

อดิศักดิ์ หิรัญรัตนกร : การเพิ่มอัตราผลิต P(3HB-co-3HV) โดยวิธีการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 แบบกึ่งต่อเนื่อง เพื่อให้มีความหนาแน่นเซลล์สูง (INCREASE PRODUCTIVITY OF P(3HB-CO-3HV) BY FED-BATCH CULTIVATION FOR HIGH CELL DENSITY OF *Alcaligenes* sp. A-04) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สวัสดิ์ กุลปรีชา, 157 หน้า, ISBN 974-332-209-4.

การผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ A-04 ในระดับขวดเขย่า และในถังหมัก ขนาด 5 ลิตรแบบแบบ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมกล้ายเชื้อ มีการเจริญในช่วงการเจริญแบบทวีคูณอยู่ระหว่าง ชั่วโมงที่ 18-30 น้ำหนักเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 36 เมื่อนำกล้ายเชื้ออายุ 18 24 30 และ 36 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ ได้ผลว่ากล้ายเชื้อที่เหมาะสมคือกล้ายเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบแบบ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้แก่ปริมาณกล้ายเชื้อ เท่ากับ 1.7 กรัมต่อลิตร ได้พบว่าการผลิต P(3HB-co-3HV) โดยมีการควบคุมค่าความเป็นกรดค่า ได้อัตราผลิตสูงกว่าเมื่อไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดค่า โดยค่าความเป็นกรดค่าที่เหมาะสม เท่ากับ 7.0 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม มีดังนี้ อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนผสม ซึ่งได้แก่ ฟรักโตสและกรวาลอริก เท่ากับ 18:2 กรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร อัตราส่วน $\text{KH}_2\text{PO}_4 : \text{Na}_2\text{HPO}_4$ เท่ากับ 1.0:0.3 กรัมต่อลิตร ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต เท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.8 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราการกวน เท่ากับ 600 รอบต่อนาที ได้ค่าความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 10.91 กรัมต่อลิตร ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 5.94 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 36 ได้อัตราผลิตเท่ากับ 0.16 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อนำค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบแบบ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะ เท่ากับ 0.1 ต่อชั่วโมง มวลเซลล์ที่ไม่รวมพอลิเมอร์ เท่ากับ 4.09 กรัมต่อลิตร ผลผลิตมวลเซลล์ต่อสารอาหารที่ใช้เท่ากับ 0.54 กรัมต่อกรัม มาคำนวณเพื่อหาอัตราการเติมสารอาหารได้ค่าอัตราการเติมสารอาหารเท่ากับ 4.52 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ในการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 แบบเฟดแบชในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งบรรจุน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 2.0 ลิตร เมื่อเติมสารอาหารเฉพาะแหล่งคาร์บอน พบว่าความหนาแน่นเซลล์ ปริมาณโคพอลิเมอร์ และอัตราผลิตเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อเติมสารอาหารที่มีทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนโดยมี อัตราส่วน C/N ตั้งแต่ 5-300 โมลต่อโมล พบว่าอัตราส่วนของ C/N ที่เหมาะสม เท่ากับ 100 โมลต่อโมล พบว่าความหนาแน่นของเซลล์ และการผลิตโคพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นได้แก่ ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 12.66 กรัมต่อลิตร ปริมาณ P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 7.89 กรัมต่อลิตร และอัตราผลิตเท่ากับ 0.22 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง พบว่าอัตราส่วนของ C/N มีผลต่อองค์ประกอบของโคพอลิเมอร์ โดยอัตราส่วนของ C/N ที่มีค่าสูงทำให้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV สูงขึ้น เมื่อเติมสารอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุที่จำเป็น โดยเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนทุก 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 12-42 เติมแร่ธาตุที่จำเป็น ที่ชั่วโมงที่ 12 และ 30 มีผลทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ และการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน คือ ความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 24.38 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นเป็น 15.28 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 62 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้อัตราผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 0.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

KEY WORD: P(3HB-co-3HV) / *Alcaligenes* sp. A-04 / PRODUCTIVITY / HIGH CELL DENSITY / FED-BATCH

ADISAK HIRUNRUTTANAKORN : INCREASE PRODUCTIVITY OF P(3HB-CO-3HV) BY FED-BATCH CULTIVATION FOR HIGH CELL DENSITY OF *Alcaligenes* sp. A-04. THESIS ADVISOR : ASSO.PROF. SONGSRI KULPREECHA, Ph.D. 157 pp. ISBN 974-332-209-4.

The production of copolymer of P(3HB-co-3HV) in shake flask and batch culture in a 5 L. jar fermenter by *Alcaligenes* sp. A-04 was investigated. The exponential growth phase of *Alcaligenes* sp. A-04 grown in seed culture medium was at 18-30 h. of cultivation period, the maximum cell mass was shown at 36 h. Seed culture of 24 h. was suitable for copolymer production, compared to that of 18, 24, 30, and 36 h. seed culture. The optimal cultivation condition of *Alcaligenes* sp. A-04 for P(3HB-co-3HV) production in a fermenter was studied. The suitable inoculum size was 1.7 g/l of 24 h. seed culture. At 30 °C, higher productivity of P(3HB-co-3HV) was obtained with pH controlled at 7.0 compared with that of uncontrolled pH cultivation. The optimal medium composition and culture condition were as followed: fructose and valeric acid was 18 : 2 g/l, 1.0 g/l of ammonium sulfate, 1.0 : 0.3 g/l of KH_2PO_4 : Na_2HPO_4 , 0.1 g/l of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, aeration rate at 1.8 vvm. and agitation speed at 600 rpm. Under this cultivation condition, the maximum cell density was 10.91 g/l and copolymer content was 5.94 g/l at 36 h of cultivation with productivity of 0.16 g/l/h. Feed rate of fresh medium was 4.52 ml/h calculated based on the parameters obtained from batch cultivation i.e. specific growth rate (μ); 0.1 h^{-1} , residual cell mass (X_r); 0.4 g/l and biomass yield ($Y_{x/s}$); 0.54 g/g. When applied the suitable cultivation condition to fed batch cultivation of *Alcaligenes* sp. A-04 in a 5 L. fermenter, with feeding of carbon source only; cell density, copolymer content and productivity was slightly increased. With carbon and nitrogen source feeding at C/N ratio of 5-300 mole/mole, higher cell density (12.66 g/l), P(3HB-co-3HV) content (7.89 g/l) and higher productivity (0.22 h^{-1}) were achieved with C/N ratio of 100 mole/mole. It was also found that the composition of copolymer was affected by C/N ratio of culture medium; higher C/N ratio resulted in higher 3HV monomer. In the experiment of feeding carbon and nitrogen source every 6 h. from 12-24 h. and feeding essential elements at 12 and 30 h, the cell density and copolymer of P(3HB-co-3HV) production by *Alcaligenes* sp. A-04 was remarkably increased i.e. the cell density was increased to 24.38 g/l, P(3HB-co-3HV) content was increased to 15.28 g/l or 62 % by cell dry weight and the productivity was increased to 0.42 g/l/h.