0.00 | 0.19 | 4.89 | 85 | 15 |
| 60 | 11.58 | -0.00 | 10.42 | 18.76 | 0.92 | 2.37 | 0.00 | 0.22 | 4.72 | 85 | 15 |

ตารางที่ 22(จ) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโทส ความเป็นกรดอมิโน ปริมาณฟอสเฟตที่เหลือในน้ำหมัก และปริมาณ P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 แบบเฟดแบช และเติมสารอาหารที่มีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200 โมลต่อโมล

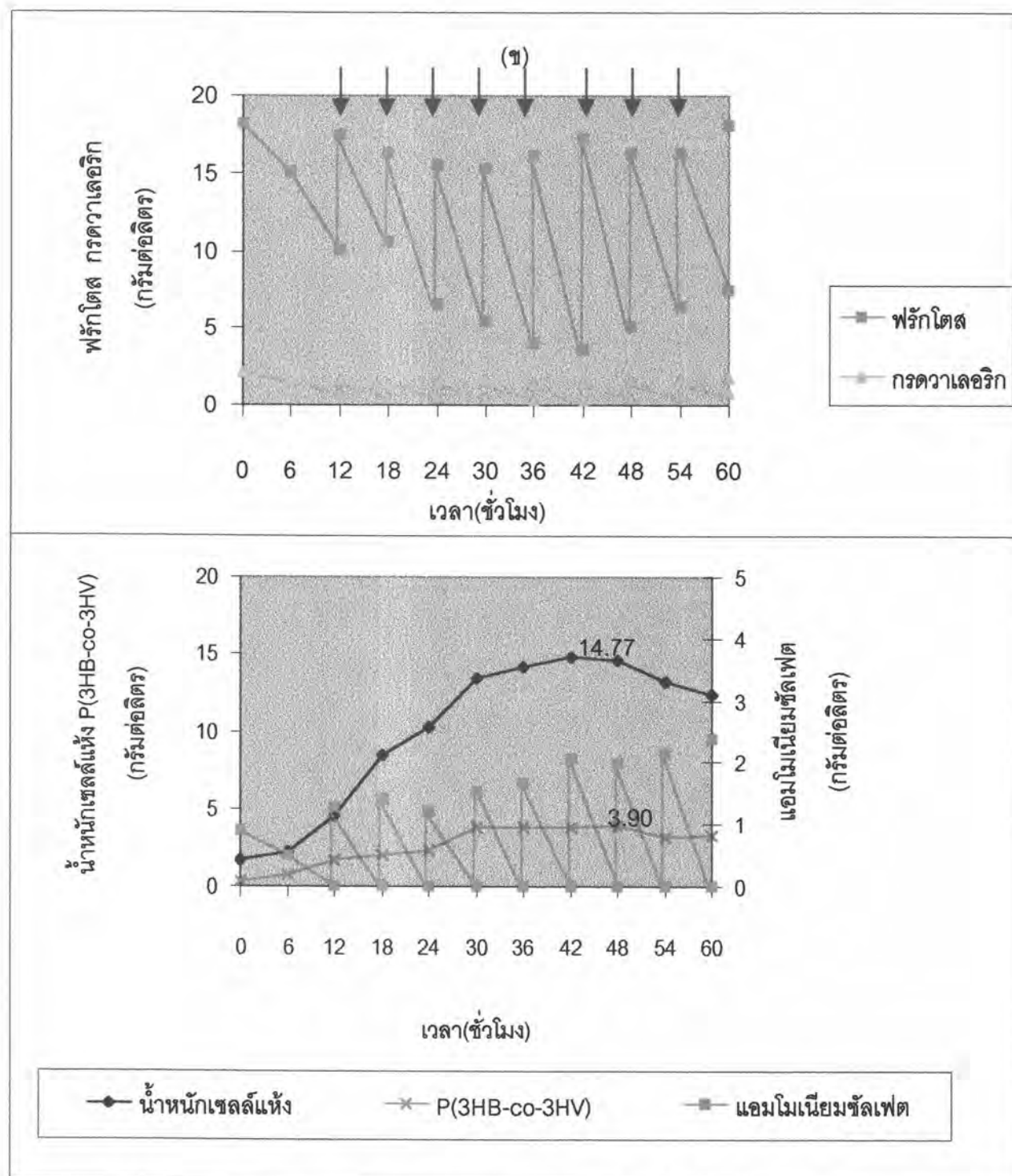
| เวลา (ชั่วโมง) | CDW (กรัมต่อลิตร) | μ (ชั่วโมง ⁻¹) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | | P(3HB-co-3HV) (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------|----------|------------------------------|----------|--|----------|--------------------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.75 | - | 18.59 | - | 2.04 | - | 1.06 | - | 0.38 | 100 | 0 |
| 6 | 3.14 | 0.1 | 15.39 | - | 1.83 | - | 0.64 | - | 1.29 | 94 | 6 |
| 12 | 5.04 | 0.08 | 12.30 | 16.52 | 1.01 | 1.95 | 0.00 | 0.06 | 2.46 | 93 | 7 |
| 18 | 8.43 | 0.09 | 9.81 | 16.22 | 1.18 | 2.07 | 0.00 | 0.05 | 2.94 | 91 | 9 |
| 24 | 9.48 | 0.03 | 7.13 | 16.02 | 1.37 | 2.26 | 0.00 | 0.06 | 3.97 | 92 | 8 |
| 30 | 9.78 | 0.01 | 6.69 | 17.54 | 1.01 | 2.13 | 0.00 | 0.06 | 4.18 | 91 | 9 |
| 36 | 11.12 | 0.02 | 6.79 | 16.29 | 0.97 | 2.05 | 0.00 | 0.07 | 6.92 | 89 | 11 |
| 42 | 10.00 | -0.02 | 7.48 | 15.98 | 1.33 | 2.16 | 0.00 | 0.07 | 6.83 | 87 | 13 |
| 48 | 9.79 | -0.01 | 8.18 | 16.46 | 1.28 | 2.47 | 0.00 | 0.07 | 5.95 | 88 | 12 |
| 54 | 9.66 | -0.00 | 8.57 | 16.88 | 1.34 | 2.38 | 0.0 | 0.07 | 5.32 | 88 | 12 |
| 60 | 9.57 | -0.00 | 8.67 | 17.07 | 1.62 | 2.52 | 0.00 | 0.07 | 5.97 | 90 | 10 |

ตารางที่ 22(ล) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโทส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือในน้ำหมัก และปริมาณ P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 แบบเฟดแบช และเติมสารอาหารที่มีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 300 โมลต่อโมล

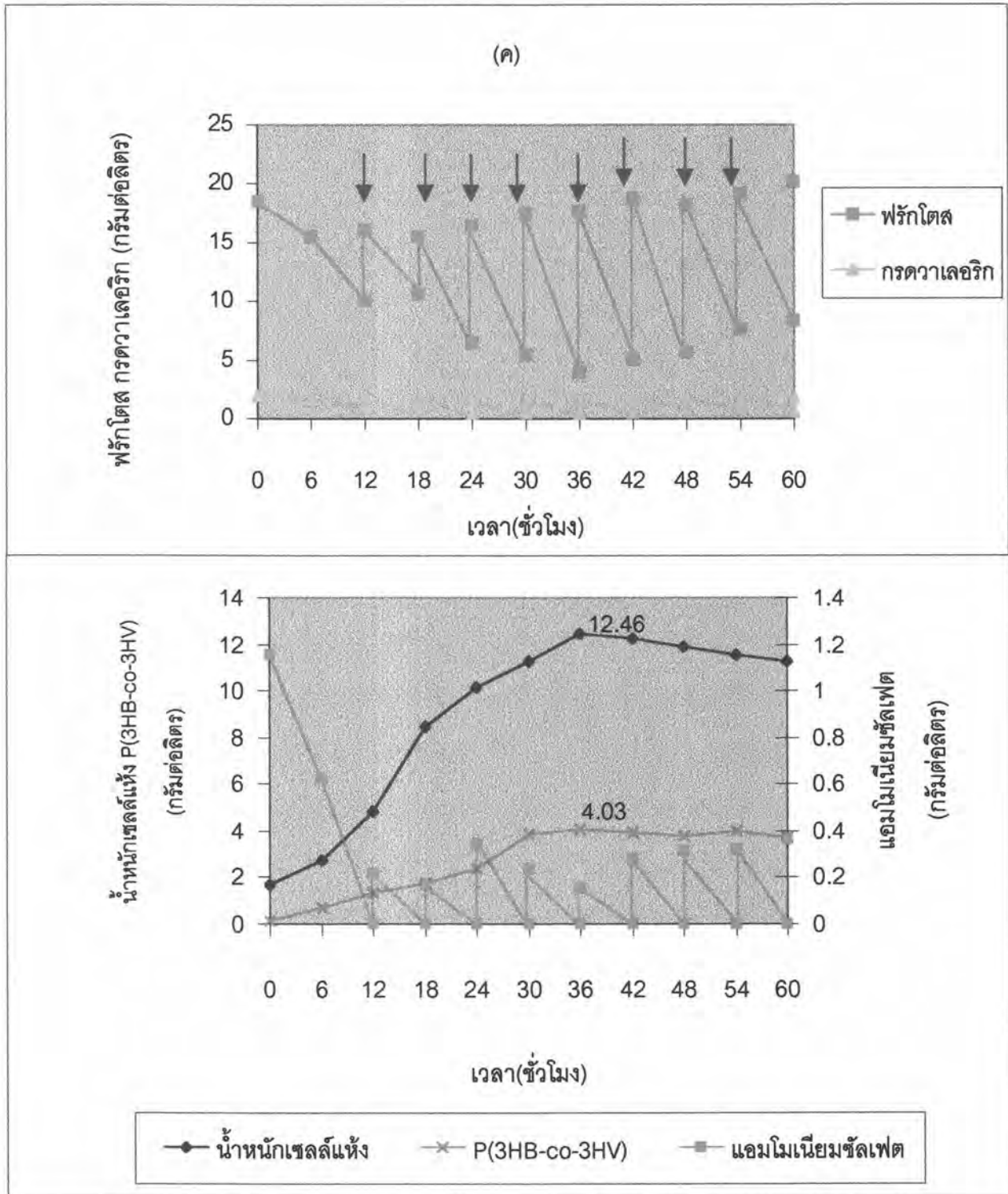
| เวลา (ชั่วโมง) | CDW (กรัมต่อลิตร) | μ (ชั่วโมง ⁻¹) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | | $(NH_4)_2SO_4$ (กรัมต่อลิตร) | | P(3HB-co-3HV) (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|----------------------|-----------------------------------|--------------------------|----------|------------------------------|----------|---------------------------------|----------|--------------------------------|--------------------------------------|-----------|
| | | | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.72 | - | 17.99 | - | 2.15 | - | 1.26 | - | 0.22 | 99 | 1 |
| 6 | 3.02 | 0.09 | 15.28 | - | 1.73 | - | 0.52 | - | 0.99 | 96 | 4 |
| 12 | 5.74 | 0.12 | 9.10 | 14.10 | 1.21 | 1.93 | 0.00 | 0.02 | 1.93 | 91 | 9 |
| 18 | 7.94 | 0.05 | 8.25 | 14.56 | 1.24 | 2.06 | 0.00 | 0.03 | 2.86 | 92 | 8 |
| 24 | 9.24 | 0.03 | 7.36 | 13.15 | 1.02 | 2.14 | 0.00 | 0.03 | 4.32 | 91 | 9 |
| 30 | 10.29 | 0.02 | 6.08 | 14.86 | 0.97 | 2.08 | 0.00 | 0.03 | 5.82 | 89 | 11 |
| 36 | 11.85 | 0.02 | 6.13 | 15.42 | 1.23 | 2.14 | 0.00 | 0.03 | 6.43 | 88 | 12 |
| 42 | 11.69 | -0.00 | 7.02 | 17.21 | 1.39 | 2.34 | 0.00 | 0.03 | 6.52 | 85 | 15 |
| 48 | 11.54 | -0.00 | 5.17 | 16.45 | 1.37 | 2.26 | 0.00 | 0.04 | 6.58 | 84 | 16 |
| 54 | 11.62 | -0.00 | 6.58 | 17.24 | 1.48 | 2.30 | 0.00 | 0.05 | 6.42 | 88 | 12 |
| 60 | 11.38 | -0.00 | 6.13 | 17.52 | 1.51 | 2.45 | 0.00 | 0.05 | 6.01 | 87 | 13 |



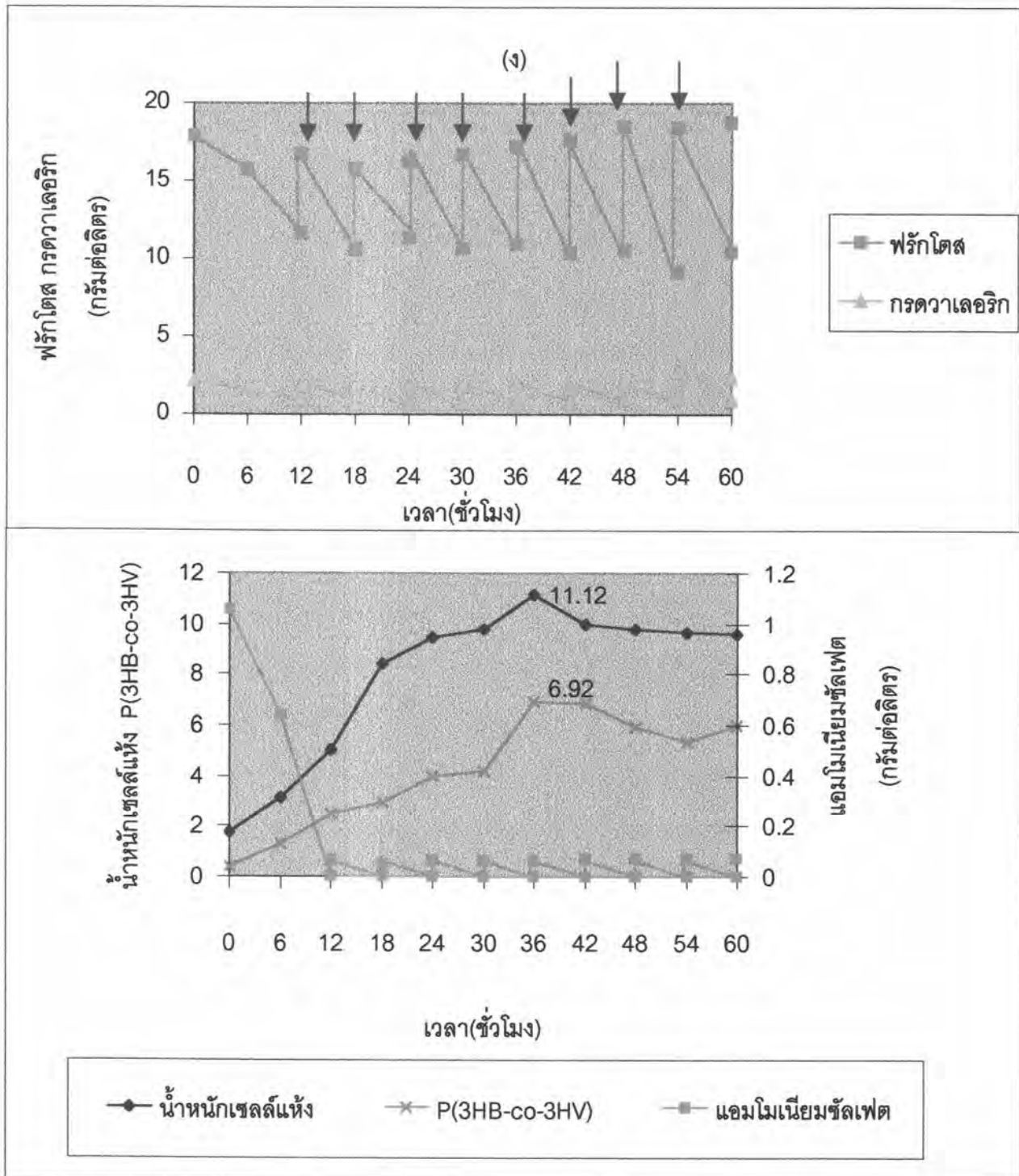
รูปที่ 26(ก) การเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 แบบ เฟดแบช โดยเติมสารอาหารเฉพาะแหล่งคาร์บอน (↓ หมายถึงการเติมอาหาร)



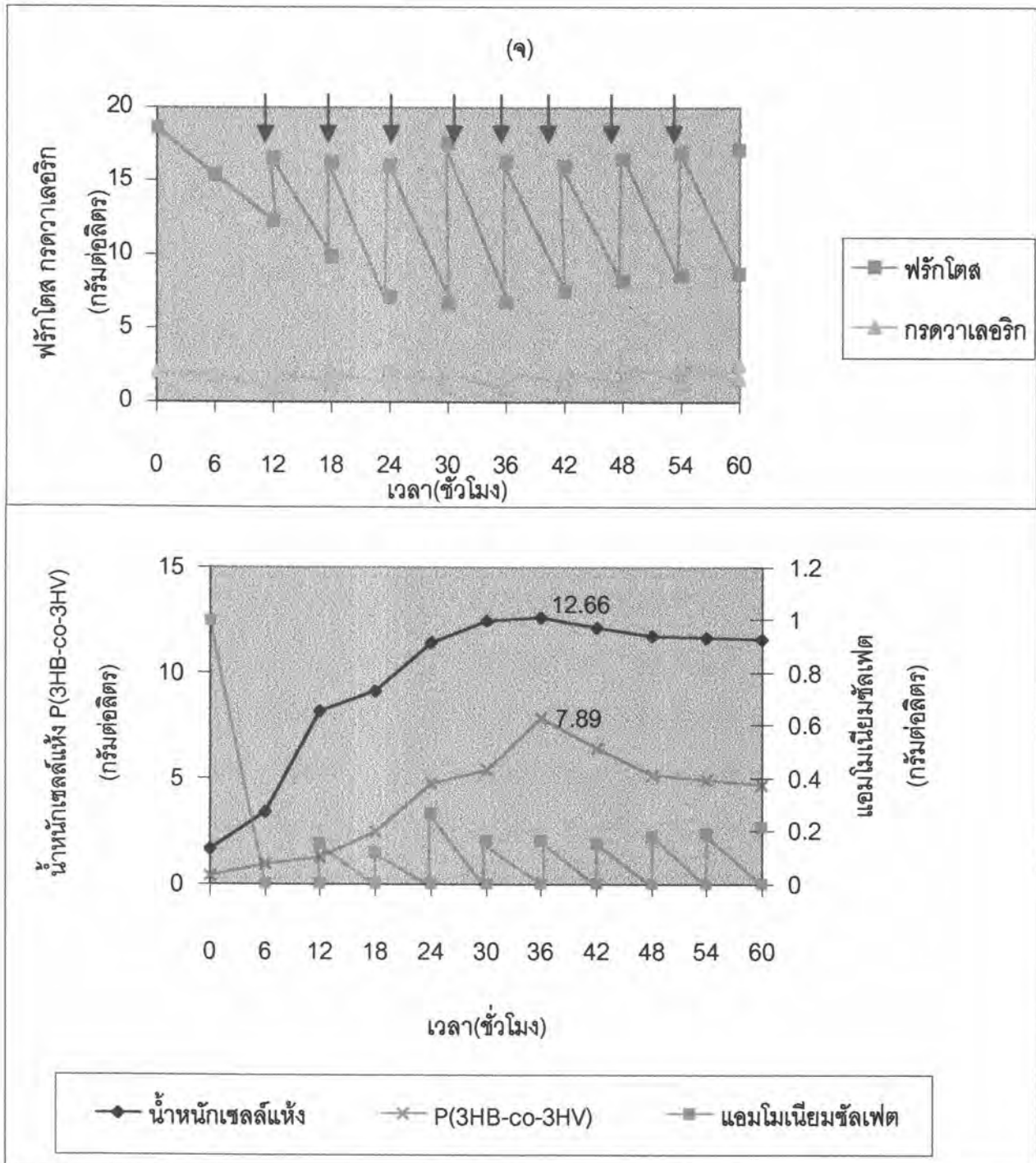
รูปที่ 26(ข) การเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 แบบ เฟดแบช โดยเติมอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน (ฟรักโตสและกรดวาลูอริก) และ แอมโมเนียมซัลเฟตอัตราส่วน C/N เท่ากับ 5 โมลต่อโมล (↓ หมายถึงการเติม สารอาหาร)



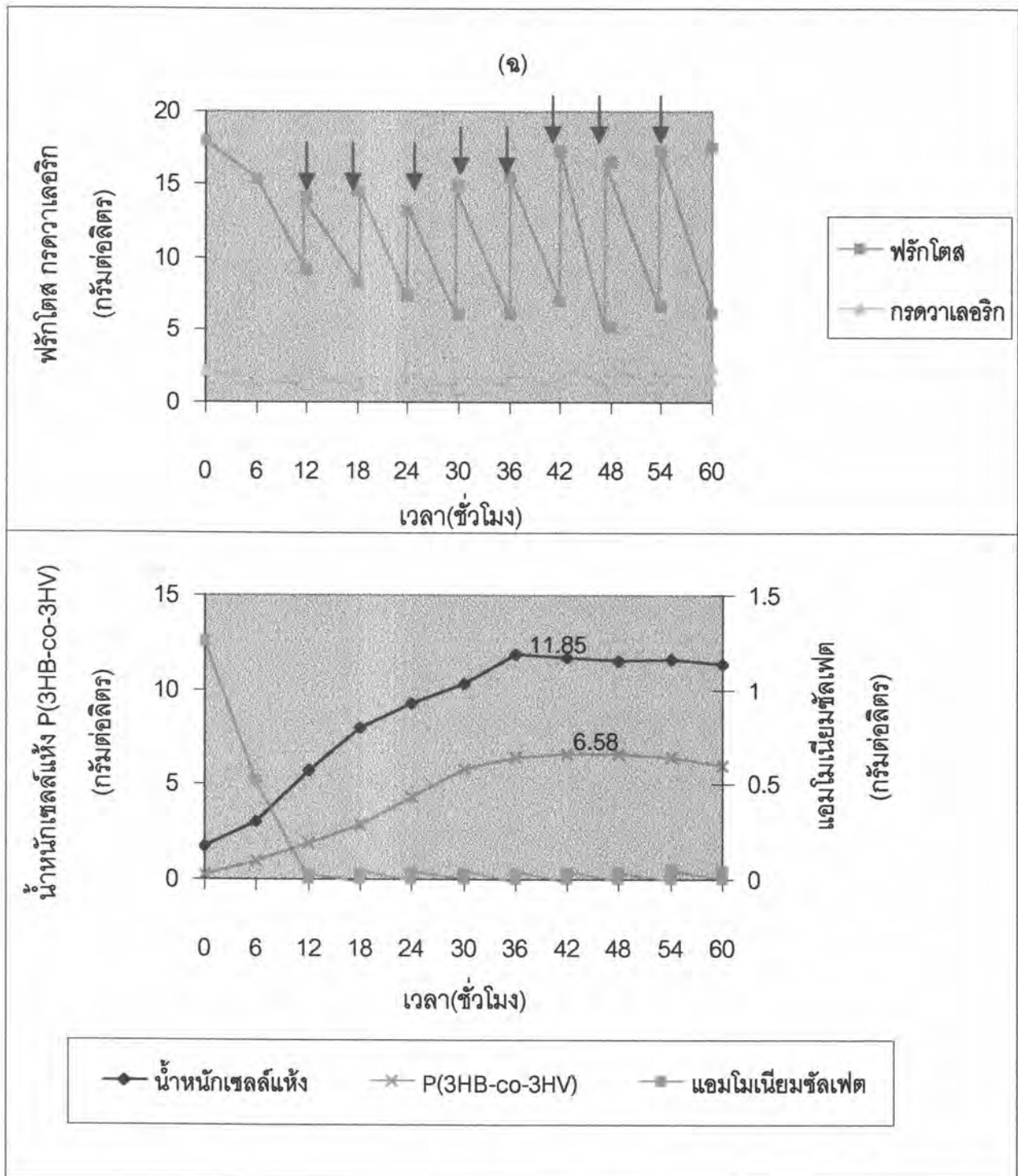
รูปที่ 26(ค) การเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 แบบ เฟดแบช โดยเติมอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน (ฟรักโตสและกรดวาเลอริก) และ แอมโมเนียมซัลเฟตอัตราส่วน C/N เท่ากับ 50 โมลต่อ โมล (↓ หมายถึงการเติม สารอาหาร)



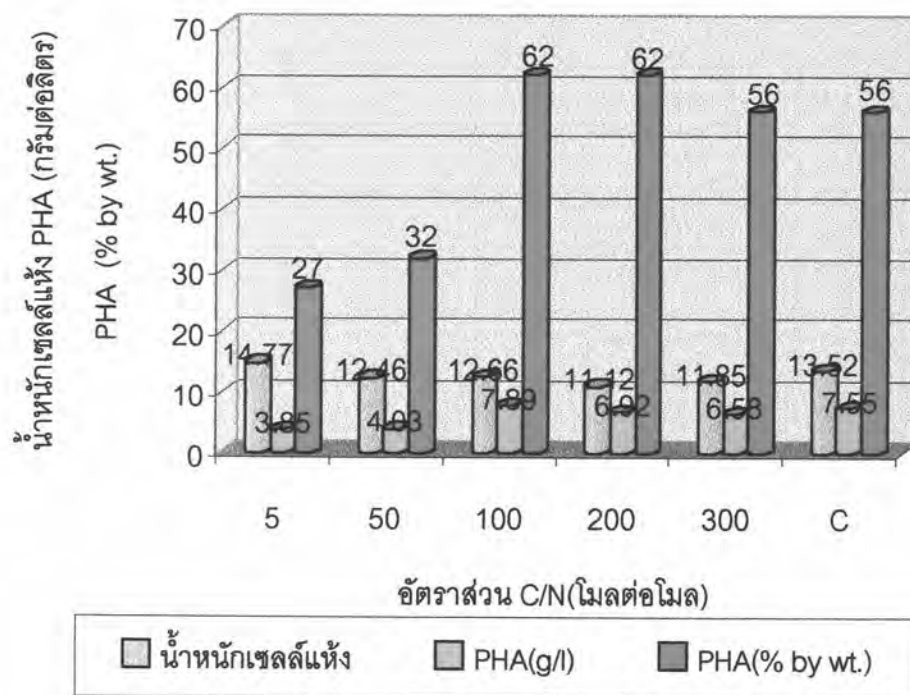
รูปที่ 26(ง) การเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes sp. A-04* แบบ เฟดแบช โดยเติมอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน (ฟรักโตสและกรดวาลेरริก) และ แอมโมเนียมซัลเฟตอัตราส่วน C/N เท่ากับ 100 โมลต่อโมล (↓ หมายถึงการ เติมสารอาหาร)



รูปที่ 26(จ) การเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 แบบ เฟดแบช โดยเติมอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน (ฟรักโตสและกรดวาเลอริก) และ แอมโมเนียมซัลเฟตอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200 โมลต่อโมล (↓ หมายถึงการ เติมสารอาหาร)



รูปที่ 26(จ) การเจริญ และการผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 แบบ เฟดแบช โดยเติมอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน (ฟรักโทสและกรดวาลेरริก) และ แอมโมเนียมซัลเฟตอัตราส่วน C/N เท่ากับ 300 โมลต่อโมล (↓ หมายถึงการเติม สารอาหาร)



รูปที่ 27 เปรียบเทียบน้ำหนักรเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก โดยเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบช และแปรผันการเติมอาหารที่มีอัตราส่วน โมล C/N เท่ากับ 5 50 100 200 300 โมลต่อโมล และ อาหารที่มีเพียงแหล่ง คาร์บอน(C)

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบการสร้าง P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ใน
ถังหมักขนาด 5 ลิตรเป็นการเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยแปรผันการเติมอาหารที่มี
อัตราส่วน C/N ต่างกัน คือ 5 50 100 200 300 และเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอน

| อัตราส่วนโมล C/N | เวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | PHA content % by wt. | Productivity (g/l.h) |
|---------------------|----------------------------|-----------------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|
| 5 | 42 | 14.77 | 3.90 | 27 | 0.09 |
| 50 | 36 | 12.46 | 4.03 | 32 | 0.11 |
| 100 | 36 | 12.66 | <u>7.89</u> | <u>62</u> | <u>0.22</u> |
| 200 | 36 | 11.12 | 6.92 | 62 | 0.19 |
| 300 | 36 | 11.85 | 6.58 | 56 | 0.18 |
| C | 36 | 12.52 | 7.55 | 60 | 0.21 |

หมายเหตุ : C หมายถึงการทดลองที่มีการเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอน

3.2 การเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องโดยเติมอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และแหล่งเกลือแร่

จากการทดลองที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าถึงจะมีการเติมสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงานคือ น้ำตาลฟรักโทส และกรควาเลอริก แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟตลงไปในอาหารระหว่างการเลี้ยง แต่ก็ไม่ได้ทำให้การเจริญเพิ่มขึ้นมากเท่าที่ควร จากงานวิจัยของ Repaske (1976) ได้กล่าวถึงปริมาณสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อ *A. eutrophus* ว่า ปริมาณของเกลือแร่ และ trace element ที่เพียงพอสามารถทำให้ช่วงระยะการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) นานขึ้น และความหนาแน่นเซลล์มากขึ้น เนื่องจากถ้ามีสารอาหารความเข้มข้นสูงตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ จะทำให้มีการจำกัดการเจริญ และอาจเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการหาปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งเกลือแร่ที่ต้องการเติม ซึ่งจะเติมไปพร้อมกับน้ำตาล ฟรักโทส และแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อความสะดวกในการเติมอาหารจึงต้องแบ่งสารละลายที่ต้องเติมเป็นสองส่วน

อาหารส่วนที่ 1 ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอนผสม (น้ำตาลฟรักโทส กับกรควาเลอริกอัตราส่วน 9 : 1) และมีแอมโมเนียมซัลเฟตอัตราส่วนโมล C/N เท่ากับ 100 โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (แหล่งคาร์บอนผสม 300 กรัมต่อลิตร)

อาหารส่วนที่ 2 ประกอบด้วย KH_2PO_4 73.72 กรัมต่อลิตร Na_2HPO_4 22.118 กรัมต่อลิตร MgSO_4 3.686 กรัมต่อลิตร trace element 80 มิลลิลิตร

หลังจากทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM เป็นเวลา 12 ชั่วโมงแล้ว ได้ทำการเติมอาหารดังกล่าวซึ่งจะแบ่งการทดลองตามการเติมอาหารดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1) เติมอาหารส่วนที่ 1 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ตลอดจนถึงชั่วโมงที่ 42 ทุกๆ 6 ชั่วโมง (รวม 6 ครั้ง) ส่วนที่สอง ชั่วโมงที่ 12 (รวม 1 ครั้ง)
- ชุดการทดลองที่ 2) เติมอาหารส่วนที่ 1 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ตลอดจนถึงชั่วโมงที่ 42 ทุกๆ 6 ชั่วโมง (รวม 6 ครั้ง) ส่วนที่สอง ชั่วโมงที่ 18 (รวม 1 ครั้ง)
- ชุดการทดลองที่ 3) เติมอาหารส่วนที่ 1 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ตลอดจนถึงชั่วโมงที่ 42 ทุกๆ 6 ชั่วโมง (รวม 6 ครั้ง) ส่วนที่สอง ชั่วโมงที่ 12 และ 30 (รวม 2 ครั้ง)
- ชุดการทดลองที่ 4) เติมอาหารส่วนที่ 1 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ตลอดจนถึงชั่วโมงที่ 42 ทุกๆ ชั่วโมง (รวม 6 ครั้ง) ส่วนที่สอง ชั่วโมงที่ 12 24 36 (รวม 3 ครั้ง)
- ชุดการทดลองที่ 5) เติมอาหารส่วนที่ 1 และส่วนที่สองพร้อมกัน ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ตลอดจนถึงชั่วโมงที่ 42 ทุกๆ 6 ชั่วโมง (รวม 6 ครั้ง)

ผลการวิจัย ดังแสดงตารางที่ 24 เป็นดังนี้คือ ในชุดการทดลองที่ 1) การเจริญสูงสุดในช่วงโม่งที่ 36 น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 22.18 กรัมต่อลิตร และ P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 12.13 กรัมต่อลิตร การทดลองที่ 2) มีการเจริญสูงสุดในช่วงโม่งที่ 42 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 22.01 กรัมต่อลิตร และ P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 12.36 การทดลองที่ 3) มีการเจริญสูงสุดในช่วงโม่งที่ 36 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 24.38 กรัมต่อลิตร และ P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 15.28 กรัมต่อลิตร การทดลองที่ 4) มีการเจริญสูงสุดในช่วงโม่งที่ 36 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 21.76 กรัมต่อลิตร และ P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 12.43 กรัมต่อลิตร การทดลองที่ 5) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 20.25 กรัมต่อลิตร ในช่วงโม่งที่ 36 ส่วน P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 11.14 กรัมต่อลิตร ทุกการทดลองมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ $0.13 - 0.15 \text{ h}^{-1}$ สรุปผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 25 และรูปที่ 29 โดยสรุปว่า เมื่อมีการเติมสารอาหารที่ประกอบด้วยสารอาหารสองส่วนดังกล่าวไว้แล้วข้างต้น การเติมสารอาหารส่วนที่ หนึ่งทุกๆ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 จนถึงชั่วโมงที่ 42 และส่วนที่สอง ที่ชั่วโมงที่ 12 และ 30 ให้ผลดีที่สุด คือให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 24.38 กรัมต่อลิตร และ P(3HB-co-3HV) สูงสุด เท่ากับ 15.28 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 63 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราผลผลิตเท่ากับ 0.42

ตารางที่ 24(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโทส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือในน้ำหมัก และปริมาณ P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 แบบเฟดแบช และเติมสารอาหารส่วนที่ 1 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ทุกๆ 6 ชั่วโมง จนถึง ชั่วโมงที่ 42 และส่วนที่ 2 เติม ที่ชั่วโมงที่ 12

| เวลา (ชั่วโมง) | CDW (กรัมต่อลิตร) | μ (ชั่วโมง ⁻¹) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | | P(3HB-co-3HV) (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------|----------|------------------------------|----------|--|----------|--------------------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.67 | - | 18.10 | - | 1.92 | - | 1.01 | - | 0.29 | 100 | 0 |
| 6 | 2.43 | 0.06 | 16.57 | - | 1.47 | - | 0.35 | - | 0.62 | 97 | 3 |
| *12 | 5.34 | 0.13 | 8.94 | 17.64 | 0.25 | 1.43 | 0.02 | 0.17 | 1.57 | 92 | 8 |
| 18 | 9.48 | 0.10 | 9.14 | 18.25 | 0.34 | 1.76 | 0.00 | 0.17 | 3.13 | 86 | 14 |
| 24 | 16.79 | 0.10 | 9.95 | 18.38 | 0.12 | 1.62 | 0.00 | 0.15 | 6.27 | 84 | 16 |
| 30 | 19.78 | 0.03 | 8.25 | 18.07 | 0.44 | 1.89 | 0.00 | 0.16 | 8.79 | 82 | 18 |
| 36 | 22.18 | 0.02 | 7.16 | 16.23 | 0.53 | 1.92 | 0.00 | 0.18 | 12.13 | 82 | 18 |
| 42 | 22.02 | -0.00 | 9.32 | 17.62 | 0.50 | 1.91 | 0.00 | 0.20 | 12.08 | 83 | 17 |
| 48 | 22.12 | -0.00 | 10.36 | - | 0.64 | - | 0.00 | 0.13 | 12.11 | 82 | 18 |
| 54 | 21.96 | -0.00 | 9.35 | - | 0.27 | - | 0.00 | 0.15 | 11.97 | 82 | 18 |
| 60 | 21.43 | -0.00 | 7.63 | - | 0.06 | - | 0.00 | 0.15 | 12.06 | 82 | 18 |

ตารางที่ 24(ข) นำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโทส กรดวาเลอริก และ แอมโมเนียมซัลเฟตที่หือในน้ำหมัก และปริมาณ P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 และเติมสารอาหารส่วนที่ 1 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ทุกๆ 6 ชั่วโมง จนถึง ชั่วโมงที่ 42 และส่วนที่ 2 เติมที่ชั่วโมงที่ 18

| เวลา (ชั่วโมง) | CDW (กรัมต่อลิตร) | μ (ชั่วโมง ⁻¹) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | | P(3HB-co-3HV) (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------|----------|------------------------------|----------|--|----------|--------------------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.71 | - | 18.00 | - | 2.14 | - | 0.99 | - | 0.35 | 100 | 0 |
| 6 | 2.35 | 0.05 | 14.53 | - | 1.57 | - | 0.24 | - | 0.67 | 97 | 3 |
| 12 | 5.18 | 0.13 | 9.82 | 16.79 | 0.54 | 1.67 | 0.01 | 0.21 | 1.83 | 92 | 8 |
| *18 | 8.06 | 0.07 | 10.17 | 18.49 | 0.53 | 1.68 | 0.00 | 0.19 | 3.88 | 87 | 13 |
| 24 | 14.58 | 0.10 | 9.36 | 17.83 | 0.34 | 1.42 | 0.00 | 0.18 | 5.63 | 84 | 16 |
| 30 | 21.21 | 0.06 | 11.38 | 18.84 | 0.36 | 1.56 | 0.00 | 0.19 | 10.36 | 85 | 15 |
| 36 | 21.76 | -0.00 | 7.63 | 15.13 | 0.78 | 1.97 | 0.00 | 0.21 | 12.43 | 84 | 16 |
| 42 | 20.86 | -0.01 | 8.23 | 15.38 | 0.88 | 2.00 | 0.00 | 0.2 | 10.31 | 84 | 16 |
| 48 | 19.72 | -0.01 | 9.89 | - | 1.78 | - | 0.00 | 0.01 | 9.83 | 86 | 14 |
| 54 | 18.76 | -0.01 | 8.52 | - | 1.55 | - | 0.00 | 0.01 | 8.81 | 86 | 14 |
| 60 | 16.65 | -0.02 | 7.11 | - | 1.38 | - | 0.00 | 0.01 | 7.00 | 85 | 15 |

ตารางที่ 24(ค) ปริมาณน้ำหนักรวมแห้ง ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมัก และปริมาณ P(3HB-co-3HV) เมื่อเมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 และเติมสารอาหารส่วนที่ 1 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ทุกๆ 6 ชั่วโมง จนถึง ชั่วโมงที่ 42 และส่วนที่ 2 เติมที่ ชั่วโมงที่ 12

30

| เวลา (ชั่วโมง) | CDW (กรัมต่อลิตร) | μ (ชั่วโมง ⁻¹) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | | กรควาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | | P(3HB-co-3HV) (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------|----------|------------------------------|----------|--|----------|--------------------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.71 | - | 18.04 | - | 1.89 | - | 1.05 | - | 0.35 | 100 | 0 |
| 6 | 2.35 | 0.05 | 15.75 | - | 1.36 | - | 0.64 | - | 1.08 | 95 | 5 |
| *12 | 5.67 | 0.15 | 7.35 | 15.98 | 0.44 | 1.21 | 0.04 | 0.18 | 1.65 | 91 | 9 |
| 18 | 10.37 | 0.10 | 6.39 | 14.65 | 0.26 | 1.76 | 0.00 | 0.19 | 3.48 | 86 | 14 |
| 24 | 17.32 | 0.09 | 5.18 | 15.17 | 0.24 | 1.68 | 0.00 | 0.17 | 9.32 | 84 | 16 |
| *30 | 22.43 | 0.04 | 8.65 | 16.46 | 0.31 | 1.92 | 0.00 | 0.16 | 11.35 | 82 | 18 |
| 36 | 24.36 | 0.01 | 10.32 | 18.32 | 0.22 | 2.06 | 0.00 | 0.21 | 15.28 | 82 | 18 |
| 42 | 24.16 | -0.00 | 11.66 | 18.96 | 0.67 | 2.39 | 0.00 | - | 15.01 | 81 | 19 |
| 48 | 23.94 | -0.00 | 10.25 | - | 0.32 | - | 0.00 | - | 14.87 | 81 | 19 |
| 54 | 23.69 | -0.00 | 9.64 | - | 0.0 | - | 0.00 | - | 14.66 | 81 | 19 |
| 60 | 23.59 | -0.00 | 6.35 | - | 0.0 | - | 0.00 | - | 14.21 | 83 | 17 |

ตารางที่ 24(ง) นำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโทส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือในน้ำหมัก และปริมาณP(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 และเติมสารอาหารส่วนที่ 1 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ทุกๆ 6 ชั่วโมง จนถึง ชั่วโมงที่ 42 และส่วนที่ 2 เติมที่ชั่วโมงที่ 12

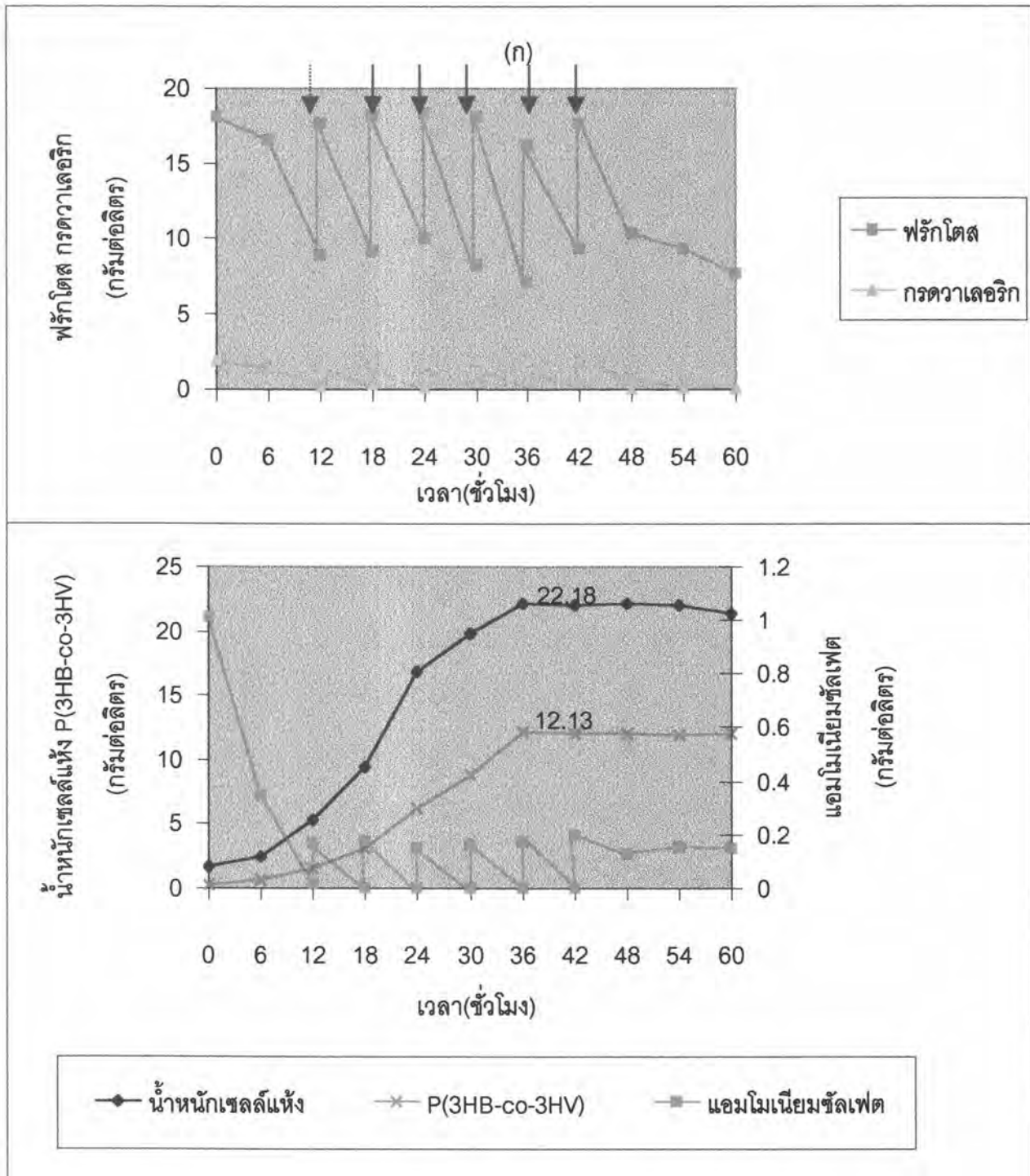
24 36

| เวลา (ชั่วโมง) | CDW (กรัมต่อลิตร) | μ (ชั่วโมง ⁻¹) | ฟรักโทส (กรัมต่อลิตร) | | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | | P(3HB-co-3HV) (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------|----------|------------------------------|----------|--|----------|--------------------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.72 | - | 18.06 | - | 1.97 | - | 1.04 | - | 0.37 | 100 | 0 |
| 6 | 2.38 | 0.06 | 14.09 | - | 1.24 | - | 0.17 | - | 0.58 | 96 | 4 |
| *12 | 5.67 | 0.15 | 9.24 | 16.88 | 0.48 | 1.58 | 0.04 | 0.17 | 1.47 | 93 | 7 |
| 18 | 8.75 | 0.07 | 7.33 | 14.90 | 0.35 | 1.47 | 0.00 | 0.18 | 3.29 | 85 | 15 |
| *24 | 14.67 | 0.09 | 6.36 | 13.90 | 0.44 | 1.75 | 0.00 | 0.21 | 9.37 | 86 | 14 |
| 30 | 18.35 | 0.04 | 7.70 | 16.28 | 0.28 | 1.88 | 0.00 | 0.17 | 11.20 | 85 | 15 |
| *36 | 21.76 | 0.03 | 8.22 | 17.55 | 0.47 | 1.67 | 0.00 | 0.16 | 12.43 | 85 | 15 |
| 42 | 21.63 | -0.00 | 8.15 | 17.63 | 0.24 | 1.73 | 0.00 | 0.18 | 12.25 | 85 | 15 |
| 48 | 21.69 | 0.00 | 9.66 | - | 0.31 | - | 0.00 | - | 12.07 | 86 | 14 |
| 54 | 21.64 | -0.00 | 8.18 | - | 0.0 | - | 0.00 | - | 12.18 | 87 | 13 |
| 60 | 21.54 | -0.00 | 6.98 | - | 0.0 | - | 0.00 | - | 12.14 | 86 | 14 |

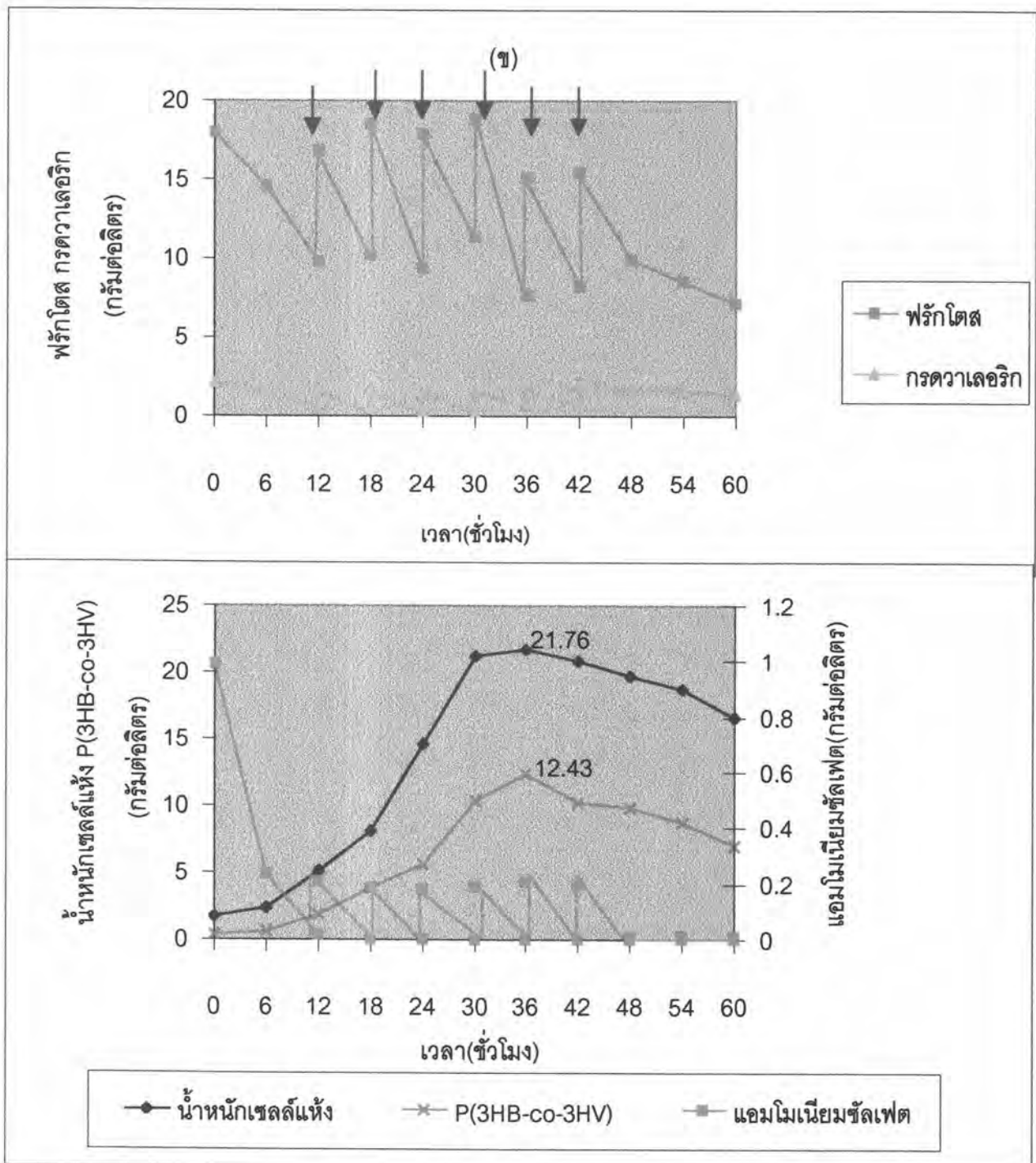
ตารางที่ 24(จ) นำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณฟรักโตส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือในน้ำหมัก ปริมาณ P(3HB-co-3HV) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 และเติมสารอาหารส่วนที่ 1 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ทุกๆ 6 ชั่วโมง จนถึง ชั่วโมงที่ 42 และส่วนที่ 2 เติมที่ ชั่วโมงที่

12 18 24 30 36 42

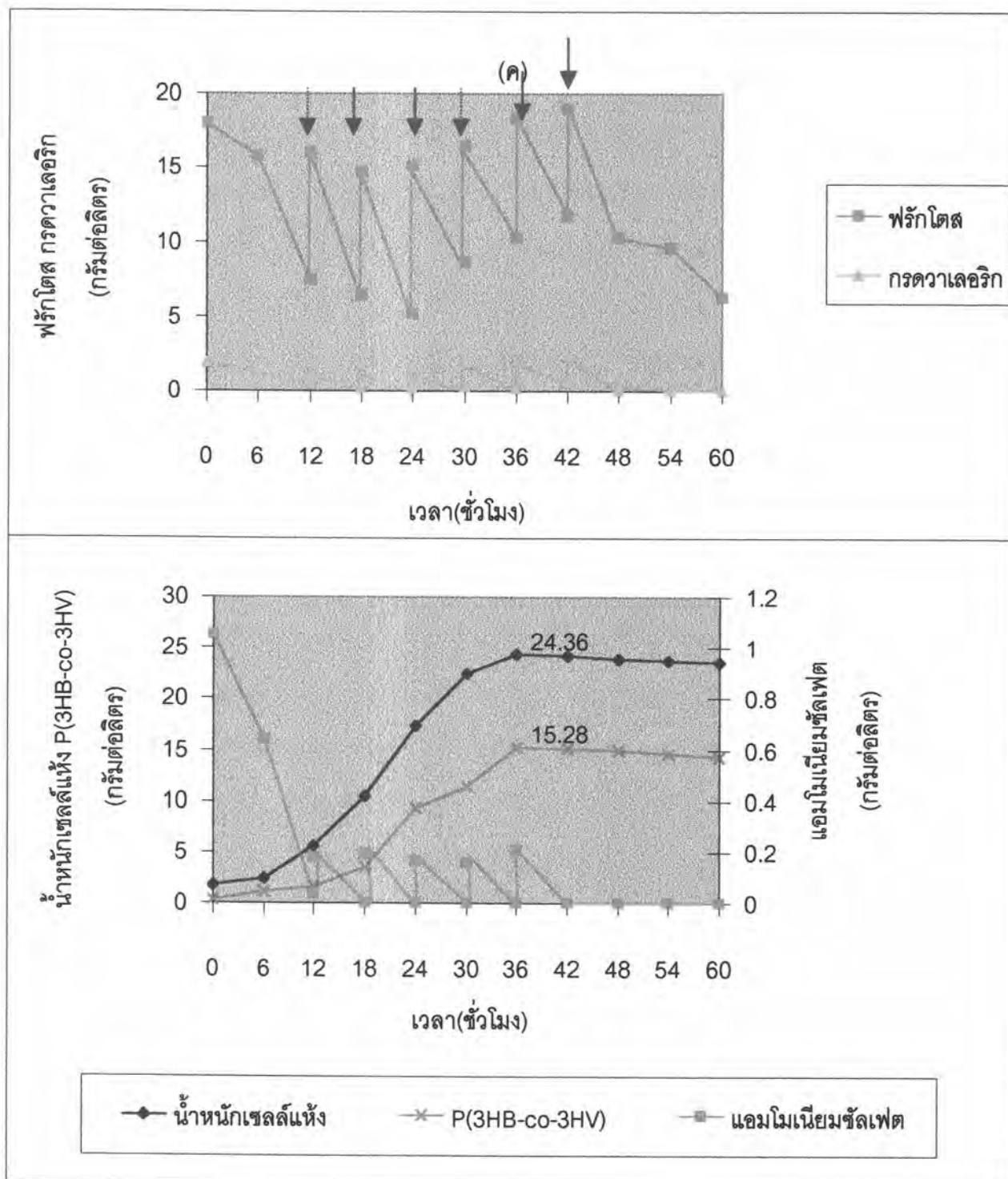
| เวลา (ชั่วโมง) | CDW (กรัมต่อลิตร) | μ (ชั่วโมง ⁻¹) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | | กรดวาเลอริก (กรัมต่อลิตร) | | (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร) | | P(3HB-co-3HV) (กรัมต่อลิตร) | สัดส่วนโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์) | |
|-------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------|----------|------------------------------|----------|--|----------|--------------------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | ก่อนเติม | หลังเติม | | 3HB | 3HV |
| 0 | 1.72 | - | 18.01 | - | 2.02 | - | 1.01 | - | 0.46 | 100 | 0 |
| 6 | 2.50 | 0.06 | 14.45 | - | 1.68 | - | 0.43 | - | 0.72 | 96 | 4 |
| *12 | 5.47 | 0.13 | 10.46 | 17.64 | 0.86 | 1.87 | 0.01 | 0.17 | 1.36 | 92 | 8 |
| *18 | 7.73 | 0.06 | 8.65 | 15.38 | 0.45 | 1.64 | 0.00 | 0.15 | 3.85 | 86 | 14 |
| *24 | 14.13 | 0.10 | 8.66 | 15.96 | 0.40 | 1.87 | 0.00 | 0.19 | 5.45 | 84 | 16 |
| *30 | 19.23 | 0.05 | 8.84 | 16.48 | 0.29 | 1.71 | 0.00 | 0.21 | 9.54 | 84 | 17 |
| *36 | 20.25 | 0.01 | 7.15 | 16.21 | 0.67 | 1.55 | 0.00 | 0.19 | 11.14 | 85 | 15 |
| *42 | 20.15 | -0.00 | 7.67 | 16.88 | 0.52 | 1.83 | 0.00 | 0.20 | 11.21 | 85 | 15 |
| 48 | 20.12 | 0.00 | 6.35 | - | 0.67 | - | 0.00 | - | 10.72 | 86 | 14 |
| 54 | 20.02 | -0.00 | 5.68 | - | 0.04 | - | 0.00 | - | 10.82 | 89 | 11 |
| 60 | 20.00 | -0.00 | 6.47 | - | 0.02 | - | 0.00 | - | 10.82 | 89 | 11 |



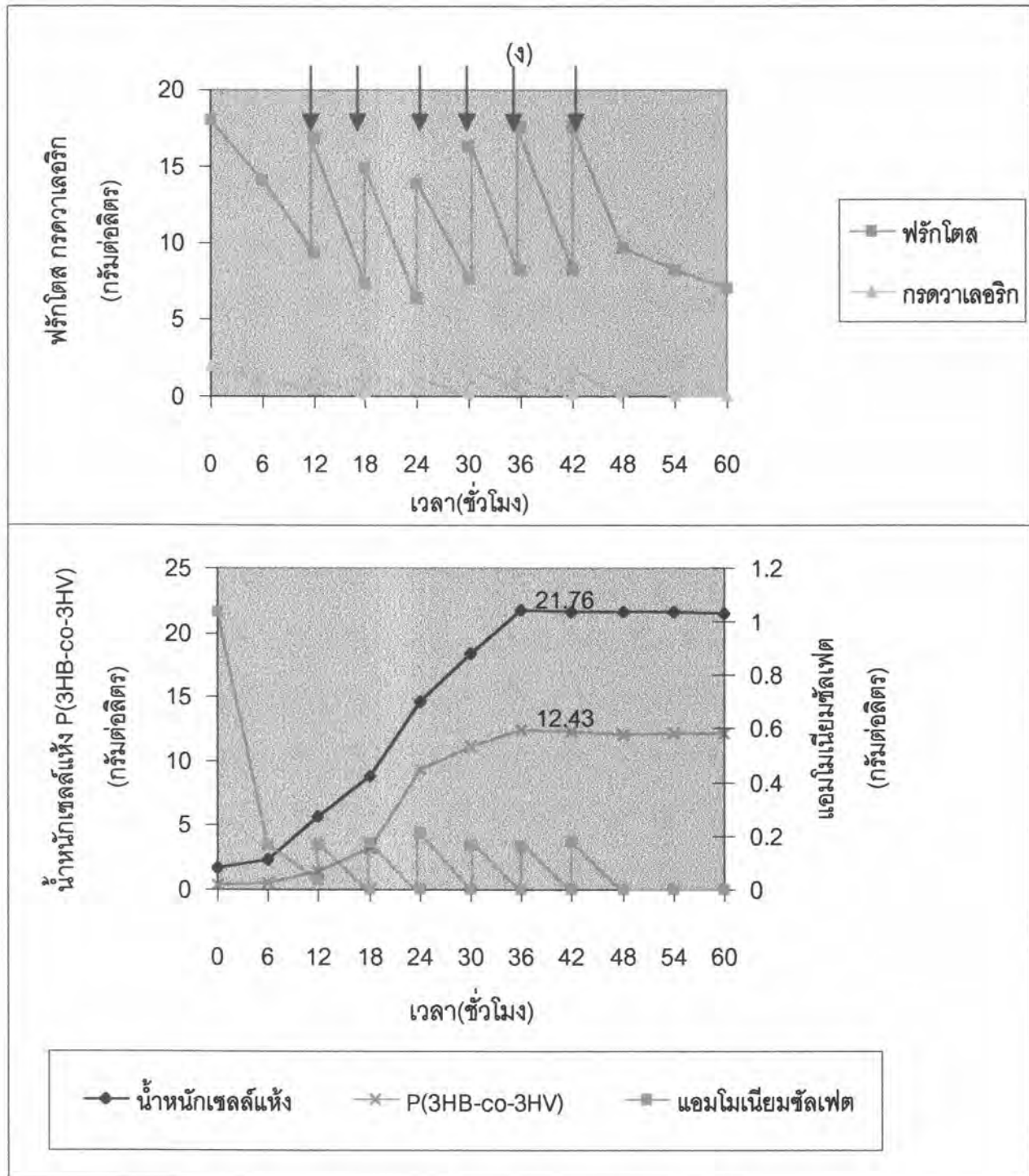
รูปที่ 28(ก) การเจริญ และการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยการเลี้ยงแบบเฟดแบช เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน (อัตราส่วนโมล C/N 100) และแหล่งเกลือแร่ชั่วโมงที่ 12 (↓ หมายถึงการเติมสารอาหารส่วนที่ 1) (↓ หมายถึงการเติมสารอาหารส่วนที่ 1 และ 2)



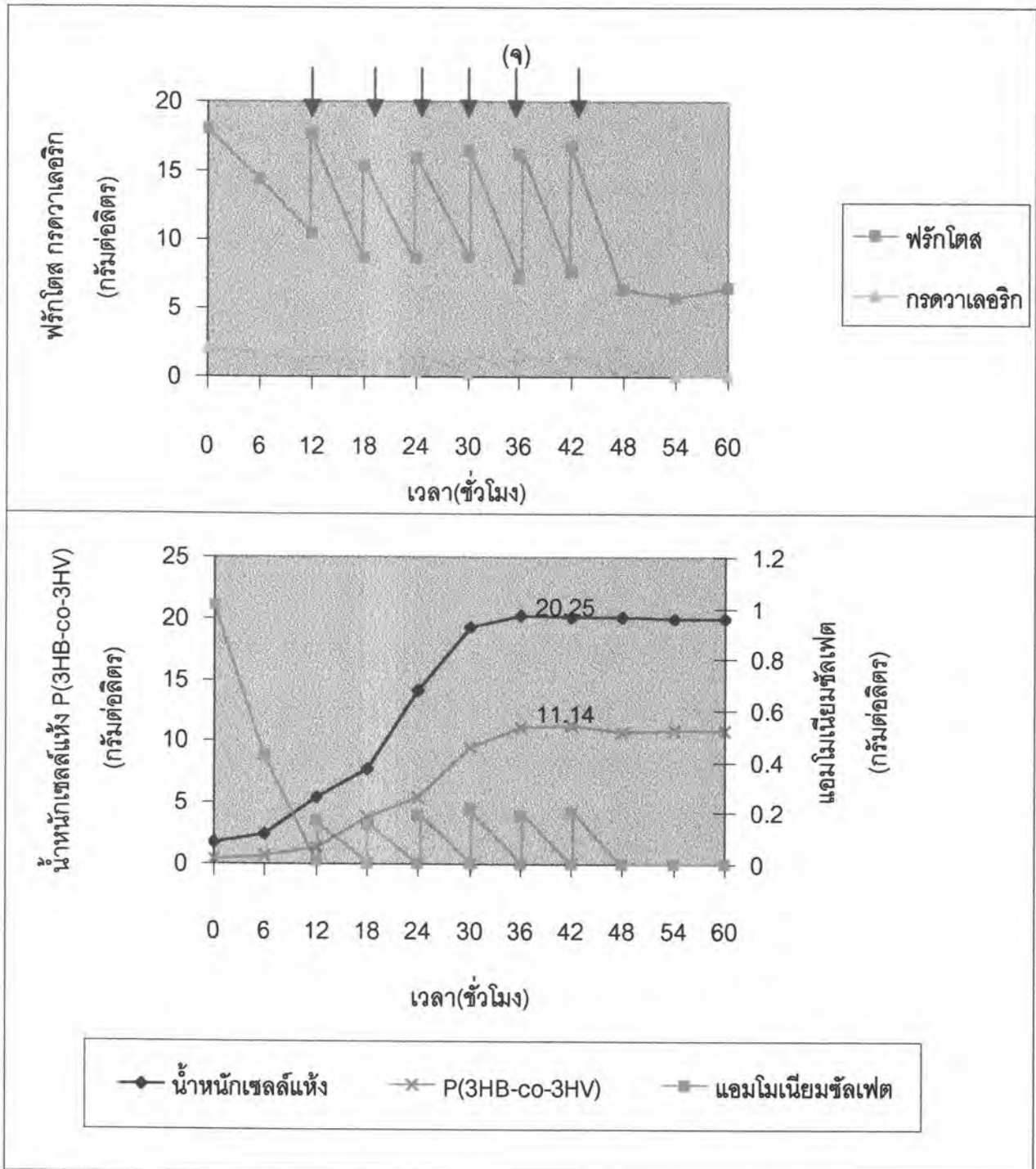
รูปที่ 28(ข) การเจริญ และการผลิตโคพอลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยการเลี้ยงแบบเฟดแบช เมื่อทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน (อัตราส่วนโมล C/N 100) และแหล่งเกลือแร่ชั่วโมงที่ 18 (↓ หมายถึงการเติมสารอาหารส่วนที่ 1) (↓ หมายถึงการเติมสารอาหารส่วนที่ 1 และ 2)



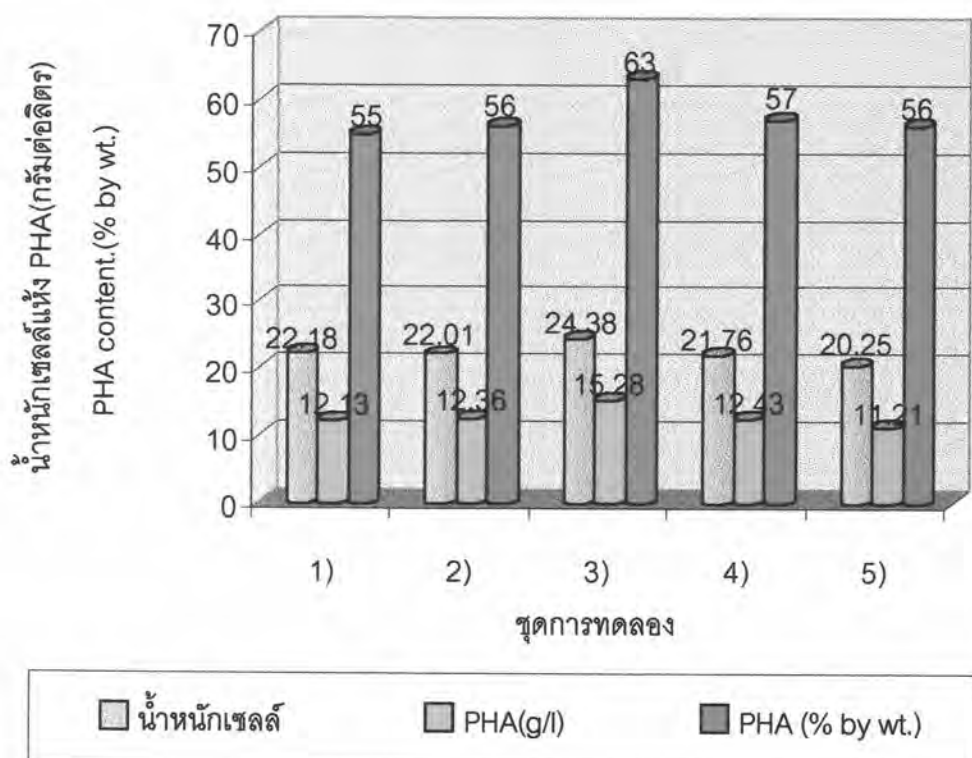
รูปที่ 28(ค) การเจริญ และการผลิตโคพอลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยการเลี้ยงแบบเฟดแบช เมื่อทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน (อัตราส่วน โมล C/N 100) และแหล่งเกลือแร่ชั่วโมงที่ 12 และ 30 (↓ หมายถึงการเติมสารอาหารส่วนที่ 1) (↓ หมายถึงการเติมสารอาหารส่วนที่ 1 และ 2)



รูปที่ 28(ง) การเจริญ และการผลิตโคพอลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยการเลี้ยงแบบเฟดแบช เมื่อทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน (อัตราส่วนโมล C/N 100) และแหล่งเกลือแร่ชั่วโมงที่ 12 24 และ 36 (↓ หมายถึงการเติมสารอาหารส่วนที่ 1) (↓ หมายถึงการเติมสารอาหารส่วนที่ 1 และ 2)



รูปที่ 28(จ) การเจริญ และการผลิต โพลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยการเลี้ยงแบบเฟดแบช เมื่อทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน (อัตราส่วนโมล C/N 100) และแหล่งเกลือแร่ชั่วโมงที่ 12 18 24 30 36 และ 42 (↓ หมายถึงการเติมสารอาหารส่วนที่ 1 และ 2)



รูปที่ 29 เปรียบเทียบน้ำหมักเซลล์แห้ง และปริมาณ โคพอลิเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp. A-04* ในถังหมักแบบเฟดแบช

ตารางที่ 25 เปรียบเทียบการสร้าง P(3HB-co-3HV) เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes sp. A-04* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยวิธีการเลี้ยงแบบเฟดแบช โดยทำการเติมอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลฟรักโทส กรดวาเลอริก แอมโมเนียมซัลเฟต เกลือแร่ และ trace element ที่เวลาต่างกัน

| ชุดการทดลอง | เวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง) | น้ำหมักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) | PHA (กรัมต่อลิตร) | PHA (% by wt.) | Productivity (g/l.h) |
|-------------|-------------------------|----------------------------|-------------------|----------------|----------------------|
| 1) | 36 | 22.18 | 12.13 | 55 | 0.34 |
| 2) | 42 | 22.01 | 12.36 | 56 | 0.29 |
| 3) | 36 | 24.38 | 15.28 | 63 | 0.42 |
| 4) | 36 | 21.76 | 12.43 | 57 | 0.35 |
| 5) | 36 | 20.25 | 11.21 | 56 | 0.35 |