บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต

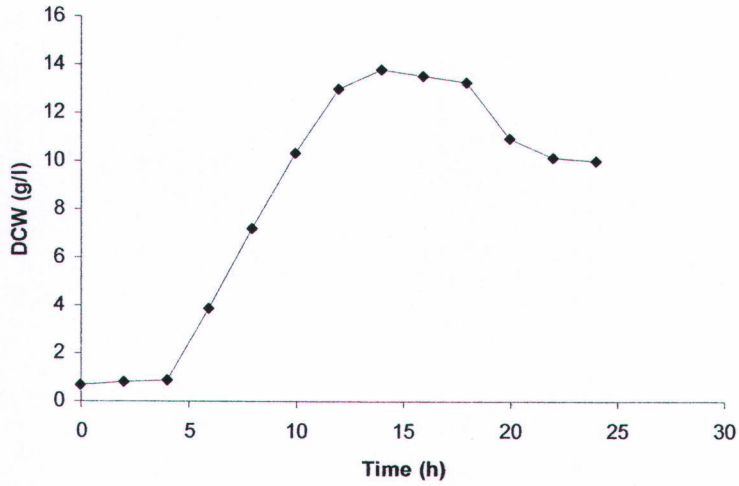
Keshavarz และ Roy (2010) พบว่า การสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ที่เหมาะสมนั้นควรเป็นกระบวนการต่อเนื่อง (serial process) ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกจุลินทรีย์จะมีการเจริญในแหล่งคาร์บอนที่ทำให้มีการผลิตเซลล์ปริมาณมาก ส่วนในขั้นตอนที่สองมีการเติมสารอาหารเพื่อใช้ในการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เซลล์ปริมาณมากที่ได้ในขั้นตอนแรกก็จะใช้สารอาหารนั้น เพื่อนำไปสังเคราะห์และสะสม P(3HB)

สุกฤตยา วีระนนท์ (2539) เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อเพิ่มการผลิต P(3HB) โดยในขั้นตอนแรกเป็นการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มากในอาหารสูตรอุดม (Rich medium) แล้วจึงถ่ายเซลล์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) (อาหาร MSM) ทำให้ปริมาณ P(3HB) เพิ่มขึ้น

ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.4.2 จากนั้นติดตามการเจริญเติบโตของ *B.megaterium* BA-019 โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาหาความหนาแน่นของเซลล์และคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 พบว่าเซลล์มีการเติบโตจนถึงชั่วโมงที่ 14 จากนั้นปริมาณเซลล์ค่อนข้างคงที่และลดลงจนสิ้นสุดการทดลอง โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 13.82 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 14 เมื่อคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ(μ) พบว่ากล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมงให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.759 ต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกกล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมง นำไปใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.1 การเติบโตของ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

time (h)	DCW (g/l)	μ (h^{-1})
0	0.65	-
2	0.79	0.098
4	0.85	0.037
6	3.88	0.759
8	7.21	0.310
10	10.33	0.180
12	12.98	0.114
14	13.82	0.031
16	13.51	-0.011
18	13.25	-0.010
20	10.95	-0.095
22	10.12	-0.039
24	9.98	-0.007



รูปที่ 4.1 การเติบโตของ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ

4.2 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองภายใต้ภาวะการเจริญที่สมดุล

รัตนศิริ มุทิตากุล(2538) ได้คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต P(3HB) ได้จากแหล่งธรรมชาติ จำนวน 30 สายพันธุ์ คัดเลือกได้สายพันธุ์ BA-019 ซึ่งสามารถผลิต P(3HB) ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่นและสามารถจำแนกชนิดเป็น *Bacillus* sp. เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ และกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Bacillus* sp. ที่แยกได้ใหม่นี้สามารถใช้น้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต P(3HB) ได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่น และเมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM โดยใช้กากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถผลิต P(3HB) ได้ 31.84 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (1 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน

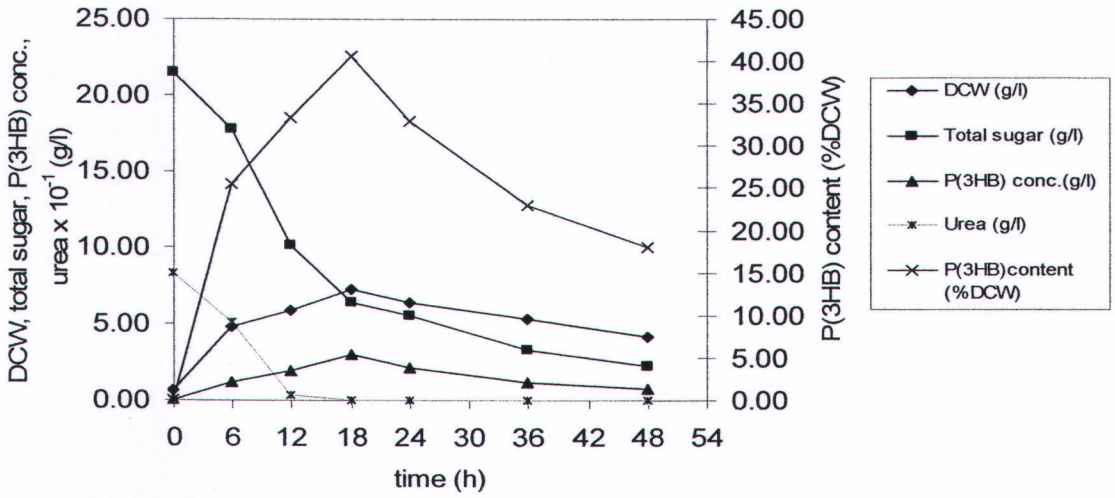
อติพล บุญเรืองถาวร(2543) ได้ศึกษาการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์และการผลิต P(3HB) โดยศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (แหล่งคาร์บอน,แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ) และภาวะการเลี้ยงเชื้อ พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิต P(3HB) ได้ดี โดยใช้กากน้ำตาลและยูเรียซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลทรายที่มีปริมาณน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร กากน้ำตาลให้ผลการเติบโตของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) ดีกว่าน้ำตาลทรายเท่ากับ 2.5 และ 4.0 เท่าตามลำดับ พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถใช้ยูเรียเพื่อการเติบโตของเซลล์และการผลิต P(3HB) ได้ดีกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นในงานวิจัยนี้สนใจที่จะใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต P(3HB) เพื่อทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลง เนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกมากในประเทศไทยและเป็นพืชที่สามารถตัดและเก็บเกี่ยวได้หลายครั้ง โดยในกระบวนการการผลิตน้ำตาลทรายจะใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบหลักและมีน้ำอ้อยเกิดขึ้นหลายขั้นตอน ซึ่งในน้ำอ้อยจะประกอบไปด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส (วิเคราะห์โดย HPLC) รวมทั้งวิตามิน และธาตุอาหารเป็นจำนวนมาก (มิตรผลวิจัย, 2551) ส่วนแหล่งไนโตรเจนเลือกใช้ยูเรีย เนื่องจากมีราคาถูกและให้ผลผลิตดีกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (อติพล บุญเรืองถาวร, 2543)

งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ปริมาณน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร (เทียบเท่ากับการใช้กากน้ำตาล) เพื่อศึกษาการผลิต P(3HB) ในภาวะการเจริญที่สมดุล จากผลการวิจัยการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้

ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2 พบว่าเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตรเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 7.23 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 2.94 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 40.69 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 18 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของยูเรียค่อยๆลดลงและหมดที่ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4.2 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	21.52±0.34	0.83±0.06	0.64±0.03	0.00	0.00
6	17.78±0.27	0.51±0.05	4.74±0.05	1.20±0.04	25.41±0.24
12	10.12±0.12	0.03±0.00	5.83±0.05	1.94±0.04	33.23±0.26
18	6.43±0.09	0.00±0.00	**7.23±0.05**	**2.94±0.04**	**40.69±0.35**
24	5.54±0.11	0.00±0.00	6.38±0.04	2.10±0.04	32.87±0.24
36	3.32±0.05	0.00±0.00	5.32±0.06	1.22±0.04	23.02±0.23
48	2.37±0.07	0.00±0.00	4.17±0.03	0.75±0.03	17.95±0.22



รูปที่ 4.2 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)

4.3 ศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารแต่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอที่มีต่อการเจริญการสังเคราะห์และสะสม P(3HB)

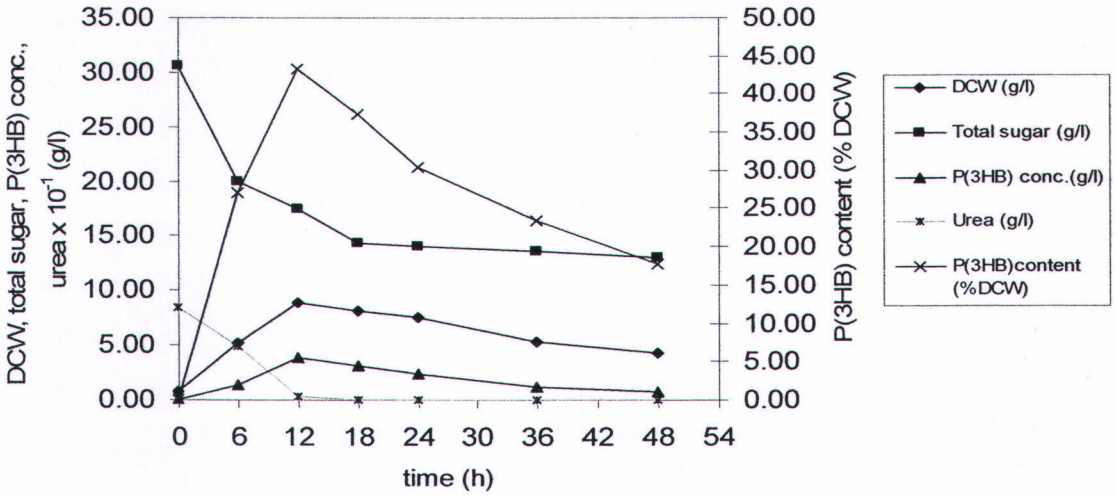
4.3.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต P(3HB)

Bosco และ Chiampo (2010) รายงานว่า การผลิต P(3HB) ให้ได้ประสิทธิภาพและมีราคาถูกลงขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก ปรับปรุงกระบวนการหมัก วิธีการ recovery และขั้นตอนการทำสารให้บริสุทธิ์ รวมถึงการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณสูง

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ได้ศึกษาความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกันโดยใช้ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.3-4.5 และรูปที่ 4.3-4.5 พบว่าเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตรเชื้อสามารถสังเคราะห์และสะสมP(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 8.92 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.85 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 43.16 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของยูเรียค่อยๆลดลงและหมดที่ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อโดยได้ผลดีกว่าภาวะการเจริญที่สมดุล และเมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเพิ่มขึ้นเป็น 40 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นแต่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ลดลง โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 11.09 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.78 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 34.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ 12 ชั่วโมง (40 กรัมต่อลิตร) และได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 13.31 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 1.56 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 11.70 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ 18 ชั่วโมง (50 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ (รูปที่ 4.6) ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 30 กรัมต่อลิตรใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.3 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 34 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)

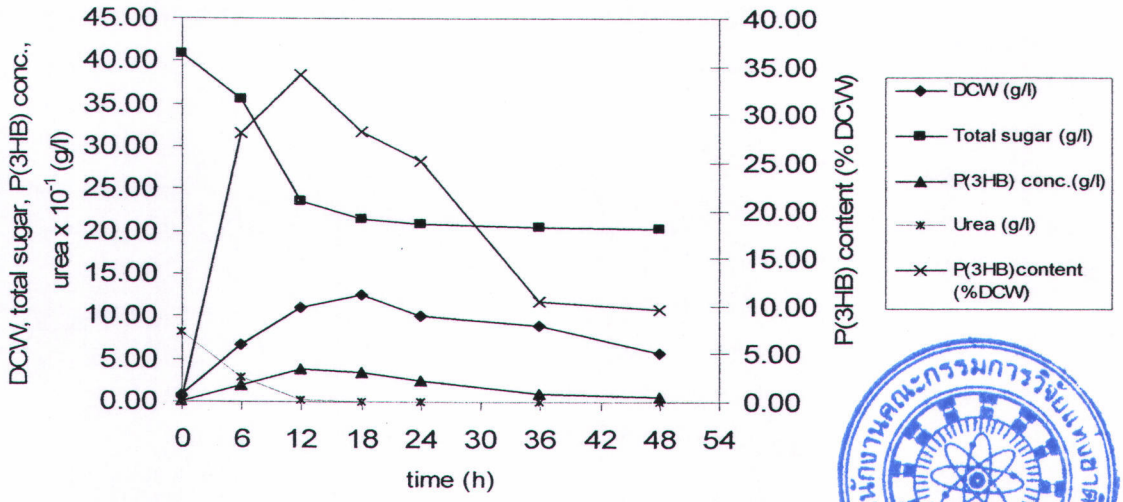
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.59±0.38	0.84±0.05	0.68±0.03	0.00	0.00
6	19.90±0.27	0.49±0.05	5.12±0.05	1.38±0.03	26.95±0.21
12	17.45±0.25	0.03±0.00	**8.92±0.04**	**3.85±0.02**	**43.16±0.39**
18	14.39±0.24	0.00±0.00	8.09±0.06	3.03±0.04	37.43±0.34
24	13.99±0.24	0.00±0.00	7.59±0.07	2.31±0.04	30.39±0.30
36	13.63±0.22	0.00±0.00	5.29±0.06	1.13±0.03	23.38±0.21
48	12.95±0.18	0.00±0.00	4.26±0.05	0.76±0.03	17.80±0.22



รูปที่ 4.3 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 34 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)

ตารางที่ 4.4 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 45 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)

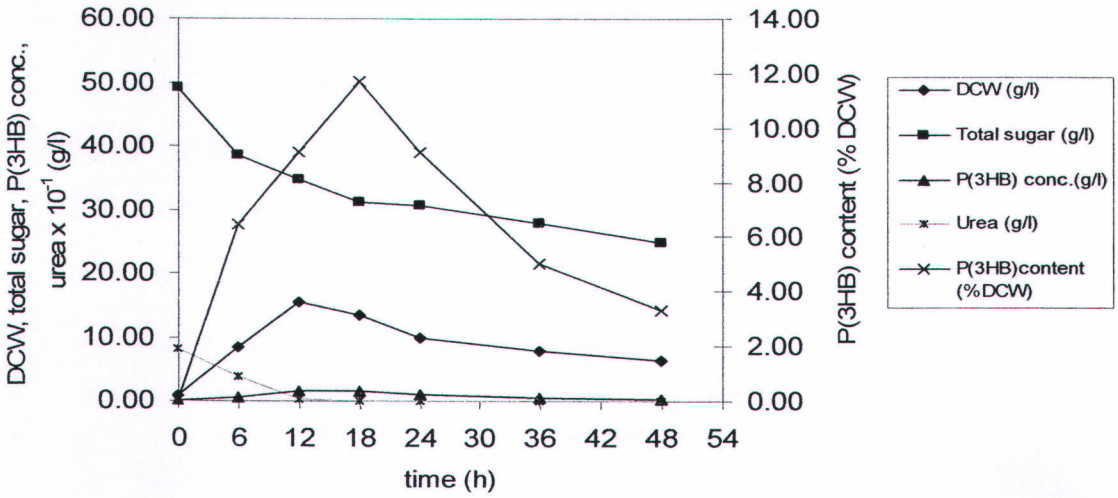
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	40.85±0.45	0.82±0.07	0.69±0.03	0.00	0.00
6	35.56±0.36	0.29±0.05	6.61±0.04	1.85±0.03	27.94±0.23
12	23.62±0.33	0.01±0.00	11.09±0.04	**3.78±0.04**	**34.12±0.34**
18	21.44±0.29	0.00±0.00	**12.44±0.07**	3.50±0.04	28.15±0.22
24	20.98±0.23	0.00±0.00	10.12±0.04	2.55±0.04	25.16±0.24
36	20.60±0.23	0.00±0.00	8.90±0.04	0.92±0.03	10.38±0.18
48	20.33±0.25	0.00±0.00	5.70±0.04	0.55±0.03	9.62±0.16



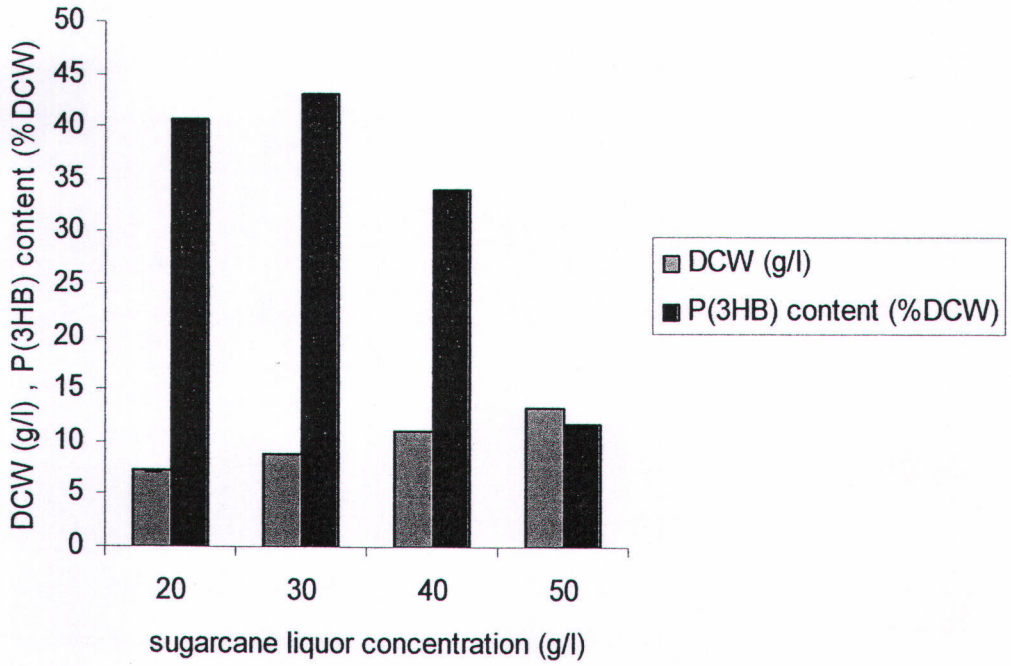
รูปที่ 4.4 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 45 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)

ตารางที่ 4.5 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 57 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	48.99±0.47	0.82±0.06	0.75±0.04	0.00	0.00
6	38.58±0.38	0.39±0.03	8.25±0.04	0.53±0.04	6.42±0.11
12	34.60±0.33	0.03±0.00	**15.48±0.03**	1.41±0.04	9.10±0.22
18	31.23±0.33	0.00±0.00	13.31±0.04	**1.56±0.03**	**11.70±0.26**
24	30.62±0.29	0.00±0.00	9.89±0.03	0.90±0.04	9.08±0.21
36	27.86±0.27	0.00±0.00	7.79±0.04	0.39±0.04	5.04±0.18
48	24.70±0.25	0.00±0.00	6.23±0.05	0.21±0.03	3.30±0.15



รูปที่ 4.5 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 57 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)



รูปที่ 4.6 ความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร

4.3.2 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจน

Pandian และคณะ(2010) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตของ P(3HB) โดยการกระตุ้นให้เซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้เพิ่มขึ้น โดยการให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ และจำกัดธาตุอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียมหรือโพแทสเซียม

Suzuki และคณะ(1986) รายงานว่า ชนิดของเกลือแอมโมเนียมไม่มีผลต่อการผลิต P(3HB) โดยปริมาณที่ได้มีค่าไม่แตกต่างกันมาก โดยใช้เชื้อ *Pseudomonas* sp. K ซึ่งเลี้ยงในระดับขวดเขย่าและใช้เกลือแอมโมเนียมทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) โซเดียมแอมโมเนียมโมโนไฮโดรฟอสเฟตเตตระไฮเดรต ($NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$) แอมโมเนียมไดไฮโดรฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$) แอมโมเนียมไฮโดรคาร์บอเนต (NH_4HCO_3) ไดแอมโมเนียมไดไฮโดรฟอสเฟต [$(NH_4)_2HPO_4$] แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) และศึกษาถึงผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ในเชื้อเดียวกันโดยเลี้ยงแบบ fed-batch พบว่าการจำกัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.0 มิลลิกัมกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) โดยได้ปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 52 เป็น 57 เปอร์เซ็นต่อน้ำหนักแห้ง

Daniel และคณะ(1992) รายงานว่า การจำกัดปริมาณแอมโมเนียมมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ในเชื้อ *Pseudomonas* 135 ในการเลี้ยงแบบ fed-batch โดยได้ปริมาณ P(3HB) เพิ่มขึ้นจาก 37 เป็นเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต่อน้ำหนักแห้ง และศึกษาผลของชนิดเกลือแอมโมเนียม ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไฮโดรคาร์บอเนต (NH_4HCO_3) และแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ในเชื้อเดียวกัน พบว่าได้ปริมาณ P(3HB) ไม่แตกต่างกัน

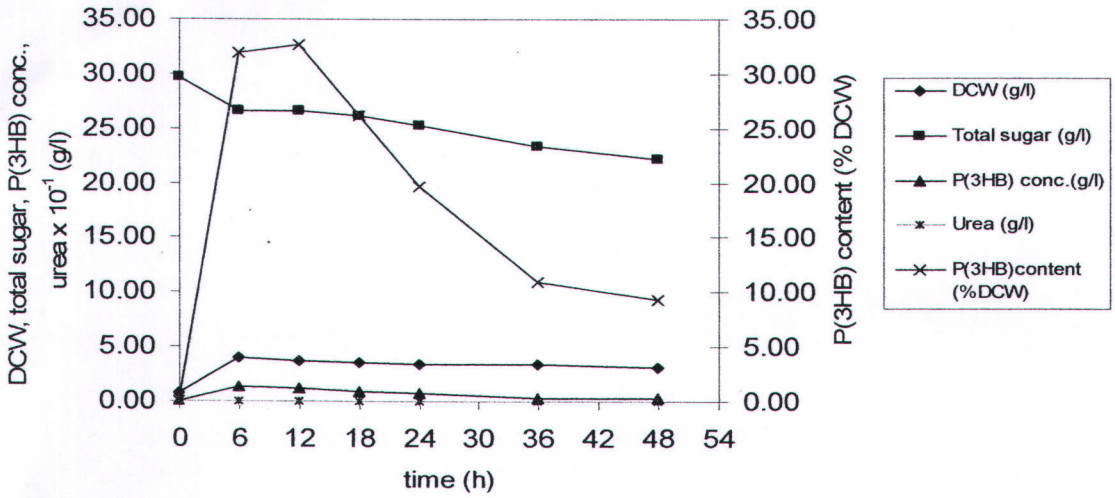
อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) รายงานว่า การศึกษาการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ในเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในการเลี้ยงระดับขวดเขย่า พบว่า การจำกัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) โดยได้ปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 19.20 เป็น 46.98 เปอร์เซ็นต่อน้ำหนักแห้ง

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจนในรูปของยูเรียในอาหาร MSM ที่มีผลต่อการผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมยูเรีย (N-free medium) โดยใช้ปริมาณคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้างต้น คือ 30 กรัมต่อลิตรส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม (สูตรอาหาร MSM) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.6-4.12 และรูปที่ 4.7-4.13 พบว่าเมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตรเชื้อสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 8.88 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.87 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 43.25 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของยูเรียค่อยๆลดลงและหมดที่ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้นลดลง คือ 0.6 0. 4 0.2 และไม่มีการเติมยูเรีย พบว่าทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลงอย่างชัดเจน โดยได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 32.63 38.06 38.71 และ 41.11 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้น 1.0 และ 1.2 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ปริมาณ P(3HB) ใกล้เคียงกัน คือ เท่ากับ 39.01 และ 38.91 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 4.14) ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกใช้ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตรในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.6 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมยูเรีย (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

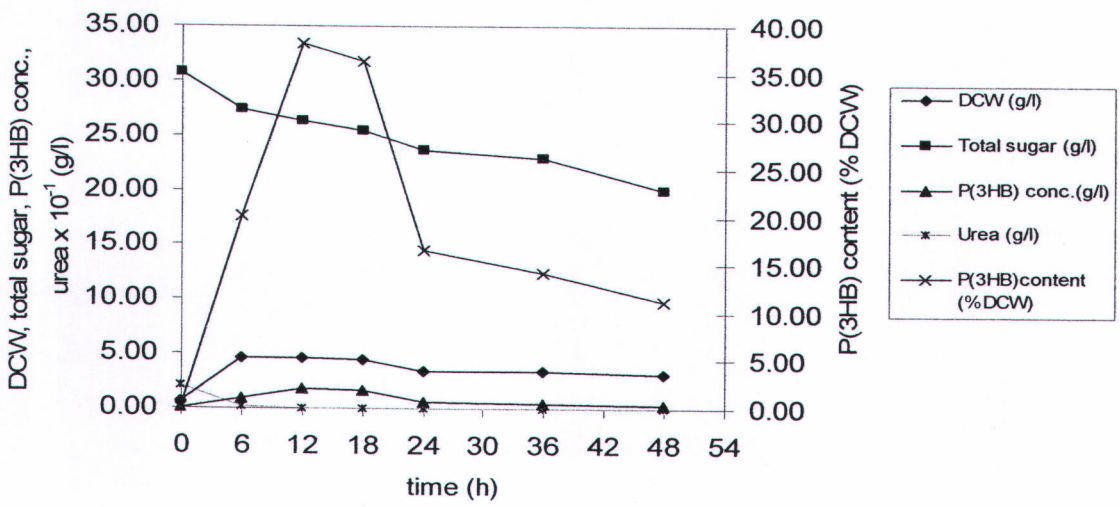
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	29.66±0.33	0.00±0.00	0.71±0.03	0.00	0.00
6	26.60±0.32	0.00±0.00	4.04±0.03	1.29±0.04	31.83±0.30
12	26.56±0.35	0.00±0.00	**3.62±0.04**	**1.18±0.03**	**32.63±0.26**
18	26.16±0.34	0.00±0.00	3.50±0.04	0.92±0.03	26.17±0.24
24	25.29±0.29	0.00±0.00	3.42±0.04	0.67±0.03	19.60±0.22
36	23.29±0.33	0.00±0.00	3.33±0.03	0.36±0.03	10.95±0.17
48	22.20±0.36	0.00±0.00	3.13±0.04	0.29±0.03	9.27±0.14



รูปที่ 4.7 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมยูเรีย (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.7 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

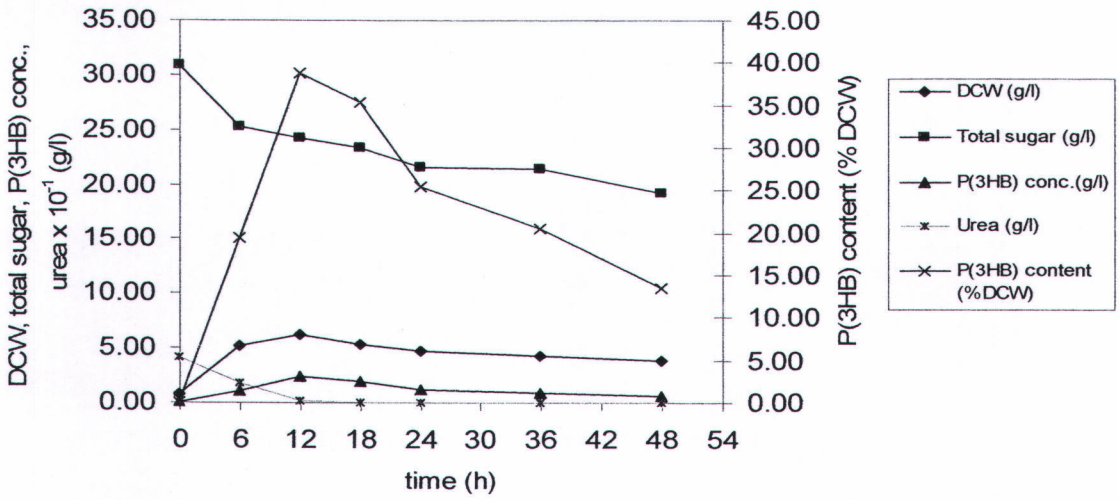
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.68±0.37	0.21±0.03	0.65±0.04	0.00	0.00
6	27.37±0.33	0.01±0.00	4.51±0.04	0.90±0.04	20.06±0.18
12	26.36±0.29	0.00±0.00	**4.64±0.03**	**1.77±0.03**	**38.06±0.38**
18	25.43±0.30	0.00±0.00	4.37±0.04	1.58±0.04	36.25±0.27
24	23.62±0.27	0.00±0.00	3.46±0.04	0.57±0.03	16.55±0.22
36	22.96±0.27	0.00±0.00	3.36±0.04	0.48±0.03	14.16±0.17
48	19.87±0.22	0.00±0.00	3.06±0.03	0.34±0.03	11.15±0.16



รูปที่ 4.8 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.8 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

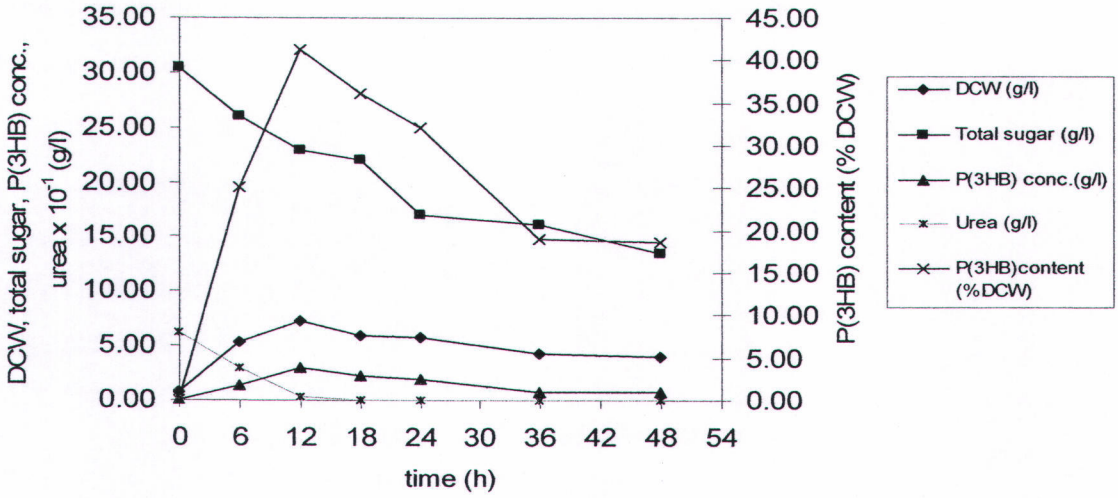
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.91±0.41	0.41±0.05	0.69±0.03	0.00	0.00
6	25.19±0.32	0.18±0.02	5.14±0.03	0.99±0.03	19.30±0.23
12	24.24±0.29	0.02±0.00	**6.24±0.04**	**2.42±0.03**	**38.71±0.31**
18	23.40±0.30	0.00±0.00	5.26±0.04	1.86±0.03	35.39±0.32
24	21.63±0.27	0.00±0.00	4.67±0.03	1.19±0.04	25.44±0.24
36	21.41±0.26	0.00±0.00	4.22±0.04	0.86±0.03	20.42±0.23
48	19.20±0.22	0.00±0.00	3.83±0.04	0.52±0.04	13.46±0.17



รูปที่ 4.9 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.9 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.6 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

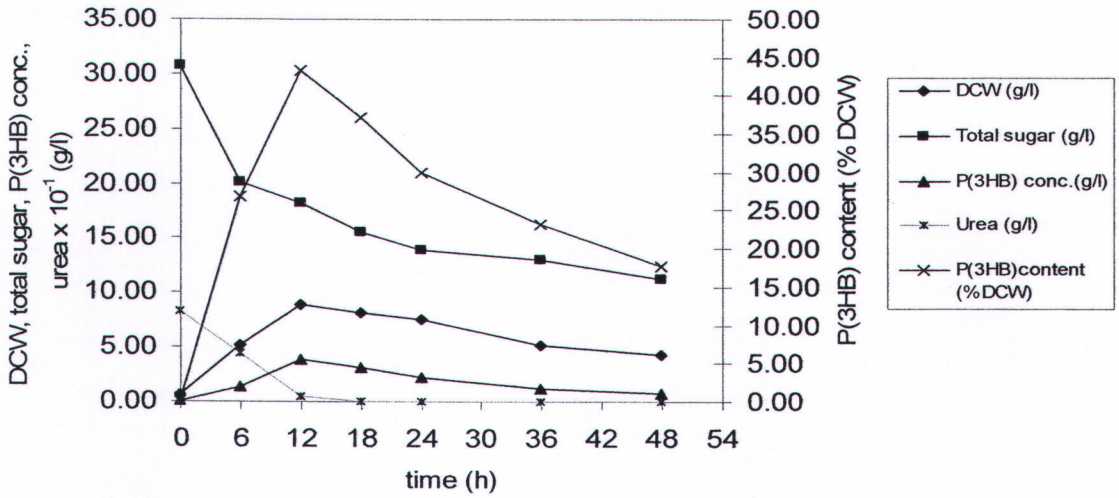
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.46±0.33	0.62±0.05	0.73±0.03	0.00	0.00
6	26.05±0.31	0.29±0.03	5.25±0.04	1.31±0.03	24.99±0.25
12	22.87±0.29	0.03±0.00	**7.17±0.04**	**2.95±0.04**	**41.11±0.46**
18	22.03±0.25	0.00±0.00	5.97±0.04	2.16±0.03	36.10±0.33
24	17.00±0.22	0.00±0.00	5.69±0.03	1.85±0.03	32.10±0.26
36	16.11±0.19	0.00±0.00	4.29±0.04	0.81±0.04	19.00±0.21
48	13.47±0.15	0.00±0.00	3.94±0.04	0.74±0.03	18.69±0.19



รูปที่ 4.10 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.6 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.10 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

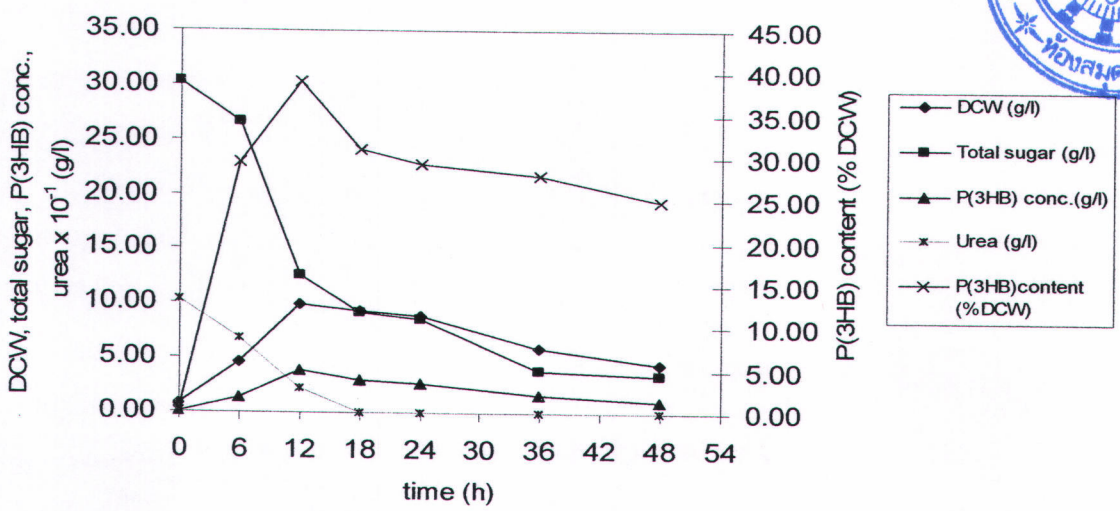
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.72±0.39	0.82±0.07	0.66±0.03	0.00	0.00
6	20.05±0.33	0.45±0.03	5.11±0.04	1.37±0.03	26.70±0.25
12	18.22±0.33	0.04±0.00	**8.88±0.03**	**3.87±0.05**	**43.25±0.37**
18	15.51±0.28	0.00±0.00	8.13±0.05	3.08±0.04	37.13±0.33
24	13.82±0.25	0.00±0.00	7.51±0.03	2.27±0.04	30.05±0.29
36	12.98±0.22	0.00±0.00	5.22±0.06	1.16±0.03	23.15±0.25
48	11.21±0.17	0.00±0.00	4.31±0.04	0.72±0.04	17.70±0.19



รูปที่ 4.11 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.11 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

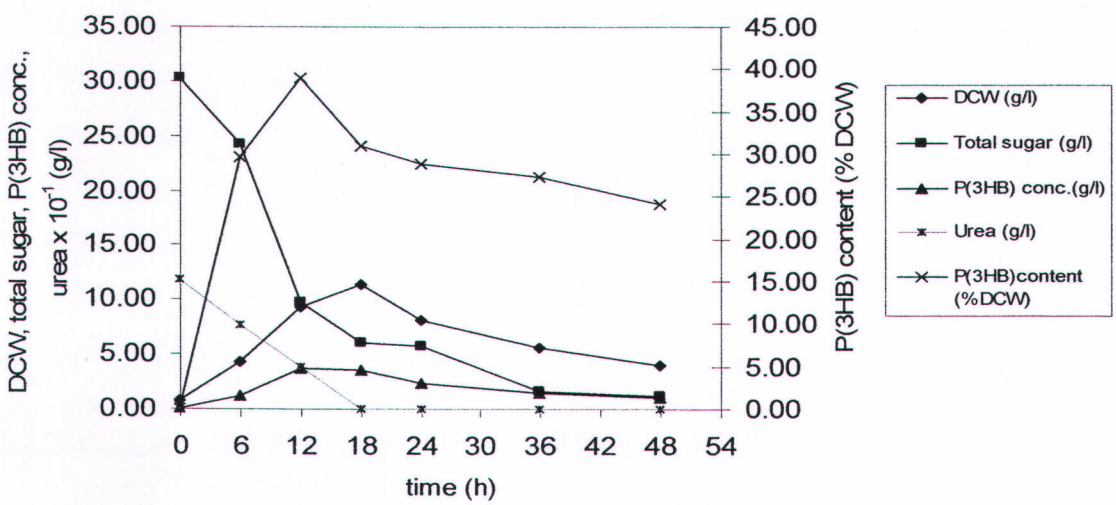
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.28±0.33	1.03±0.08	0.77±0.03	0.00	0.00
6	26.61±0.31	0.68±0.06	4.58±0.04	1.35±0.04	29.43±0.24
12	12.54±0.23	0.22±0.04	**9.85±0.03**	**3.84±0.03**	**39.01±0.32**
18	9.17±0.11	0.00±0.00	9.29±0.04	2.88±0.03	31.01±0.25
24	8.56±0.11	0.00±0.00	8.87±0.04	2.59±0.04	29.25±0.22
36	3.88±0.06	0.00±0.00	5.88±0.04	1.64±0.03	27.91±0.23
48	3.39±0.07	0.00±0.00	4.41±0.03	1.10±0.03	24.88±0.25



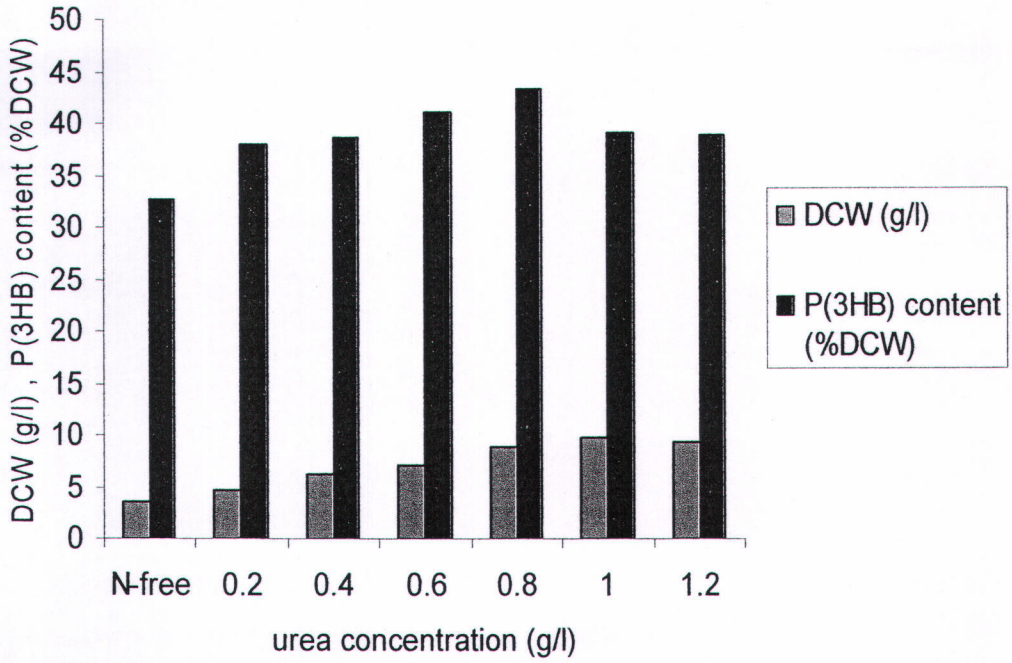
รูปที่ 4.12 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.12 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.2 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.31±0.39	1.18±0.07	0.73±0.04	0.00	0.00
6	24.16±0.33	0.77±0.07	4.24±0.04	1.25±0.03	29.58±0.25
12	9.79±0.14	0.39±0.03	9.30±0.04	**3.62±0.04**	**38.91±0.31**
18	6.12±0.11	0.00±0.00	**11.31±0.04**	3.50±0.04	30.97±0.24
24	5.81±0.09	0.00±0.00	8.13±0.04	2.35±0.03	28.90±0.27
36	1.62±0.03	0.00±0.00	5.55±0.04	1.52±0.03	27.37±0.25
48	1.13±0.04	0.00±0.00	4.05±0.04	0.98±0.03	24.18±0.26



รูปที่ 4.13 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.2 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)



รูปที่ 4.14 ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมยูเรีย

4.3.3 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณแมกนีเซียม

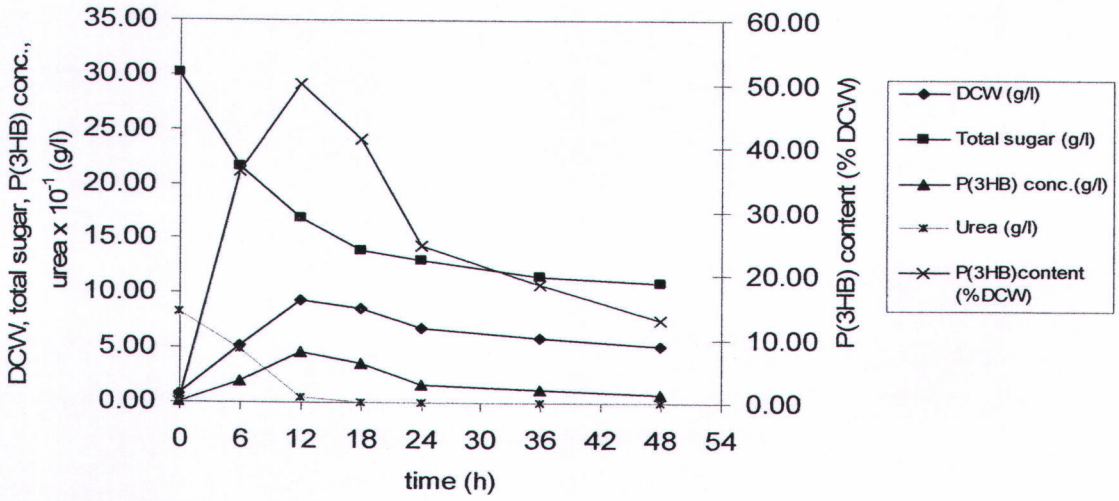
Daniel และคณะ(1992) รายงานว่า การจำกัดปริมาณแมกนีเซียมมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยเชื้อ *Pseudomonas* 135 พบว่าเมื่อไม่มีการเติมแมกนีเซียมในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟต ปริมาณ P(3HB) มีค่าเท่ากับ 42.50 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมีผลมากกว่าการจำกัดปริมาณแอมโมเนียม (37 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) และฟอสเฟต (34.5 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) รายงานว่า ผลของการจำกัดแมกนีเซียมในรูปแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ต่อมาภายหลังจัดจำแนกสปีชีส์เป็น *Alcaligenes eutropha* และเป็น *Ralstonia eutropha* และในปัจจุบันคือ *Cupriavidus necator* พบว่า อาหารที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตจะทำให้ปริมาณ P(3HB) เพิ่มขึ้นจาก 19.86 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเทียบกับอาหารสูตรที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร จะสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้เท่ากับ 37.70 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของการจำกัดปริมาณแมกนีเซียมในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ต่อการผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 0.2 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต โดยใช้ปริมาณคาร์บอนและยูเรียที่ได้จากการทดลองข้างต้น คือ 30 และ 0.8 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม (สูตรอาหาร MSM) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.13-4.15 และรูปที่ 4.15-4.18 พบว่าเมื่อใช้อาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 47.26 และ 43.50 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต เชื้อสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.23 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 4.60 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 49.96 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของยูเรียค่อยๆลดลงและหมดที่ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4.13 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

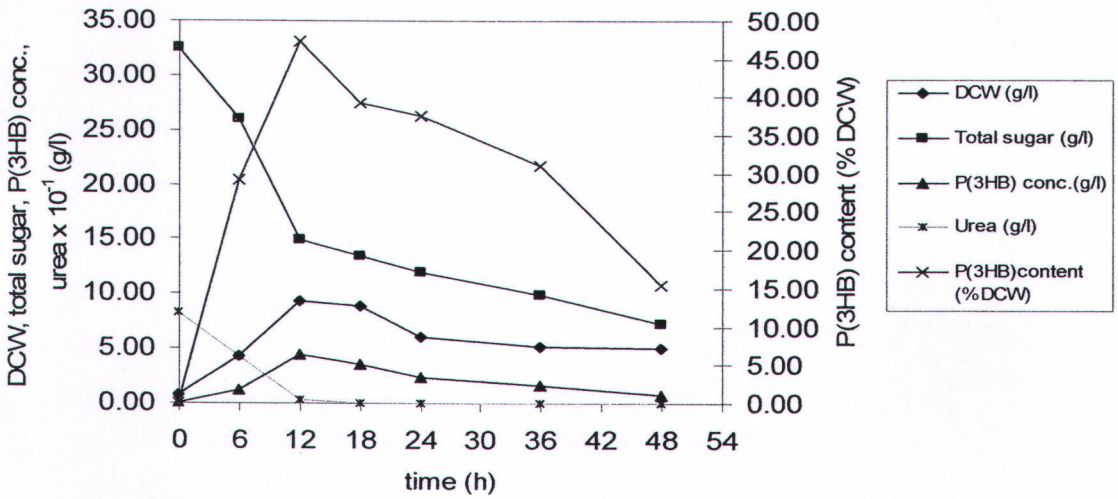
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.18±0.42	0.82±0.05	0.75±0.03	0.00	0.00
6	21.53±0.35	0.48±0.05	5.15±0.04	1.89±0.03	36.20±0.28
12	16.78±0.31	0.04±0.00	**9.23±0.05**	**4.60±0.03**	**49.96±0.30**
18	13.82±0.22	0.00±0.00	8.61±0.05	3.56±0.05	41.35±0.30
24	12.98±0.21	0.00±0.00	6.75±0.04	1.67±0.04	24.50±0.25
36	11.53±0.15	0.00±0.00	5.89±0.04	1.11±0.03	18.40±0.23
48	10.89±0.17	0.00±0.00	5.17±0.03	0.71±0.03	12.97±0.15



รูปที่ 4.15 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.14 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

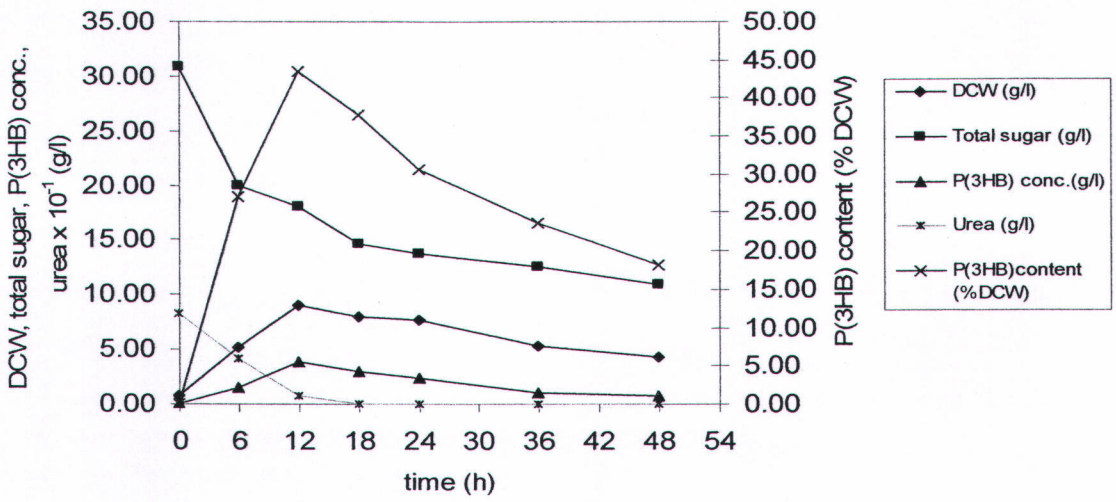
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	32.47±0.39	0.82±0.05	0.77±0.04	0.00	0.00
6	25.97±0.27	0.43±0.03	4.23±0.04	1.24±0.04	29.21±0.27
12	14.97±0.22	0.03±0.00	**9.26±0.03**	**4.38±0.05**	**47.26±0.30**
18	13.37±0.25	0.00±0.00	8.91±0.03	3.49±0.04	39.21±0.29
24	12.01±0.21	0.00±0.00	6.12±0.03	2.29±0.03	37.47±0.31
36	9.92±0.11	0.00±0.00	5.24±0.04	1.62±0.04	30.97±0.24
48	7.22±0.12	0.00±0.00	5.03±0.03	0.78±0.03	15.47±0.15



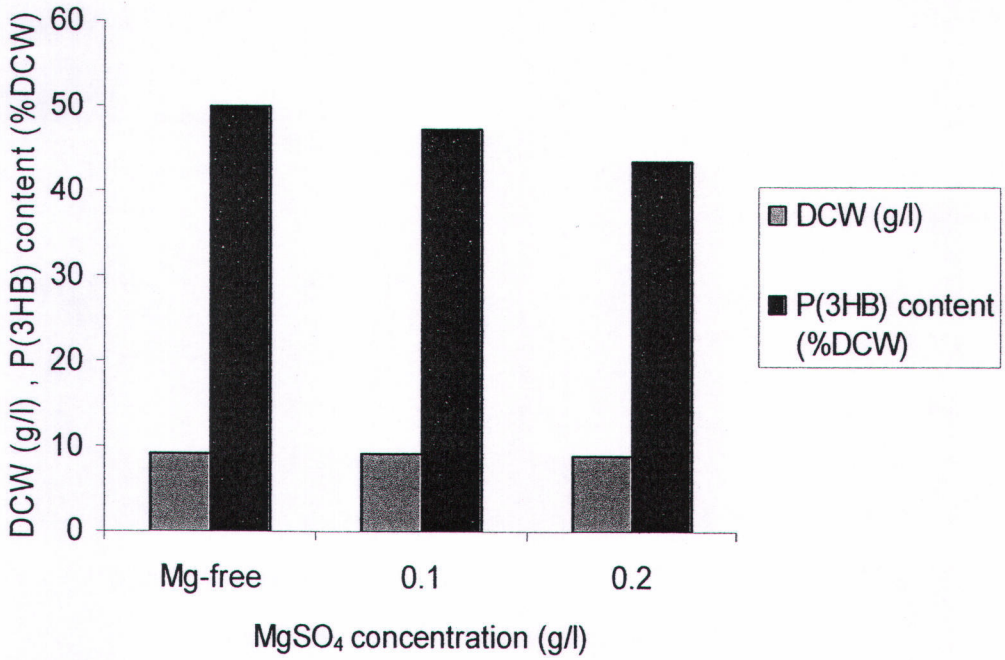
รูปที่ 4.16 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.15 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.81±0.42	0.82±0.07	0.67±0.03	0.00	0.00
6	19.98±0.27	0.42±0.05	5.17±0.03	1.41±0.04	27.10±0.23
12	17.95±0.25	0.07±0.00	**8.95±0.04**	**3.83±0.04**	**43.50±0.34**
18	14.59±0.23	0.00±0.00	8.02±0.05	3.01±0.04	37.80±0.31
24	13.77±0.24	0.00±0.00	7.62±0.04	2.35±0.03	30.50±0.30
36	12.55±0.24	0.00±0.00	5.33±0.05	1.10±0.04	23.55±0.22
48	10.95±0.22	0.00±0.00	4.22±0.05	0.78±0.03	18.05±0.22



รูปที่ 4.17 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)



รูปที่ 4.18 ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 0.2 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต

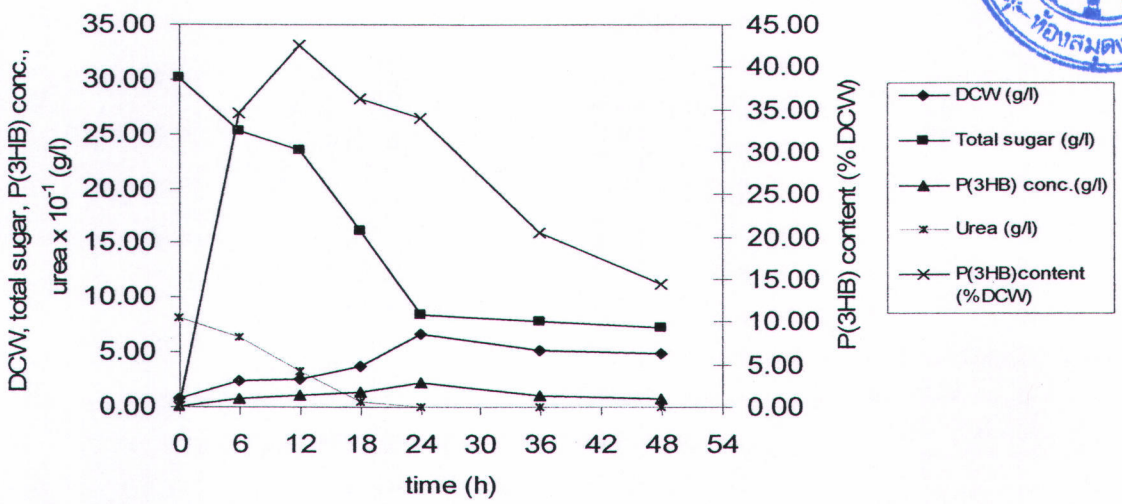
4.3.4 การศึกษาผลร่วมของการจำกัดโพแทสเซียมและฟอสเฟต

Daniel และคณะ(1992) รายงานว่า ศึกษาการจำกัดปริมาณฟอสเฟตมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* Z-I ในระดับถังหมัก พบว่าเมื่อจำกัดปริมาณฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีปริมาณเพียง 45 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณฟอสเฟตในสูตรอาหารเดิม ปริมาณ P(3HB) จะเพิ่มขึ้นจาก 9.9 เป็นเท่ากับ 23 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของการจำกัดโพแทสเซียมและฟอสเฟตในรูปของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ต่อการผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยใช้ปริมาณคาร์บอน ยูเรียและแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตที่ได้จากการทดลองข้างต้น คือ 30 0.8 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ตามลำดับ ส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม (สูตรอาหาร MSM) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.16-4.22 และรูปที่ 4.19-4.25 พบว่าเมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.21 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 4.62 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 50.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของยูเรียค่อยๆ ลดลงและหมดที่ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นลดลง คือ 1.5 1.0 0.5 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่าได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 46.60 41.48 39.81 และ 42.59 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเพิ่มขึ้น คือ 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 44.45 และ 38.36 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (รูปที่ 4.26) ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตรในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.16 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

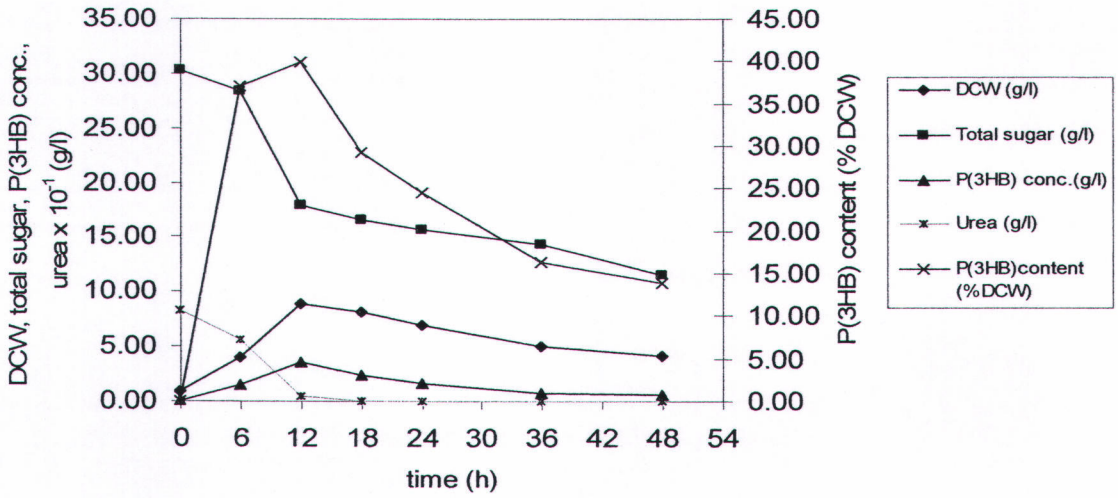
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.15±0.37	0.81±0.05	0.74±0.04	0.00	0.00
6	25.20±0.26	0.63±0.04	2.35±0.04	0.81±0.04	34.56±0.24
12	23.54±0.23	0.33±0.03	2.44±0.04	1.04±0.04	**42.59±0.34**
18	16.11±0.22	0.05±0.00	3.76±0.03	1.37±0.05	36.34±0.31
24	13.42±0.19	0.00±0.00	**6.67±0.03**	**2.26±0.04**	33.94±0.25
36	10.74±0.21	0.00±0.00	5.23±0.04	1.08±0.04	20.60±0.21
48	10.16±0.17	0.00±0.00	4.85±0.04	0.70±0.03	14.40±0.19



รูปที่ 4.19 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

ตารางที่ 4.17 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

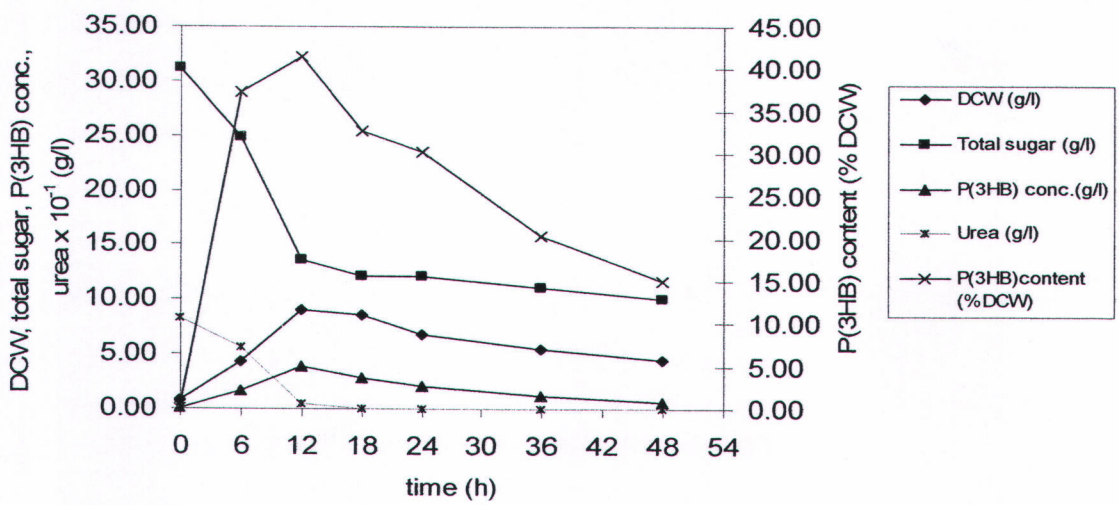
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.29±0.35	0.83±0.06	0.69±0.04	0.00	0.00
6	28.32±0.33	0.56±0.05	3.96±0.03	1.46±0.04	36.94±0.29
12	17.92±0.29	0.05±0.00	**8.82±0.03**	**3.51±0.03**	**39.81±0.36**
18	16.54±0.25	0.00±0.00	8.14±0.04	2.38±0.04	29.22±0.22
24	15.59±0.23	0.00±0.00	6.87±0.04	1.69±0.04	24.57±0.21
36	14.34±0.25	0.00±0.00	4.95±0.05	0.80±0.04	16.26±0.18
48	11.47±0.17	0.00±0.00	4.15±0.03	0.57±0.04	13.78±0.16



รูปที่ 4.20 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

ตารางที่ 4.18 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

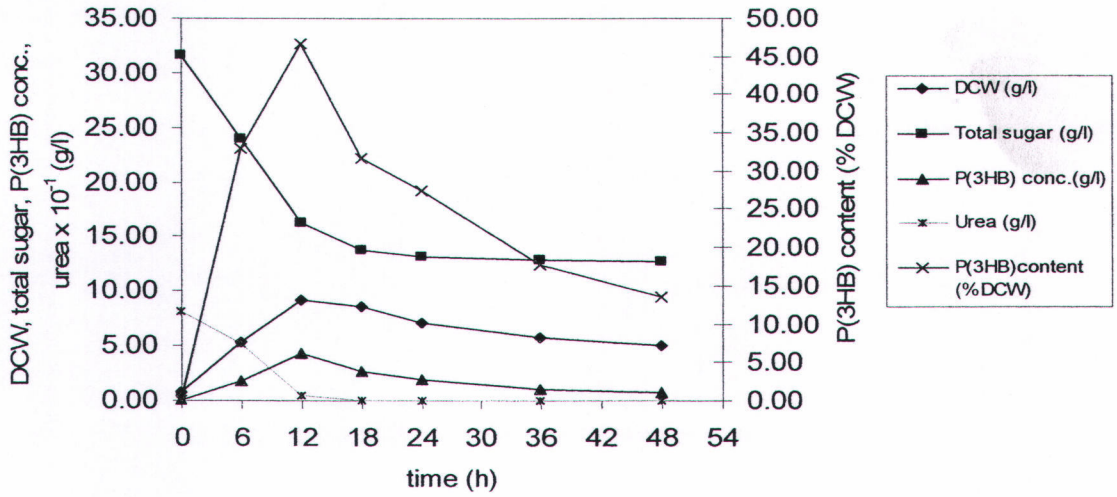
Time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	31.23±0.37	0.83±0.07	0.78±0.03	0.00	0.00
6	24.80±0.32	0.56±0.05	4.28±0.04	1.59±0.05	37.24±0.29
12	13.64±0.22	0.05±0.00	**8.95±0.05**	**3.79±0.02**	**41.48±0.33**
18	12.16±0.19	0.00±0.00	8.58±0.04	2.80±0.04	32.62±0.24
24	12.09±0.19	0.00±0.00	6.73±0.05	2.04±0.04	30.24±0.26
36	11.02±0.17	0.00±0.00	5.48±0.03	1.11±0.04	20.28±0.16
48	10.10±0.013	0.00±0.00	4.41±0.03	0.66±0.03	15.03±0.15



รูปที่ 4.21 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

ตารางที่ 4.19 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

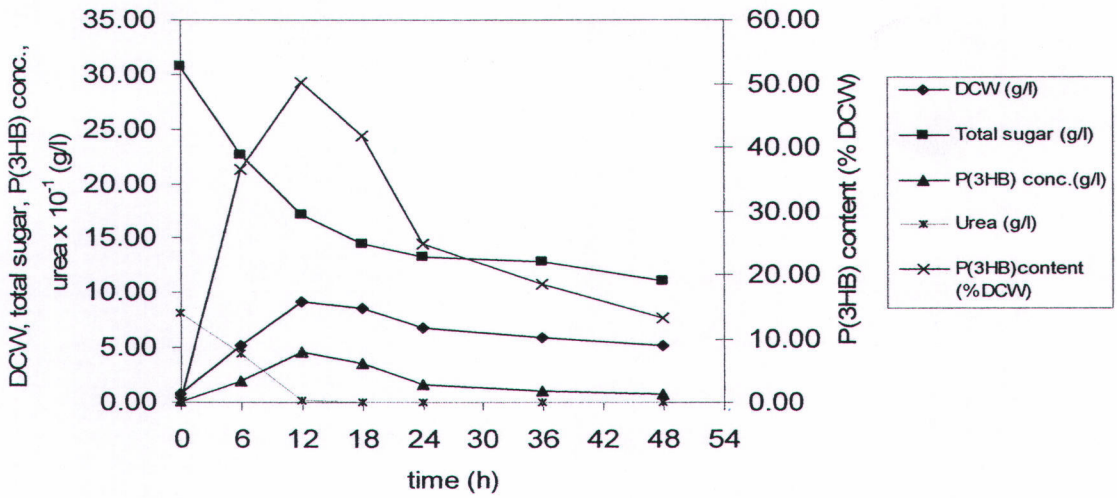
Time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	31.54±0.43	0.81±0.04	0.81±0.03	0.00	0.00
6	23.88±0.28	0.51±0.03	5.35±0.04	1.76±0.03	32.99±0.23
12	16.23±0.22	0.04±0.00	**9.09±0.04**	**4.24±0.03**	**46.60±0.30**
18	13.78±0.21	0.00±0.00	8.63±0.04	2.73±0.03	31.60±0.22
24	13.17±0.17	0.00±0.00	7.11±0.04	1.95±0.03	27.37±0.25
36	12.84±0.17	0.00±0.00	5.72±0.04	1.01±0.03	17.72±0.20
48	12.77±0.21	0.00±0.00	5.07±0.03	0.68±0.03	13.46±0.20



รูปที่ 4.22 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

ตารางที่ 4.20 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

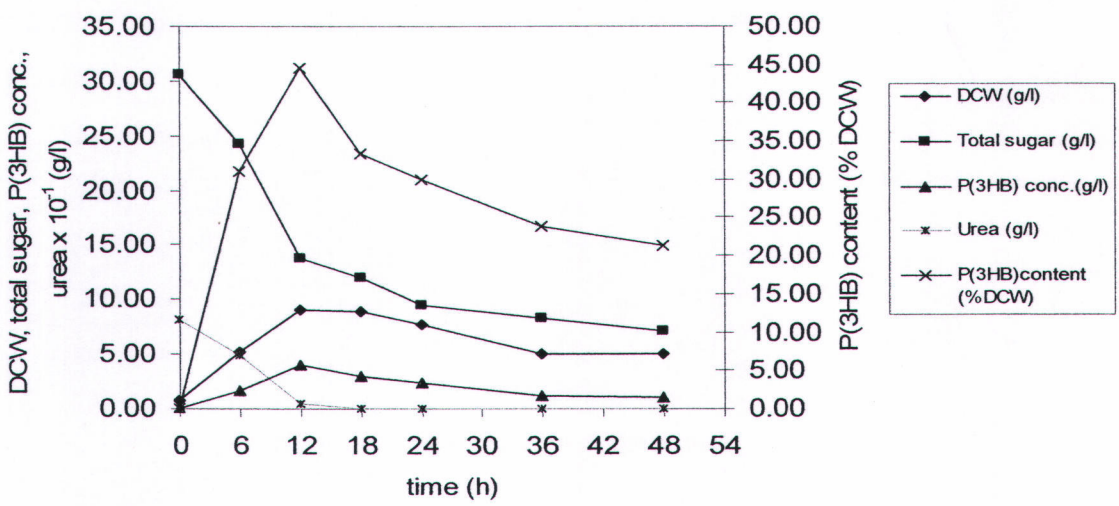
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.77±0.39	0.81±0.06	0.75±0.04	0.00	0.00
6	22.66±0.31	0.45±0.05	5.14±0.03	1.88±0.04	36.56±0.31
12	17.15±0.28	0.01±0.00	**9.21±0.04**	**4.62±0.04**	**50.12±0.34**
18	14.54±0.26	0.00±0.00	8.58±0.03	3.58±0.04	41.71±0.31
24	13.32±0.23	0.00±0.00	6.78±0.03	1.68±0.03	24.77±0.25
36	12.86±0.19	0.00±0.00	5.88±0.04	1.09±0.04	18.56±0.21
48	11.07±0.15	0.00±0.00	5.21±0.04	0.69±0.04	13.17±0.18



รูปที่ 4.23 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

ตารางที่ 4.21 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

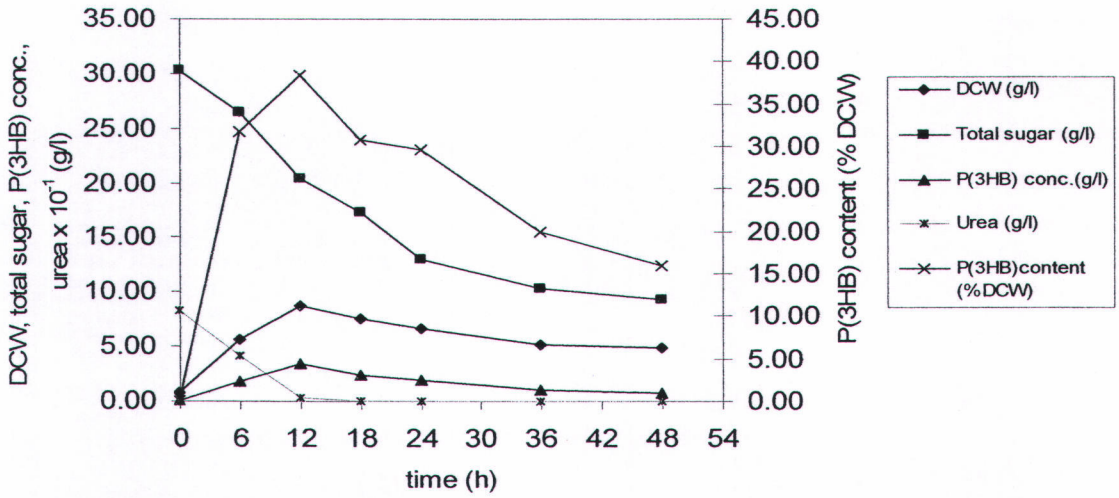
Time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.58±0.34	0.81±0.07	0.75±0.03	0.00	0.00
6	24.16±0.23	0.49±0.06	5.12±0.04	1.59±0.04	31.09±0.24
12	13.76±0.22	0.04±0.00	**9.04±0.04**	**4.02±0.04**	**44.45±0.33**
18	11.93±0.18	0.00±0.00	8.92±0.03	2.98±0.03	33.38±0.23
24	9.48±0.11	0.00±0.00	7.68±0.03	2.30±0.04	29.99±0.24
36	8.32±0.11	0.00±0.00	5.09±0.04	1.22±0.03	23.88±0.24
48	7.09±0.09	0.00±0.00	4.96±0.03	1.06±0.04	21.34±0.24



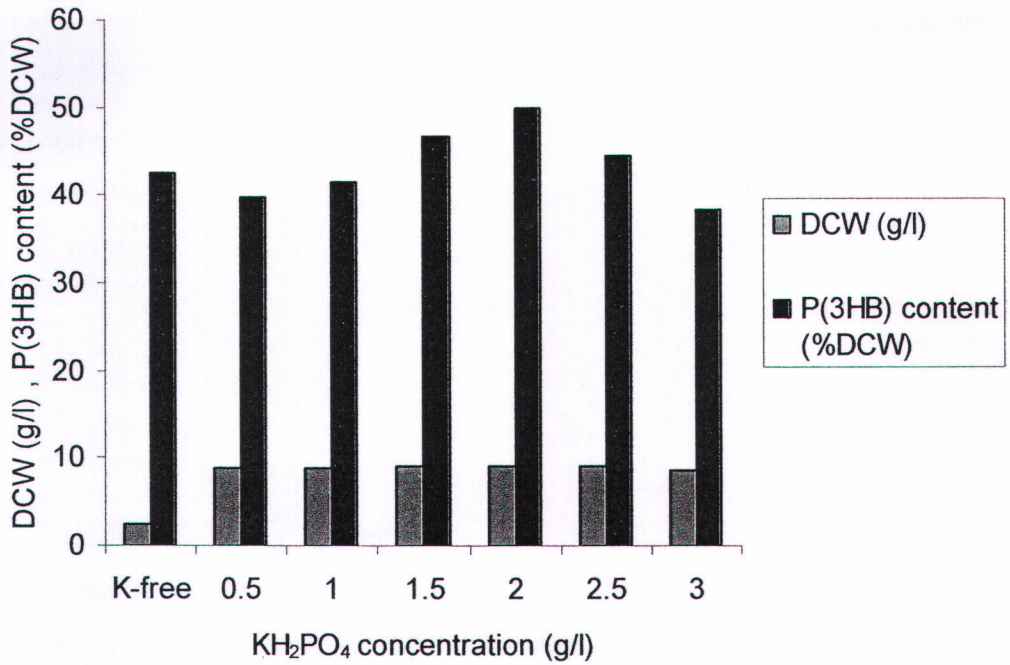
รูปที่ 4.24 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

ตารางที่ 4.22 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.24±0.42	0.83±0.06	0.71±0.04	0.00	0.00
6	26.37±0.25	0.42±0.04	5.56±0.04	1.76±0.03	31.62±0.28
12	20.39±0.25	0.03±0.00	**8.67±0.04**	**3.33±0.03**	**38.36±0.30**
18	17.23±0.22	0.00±0.00	7.53±0.04	2.32±0.03	30.77±0.29
24	13.01±0.13	0.00±0.00	6.68±0.04	1.98±0.04	29.63±0.28
36	10.37±0.11	0.00±0.00	5.21±0.04	1.04±0.04	20.01±0.20
48	9.25±0.09	0.00±0.00	4.87±0.04	0.77±0.04	15.89±0.15



รูปที่ 4.25 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)



รูปที่ 4.26 ความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

4.4 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

4.4.1 การผลิต P(3HB) จากน้ำอ้อย

Jiang และคณะ(2008) รายงานว่า *Pseudomonas fluorescens* A2a5 สามารถใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) และใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 32 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 22 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 70 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 96 ชั่วโมง และค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

งานวิจัยนี้ศึกษาผลการผลิต P(3HB) จากการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้จากข้างต้นและควบคุมภาวะการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงกล้าเชื้อให้ได้ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 3 ลิตร โดยเลือกภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) จากการทดลองข้างต้น ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ตลอดการเลี้ยงเชื้อ โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ตามลำดับ(อติพล บุญเรืองถาวร, 2543) เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.23 และรูปที่ 4.27 และคำนวณหาค่าอัตราการผลิต (productivity) (ตารางที่ 4.25) โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 9.61 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 42.52 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 6 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของยูเรียค่อยๆลดลงและหมดที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ

4.4.2 การผลิต P(3HB) จากกากน้ำตาล

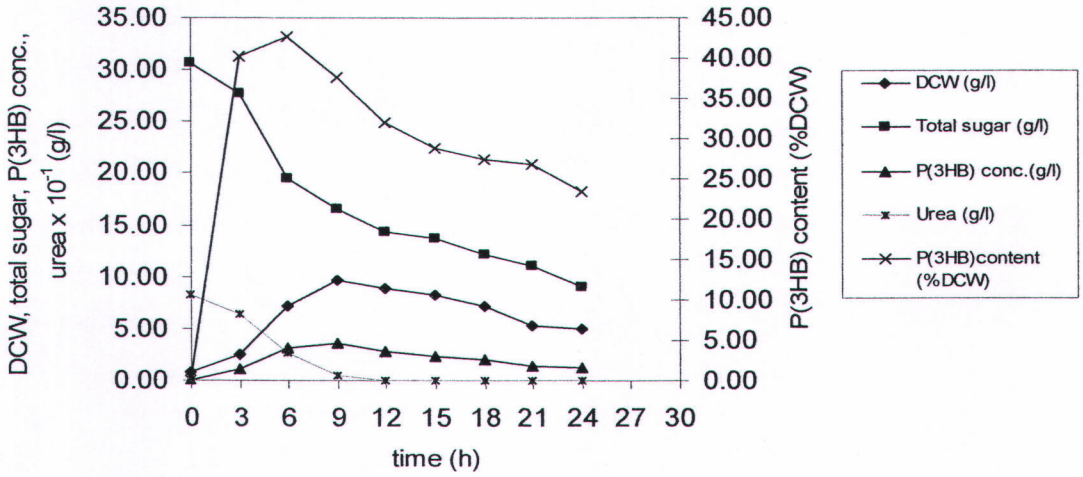
Kulpreecha และคณะ(2009) ศึกษาเพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์และเพิ่มการผลิต P(3HB) โดย *Bacillus megaterium* BA-019 ใช้กากน้ำตาลและยูเรียซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก โดยใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อโดยวิธี fed-batch เพื่อให้ได้ทั้งความหนาแน่นของเซลล์และอัตราการผลิต P(3HB) สูงขึ้น จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 แบบ fed-batch ที่มีการควบคุมการป้อนสารอาหารด้วยวิธี pH-stat พบว่าเมื่อใช้สารอาหารป้อนเข้าที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุให้ผลการเติบโตของเซลล์อย่างรวดเร็วและมีการผลิต P(3HB) เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยผลการทดลองที่ได้ดีกว่าการใช้สารอาหารป้อนเข้า

ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน หรือใช้แหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ผลการศึกษาพบว่าการใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 400 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมลในสารป้อนเข้า มีผลให้เพิ่มการผลิต P(3HB) และความหนาแน่นของเซลล์ โดยให้ความเข้มข้นของเซลล์ปริมาณสูงขึ้นมาก (72.57 กรัมต่อลิตร) ได้ปริมาณของ P(3HB) เท่ากับ 30.52 กรัมต่อลิตรคิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 42 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีอัตราการผลิต P(3HB) เพิ่มขึ้นเป็น 1.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

งานวิจัยนี้ศึกษาผลการผลิต P(3HB) จากการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้จากข้างต้นและควบคุมภาวะการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงกล้าเชื้อให้ได้ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 3 ลิตร โดยเลือกภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) จากการทดลองข้างต้น ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ตลอดการเลี้ยงเชื้อ โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ตามลำดับ(อติพล บุญเรืองถาวร, 2543) เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.24 และรูปที่ 4.28 และคำนวณหาค่าอัตราการผลิต (productivity) (ตารางที่ 4.25)โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.97 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.31 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 33.23 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 15 ชั่วโมง ความเข้มข้นของยูเรียค่อยๆลดลงและหมดที่ชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4.23 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร

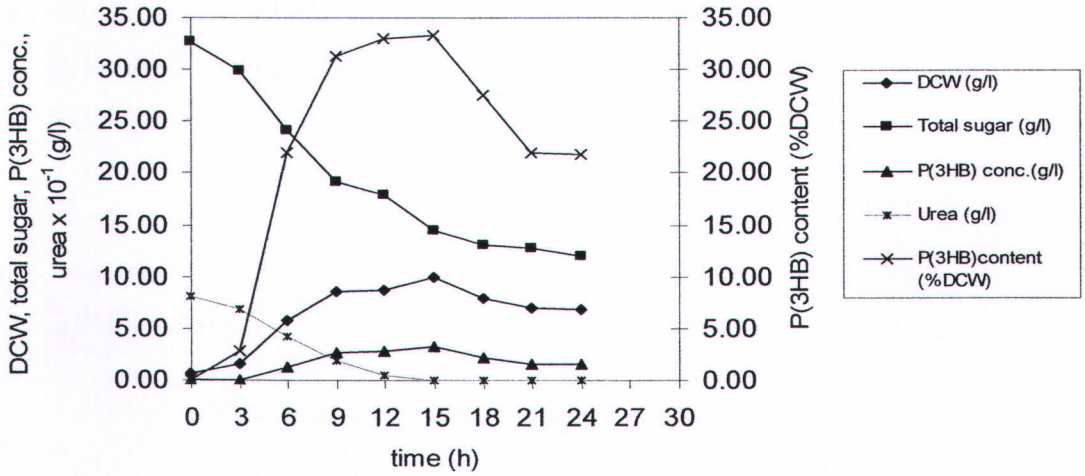
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.71±0.33	0.82±0.06	0.74±0.03	0.00	0.00
3	27.75±0.34	0.64±0.05	2.53±0.03	1.02±0.04	40.29±0.27
6	19.37±0.23	0.26±0.01	7.22±0.04	3.07±0.04	**42.52±0.26**
9	16.42±0.21	0.05±0.00	**9.61±0.04**	**3.61±0.04**	37.62±0.23
12	14.29±0.22	0.00±0.00	8.82±0.04	2.83±0.04	32.05±0.22
15	13.63±0.15	0.00±0.00	8.20±0.04	2.37±0.03	28.89±0.23
18	12.15±0.11	0.00±0.00	7.09±0.03	1.95±0.03	27.48±0.20
21	11.00±0.09	0.00±0.00	5.22±0.04	1.40±0.04	26.84±0.21
24	9.08±0.09	0.00±0.00	5.02±0.03	1.18±0.03	23.44±0.21



รูปที่ 4.27 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 4.24 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร

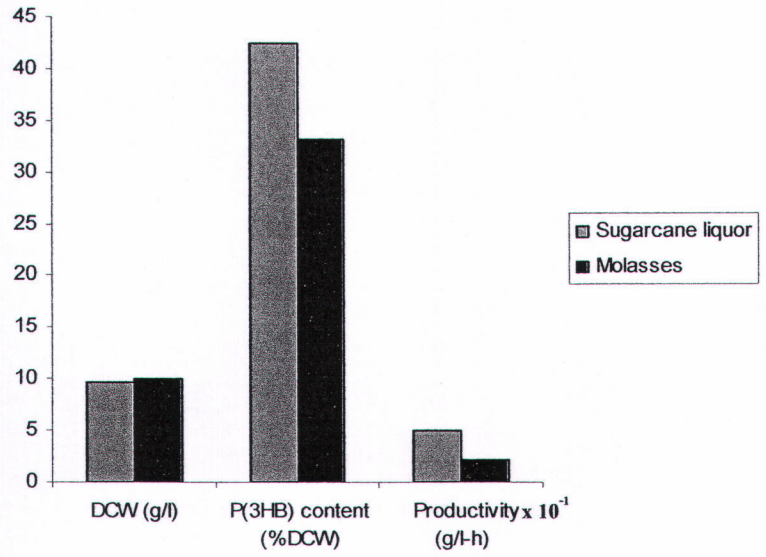
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	32.64±0.37	0.81±0.05	0.69±0.03	0.00	0.00
3	29.93±0.35	0.68±0.05	1.49±0.04	0.04±0.03	2.79±0.22
6	24.09±0.31	0.42±0.02	5.72±0.03	1.26±0.04	21.95±0.22
9	19.10±0.024	0.18±0.01	8.59±0.04	2.68±0.03	31.22±0.26
12	17.96±0.22	0.04±0.00	8.67±0.03	2.86±0.03	32.97±0.24
15	14.53±0.19	0.00±0.00	**9.97±0.04**	**3.31±0.04**	**33.23±0.25**
18	13.11±0.17	0.00±0.00	7.90±0.03	2.17±0.04	27.50±0.25
21	12.73±0.15	0.00±0.00	6.97±0.04	1.52±0.03	21.87±0.23
24	11.97±0.11	0.00±0.00	6.82±0.03	1.49±0.04	21.79±0.22



รูปที่ 4.28 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 4.25 ค่าอัตราการผลิต เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยและกากน้ำตาลความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร

time (h)	Sugarcane liquor P(3HB) productivity (g/l-h)	Molasses P(3HB) productivity (g/l-h)
0	0.00	0.00
3	0.34	0.01
6	0.51	0.21
9	0.40	0.30
12	0.24	0.24
15	0.16	0.22
18	0.11	0.12
21	0.07	0.07
24	0.05	0.06



รูปที่ 4.29 ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณ P(3HB) และค่าอัตราการผลิตสูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยและกากน้ำตาลความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร