บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

1. การเจริญของ *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำ

จากการทรีตแบคทีเรียด้วยรังสีแกมมา ใช้สาร 2-aminoanthracene (2-AA) และรังสีแกมมาร่วมกับใช้สาร 2-AA สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสม PHB ภายในเซลล์ได้สูงคือ แบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA พบว่าแบคทีเรียผลิตมวลเซลล์และ PHB ได้เท่ากับ 1.50 และ 0.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นการสะสมร้อยละ 40 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งจากรายงานของ Kim et al. (1993) พบว่าแบคทีเรีย *Alcaligenes eutrophus* เป็นแบคทีเรียสามารถเจริญได้ง่ายในสูตรอาหารทั่วไป และมีการเก็บสะสม PHA ไว้เป็นจำนวนมากคิดเป็นร้อยละ 80 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อศึกษาการผลิต PHB โดยเลี้ยง *A. eutrophus* แบบกึ่งกะที่มีการควบคุมความเข้มข้นของปริมาณกลูโคส พบว่า เชื้อสามารถเก็บสะสม PHB ไว้ภายในเซลล์สูงถึงร้อยละ 73

เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 (สายพันธุ์เดิม), *A. lactus* TISTR 1403/2AA และ *A. lactus* TISTR 1403/ γ พบว่า *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA สามารถผลิต PHB ได้ดีกว่า สอดคล้องกับรายงานของ Hikmet et al. (2003) ทำการทรีตแบคทีเรียเพื่อผลิต PHB ได้แก่ *Bacillus megaterium* Y6, *B. subtilis* K8, *B. sphaericus* X3 และ *B. firmus* G2 โดยใช้สาร acriflavine และ 5- bromourasil พบว่าแบคทีเรียที่ได้รับสารเคมีสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ส่วน Divyashree et al. (2009) ศึกษาการเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus flexus* โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำ *B. flexus* ที่ผ่านการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 5, 10, 20 และ 40 kGy พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 45 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และช่วยให้น้ำหนักโมเลกุลของ PHB เพิ่มสูงขึ้นจาก 1.5×10^5 ถึง 1.9×10^5 พร้อมทั้งยังเพิ่มความทนแรงดึงจาก 18 ถึง 20 เมกะปาสกาล (MPa) หลังจากได้รับรังสีปริมาณ 10 kGy ดังนั้นวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์สามารถช่วยทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHB ได้ปริมาณเพิ่มขึ้น

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB

2.1 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของ *A. lactus* TISTR 1403 / γ-2AA

จากการเลี้ยงแบคทีเรียในสูตรอาหารดัดแปลงสำหรับผลิต PHB โดยใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน พบว่าการใช้ซูโครส ซูโครสทางการค้า (น้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล) และไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตสและส่วนของเด็กซ์ทรินผสมกันอยู่ ช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียมีการเจริญที่ดีและผลิต PHB ได้ปริมาณสูงคิดเป็นร้อยละ 72.53, 80.67 และ 83.18 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Yükseckdağ et al. (2004) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต PHB ของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* 25 และ *Bacillus megaterium* 12 โดยใช้กลูโคส ซูโครส อะราบิโนส แมนนิทอล พบว่าการใช้กลูโคสแบคทีเรีย *B. subtilis* 25 และ *B. megaterium* 12 ผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 0.24 และ 0.31 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 19.51 และ 19.49 และมากกว่ารายงานของ Ramsay et al. (1990) ศึกษาการเลี้ยง *A. lactus* ATCC 29714 โดยใช้ซูโครสพบว่าสามารถสะสม PHB ได้สูงสุดร้อยละ 40

การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) ค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) :ซึ่งมีความสำคัญเพื่อใช้เป็นประโยชน์สำหรับการขยายขนาดการผลิตในระดับอุตสาหกรรม (เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, 2551) จากการคำนวณพบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ส่งผลให้แบคทีเรียผลิดมวลเซลล์แห้งและ PHB ได้แตกต่างกัน โดยการเลี้ยงแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ในอาหารที่ใช้น้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุดเท่ากับ 0.63 และ 0.54 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ตามลำดับ สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) พบว่ามีค่าสูงสุดเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 0.97 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นซูโครสจึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับลิต PHB เนื่องจากแบคทีเรียสามารถสะสม PHB ภายในเซลล์ได้ดีที่สุด โดยพบว่าในธรรมชาติแบคทีเรีย *A. lactus* สามารถเจริญเติบโตและใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB ได้ดี (Wang et al., 1997; Lee, 1996)

จากเป้าหมายของการศึกษาที่ต้องการนำวัตถุดิบที่มีราคาถูกมาใช้ประโยชน์เช่น แป้งมันสำปะหลัง กากน้ำตาล ซูโครส หางนม กรดไขมัน กลีซอรอล ของเสียจากกระบวนการบำบัดน้ำ วัสดุจำพวกเซลลูโลสและน้ำตาลที่ได้จากการสลายเฮมิเซลลูโลส ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลัง และกากมัน เป็นต้น เพื่อช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิตพลาสติกชีวภาพ

(Leda et al., 2009; Nath et al., 2008) ในงานวิจัยจึงนำกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง โดยผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากากมันสำปะหลังสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนสำหรับผลิต PHB ได้ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 0.72 กรัมต่อลิตรและมีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุดเท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีการสะสม PHB ได้คิดเป็นร้อยละ 57.60 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

2.2 ผลความเข้มข้นของไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีกายภาพของกากมันสำปะหลัง พบว่ายังคงมีส่วนของแป้งหลงเหลืออยู่มาก สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ จากการเลี้ยงแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 30, 40, 50, 60 และ 70 ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นเริ่มคงที่และลดลง ซึ่งเมื่อการเจริญของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลจะมีค่าลดลงเช่นเดียวกัน เนื่องมาจากแบคทีเรียนำน้ำตาลไปใช้เพื่อการเจริญและสังเคราะห์ PHB โดยดึงไปใช้ผ่านวิถีเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตเพื่อสังเคราะห์ acetyl-CoA จากนั้น acetyl-CoA ก็จะถูกส่งเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ เพื่อให้ได้ PHB ส่งผลทำให้ปริมาณน้ำตาลลดลงในระหว่างการเจริญ (Verlinden et al., 2007)

จากการศึกษาแบคทีเรียผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเข้มข้นร้อยละ 30 เท่ากับ 2.08 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือร้อยละ 70, 50, 40 และ 60 มีค่าเท่ากับ 2.00, 1.66, 1.61 และ 1.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 แบคทีเรียผลิต PHB ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 1.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 94.73 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 30, 40, 60 และ 70 มีค่าใกล้เคียงกัน เท่ากับ 0.72, 0.64, 0.71 และ 0.61 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 57.60, 39.75, 49.65 และ 46.56 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งมากกว่ารายงานของ Quillaguaman et al. (2005) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Halomonas boliviensis* โดยใช้ไฮโดรไลเซทของแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียผลิต PHB ได้สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 56 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งต่างจากงานวิจัยของ Arun et al. (2006) ศึกษาการผลิต PHB จากแบคทีเรีย *A. eutrophus* โดยใช้ชานอ้อยความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิต PHB ได้ร้อยละ 0.28 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และการศึกษาของ Silva et al. (2004) นำไฮโดรไลเซทของเซลลูโลสมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA จากแบคทีเรีย

Burknolderia cepacia IPT 048 และ *Burknolderia sacchari* IPT 101 พบว่าสามารถผลิต PHA ได้ปริมาณสูงร้อยละ 53 และ 62 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 50 มีความเหมาะสมสำหรับการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน นอกจากสามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณสูงยังมีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) ค่าสูงสุดเท่ากับ 0.34 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุดเท่ากับ 1.79 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการทดสอบการผลิต PHB ภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง พบว่าโดยใช้การย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วย sudan black B พบว่าแบคทีเรียสามารถย้อมติดสีของ sudan black B แสดงว่าแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิต PHB ภายในเซลล์ได้

2.3 ผลแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์

แหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิต PHB ของจุลินทรีย์ (Omar et al., 2001) ในการศึกษาจึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมอะซิเตรต และยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน พบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 / γ-2AA ในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน แบคทีเรียสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 6.60, 5.37, 2.55, 2.14, 1.17 และ 0.95 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 2.08, 1.61, 1.17, 1.65, 0.65 และ 0.30 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมอะซิเตรต ยูเรีย และในชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน คิดเป็นร้อยละ 39.61, 29.98, 70.05, 75.68, 55.55 และ 69.76 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งต่างกับงานวิจัยของ Mona et al. (2001) เลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* ในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน พบว่าการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมอะซิเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมออกซาเลต และแอมโมเนียมฟอสเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ช่วยให้เกิดการสะสม PHB ภายในเซลล์คิดเป็นร้อยละ 38.42, 24.71, 22.71, 20.60, 21.39 และ 22.77 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5-1 และรายงานของ Seo et al. (1998) เลี้ยงแบคทีเรีย *A. eutrophus* ATCC 17699 ในแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน พบว่าการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมฟอสเฟต และ แอมโมเนียมซัลเฟต แบคทีเรียสามารถสะสม PHB ภายในเซลล์คิดเป็นร้อยละ 20.3, 19.5 และ 21.5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และมากกว่าการศึกษาของ Khanna and Srivastana (2005) ได้เลี้ยงแบคทีเรีย

R. eutropha NRRLB14690 ในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรีย และแอมโมเนียมคลอไรด์ พบว่าแบคทีเรียสามารถสะสม PHB ภายในเซลล์คิดเป็นร้อยละ 39, 26, 48.5 และ 30.45 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนการศึกษาของ Wang and Lee (1997) เลี้ยงแบคทีเรีย *A. latus* DSM1123 ในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าแบคทีเรียสามารถสะสม PHB ภายในเซลล์คิดเป็นร้อยละ 80 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ตารางที่5-1)

จากการศึกษาพบว่าการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียผลิตมวลเซลล์ได้สูง แต่ไม่ส่งเสริมให้แบคทีเรียสะสม PHB ภายในเซลล์เช่นเดียวกันกับการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเมื่อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุดเท่ากับ 1.56 และ 0.45 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป แต่พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมอะซิเตรต แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดีและส่งเสริมให้สะสม PHB ภายในเซลล์ได้สูง ซึ่งในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมอะซิเตรต และแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.90 และ0.70 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ 5-1 เปรียบเทียบผลผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้

สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณ PHB (%)	แหล่งอ้างอิง
A. lactus TISTR 1403/ γ-2AA	ชุดควบคุม (ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน)	69.76	This study
	แอมโมเนียมซัลเฟต	70.05	
	แอมโมเนียมคลอไรด์	29.98	
	แอมโมเนียมไนเตรท	39.61	
	แอมโมเนียมอะซิเตรต	75.68	
	ยูเรีย	55.55	
Bacillus megaterium	แอมโมเนียมคลอไรด์	38.42	Mona et al. (2001)
	แอมโมเนียมฟอสเฟต	21.39	
	แอมโมเนียมซัลเฟต	20.60	
	แอมโมเนียมไนเตรท	24.71	
	แอมโมเนียมอะซิเตรต	22.71	
	แอมโมเนียมออกซาเลต	22.77	
A. eutrophus ATCC 17699	แอมโมเนียมคลอไรด์	20.3	Seo et al. (1998)
	แอมโมเนียมฟอสเฟต	19.5	
	แอมโมเนียมซัลเฟต	21.5	
A. latus DSM1123	แอมโมเนียมซัลเฟต	80	Wang and Lee (1997)
R. eutropha NRRLB14690	แอมโมเนียมซัลเฟต	39	Khanna and Srivastana (2005)
	แอมโมเนียมไนเตรท	26	
	ยูเรีย	48.5	
	แอมโมเนียมคลอไรด์	30.45	

2.4 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์

ในการศึกษาผลของอัตรส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมพบว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างกัน ส่งผลให้การเจริญของ*A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA แตกต่างกัน พบว่าเมื่อเลี้ยง *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ในอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15 มีค่าการเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง รองลงมาคือใน

อัตราส่วน 21.4, 30, 60 และ 300 ตามลำดับ ส่วนในชุดควบคุมแบคทีเรียสามารถเจริญได้น้อยกว่าชุดทดลองอื่น ๆ อาจเนื่องจากความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมและความสามารถในการแตกตัวของเกลือแอมโมเนียมที่แตกต่างกัน แบคทีเรียจึงมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เพราะความสามารถในการดูดซึมไนโตรเจนแตกต่างกัน (Grothe et al.,1999)

จากการศึกษาพบว่าอัตราส่วน C:N เท่ากับ 15 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 4.44 และ 2.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง C:N เท่ากับ 300, 60, 30, 21.4 และ 15 แบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA มีการสะสม PHB ภายในเซลล์ได้ใกล้เคียงกัน เท่ากับร้อยละ 59.19, 54.41, 57.63, 63.31 และ 58.55 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ จากผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumar et al. (2004) ศึกษาการผลิต PHB จากกลุ่มจุลินทรีย์ระบบตะกอนเร่งโรงงานผลิตอาหารความเข้มข้นตะกอนเริ่มต้นเท่ากับ 3.5 กรัมต่อลิตร โดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 500 ถึง 3000 มิลลิลิตรต่อลิตร ศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 24, 96, 120, 144 และ 168 (โมลต่อโมล) ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าเมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้น การสะสม PHB ต่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น ชุดการทดลองที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 144 มีการสะสม PHB สูงสุดเท่ากับร้อยละ 33 และจากงานวิจัยของ Wang et al. (2007) ศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 20, 40, 60, 80, 100, 120 และ I40 (โมลต่อโมล) เมื่อใช้ตะกอนสลัดจ์ในระบบตะกอนเร่ง (SBR) และใช้บิวทิริกและวาลอริคเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นกรดเริ่มต้น 1 กรัมต่อลิตร พบว่า อัตราส่วนคาร์บอนไนโตรเจนที่ 100 ให้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 30.3 กรัมต่อกรัมเซลล์

จากการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) ค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) พบว่าอัตราส่วน C:N เท่ากับ 300 มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 1.14 และ0.40 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุดเท่ากับ 0.73 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วน C:N เท่ากับ 15 จะเห็นได้ว่าอัตราส่วน C:N ที่ให้ค่าผลผลิต PHB สูงสุดอาจจะไม่มีสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุดตามไปด้วย

2.5 ผลของความเป็นกรดด่าง

ค่าความเป็นกรดด่างเป็นหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ PHB (Seo et al., 1998) จากการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างต่อการเจริญและการผลิต PHB โดยปรับอาหารเลี้ยงที่ใช้ให้มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6, 6.5, 7 และ 8 ทำการเลี้ยง *A. lactus* TISTR 1403/γ-2AA ในสูตรอาหารสำหรับผลิต PHB ในอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15 จากการศึกษาแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/γ-2AA มีแนวโน้มการเจริญในทางเดียวกัน คือมีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อการเจริญสูงขึ้นค่าความเป็นกรดด่างในแต่ละชุดการทดลองจะมีค่าลดลงและเริ่มคงที่เนื่องจากแบคทีเรีย *Alcaligenes* มีการนำสารอาหารเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) เพื่อใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเจริญ ซึ่งเมื่อค่าความเป็นกรดด่างลดลงจะทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ พบว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นแบคทีเรียสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญได้ แต่หากมีในปริมาณที่สูง จะเกิดการยับยั้งการเจริญ (Substrate inhibition) และมีผลต่อการสังเคราะห์ PHB ของแบคทีเรีย (Seo et al., 1998)

จากการศึกษาพบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 แบคทีเรียผลิตมวลเซลล์แห้ง ได้สูงสุดเท่ากับ 4.95 กรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณ PHB พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6, 6.5 และ 7 มีค่าใกล้เคียงกัน เท่ากับ 1.90, 1.98 และ 2.07 ตามลำดับ แต่พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 8 มีค่าน้อยที่สุด ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากในอาหารเลี้ยงมีค่าความเป็นด่างสูงส่งผลให้แบคทีเรียสะสม PHB ภายในเซลล์ได้น้อย (Indu et al., 2009) จะเห็นได้ว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 แบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้สูงสุด แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการสะสมภายในเซลล์กับชุดการทดลองอื่นพบว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างกัน มีค่าคิดเป็นร้อยละ 56.21, 60.73, 69.00 และ 59.21 ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nisha et al. (2009 b) ได้ศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHB ของแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus* NCIM 5149 พบว่า แบคทีเรียผลิตมวลเซลล์และ PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 4.11 และ 1.82 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7

จากการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) ค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุด มีค่าสูงสุดเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 แต่พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) มีค่าใกล้เคียงกับอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHB จะอยู่ในช่วง 6.5-7 สอดคล้องกับรายงานของ Luli and Strohl (1990) ระบุว่าค่าความเป็นกรดด่างมีผลต่อการ

เจริญและการผลิต PHB ของแบคทีเรีย การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 6.5-7 จะป้องกันไม่ให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงจนอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดมากเกินไป เนื่องจากจะทำให้ขาดความสมดุลระหว่างปริมาณไอออนของไฮโดรเจนและไฮดรอกไซด์ ซึ่งส่งผลต่อการผ่านเข้าออกของสารอาหารและเซลล์ไม่สามารถนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความเป็นพิษเนื่องจากปริมาณกรดในระบบมากเกินไป

3. ความสามารถในการผลิต PHB ของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

จากการทดลองเลี้ยง *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ในถังหมักแบบกะ พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 12 - 36 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แบคทีเรียมีการนำไปใช้เพื่อการเจริญซึ่งปริมาณน้ำตาลจะลดลงตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ และพบว่าปริมาณไนโตรเจนภายในถังหมักมีค่าลดต่ำลงและคงที่ในชั่วโมงที่ 36 ทั้งนี้อาจเกิดจากเมื่อสารอาหารเริ่มลดน้อยลงจึงมีผลทำให้แบคทีเรียมีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ และภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนและมีปริมาณคาร์บอนมากเพียงพอส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ NADPH oxidase ลดลง ซึ่งภายใต้สภาวะเหล่านี้จะเกิด NADH เพิ่มขึ้นและจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซิเตรตซินเทสและเอนไซม์ไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนสทำให้อะซิทิลโคเอเพิ่มสูงขึ้นถึงระดับที่จะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคเอซิลทรานเฟอเรส โดยโคเอนไซม์เป็นตัวยับยั้งเป็นผลให้เกิดปฏิกิริยาการรวมกันของอะซิทิลโคเอและเริ่มกระบวนการสังเคราะห์ PHB โดยอัตราส่วน NADPH/NAD ที่สูงเกิดจากการเปลี่ยนแปลงการจำกัดอากาศอย่างรวดเร็ว เป็นผลทำให้มีการสังเคราะห์ PHB ขึ้น (Arunpan, 1998 อ้างอิงโดย ธงชัย วงศ์สุวรรณ, 2550)

จากการศึกษาแบคทีเรียผลิตมวลเซลล์และ PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 4.53 และ 2.47 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 54.52 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.66 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.32 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร(Yp/s) เท่ากับ 0.24 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง สอดคล้องกับงานวิจัยของ ธงชัย วงศ์สุวรรณ (2550) ในศึกษาจลนพลศาสตร์ของการผลิต PHA จาก *Ralstonia eutropha* TIRTS 1095 แบบกึ่งกะ โดยใช้โพรพิโอเนต กรดบิวทิริก แอมโมเนียมซัลเฟต และ ฟอสเฟต เป็นแหล่งอาหารพบว่ามีสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 1.03 กรัมต่อกรัม TOC และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHA จากสารอาหาร

(Yp/s) เท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัม TOC และรายงานของ Yezza et al. (2007) ได้ศึกษาการผลิต PHB จาก *Alcaligenes latus* ATCC 29714 ในถังหมักแบบกะ ขนาด 10 ลิตร ด้วยการใช้น้ำตาลเมเปิล เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีมวลเซลล์ 4.2 ± 0.3 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณ PHB คิดเป็นร้อยละ 77.0 ± 2.6 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร(Yp/s) เท่ากับ 0.32 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป

4. การตรวจสอบชนิดและปริมาณของ PHB

จากการสกัดเซลล์แบคทีเรียด้วยสารผสมระหว่างกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 3 เมทานอล และคลอโรฟอร์ม นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง ซึ่งเป็นวิธีที่ดีและมีความแม่นยำสูง โดยสามารถวิเคราะห์สารที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 10^{-5} กรัมต่อลิตรได้ (Braunegg et al., 1978) จากการตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จาก *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยเครื่อง GC-MS ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ พบว่าเป็นพอลิเมอร์ชนิดเดียวกับสารมาตราฐาน PHB มีมวลสเปคตรัม เท่ากับ 74, 87 และ103 ซึ่งพบว่าแบคทีเรีย *A. lactus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่1 (Class I) ดังนั้นการสังเคราะห์ PHB จะเกี่ยวข้องกับ β-hydroxybutyryl-coenzyme A (HBCoA) โดยมีการสังเคราะห์ (R)-3-hydroxy fatty acid จากตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 ถึง 5 (Jia et al., 2001; Yolanda et al., 2008) จากรายงานของ Rijk et al. (2005) โดยระบุมวลสเปคตัม (mass spectra (m/z)) หลักของสาร 3- hydroxyl alkanoic acids methyl ester เท่ากับ 103 ซึ่งเกิดจากการแตกพันธะ α ในคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 และมวลสเปคตัม (m/z) เท่ากับ 74 เป็นมวลสเปคตัมที่สำคัญสามารถระบุว่าสารที่ทดสอบคือพอลิเมอร์ชนิด PHB เกิดจากการแตกตัวของไอออนของหมู่ methyl ester (Rijk et al., 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yolanda et al. (2008) ได้ตรวจสอบองค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จาก *Saccharophagus degradans* ATCC 43961 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า *S. degradans* ATCC 43961 ผลิตพอลิเมอร์ที่มีหน่วยของ 3-β-hydroxybutyrate

จากผลการทดสอบที่ได้สรุปได้ว่าแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตพอลิเมอร์ชนิด PHB สะสมภายในเซลล์เป็นส่วนใหญ่ แตกต่างจากงานวิจัยของ Wang et al. (2007) ได้ศึกษาองค์ประกอบของพอลิเมอร์ของเชื้อผสมจากตะกอนเร่งที่เลี้ยงในของเสียจากมอลท์ (Malt waste) และของเสียจากถั่วเหลือง (Soya waste) พบว่าองค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ได้มีสัดส่วนโมล (Mole fraction) ของ HB:HV เท่ากับ 90:10 และ 75:25 ตามลำดับ แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

ที่มีกลูโคสและฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน จะได้พอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบของ HB:HV เท่ากับ 55:45 และ 20:80 ตามลำดับ และจากการคำนวณปริมาณของ PHB ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ พบว่าการใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA สามารถผลิต PHB ได้มากกว่าการใช้กลูโคส 76.6 เท่า

สรุปผลการทดลอง

จากการทรีตแบคทีเรียด้วยรังสีแกมมา ใช้สาร 2-aminoanthracene (2-AA) และรังสีแกมมาร่วมกับใช้สาร 2-AA สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสม PHB ภายในเซลล์ได้สูงคือ แบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA พบว่าแบคทีเรียผลิตมวลเซลล์และ PHB ได้เท่ากับ 1.50 และ 0.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นการสะสมร้อยละ 40 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สามารถผลิต PIIB ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 (สายพันธุ์เดิม), *A. lactus* TISTR 1403/2AA และ *A. lactus* TISTR 1403/ γ

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA มีการเจริญและสะสม PHB ได้สูงสุดโดยใช้ซูโครส และน้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล มีการผลิต PHB ได้มากที่สุดถึงร้อยละ 80 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากเป้าหมายของการศึกษาที่ต้องการนำวัตถุดิบที่มีราคาถูกมาใช้ประโยชน์ และจากการนำไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน แบคทีเรียสามารถสร้าง PHB ได้ร้อยละ 57 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมากกว่าในชุดควบคุมที่ใช้กลูโคส (ร้อยละ 50 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังช่วงระหว่างร้อยละ 30-70 (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่าการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 50 ผลิต PHB ได้สูงสุด (1.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 94.73 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) และจากการเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ คือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมอะซิเตรต หรือ ยูเรีย ร่วมกับการใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังร้อยละ 50 พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนแบคทีเรียมีการเจริญและสะสม PHB ภายในเซลล์ได้สูง คิดเป็นร้อยละ 70 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จึงเลือกใช้ แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกับไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 50 เพื่อศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน พบว่าการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง C:N แบคทีเรียสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและPHB ได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน โดยอัตราส่วน C:N เท่ากับ 15 มีการผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 4.44 และ 2.60 กรัม

ต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 58.55 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และการปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารให้อยู่ในช่วง 6.5-7 ช่วยให้แบคทีเรียเจริญและสะสม PHB ได้ดี

เมื่อศึกษาความสามารถในการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบคทีเรียผลิตมวลเซลล์และ PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 4.53 และ 2.47 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 54.52 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็นสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.66 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.32 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร(Yp/s) เท่ากับ 0.24 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป จากการตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จาก *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยเครื่อง GC-MS ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ พบว่า เป็นพอลิเมอร์ชนิดเดียวกับสารมาตราฐาน PHB มีมวลสเปคตรัมเท่ากับ 74, 87 และ103 จากการทดลองทั้งหมดพบว่า การใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA สามารถผลิต PHB ได้มากกว่าการใช้กลูโคส 76.6 เท่า

ข้อเสนอแนะ

1. การนำวิธีการฉายรังสีแกมมาร่วมกับใช้สารเคมี มาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียเพื่อผลิต PHB ให้ได้ปริมาณสูงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ แต่จำเป็นต้องมีการตรวจลักษณะแบคทีเรียที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อยืนยันลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
2. การพัฒนาการผลิต PHB โดยใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าให้ผลผลิตต่ำ เนื่องจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นมีค่าต่ำ ดังนั้นต้องมีการปรับปรุงการย่อยสลายกากมันสำปะหลังให้ได้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจจะใช้เอนไซม์อะไมเลสร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการย่อยสลาย
3. การนำกากมันสำปะหลังมาใช้เป็นวัตถุดิบหลักสำหรับการผลิต จำเป็นต้องคำนึงถึงราคาของกากมันสำปะหลัง และค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวกับแหล่งของสารอาหารอื่น ๆ สำหรับใช้ในการผลิตด้วย
4. ควรมีการปรับปรุงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตอื่น ๆ เช่น แหล่งฟอสฟอรัสและแร่ธาตุอื่น ๆ รวมไปถึง พัฒนากระบวนการหมัก นอกจากการเลี้ยงแบบกะ สามารถทำการหมักในแบบกึ่งกะ แบบกะสองขั้นตอน แบบกึ่งต่อเนื่อง แบบต่อเนื่องขั้นตอนเดียว และแบบต่อเนื่องสองขั้นตอนได้