

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)

โดย *Bacillus* sp. P-12



นางสาววันกุล ชนะสิทธิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

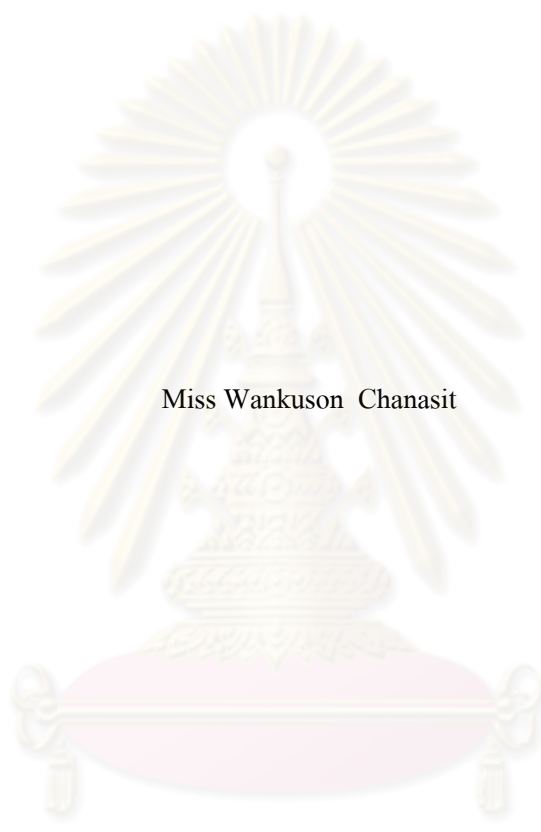
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMAL CONDITIONS FOR POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE)

PRODUCTION BY *Bacillus* sp. P-12



Miss Wankuson Chanasit

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต

พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)

โดย *Bacillus* sp. P-12

โดย

นางสาววันกมล ชนะสิทธิ์

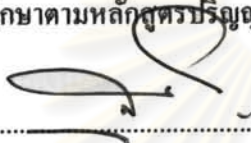
สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

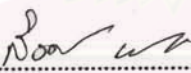
รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา

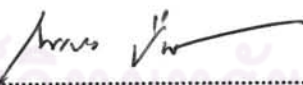
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท


  
.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปั่นพานิชการ)

  
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ ดร. สาวิตรี ลิ้มทอง)

วันฤศล ชนะสิทธิ์ : ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลเอเรต) โดย *Bacillus* sp. P-12. (OPTIMAL CONDITIONS FOR POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) PRODUCTION BY *Bacillus* sp. P-12) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. ช่างศรี กุลปริษา, 220 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลเอเรต) หรือ PHBV จาก *Bacillus megaterium* P-12 ที่คัดแยกได้ใหม่ ผลการศึกษาพบว่า กล้าเชื้อ *B. megaterium* P-12 เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ Basal Culture Medium (BCM) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.15 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 จากนั้นได้ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีต่อการเจริญและสังเคราะห์พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB) เพื่อเป็นแนวทางในการหาแหล่งคาร์บอนที่มีราคาไม่แพงมาใช้ทดแทน พบว่า *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญและสังเคราะห์ P(3HB) ได้ดีที่สุดในซูโครส โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 3.26 กรัมต่อลิตร และ 56.64 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่ชั่วโมง 18 ขณะที่เมื่อเลี้ยงในน้ำอ้อยซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาไม่แพง พบว่า ได้ปริมาณ P(3HB) ใกล้เคียงกันคือมีค่าเท่ากับ 56.46 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตร แต่ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าและใช้เวลาในการผลิตสั้นกว่าโดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 9.22 กรัมต่อลิตรตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 การใช้น้ำอ้อยและเกลือโซเดียมวาลเอเรตเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรตหรือ 3HB และ 3-ไฮดรอกซีวาลเอเรตหรือ 3HV ตามลำดับ พบว่า อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาลเอเรต 10.0 กรัมต่อลิตรและมียูเรีย 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ได้ปริมาณ 3HV อยู่ในช่วงที่ต้องการ คือมีค่าเท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.78 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHBV เท่ากับ 37.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้งที่ชั่วโมง 12 จากนั้นจึงเพิ่มผลผลิต PHBV โดยการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า *B. megaterium* P-12 เจริญและสังเคราะห์ PHBV ได้สูงขึ้นโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มเป็น 4.89 กรัมต่อลิตรและปริมาณ PHBV สูงขึ้นเป็น 41.36 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลการศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพบางประการของ PHBV ที่ผลิตได้ พบว่ามีอุณหภูมิหลอมเหลว อุณหภูมิกลาสทรานสิชันและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 143.44 องศาเซลเซียส -17.09 องศาเซลเซียส และ  $6.53 \times 10^4$  คาลตัน ตามลำดับ

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....วันฤศล ชนะสิทธิ์.....  
 สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่อ อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
 ปีการศึกษา.....2553.....



## 5072655323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

**KEYWORDS** : *Bacillus* sp. P-12/ POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXY VALERATE)/SUGARCANE LIQUOR

**WANKUSON CHANASIT: OPTIMAL CONDITIONS FOR POLY(3-HYDROXY BUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) PRODUCTION BY *Bacillus* sp. P-12).**

**THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SONGSRI KULPREECHA, Dr.Eng., 220 pp.**

This work aimed to investigate the optimal conditions for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) or PHBV production by the newly isolated *Bacillus megaterium* P-12. The optimal growth condition of *B. megaterium* P-12 was 37 °C in Basal Culture Medium (BCM) adjusted initial pH at 7.0. The maximum dry cell weight (DCW) obtained was 6.15 gL<sup>-1</sup> at 12 h of cultivation. The effect of sugar used as a carbon source on cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) or P(3HB) synthesis was examined in order to investigate an inexpensive carbon source. The results showed that *B. megaterium* P-12 produced the highest DCW of 3.26 gL<sup>-1</sup> and P(3HB) content of 56.64 % DCW in the production medium containing sucrose at 18 h of cultivation. To reduce the production cost, using an inexpensive carbon source is one of the alternative solutions. Sugarcane liquor is a good candidate due to its high sugar content (mainly sucrose). When *B. megaterium* P-12 was cultivated in the production medium containing 20.0 gL<sup>-1</sup> of total sugar in sugarcane liquor, the maximum P(3HB) content was 56.46 % DCW comparable to that with sucrose but higher DCW of 9.22 gL<sup>-1</sup> and shorter cultivation time at 6 h. For PHBV production, sugarcane liquor and sodium valerate were used as 3-hydroxybutyrate (3HB) and 3-hydroxyvalerate (3HV) generating carbon source, respectively. The suitable mole fraction of 3HV at 21 mol% was determined in the medium containing 10.0 gL<sup>-1</sup> of total sugar (in sugarcane liquor) and 10.0 gL<sup>-1</sup> of sodium valerate as the mixed carbon source with 1.0 gL<sup>-1</sup> of urea as a nitrogen source. The highest DCW of 3.78 gL<sup>-1</sup> and PHBV content of 37.06 % DCW were detected at 12 h of cultivation. The higher yield of cell mass and PHBV were obtained in 5 L fermenter compared to that of shake flask culture i.e. cell concentration was 4.89 gL<sup>-1</sup> and PHBV content was 41.36 % DCW. Some of physicochemical properties of PHBV were as followed: melting temperature of 143.44 °C, glass transition temperature of -17.09 °C and molecular weight of 6.53 x 10<sup>5</sup> Da, respectively.

Department ..... Microbiology ..... Student's signature ..... *Wankuson Chanasit* .....  
 Field of Study ..... Industrial Microbiology ..... Advisor's signature ..... *S. Kulpreecha* .....  
 Academic Year ..... 2010 .....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดีจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ส่องศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำแก่ ข้าพเจ้า ทำให้สามารถทำงานวิจัยได้สำเร็จ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการ สอบ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และศาสตราจารย์ ดร. สาวิตรี ลิ้มทอง ที่กรุณา ได้รับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ดียิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี ที่กรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลือ รวมทั้งให้ยืมใช้อุปกรณ์และเครื่องมือภายในห้องปฏิบัติการเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ จุลินทรีย์ที่ศึกษา

ขอขอบพระคุณ บริษัท มิตรผลวิจัยและพัฒนา ที่ให้ความอนุเคราะห์นำอ้อยเพื่อใช้ในการ วิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ โครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์ (พสวท.) สำหรับทุนการศึกษา

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ ในห้องวิจัย 462 ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและคอยให้กำลังใจ ในการทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาคอุตสาหกรรมทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ และน้องๆ ที่ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ซึ่งเป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุดที่คอยสนับสนุน ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ท
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการ.....	1
1.2 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย.....	3
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.4 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2. ปรีทรรศน์วรรณกรรม.....	5
2.1 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	5
2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต.....	7
2.3 พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต).....	13
2.4 พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต).....	16
2.5 การสะสม PHAs ในจุลินทรีย์.....	25
2.6 วัฏจักรการหมุนเวียนองค์ประกอบอินทรีย์ของ PHAs.....	26
2.7 การย่อยสลายได้ทางชีวภาพของ PHAs.....	27
2.8 แนวทางการนำ PHAs ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์.....	28
2.9 บริษัทผู้ผลิต PHAs.....	29
2.10 ข้อจำกัดในการนำ PHAs ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์และ แนวทางในการแก้ปัญหา.....	30
2.11 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHAs.....	31
2.12 การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยควบคุมสัดส่วนของ 3HV.....	43

2.13 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์.....	45
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	46
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	46
3.2 เคมีภัณฑ์.....	47
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	50
3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา.....	50
3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	50
3.3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์.....	51
3.3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ <i>Bacillus</i> sp. P-12 ที่คัดแยกได้ใหม่ ทางอนุกรมวิธาน.....	52
3.3.5 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. P-12.....	54
3.3.6 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. P-12.....	55
3.3.7 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ การผลิต โคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV.....	55
3.3.8 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญ การผลิต โคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV.....	57
3.3.9 การศึกษาภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญ การผลิต โคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV.....	58
3.3.10 การผลิต โคพอลิเมอร์ PHBV จาก <i>Bacillus</i> sp. P-12 โดยใช้ภาวะ ที่เหมาะสมมาเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	58
3.3.11 การสกัด โคพอลิเมอร์จากเซลล์แห้งและการทำให้บริสุทธิ์.....	59
3.3.12 การศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพบางประการของ โคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้จาก <i>Bacillus</i> sp. P-12.....	59
3.4 วิธีวิเคราะห์.....	60
3.4.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	60
3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด.....	60
3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย.....	61

3.4.4 การวิเคราะห์สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณของพอลิเมอร์ โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography: GC).....	61
3.4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำอ้อยด้วย เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิด โครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC).....	63
3.4.6 การวิเคราะห์หาปริมาณของเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตและเกลือโซเดียม วาเลอเรตโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี.....	63
4. ผลการทดลอง.....	64
4.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ <i>Bacillus</i> sp. P-12 ที่คัดแยกได้ทางอนุกรมวิธาน.....	64
4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	64
4.1.2 สมบัติทางชีวเคมี.....	66
4.1.3 วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของ <i>Bacillus</i> sp. P-12.....	69
4.1.3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของ <i>Bacillus</i> sp. P-12.....	69
4.1.3.2 ต้นไม้วิวัฒนาการ.....	71
4.2 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อและอายุที่เหมาะสมสำหรับเป็นกล้าเชื้อ ของ <i>Bacillus megaterium</i> P-12.....	72
4.2.1 ชนิดของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ <i>B. megaterium</i> P-12.....	72
4.2.2 ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงกล้าเชื้อ <i>B. megaterium</i> P-12.....	74
4.2.3 อายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเป็นกล้าเชื้อของ <i>B. megaterium</i> P-12...	78
4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการเจริญ การผลิต โคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของ โมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV.....	80
4.3.1 ผลของชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของ โมโนเมอร์ 3HB .....	80
4.3.1.1 ผลของชนิดแหล่งคาร์บอน.....	80
4.3.1.2 ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอน.....	87
4.3.2 ผลของชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนผสมเพื่อผลิตเป็น โคพอลิเมอร์ PHBV.....	91



4.3.2.1 อัตราส่วนระหว่างสารตั้งต้นของ 3HB ต่อสารตั้งต้นของ 3HV เท่ากับ 15.0 กรัมต่อลิตรต่อ 5.0 กรัมต่อลิตร.....	92
4.3.2.2 อัตราส่วนระหว่างสารตั้งต้นของ 3HB ต่อสารตั้งต้นของ 3HV เท่ากับ 10.0 กรัมต่อลิตรต่อ 10.0 กรัมต่อลิตร.....	93
4.3.2.3 อัตราส่วนระหว่างสารตั้งต้นของ 3HB ต่อสารตั้งต้นของ 3HV เท่ากับ 5.0 กรัมต่อลิตรต่อ 15.0 กรัมต่อลิตร.....	95
4.4 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญ การผลิต โคพอลิเมอร์และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV.....	110
4.4.1 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจน.....	110
4.4.2 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน.....	114
4.5 ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญ การผลิต โคพอลิเมอร์และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV.....	119
4.5.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวสำหรับการผลิต.....	119
4.5.2 ปริมาณอากาศ.....	124
4.6 การผลิต โคพอลิเมอร์ PHBV จาก <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	129
4.7 สมบัติทางเคมีกายภาพบางประการของ โคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้จาก <i>B. megaterium</i> P-12.....	136
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	138
รายการอ้างอิง.....	151
ภาคผนวก.....	164
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	165
ภาคผนวก ข สูตรคำนวณ.....	168
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน.....	171
ภาคผนวก ง โครมาโตแกรม.....	177
ภาคผนวก จ ผลการทดลอง.....	181
ภาคผนวก ฉ ผลการทดสอบทางสถิติ.....	203
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	220

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	แบบที่เรียที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้..... 11
2.2	เปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพ เคมีและเชิงกลของ PP และ P(3HB)..... 14
2.3	สมบัติทางกายภาพ เคมี และเชิงกลของ PHBV เมื่อเทียบกับ P(3HB) และ PP..... 18
2.4	สมบัติทางกายภาพและเชิงกลของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ตั้งแต่ 0 จนถึง 25 โมลเปอร์เซ็นต์..... 19
2.5	บริษัทผู้ผลิต PHAs..... 29
2.6	เปรียบเทียบการสังเคราะห์ PHAs จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาไม่แพง..... 33
2.7	องค์ประกอบของน้ำอ้อย..... 34
4.1	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของชุดทดสอบ API 50 CHB..... 66
4.2	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของชุดทดสอบ API 20 E..... 68
4.3	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะการเลี้ยงเชื้อต่างๆ..... 77
4.4	น้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราการเจริญจำเพาะของ <i>B. megaterium</i> P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 78
4.5	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้สูงสุด รวมทั้ง สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของ 3HB และ 3HV ในโคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยต่อเกลือ โซเดียมวาเลอเรต หรือเกลือ โซเดียมโพรพิโอเนตในอัตราส่วนต่างๆ..... 99
4.6	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้สูงสุด รวมทั้ง สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ในโคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อย ต่อเกลือ โซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วนต่างๆ..... 108
4.7	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้และสัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบในโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง..... 131
4.8	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สูงสุด รวมทั้ง ค่าอัตราการผลิตระหว่างการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในระดับขวดเขย่ากับการ

	เลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	134
4.9	สมบัติทางเคมีกายภาพบางประการของ โคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตจาก <i>B.megaterium</i> P-12 เปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น.....	135
5.1	เปรียบเทียบการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยใช้จุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอนและเทคนิคการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน.....	149



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงการสะสม PHAs ในรูปของเม็ดแกรนูล ภายในเซลล์ของ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42A2..... 7
2.2	วิธีการย่อยสลาย PHAs..... 8
2.3	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHAs..... 9
2.4	เซลล์ที่ย้อมด้วยสีในสไลด์ เอ (A) และสีซูดานแบลค บี (B)..... 13
2.5	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ P(3HB)..... 13
2.6	การสังเคราะห์ P(3HB) จากโมโนเมอร์ 3HB..... 14
2.7	โครงสร้างของ <i>pha</i> CBA cluster ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ P(3HB)..... 15
2.8	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHBV..... 16
2.9	การสังเคราะห์ PHBV จากโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV..... 17
2.10	การเรียงตัวของโมโนเมอร์ 3HB และโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ PHBV แบบสุ่ม..... 17
2.11	วิธีชีวสังเคราะห์ PHBV..... 22
2.12	แหล่งที่มาของ propionyl-CoA ซึ่งใช้เป็นสารตัวกลางสำหรับกระบวนการ สังเคราะห์ PHAs ที่มี 3HV เป็นองค์ประกอบ..... 24
2.13	ส่วนประกอบภายในแกรนูลของ PHAs..... 25
2.14	วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนขององค์ประกอบอินทรีย์ของ PHAs..... 26
2.15	กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ..... 37
2.16	กระบวนการผลิตน้ำตาลรีไฟน์..... 37
4.1	ลักษณะโคโลนีของ <i>Bacillus</i> sp. P-12 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MSM และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 64
4.2	ลักษณะการย้อมติดสีแกรมของ <i>Bacillus</i> sp. P-12 ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง..... 65
4.3	ลักษณะสปอร์ภายในเซลล์ของ <i>Bacillus</i> sp. P-12 ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง เมื่อย้อมเซลล์ด้วยสีมาลาไคท์กรีน..... 65
4.4	ลักษณะแกรนูลที่ย้อมติดสีดำของซูดานแบลค บี ของ <i>Bacillus</i> sp. P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM เป็นเวลา 12 ชั่วโมง..... 65
4.5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ <i>Bacillus</i> sp. P-12..... 69
4.6	ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ <i>Bacillus</i> sp. P-12..... 71

- 4.7 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของ *B.megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหาร  
เลี้ยงกล้าเชื้อ BCM BYPcng และ NB..... 73
- 4.8 เปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะของ *B.megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหาร  
เลี้ยงกล้าเชื้อ BCM BYPcng และ NB..... 73
- 4.9 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของ *B. megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหาร  
เลี้ยงกล้าเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0..... 74
- 4.10 เปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะของ *B.megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหาร  
เลี้ยงกล้าเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0..... 75
- 4.11 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของ *B.megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิเท่ากับ  
25 30 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส..... 76
- 4.12 เปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะของ *B. megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ  
เท่ากับ 25 30 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส..... 76
- 4.13 การเจริญเติบโตของ *B. megaterium* P-12 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM  
ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส  
เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 79
- 4.14 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง  
*B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีซูโครส กลูโคส และฟรักโทสที่มี  
ความเข้มข้น 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นของ โมโนเมอร์ 3HB..... 81
- 4.15 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด  
และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มี  
ซูโครส กลูโคสและฟรักโทสที่มีความเข้มข้น 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นของ  
โมโนเมอร์ 3HB..... 82
- 4.16 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต P(3HB) Yp/x Yp/s และ Yx/s เมื่อเลี้ยง  
*B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีสารตั้งต้นของ โมโนเมอร์ 3HB  
เป็นน้ำตาลบางชนิด..... 83
- 4.17 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) สูงสุด  
เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีซูโครสและน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้น  
ของน้ำตาลรวม 20.0 กรัมต่อลิตรเท่ากันเป็นสารตั้งต้นของ โมโนเมอร์ 3HB..... 84
- 4.18 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด  
และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM



- ที่มีชูโครส 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB..... 85
- 4.19 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB..... 85
- 4.20 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต P(3HB) Yp/x Yp/s และ Yx/s เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB เป็นน้ำตาลชูโครส 20.0 กรัมต่อลิตรเทียบกับน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 20.0 กรัมต่อลิตรเท่ากัน..... 86
- 4.21 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 30.0 40.0 และ 50.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB..... 88
- 4.22 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 30.0 40.0 และ 50.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB..... 89
- 4.23 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต P(3HB) Yp/x Yp/s และ Yx/s เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 30.0 40.0 และ 50.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเป็น โมโนเมอร์ 3HB..... 90
- 4.24 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของและปริมาณ PHBV สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 15.0 กรัมต่อลิตรกับกลีโคโนเดียมวาเลอเรตหรือกลีโคโนเดียมโพรพิโอเนต 5.0 กรัมต่อลิตร..... 92
- 4.25 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต PHBV Yp/x Yp/s และ Yx/s เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 15.0 กรัมต่อลิตรกับกลีโคโนเดียมวาเลอเรตหรือกลีโคโนเดียมโพรพิโอเนต 5.0 กรัมต่อลิตร..... 93
- 4.26 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของและปริมาณ PHBV สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรกับกลีโคโนเดียมวาเลอเรตหรือกลีโคโนเดียมโพรพิโอเนต 10.0 กรัมต่อลิตร..... 94

- 4.27 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต PHBV Yp/x Yp/s และ Yx/s เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 10.0 กรัมต่อลิตร..... 95
- 4.28 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของและปริมาณ PHBV สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 5.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 15.0 กรัมต่อลิตร..... 96
- 4.29 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต PHBV Yp/x Yp/s และ Yx/s เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 5.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 15.0 กรัมต่อลิตร..... 97
- 4.30 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรตหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตและน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตที่อัตราส่วนต่างๆ 98
- 4.31 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุดที่ผลิตได้ รวมถึงสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตและน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต ในอัตราส่วน 15:5 10:10 และ 5:15 กรัมต่อลิตรต่อกรัมต่อลิตร..... 100
- 4.32 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 20:0 ถึง 17:3..... 102
- 4.33 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 16:4 ถึง 13:7..... 103
- 4.34 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง

- B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อย ต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 12:8 ถึง 9:11..... 104
- 4.35 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อย ต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 8:12 ถึง 5:15..... 105
- 4.36 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อย ต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 4:16 ถึง 1:19..... 106
- 4.37 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณ โคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้สูงสุด รวมทั้งสัดส่วน โมลเปอร์เซ็นต์ของ โมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบใน โคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วนต่างๆ..... 109
- 4.38 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของและปริมาณ PHBV สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งมีความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตรกับยูเรียที่มีโมลของไนโตรเจนเท่ากับ แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งคิดเป็น 0.5 กรัมต่อลิตร..... 111
- 4.39 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณ เกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน.. 112
- 4.40 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณ เกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณยูเรีย เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียที่มีโมลของไนโตรเจนเท่ากับแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งคิดเป็น 0.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน..... 112
- 4.41 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต PHBV Yp/x Yp/s และ Yx/s เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตรกับยูเรียที่มีโมลของ ไนโตรเจนเท่ากับแอมโมเนียมซัลเฟต คิดเป็น 0.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน... 113
- 4.42 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของยูเรียเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ

	3.0 กรัมต่อลิตร.....	115
4.43	น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณ เกลือโซเดียมวาเลอเรตและปริมาณยูเรีย เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อ ลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน.....	116
4.44	เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต PHBV $Y_{p/x}$ $Y_{p/s}$ และ $Y_{x/s}$ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมียูเรียที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน.....	117
4.45	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณ โคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้สูงสุด รวมทั้งสัดส่วน โมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบใน PHBV เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในยูเรียที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 ถึง 3.0 กรัมต่อลิตร.....	118
4.46	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0.....	120
4.47	น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือ โซเดียมวาเลอเรตและปริมาณยูเรีย เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0.....	121
4.48	เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต P(3HB) $Y_{p/x}$ $Y_{p/s}$ และ $Y_{x/s}$ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0.....	122
4.49	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณ โคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้สูงสุด รวมทั้ง สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบใน PHBV เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวสำหรับ การผลิต MSM เท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0.....	123
4.50	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในปริมาณอากาศแตกต่างกัน ซึ่งทำได้โดยการแปรปริมาตรอาหารเหลวสำหรับ การผลิต MSM เท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิลิตร.....	125
4.51	น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือ โซเดียมวาเลอเรตและปริมาณยูเรีย เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในขวดทดลองที่มี ปริมาตรของอาหารเหลว MSM เท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิลิตร.....	126
4.52	เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต PHBV $Y_{p/x}$ $Y_{p/s}$ และ $Y_{x/s}$ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในขวดทดลองที่มีปริมาตรของอาหารเหลว MSM เท่ากับ 25 50 75 และ	

	100 มิลลิลิตร.....	127
4.53	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้สูงสุด รวมทั้ง สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบใน PHBV เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> P-12 ที่มีปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิลิตร.....	128
4.54	น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของและปริมาณ PHBV สูงสุด เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในระดับขวดเขย่าเปรียบเทียบกับเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	129
4.55	น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือ โซเดียมวาเลอเรตและปริมาณยูเรีย เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตร ต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตรและมียูเรียที่มีความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้อัตราการกวนที่ 500 รอบต่อนาที และให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	130
4.56	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ โคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบใน PHBV เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> P-12 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตรและมียูเรีย 1.0 กรัมต่อ ลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้อัตราการกวนที่ 500 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	132
4.57	เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต PHBV Yp/x Yp/s และ Yx/s เมื่อเลี้ยง <i>B.megaterium</i> P-12 ในระดับขวดเขย่ากับเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	133



## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ตัวย่อ	คำอธิบาย
DCW	น้ำหนักเซลล์แห้ง
$\text{gL}^{-1}$	กรัมต่อลิตร
$\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
h	ชั่วโมง
$\text{h}^{-1}$	ต่อชั่วโมง
PHB / P(3HB)	พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตหรือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)
PHBV / P(3HB-co-3HV)	พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)
P(3HB) conc.	ความเข้มข้นของ P(3HB)
PHBV conc.	ความเข้มข้นของ PHBV
P(3HB) cont.	ปริมาณของ P(3HB)
PHBV cont.	ปริมาณของ PHBV
% DCW	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง
$\mu$	อัตราการเติบโตจำเพาะ
$\mu_{\text{max}}$	อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

พลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น พอลิโพรพิลีน (polypropylene หรือ PP) พอลิเอธิลีน (polyethylene หรือ PE) พอลิไวนิลคลอไรด์ (polyvinylchloride หรือ PVC) เริ่มมีการใช้งานอย่างแพร่หลายตั้งแต่กลางศตวรรษที่ 19 และยังคงมีความต้องการใช้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากพลาสติกมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการเมื่อเทียบกับวัสดุอื่นคือ มีน้ำหนักเบา มีความแข็งแรงทนทาน สามารถทนต่อสารเคมีและความร้อน กันน้ำได้ดี มีความสวยงามและสามารถปรับแต่งให้มีลักษณะพิเศษตามที่ต้องการได้ รวมทั้งใช้พลังงานในการผลิตต่ำ จึงทำให้มีราคาถูก (Loo และ Sudesh, 2007b) แต่อย่างไรก็ตาม พลาสติกสังเคราะห์เหล่านี้ ถือเป็นวัสดุที่ไม่ย่อยสลายหรือต้องใช้เวลาอันมากในการย่อยสลายตามธรรมชาติ ทำให้ไม่สามารถกำจัดได้ทัน ส่งผลให้ขยะที่เกิดจากผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ใช้งานแล้วมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา ดังนั้น เพื่อลดปัญหาของพลาสติกสังเคราะห์ที่เป็นมลพิษในสิ่งแวดล้อม การศึกษาวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติเพื่อใช้ทดแทนพลาสติกที่ย่อยสลายไม่ได้ จึงมีความสำคัญและน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) เป็นกลุ่มพอลิเอสเทอร์สายตรง ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกรด 3-ไฮดรอกซี (3-hydroxy acid) ถูกสร้างและสะสมอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์หลายชนิดในรูปของแกรนูล เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนในภาวะที่จำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือ ออกซิเจน เป็นต้น ในขณะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป (Anderson และ Dawes, 1990 ; Luengo และคณะ, 2003) สำหรับแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์ใช้ในกระบวนการหมัก ส่วนใหญ่มาจากทรัพยากรที่สามารถผลิตทดแทนใหม่ได้ (renewable resources) เช่น กากน้ำตาล (Kulprecha และคณะ, 2009) หางนม (Koller และคณะ, 2008) น้ำมันปาล์ม (Lee และคณะ, 2008) หรือแป้ง (Sheu และคณะ, 2009) เป็นต้น โดยชนิดของ PHAs ที่ถูกสังเคราะห์และสะสมจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอนและภาวะที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ (Savenkova และคณะ, 2000 ; Sudesh และคณะ, 2000) PHAs มีสมบัติเป็นพลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในธรรมชาติด้วยจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์ดีพอลิเมอร์เอส (depolymerase) และเอสเตอเรส (esterase) ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ได้แก่ น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดคาร์บอกซิลิก (Lee, 1996) นอกจากนี้ PHAs ยังมีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติกเช่นเดียวกับพลาสติกสังเคราะห์ในกลุ่ม PP และ PE จึงสามารถนำ PHAs มาขึ้นรูปและนำกลับมาหลอมเหลวด้วยความร้อนได้ (Evan และ Sikdar, 1990)

PHAs ชนิดที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB)] และพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), P(3HB-co-3HV) หรือ PHBV] P(3HB) เป็นโฮโมพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3-hydroxybutyrate, 3HB) เพียงชนิดเดียวเชื่อมต่อกันแบบหัวต่อหาง สังเคราะห์และสะสมโดยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ มีสมบัติคล้ายกับ PP (Dai และคณะ, 2007) โดยมีอุณหภูมิกลาสทรานสิชัน ( $T_g$ ) และอุณหภูมิหลอมเหลว ( $T_m$ ) สูง คือมีค่าประมาณ 4 และ 180 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีระดับความเป็นผลึก (degree of crystallinity) สูงประมาณ 55-80 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสมบัติเชิงกล พบว่า มีค่ายังส์โมดูลัส (Young's modulus) ค่าการต้านแรงดึง (tensile strength) และเปอร์เซ็นต์การยืด (% elongation to break) เท่ากับ 3.5 GPa 43 MPa และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำให้ P(3HB) มีสมบัติแข็ง (stiffness) เปราะ (brittleness) ไม่ยืดหยุ่นและขึ้นรูปได้ยาก จึงมีข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ใช้งานและไม่เหมาะจะใช้ในเชิงพาณิชย์ (Sudesh และคณะ, 2000) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโคพอลิเมอร์ PHBV พบว่า มีสมบัติทางกายภาพและเชิงกลที่ดีกว่า P(3HB) เนื่องจาก PHBV เป็นโคพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรตต่อเชื่อมกับ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3-hydroxyvalerate, 3HV) ด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกกับหมู่ไฮดรอกซี โดยมีการเรียงตัวของโมโนเมอร์เป็นแบบสลับ (Matsusaki และคณะ, 2000) แสดงลักษณะเป็นไอโซไดมอร์ฟิซึม (isodimorphism) ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์สองชนิดที่มีรูปร่างและขนาดคล้ายกันจึงสร้างผลึกร่วม (cocrystallization) ได้ (Dai และคณะ, 2008) จากการศึกษาการผลิต PHBV ใน *Ralstonia eutropha* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ได้ในปริมาณสูง พบว่า การมีโมโนเมอร์ 3HV ในสายโคพอลิเมอร์ PHBV มีผลให้ระดับความเป็นผลึก อุณหภูมิกลาสทรานสิชันและอุณหภูมิหลอมเหลวลดลง โดยเมื่อเพิ่มปริมาณ 3HV จาก 0 ถึง 20 โมลเปอร์เซ็นต์ด้วยการเติมโคสับสเตรต 3HV (3HVcosubstrate) ที่เหมาะสม เช่น กรดโพรพิโอนิกหรือกรดวาเลอริกในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะไปลดระดับความเป็นผลึกลงจาก 63 เป็น 31 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิกลาสทรานสิชันลดลงจาก 4 เป็น -1 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิหลอมเหลวลดลงจาก 180 เป็น 145 องศาเซลเซียส ตามลำดับ รวมทั้งยังช่วยลดค่ายังส์โมดูลัสและค่าการต้านแรงดึง ขณะที่ผลไปเพิ่มเปอร์เซ็นต์การยืดให้สูงขึ้น ทำให้ PHBV ที่ได้มีความแข็งและเปราะลดลง มีความเหนียวและยืดหยุ่นมากขึ้น (Sudesh และคณะ, 2000 ; Mallick และคณะ, 2007) จึงสามารถนำ PHBV ไปขึ้นรูปได้ง่ายและประยุกต์ใช้งานได้หลากหลายกว่า P(3HB) สมบัติทางกายภาพ เหนียวและเชิงกลของ PHBV ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งถูกควบคุมโดยการปรับชนิดและปริมาณของสับสเตรตในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสม (Loo และ Sudesh, 2007b) การมีปริมาณ 3HV ในโคพอลิเมอร์ PHBV ปริมาณน้อย จะทำให้พอลิเมอร์ที่ได้มีลักษณะ

คล้าย PVC และพอลิสไตรีน (polystyrene หรือ PS) คือ แข็งและเปราะ แต่ถ้ามีปริมาณ 3HV ในปริมาณที่เหมาะสมจะมีลักษณะเหมือนกับ PP ซึ่งมีความสมดุลของความแข็งและความเหนียว ส่วนการมี 3HV ในปริมาณสูง จะทำให้ได้พอลิเมอร์ที่มีความนิ่มและเหนียวเหมือน PE (Barker และคณะ, 1997) การมี 3HV ใน PHBV ปริมาณสูงเกินไป คือ ตั้งแต่ 47-100 โมลเปอร์เซ็นต์ มีผลให้อุณหภูมิหลอมเหลวสูงขึ้น ทำให้พอลิเมอร์ที่ได้กลับมามีสมบัติแข็งและเปราะเหมือน P(3HB) (Bloembergen และคณะ, 1986) และพบว่า PHBV ที่มีสมบัติเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์มากที่สุด คือ โคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV อยู่ในช่วง 20 ถึง 30 โมลเปอร์เซ็นต์ (Nobes และคณะ, 1994 ; Barker และคณะ, 1997 ; Sudesh และคณะ, 2000 ; Volova, 2004 ; Rudnik, 2008 ) ในปี 1981 บริษัท ICI ผลิต PHBV เพื่อใช้ในเชิงพาณิชย์เป็นครั้งแรก มีชื่อทางการค้าว่า Biopol โดยผลิต PHBV ที่มีสัดส่วนของ 3HV อยู่ในช่วง 3-20 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและกรดโพทิโอนิกและใช้เทคนิคการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบคซ์ (Choi และ Lee, 1999)

#### มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จากเชื้อ *Bacillus* sp. P-12 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ใหม่ในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัยโดยศันสนีย์ สันติอรรรถพันธ์ (2550) พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณสูง คือได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 44.54 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสำหรับการผลิต Mineral Salt Medium (MSM) ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากเหตุผลดังกล่าวนี้ จึงสันนิษฐานได้ว่า หากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. P-12 สามารถสังเคราะห์และสะสมโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) ได้ในปริมาณสูงก็น่าจะมีแนวโน้มในการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ได้ในปริมาณสูงเช่นเดียวกัน (Haywood และคณะ, 1989 ; Ramsay และคณะ, 1990)

จากที่กล่าวมาข้างต้นแล้วว่า โคพอลิเมอร์ PHBV มีสมบัติทางกายภาพ เคมีและเชิงกลดีกว่าโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) เนื่องจากมีอุณหภูมิกลาสทรานสิชัน อุณหภูมิหลอมเหลวและระดับความเป็นผลึกต่ำกว่า P(3HB) ขณะที่ค่ายังส์โมดูลัส ค่าการต้านแรงดึงและเปอร์เซ็นต์การยืดมีค่าสูงกว่า P(3HB) จึงทำให้ PHBV มีความแข็งและเปราะลดลง มีความเหนียวและยืดหยุ่นมากขึ้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้หลากหลาย โดยสมบัติด้านต่างๆของ PHBV ที่ผลิตได้จะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์ ดังนั้นการควบคุมสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ให้ได้ตามความต้องการ โดยการเลือกใช้นิโคตและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม รวมไปถึงการศึกษาหาภาวะที่

เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตโคพอลิเมอร์ของ *Bacillus* sp. P-12 เป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ได้ในปริมาณมากขึ้น อันจะส่งผลให้ราคาต้นทุนต่อหน่วยต่ำลง เพื่อให้สามารถแข่งขันกับพลาสติกสังเคราะห์ที่มีราคาถูกกว่าได้

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จาก *Bacillus* sp. P-12 สายพันธุ์ที่แยกได้ใหม่ เนื่องจากให้ปริมาณพอลิเมอร์ PHAs อยู่ในเกณฑ์สูงเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดที่ศึกษาในห้องปฏิบัติการในปัจจุบัน โดยมุ่งศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญ การผลิตและสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV รวมถึงสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เพื่อให้ได้ผลผลิต PHBV สูงและสามารถควบคุมสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบของโคพอลิเมอร์ PHBV ให้ได้ตามความต้องการเพื่อความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้งานด้านต่างๆต่อไป

### ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. พิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Bacillus* sp. P-12 ที่คัดแยกได้ใหม่ทางอนุกรมวิธาน
2. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อและอายุที่เหมาะสมสำหรับเป็นกล้าเชื้อ
3. ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการเจริญ การผลิตโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) และโคพอลิเมอร์ PHBV รวมถึงสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV
4. ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญ การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV
5. ศึกษาภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญ การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV
6. ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร
7. ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพบางประการของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. P-12

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงผลของปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญ การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. P-12 เพื่อให้สามารถเลือกภาวะการเลี้ยงเชื้อให้ได้ผลผลิตสูง และมีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ที่มีสมบัติเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้



## บทที่ 2

### ปริทรรศน์วรรณกรรม

กว่า 50 ปีมาแล้วที่พลาสติกสังเคราะห์ที่ผลิตได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น พอลิเอทิลีน พอลิไวนิลคลอไรด์ พอลิสไตรีน ได้เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวัน (Zinn และคณะ, 2001) เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการเมื่อเทียบกับวัสดุอื่น คือ มีน้ำหนักเบา มีความแข็งแรง ทนทาน สามารถทนต่อสารเคมีและความร้อน กันน้ำได้ดี ทนต่อการย่อยสลายจากจุลินทรีย์ เนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Shah และคณะ, 2007) และสามารถปรับแต่งให้มีลักษณะพิเศษตามที่ต้องการได้ รวมทั้งใช้พลังงานในการผลิตต่ำ จึงทำให้มีราคาถูก (Loo และ Sudesh, 2007b) แต่ปัญหาใหญ่ของพลาสติกที่ทั่วโลกกำลังประสบอยู่ในปัจจุบันคือขยะพลาสติก เนื่องจากพลาสติกสังเคราะห์เป็นวัสดุย่อยยากต้องใช้เวลาอย่างมากในการย่อยสลายได้หมด จึงสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อม มีการประมาณกันว่า ปริมาณการใช้พลาสติกทั่วโลกมีมากกว่า 2 หมื่นล้านตันต่อวันหรือคิดเป็นประมาณ 140 ล้านตันต่อปี (Suriyamongkol และคณะ, 2007) ประกอบกับความกังวลเกี่ยวกับความมั่นคงทางวัสดุประเภทพอลิเมอร์ อันเนื่องมาจากการลดลงของน้ำมันดิบสำรองได้พิภพและเชื้อเพลิงจากฟอสซิล (fossil fuel) ที่ถือว่าเป็นแหล่งพอลิเมอร์สังเคราะห์แหล่งใหญ่ที่สุดที่ป้อนเข้าสู่ระบบอุตสาหกรรม ซึ่งมีการประมาณว่าจะหมดไปในอีก 90 ปีข้างหน้า อันจะส่งผลให้วัสดุที่ใช้ในการสังเคราะห์พอลิเมอร์มีแนวโน้มของราคาสูงขึ้นตามราคาน้ำมัน (Sankhla และคณะ, 2010) ดังนั้น การวิจัยและพัฒนาพลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายหรือสลายตัวโดยวิธีการตามธรรมชาติได้ (biodegradable plastic) แต่ยังคงรักษาคุณสมบัติที่ดีของพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมีที่ต้องการเอาไว้ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจที่จะช่วยลดปัญหาขยะพลาสติกได้

#### 2.1 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic)

##### 2.1.1 ความหมายของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ หมายถึง พลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยการย่อยที่มีผลมาจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ สาหร่าย เป็นต้น (Alderete และคณะ, 1993) ได้ผลิตกันทั้งเป็นสารประกอบขนาดเล็ก เช่น คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

## 2.1.2 ประเภทของพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพได้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท (Reddy และคณะ, 2003) ได้แก่

2.1.2.1 พลาสติกที่ถูกสลายตัวโดยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV degradable plastic) เนื่องจากพลาสติกชนิดนี้มีหมู่คาร์บอนิล ( $C=O$ ) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีความไวสูงต่อแสง UV ทำให้เกิดการแตกตัวในสายโซ่ของพอลิเมอร์ พลาสติกจะกรอบและแตกได้ หรือมีการเติมสารที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (photoactivate) เช่น เหล็ก และทองแดง เป็นต้น เพื่อเร่งการทำลายสายพอลิเมอร์เมื่อได้รับแสง UV

2.1.2.2 พลาสติกที่เติมสารเติมแต่งซึ่งย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable additives-based plastic) อาศัยหลักการเติมสารเติมแต่งทางธรรมชาติจำพวกคาร์โบไฮเดรตบางชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด แป้ง และเซลลูโลส เป็นต้น มาผสมเข้ากับพลาสติกสังเคราะห์จำพวกพอลิเอทิลีน พอลิโพรพิลีน และพอลิสไตรีน โดยเมื่ออนุภาคของแป้งถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ พลาสติกจะอ่อนตัวลง มีความพรุนและมีพื้นที่ผิวมากขึ้นช่วยในการทำลายร่างแหของพลาสติก

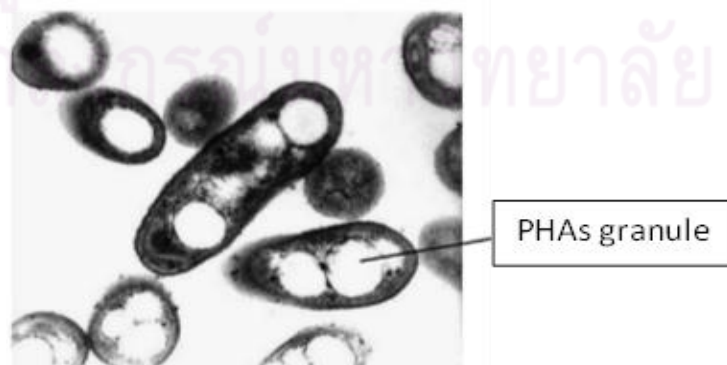
2.1.2.3 พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพอย่างสมบูรณ์ (completely biodegradable plastic) เป็นพลาสติกที่สลายตัวด้วยเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ในธรรมชาติ ซึ่งพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพมีอยู่หลายชนิด การค้นพบในช่วง 20 กว่าปีที่ผ่านมานี้ ส่วนมากพบสายพอลิเมอร์ที่มีพันธะซึ่งสามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้ เช่น เอไมด์ (amide) เอสเทอร์ (ester) ยูเรีย (urea) ยูรีเทน (urethane) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม พอลิเมอร์ที่น่าสนใจที่สุด คือ พอลิเอสเทอร์สายตรง เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ รวมทั้งมีคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้งาน (Sudesh และคณะ, 2000)

สำหรับชนิดของกลุ่มพอลิเอสเทอร์สายตรง (aliphatic polyester) ที่สำคัญ ได้แก่ พอลิไฮดรอกซีอัลคานอเอต (polyhydroxyalkanoate, PHAs) พอลิแลคติกแอซิด (polylactic, PLA) พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (polybutylene succinate, PBS) รวมถึงโคพอลิเมอร์และอนุพันธ์ผสมของพอลิเมอร์เหล่านี้ (Kulprecha, 2006) ซึ่งเมื่อพิจารณาสมบัติด้านต่างๆ พบว่า มีความเป็นไปได้มากที่จะนำ PHAs มาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จาก อุตสาหกรรมปิโตรเคมี เนื่องจากมีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก คือ สามารถนำมาขึ้นรูปและทำให้เป็นแผ่นฟิล์มหรือไฟเบอร์ได้ (Lee, 1996 ; Khanna และ Srivastava, 2005)

## 2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates, PHAs)

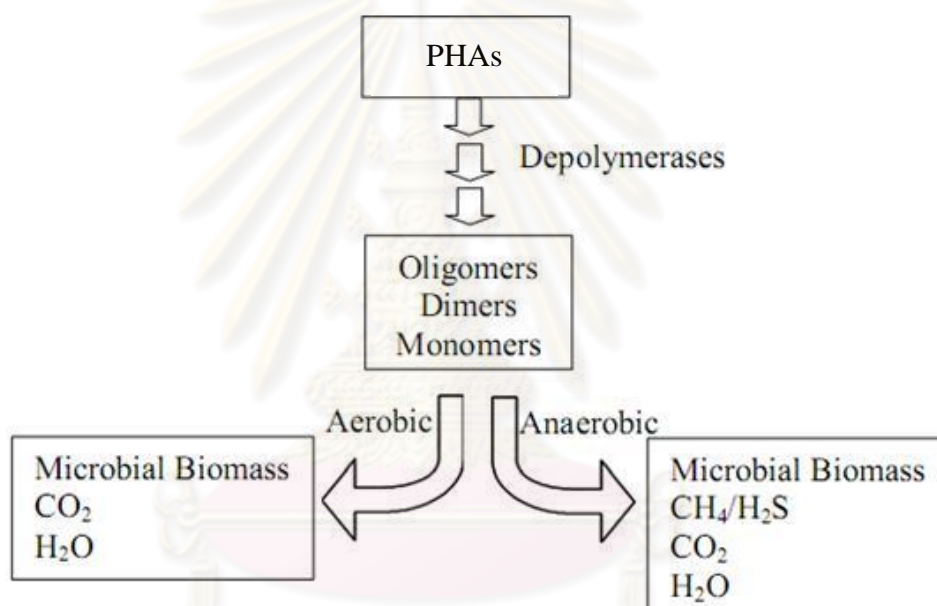
พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่กำลังได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติกซึ่งเทียบเคียงได้กับพอลิเมอร์สังเคราะห์ชนิดพอลิโพรพิลีนและพอลิเอธิลีน ทั้งในแง่ของจุดหลอมเหลว น้ำหนักโมเลกุล การต้านแรงดึง และความสามารถในการเกิดผลึก เป็นต้น นอกจากนี้ PHAs ยังสามารถเบี่ยงเบนระนาบแสงได้ (optically active) มีความสม่ำเสมอทางด้านเคมีสเตอริโอของหน่วยซ้ำ (isotactic) รวมทั้งไม่ละลายน้ำ (Brandl และคณะ, 1990 ; Zinn และคณะ, 2001 ; Reddy และคณะ, 2003 ; Shahhosseini, 2004) จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้หลากหลาย และมีข้อได้เปรียบกว่าพลาสติกสังเคราะห์เนื่องจาก PHAs เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางธรรมชาติได้อย่างสมบูรณ์ จึงเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (eco-friendly) (Steinbüchel และ Fuchtenbusch, 1998)

PHAs เป็นกลุ่มพอลิเมอร์ประเภทพอลิเอสเทอร์ที่สังเคราะห์และสะสมได้ตามธรรมชาติ โดยจุลินทรีย์หลากหลายชนิดในลักษณะเม็ดแกรนูล (granule) ซึ่งอยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ภายใต้สภาวะที่สารอาหารไม่สมดุล กล่าวคือ มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป ขณะที่มีการจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือ trace element อื่นๆ เช่น แมกนีเซียม แคลเซียม เหล็ก เป็นต้น (Anderson และ Dawes, 1990) เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองและแหล่งคาร์บอนให้แก่เซลล์ โดยจำนวนและขนาดของแกรนูลในแต่ละเซลล์ จะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ เช่น *Ralstonia eutropha* จะมีแกรนูลประมาณ 8-12 แกรนูลต่อเซลล์ (Ballard และคณะ, 1987) ขณะที่ *Pseudomonas oleovorans* จะมีแกรนูลขนาดใหญ่เพียง 1-2 แกรนูลต่อเซลล์เท่านั้น (Klinke และคณะ, 1999)



รูปที่ 2.1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงการสะสม PHAs ในรูปของเม็ดแกรนูลภายในเซลล์ของ *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (Fernández และคณะ, 2005)

นอกจากนี้ PHAs ยังสามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติด้วยจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์ดีพอลิเมอร์เอส (depolymerase) และเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) (Jendrossek, 2001 ; Shah และคณะ, 2007) โดยจุลินทรีย์จะปล่อยเอนไซม์เหล่านี้ออกมาภายนอกเซลล์ เพื่อย่อยพอลิเมอร์ให้กลายเป็นหน่วยย่อยหรือโมโนเมอร์ จากนั้นโมโนเมอร์ที่มีขนาดเล็กนี้จะถูกดูดซึมผ่านเข้าทางผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ และเกิดปฏิกิริยาเมตาบอลิซึมเปลี่ยนไปเป็นสารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารและแหล่งพลังงานได้ พร้อมทั้งปล่อยน้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดคาร์บอกซิลิกออกมาในภาวะที่มีออกซิเจน หรือปล่อยก๊าซมีเทนออกมาภายใต้ภาวะไร้อากาศ ได้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการย่อยสลาย (Evan และ Sikdar, 1990 ; Khanna และ Srivastava, 2005)

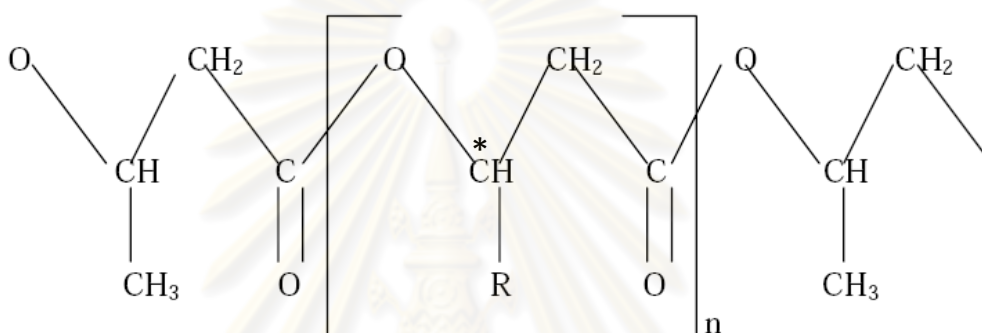


รูปที่ 2.2 วิธีการย่อยสลาย PHAs (Jendrossek และ Handrick, 2002)

คุณสมบัติของ PHAs จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับการรวมตัวกันของชนิดและปริมาณของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ (Lee, 1996) นอกจากนี้ ชนิดของหมู่ฟังก์ชันและระดับความอึดตัวของพันธะยังมีผลต่อสมบัติของพอลิเมอร์ด้วย (Eggink และคณะ, 1995) โดยทั่วไป น้ำหนักโมเลกุลของ PHAs จะอยู่ในช่วง  $10^5$  ถึง  $10^6$  คาลตัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และภาวะในการเจริญของเชื้อ (Sudesh และคณะ, 2000 ; Reddy และคณะ, 2003 ; Fernández และคณะ, 2005)

### 2.2.1 โครงสร้างของ PHAs

PHAs มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรงที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวที่หนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์ตัวที่สองตรงตำแหน่งบีต้า-คาร์บอน ซึ่งเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) โดยแสดงโครงสร้างเป็น R-configuration ในรูปของกรดไขมัน R-(3)-hydroxy fatty acid หรือ R- $\beta$ -hydroxy fatty acid ซึ่งการเชื่อมต่อกันของโมโนเมอร์เป็นแบบหัวต่อหาง (head-to-tail configuration) เช่นเดียวกับพอลิโพรพิลีน (Brandl และคณะ, 1990) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHAs (Khanna และ Srivastasa, 2005)

กำหนดให้ \*C แสดงตำแหน่งไครัลคาร์บอน

เมื่อ n = 1	เมื่อ R = ไฮโดรเจน(H)	สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต)	; P(3HP)
	เมื่อ R = เมทิล(CH <sub>3</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	; P(3HB)
	เมื่อ R = เอทิล(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	; P(3HV)
	เมื่อ R = โพรพิล(C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต)	; P(3HHX)
	เมื่อ R = บิวทิล(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต)	; P(3HHp)
	เมื่อ R = เพนทิล(C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต)	; P(3HO)
	เมื่อ R = เฮกซิล(C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีโนนาโนเอต)	; P(3HN)
	เมื่อ R = เฮปทิล(C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีเดคาโนเอต)	; P(3HD)
	เมื่อ R = ออกซิล(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีอันเดคาโนเอต)	; P(3HUD)
	เมื่อ R = โนนิล(C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีโดเดคาโนเอต)	; P(3HDD)
เมื่อ n = 2	เมื่อ R = ไฮโดรเจน(H)	สารนี้คือ	พอลิ(4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	; P(4HB)
เมื่อ n = 3	เมื่อ R = ไฮโดรเจน(H)	สารนี้คือ	พอลิ(5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	; P(5HP)

(หมายเหตุ n มีค่าได้ตั้งแต่ 600 -35,000)



## 2.2.2 การจัดจำแนกชนิดของ PHAs

2.2.2.1 การจัดจำแนกชนิดตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในหน่วยโมโนเมอร์ (Medison และ Huisman, 1999 ; Zimm และคณะ, 2001) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

(1) พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่สั้น (short-chain-length PHAs หรือ scl-PHAs) คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 3-5 อะตอม เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) พอลิ(3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) เป็นต้น

(2) พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่ปานกลาง (medium-chain-length PHAs หรือ mcl-PHAs) คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 6-14 อะตอม เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต) เป็นต้น

(3) พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่ยาว (long-chain-length PHAs หรือ lcl-PHAs) คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมมากกว่า 14 อะตอม

PHAs จะมีสมบัติแตกต่างกันไปตามความยาวของสายโซ่ เช่น PHAs ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีความยาวสายโซ่ของหมู่แทนที่สั้นจะเป็นเทอร์โมพลาสติก ซึ่งจะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมีมากที่สุด ขณะที่ PHAs ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีความยาวสายโซ่ของหมู่แทนที่ปานกลางจะมีคุณสมบัติเป็นอีลาสโตเมอร์และยาง (rubber) (Gagnon และคณะ, 1992)

2.2.2.2 การจัดจำแนกชนิดโดยแบ่งตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์ PHA แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท (Luengo และคณะ, 2003) คือ

(1) โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อรวมกัน ตัวอย่างเช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB)

(2) เฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อรวมกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ สามารถแบ่งได้ดังนี้

- โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) หรือ P(3HB-co-3HV) หรือ PHBV พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB-co-4HB) เป็นต้น

- เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB-co-3HV-co-4HB) เป็นต้น

### 2.2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้

ในธรรมชาติ มีพืช รา และแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้ แต่กลุ่มที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHAs ได้ในปริมาณสูงจะเป็นแบคทีเรีย ในปัจจุบันคาดว่า มีแบคทีเรียมากกว่า 300 ชนิดที่ถูกระบุว่าสามารถผลิตและสะสม PHAs ได้ (Volova และคณะ, 2007) แต่อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียที่สามารถผลิตและสะสม PHAs ได้ในปริมาณสูงๆ มีเพียงไม่กี่ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในจีส *Ralstonia Alcaligenes Bacillus Aeromonas* และ *Pseudomonas* ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	พอลิเมอร์	เอกสารอ้างอิง
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Lauric acid , oleic acid	mcl-PHAs	(Lee และคณะ, 2000; Han และคณะ, 2004)
<i>Alcaligenes latus</i>	Malt, soy waste , milk waste, vinegar wastese, sesame oil	P(3HB)	(Wong และคณะ, 2005)
<i>Bacillus cereus</i>	Glucose ,ε-caprolactone, sugarbeet molasses	P(3HB), terpolymer	(Labuzek และ Radecka คณะ, 2001; Yilmaz และ Beyatli, 2005; Valappil และคณะ, 2007)
<i>Bacillus sp.</i>	Nutrient broth, glucose, alkanoates,caprolactone, soy molasses	P(3HB) , PHBV, copolymer	(Katircioglu และคณะ, 2003; Shamala และคณะ, 2003; Tajima และคณะ, 2003; Yilmaz และคณะ ,2005; Full และคณะ ,2006)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Palm olein, palm stearin, crude palm oil, xylose, palm kernel oil, oleic acid, evulinic acid	P(3HB) , PHBV	(Keenan และคณะ, 2004; Nakas และคณะ, 2004; AliasและTan, 2005; Celik และคณะ, 2005)

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้ (ต่อ)

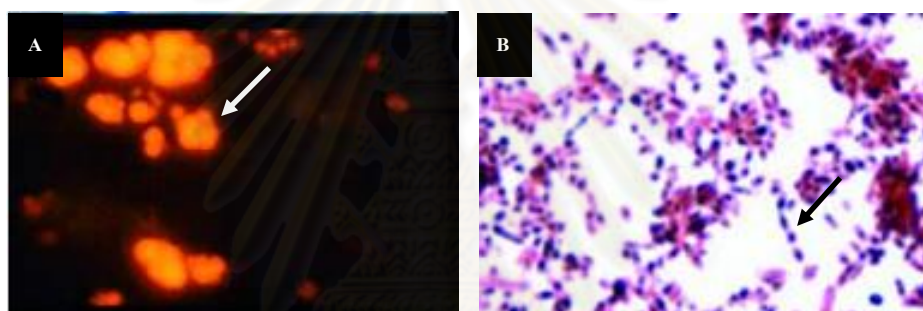
จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	พอลิเมอร์	เอกสารอ้างอิง
<i>Burkholderia sacchari</i> sp. nov.	Adonitol, arabinose, arabitol, cellobiose, fructose, fucose, lactose, maltose, melibiose, raffinose, rhamnose, sorbitol, sucrose, trehalose, xylitol	P(3HB) , PHBV	(Bramer และคณะ, 2001)
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	Glucose ,technical oleic acid, waste free fatty acid, waste free frying oil	mcl-PHAs	(Hoffmann และ Rehm, 2004; Fernandez และ คณะ, 2005)
<i>Pseudomonas</i> <i>oleovorans</i>	Octanoic acid	mcl-PHAs	(Durner และคณะ, 2000; Foster และคณะ, 2005)
<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i>	Glucose , octanoic acid, undecenoic acid	mcl-PHAs	(Tobin และ O'Connor , 2005; Hartmann และ คณะ, 2006)
<i>Pseudomonas putida</i> , <i>P. jessenii</i> , <i>P. fluorescens</i>	Glucose , aromatic monomers	aromatic polymers	(Tobin และ O'Connor , 2005; Ward และ O'Connor, 2005 ; Ward และคณะ, 2005)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Glucose ,soybean oil, alcohols, alkanoates	mcl-PHAs	(Xu และคณะ, 2005)
<i>Rhodopseudomonas</i> <i>palustris</i>	Acetate, malate, fumarate, succinate, propionate, malonate, gluconate, butyrate, glycerol, citrate	P(3HB) , PHBV	(Mukhopadhyay และ คณะ, 2005)

ที่มา : Verlinden และคณะ (2007)

ถึงแม้ว่าปัจจุบันมีการค้นพบอนุพันธ์พอลิเอสเทอร์ที่อยู่ในกลุ่ม PHAs นี้มากกว่า 80 ชนิด (Fernández และคณะ, 2005) แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดที่เป็นที่รู้จักแพร่หลาย โดยอนุพันธ์พอลิเมอร์ที่เป็นที่รู้จักมากที่สุดได้แก่ พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

## 2.3 พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [Poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB)]

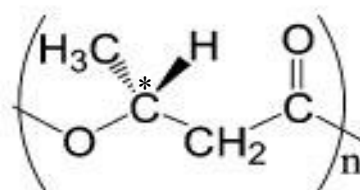
พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [Poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB) หรือ PHB] ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในเซลล์ของจุลินทรีย์ *Bacillus megaterium* ในปี ค.ศ. 1926 โดย Lemoigne นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศส (Braunegg, 1998) โดย P(3HB) ที่ถูกสร้างและสะสมขึ้นนี้ พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสปอร์ เพราะมีการสะสมของก้อนไขมัน (lipid inclusion) ในช่วงที่มีการเจริญแบบคงที่ของแบคทีเรีย (McCool และคณะ, 1996) สำหรับการตรวจหา PHAs ในเซลล์ของจุลินทรีย์เบื้องต้นจะใช้เทคนิค fat stain ซึ่งเป็นการย้อมสีสารประเภทไขมันที่สะสมอยู่ภายในเซลล์แบคทีเรียด้วยสีย้อมไนล์บลู เอ (Nile Blue A) หรือสีซูดานแบลค บี (Sudan black B) (รูปที่ 2.4) (López-Cortés และคณะ, 2008)



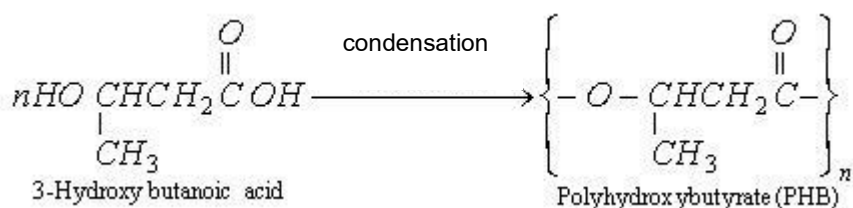
รูปที่ 2.4 เซลล์ที่ย้อมด้วยสีไนล์บลู เอ (A) และสีซูดานแบลค บี (B) (López-Cortés และคณะ, 2008)

### 2.3.1 โครงสร้างของ P(3HB)

P(3HB) เกิดจากการเชื่อมต่อกันของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3-hydroxybutyrate, 3HB) ซึ่งมีหมู่เมทิล (methyl group) มาต่อกับสายพอลิเมอร์หลักตรงตำแหน่งไครัลคาร์บอน (\*C) และมีโมโนเมอร์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ได้เป็นสารประกอบพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) (Loo และ Sudesh, 2007b) ดังแสดงในรูปที่ 2.5 และ 2.6 ตามลำดับ



รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ P(3HB) (Loo และ Sudesh, 2007b)



รูปที่ 2.6 การสังเคราะห์ P(3HB) จากโมโนเมอร์ 3HB (Sudesh และคณะ, 2000)

### 2.3.2 สมบัติของโพลิเมอร์ P(3HB)

P(3HB) มีสมบัติใกล้เคียงกับพอลิโพรพิลีน แต่มีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีบางประการที่ดีกว่า กล่าวคือ มีปริมาณผลึกในโครงสร้างสูง คือ ประมาณ ร้อยละ 50 ถึง 70 จึง ทำให้พอลิเมอร์มีความต้านทานต่อตัวทำละลายต่างๆดีมาก มีความต้านทานต่อไขมันและน้ำมันปานกลางถึงดี นอกจากนี้ยังมีความต้านทานต่อรังสี UV ดี แต่ไม่ทนต่อกรดและด่าง และจากการที่ P(3HB) มีการแพร่ผ่านของก๊าซออกซิเจนต่ำ จึงสามารถนำไปใช้เป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ไวต่อออกซิเจนได้ดี (Grothe และคณะ, 1999; Sharma และ Mallick, 2005) อย่างไรก็ตาม P(3HB) ยังมีข้อจำกัดในการนำไปใช้งานเนื่องจากมีความแข็ง (stiffness) และเปราะ (brittleness) (Evan และ Sikdar, 1990 ; Koning และคณะ, 1992 ; Sudesh และคณะ, 2000) ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพ เคมีและเชิงกลของ PP และP(3HB)

สมบัติ	PP	P(3HB)
จุดหลอมเหลว (melting temperature) (°C)	171-186	171-182
ความสามารถเป็นผลึก (degree of crystallinity) (%)	65-70	65-80
ความหนาแน่น (density) (g/cm <sup>3</sup> )	0.94-0.95	1.23-1.25
น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) (x10 <sup>5</sup> Dalton)	2.2-7	1-8
การกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution)	5-12	2.2-3
ความแข็ง (flexural modulus) (GPa)	1.7	3.5-4
ความสามารถในการต้านแรงดึง (tensile strength) (MPa)	39	40
ความสามารถในการขยายตัว (extension to break) (%)	400	6-8



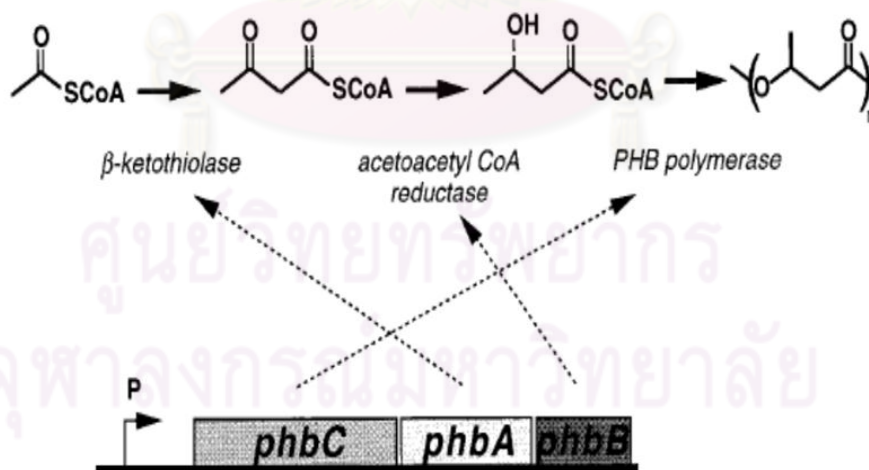
ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพ เคมีและเชิงกลของ PP และP(3HB) (ต่อ)

สมบัติ	PP	P(3HB)
ความทนทานต่อแสงอัลตราไวโอเลต (UV resistance)	ไม่ดี	ดี
ความทนทานต่อตัวทำละลาย (solvent resistance)	ดี	ไม่ดี
ความสามารถให้ออกซิเจนผ่าน(oxygen permeability) ( $\text{cm}^{-1} \text{m}^{-2} \text{atm}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	1,700	45

ที่มา: Evan และSikdar (1990)

### 2.3.3 วิธีชีวสังเคราะห์ P(3HB)

สำหรับวิธีการสังเคราะห์ P(3HB) มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์  $\beta$ -ketothiolase เอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase และเอนไซม์ P(3HB) synthase หรือเอนไซม์ P(3HB) polymerase ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ในแต่ละขั้นตอนในการสังเคราะห์ P(3HB) นั้น เกิดจากการแสดงออกของ *pha* CBA cluster (Reddy และคณะ, 2003) ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของ *pha* CBA cluster ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ P(3HB) ประกอบด้วยโปรโมเตอร์และยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ ได้แก่ *pha C* *pha A* และ *pha B* ตามลำดับ (Reddy และคณะ, 2003)

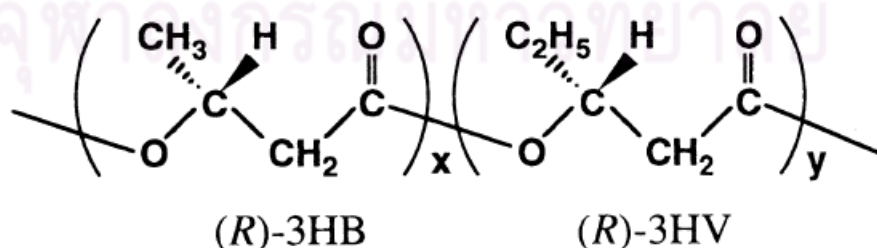
ปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีกลไกการทำงานดังนี้ เริ่มจาก acetyl-CoA 2 โมเลกุลถูกควมรวมเป็น acetoacetyl-CoA โดยอาศัยเอนไซม์  $\beta$ -ketothiolase จากนั้น acetoacetyl-CoA จะถูกรีดิวซ์ไปเป็น 3-hydroxybutyryl-CoA ด้วยเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase จากนั้น 3-hydroxybutyryl-CoA ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ในปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันจะถูกพอลิเมอร์ไรซ์ไปเป็น P(3HB) ด้วยเอนไซม์ P(3HB) polymerase

แต่เนื่องจาก P(3HB) มีความแข็งแต่เปราะ ไม่ยืดหยุ่นและขึ้นรูปได้ยาก จึงเป็นข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ใช้งานและไม่เหมาะจะใช้ในเชิงพาณิชย์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์ พบว่า มีสมบัติทางกายภาพและเชิงกลที่ดีกว่า P(3HB) (Sudesh และคณะ, 2000)

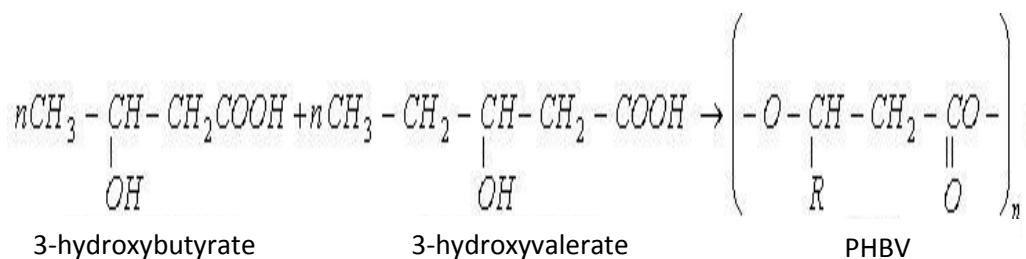
## 2.4 พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), P(3HB-co-3HV) หรือ PHBV]

### 2.4.1 โครงสร้างของ PHBV

พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), P(3HB-co-3HV) หรือ PHBV] เป็นโคพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) ต่อเชื่อมกับ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3-hydroxyvalerate, 3HV) ด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกกับหมู่ไฮดรอกซี (Loo และ Sudesh, 2007b) (แสดงดังรูปที่ 2.8 และ 2.9) โดยมีการเรียงตัวของโมโนเมอร์เป็นแบบสลับ (Matsusaki และคณะ, 2000) (ดังรูปที่ 2.10) แสดงลักษณะเป็นไอโซไดมอร์ฟิซึม (isodimorphism) ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์สองชนิดที่มีรูปร่างและขนาดคล้ายกันจึงสร้างผลึกร่วมกันได้ (cocrystallization) (Dai และคณะ, 2008 ; Galego และคณะ, 2000)



รูปที่ 2.8 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHBV ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3HB และโมโนเมอร์ 3HV ต่อเชื่อมกันด้วยพันธะเอสเทอร์ (Loo และ Sudesh, 2007b)



รูปที่ 2.9 การสังเคราะห์ PHBV จากโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV (Sudesh และคณะ, 2000)  
(เมื่อกำหนดให้ R = CH<sub>3</sub>: methyl, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>: ethyl)



รูปที่ 2.10 การเรียงตัวของโมโนเมอร์ 3HB และโมโนเมอร์ 3HV ในสายโคพอลิเมอร์ PHBV แบบสุ่ม (Kumar และคณะ, 2001)

#### 2.4.2 สมบัติของโคพอลิเมอร์ PHBV

เนื่องจากมีหมู่เอทิล (ethyl group) เป็นสายโซ่ด้านข้างของโมโนเมอร์ 3HV จึงทำให้สายโคพอลิเมอร์ PHBV มีการเรียงตัวกันอย่างไม่แน่นอน ส่งผลให้จุดหลอมเหลว ระดับการเกิดผลึก ความทนต่อแรงดึง (tensile strength) และ modulus strength มีค่าลดลง ในขณะที่ความยืดหยุ่น (flexibility) ความทนต่อการกระแทก (impact strength) มีค่าเพิ่มขึ้น และสามารถทำให้เป็นเส้นหรือแผ่นบางได้ (Du และคณะ, 2001; Chen และ Wang, 2002 ; Khanna และ Srivastava, 2005; Hori และคณะ, 2009) นอกจากนี้ โคพอลิเมอร์ PHBV ยังมีความเสถียรในน้ำ น้ำมันและแอลกอฮอล์ แต่ไม่ทนหรือทนน้อยต่อกรดและด่าง และสามารถย่อยสลายได้เร็วกว่า P(3HB) (Akmal และคณะ, 2003) สำหรับสมบัติทางกายภาพ เคมีและเชิงกลของโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเทียบกับ P(3HB) และ PP แสดงอยู่ในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สมบัติทางกายภาพ เคมีและเชิงกลของ PHBV เมื่อเทียบกับ P(3HB) และ PP

สมบัติ	P(3HB) <sup>a</sup>	P(3HB-co-20%3HV) <sup>b</sup>	PP <sup>a</sup>
ความหนาแน่น (density) (g/cm <sup>3</sup> )	1.250	N/A	0.905
ความสามารถเป็นผลึก (degree of crystallinity) (%)	80	56	70
น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) (x10 <sup>5</sup> Dalton)	5	N/A	2
อุณหภูมิกลาสทรานสิชัน (glass transition temperature) (°C)	4	-1	-10
อุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature) (°C)	180	145	176
ความแข็ง (flexural modulus) (GPa)	4.0	1.2	1.7
ความสามารถในการต้านแรงดึง (tensile strength) (MPa)	40	32	38
ความสามารถในการขยายตัว (extension to break) (%)	6	50	400
ความทนทานต่อแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV resistance)	ดี	N/A	ไม่ดี
ความทนทานต่อตัวทำละลาย (solvent resistance)	ไม่ดี	N/A	ดี

ที่มา : Hocking และ Marchessault (1994) ; Doi (1990)

หมายเหตุ N/A : ไม่ปรากฏข้อมูล

a : ข้อมูลอ้างอิงจาก Hocking และ Marchessault (1994)

b : ข้อมูลอ้างอิงจาก Doi (1990)

Hocking และ Marchessault (1994) ; Choi และ Lee (1999) ; Du และคณะ (2001) Marangoni และคณะ (2002) ; Zakaria และคณะ (2010) พบว่า สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV จะถูกควบคุมโดยอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HB (3HB-generating carbon source) ต่อสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HV (3HV-generating carbon source) โดยหากมีอัตราส่วนระหว่างสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HB ต่อสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HV สูง จะทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูง แต่มีโมลเปอร์เซ็นต์ของ 3HV ต่ำ ขณะที่หากมีอัตราส่วนระหว่างสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HB ต่อสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HV ต่ำ จะทำให้มีโมลเปอร์เซ็นต์ของ 3HV สูง แต่น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้จะต่ำ จากการที่โคพอลิเมอร์ PHBV มีสัดส่วนของ 3HV ที่แตกต่างกันนี้เองจึงทำให้มีสมบัติทางกายภาพและเชิงกลที่แตกต่างกันขึ้นกับปริมาณ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบภายในโคพอลิเมอร์ (ดังแสดงในตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 สมบัติทางกายภาพและเชิงกลของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ตั้งแต่ 0 จนถึง 25 โมลเปอร์เซ็นต์

สัดส่วนของ โมโนเมอร์ 3HV (โมลเปอร์เซ็นต์)	อุณหภูมิ หลอมเหลว (°C)	อุณหภูมิกลาส ทรานสิชัน (°C)	ค่ายังต์ โมดูลัส (GPa)	ความสามารถใน การต้านแรงดึง (MPa)	ความทนต่อ การกระแทก (J/m)
0	179	10	3.5	40	50
3	170	8	2.9	38	60
9	162	6	1.9	37	95
14	150	4	1.5	35	120
20	145	-1	1.2	32	200
25	137	-6	0.7	30	400

ที่มา : Hocking และ Marchessault , 1994

#### 2.4.2.1 สมบัติทางอุณหภูมิจากของโคพอลิเมอร์ PHBV (thermal properties)

โคพอลิเมอร์ PHBV ซึ่งมีโมโนเมอร์ 3HV เป็นองค์ประกอบ จะมีผลให้ลดอุณหภูมิต่างๆลง ได้แก่ ได้แก่ อุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature ,  $T_m$ ) อุณหภูมิกลาสทรานสิชัน (glass transition temperature ,  $T_g$ ) ค่าความร้อนของการหลอมเหลว (heat of fusion ,  $\Delta H_f$ )



Dai และคณะ (2007) พบว่า โคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV สูงขึ้น จะช่วยลดอุณหภูมิหลอมเหลวลง กล่าวคือ โคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 40 โมลเปอร์เซ็นต์ จะมีผลไปลดอุณหภูมิหลอมเหลวของพอลิเมอร์จาก 180 องศาเซลเซียสในกรณีที่เป็นโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) ให้เหลือเพียง 75 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเพิ่มสัดส่วนของ 3HV ให้สูงขึ้น จนถึง 95 โมลเปอร์เซ็นต์ กลับพบว่า มีผลทำให้อุณหภูมิหลอมเหลวเพิ่มขึ้นเป็น 108 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Savenkova และคณะ (2000) ซึ่งพบว่า เมื่อเพิ่มสัดส่วนของ 3HV ตั้งแต่ 0 ไปจนถึง 20 โมลเปอร์เซ็นต์ จะมีผลช่วยลดอุณหภูมิหลอมเหลวจาก 180 องศาเซลเซียสเป็น 123 องศาเซลเซียส ขณะเดียวกันก็ยังมีผลให้อุณหภูมิกลาสทรานสิชันลดลงจาก 3.1 องศาเซลเซียส เป็น -6.3 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ การศึกษาของ Hu และคณะ (1997) ยังพบว่า การเพิ่มขึ้นของสัดส่วน 3HV จาก 9 จนถึง 95 โมลเปอร์เซ็นต์ จะมีผลไปลดอุณหภูมิหลอมเหลวลงตั้งแต่ 178 จนถึง 99 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิกลาสทรานสิชันก็ลดลงจาก 4 องศาเซลเซียสจนถึง -16 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Zakaria และคณะ (2010) ที่ได้รายงานว่า อุณหภูมิกลาสทรานสิชันจะลดลงจาก 0.5 เป็น 0.1 องศาเซลเซียส เมื่อมีปริมาณ 3HV เพิ่มขึ้นจาก 12 ไปเป็น 21 โมลเปอร์เซ็นต์ สำหรับค่าความร้อนในการหลอมเหลว พบว่า มีแนวโน้มลดลงในลักษณะเดียวกันกับอุณหภูมิหลอมเหลว โดยมีค่าต่ำที่สุดเมื่อมีสัดส่วนของ 3HV อยู่ระหว่าง 20 ถึง 60 โมลเปอร์เซ็นต์ (Doi, 1990)

#### 2.4.2.2 สมบัติเชิงกลของโคพอลิเมอร์ PHBV (mechanical properties)

สมบัติเชิงกลของโคพอลิเมอร์ PHBV จะเปลี่ยนแปลงตามสัดส่วนของ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบ กล่าวคือ การเพิ่มขึ้นของ 3HV จะมีผลทำให้พอลิเมอร์มีความยืดหยุ่น (flexibility) มากขึ้น โดยดูได้จากค่ายังส์โมดูลัส (Young's modulus) ที่ลดลง และยังช่วยลดความแข็ง (stiffness) โดยดูจากค่าการทนแรงกระแทก (impact strength) ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ สัดส่วนของ 3HV ที่เพิ่มขึ้นยังทำให้มีค่าการต้านแรงดึง (tensile strength) และเปอร์เซ็นต์การยืด (elongation to break) เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจะมีผลทำให้โคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้มีความเหนียว (toughness) เพิ่มขึ้น (Du และคณะ, 2001)

Savenkova และคณะ (2000) รายงานว่า การเพิ่มขึ้นของ 3HV จาก 0 ถึง 20 โมลเปอร์เซ็นต์ มีผลช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การยืดเป็น 180 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับ งานวิจัยของ Doi (1990) และ Hu และคณะ (1997) ที่พบว่า แผ่นฟิล์มที่มี 3HV เท่ากับ 34 โมลเปอร์เซ็นต์ จะมีค่าเปอร์เซ็นต์การยืดถึง 970 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเปอร์เซ็นต์การยืดสูงถึง 1200 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีสัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 55 โมลเปอร์เซ็นต์ ขณะที่หากเพิ่มสัดส่วนของ 3HV ให้สูงถึง 71 โมลเปอร์เซ็นต์ จะมีผลทำให้โคพอลิเมอร์กลับมามีสมบัติแข็งแต่เปราะเช่นเดียวกับ P(3HB)

#### 2.4.2.3 ระดับการเป็นผลึก (degree of crystallinity)

Sudesh และคณะ (2000) พบว่า ระดับการเป็นผลึกของโคพอลิเมอร์ PHBV จะลดลงเมื่อมีสัดส่วนของ 3HV เพิ่มขึ้น โดยเมื่อเพิ่มสัดส่วนของ 3HV จาก 0 ไปจนถึง 20 โมลเปอร์เซ็นต์ จะมีผลทำให้ระดับการเป็นผลึกลดลงจาก 63 เป็น 31 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการที่พอลิเมอร์มีระดับการเป็นผลึกลดลงจะมีข้อดีคือช่วยให้พลาสติกมีลักษณะใสขึ้น (เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตน์, 2538) และเมื่อวิเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ที่มี 3HV อยู่ในช่วง 20 ถึง 40 โมลเปอร์เซ็นต์ด้วย NMR (nuclear magnetic resonance) พบว่า 3HV ที่เกิดขึ้นในช่วงแรกจะเกิดพอลิเมอร์ที่ไม่เป็นระเบียบหรือที่เรียกว่าบริเวณอสัณฐาน (amorphous region) แทรกอยู่ในบริเวณที่เป็นผลึก (crystalline region) ของ 3HB ที่มีอยู่เดิมแบบสุ่ม แต่เมื่อเพิ่มสัดส่วนของ 3HV ให้สูงขึ้นมากกว่า 40 โมลเปอร์เซ็นต์ กลับพบว่า จะมีผลไปเพิ่มระดับการเป็นผลึกให้สูงขึ้นอีก (Cox, 1994)

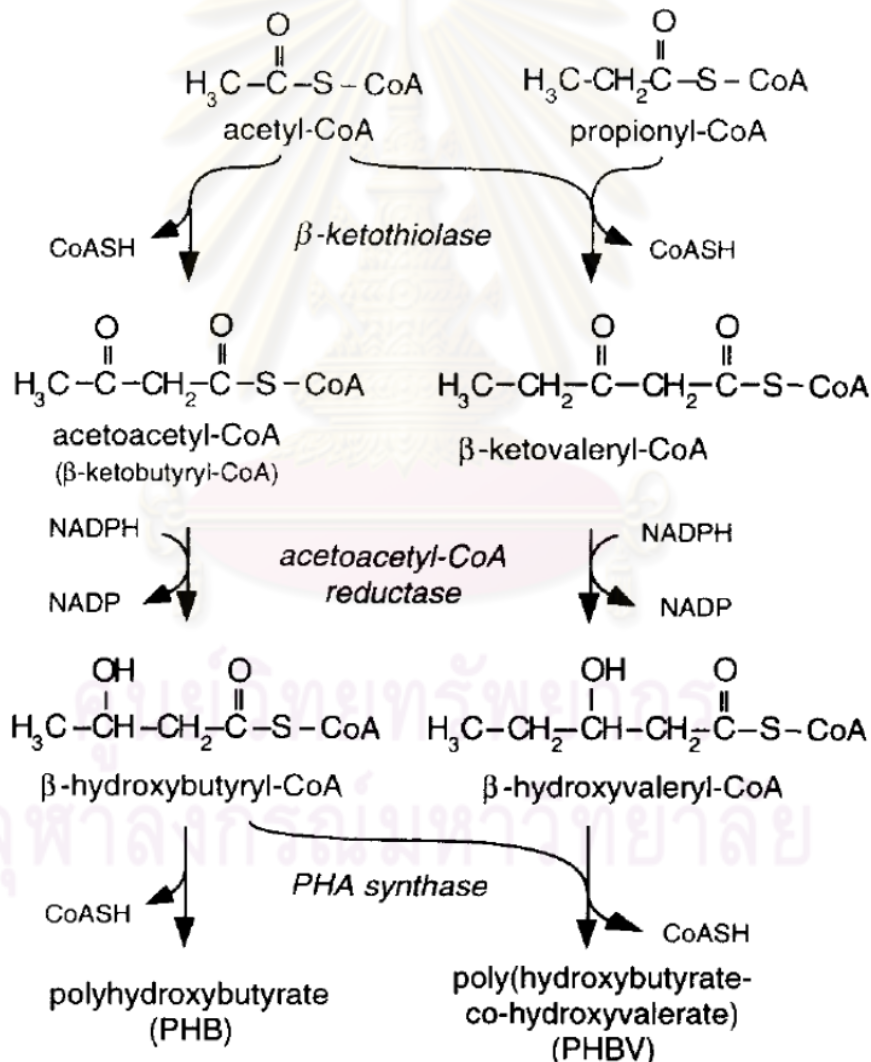
#### 2.4.2.4 การทนสารเคมีและสมบัติในการซึมผ่านของโคพอลิเมอร์

Madison และ Huisman (1999) พบว่า โคพอลิเมอร์ PHBV สามารถทนสารเคมีได้ดี โดยเฉพาะทนสารไฮโดรคาร์บอนและน้ำมันได้ดีที่สุด มีความเสถียรในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 3 ถึง 10 สำหรับสมบัติการป้องกันโดยทั่วไป ได้แก่ สมบัติการซึมผ่านของความชื้นและออกซิเจน พบว่า เมื่อสัดส่วนของ 3HV เพิ่มขึ้น อัตราการซึมผ่านของความชื้นค่อนข้างคงที่ แต่อัตราการซึมผ่านของออกซิเจนจะเพิ่มขึ้น

จากการศึกษาสมบัติด้านต่างๆ ของโคพอลิเมอร์ PHBV สามารถสรุปได้ว่า สัดส่วนของโมเมอร์ 3HV ที่แตกต่างกันจะส่งผลให้โคพอลิเมอร์มีสมบัติทางกายภาพ เคมีและเชิงกลแตกต่างกัน การมีปริมาณ 3HV ในโคพอลิเมอร์ PHBV ปริมาณน้อย จะทำให้พอลิเมอร์ที่ได้มีลักษณะคล้าย PVC และ PS คือ แข็งและเปราะ แต่ถ้ามีปริมาณ 3HV ในปริมาณที่เหมาะสม จะมีลักษณะเหมือนกับ PP ซึ่งมีความสมดุลของความแข็งและความเหนียว ส่วนการมี 3HV ในปริมาณสูง จะทำให้ได้พอลิเมอร์ที่มีความนิ่มและเหนียวเหมือน PE (Barker และคณะ, 1997) โดยการมี 3HV ในสายโคพอลิเมอร์ PHBV ปริมาณสูงเกินไป คือ ตั้งแต่ 47 ถึง 100 โมลเปอร์เซ็นต์ มีผลให้อุณหภูมิหลอมเหลวและระดับการเป็นผลึกสูงขึ้น ทำให้พอลิเมอร์ที่ได้กลับมามีสมบัติแข็งและเปราะเหมือนโพลิเมอร์ P(3HB) (Bloembergen และคณะ, 1986) ซึ่งโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสมบัติเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์มากที่สุด คือ โคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV อยู่ในช่วงประมาณ 20 ถึง 30 โมลเปอร์เซ็นต์ (Nobes และคณะ, 1994 ; Barker และคณะ, 1997 ; Sudesh และคณะ, 2000 ; Volova, 2004 ; Rudnik, 2008 ) โดยพบว่า เหมาะจะนำไปขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มที่มีความยืดหยุ่นได้ (flexible film)

### 2.4.3 วิธีชีวสังเคราะห์ PHBV

สำหรับกระบวนการสังเคราะห์ PHBV ต้องอาศัยสารตัวกลางสองชนิด ได้แก่  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA หรือ 3-hydroxybutyryl-CoA (3HB-CoA) และ  $\beta$ -hydroxyvaleryl-CoA หรือ 3-hydroxyvaleryl-CoA (3HV-CoA) โดย 3HV-CoA ได้มาจากการปฏิกิริยาควมรวมระหว่าง acetyl-CoA กับ propionyl-CoA ด้วยเอนไซม์  $\beta$ -ketothiolase ได้เป็น  $\beta$ -ketovaleryl-CoA ซึ่งต่อมาจะถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase ให้กลายเป็น 3HV-CoA จากนั้น 3HB-CoA และ 3HV-CoA จะถูกพอลิเมอไรซ์ด้วยเอนไซม์ PHA synthase ได้เป็นโคพอลิเมอร์ PHBV ในที่สุด (Eschenlauer และคณะ, 1996) ดังแสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 วิธีชีวสังเคราะห์ PHBV (Eschenlauer และคณะ, 1996)

สำหรับสารตั้งต้นที่สามารถสังเคราะห์ให้ propionyl-CoA ซึ่งเป็นสารตัวกลางในวิถีการสังเคราะห์ PHBV แบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม (Steinbüchel และ Eversloh , 2003) ดังนี้ (ดังรูปที่ 2.12)

#### 2.4.3.1 สังเคราะห์ได้จาก propionic acid

propionic acid สามารถถูกเปลี่ยนไปเป็นได้ทั้ง 3HV และ pyruvic acid หรือ succinyl-CoA ซึ่งเป็นสารตัวกลางของกระบวนการเมตาบอลิซึมหลัก อันประกอบด้วย วัฏจักร methylcitric acid cycle (MCC) และ วิถี methylmalonyl-CoA ตามลำดับ โดยในสภาวะมีอากาศ เอนไซม์ 2-methyl citric acid synthase จะทำหน้าที่ย่อย propionic acid ผ่านวิถี MCC เพื่อใช้ผลิตเป็น PHBV

#### 2.4.3.2 สังเคราะห์ได้จาก aliphatic fatty acids อื่นๆ

กรดไขมันที่มีลักษณะเป็นสายตรง ซึ่งมีความยาวของสายคาร์บอนมากและมีจำนวนของคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคี่ (odd number of carbon atoms) เช่น valeric acid heptanoic acid nonanoic acid เป็นต้น สามารถเป็นสารตั้งต้นเพื่อใช้ในการสังเคราะห์เป็น propionyl-CoA ได้ เนื่องจากในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการ  $\beta$ -oxidation จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น propionyl-CoA แทนที่จะเป็น acetyl-CoA

#### 2.4.3.3 สังเคราะห์ได้จาก levulinic acid

แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ PHA<sub>sci</sub> synthase levulinic acid (4-ketovaleric acid) จะสร้างพอลิเอสเทอร์ที่มี 4-hydroxyvaleric acid (4HV) เป็นส่วนประกอบ โดยทั่วไป PHAs ที่ถูกสะสมโดยแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี levulinic acid เป็นแหล่งคาร์บอน มักจะประกอบด้วยโมโนเมอร์ทั้ง 4HV 3HB และ 3HV ซึ่งการมี 3HB และ 3HV เกิดขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์นั้น แสดงให้เห็นว่า 3HB และ 3HV เป็นสารตัวกลางที่อยู่เหนือวิธีการย่อยสลาย levulinic acid ซึ่งจะถูกลดผ่าน  $\beta$ -oxidation ให้กลายเป็น propionyl-CoA และ acetyl-CoA ได้

#### 2.4.3.4 สังเคราะห์ได้จาก pentanol

แบคทีเรีย facultative methylotrophic *Paracoccus denitrificans* สามารถสังเคราะห์และสะสมโฮโมพอลิเมอร์ P(3HV) ได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี *n*-pentanol เป็นแหล่งคาร์บอน โดย *n*-pentanol จะถูกออกซิไดซ์ผ่าน valeraldehyde ไปเป็น valeric acid ซึ่งต่อมา valeric acid จะสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น valeryl-CoA ได้

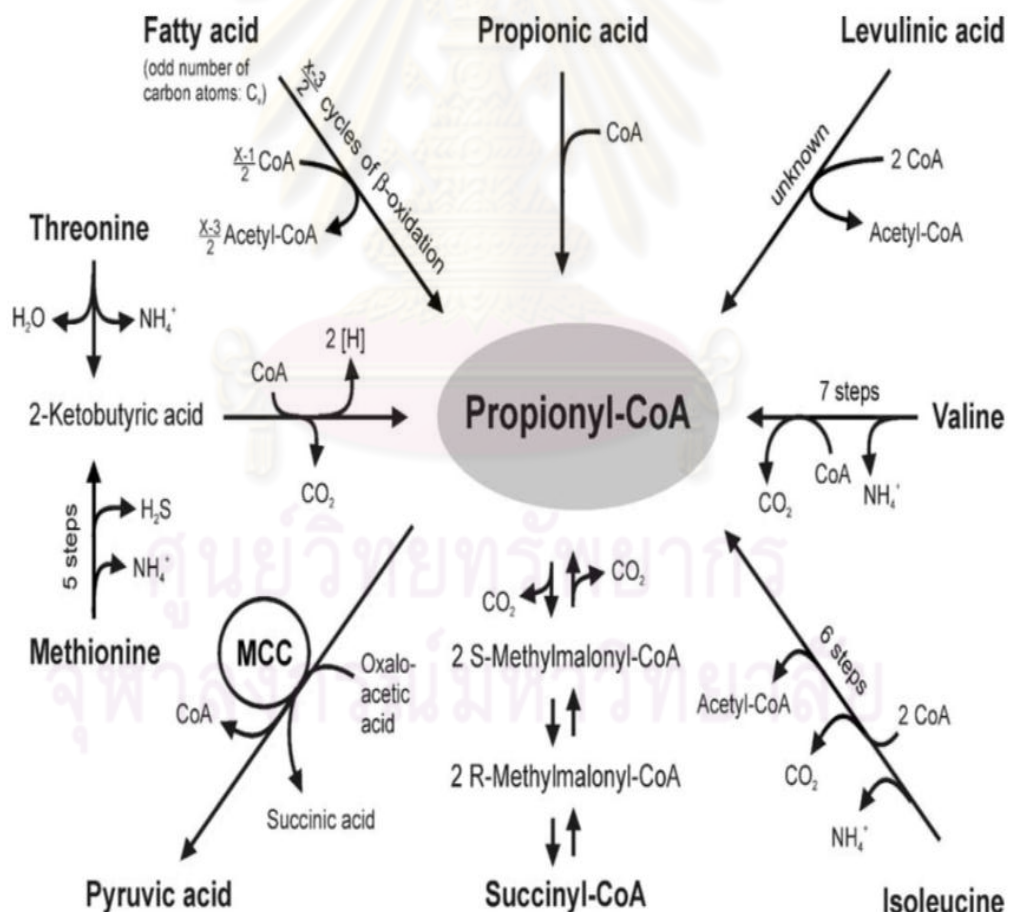
#### 2.4.3.5 สังเคราะห์ได้จาก amino acid

amino acid เป็นอีกแหล่งหนึ่งของสารตั้งต้นที่สำคัญที่ใช้สำหรับสร้างเป็น propionyl-CoA valine isoleucine threonine และ methionine เป็น amino acid ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็น 3HV เนื่องจากสามารถถูกย่อยให้กลายเป็น propionyl-CoA ได้



### 2.4.3.6 สังเคราะห์ได้จากวัฏจักร citric acid ผ่านวิถี methylmalonyl-CoA

วิธีการสังเคราะห์ coenzyme B12-dependent methylmalonyl-CoA เป็นอีกหนึ่งวิธีที่สำคัญในการสังเคราะห์ propionyl-CoA จาก propionic acid หรือจากสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็น propionyl-CoA อื่นๆ ไปเป็น succinyl-CoA เนื่องจากเอนไซม์ในวิธีการสังเคราะห์นี้สามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ (reversible) และคาดว่าวิธีการสังเคราะห์นี้น่าจะเชื่อมอยู่กับวัฏจักร citric acid ด้วย สำหรับการสังเคราะห์ PHBV จะเริ่มจากแบคทีเรียจะย่อยกลูโคสผ่านวิถีสังเคราะห์ 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate ได้เป็น pyruvate ซึ่งต่อมาจะถูกเติมคาร์บอน (carboxylate) ให้กลายเป็น oxaloacetate ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น succinyl-CoA ได้ด้วยปฏิกิริยาย้อนกลับ (reverse reaction) ของวัฏจักร citric acid จากนั้น succinyl-CoA จะถูกเปลี่ยนเป็น propionyl-CoA ได้โดยผ่าน methylmalonyl-CoA



รูปที่ 2.12 แหล่งที่มาของ propionyl-CoA ซึ่งใช้เป็นสารตัวกลางสำหรับกระบวนการสังเคราะห์ PHAs ที่มี 3HV เป็นองค์ประกอบ (Steinbüchel และ Eversloh , 2003)

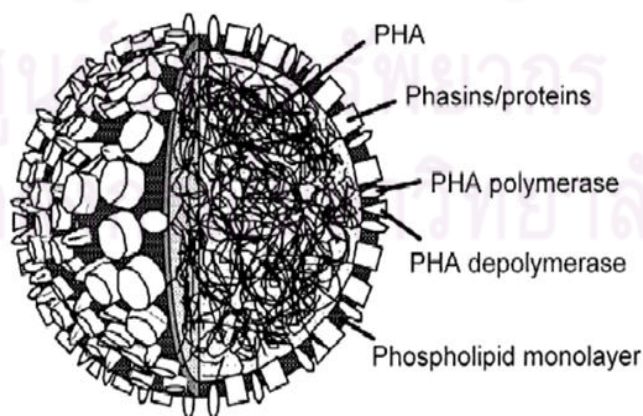


## 2.5 การสะสม PHAs ในจุลินทรีย์

Ballard และคณะ (1987) รายงานว่า เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ PHAs จำนวนแกรนูลต่อเซลล์จะอยู่ในช่วง 8-12 แกรนูลและทำให้เซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลางเพิ่มขึ้นจาก 0.24 เป็น 0.50 ไมครอน รูปร่างของเซลล์เมื่อสะสม PHAs จะเปลี่ยนเป็นค่อนข้างกลม และพบว่า การสะสม PHAs จะหยุดเมื่อมีปริมาณ PHAs ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ถึงแม้ว่าจะมีเอนไซม์และสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHAs ก็ตาม ทั้งนี้ เนื่องจากเซลล์ไม่สามารถเก็บ PHAs ได้มากกว่านี้ภายใต้ปริมาณผนังเซลล์ที่จำกัด (Gouda และคณะ, 2001) โดยภายในแกรนูลจะประกอบด้วย PHAs ประมาณ 98 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและโปรตีน 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่เหลือเป็นไขมัน จำพวกกรดฟอสฟาติก (phosphatidic) และสารประกอบที่ละลายในอะซิโตนได้อีกปริมาณเล็กน้อย

สำหรับ *Bacillus megaterium* พบว่า แกรนูลมีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 0.20-0.50 ไมครอน หนาประมาณ 2.0 นาโนเมตร มีปริมาณ PHAs เป็นองค์ประกอบประมาณ 97.7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โปรตีน 1.87 เปอร์เซ็นต์และไขมันอีก 0.46 เปอร์เซ็นต์ (Law และคณะ, 2003)

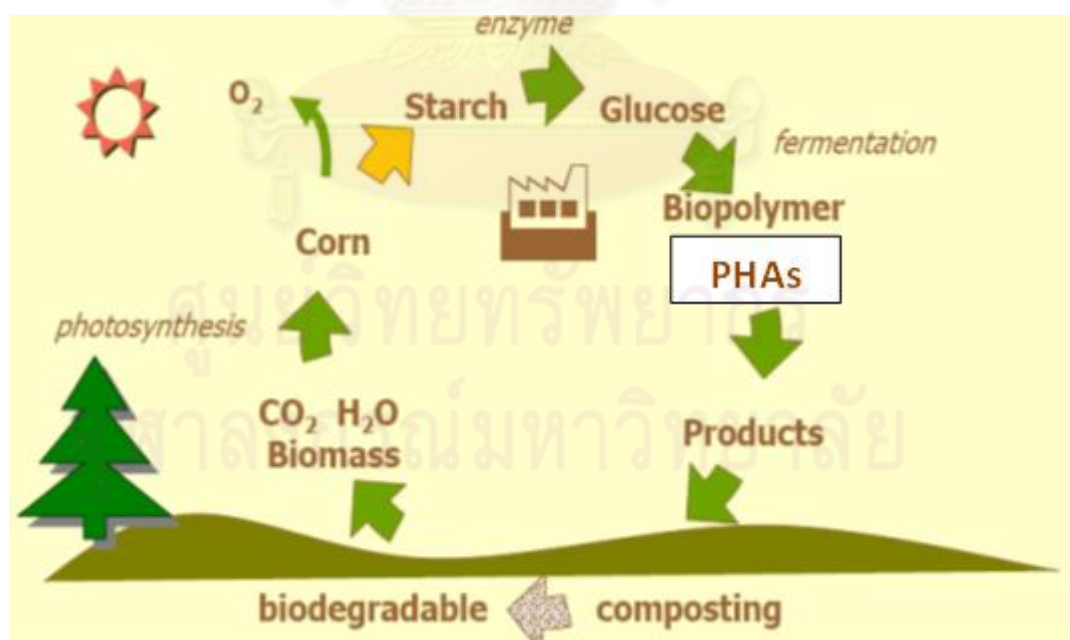
Zimm และคณะ (2001) พบว่า PHAs จะถูกสะสมไว้ภายในแกรนูลที่มีขนาดต่างๆ กัน โดยแกรนูลถูกล้อมรอบด้วย phospholipid monolayer และโปรตีน phasin รวมถึงเอนไซม์ polymerase และ depolymerase รวมทั้ง unknown protein ต่างๆ (ดังแสดงในรูปที่ 2.13)



รูปที่ 2.13 ส่วนประกอบภายในแกรนูลของ PHAs (Zimm และคณะ, 2001)

## 2.6 วัฏจักรการหมุนเวียนองค์ประกอบอินทรีย์ของ PHAs

วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนองค์ประกอบอินทรีย์ของ PHAs เริ่มจากการผลิต PHAs ด้วยกระบวนการหมัก โดยใช้แหล่งคาร์บอนซึ่งส่วนใหญ่ได้มาจากทรัพยากรที่ผลิตทดแทนใหม่ได้ (renewable resource) เช่น น้ำตาลซึ่งผลิตจากอ้อย ข้าวโพด แป้ง หรือวัตถุดิบจากการเกษตรบางชนิด (Lee และคณะ, 1999 ; Shahhosseini , 2004 ; Tian และคณะ, 2009) จุลินทรีย์จะสร้างและสะสมแกรนูลของ PHAs โดยอาศัยกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ จากนั้น จึงสกัดเอา PHAs ออกจากเซลล์เพื่อนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกต่างๆ ซึ่งหลังจากผ่านการใช้งานแล้ว PHAs อาจถูกกำจัดเช่นเดียวกับขยะพลาสติกทั่วไป เช่น นำไปฝังกลบในดิน เมื่อเกิดการย่อยสลายตามธรรมชาติจะได้เป็นปุ๋ยที่อุดมไปด้วยสารอินทรีย์ และช่วยเพิ่มปริมาณน้ำเพื่อรักษาสารอาหารในดิน (Lee, 1996) เนื่องจากเมื่อ PHAs ถูกย่อยสลายโดยสมบูรณ์จะให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อการเจริญเติบโตต่อไป จากนั้น จึงนำวัตถุดิบจากการเกษตรเหล่านี้มาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักเพื่อผลิต PHAs อย่างเป็นวัฏจักรต่อเนื่อง (Reddy และคณะ, 2003 ; Khanna และ Srivastava, 2005) ดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนองค์ประกอบอินทรีย์ของ PHAs

(ภาพจาก [www.tianan-enmet.com](http://www.tianan-enmet.com))

## 2.7 การย่อยสลายได้ทางชีวภาพของ PHAs

ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของ PHAs ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ชนิดของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของสารตั้งต้นหรือจุลินทรีย์ คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่าง พื้นที่ผิวสัมผัส น้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่าง เป็นต้น (Boopathy, 2000 ; Sang และคณะ, 2000)

PHAs สามารถถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์หลายกลุ่มทั้งแบคทีเรีย แอคติโนมัยซิส (actinomycetes) และราในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น ในดิน น้ำ (ทั้งในน้ำจืดและน้ำทะเล) สิ่งเน่าเปื่อย (compost) และในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Shah และคณะ, 2007 ; Khanna และ Srivastava, 2005) หรือมีน้อย เช่น โรงบำบัดน้ำเสีย Lee และ Yu (1997) พบว่า ในสภาวะไร้ออกซิเจนในระบบการบำบัดน้ำทิ้งชุมชน สามารถย่อยสลาย PHAs หนา 1.0 มิลลิเมตร ได้ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ ขณะที่ในสภาวะมีออกซิเจนจะใช้เวลาย่อยนานกว่าประมาณ 14 เท่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Akmal และคณะ (2003) ที่ได้ศึกษาอัตราการย่อยสลายโพลิเมอร์ P(3HB) และโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มี 40 โมลเปอร์เซ็นต์ของ 3HV เป็นองค์ประกอบในแหล่งธรรมชาติจำนวน 4 แหล่ง ได้แก่ แหล่งดิน น้ำที่จากการบำบัดด้วยระบบตะกอนเร่ง (activated sludge) ทะเลสาบน้ำจืด และมหาสมุทรอินเดีย พบว่า การย่อยสลายโพลิเมอร์ทั้ง P(3HB) และ PHBV ใน activated sludge เกิดได้เร็วที่สุด คิดเป็น 3.6 เปอร์เซ็นต์ต่อสัปดาห์ โดย P(3HB) ใช้เวลาในการย่อยสลายจนสมบูรณ์นาน 28 สัปดาห์ ขณะที่โคพอลิเมอร์ PHBV ใช้เวลายาวนานกว่าเพียงแค่ 6 สัปดาห์ โดยทั่วไป โคพอลิเมอร์ PHBV ใช้เวลาในการย่อยสลายได้เร็วกว่าโพลิเมอร์ P(3HB) เนื่องจากมีระดับความเป็นผลึกต่ำกว่า (Williamson และ Wikinson, 1958 ; Reddy และคณะ, 2003)

Manna และ Pual (2000) รายงานว่า อุณหภูมิที่ดีที่สุดในการย่อยสลาย PHAs โดยทั่วไปอยู่ที่ประมาณ 30 องศาเซลเซียส และพบว่า การมีอุณหภูมิสูง จะช่วยกระตุ้นการย่อยสลาย PHAs ให้เกิดได้ดีขึ้น เนื่องจากมีผลไปเพิ่มอัตราเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ และจากงานวิจัยของ Shah และคณะ (2007) ที่ได้สกัดแยกเอนไซม์ PHBV depolymerase จาก *Bacillus* sp. AF3 เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลายโคพอลิเมอร์ PHBV พบว่า เอนไซม์ PHBV depolymerase ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

## 2.8 แนวทางการนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์

PHAs มีสมบัติทางกายภาพและเชิงกลที่หลากหลาย จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในวงกว้าง เริ่มแรก PHAs ถูกนำมาใช้งานทางด้านทางการแพทย์เป็นหลักเนื่องจากความสามารถในการเข้ากันได้กับระบบชีวภาพ (biocompatible) ความสามารถถูกดูดซึม (bioresorbable) และยังสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) (Pouton และ Akhtar, 1996)

### 2.8.1. การประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์และเภสัชกรรม (Chen และ Wu, 2005)

-วัสดุเส้นเปลือยในงานด้านศัลยกรรม เช่น ไหมเย็บแผล ตัวเย็บแผล วัสดุปิดแผล ผ้าก๊อช เป็นต้น

-วัสดุเพื่อการบำบัดและรักษาโรค ได้แก่ แคปซูลบรรจุยาหรือวัคซีนที่ต้องการให้ตัวยาค่อยๆ ถูกปล่อยออกมาในปริมาณน้อยๆ เป็นเวลานาน หรือใช้ทำเป็นกระดูกเทียม หรืออุปกรณ์ฝังในร่างกาย โดยอาศัยสมบัติการเป็น piezoelectric ของ PHAs ซึ่งคล้ายกับสมบัติที่มีในกระดูกธรรมชาติ (Shahhosseini, 2004)

-ด้านทันตกรรม จะนำ PHAs มาใช้เป็นวัสดุตัวนำที่ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นใหม่ในโรคด้านปริทันต์ (periodontitis)

-ใช้ PHAs เป็นสารตั้งต้นในการผลิต R-(-)-3-hydroxybutyric acids ซึ่งสารนี้เป็นส่วนประกอบสำคัญที่พบในเลือดโดยปกติ (Zinn และคณะ, 2001) และสามารถใช้เป็น chiral building blocks สำหรับสังเคราะห์สารเคมีบริสุทธิ์ เช่น ยาปฏิชีวนะ วิตามิน และฟีโรโมน (pheromone) (Mandison และ Huisman, 1999; Luengo และคณะ, 2003)

### 2.8.2. การประยุกต์ใช้ในทางด้านเกษตรกรรมและปศุสัตว์

-ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุยาโรค และวัคซีนต่างๆ ในสัตว์เลี้ยง เช่น วัคซีนป้องกันโรคระบาด ยาถ่ายพยาธิ และบรรจุยาประเภทที่มีกลไกการออกฤทธิ์นาน (Reddy และคณะ, 2003)

-ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุฮอร์โมน growth factors ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช แคปซูลจะค่อยๆ สลายทีละน้อย โดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินพร้อมกับสารที่บรรจุข้างในถูกปล่อยออกมาให้สารดังกล่าวคงอยู่ในดินหรือตำแหน่งที่ต้องการใช้งานได้เป็นเวลานาน นอกจากนี้ ยังใช้เป็นพลาสติกคลุมดินรักษาความชื้น และใช้ทำถุงใส่ต้นกล้าพืชสำหรับนำไปปลูก ซึ่งเมื่อหมดเวลาการใช้งานจะค่อยๆ ถูกสลายไปโดยธรรมชาติ (Lee, 1996)

**2.8.3. การประยุกต์ใช้เป็นวัสดุประเภทบรรจุภัณฑ์** เช่น ใช้ผลิตขวดแชมพูที่ประกอบด้วย ส่วนฝาที่ต้องการความแข็งแรงและปิดได้ดี ใช้ทำบรรจุภัณฑ์บรรจุอาหารประเภทถุง ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป ขวดน้ำ ถาด ซ้อน แผ่นฟิล์มสำหรับหีบห่อ เป็นต้น (Hocking และ Marchessault, 1994)

**2.8.4. การประยุกต์ใช้เป็นวัสดุเส้นใยและแผ่นผ้าแบบ non-woven** เช่น ผลิตก้นช้อนอนามัย ผ้าอ้อมสำเร็จรูป เสื้อผ้าและเครื่องนุ่งห่ม เส้นใยสำหรับบรรจุในเครื่องนอน โดยถ้าผสม P(3HB) ลงในเส้นใยฝ้าย จะช่วยให้สมบัติในการรับความร้อนและคายความร้อนของเส้นใยช้าลงและเพิ่มความแข็งแรงให้กับเส้นใย เป็นต้น (Lee, 1996 ; Madison และ Huisman, 1999 ; Luengo และคณะ, 2003)

**2.8.5. การประยุกต์ใช้เป็นวัสดุด้านอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และการสื่อสาร** เช่น ชิ้นส่วนประกอบในโทรศัพท์เคลื่อนที่ ชิ้นส่วนประกอบในคอมพิวเตอร์ แผ่นซีดี เป็นต้น (Khanna และ Srivastava, 2005)

## 2.9 บริษัทผู้ผลิต PHAs

มีบริษัทผู้ผลิตโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) และโคพอลิเมอร์ PHBV อยู่หลายบริษัทกระจายอยู่ทั่วโลก โดยผลิตพอลิเมอร์ภายใต้ชื่อทางการค้าและกำลังการผลิตแตกต่างกัน (ดังตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.5 บริษัทผู้ผลิต PHAs (Kosior และคณะ, 2006)

Polymer	Trade names	Manufacturers	Capacity (Tons)
P(3HB)	Biogreen®	Mitsubishi Gas Chemical Company Inc. (Japan)	10,000
P(3HB)	Mirel®	Telles (US)	50,000
P(3HB)	Biocycle®	PHB Industrial Company (Brazil)	50
PHBV and P(3HB)	Biomer ®	Biomer Inc. (Germany)	50
PHBV, PHBV + Ecoflex blend	Enmat®	Tianan Biologic, Ningbo (China)	10,000



ในปี ค.ศ.1981 บริษัท Imperial Chemical Industries Ltd. (ICI) ประเทศอังกฤษ ได้พัฒนากระบวนการผลิตเพื่อการค้าของโคพอลิเมอร์ PHBV เป็นครั้งแรก ภายใต้ชื่อทางการค้าว่า Biopol® โดยผลิตโคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV อยู่ในช่วงระหว่าง 3-20 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยใช้กลูโคสและกรดโพธิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้เทคนิคการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบดจ์ (Choi และ Lee, 1999)

สำหรับบริษัทผู้ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV เพื่อการค้าในปัจจุบัน ได้แก่ บริษัท Metabolix, Massachusetts ประเทศสหรัฐอเมริกา ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยใช้ *Cupriavidus necator* (Sankhla และคณะ, 2010) บริษัท Biomer ประเทศเยอรมนี และบริษัท Tianan Biologic, Ningbo ประเทศจีน (Kosior และคณะ, 2006)

## 2.10 ข้อจำกัดในการนำ PHAs ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์และแนวทางในการแก้ปัญหา

ปัญหาที่สำคัญของการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพชนิด PHAs เพื่อใช้ทดแทนพอลิเมอร์สังเคราะห์จากปิโตรเคมี คือ ค่าใช้จ่ายในการผลิต PHAs ยังสูงกว่าการผลิตพอลิเมอร์สังเคราะห์อยู่มาก เนื่องจากการผลิต PHAs จะต้องใช้กระบวนการหมัก ทำให้ PHAs ที่ผลิตทางการค้ามีราคาสูงกว่าประมาณ 5-10 เท่าเมื่อเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์ที่ผลิตจากปิโตรเลียม เช่น พอลิโพรพิลีนและพอลิเอทิลีน ซึ่งมีราคาเพียงประมาณ 0.25 ถึง 0.5 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม (Poirier และคณะ, 1995 ; Grothe และคณะ, 1999) ปัจจัยสำคัญที่ทำให้การผลิต PHAs มีราคาสูงกว่า คือ แหล่งอาหารสำหรับการหมักและการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ซึ่งเสียค่าใช้จ่ายประมาณร้อยละ 40 และ 26 ของค่าใช้จ่ายในการผลิตทั้งหมด ตามลำดับ ( Lee, 1996 ; Choi และ Lee, 1997 ; Hori และคณะ, 2009)

ดังนั้น แนวทางในการแก้ปัญหา คือ การวิจัยและพัฒนาเพื่อหาจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHAs ได้ โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ต้องการควรมีคุณสมบัติเด่น ได้แก่ มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว มีสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกได้และควรมีอัตราในการผลิต PHAs ได้ปริมาณสูง สำหรับวิธีการในการเลือกหาแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติดังกล่าว สามารถทำได้โดยการคัดแยกจากแหล่งธรรมชาติ หรือใช้วิธีการ genetics เพื่อสร้างเป็นสายพันธุ์ผสม (recombinant strain) (Lee และคณะ, 1999 ; Lopez-Cortes และคณะ, 2008) นอกจากนี้ การปรับปรุงกระบวนการหมักและการเก็บเกี่ยวผลผลิตให้มีประสิทธิภาพ ก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มปริมาณ PHAs ได้ (Lee, 1996 ; Choi และคณะ, 1998)

## 2.11 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHAs

การผลิตพอลิเมอร์โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพนั้น จะต้องคำนึงถึงหลาย ๆ ปัจจัยที่จะมีผลต่อชนิด คุณสมบัติและปริมาณของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ ปัจจัยสำคัญต่อการสังเคราะห์ PHAs มีดังนี้

### 2.11.1 ชนิดของจุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์มีต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ต้องการผลิต พบว่า เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกัน แต่ใช้จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์ในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ส่งผลทำให้พอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกันออกไปด้วย กล่าวคือ จุลินทรีย์บางสายพันธุ์อาจผลิตพอลิเมอร์ในรูปโฮโมพอลิเมอร์ ในขณะที่อีกชนิดอาจผลิตพอลิเมอร์ที่เป็นโคพอลิเมอร์ เช่น เมื่อใช้ฟรักโตสเป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่ *Alcaligenes eutrophus* R3 พบว่า มีการผลิตพอลิเมอร์ในรูปโคพอลิเมอร์ของ PHBV แต่เมื่อมีการใช้แหล่งคาร์บอนเดิมให้แก่ *A. eutrophus* ATCC17697 พบว่า มีการผลิต P(3HB) ซึ่งเป็นโฮโมพอลิเมอร์ (Anderson and Wynn, 1995)

PHAs สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด พบว่า จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ในปริมาณและองค์ประกอบที่แตกต่างกัน (Lee, 1996 ; Lee และคณะ, 1999 ; Reddy และคณะ, 2003 ; Khanna และ Srivastava, 2005 ; Tian และคณะ, 2009)

นอกจากนี้ ในปัจจุบันยังได้มีการนำเอาเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาใช้เพื่อพัฒนาศักยภาพในการผลิตพอลิเมอร์ โดยการ over expression ของยีน *Pha* ชนิดต่างๆ เช่น recombinant *E.coli* จากการตัดต่อยีน *PhaC* ของ *Pseudomonas* sp. ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต mcl-PHA synthase เพื่อเกิดการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลาง เป็นต้น (Suriyamongkol และคณะ, 2007)

### 2.11.2 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ โดยทั่วไป จุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสร้างเซลล์ (Nelson และ Cox, 2005)

สำหรับสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งสามารถใช้ในการผลิต PHAs มีหลายประเภท ขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ โดยสามารถจำแนกออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ (Lee, 1996 ; Lee และคณะ, 1999 ; Fernández และคณะ, 2005)

- (1) คาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส ฟรักโตส ซูโครส
- (2) แอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล กลีเซอรอล

(3) อัลเคน (alkane) ได้แก่ สารประกอบอัลเคนที่มีคาร์บอนจำนวนตั้งแต่ 6 อะตอม (hexane) ไปจนถึงสารประกอบอัลเคนที่มีคาร์บอนจำนวน 10 อะตอม (decocane) ซึ่งส่วนใหญ่สารที่ใช้ในการผลิต PHAs ในกลุ่มนี้ ได้แก่ สารจำพวกน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

(4) กรดอินทรีย์และเกลือของกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดอินทรีย์หรือเกลือของกรดอินทรีย์ที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 4 อะตอมขึ้นไป

จากที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ราคาของผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจาก PHAs มีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี คือ ค่าใช้จ่ายสำหรับแหล่งอาหารที่ใช้ในการผลิต ซึ่งได้แก่ แหล่งคาร์บอนเป็นหลัก Choi และ Lee (1997) รายงานว่า ค่าใช้จ่ายสำหรับแหล่งคาร์บอน คิดเป็นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของค่าใช้จ่ายในการผลิต PHAs ทั้งหมด

ดังนั้น เพื่อลดต้นทุนของการผลิต จึงมีความพยายามในการสังเคราะห์ PHAs จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาไม่แพง เช่น กากน้ำตาล (Albuquerque และคณะ, 2007) กากถั่วเหลือง (Solaiman และคณะ, 2006) หางนม (Koller และคณะ, 2008) น้ำมัน (Shang และคณะ, 2008 ; Bhubalan และคณะ, 2008 ; Lee และคณะ, 2008) กลิเซอรอลดิบ (Mothes และคณะ, 2007) แป้ง (Chen และคณะ, 2006 ; Hass และคณะ, 2008) ชานอ้อย (Yu และคณะ, 2008) ของเสียจากการสังเคราะห์พลาสติก (Goff และคณะ, 2007) และน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ (Bengtsson และคณะ, 2008) เป็นต้น มาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อลดต้นทุนในการผลิต PHAs ดังแสดงในตารางที่ 2.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.6 เปรียบเทียบการสังเคราะห์ PHAs จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาไม่แพง

Inexpensive carbon sources	Strains	PHAs monomer	DCW (gL <sup>-1</sup> )	PHAs conc. (gL <sup>-1</sup> )	PHAs content (%DCW)	References
Hydrolyzed corn oil	<i>Pseudomonas putida</i>	mcl-PHAs	103	28	27.2	Shang <i>et.al.</i> , 2008
Whey	<i>Pseudomonas hydrogenovora</i>	P(3HB)	5	1.27	NR	Koller <i>et.al.</i> , 2008
Sugar cane molasses	Mixed bacteria	PHBV	NR	NR	30	Albuquerque <i>et.al.</i> , 2007
Soy molasses	<i>Pseudomonas corrugata</i>	P(HDD-HO-HTDE)	3.6	NR	5-17	Solaiman <i>et.al.</i> , 2006
Enzymatic extruded starch	<i>Haloferax mediterranei</i>	PHBV	39.4	20	50.8	Chen <i>et.al.</i> , 2006
Petrochemical plastic waste	<i>Pseudomonas putida</i> CA3	P(3HB)	1.14	0.84	43	Goff <i>et.al.</i> , 2007
Paper mill wastewater	Activated sludge	PHBV	NR	NR	48.2	Bengtsson <i>et.al.</i> , 2008
Bagasse hydrolysates	<i>Ralstonia eutropha</i>	P(3HB)	11.5	NR	56.5	Yu <i>et.al.</i> , 2008
Waste potato starch	<i>Ralstonia eutropha</i> NCIMB 11599	P(3HB)	179	94	55	Haas <i>et.al.</i> , 2008
Crude glycerol	<i>Cupriavidus necator</i> JMP 134	P(3HB)	50	NR	48	Mothes <i>et.al.</i> , 2007
Palm kernel oil	<i>Cupriavidus necator</i> PHB 4	P(HB-HV-HHx)	7.9	NR	79	Bhubalan <i>et.al.</i> , 2008
Plant oils	<i>Cupriavidus necator</i> H16	PHBV	4.4-5.6	6.8	80	Lee <i>et.al.</i> , 2008

ที่มา : Tian และคณะ (2009) / หมายเลข NR: Not Reported

สำหรับงานวิจัยนี้ มีความสนใจที่จะใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเป็นไฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) และโคพอลิเมอร์ PHBV เพื่อทำให้ต้นทุนในการผลิตต่ำลง เนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกมากในประเทศไทย และเป็นพืชที่สามารถตัดและเก็บเกี่ยวได้หลายครั้ง โดยในกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจะใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบหลักและมีน้ำอ้อยเกิดขึ้นหลายขั้นตอน ซึ่งในน้ำอ้อยจะประกอบไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์อยู่หลายชนิด เช่น ซูโครส กลูโคส ฟรักโทส รวมทั้งวิตามินและธาตุอาหารเป็นจำนวนมาก (แสดงในตารางที่ 2.7) จึงสามารถนำมาใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้

การใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตสารผลิตภัณฑ์ มีข้อดีคือ น้ำอ้อยมีความบริสุทธิ์สูง การเตรียมก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก (pretreatment) มีเพียงเล็กน้อย ที่สำคัญคือเป็นส่วนที่ได้จากต้นกระบวนการของการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งจัดว่าเป็นการประหยัดพลังงาน (energy saving) ถ้าเปรียบเทียบกับน้ำตาลทราย และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ การแยกและทำบริสุทธิ์ของสารผลิตภัณฑ์ทำได้ง่าย ใช้ขั้นตอนน้อย เนื่องจากไม่มีสี รวมทั้งการบำบัดของเหลือทิ้งจากน้ำหมัก (effluent treatment) ก็ทำได้ง่ายและสะดวก

ตารางที่ 2.7 องค์ประกอบของน้ำอ้อย (มิตรผลวิจัย, 2551)

องค์ประกอบของน้ำอ้อย	ของแข็งที่ละลายได้ (เปอร์เซ็นต์)
น้ำตาล	75.0 – 94.0
ซูโครส	70.0 – 90.0
กลูโคส	2.0 – 4.0
ฟรักโทส	2.0 – 4.0
โอลิโกแซคคาไรด์	0.001 – 0.05
เกลือในรูปของ	3.0 – 4.5
กรดอินทรีย์	1.5-4.5
กรดอินทรีย์	1.0-3.0
กรดอินทรีย์	1.5 – 5.5
กรดคาร์บอกซิลิก	1.1 – 3.0
กรดอะมิโน	0.5 – 2.5
อินทรีย์สารอื่นๆ ที่ไม่ใช่ น้ำตาล	
โปรตีน	0.5 – 0.6
แป้ง	0.001 – 0.18
พอลิแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำ	0.03 – 0.50
แวกซ์ ไขมัน ฟอสฟาไทด์	0.04 – 0.15



### 2.11.2.1 กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย

น้ำตาลทรายดิบเป็นน้ำตาลที่มีผลึกเป็นสีน้ำตาลเข้ม มีความชื้นสูงเนื่องจากผลึกถูกห่อหุ้มไปด้วยกากน้ำตาลที่มีความบริสุทธิ์ต่ำเป็นจำนวนมาก ไม่ผ่านกรรมวิธีการฟอกสี

น้ำตาลทรายขาวมีลักษณะเป็นผลึกขาว มีโพลาไรเซชัน ประมาณ 99 องศาเซลเซียส ปกติผลิตจากอ้อยโดยตรงสำหรับโรงงานที่มีลูกหีบ กระบวนการผลิตในระยะเริ่มต้นจะเหมือนน้ำตาลทรายดิบ จะเริ่มแตกต่างกันตั้งแต่กระบวนการทำน้ำอ้อยให้ใส

(1) การขนถ่าย (cane transportation and unloading) หลังจากผ่านกระบวนการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยแล้ว อ้อยจะถูกลำเลียงมายังลานพักอ้อย (cane yard) เพื่อทำการชั่งบันทึกน้ำหนักอ้อย ในการปล่อยให้อ้อยหล่นลงบนสะพานอ้อย (cane carrier) โดยอาศัยเครื่องมือช่วยลากเพื่อเตรียมพร้อมเข้าสู่เครื่องมือชนิดต่างๆ

(2) การเตรียมอ้อยก่อนเข้าลูกหีบ (cane preparation) คือ การทำให้ลำอ้อยกลายเป็นชิ้นละเอียดก่อนป้อนเข้าลูกหีบ โดยอาศัยเครื่องนิก (shredder) นิกย่อยอ้อยให้เป็นฝอยละเอียด โดยอาศัยการตีของแท่งค้อนที่เหวี่ยงตัวหมุนลงมา

(3) การบดอ้อย (cane milling) อ้อยจะถูกลำเลียงไปโดยสะพานป้อนอ้อย เข้าสู่ลูกหีบชุดที่ 1 น้ำอ้อยที่สกัดได้ เรียกว่า น้ำอ้อยที่สกัดได้ขั้นแรกซึ่งเป็นน้ำอ้อยแท้ จากนั้นอ้อยจะถูกพ่นด้วยน้ำ แล้วนำเข้าสู่ลูกหีบชุดต่อไป ทำให้ได้น้ำอ้อยสกัดขั้นที่ 2 ส่วนผสมของน้ำอ้อยทั้งสองส่วนนี้เรียกว่า น้ำอ้อยรวม (mixed juice) ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้น้ำอ้อยรวมในการผลิต P(3HB) และ PHBV

(4) ขั้นตอนการทำน้ำอ้อยใส (clarification) ขั้นตอนนี้จะแยกสิ่งสกปรกออกจากน้ำอ้อย โดยการตกตะกอน เช่น

กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ จะใช้วิธีที่เรียกว่า defecation method โดยนำน้ำอ้อยรวมเข้าหม้ออุ่นน้ำอ้อยเมื่ออุณหภูมิถึง 55 องศาเซลเซียส จึงเติมปูนขาวลงไปจนกระทั่งมีค่าความเป็นกรด่าง ประมาณ 7.0-7.2 ระยะเวลาผสมไม่ควรเกิน 3 นาที จากนั้นนำเข้าหม้ออุ่นให้น้ำอ้อยมีอุณหภูมิ 102-105 องศาเซลเซียส และผสมกับสารรวมตะกอน (flocculant) สิ่งสกปรกที่ตกตะกอนลงมาเรียกว่า ตะกอนตม (mud) ซึ่งมีประมาณร้อยละ 25 ของน้ำอ้อยใส

กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายขาว จะทำน้ำอ้อยบริสุทธิ์โดยเพิ่มกรรมวิธีฟอกสีน้ำอ้อย เช่น การใช้ระบบซัลไฟเทชัน (sulphitation) ฟอกสีน้ำอ้อยด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์และระบบคาร์บอนเนชัน (carbonation) ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งทั้งสองระบบนี้ยังคงต้องใช้น้ำปูนขาวและความร้อนในการทำน้ำอ้อยบริสุทธิ์ ส่วนการแยกตะกอนออกทำให้น้ำอ้อยใสนั้น ระบบซัลไฟเทชันยังคงต้องใช้ถึงพักใส เช่นเดียวกับการผลิตน้ำตาลทรายดิบ แต่ระบบคาร์บอนเนชันจะใช้เครื่องกรองแบบมีผ้ากรอง

(5) ขั้นตอนการทำน้ำอ้อยให้เป็นน้ำเชื่อม (evaporation) น้ำอ้อยที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามระบบดังกล่าวข้างต้น จะถูกส่งเข้าสู่ชุดหม้อต้ม หม้อต้มที่ใช้อาจเป็นระบบ 4-6 ชุด หม้อต้มระเหยเหล่านี้ตั้งเรียงเป็นแถวติดต่อกันโดยใช้ความร้อนจากไอน้ำ สำหรับใบแรกใช้ความร้อนถึง 128 องศาเซลเซียส ไอน้ำที่เกิดขึ้นในหม้อต้มใบแรกจะถูกนำไปใช้ต้มระเหยน้ำอ้อยในหม้อต้มใบที่สองและไอน้ำจากหม้อต้มใบที่สองจะถูกนำไปใช้ในหม้อต้มใบที่สามเช่นกัน การทำงานของหม้อต้มระเหยจะต่อเนื่องกันจนน้ำเชื่อมมีความเข้มข้น 65 บริกซ์ ภายใต้ภาวะสุญญากาศ

(6) ขั้นตอนการต้มเคี้ยวน้ำเชื่อม (boiling) น้ำเชื่อมจากถังพักน้ำเชื่อมจะถูกนำไปต้มเคี้ยวซึ่งใช้ความร้อนต่ำภายใต้สุญญากาศ (vacuum pan) ความร้อนที่ใช้ประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส สุญญากาศประมาณ 26-28 นิ้วของปรอท น้ำเชื่อมจะถูกเคี้ยวจนมีความเข้มข้นมากขึ้น จนกระทั่งเกิดผลึก (crystalline mass) เมื่อน้ำเชื่อมอยู่ในลักษณะที่เต็มไปด้วยผลึกน้ำตาล เรียกว่า แมสซิควิท

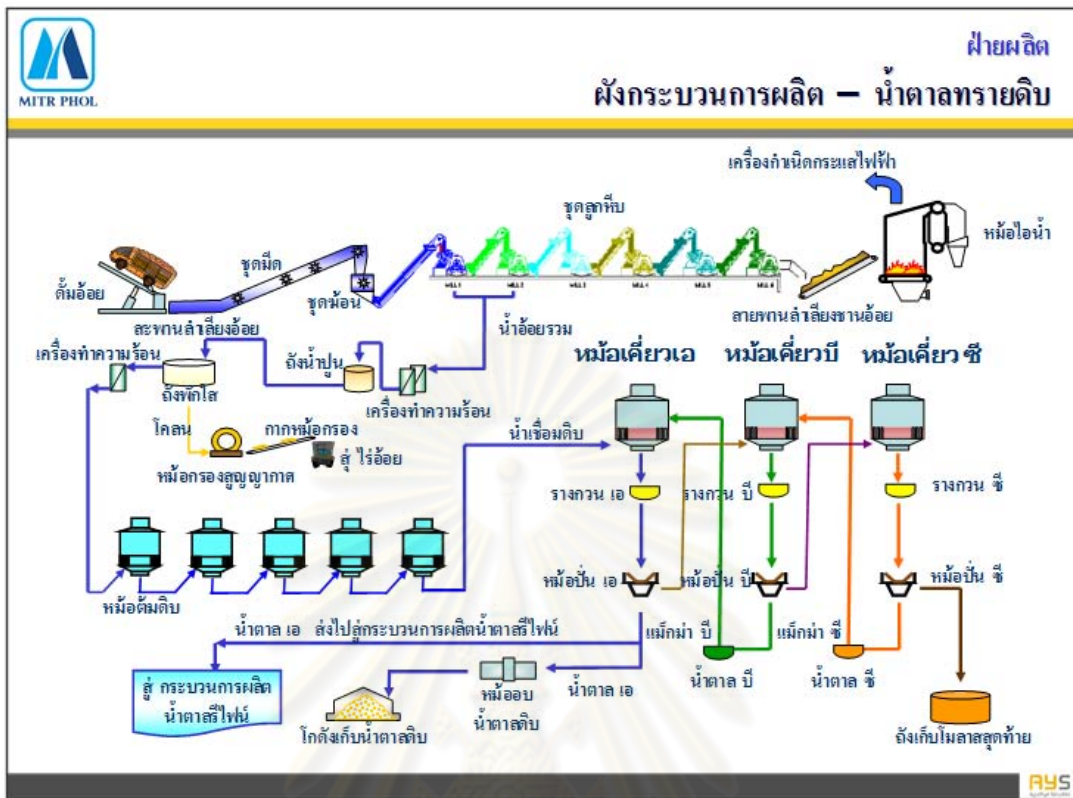
(7) ขั้นตอนการเลี้ยงผลึกน้ำตาลทรายในถังพักผลึก (crystallization in crystallizer) เนื่องจากแมสซิควิทที่ปล่อยออกมาจากหม้อเคี้ยว ประกอบด้วยผลึกน้ำตาลทรายและน้ำเลี้ยงผลึก (mother liquor) การเลี้ยงผลึกน้ำตาลทำได้ 2 วิธีคือ

การเคี้ยวให้เกิดผลึกน้ำตาลขึ้นเองจะต้องเคี้ยวจนกระทั่งความเข้มข้นของน้ำเชื่อมเพิ่มถึงภาวะเหนือจุดอิ่มตัวและลดความเข้มข้นลงโดยเติมน้ำหรือน้ำเชื่อม เลี้ยงผลึกน้ำตาลที่เกิดขึ้นให้โตถึงขนาดที่ต้องการ อย่างไรก็ตามการเลี้ยงผลึกโดยวิธีนี้ ในปัจจุบันไม่นิยมเนื่องจากการควบคุมปริมาณขนาดและความสม่ำเสมอของผลึกน้ำตาลทำได้ยาก

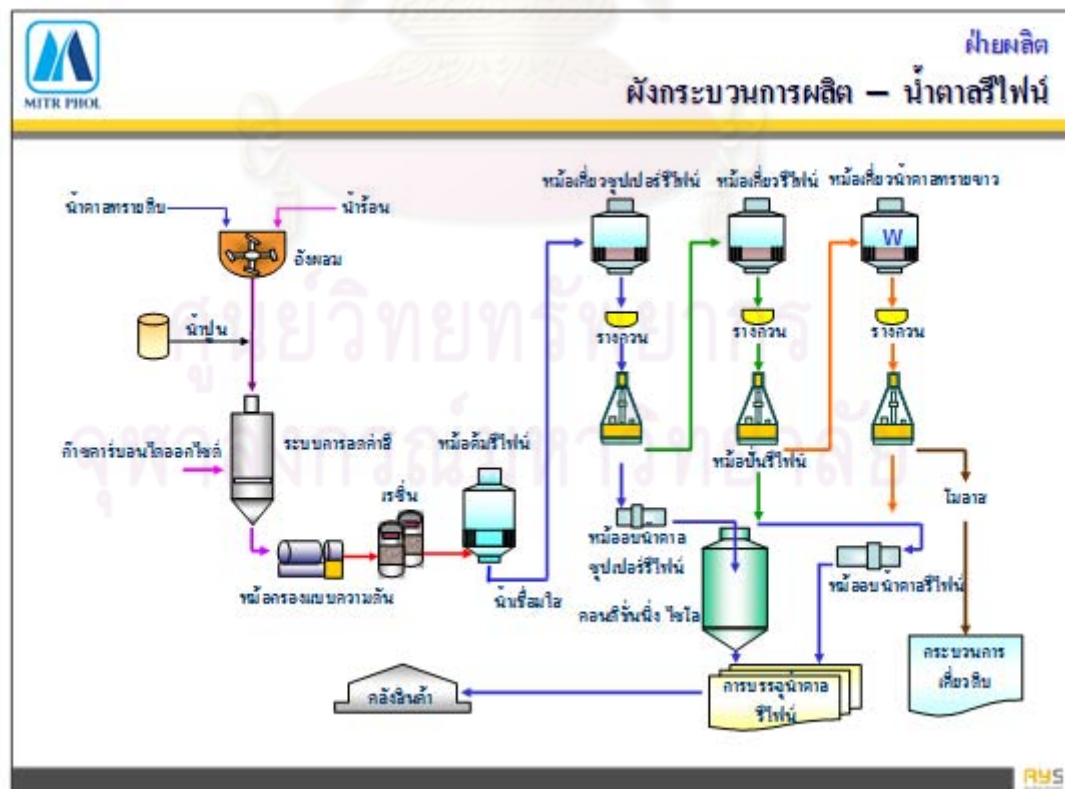
วิธีกระตุ้นให้เกิดแกนผลึกเฉียบพลัน (shock seeding) โดยเคี้ยวน้ำเชื่อมให้มีความเข้มข้นระดับหนึ่งตามกำหนด แล้วเติมผงเชื่อน้ำตาลซึ่งได้จากการบดน้ำตาลทรายขาวที่อบแห้งละเอียดขนาด 0.03 มิลลิเมตร ลงไปในหม้อเคี้ยว หลังจากนั้น 2-3 นาที ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงถึงระดับหนึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาการกระตุ้นอย่างเฉียบพลัน (shock) น้ำตาลที่ละลายในน้ำเชื่อมจะแยกตัวออกมาเป็นแกนผลึกอย่างต่อเนื่องมากมาย เมื่อแกนผลึกมีมากพอแล้ว หยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำเชื่อมเข้าหม้อเคี้ยวระดับหนึ่งจนความเข้มข้นลดลงถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเลี้ยงแกนผลึกเพื่อให้มีขนาดโตตามต้องการ

วิธีเติมผงเชื่อน้ำตาลตามจำนวนจริง (true seeding) โดยบดน้ำตาลทรายขาวที่อบแห้งแล้วผสมกับแอลกอฮอล์แล้วเติมลงในน้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นถึงระดับที่กำหนด ปิดไอน้ำที่เข้าหม้อเคี้ยวจนกระทั่งผงเชื่อน้ำตาลกระจายตัวทั่วน้ำเชื่อม แล้วจึงเปิดไอน้ำเคี้ยวต่อประมาณ 15-30 นาที เติมน้ำเชื่อมเข้าไปอย่างต่อเนื่อง เลี้ยงผลึกที่เกิดขึ้นให้มีขนาดตามต้องการ

กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบและน้ำตาลรีไฟน์ แสดงผังรูปที่ 2.15 และ 2.16 ตามลำดับ (มิตรผลวิจัย, 2551)



รูปที่ 2.15 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ (มิตรผลวิชัย, 2551)



รูปที่ 2.16 กระบวนการผลิตน้ำตาสีโพน (มิตรผลวิชัย, 2551)

### 2.11.2.2 การใช้ประโยชน์จากอ้อยในอุตสาหกรรม

ประโยชน์ที่สำคัญของอ้อยในอุตสาหกรรม คือ ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมน้ำตาล ในทางเคมี น้ำตาลส่วนใหญ่ที่ได้จากอ้อยเป็นน้ำตาลซูโครส นอกจากนั้น จะเป็นน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรักโทสซึ่งทั้งสองชนิดนี้รวมเรียกว่าน้ำตาลอินเวิร์ต (invert sugar) โดยในทางการค้า น้ำตาลจากอ้อยมีชื่อเรียกต่างๆ กันตามความบริสุทธิ์และกรรมวิธีในการผลิต เช่น น้ำตาลแดงหรือน้ำตาลทรายแดง (brown sugar, gur, jaggery, muscovado) น้ำตาลดิบหรือน้ำตาลทรายดิบ (raw sugar) น้ำตาลทรายขาว (white sugar หรือ plantation white sugar) น้ำตาลทรายบริสุทธิ์หรือน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (refined sugar)

ในการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยโดยตรงนั้นมีผลพลอยได้ (by-products) เกิดขึ้นหลายชนิดที่สำคัญได้แก่ ชานอ้อย กากตะกอน (filter mud, filter cake) และกากน้ำตาล (molasses) ซึ่งทั้งน้ำตาลและผลพลอยได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง

### 2.11.3 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Nelson และ Cox, 2005) ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่ใช้สำหรับการผลิต PHAs สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท (Annur และคณะ, 2008) ดังนี้

#### (1) แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้ในรูปของกรดอะมิโน เคซีน เปปโตน ยีสต์ สกัด สารสกัดจากเนื้อ หรือยูเรีย เป็นต้น

#### (2) แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน

แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่

- แอมโมเนีย อาจใช้ในรูปแก๊สหรือสารละลายแอมโมเนีย
- ไนเตรตและเกลือแอมโมเนียม เช่น เกลือแอมโมเนียมคลอไรด์  $[\text{NH}_4\text{Cl}]$  เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  เกลือแอมโมเนียมไนเตรต  $[\text{NH}_4\text{NO}_3]$  เกลือแอมโมเนียมฟอสเฟต  $[(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4]$  เป็นต้น โดยเกลือแอมโมเนียมที่มีราคาถูกที่สุด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต

นอกจากแหล่งคาร์บอนแล้วแหล่งไนโตรเจนก็มีผลต่อราคาการผลิต PHAs เช่นกัน โดยแหล่งไนโตรเจนที่นิยมนำมาใช้ในการผลิต PHAs ได้แก่  $\text{NH}_4\text{Cl}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$   $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$



โมโนโซเดียมกลูตาเมต และยูเรีย (Groom และคณะ, 1998; Quillaguamán และคณะ, 2008) โดยแหล่งไนโตรเจนที่กล่าวมาพบว่ายูเรียมีราคาถูกที่สุด (Lee และคณะ, 2008)

Grothe และคณะ (1999) เปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญ ผลิตและสะสม PHAs ของเชื้อ *Alcaligenes latus* จำนวน 4 แหล่ง ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรตและยูเรีย พบว่า เชื้อสามารถเจริญและสะสมในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแอมโมเนียมซัลเฟตได้ดีที่สุด เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของ PHAs สูงสุดเท่ากับ 8.0 กรัมต่อลิตร และ 4.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่เมื่อเลี้ยงในแอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมไนเตรตกลับให้ผลต่ำกว่า ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เป็นยูเรีย พบว่า เชื้อ *A. latus* ไม่สามารถเมตาบอลิซึมเพื่อนำไปใช้ในการเจริญและสะสม PHAs ได้

Gouda และคณะ (2001) ศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจน โดยเลี้ยง *Bacillus megaterium* ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตที่มีความเข้มข้นของน้ำแข็งข้าวโพด 0.5-7 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า *B. megaterium* สามารถผลิต PHAs ได้มากที่สุดเท่ากับ 49.12 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในน้ำแข็งข้าวโพดที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำแข็งข้าวโพด กลับพบว่ามิผลทำให้ความสามารถในการผลิต PHAs ลดลง

Khanna และ Srivastava (2005) ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญและสะสม P(3HB) ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* ระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์และยูเรีย พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในยูเรีย ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 7.92 กรัมต่อลิตร 3.84 กรัมต่อลิตรและ 48.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่ชั่วโมง 60 ของการเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ ขณะที่เมื่อเลี้ยงในแอมโมเนียมไนเตรต พบว่า เชื้อสะสม P(3HB) ได้น้อยมากคือมีปริมาณ PHAs เท่ากับ 0.66 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 26 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง

Lee และคณะ (2008) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ระหว่างแอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต โซเดียมไนเตรต ยูเรียและแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตของเชื้อ *Cupriavidus necator* H16 พบว่า เชื้อสามารถเจริญและสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ได้สูงสุดเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHA สูงสุดเท่ากับ 7.5 กรัมต่อลิตรและ 90 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

#### 2.11.4 แหล่งฟอสฟอรัสและอาหารเสริมเกลือแร่

การสะสม PHAs จะเกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารเกลือแร่ขาดความสมดุล เช่น ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ ซึ่งพบว่า ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม



และซัลเฟอร์ นั้นจัดเป็นแร่ธาตุหลักที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณมากพอสมควร โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ฟอสฟอรัสและแมกนีเซียม ซึ่งจำเป็นมากเนื่องจากเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสร้างและการถ่ายเทพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ (Holmes และคณะ, 1985)

Ryu และคณะ (1997) ศึกษาการผลิต PHAs ของเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* ในสภาวะกึ่งกะที่มีปริมาณฟอสเฟตจำกัด เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  เท่ากับ 2.2 3.1 4.3 และ 5.5 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้นที่สูงขึ้นสามารถผลิตเซลล์และ PHAs สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นของเซลล์และปริมาณ PHAs สูงที่สุด เท่ากับ 281 และ 232 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ภายใน 74 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

Grothe และคณะ (1999) ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่เติมธาตุอาหารรองต่อการเจริญและผลิต PHAs ของเชื้อ *Alcaligenes latus* เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเติมธาตุอาหารรอง ได้แก่  $\text{ZnSO}_4$   $\text{CuSO}_4$   $\text{NiSO}_4$   $\text{CaCl}_2$   $\text{H}_3\text{BO}_3$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$   $\text{CoCl}_2$   $\text{MnCl}_2$  และ ammonium Fe (III) citrate มีผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์และปริมาณ PHAs สูงขึ้นเป็น 6.8 และ 3.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Sharma และ Mallick (2005) รายงานว่า การจำกัดปริมาณฟอสฟอรัสมีผลต่อการสังเคราะห์ PHAs ของ *Nostoc muscorum* โดยพบว่า เมื่อมีการจำกัดฟอสฟอรัสไปพร้อมๆ กับให้แหล่งคาร์บอนมากเกินไป เซลล์จะสะสม PHAs ได้สูงขึ้น คือมีค่าเท่ากับ 23 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ขณะที่หากทำการเลี้ยงเซลล์ให้เจริญในแหล่งคาร์บอนก่อนแล้วจึงมีการจำกัดฟอสฟอรัส พบว่า มีการสะสม PHAs ได้ปริมาณน้อยมาก

### 2.11.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต PHAs พบว่า หากต้องการผลิต PHAs ควรทำการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างไม่ให้ต่ำกว่า 7.0 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดมากเกินไป ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์สำคัญที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ PHAs (Kinoshita และคณะ, 1991)

Khatipov และคณะ (1998) รายงานว่า การเพิ่มขึ้นของค่าความเป็นกรด-ด่าง ทำให้มีการสะสม PHAs เพิ่มขึ้น โดยได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ในแลกเตท ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดไนโตรเจน พบว่า จุลินทรีย์สามารถผลิต PHAs ได้ปริมาณสูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจาก 6.8 เป็น 7.5

Grothe และคณะ (1999) ศึกษาการผลิต PHAs ใน *Alcaligenes latus* พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญและผลิต PHAs มีค่าเท่ากับ 6.5

โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะนี้ จะผลิต PHAs สูงถึง 63 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ภายใน 93 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ขณะที่ Chua และคณะ (2003) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการสะสม PHAs ในน้ำทิ้งจากการบำบัดด้วยระบบตะกอนเร่ง (activated sludge) โดยทำการทดลองแบบแบตช์ พบว่า มีปริมาณ PHAs สูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และ 8.5 ซึ่งสูงกว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และ 7.5

Sankhla และคณะ (2010) รายงานว่า *Brevibacillus invocatus* MTCC 9039 สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดเท่ากับ 397 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 11.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็น 3.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ

### 2.11.6 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ การผลิตและสะสม PHAs ของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและสังเคราะห์ PHAs ได้แตกต่างกัน

Aslim และคณะ (1998) ศึกษาการผลิต PHAs ด้วยจุลินทรีย์กลุ่ม lactic acid bacteria พบว่า อุณหภูมิที่จีน่าส *Lactobacillus* sp. สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ในขณะที่จีน่าส *Pediococcus* sp. เจริญได้ดีที่ 37 องศาเซลเซียส แต่ *Streptococcus* sp. เจริญได้ดีที่ 40 องศาเซลเซียส

Grothe และคณะ (1999) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและสะสม PHAs ของ *Alcaligenes latus* มีค่าเท่ากับ 33 องศาเซลเซียส เนื่องจากได้ปริมาณพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 63 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง

Krishna และคณะ (1999) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสะสม PHAs ในระบบเอสบีอาร์ (SBR: Sequencing Batch Reactor) ที่มีการเติมอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า อัตราการสร้าง PHAs จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงจะไปเพิ่ม anabolic rate ของการสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลใหญ่ขึ้นของเซลล์แทนที่จะมีการสะสม PHAs

Shi และคณะ (2001) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการแสดงออกของยีน *pha* ใน *E.coli* และผลของรูปแบบของอุณหภูมิต่อการผลิต PHAs โดยการตัดต่อยีน *Pha C A* และ *B* รวมทั้ง promoter ที่ควบคุม *pha* โอเปอรอนลงในพลาสมิด pNDTM 2 จากนั้นจึงย้ายพลาสมิดที่สร้างใหม่นี้เข้าสู่ *E.coli* XL 1-Blue เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าว โดยกำหนดรูปแบบของอุณหภูมิดังนี้ ในระหว่าง 10 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อจะควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 34 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ จากนั้นจึงเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ PHAs โดยการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส เรียกว่ากระบวนการ heat shock หลังจากนั้น 5 ชั่วโมง จึงปรับ

อุณหภูมิให้ลดลงเป็น 37 องศาเซลเซียสเพื่อลดผลของ heat shock ซึ่งผลจากกระบวนการ heat shock พบว่า สามารถสร้าง PHAs ได้ โดยงานวิจัยนี้ยังไปสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kabia และ Shimizu (2001) ที่ได้รายงานไว้ว่า recombinant *E.coli* สายพันธุ์ที่มี promoter และยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์ P(3HB) สามารถสะสม P(3HB) ได้เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิในการบ่มจาก 34 องศาเซลเซียส เป็นมากกว่า 37 องศาเซลเซียส

### 2.11.7 ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต PHAs เนื่องจากสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ citrate synthase และ isocitrate dehydrogenase จะถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้ acetyl-CoA ไม่เข้าสู่วัฏจักร TCA แต่จะเปลี่ยนไปเป็น acetoacetyl-CoA เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHAs โดยเอนไซม์  $\beta$ -ketothiolase จึงมีการสะสม PHAs เกิดขึ้น (Luengo และคณะ, 2003) ซึ่งการที่มีปริมาณออกซิเจนจำกัดยังมีผลต่อการลดการทำงานของกระบวนการหายใจในขณะที่ PHAs จะทำหน้าที่เป็นแอนอ็อกซิเจนที่มีฤทธิ์ลดพลัง (reducing power) หรือเป็นหน่วยควบคุมปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox regulator) ภายในเซลล์ ดังนั้น การจำกัดปริมาณออกซิเจนจึงช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์ PHAs ได้ (Steinbüchel และ Schlegel, 1989)

Satoh และคณะ (1998) เปรียบเทียบวิธีในระบบตะกอนเร่ง 2 ระบบ คือ Anaerobic – Aerobic (AA) Microanaerobic – Aerobic (MA) แล้วนำกากตะกอน (sludge) จากทั้ง 2 ระบบมาทดสอบปริมาณ PHAs ในถังหมักแบบแบตช์ โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ได้แก่ ชุดที่ไม่มีการเติมออกซิเจน และชุดที่มีการเติมออกซิเจนในปริมาณจำกัด พบว่า sludge จากระบบ AA มีการสังเคราะห์ PHAs ในสภาวะที่มีออกซิเจนสูงกว่าในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เท่ากับ 33 และ 22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนใน sludge จากระบบ MA สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้สูงถึง 62 เปอร์เซ็นต์

Kulpreecha และคณะ (2009) รายงานว่า ปริมาณออกซิเจนมีผลโดยตรงต่อการเจริญและสังเคราะห์ P(3HB) ของ *Bacillus megaterium* BA-019 พบว่า ที่ปริมาณออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen, DO) เท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ ได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ P(3HB) สูงสุด เท่ากับ 8.78 และ 61.62 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ขณะที่ที่ปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณ P(3HB) ต่ำกว่า โดยมีค่าเท่ากับ 47.02 และ 57.99 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

## 2.12 การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยควบคุมสัดส่วนของ 3HV

การควบคุมสัดส่วนของ ใน PHBV สามารถทำได้ในขั้นตอนการผลิต โดยศึกษาถึงผลของการแปรผันชนิดและปริมาณของสารตั้งต้นหรือสับสเตรตหลัก โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการนำสารตั้งต้นไปใช้ในการสังเคราะห์ PHBV ได้แตกต่างกัน ทั้งนี้การศึกษาวิจัยการควบคุมสัดส่วนของ 3HV มีรายงานไว้ ดังตัวอย่างต่อไปนี้

Chen และคณะ (1991) ศึกษาผลของชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนผสมต่อสัดส่วนของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ PHBV โดยการเติมกรดหรือเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับน้ำตาล เพื่อใช้เลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ต่างๆ ที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้ ได้แก่ *Bacillus megaterium* DSM 90 *B. laterosporus* DSM 335 *B. subtilis* DSM 10 *B. sphaericus* DSM 28 *B. cereus* DSM 31 *B. amyloliquefaciens* DSM 7 *B. licheniformis* DSM 394 *B. macerans* DSM 2832 *B. circulans* DSM 1529 *B. thuringiensis* DSM 2046 และ *B. mycoides* DSM 2048 ในการเลี้ยงแบบสองขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกใช้อาหารสูตรอุดม (rich medium) จากนั้นนำเซลล์มาล้างแล้วย้ายมาลงในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน พบว่า ทุกสายพันธุ์สังเคราะห์ได้เฉพาะ P(3HB) แต่เมื่อเติมกรดโพรพิโอนิก กรดวาเลอริกหรือกรดเฮกซานอิกลงในอาหารเหลือสำหรับการผลิต PHAs จึงจะสามารถสังเคราะห์ 3HV ได้ โดยพบว่า *B. megaterium* สามารถเจริญได้สูงที่สุด คือ มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.2 และ 7.2 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุดผลิตได้จาก *B. circulans* มีค่าเท่ากับ 57.3 และ 56.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงในกรดโพรพิโอนิกและกรดวาเลอริก ตามลำดับ ส่วนการใช้กรดเฮกซานอิกนั้นเชื้อเติบโตได้ช้ามาก

Lee และคณะ (1995) ศึกษาการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ใน *Bacillus thuringiensis* R-510 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกสูงๆ ได้ พบว่า เมื่อเติมกรดโพรพิโอนิกตั้งแต่ 0.1-2.0 เปอร์เซ็นต์ ช่วงการเติบโตระยะพักตัวนานขึ้น เมื่อความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกเพิ่มขึ้น โดยได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 44.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ขณะที่ปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 33 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสูงถึง 80 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

Cho และคณะ (2001) ศึกษาผลของเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ โพรพิโอเนต บิวทิเรต วาเลอเรตและเฮกซะโนเอตร่วมกับการเติมกลูโคสเพื่อผลิตเป็นโคพอลิเมอร์ PHBV ใน *Azotobacter vinelandii* UWD พบว่า เชื้อสามารถเจริญ ผลิตและสะสม PHBV ได้สูงสุดในวาเลอเรต โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV เท่ากับ 6.3 กรัมต่อลิตร 4.0 กรัมต่อ



ลิตร 64.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และมีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 22 โมลเปอร์เซ็นต์

Yu และคณะ (2005) รายงานว่า เมื่อเลี้ยง *Ralstonia eutropha* ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกลูโคสกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต ในถังหมักที่มีการกวนแบบต่อเนื่อง (continuous stirred tank reactor) เพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV พบว่า เมื่อเติมโซเดียมโพรพิโอเนตที่มีความเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตรร่วมกับกลูโคสที่มีความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร เซลล์จะสะสม P(3HB) เป็นส่วนใหญ่ โดยมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV อยู่เล็กน้อย (ปริมาณ PHBV มีค่าระหว่าง 10-15 wt%) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิโอเนตเป็น 5.0 กรัมต่อลิตร พบว่า *R. eutropha* จะเริ่มสะสมโมโนเมอร์ 3HV มากขึ้น โดยมีสัดส่วนระหว่าง 3HB : 3HV เท่ากับ 70 : 30 (ปริมาณ PHBV เท่ากับ 78 wt %) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิโอเนตขึ้นไปเป็น 7.0 กรัมต่อลิตร พบว่า ให้สัดส่วนระหว่าง 3HB : 3HV ประมาณ 60 : 40 (ปริมาณ PHBV เท่ากับ 68 wt %) ขณะที่เมื่อมีความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 15.0 กรัมต่อลิตร พบว่า ให้สัดส่วนระหว่าง 3HB : 3HV เป็น 40 : 60 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิโอเนต จะทำให้มีการสะสมโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ PHBV เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม หากมีความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิโอเนตมากเกินไป จะไปมีผลทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHBV ลดลง

Loo และ Sudesh (2007a) พบว่า เมื่อเลี้ยง *Delftia acidovorans* ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างเกลือโซเดียมบิวทิเรตกับเกลือโซเดียมวาเลอเรต สามารถให้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ในช่วงที่กว้างกว่าการใช้เกลือโซเดียมวาเลอเรตเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว โดยมีปริมาณ 3HV ตั้งแต่ 0 ถึง 90 โมลเปอร์เซ็นต์ และยังได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงกว่าคือมีค่าเท่ากับ 37 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง

Rocha และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยใช้ซูโครสและกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ปริมาณ ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างซูโครสต่อกรดโพรพิโอนิก (s/p) โดยสามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV ตั้งแต่ 6.5 ถึง 40 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในแหล่งอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างซูโครสต่อกรดโพรพิโอนิกตั้งแต่ 61.5: 1 ถึง 10 : 1

Sheu และคณะ (2009) ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จาก *Caimonas taiwannensis* โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างโซเดียมกลูโคเนตกับโซเดียมวาเลอเรต พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมวาเลอเรตตั้งแต่ 5 ไปจนถึง 80 มิลลิโมลาร์ จะมีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้นจาก 10 ไปจนถึง 95 โมลเปอร์เซ็นต์ แต่เซลล์จะเจริญเติบโตได้น้อยมาก โดยพบว่า ที่ความเข้มข้นของโซเดียมวาเลอเรตเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพียง 0.8 กรัมต่อลิตร ขณะที่ความ



เข้มข้นของโซเดียมวาเลอเรตมากกว่า 20 มิลลิโมลาร์ จะมีผลยับยั้งการเจริญและการสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV อย่างเห็นได้ชัด

Zakaria และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *Comamonas sp.* EB172 ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิกในอัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ 5:0 4:1 3:2 2:3 และ 1:4 พบว่า มีปริมาณ 3HV ได้ตั้งแต่ 0 ถึง 17 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งที่อัตราส่วนระหว่างกรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 2:3 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 2.8 กรัมต่อลิตรและ 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 15 โมลเปอร์เซ็นต์

## 2.13 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

### 2.13.1 ระดับขวดเขย่า (shake flask)

การเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าเป็นการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวเพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และสามารถทราบผลของตัวแปรในการศึกษาโดยใช้เวลาน้อย การศึกษาทำได้สะดวก ไม่ยุ่งยาก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อย ตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ทำให้สามารถหาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ได้ในการทดลองระดับนี้

### 2.13.2 ระดับถังหมักห้องปฏิบัติการ (lab scale fermenter)

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการเป็นการเลี้ยงเชื้อโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ เพิ่มปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และอื่นๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการผลิต (production process) ที่ต้องการ ข้อได้เปรียบของการเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมักมีหลายประการ ได้แก่ สามารถให้อากาศ (ออกซิเจน) แก่ระบบได้มากกว่าระดับขวดเขย่า เนื่องจากมีการให้อากาศและการกวน ซึ่งมีผลให้มีการผสม (mixing) ได้ดีระหว่างเซลล์ สารอาหาร และออกซิเจน ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญได้ดี สามารถควบคุมภาวะในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้มากกว่าการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า เช่น ค่าความเป็นกรดและอุณหภูมิตลอดการเลี้ยงเชื้อ ค่าออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen) ทราบการเปลี่ยนแปลงของค่าตัวแปรเหล่านี้ได้ตลอดการศึกษาโดยมีการบันทึกโดยเครื่องอัตโนมัติ สามารถเติมสารอาหารระหว่างการเลี้ยงเชื้อ (fed-batch และ continuous cultivation) ทำให้เลี้ยงเชื้อได้นานขึ้น โดยไม่ต้องเริ่มต้นใหม่ แต่ส่งผลให้ได้ผลผลิตมากขึ้น รวมทั้งหลีกเลี่ยงการยับยั้งการเจริญจากความเข้มข้นของสารเริ่มต้น (feed back inhibition)

### บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 วัสดุอุปกรณ์

- 3.1.1 เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) รุ่น 3400CX ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.2 เครื่องสำหรับฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (auto sampler) รุ่น 8200CX ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.3 แคปพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ชนิด CP-WAX 52 CB เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 60 ม. ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.4 เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.5 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychotherm incubator shaker) รุ่น G27 แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.6 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S ของบริษัท Sartorius ประเทศเยอรมนี
- 3.1.7 เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P ของบริษัท Sartorius ประเทศเยอรมนี
- 3.1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P ของบริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) รุ่น Centrikon T-42K ของบริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.10 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (VIS spectrophotometer) รุ่น Novaspec II ของบริษัท Pharmacia Biotech ประเทศอังกฤษ
- 3.1.11 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 2000 ของบริษัท Cyberscan ประเทศสิงคโปร์
- 3.1.12 ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124 ของบริษัท ISSCO ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.13 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น INE 500 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 3.1.14 ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL-60 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 3.1.15 ตู้อบแห้ง (dryer oven) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 3.1.16 หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy ประเทศญี่ปุ่น

- 3.1.17 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W760 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 3.1.18 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo Electric ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.19 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ของบริษัท Forma Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.20 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.21 ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) ของบริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.22 อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ Gel Documentation และ โปรแกรม Quantity One Version 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.23 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.24 ไมโครปิเปต ขนาด 100 200 1,000 และ 5,000 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส
- 3.1.25 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ 2 ของบริษัท Whatman ประเทศอังกฤษ
- 3.1.26 ถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร ของบริษัท B.E. Marubishi ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.27 หลอดทดลองฝาเกลียว (screw-cap tube) ของบริษัท PYREX ประเทศเยอรมนี
- 3.1.28 ชุดตรวจจำเพาะรูป API 50 CHB Medium และ API 20 E ของบริษัท bioMérieux ประเทศฝรั่งเศส

### 3.2 เคมีภัณฑ์

- 3.2.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ( $H_2SO_4$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.2 กรดซิตริก ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.3 กรดบอริก ( $H_3BO_3$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.4 กรดเบนโซอิก ( $C_7H_6O_2$ ) ของบริษัท Nacalai tesque ประเทศญี่ปุ่น
- 3.2.5 กรดอะซิติก ( $C_2H_4O_2$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.6 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.7 กลีเซอรอล ( $C_3H_8O_3$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.8 กลูโคส [ D(+)glucose :  $C_6H_{12}O_6$  ] ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.9 ฟรุคโตส [ D(-)fructose :  $C_6H_{12}O_6$  ] ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

- 3.2.10 ซูโครส ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.11 คลอโรฟอร์ม ( $CHCl_3$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.12 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) ของบริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.13 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.14 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.2.15 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.2.16 โซเดียมคลอไรด์ ( $NaCl$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.17 โซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $NaOH$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.18 โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ( $NaOCl$ ) ของบริษัท Clorox ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.19 ไดคลอโรมีเทน ( $CH_2Cl_2$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.20 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $Na_2HPO_4$ ) ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 3.2.21 นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.22 โซเดียมโพรพิโอเนต ( $C_3H_5O_2Na$ ) ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 3.2.23 โซเดียมวาเลอเรต ( $C_5H_9O_2Na$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.24 โซเดียมอะซิเตต ( $CH_3COONa$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.25 สารมาตรฐานพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [P(3HB)] ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.26 สารมาตรฐานพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-12%3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [P(3HB-co-12%3HV)] ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.27 โพแทสเซียมคลอไรด์ ( $KCl$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.28 แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.29 แบคทีเรียทริปโตส (Bacto tryptose) ของบริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.30 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.31 เฟอร์รัสซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ของบริษัท Unilab ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.32 เมทานอล ( $CH_3OH$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.33 เอทานอล ( $C_2H_5OH$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.34 แมกนีเซียมซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี

- 3.2.35 แมงกานีสคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์ ( $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.36 ยูเรีย ( $\text{N}_2\text{H}_6\text{CO}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.37 สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Labscan Asia ประเทศไอร์แลนด์
- 3.2.38 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Springer ประเทศฝรั่งเศส
- 3.2.39 เปปโตน (peptone) ของบริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.40 เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.41 เอนไซม์ยูรีเอส (urease) ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 3.2.42 แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต [ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ] ของบริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.43 แอมโมเนียมซัลเฟต [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.44 น้ำอ้อย ของบริษัทมิตรผลวิชัย จำกัด ประเทศไทย
- 3.2.45 เฮกเซน (Hexane) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.46 สารละลายฟีนอลอิ่มตัว (equilibrated phenol) ของบริษัท USB ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.47 อะซีโตน (acetone) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.48 อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท ABgene ประเทศอังกฤษ
- 3.2.49 วุ้นผง (agar) ของบริษัทบิกเบน โปรดัคตอรา เดอ อะการ์ เอส. เอ ประเทศชิลี
- 3.2.50 dNTP ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.51 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.52 GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.53 Taq DNA polymerase ของบริษัท BioLabs ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.54 ก๊าซไฮโดรเจน ( $\text{H}_2$ ) ของบริษัท PRAXAIR ประเทศไทย
- 3.2.55 ก๊าซออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) ของบริษัท TIG (Thai Industrial Gas) ประเทศไทย
- 3.2.56 ก๊าซไนโตรเจน ( $\text{N}_2$ ) ของบริษัท PRAXAIR ประเทศไทย



### 3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Bacillus* sp. P-12 เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ใหม่ในห้องปฏิบัติการโดย ศันสนีย์ สันตือรณพันธุ์ (2550) สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่นที่ศึกษา คัดแยกได้จากดินบริเวณใกล้บ่อน้ำพุร้อนหนองหญ้าปล้อง อำเภอหนองหญ้าปล้อง จังหวัดเพชรบุรี

#### 3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.2.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม
แบคโตทริปโตส	5.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

3.3.2.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) ใช้สูตรของ Doi และคณะ (1986) ซึ่งศึกษาปรับปรุงโดย สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) (อ้างถึงใน Kulpreecha และคณะ, 2009) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	10.0	กรัม
แบคโตทริปโตส	10.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
น้ำตาลทราย	10.0	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายน้ำตาลนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.3.2.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตและสะสม โพลิเมอร์ P(3HB) และ โคลิเมอร์ PHBV คือ อาหาร Mineral Salt Medium (MSM) (อดิพล บุญเรืองถาวร, 2543) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

แหล่งคาร์บอน	20.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
กรดซिटริก	0.75	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
สารละลาย trace element	1.0	มิลลิลิตร

แยกละลายเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตและสารละลาย trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย trace element ใน 1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	20.0	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.30	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.20	กรัม
แอมโมเนียม โมลิบเดตเตตระไฮเดรต	0.60	กรัม
กรดบอริก	0.60	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์	0.08	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.50	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	0.05	กรัม
นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.02	กรัม

### 3.3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

#### 3.3.3.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น

เก็บจุลินทรีย์โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ทุกๆ 3 เดือน

#### 3.3.3.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อจากข้อ 3.3.2.2 นำไปเลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลว ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10

นาที เทส่วนน้ำใส่ทั้ง ล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl จากนั้นปั่นแยกเซลล์และทำซ้ำอีกรอบ กระจายเซลล์ใน 10% กลีเซอรอลที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและปรับให้อยู่ในช่วง 0.8-1.0 (จำนวน  $10^9$  CFU/ml) บรรจุลงในหลอดเยือกแข็ง (cryotube) ที่ปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือนหรือเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี

### 3.3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Bacillus* sp. P-12 ที่คัดแยกได้ใหม่ทางอนุกรมวิธาน

#### 3.3.4.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำ *Bacillus* sp. P-12 ซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA อายุ 24 ชั่วโมง มาย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) เพื่อจำแนกชนิดเบื้องต้น ย้อมสีซูดาน แบลค บี (Sudan black B) เพื่อดูลักษณะการติดสีของแกรนูลภายในเซลล์ และย้อมเอนโดสปอร์ด้วยสีมาลาไคท์กรีน (Malachite green)

#### 3.3.4.2 ศึกษาสมบัติทางชีวเคมี

ทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB Medium และ API 20 E ของบริษัท bioMérieux

สำหรับหลักการของ API 50 CHB Medium เป็นอาหารพร้อมใช้สำหรับการศึกษาการหมักของคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด ใน API 50 CHB Strip ในระหว่างการบ่ม คาร์โบไฮเดรตจะถูกหมักกลายเป็นกรด ซึ่งมีผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง สังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ ผลชีวเคมีที่ได้ใช้นำมาวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรีย โดยทั่วไป ผลการทดสอบ API 50 CHB Medium เพียงอย่างเดียวก็เพียงพอต่อการวิเคราะห์เชื้อ แต่บางกรณีอาจจำเป็นต้องยืนยันผลด้วย API 20 E หรือสังเกตจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาาร่วมด้วย

#### การเตรียม Strip

Strip ของ API 50 CHB จะประกอบด้วย 5 แถบด้วยกัน โดยแต่ละแถบจะประกอบด้วยช่องที่บรรจุสารอาหารชนิดแห้งไว้จำนวน 10 ช่อง โดยเรียงลำดับจาก 0 จนถึง 49 เตรียมกล่องสำหรับ incubate โดยเติมน้ำกลั่น (ปริมาตร ประมาณ 10 มิลลิลิตร) ลงในหลุมทุกหลุมของถาดล่างของกล่อง incubate บันทึก Reference. No ของเชื้อบริเวณพลาสติกที่ยื่นออกมา (ไม่ควรบันทึกไว้ที่ฝากล่อง เพราะอาจเกิดการสับสนได้) นำแถบ Strip 2 แถบใหญ่ คือ 0-19 และ 20-39 ออกจากที่บรรจุ หลังจากนั้นแบ่งแถบ Strip ออกเป็น 4 ส่วนเล็กๆ นั่นคือแถบ 0-9, 10-19, 20-29 และ 30-39 นำมาวางในถาดล่างของกล่อง incubate ซึ่งเติมน้ำไว้แล้ว นำ Strip อีกส่วนที่เหลือ ได้แก่ แถบ 40-49 ออกมาวางในถาด incubation จนเต็ม

#### การเตรียม Inoculum

(1) เปิดขวดที่บรรจุสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (1 ml)

(2) เขี่ยเชื้อ *Bacillus* sp. P-12 จากอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ให้มีความเข้มข้นสูง

(3) เปิดขวดที่บรรจุสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ที่ฆ่าเชื้อแล้ว (5 ml) เติม suspension จากข้อ (2) ลงไป ให้มีความขุ่นเท่ากับ 2 McFarland บันทึกจำนวนหยดของ suspension ที่เติมลงไป (n)

(หมายเหตุ: Suspension ที่มีความขุ่น 2 McFarland ใช้สำหรับ inoculate API 20 E)

(4) เปิด ampoule ของ API 50 CHB Medium

(5) เติม suspension เป็นจำนวน 2 เท่าของจำนวนหยด (2n) ในข้อ (3) ลงใน ampoule ของ API 50 CHB Medium

การหยด Inoculum ลงใน Strip

เติม API 50 CHB Medium ลงในหลุม (ไม่ต้องเติม) การเติม Mineral oil จะช่วยให้แยกผลการทดสอบว่าเป็น Positive หรือ Negative ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยระวังอย่าให้เกิดฟองก๊าซที่ก้นหลุม

การอ่านผล

อ่านผลหลังจากบ่มที่ 24 และ 48 ชั่วโมง โดยผลทดสอบที่เป็นบวกเกิดขึ้นเนื่องจาก phenol red ที่ใส่ในอาหารเกิดการเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองอันเนื่องมาจากสภาพความเป็นกรดในอาหาร สำหรับ Esculin test (หลุมที่ 25) อาหารจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีดำ บางครั้งผล Positive อาจเปลี่ยนเป็น Negative ได้ในการอ่านผลครั้งที่ 2 เนื่องจากเกิดการผลิตแอมโมเนียจากเปปโตน ซึ่งมีผลให้อาหารเป็นกลาง ดังนั้น ให้บันทึกผลที่ได้เป็น Positive

นำผลที่ได้มาทำการแปลผลด้วย Software APILAB Plus ส่วนการอ่านผลของ API 20 E ให้อ่านตามคู่มือการอ่านผลของ API 20 E สำหรับการทดสอบปฏิกิริยา NIT ในช่อง GLU test ให้อ่านผลหลังสุด

3.3.4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S ribosomal DNA (partial 16S rDNA sequencing) ของ *Bacillus* sp. P-12

3.3.4.3.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA

นำ *Bacillus* sp. P-12 ที่คัดแยกได้ในรูปของโคโลนีบริสุทธิ์ ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โดยใช้ไพรเมอร์ ดังนี้ 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') และ 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3')

เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนดิเอ็นเอแล้ว นำไปเชื่อมต่อดำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu>) แล้วนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

#### 3.3.4.3.2 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ที่ผ่านการวิเคราะห์แล้วและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ ทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X จากนั้นนำข้อมูลที่ผ่านการปรับแนว มาคำนวณ distance matrix สร้าง phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์แบบ Neighbor-joining (NJ) และ Bootstrap ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package version 3.752 c ซึ่งประกอบด้วย PRODIST.EXE NEIGHBOR.EXE SEQBOOT.EXE และ CONSENSE.EXE ตามลำดับ ต้นไม้วิวัฒนาการที่ถูกสร้างขึ้น นำเสนอโดยใช้โปรแกรม TREEVIEW (Kimura, 1980)

### 3.3.5 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. P-12

#### 3.3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเป็นกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 3.3.3.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียงใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85% (w/v)) เพื่อทำให้เป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) และปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5

#### 3.3.5.2 ชนิดของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Bacillus* sp. P-12

ถ่ายหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ( $OD_{600} = 0.5$ ) ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร (4% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร สำหรับชนิดของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่ศึกษา ได้แก่ BCM (Kulpreecha และคณะ, 2009) BYPcng (Mitsui และคณะ, 1997) และ Nutrient Broth (NB) (ภาคผนวก ก)

นำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปหาค่าความหนืด แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโตและหาอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) จากนั้นจึงเลือกชนิดของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสม เพื่อให้ได้กล้าเชื้อปริมาณมาก และมีแอกติวิตีในการผลิตสูง



### 3.3.5.3 ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. P -12

ถ่ายหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ชนิดที่เหมาะสมที่ได้จากการวิจัย ข้อ 3.3.5.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยแปรค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเริ่มต้นและอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงกล้าเชื้อ ดังนี้ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ เท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0 และอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงกล้าเชื้อ เท่ากับ 25 30 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส

เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปหาค่านักเซลล์แห้ง แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโตและหาอัตราการเจริญจำเพาะ จากนั้นจึงเลือกภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงกล้าเชื้อเพื่อการศึกษาขั้นต่อไป

### 3.3.6 การศึกษาอายุที่เหมาะสมสำหรับเป็นกล้าเชื้อของ *Bacillus* sp. P -12

ถ่ายหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ( $OD_{600} = 0.5$ ) ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.5.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (4% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อและนำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิตามที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.5.3. ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาหาค่านักเซลล์แห้ง คำนวณอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{max}$ ) เพื่อหาอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ในขั้นตอนต่อไป

### 3.3.7 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการเจริญ การผลิตไฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) และโคพอลิเมอร์ PHBV รวมถึงสัดส่วนของโมนิเมอร์ 3HV ใน PHBV

3.3.7.1 ผลของชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของโมนิเมอร์ 3HB (3HB-generating carbon source)

ผลของชนิดแหล่งคาร์บอน

ถ่ายกล้าเชื้อที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM (อดิพล บุญเรืองถาวร, 2543) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใน 1 ลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน 20.0 กรัม และใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.0 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัม กรดซิตริก 0.75 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 0.1 กรัมและสารละลาย trace

element 1.0 มิลลิกรัม ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิกรัม เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นตามผลที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.6 เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ สำหรับแหล่งคาร์บอนปริมาณ 20.0 กรัมต่อลิตรที่ใช้ในอาหารเหลว สำหรับการผลิตข้างต้น แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ตอน คือ

(1) แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลบางชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรักโตสและซูโครส เพื่อเป็นแนวทางในการหาแหล่งคาร์บอนที่มีราคาไม่แพงมาทดแทน

(2) แหล่งคาร์บอนที่มีราคาไม่แพง (inexpensive carbon source) ได้แก่ น้ำอ้อย (ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจากบริษัท มิตรผลวิจัยและพัฒนา จำกัด) โดยผลที่ได้จากการศึกษาในขั้นตอนนี้ จะนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB ซึ่งเป็นองค์ประกอบในโคพอลิเมอร์ PHBV ในขั้นตอนต่อไป

#### ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอน

แปรความเข้มข้นของสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB ที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ เท่ากับ 20.0 30.0 40.0 และ 50.0 กรัมต่อลิตร

#### 3.3.7.2 ผลของชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนผสมเพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV

เปรียบเทียบชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนผสมที่มีผลต่อการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ โดยถ่ายกล้าเชื้อที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.5 ปริมาตร 2 มิลลิกรัม ลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิต ปริมาตร 50 มิลลิกรัมที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB ที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.3.7.1 กับเกลือโซเดียมวาเลอเรตหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HV (3HV-generating carbon source) โดยแปรความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนผสมในสัดส่วนระหว่างสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB ต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตเท่ากับ 15:5 10:10 และ 5:15 กรัมต่อลิตร ต่อกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (กำหนดให้แหล่งคาร์บอนผสมมีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตร) และแปรความเข้มข้นระหว่างสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB ต่อเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตที่มีปริมาณธาตุคาร์บอนเท่ากับธาตุคาร์บอนในโซเดียมวาเลอเรตซึ่งเท่ากับ 15:6.45 10:12.90 และ 5:19.35 กรัมต่อลิตรต่อกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญ ผลิตและสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ของ *Bacillus* sp. P-12 ระหว่างเกลือโซเดียมวาเลอเรตกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต

เมื่อได้ชนิดของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB และสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HV แล้ว จากนั้นจึงแปรสัดส่วนระหว่างสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB กับสารตั้ง

ต้นของโมโนเมอร์ 3HV ที่ได้จากการศึกษาข้างต้น เท่ากับ 19:1 18:2 17:3 16:4 15:5 14:6 13:7 12:8 11:9 10:10 9:11 8:12 7:13 6:14 5:15 4:16 3:17 2:18 และ 1:19 ตามลำดับ เพื่อหาสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ PHBV ตามที่ต้องการ คือ มีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV อยู่ในช่วงประมาณ 20 ถึง 30 โมลเปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์มากที่สุด โดยพบว่า สามารถนำไปขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้ (Nobes และคณะ, 1994 ; Barker และคณะ, 1997 ; Sudesh และคณะ, 2000 ; Volova, 2004 ; Rudnik, 2008 )

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิตามผลที่ได้จากการวิจัย 3.3.5 ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB และสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HV ที่เหลือ สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ แล้วจึงเลือกสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ต้องการ ไปวิเคราะห์หาสมบัติทางเคมีกายภาพบางประการต่อไป

เมื่อได้ผลการวิจัยแล้ว นำข้อมูลที่ได้มาศึกษาหาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ (kinetic parameters) ของเชื้อ *Bacillus* sp. P-12 ได้แก่ ค่าอัตราการผลิต (productivity) สัมประสิทธิ์ผลผลิตพอลิเมอร์ต่อปริมาณเซลล์ ( $Y_{p/x}$ ) สัมประสิทธิ์ผลผลิตพอลิเมอร์ต่อสับสเตรตที่ใช้ไป ( $Y_{p/s}$ ) และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ใช้ไป ( $Y_{x/s}$ ) โดยค่าพารามิเตอร์เหล่านี้หาได้จากสมการทางคณิตศาสตร์ (ภาคผนวก ข) เพื่อใช้เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญ ผลิตและสะสมพอลิเมอร์ของเชื้อ *Bacillus* sp. P-12 ในภาวะต่างๆ

### 3.3.8 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญ การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV และ สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV

#### 3.3.8.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

ถ่ายกล้าเชื้อที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิต ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่ ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนผสมที่ได้จากผลการวิจัย ข้อ 3.3.7.2 ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร และยูเรียที่มีปริมาณธาตุไนโตรเจนเท่ากับธาตุไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ระหว่างแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์และอนินทรีย์ แล้วเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเพื่อการศึกษาขั้นต่อไป

### 3.3.8.2 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

แปรความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.8.1 เท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิตามผลที่ได้จากการวิจัย ข้อ 3.3.5 ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ ค่าอัตราการผลิต  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  ตามลำดับ

### 3.3.9 การศึกษาภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญ การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV และ สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV

นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากการวิจัย ข้อ 3.3.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารสำหรับการผลิต ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยใช้สารตั้งต้นจากการวิจัยข้อ 3.3.7 และ 3.3.8 มาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณโคพอลิเมอร์ ซึ่งได้แก่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารสำหรับการผลิตและปริมาณอากาศ

สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารสำหรับการผลิตปรับให้ได้เท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0 ส่วนปริมาณอากาศ จะให้อากาศปริมาณแตกต่างกัน ซึ่งทำได้โดยโดยการแปรปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งบรรจุในขวดทดลอง ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิลิตร

เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิตามที่ได้จากการวิจัยข้อ 3.3.5 เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ ค่าอัตราการผลิต  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  ตามลำดับ

### 3.3.10 การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จาก *Bacillus* sp. P-12 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาได้มาเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.5.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงกล้าเชื้อให้ได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.5.3 (คิดเป็น 10% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) จากนั้นจึงถ่ายกล้าเชื้อที่มีอายุที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.6 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น

ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.7 และ 3.3.8 เท่ากับ 2.5 ลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.5 และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHBV ซึ่งได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.9 ตลอดจนเลี้ยงเชื้อ โดยให้อัตราการกวนที่ 500 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ตามลำดับ

เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB และสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HV ที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจนสัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ และคำนวณหาค่าอัตราการผลิต  $Yp/x$   $Yp/s$  และ  $Yx/s$  ตามลำดับ

### 3.3.11 การสกัดโคพอลิเมอร์จากเซลล์แห้งและการทำให้บริสุทธิ์

ใช้วิธีของ Doi และคณะ (1995) โดยปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ทั้งหมดไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะแห้ง จากนั้นบรรจุเซลล์แห้งลงในถุงกระดาษกรองเบอร์ 2 เย็บปิดด้วยด้ายทุกด้านให้สนิท นำไปใส่ขวดที่มีฝาปิดสนิทและสกัดโคพอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเทใส่ภาชนะ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อระเหยคลอโรฟอร์มออกให้หมด จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์ม นำมาทำให้บริสุทธิ์อีกรอบ โดยละลายแผ่นฟิล์มที่ได้ในคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนเป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้ง นำมาตกตะกอนในเฮกเซน ปริมาตร 4 เท่า ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระเหยเฮกเซนออกให้หมด จากนั้นจึงเก็บโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ในเดซิเคเตอร์

### 3.3.12 การศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical properties) บางประการของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. P-12

#### 3.3.12.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC)

ใช้วิธีของ Abate และคณะ (1995) โดยละลายพอลิเมอร์ในคลอโรฟอร์มชนิดกรด HPLC เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง Gel Permeation Chromatography ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC-10A dvp ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้คอลัมน์ Water Styragel HT 6E มีตัวพาเป็นคลอโรฟอร์ม อัตราการชะ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กำหนดน้ำหนัก



โมเลกุลของพอลิเมอร์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของพอลิสไตรีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง  $9.1 \times 10^3 - 3.84 \times 10^6$  ซึ่งทำการวิเคราะห์ในสถานะเดียวกัน

3.3.12.2 การวิเคราะห์หาอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature,  $T_m$ ) และอุณหภูมิกลาสทรานสิชัน (glass transition temperature,  $T_g$ ) ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC)

ใช้วิธีของ Abe และ Doi (1999) วิเคราะห์หาอุณหภูมิหลอมเหลวและอุณหภูมิกลาสทรานสิชัน โดยชั่งพอลิเมอร์ให้มีน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียม ขนาดปริมาตร 30 ไมโครลิตร และทำการวิเคราะห์ 2 ขั้นตอน ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter ยี่ห้อ Perkin-Elmer รุ่น DCS 7 ภายใต้สภาวะดังนี้

(1) หาค่า  $T_m$  โดยเพิ่มอุณหภูมิจาก 0 องศาเซลเซียส ถึง 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที

(2) ทำการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจาก 200 องศาเซลเซียส เป็น -150 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์หาค่า  $T_g$  ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิจาก -150 องศาเซลเซียสเป็น 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที (ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

### 3.4 วิธีวิเคราะห์

#### 3.4.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหนักปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ โดยการเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์อบแห้ง คำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข) ในหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

#### 3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

นำสารตัวอย่างเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสหรือฟรักโตส จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธีของ Bernfeld (1955) โดยเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid, DNSA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในอ่างน้ำเย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540

นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำตาลกลูโคสหรือฟรักโตส และค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

สำหรับกรณีที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส จะต้องย่อยซูโครสให้เป็นน้ำตาลโมลกุลเดี่ยวก่อน โดยนำสารตัวอย่างเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมสารละลายอินเวอร์เทส 1.5 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เช่นเดียวกับวิธีข้างต้น

### 3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรียในน้ำหมัก

ตามวิธีของ Kemper (1974) นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปลอดภัยให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 x 150 มิลลิเมตร เติมสารละลายโพแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย EDTA 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลในไตรฟอสเฟต 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัพเฟอร์ไฮโปคลอไรต์ 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดภัย 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร (ในน้ำกลั่นปลอดภัยเป็นตัวแทนเปรียบเทียบ) กำหนดหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

กรณีแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นยูเรีย จะต้องย่อยยูเรียด้วยเอนไซม์ยูเรียเอส (urease) ก่อน โดยนำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดภัยตามความเหมาะสม ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ยูเรียเอส ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณยูเรีย เช่นเดียวกับวิธีข้างต้น

### 3.4.4 การวิเคราะห์สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณของพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโต

กราฟฟี (Gas Chromatography : GC)

ตามวิธีของ Comeau และ คณะ (1998) โดยการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ซึ่งเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียวเติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรด

ซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 3 (3 % acidified methanol) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารละลายมาตรฐานภายในความเข้มข้นเท่ากับปริมาตร 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 5 นาที และนำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ไปสกัดแยกกรดและกากเซลล์ตามวิธีข้างต้นอีกครั้ง ถ้ายังชั้นคลอโรฟอร์มไม่หลุดออกจากตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟี แล้ววิเคราะห์สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟีภายใต้ภาวะ ดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: แคปพิลารีคอลัมน์ ชนิด CP wax – 52 CB เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 60 เมตร
อุณหภูมิของ injector	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของคอลัมน์	: 130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียส ต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ Detector (FID)	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
Split ratio	: 50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	: ก๊าซไนโตรเจนอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	: 1 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดของโมโนเมอร์โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของสารตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารละลายมาตรฐาน P(3HB) และ P(3HB-co-12% 3HV) (ภาคผนวก ข) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

การแสดงผลปริมาณพอลิเมอร์ นิยมแสดงเป็นปริมาณต่อปริมาณของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร) หรือแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)

การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ 3HB และ 3HV (กรัมต่อลิตรต่อ dried cell 20 มิลลิกรัม) จะใช้โปรแกรม Star chromatogram : version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณโมโนเมอร์โดยมีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน แสดงกราฟมาตรฐานของสารต่างๆและโครมาโตแกรม ในภาคผนวก ค และภาคผนวก ง ตามลำดับ

### 3.4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำอ้อยด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

เตรียมน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50 ถึง 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำส่วนที่กรองได้ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์หาน้ำตาลกลูโคส ฟรักโตสและซูโครส โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของน้ำตาลแต่ละชนิดกับน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด โดยวิเคราะห์ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: Phenomenax Spherisorb NH <sub>2</sub> LCD
ชนิดของดีเทคเตอร์	: Refractive Index Detector
flow rate	: 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	: 90% อะซีโตนไนโตรเจนในน้ำ (ปริมาตรต่อปริมาตร)
ปริมาตรที่ฉีด	: 5 ไมโครลิตร

### 3.4.6 การวิเคราะห์หาปริมาณของเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตและเกลือโซเดียมวาเลอเรต โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี

ใช้วิธีของ Ramsay และคณะ (1990) โดยนำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว 1 มิลลิลิตร ใต้งในหลอดฝาเกลียว เติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารละลายมาตรฐานภายในความเข้มข้นเท่ากับปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นและไดคลอโรมีเทน อย่างละ 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาที และปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อ นาที นาน 10 นาที เก็บชั้นไดคลอโรมีเทน (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของโมนอเมอร์ ใต้อหลอดฝาเกลียวนำไปวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟี ภายใต้สภาวะเดียวกับการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์

คำนวณหาปริมาณเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตและโซเดียมวาเลอเรตโดยใช้โปรแกรม Star chromatogram : version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณโมนอเมอร์โดยมีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำกรวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน แสดงกราฟมาตรฐานของสารต่างๆ และโครมาโตแกรม ในภาคผนวก ค และภาคผนวก ง ตามลำดับ

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Bacillus* sp. P-12 ที่คัดแยกได้ทางอนุกรมวิธาน

คันทันย์ สันตือรรณพันธุ์ (2550) ได้คัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสม P(3HB) จากแหล่งดินตามธรรมชาติ บริเวณใกล้บ่อน้ำพุร้อนหนองหญ้าปล้อง อำเภอหนองหญ้าปล้อง จังหวัดเพชรบุรี พบว่ามี 4 ไอโซเลต ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณสูง โดย ไอโซเลต P-12 สามารถผลิตและสะสม P(3HB) ได้สูงสุดเมื่อเทียบกับไอโซเลตอื่น ซึ่งมีปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 44.54 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น พบว่า ไอโซเลต P-12 ที่แยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นรูปแท่งและจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* sp.

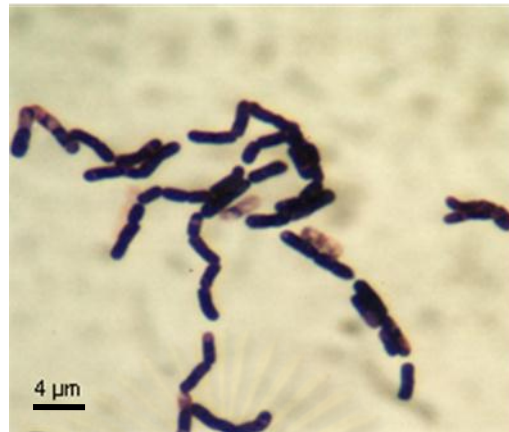
##### 4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะโคโลนีที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า คือ มีลักษณะกลม ขนาดใหญ่ สีครีมอ่อน ผิวเรียบมันวาว นูนและทึบแสง



รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus* sp. P-12 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MSM และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

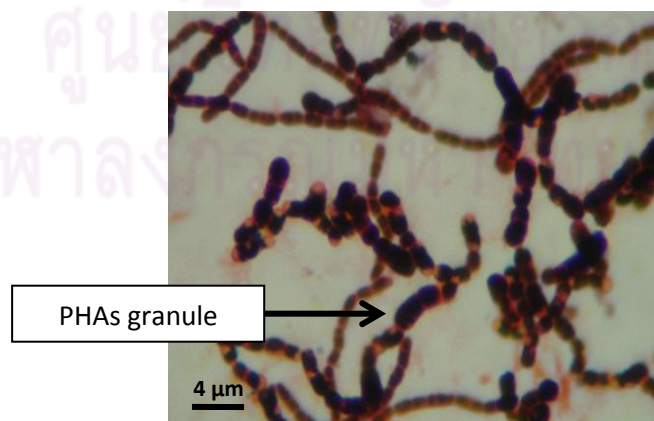




รูปที่ 4.2 ลักษณะการย้อมติดสีแกรมของ *Bacillus* sp. P-12 อายุ 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1,000 เท่า)



รูปที่ 4.3 ลักษณะสปอร์ภายในเซลล์ของ *Bacillus* sp. P-12 ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง เมื่อย้อมเอนโดสปอร์ด้วยสีมาลาไคท์กรีน (กำลังขยาย 1,000 เท่า)



รูปที่ 4.4 ลักษณะแกรนูลที่ย้อมติดสีดำของซูดาน แบลค บี ของ *Bacillus* sp. P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

#### 4.1.2 สมบัติทางชีวเคมี

เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารอาหารได้แตกต่างกัน จึงสามารถนำหลักการนี้มาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ โดยดูการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้น วิธีที่สะดวกในการทดสอบการทำงานในแง่เมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย คือ การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่สารอาหารที่ต้องการจะทดสอบและสารที่เป็นอินดิเคเตอร์ลงไป ผลจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย จะเปลี่ยนสภาพทางเคมีและกายภาพของอาหารที่ใช้เลี้ยง เช่น เกิดกรด-ด่าง เกิดสารบางชนิด เกิดฟองก๊าซหรือทำให้เจลาตินเหลว เป็นต้น

สำหรับการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีในงานวิจัยนี้ ได้ทดสอบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตจำนวน 49 ชนิดและทดสอบความสามารถในการใช้ active ingredients จำนวน 20 ชนิดของ *Bacillus* sp. P-12 ตามระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์เอพีไอ (API system) (Logan และ Berkeley, 1984) ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHB และ API 20 E แสดงผลการทดสอบในตารางที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของชุดทดสอบ API 50 CHB

Characteristics	Reaction	
	24 h	48 h
Control	+	+
Glycerol	+	+
Erythritol	-	-
D-arabinose	-	-
L-arabinose	+	+
D-ribose	+	+
D-xylose	+	+
L-xylose	-	-
D-adonitol	-	-
Methyl-β-D-xylopyranoside	-	-
D-galactose	-	-
D-glucose	+	+
D-fructose	+	+

หมายเหตุ เครื่องหมาย (+) = Positive reaction / เครื่องหมาย (-) = Negative reaction

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของชุดทดสอบ API 50 CHB (ต่อ)

Characteristics	Reaction	
	24 h	48 h
D-mannose	-	-
L-sorbose	-	-
L-rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	-	-
D-mannitol	+	+
D-sorbitol	-	-
Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside	-	-
Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	-	-
N-acetylglucosamine	+	+
Amygdaline	-	-
Arbutine	-	-
Esculine ferric citrate	+	+
Salicine	-	-
D-cellobiose	-	-
D-maltose	+	+
D-lactose (bovine origin)	-	-
D-melibiose	+	+
D-saccharose (sucrose)	+	+
D-trehalose	+	+
Inuline	+	+
D-melezitose	-	-
D-raffinose	+	+
Amidon (starch)	+	+
Glycogen	+	+
Xylitol	-	-

หมายเหตุ เครื่องหมาย (+) = Positive reaction / เครื่องหมาย (-) = Negative reaction

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของชุดทดสอบ API 50 CHB (ต่อ)

Characteristics	Reaction	
	24 h	48 h
Gentiobiose	-	-
D-turanose	+	+
D-lyxose	-	-
D-tagatose	-	-
D-fucose	-	-
D-arabitol	-	-
L-arabitol	-	-
Potassium gluconate	-	-
Potassium 2-ketogluconate	-	-
Potassium 5-ketogluconate	-	-

หมายเหตุ เครื่องหมาย (+) = Positive reaction / เครื่องหมาย (-) = Negative reaction

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของชุดทดสอบ API 20 E

Active ingredients	Result
2-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	-
L-arginine	-
L-lysine	-
L-ornithine	-
Trisodium citrate	-
Sodium thiosulphate	-
Urea	+
L-tryptophane	-
L-tryptophane(Indole production)	-
Sodium pyruvate	-
Gelatin (bovine origin)	+

หมายเหตุ เครื่องหมาย (+) = Positive reaction / เครื่องหมาย (-) = Negative reaction

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของชุดทดสอบ API 20 E (ต่อ)

Active ingredients	Result
D-glucose	+
D-mannitol	-
Inositol	-
D-sorbitol	-
L-rhamnose	-
D-sucrose	+
D-melibiose	-
Amygdlin	-
L-arabinose	-

หมายเหตุ เครื่องหมาย (+) = Positive reaction / เครื่องหมาย (-) = Negative reaction

เมื่อกำหนดให้ (+) สามารถใช้ได้ เจริญได้ หรือเกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ

(-) ไม่สามารถใช้ได้ ไม่เจริญ หรือไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น และผลการวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB และ API 20 E พบว่า ไอโซเลต P-12 จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* และจัดอยู่ในสปีชีส์ *megaterium*

#### 4.1.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. P-12

##### 4.1.3.1 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. P-12 ตามวิธีในข้อ 3.3.4.3 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. P-12 มีความยาว 683 เบส โดยลำดับนิวคลีโอไทด์เรียงจากปลาย 5'-phosphate ไปยัง 3'-OH เป็นดังแสดงในรูปที่ 4.5

BASE	COUNT	182	a	146	c	218	g	137	t
ORIGIN									
1	GTCGAGCGAA	CTGATTAGAA	GCTTGCTTCT	ATGACGTTAG	CGGCGGACGG	GTGAGTAACA			
61	CGTGGGCAAC	CTGCCTGTAA	GACTGGGATA	ACTTCGGGAA	ACCGAAGCTA	ATACCGGATA			



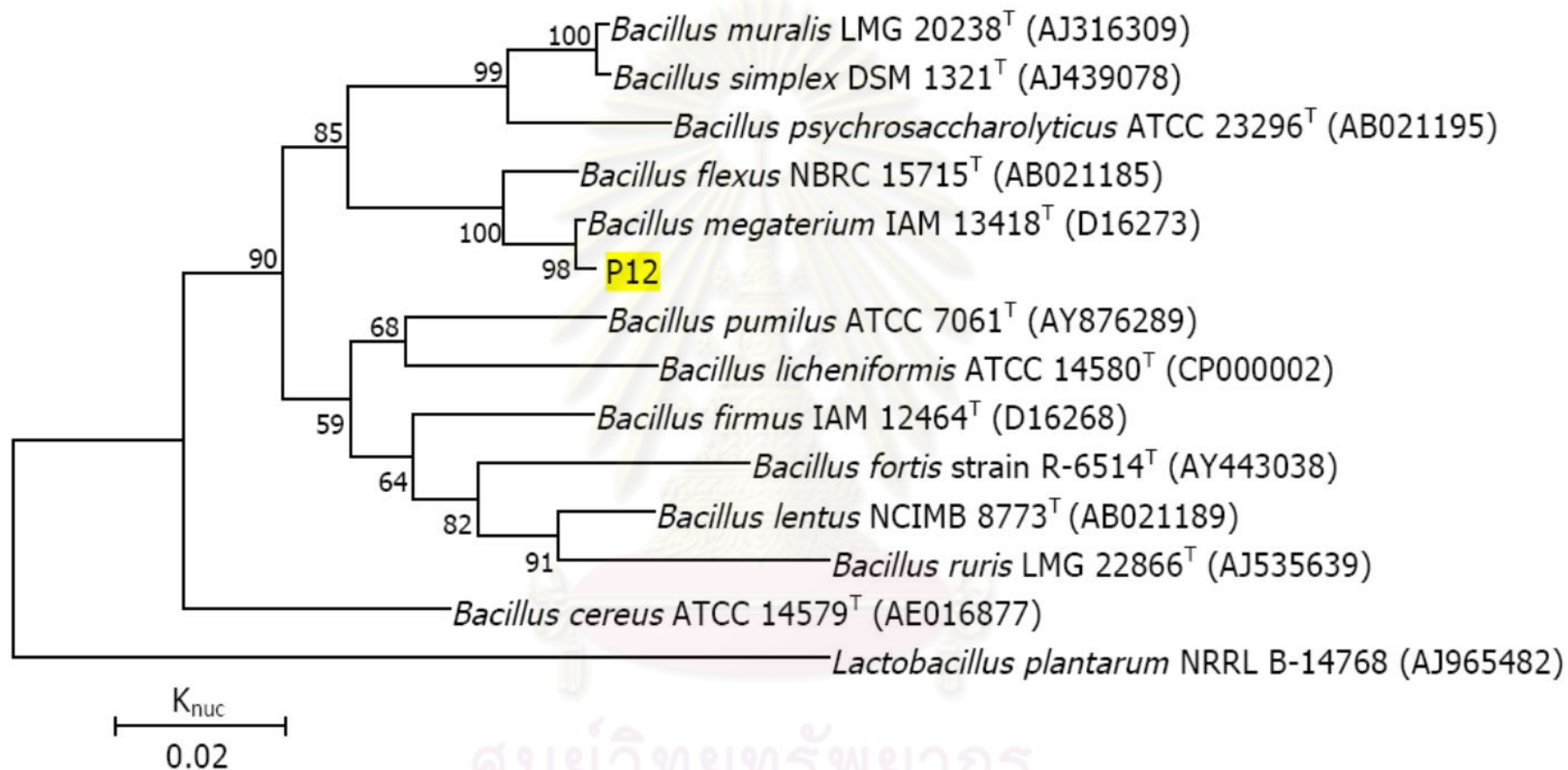
121	GGATCTTCTC	CTTCATGGGA	GATGATTGAA	AGATGGTTTC	GGCTATCACT	TACAGATGGG
181	CCC CGGTGC	ATTAGCTAGT	TGGTGAGGTA	ACGGCTCACC	AAGGCAACGA	TGCATAGCCG
241	ACCTGAGAGG	GTGATCGGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC
301	AGCAGTAGGG	AATCTTCGCG	AATGGACGAA	AGTCTGACGG	AGCAACGCCG	CGTGAGTGAT
361	GAAGGCTTTC	GGGTCGTAAA	ACTCTGTTGT	TAGGGAAGAA	CAAGTACAAG	AGTAACTGCT
421	TGTACCTTGA	CGGTACCCTAA	CCAGAAAGCC	ACGGCTAACT	ACGTGCCAGC	AGCCGCGGTA
481	ATACGTAGGT	GGCAAGCGTT	ATCCGGAATT	ATTGGGCGTA	AAGCGCGCGC	AGGCGGTTTC
541	TTAAGTCTGA	TGTGAAAGCC	CACGGCTCAA	CCGTGGAGG	TCATTGAAA	CTGGGGAACT
601	TGAGTGCAGA	AGAGAAAAGC	GGAATTCCAC	GTGTAGCGGT	GAAATGCGTA	GAAATGTGGA
661	GGAACACTAG	TGGCGAAGGC	GGC			

รูปที่ 4.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. P-12

เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. P-12 กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTn ใน <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. P-12 มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ IAM 13418 ที่รายงานไว้ 680 นิวคลีโอไทด์ คิดเป็น 99.60 % (ภาคผนวก ง) แสดงว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P-12 สามารถจัดจำแนกได้เป็น *Bacillus megaterium* จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *B. megaterium* P-12 ที่คัดแยกได้ใหม่นี้ไปฝาก (deposit) ไว้ใน Genbank ภายใต้อccession number HQ 646058

#### 4.1.3.2 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. P-12 และลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn) มาทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X และนำข้อมูลที่ได้ผ่านการปรับแนวมาสร้างต้นไม้วิวัฒนาการด้วยโปรแกรม PHYLIP software package พบว่า *Bacillus* sp. P-12 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ IAM 13418 ดังแสดงในรูปที่ 4.6



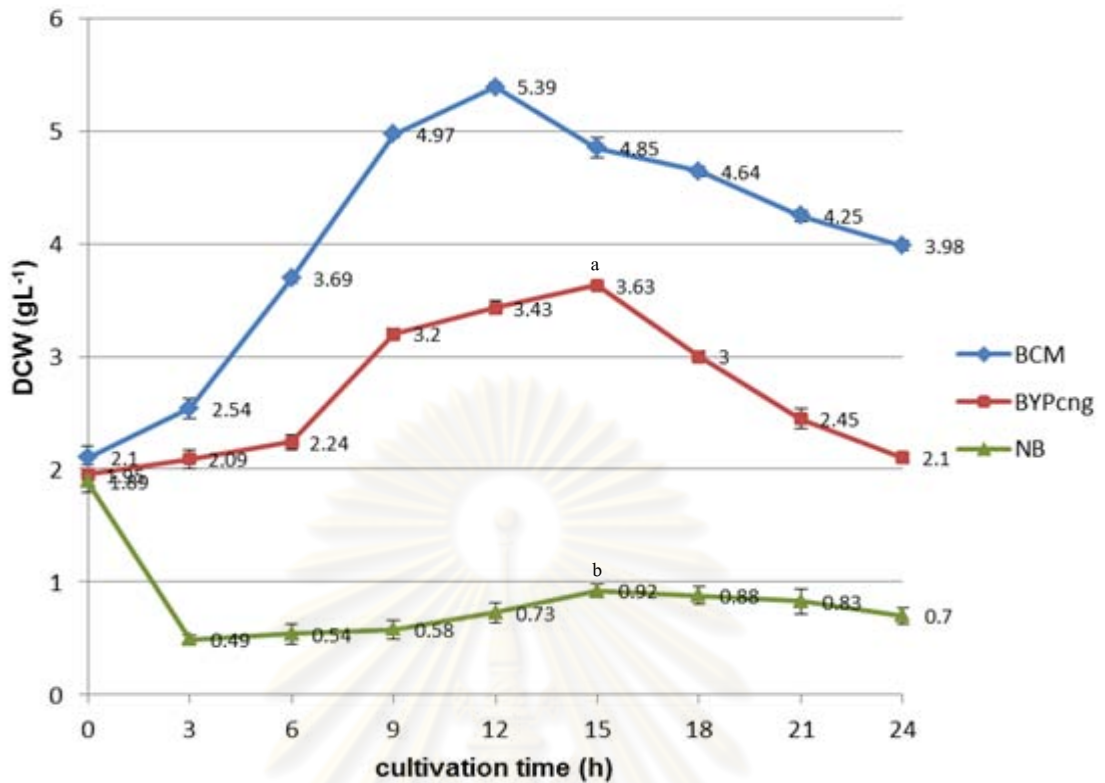
รูปที่ 4.6 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. P-12 (accession number : HQ 646058) โดยใช้ 16S rDNA ของ *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ NRRL B-14768 (AJ965482) เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้งด้วย bootstrap (%)

## 4.2 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อและอายุที่เหมาะสมสำหรับเป็นกล้าเชื้อของ *Bacillus megaterium* P-12

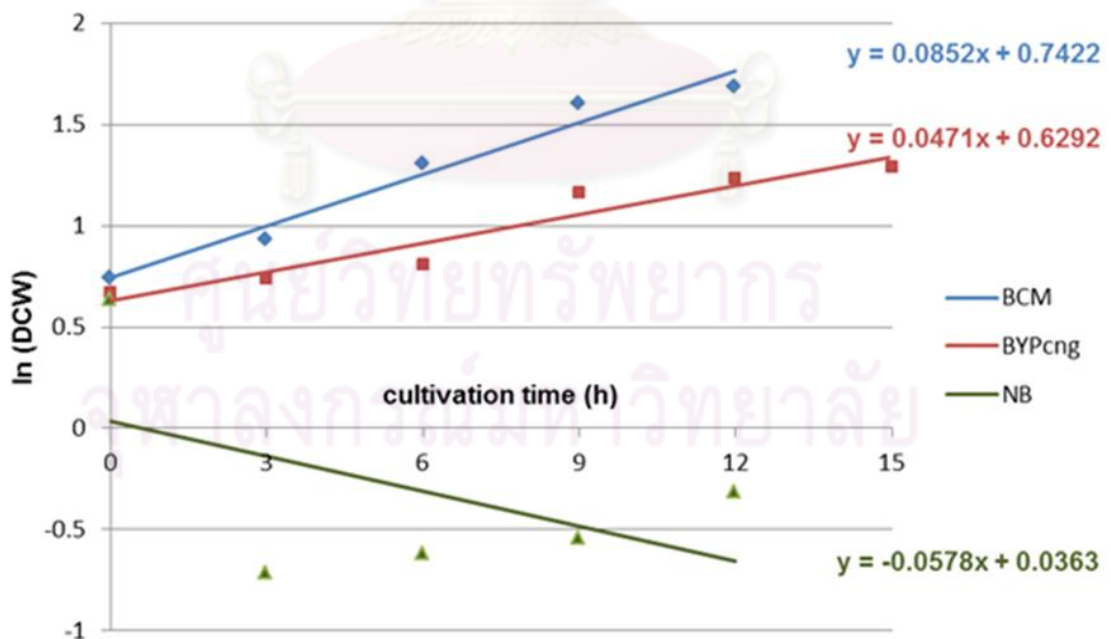
Grothe และคณะ (1999) ; Du และคณะ (2001) ; Rocha และคณะ (2008) ; Keshavarz และ Roy (2010) รายงานว่า การสังเคราะห์และสะสม PHAs ควรเป็นกระบวนการสองขั้นตอน (two-phase process) ขั้นตอนแรก จุลินทรีย์จะมีการเจริญในแหล่งคาร์บอน โดยจุลินทรีย์จะนำสารอาหารนั้นไปสร้างองค์ประกอบของเซลล์และผลิตเซลล์ปริมาณมาก แต่ผลิตพอลิเมอร์ได้ต่ำ เรียกว่าระยะการเจริญของเซลล์ (growth phase) ส่วนในขั้นตอนที่สอง มีการจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือออกซิเจน ขณะที่แหล่งคาร์บอนมากเกินไป เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์และสะสม PHAs เรียกว่า ระยะสะสมผลิตภัณฑ์ (accumulation phase) ซึ่งเซลล์ปริมาณมากที่ได้ในขั้นตอนแรกก็จะใช้สารอาหารนั้นเพื่อนำไปผลิตเป็น PHAs โดยอาจมีการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรืออาจไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้น แต่ขนาดของเซลล์ จะใหญ่ขึ้นเนื่องมาจากการสังเคราะห์และสะสม PHAs ภายในเซลล์ ดังนั้น การผลิตกล้าเชื้อให้ได้ปริมาณมากในขั้นตอนแรก จะส่งผลทำให้ได้ปริมาณ PHAs เพิ่มขึ้น

### 4.2.1 ชนิดของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *B. megaterium* P-12

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของ *B. megaterium* P-12 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกัน ได้แก่ อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM BYPcng และ NB พบว่า *B. megaterium* P-12 เจริญในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM ได้ดีที่สุด เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก ฉ) โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 5.39 กรัมต่อลิตร และ 0.0852 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 1 (ภาคผนวก จ) รูปที่ 4.7 และ 4.8



รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของ *B.megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM BYPcng และ NB (สัญลักษณ์ ab แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ,  $P < 0.05$  : ANOVA เมื่อให้อาหาร BCM เป็นชุดควบคุม)



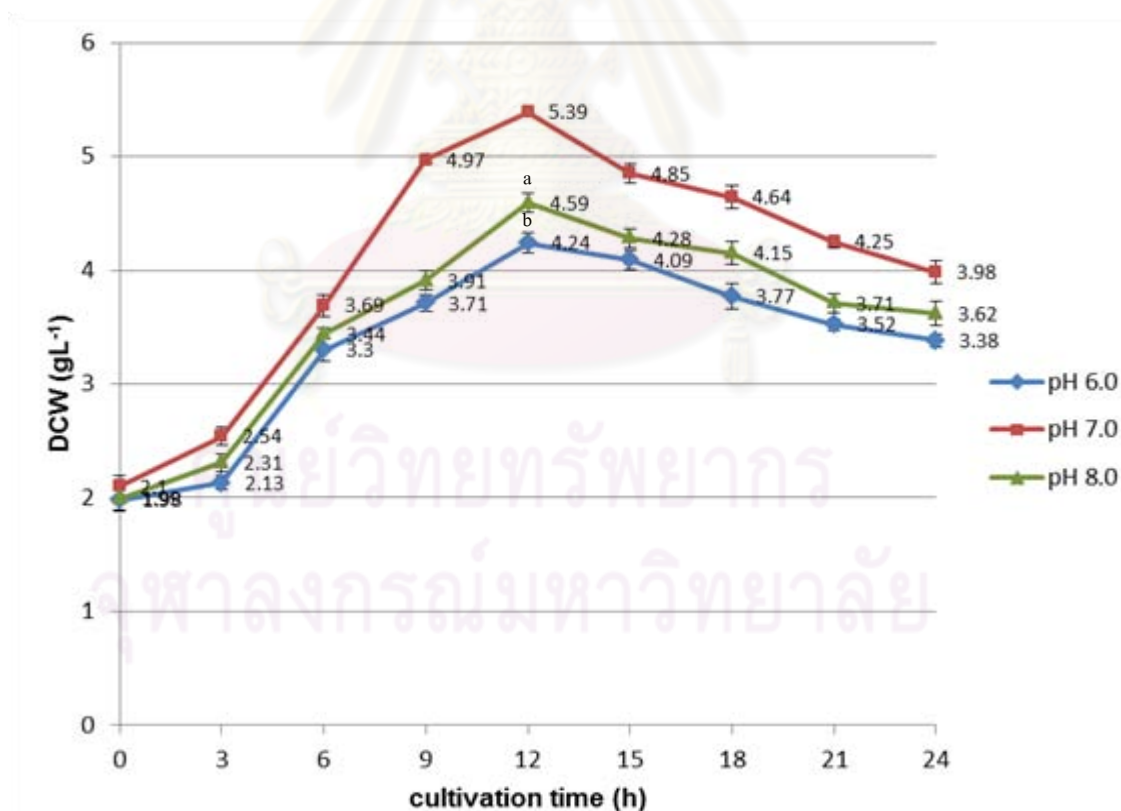
รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะของ *B.megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM BYPcng และ NB

#### 4.2.2 ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงกล้าเชื้อ *B. megaterium* P-12

ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ และอุณหภูมิในการเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสมเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่มีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

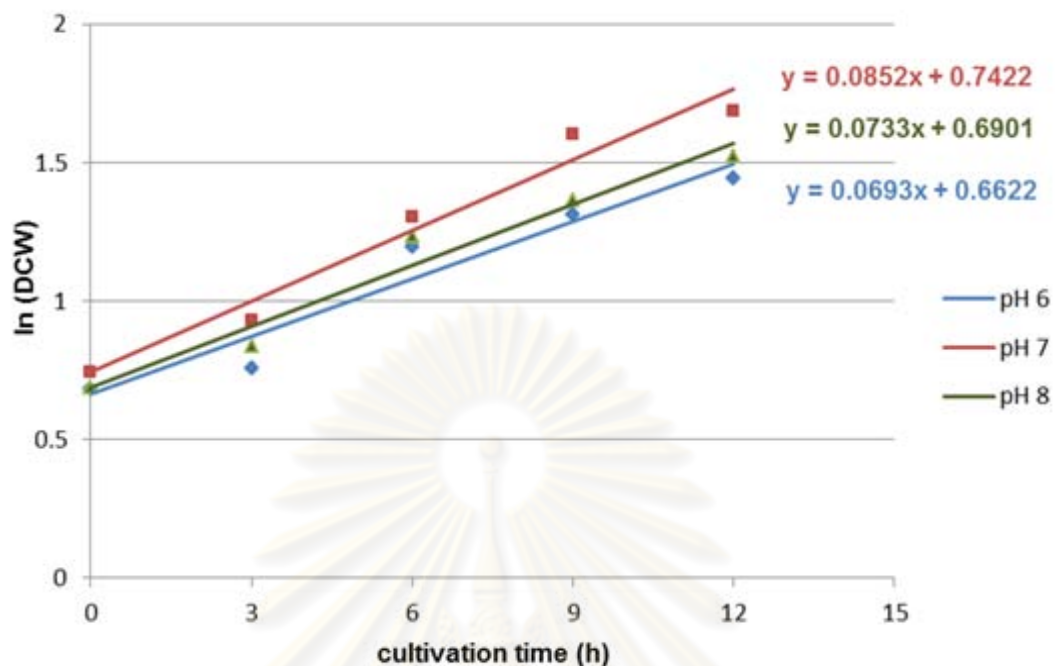
##### 4.2.2.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของ *B. megaterium* P-12 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0 เปรียบเทียบกัน พบว่า *B. megaterium* P-12 เจริญในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ได้ดีที่สุด เนื่องจากมีน้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 และ 8.0 อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก ฉ) โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 5.39 กรัมต่อลิตร และ 0.0852 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 1 (ภาคผนวก จ) รูปที่ 4.9 และ 4.10



รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของ *B. megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0 (สัญลักษณ์ ab แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ,  $P < 0.05$  : ANOVA เมื่อให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหาร BCM เท่ากับ 7.0 เป็นชุดควบคุม)

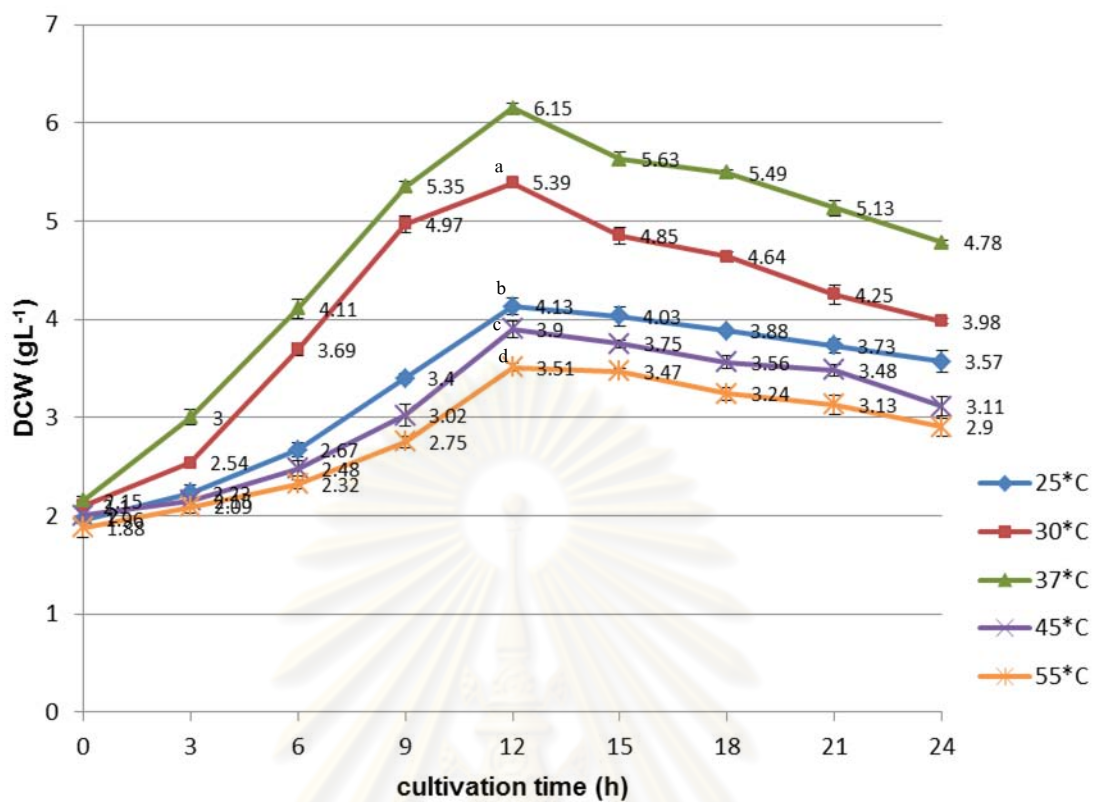




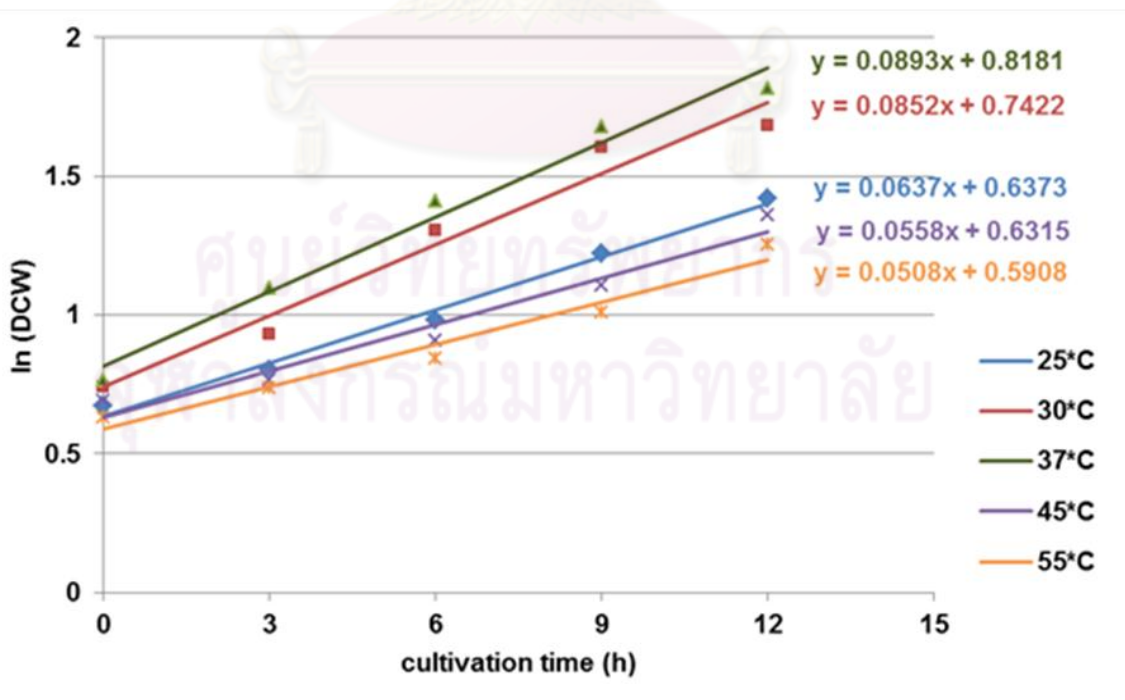
รูปที่ 4.10 เปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะของ *B. megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0

#### 4.2.2.2 อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงกล้าเชื้อ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของ *B. megaterium* P-12 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 25 30 37 45 และ 55 องศาเซลเซียสเปรียบเทียบกัน พบว่า *B. megaterium* P-12 เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ดีที่สุด เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก จ) โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 6.15 กรัมต่อลิตร และ 0.0893 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 1 (ภาคผนวก จ) รูปที่ 4.11 และ 4.12



รูปที่ 4.11 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของ *B. megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิเท่ากับ 25 30 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส (สัญลักษณ์ abcd แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ,  $P < 0.05$  : ANOVA เมื่อ 37 °C เป็นชุดควบคุม)



รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะของ *B. megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิเท่ากับ 25 30 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.3 น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะการเลี้ยงเชื้อต่างกัน ได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อและอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงกล้าเชื้อ

Growth conditions	Maximum DCW (gL <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )**
<b>Seed culture medium</b>		
BCM*	5.39 ± 0.04	0.0852
BYPcng	3.63 ± 0.03	0.0471
NB	0.92 ± 0.06	- 0.0578
<b>Initial pH</b>		
6	4.24 ± 0.09	0.0693
7*	5.39 ± 0.04	0.0852
8	4.59 ± 0.09	0.0733
<b>Incubation temperature (°C)</b>		
25	4.13 ± 0.08	0.0637
30*	5.39 ± 0.04	0.0852
37	6.15 ± 0.05	0.0893
45	3.90 ± 0.09	0.0558
55	3.51 ± 0.04	0.0508

หมายเหตุ (\*): เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM ที่มีค่า pH เริ่มต้น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C

(\*\*): อัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) หาได้จากความชันของกราฟระหว่างการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กับเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อตามสมการ  $\ln X_t - \ln X_0 = \mu t$  (ภาคผนวก ข)

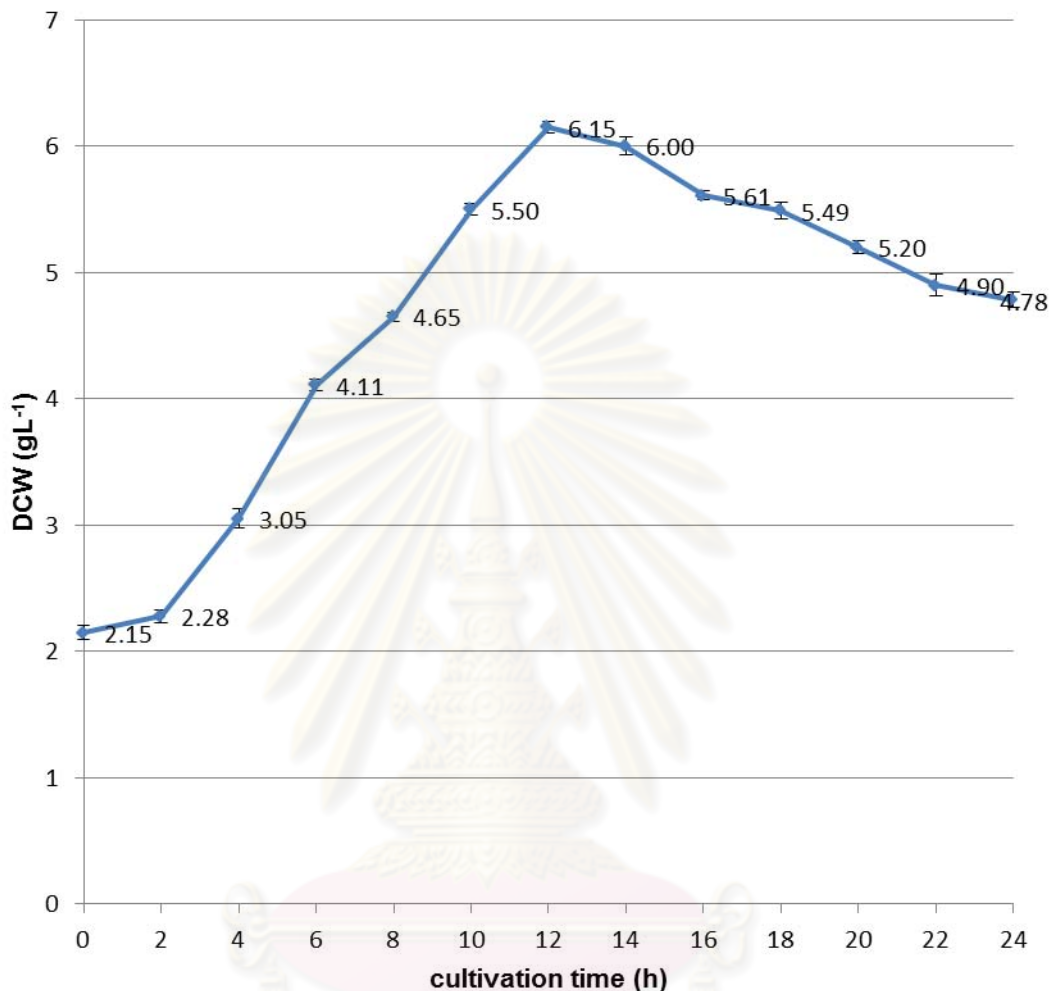
จากข้อมูลในตารางที่ 4.3 สรุปได้ว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ *B. megaterium* P-12 คือ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด

#### 4.2.3 อายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเป็นกล้าเชื้อของ *B. megaterium* P-12

เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อ *B. megaterium* P-12 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งถือเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ และติดตามการเจริญเติบโตของ *B. megaterium* P-12 โดยการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราการเจริญจำเพาะ พบว่า เซลล์อยู่ในระยะพักตัว (lag phase) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจะเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (exponential phase) จนถึงชั่วโมงที่ 12 และเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.15 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อและเริ่มเข้าสู่ระยะลดจำนวน (death phase) ในชั่วโมงที่ 16 สำหรับอัตราการเจริญจำเพาะของ *B. megaterium* P-12 พบว่า สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 โดยมีค่าเท่ากับ 0.108 ต่อชั่วโมง ดังแสดงในตาราง 4.4 และรูปที่ 4.13

ตารางที่ 4.4 น้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราการเจริญจำเพาะของ *B. megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Time (h)	DCW (gL <sup>-1</sup> )	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	2.15 ± 0.06	0
2	2.20 ± 0.05	0.029
4	3.05 ± 0.08	0.087
6	4.11 ± 0.05	<b>0.108</b>
8	4.80 ± 0.04	0.096
10	5.84 ± 0.05	0.094
12	<b>6.15 ± 0.04</b>	0.089
14	6.00 ± 0.07	0.073
16	5.61 ± 0.04	0.060
18	5.49 ± 0.07	0.052
20	5.20 ± 0.05	0.044
22	4.90 ± 0.08	0.037
24	4.78 ± 0.06	0.033



รูปที่ 4.13 การเจริญเติบโตของ *B. megaterium* P-12 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้น จึงเลือกกล้าเชื้อที่มีอายุ 6 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในงานวิจัยสำหรับการผลิตโพลิเมอร์ P(3HB) และ โพลิเมอร์ PHBV ในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.108 ต่อชั่วโมง



#### 4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการเจริญ การผลิตโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV

##### 4.3.1 ผลของชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB (3HB-generating carbon source)

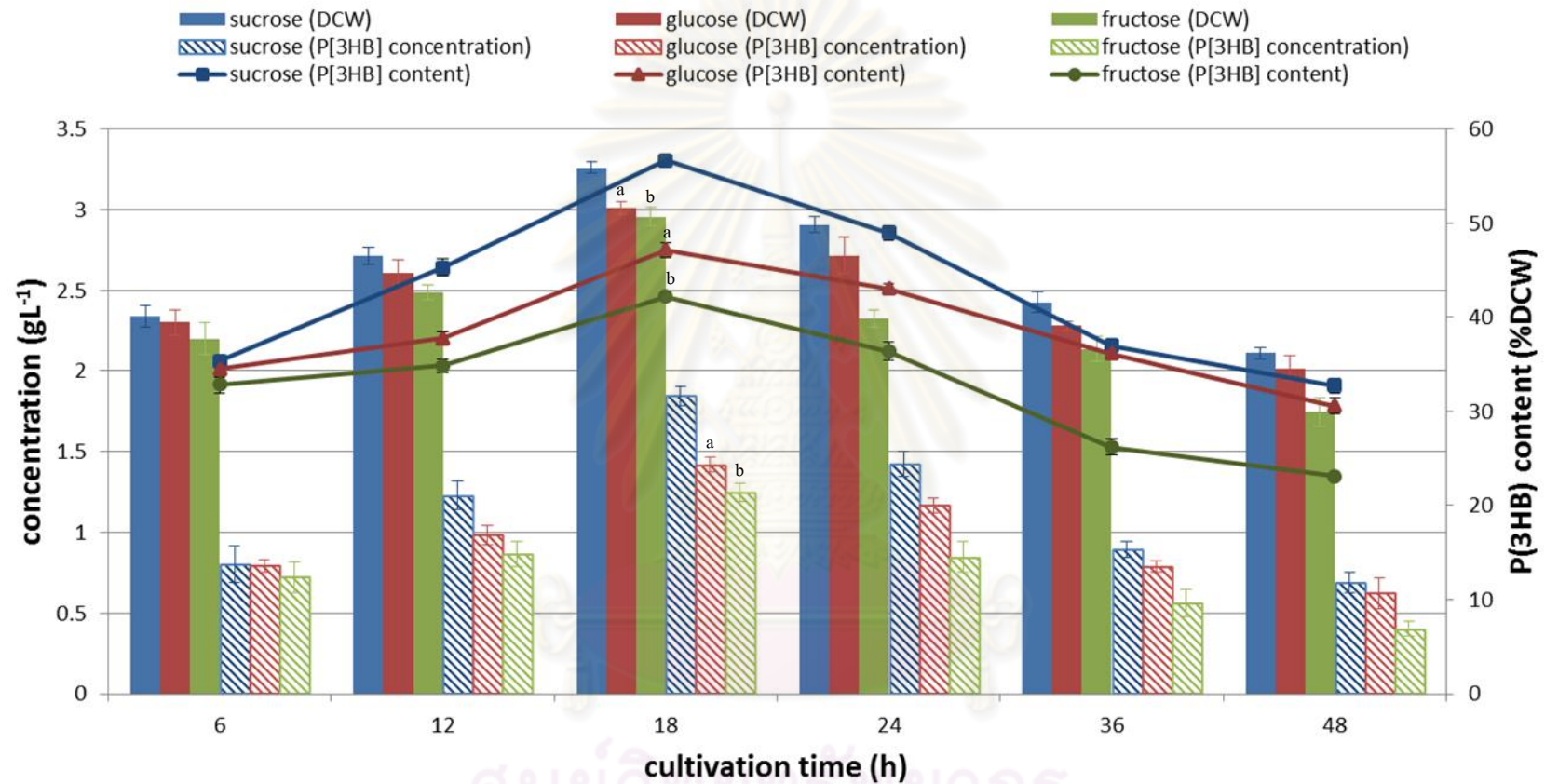
แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการผลิต PHAs โดยกระบวนการสังเคราะห์และสะสม PHAs จะเพิ่มสูงขึ้นหลังจากแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุด และภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล กล่าวคือ เมื่อมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป แต่มีการจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน โฟสเฟต เชื้อแมกนีเซียม หรือ ฟอสฟอรัส เป็นต้น (Salehizadeh และ Loosdrecht, 2004)

ในธรรมชาติ มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้และใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน โดยแหล่งคาร์บอนที่สำคัญที่แบคทีเรียนำมาใช้สังเคราะห์ PHAs มีหลายชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรักโตส ซูโครส กรดซิตริก อะซิเตท โพรพิโอเนต บิวทิเรต วาเลอเรต แลคเตท เป็นต้น คาร์บอนแต่ละชนิดที่ใช้มีผลต่อองค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ ดังนั้น การศึกษาถึงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จะทำให้การผลิตพอลิเมอร์เกิดได้ดีขึ้น (Ganzeveld และคณะ, 1999)

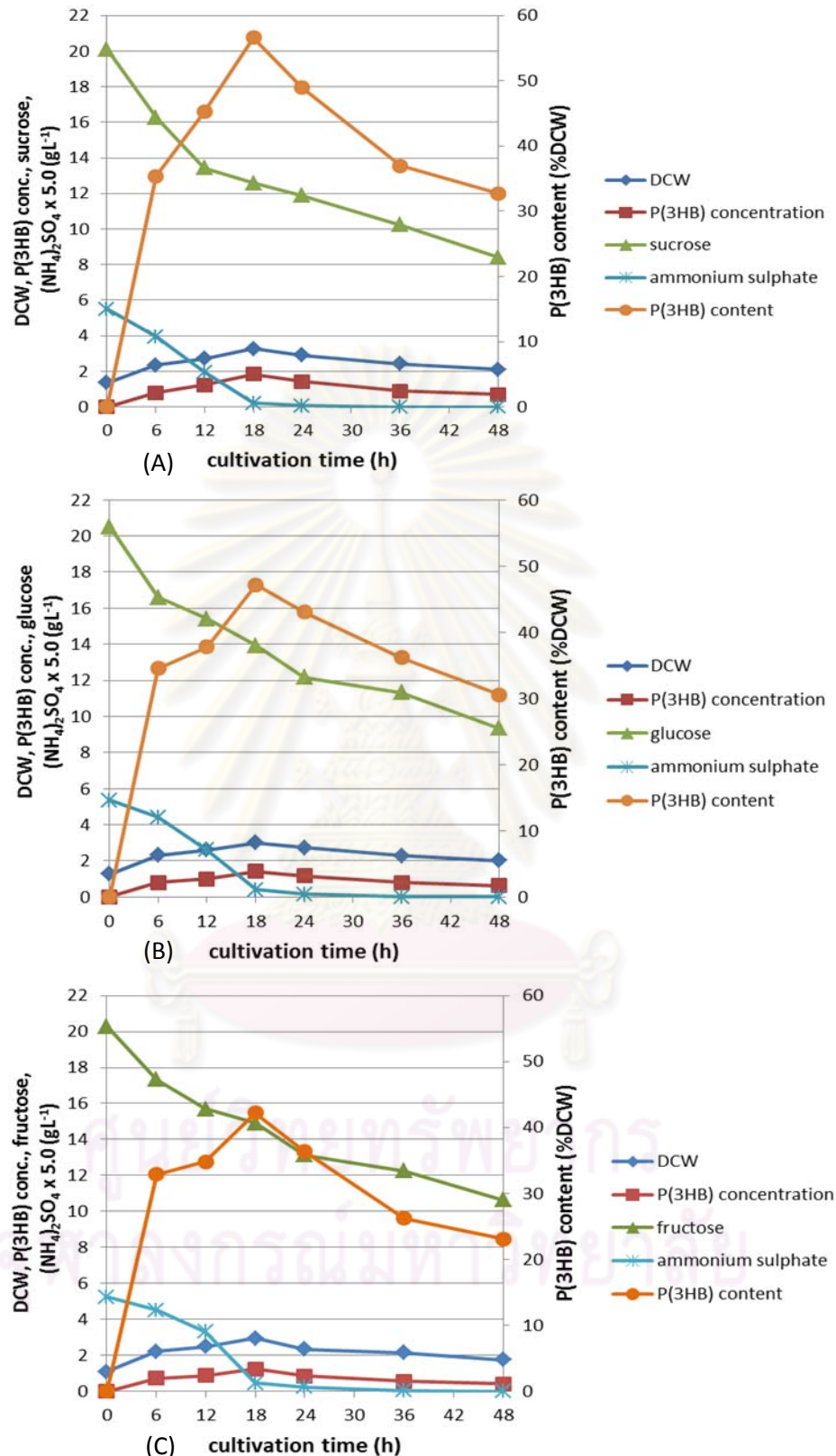
##### 4.3.1.1 ผลของชนิดแหล่งคาร์บอน

###### (1) แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลบางชนิด

ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB ที่เป็นน้ำตาลบางชนิด ได้แก่ ซูโครส กลูโคส และฟรักโตส ที่มีต่อการเจริญและสังเคราะห์ P(3HB) ของ *B. megaterium* P-12 เนื่องจากจุลินทรีย์โดยทั่วไป สามารถเจริญในน้ำตาลเหล่านี้ได้เกือบทุกชนิด และยังเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำได้ง่าย (Champagne และ Li, 2009) เพื่อเป็นแนวทางในการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาไม่แพงมาทดแทน จากการศึกษา พบว่า *B. megaterium* P-12 สามารถใช้ซูโครสในการเจริญเติบโต ผลิตและสะสม P(3HB) ได้ดีที่สุดในเมื่อเทียบกับกลูโคสและฟรักโตสที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตรเท่ากัน เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก ฉ) โดยมีค่าเท่ากับ 3.26 กรัมต่อลิตร 1.85 กรัมต่อลิตร และ 56.64 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 2 (ภาคผนวก จ) รูปที่ 4.14 และ 4.15

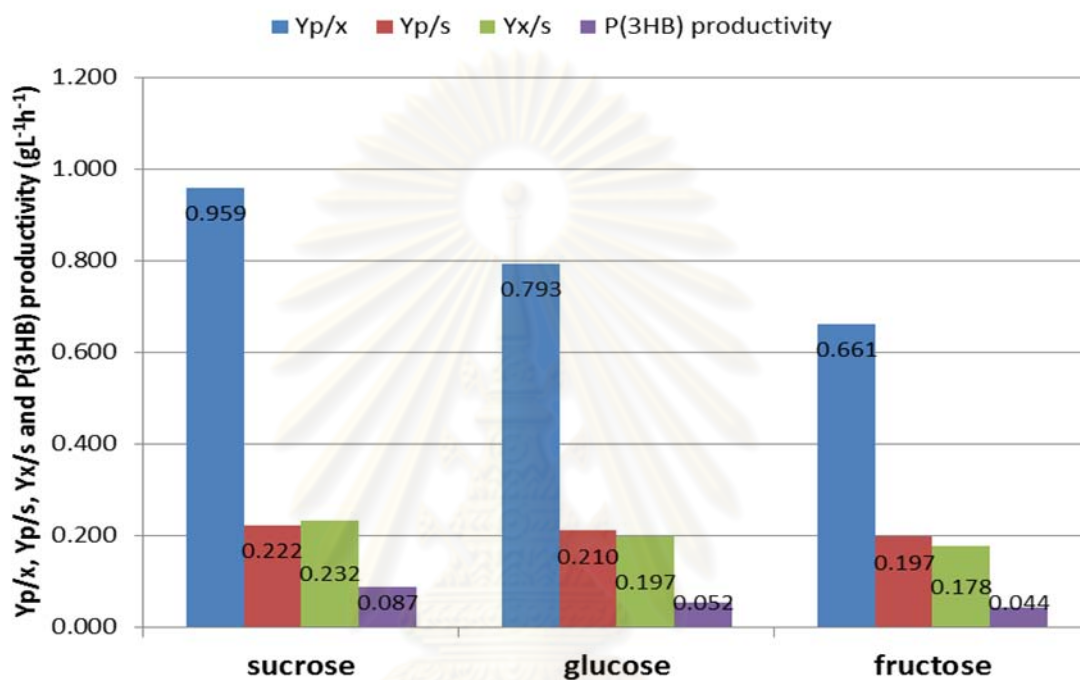


รูปที่ 4.14 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีซูโครส กลูโคส และฟรักโทส ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB (สัญลักษณ์ ab แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test เมื่อกำหนดให้ซูโครส เป็นชุดควบคุม)



รูปที่ 4.15 (A-C) น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีซูโครส กลูโคส และฟรักโตสที่มีความเข้มข้น 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB ตามลำดับ

เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีซูโครส 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HB พบว่า ได้ค่าอัตราการผลิต P(3HB)  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  สูงสุด เท่ากับ 0.087 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.959 0.222 และ 0.232 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในกลูโคส และฟรุกโตส ดังแสดงในรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต P(3HB)  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ

จากการที่ *B. megaterium* P-12 สามารถใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตโมโนเมอร์ 3HB ในการเจริญ ผลิตและสะสมพอลิเมอร์ P(3HB) ได้ดีที่สุด จึงเป็นแนวทางในการนำแหล่งคาร์บอนที่มีราคาไม่แพงจากอ้อยมาใช้ทดแทนซูโครส เพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิต PHAs ต่อหน่วยให้ต่ำลง ซึ่งจะทำให้สามารถแข่งขันกับพอลิเมอร์สังเคราะห์อื่นๆ ได้

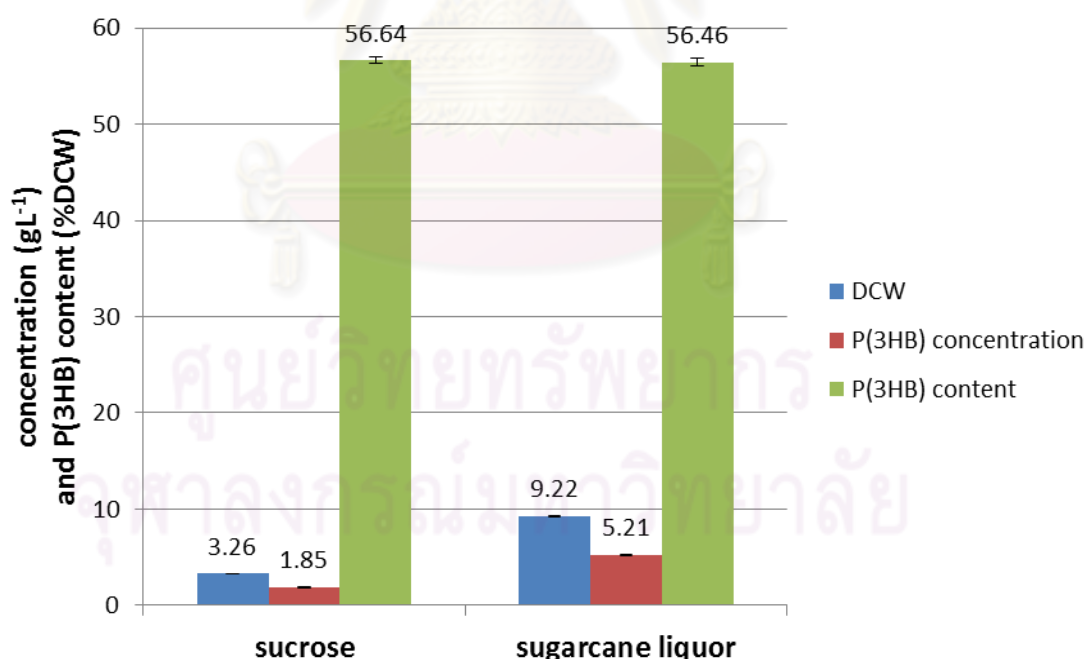
## (2) แหล่งคาร์บอนที่มีราคาไม่แพง

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิต P(3HB) แทนซูโครส เนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกมากในประเทศไทยและเป็นพืชที่สามารถตัดและเก็บเกี่ยวได้หลายครั้ง โดยในกระบวนการการผลิตน้ำตาลทราย จะใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบหลักและมีน้ำอ้อยเกิดขึ้นหลายขั้นตอน ซึ่งในน้ำอ้อยจะประกอบไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์อยู่หลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่างๆ โดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบ



หลักเฉลี่ยประมาณ 95.39 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสเฉลี่ยประมาณ 4.27 เปอร์เซ็นต์ และฟรักโทสเฉลี่ยประมาณ 0.84 เปอร์เซ็นต์ (วิเคราะห์โดย HPLC ภาคผนวก ค และภาคผนวก ง) รวมทั้งมีวิตามินและธาตุอาหารเป็นจำนวนมาก (มิตรผลวิจัย, 2551) จึงสามารถนำมาใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อทดแทนการใช้ซูโครสได้

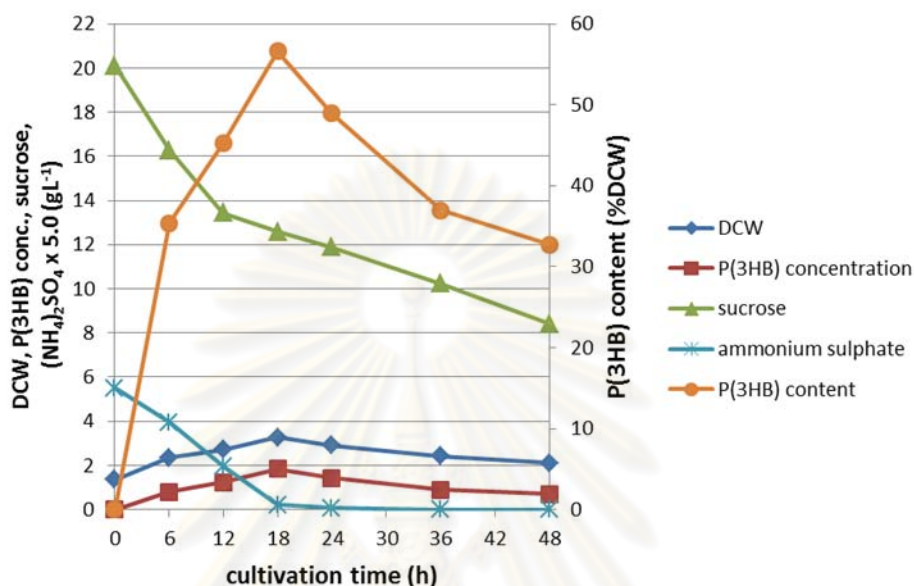
เมื่อใช้ซูโครสกับน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตรเท่ากัน เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโคโนเมอร์ 3HB พบว่า *B. megaterium* P-12 ที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถเจริญและผลิต P(3HB) ได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในซูโครสอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก ฉ) โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 9.22 กรัมต่อลิตร และ 5.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ขณะที่ปริมาณ P(3HB) ใกล้เคียงกับเมื่อเลี้ยงในซูโครส คือมีค่าเท่ากับ 56.46 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง กล่าวคือ ปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ไม่ว่าจะใช้ซูโครสหรือน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P > 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก ฉ) ดังแสดงในตารางที่ 3 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.17



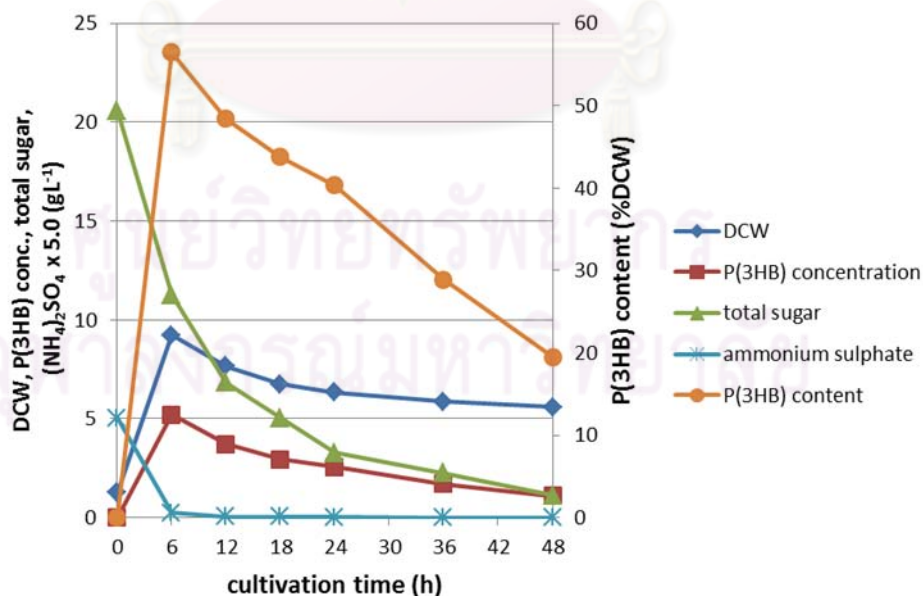
รูปที่ 4.17 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) สูงสุดเมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีซูโครสและน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตรเท่ากันเป็นสารตั้งต้นของโคโนเมอร์ 3HB (สัญลักษณ์ ab แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test)



สำหรับความสามารถในการเจริญ ผลิตและสะสม P(3HB) ของ *B.megaterium* P-12 เมื่อใช้ซูโครสและน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตรเท่ากันเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงในตารางที่ 3 (ภาคผนวก จ) รูปที่ 4.18 และ 4.19 ตามลำดับ

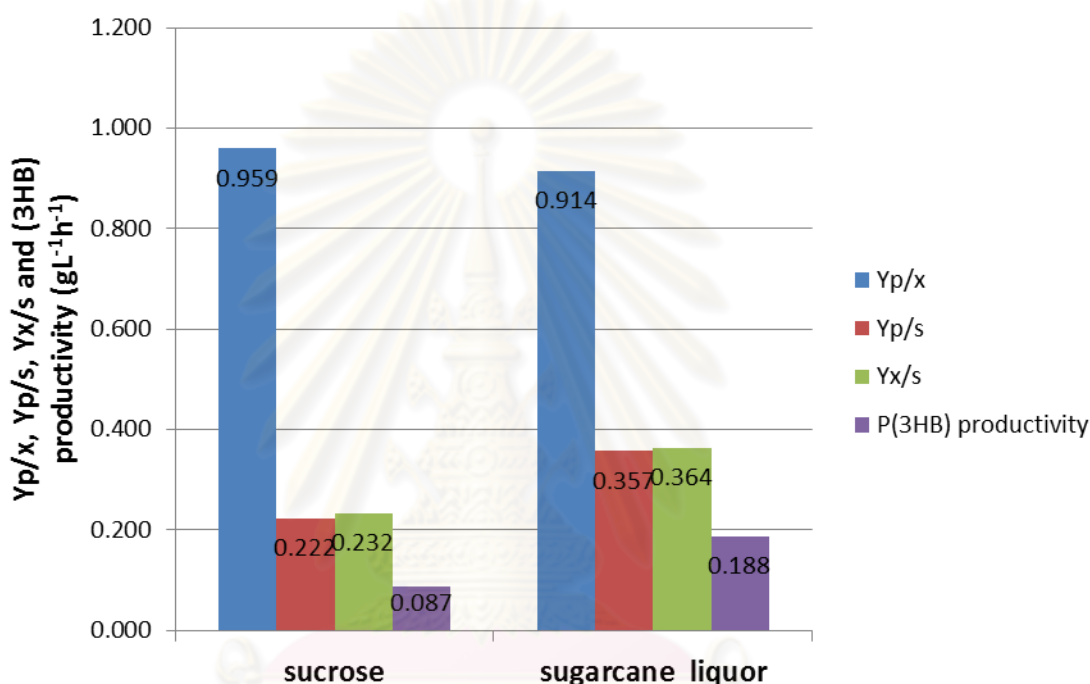


รูปที่ 4.18 นำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีซูโครส 20.0 กรัมต่อลิตร เป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB



รูปที่ 4.19 นำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB

ค่าอัตราการผลิต  $Y_p/s$  และ  $Y_x/s$  มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.188 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.357 และ 0.364 ตามลำดับ เมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HB แต่ให้ค่า  $Y_p/x$  ต่ำกว่าเมื่อใช้ซูโครส คือมีค่าเท่ากับ 0.914 ทั้งนี้เนื่องมาจากที่ปริมาณ P(3HB) ใกล้เคียงกัน เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* P-12 ในน้ำอ้อย จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในซูโครส ดังแสดงในรูปที่ 4.20



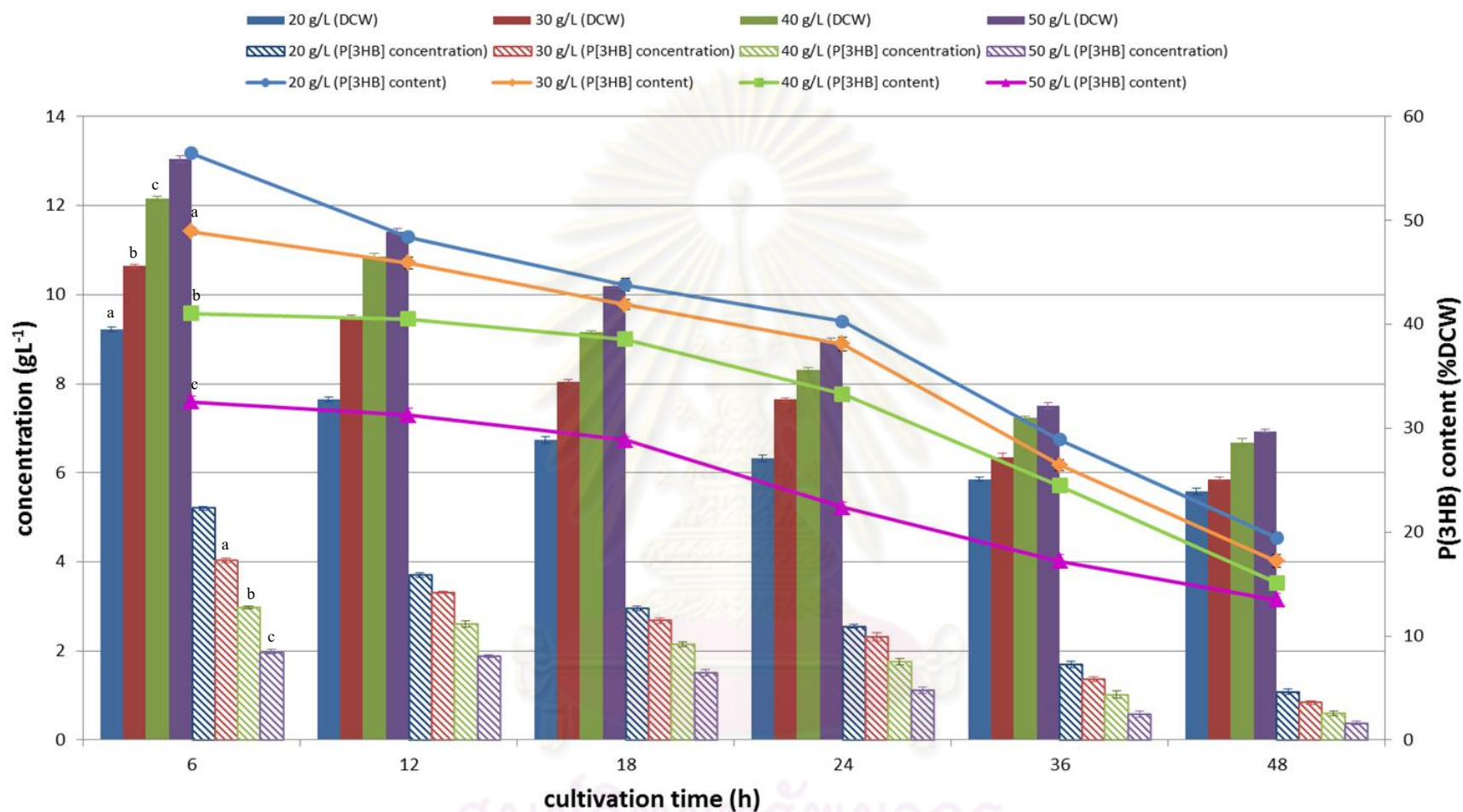
รูปที่ 4.20 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต P(3HB)  $Y_p/x$   $Y_p/s$  และ  $Y_x/s$  เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB เป็นน้ำตาลซูโครส 20.0 กรัมต่อลิตรเทียบกับน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 20.0 กรัมต่อลิตรเท่ากัน

จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB เป็นน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 20.0 กรัมต่อลิตร จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่าเมื่อเลี้ยงในซูโครสมากถึง 3 เท่า และมีค่าอัตราการผลิตสูงกว่าถึง 2 เท่า เนื่องจาก *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญ ผลิตและสะสม P(3HB) ได้สูงสุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า น้ำอ้อยเหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตสารตั้งต้นสำหรับโมโนเมอร์ 3HB ในขั้นตอนต่อไป

#### 4.3.1.2 ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอน

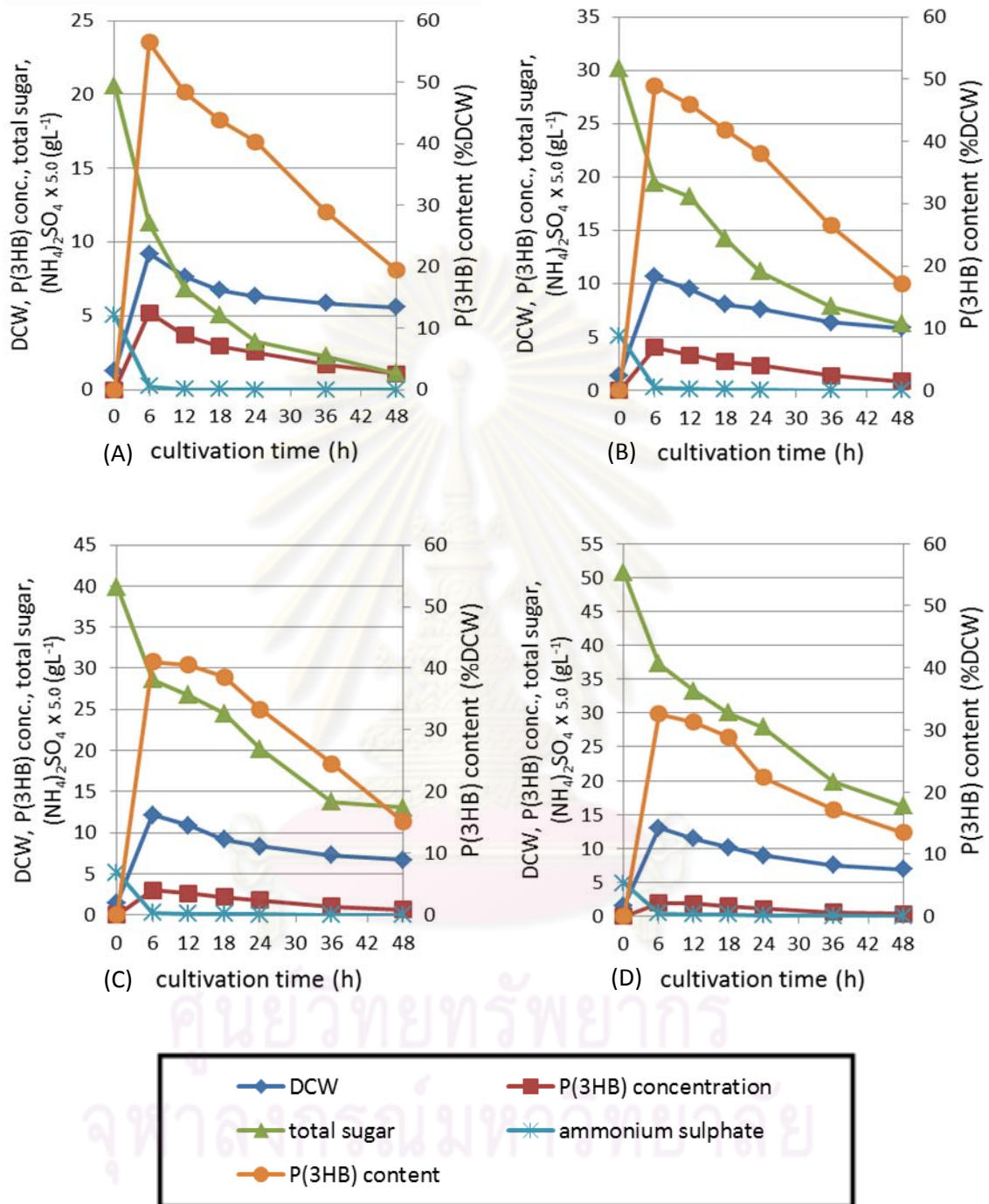
ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HB เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิต PHAs เนื่องจากโดยทั่วไป จุลินทรีย์จะสามารถมีชีวิตรอดอยู่ในแหล่งคาร์บอน ณ ความเข้มข้นที่เหมาะสมค่าหนึ่งเท่านั้น (critical concentration) (Lin และคณะ, 2008) ดังนั้น จึงต้องหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HB ที่เหมาะสมเพื่อให้ *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญ ผลิตและสะสมพอลิเมอร์ได้สูงสุด

ผลการศึกษา พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำอ้อยให้สูงขึ้น *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น แต่สังเคราะห์และสะสมไฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) ได้น้อยลง โดยเชื้อเจริญได้ดีที่สุดในอาหาร MSM ซึ่งมีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 13.05 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก ฉ) ขณะที่ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) สูงสุดเมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 5.21 กรัมต่อลิตร และ 56.46 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก ฉ) ดังแสดงในตาราง ที่ 4 (ภาคผนวก จ) รูปที่ 4.21 และ 4.22



รูปที่ 4.21 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 30.0 40.0 และ 50.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB (สัญลักษณ์ abc แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test) เมื่อกำหนดให้น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นชุดควบคุม \*ยกเว้นในกรณีน้ำหนักเซลล์แห้ง กำหนดให้น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50.0 กรัมต่อลิตรเป็นชุดควบคุม

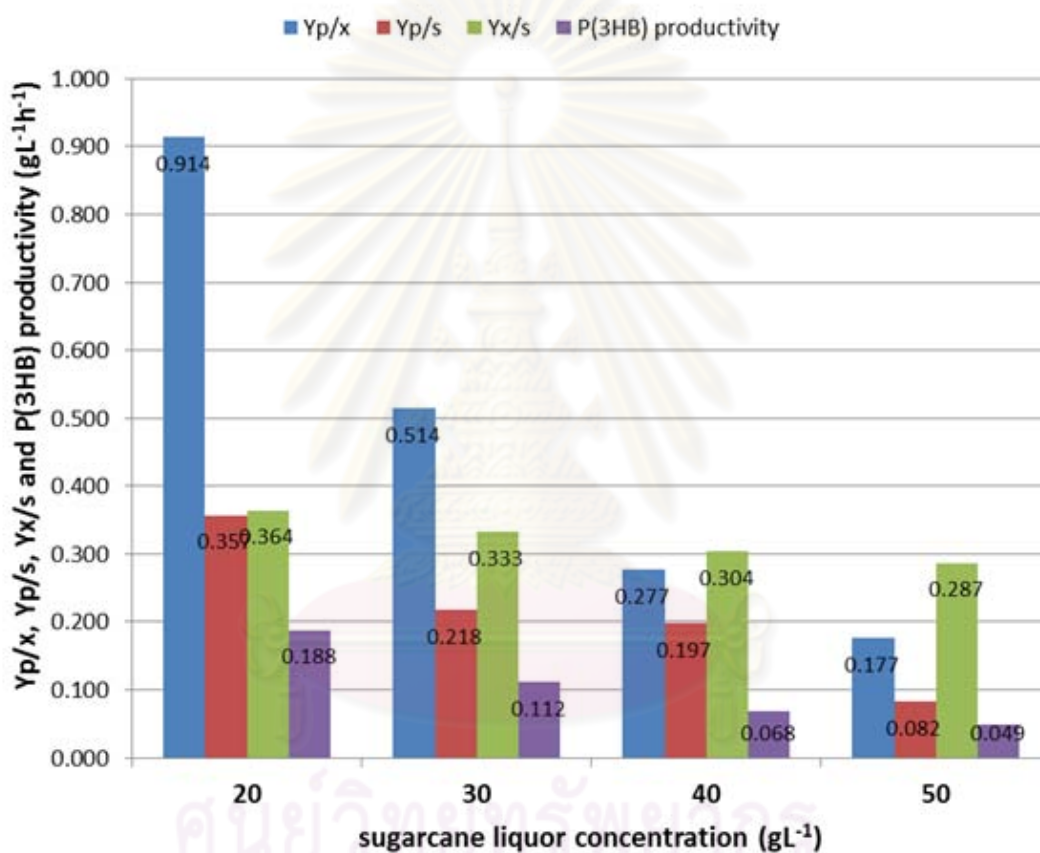




รูปที่ 4.22 (A-D) น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 30.0 40.0 และ 50.0 กรัมต่อลิตร เป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB ตามลำดับ



เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB พบว่า ได้ค่าอัตราการผลิต P(3HB)  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  สูงสุดเท่ากับ 0.188 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.914 0.359 และ 0.364 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30.0 40.0 และ 50.0 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.23 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต P(3HB)  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 30.0 40.0 และ 50.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB

ดังนั้น จึงเลือกใช้น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HB ในขั้นตอนต่อไป เนื่องจาก *B. megaterium* P-12 สามารถผลิตและสะสม P(3HB) ได้สูงสุดที่ความเข้มข้นนี้

โดยทั่วไป จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมโพลิเมอร์ P(3HB) ได้ในปริมาณสูงมักมีแนวโน้มที่จะสามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้ปริมาณสูงเช่นกัน (Haywood และคณะ, 1989 ; Ramsay และคณะ, 1990) ซึ่งจากผลการทดลองที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่า *B. megaterium* P-12 ที่คัดแยกได้ใหม่นี้ สามารถผลิตและสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณสูง โดยมีความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 5.21 กรัมต่อลิตรและ 56.46 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM ซึ่งมีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน จึงคาดว่า *B. megaterium* P-12 น่าจะมีความสามารถในการผลิตและสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ได้ในปริมาณสูงเช่นเดียวกัน

สำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV สามารถทำได้โดยการเติมโคสับสเตรตที่เหมาะสมที่จะใช้ผลิตเป็นสารตั้งต้นของโพลิเมอร์ 3HV (3HV cosubstrate) ลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้เพื่อผลิตเป็นโพลิเมอร์ 3HV ที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ ได้แก่ กรดอินทรีย์หรือเกลือของกรดอินทรีย์ เช่น กรดวาเลอริกหรือเกลือโซเดียมวาเลอเรต กรดโพรพิโอนิกหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต เป็นต้น (Ramsay และคณะ, 1990 ; Ganzeveld และคณะ, 1999)

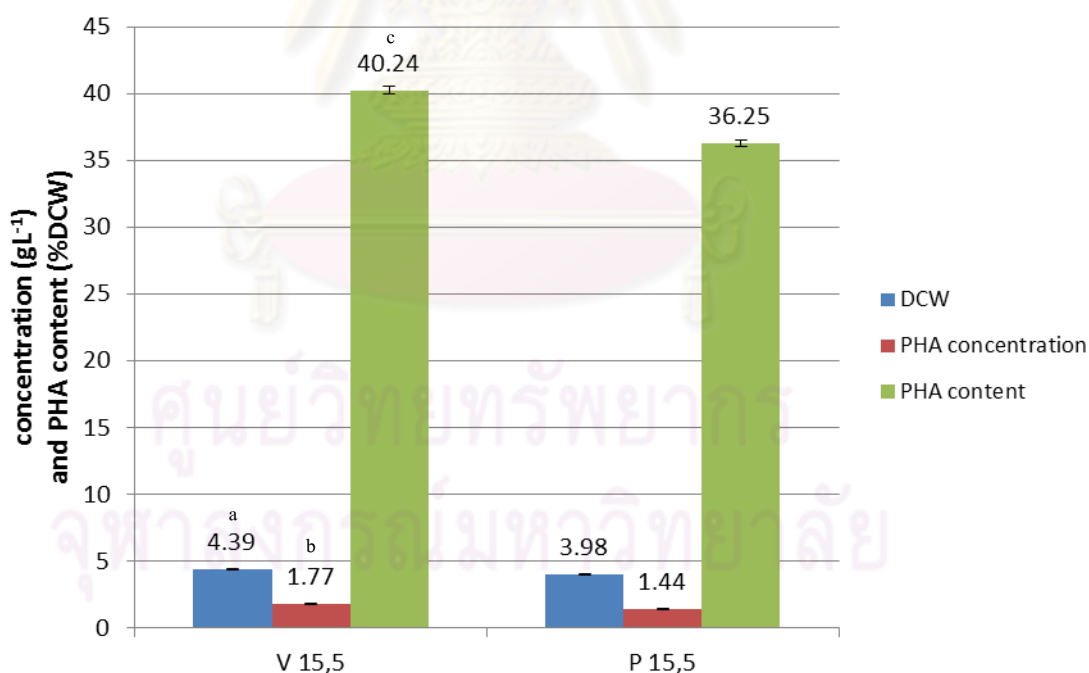
โดยในงานวิจัยนี้ ได้เลือกใช้เกลือโซเดียมวาเลอเรตและเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตเป็นโพลิเมอร์ 3HV (3HV-generating carbon source) เนื่องจากแหล่งคาร์บอนในรูปเกลือของกรดอินทรีย์มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าในรูปกรด Loo และ Sudesh (2007b) พบว่า สารประกอบในรูปเกลือของกรดอินทรีย์จะช่วยลดการเกิดโปรตอนอิสระ ( $\text{free H}^+$ ) ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ ทำให้ไม่มีการสะสมของกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงช่วยให้รักษาระดับค่าความเป็นกรด-ด่างได้

#### 4.3.2 ผลของชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนผสมเพื่อผลิตเป็นโคพอลิเมอร์ PHBV

ศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จากแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นของโพลิเมอร์ 3HB กับเกลือโซเดียมวาเลอเรตหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของโพลิเมอร์ 3HV โดยกำหนดให้แหล่งคาร์บอนผสมมีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตร เนื่องจากจากผลการทดลองก่อนหน้า พบว่า ที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) สูงสุด ดังนั้น จึงแปรอัตราส่วนระหว่างสารตั้งต้นของโพลิเมอร์ 3HB ต่อสารตั้งต้นของโพลิเมอร์ 3HV เท่ากับ 15:5 10:10 และ 5:15 กรัมต่อลิตรต่อกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพื่อเปรียบเทียบการเจริญ การผลิตและสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ของ *B. megaterium* P-12

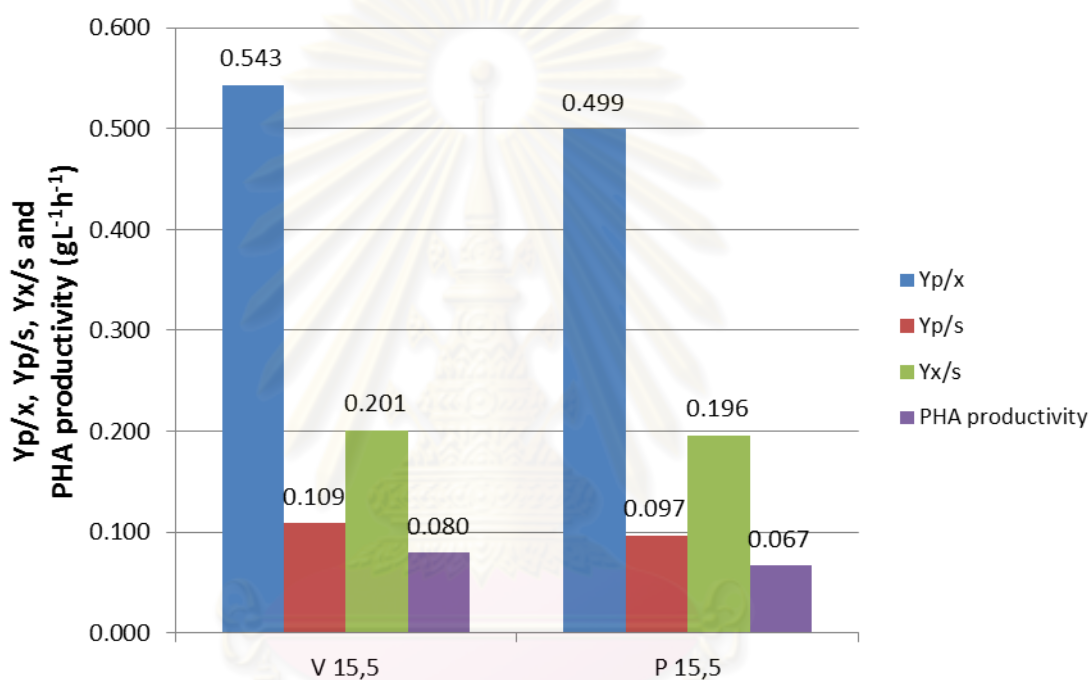
4.3.2.1 อัตราส่วนระหว่างสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB ต่อสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 15.0 กรัมต่อลิตรต่อ 5.0 กรัมต่อลิตร

เปรียบเทียบการเจริญ ผลิตและสะสม โพลิเมอร์ PHBV ของเชื้อ *B. megaterium* P-12 ระหว่างการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 15.0 กรัมต่อลิตร กับเกลือโซเดียมวาเลอเรต 5.0 กรัมต่อลิตร (V15,5) กับแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 15.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 5.0 กรัมต่อลิตร (P15,5) พบว่า *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญ ผลิตและสะสม PHBV เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ได้ดีกว่า เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ PHBV และปริมาณพอลิเมอร์ PHBV สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก จ) โดยมีค่าเท่ากับ 4.39 กรัมต่อลิตร 1.77 กรัมต่อลิตร และ 40.24 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 5 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.24



รูปที่ 4.24 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของและปริมาณ PHBV สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 15.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือ โซเดียมวาเลอเรตหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 5.0 กรัมต่อลิตร (สัญลักษณ์ abc แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test)

เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 15.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรต 5.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโพลิเมอร์ PHBV มีค่าอัตราการผลิต PHBV  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เท่ากับ 0.080 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.543 0.109 และ 0.201 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 15.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 5.0 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.25

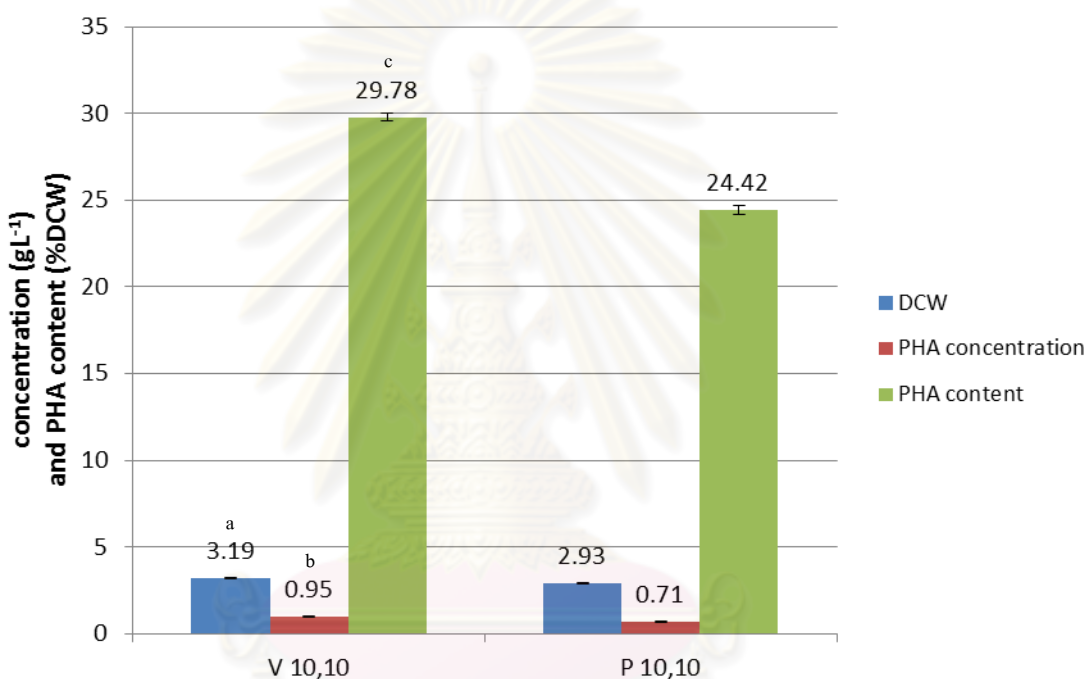


รูปที่ 4.25 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต PHBV  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 15.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 5.0 กรัมต่อลิตร

4.3.2.2 อัตราส่วนระหว่างสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB ต่อสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 10.0 กรัมต่อลิตรต่อ 10.0 กรัมต่อลิตร

เปรียบเทียบการเจริญ ผลิตและสะสมโพลิเมอร์ PHBV ของเชื้อ *B. megaterium* P-12 ระหว่างการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตร (V10,10) กับแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 10.0 กรัมต่อลิตร (P10,10) พบว่า *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญ ผลิตและสะสม PHBV เมื่อใช้แหล่ง

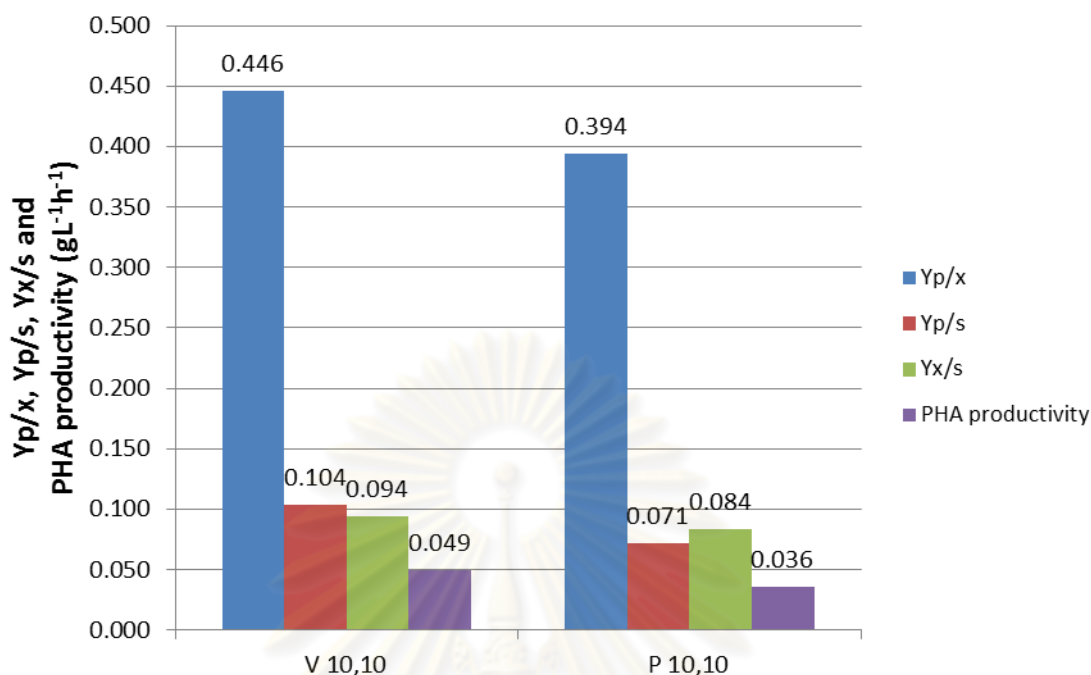
คาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือ โซเดียมวาเลอเรตเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ได้ดีกว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ PHBV และปริมาณพอลิเมอร์ PHBV สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก จ) โดยมีค่าเท่ากับ 3.19 กรัมต่อลิตร 0.95 กรัมต่อลิตร และ 29.78 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 6 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.26



รูปที่ 4.26 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของและปริมาณ PHBV สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* P-12 ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือ โซเดียมวาเลอเรตหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 10.0 กรัมต่อลิตร (สัญลักษณ์ abc แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test)

เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโคพอลิเมอร์ PHBV มีค่าอัตราการผลิต PHBV  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เท่ากับ 0.049 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.446 0.104 และ 0.094 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 10.0 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.27

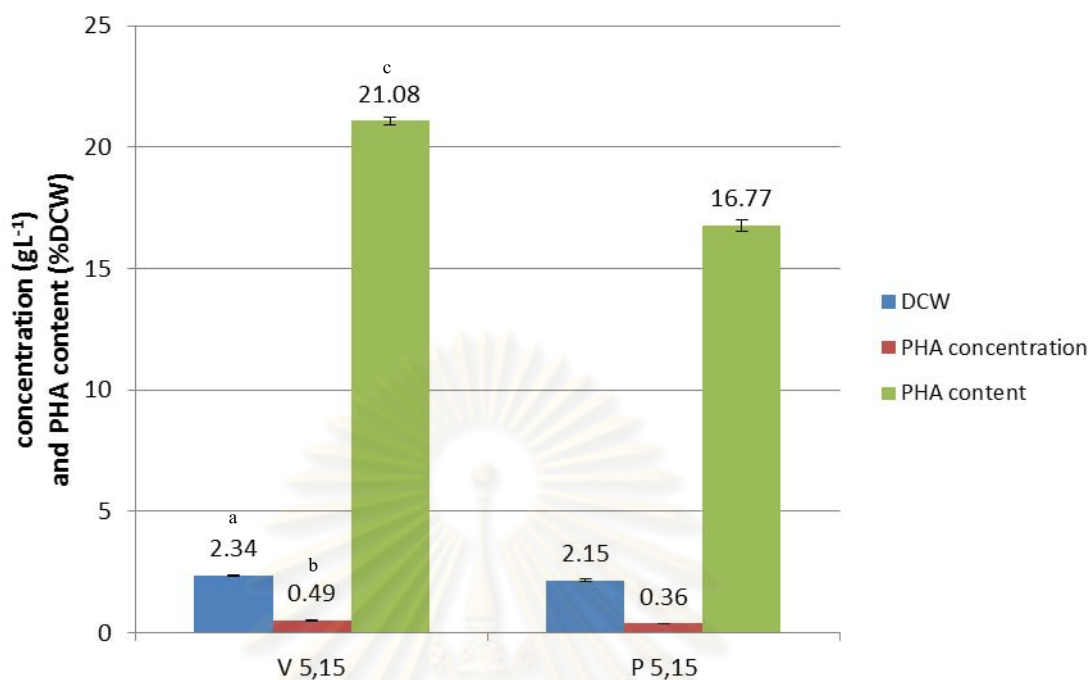




รูปที่ 4.27 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต PHBV  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 10.0 กรัมต่อลิตร

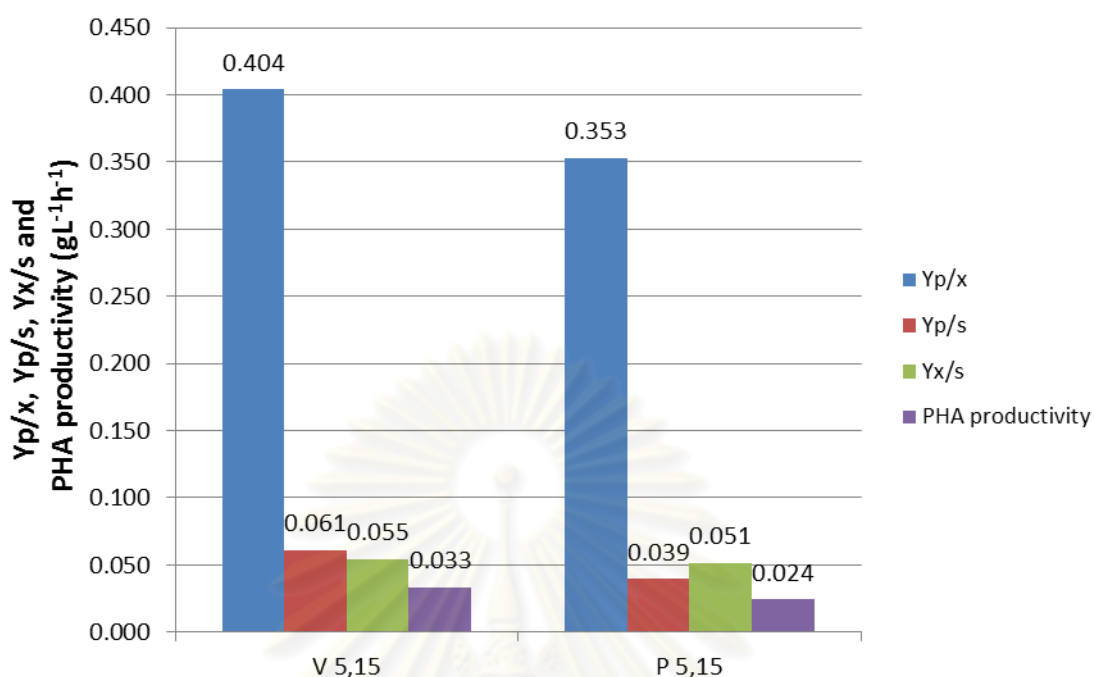
4.3.2.3 อัตราส่วนระหว่างสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB ต่อสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 5.0 กรัมต่อลิตรต่อ 15.0 กรัมต่อลิตร

เปรียบเทียบการเจริญ ผลิตและสะสมโพลิเมอร์ PHBV ของเชื้อ *B. megaterium* P-12 ระหว่างการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 5.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรต 15.0 กรัมต่อลิตร (V5,15) กับแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 5.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 15.0 กรัมต่อลิตร (P5,15) พบว่า *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญ ผลิตและสะสม PHBV เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ได้ดีกว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ PHBV และปริมาณโพลิเมอร์ PHBV สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก ฉ) โดยมีค่าเท่ากับ 2.34 กรัมต่อลิตร 0.49 กรัมต่อลิตร และ 21.08 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 7 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.28



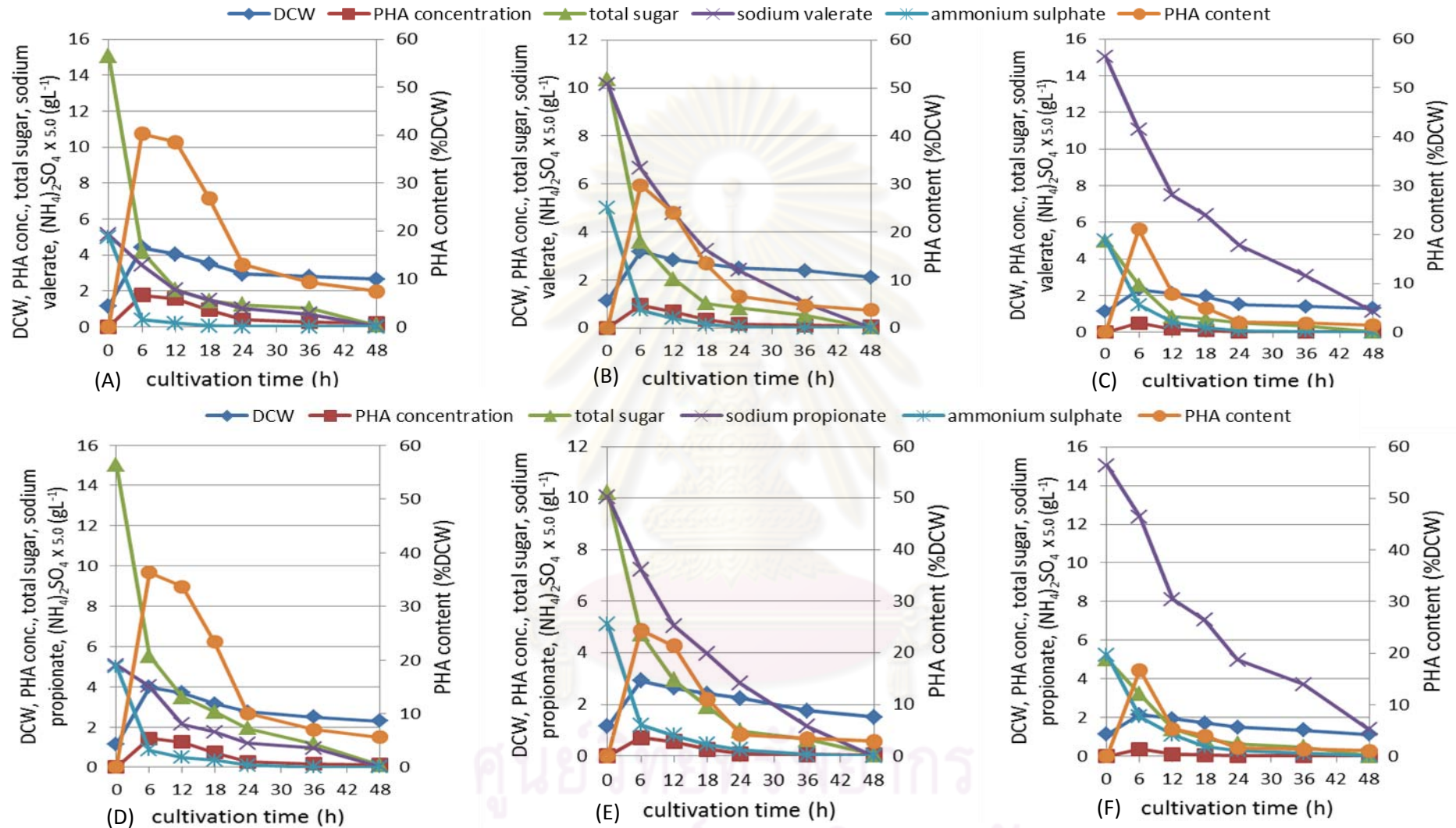
รูปที่ 4.28 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของและปริมาณ PHBV สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 5.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือ โซเดียมวาเลอเรตหรือเกลือโซเดียม โพรพิโอเนต 15.0 กรัมต่อลิตร (สัญลักษณ์ abc แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test)

เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 5.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือ โซเดียมวาเลอเรต 15.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโคพอลิเมอร์ PHBV มีค่าอัตราการผลิต PHBV  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เท่ากับ 0.033 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.404 0.061 และ 0.055 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 5.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือ โซเดียม โพรพิโอเนต 15.0 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.29



รูปที่ 4.29 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต PHBV  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 5.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือ โซเดียมวาเลอเรตหรือเกลือ โซเดียม โพรพิโอเนต 15.0 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองข้างต้น สรุปได้ว่า *Bacillus megaterium* P-12 สามารถเจริญ ผลิตและสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือ โซเดียมวาเลอเรตได้ดีกว่าในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือ โซเดียม โพรพิโอเนตในทุกอัตราส่วน (15:5 10:10 และ 5:15 กรัมต่อลิตรต่อกรัมต่อลิตร) เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงกว่า (ดังแสดงในรูปที่ 4.30) รวมทั้งยังมีค่าอัตราการผลิต PHBV  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  สูงกว่าในทุกอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนผสม ดังนั้น จึงเลือกใช้เกลือ โซเดียมวาเลอเรตเป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HV ในขั้นตอนต่อไป



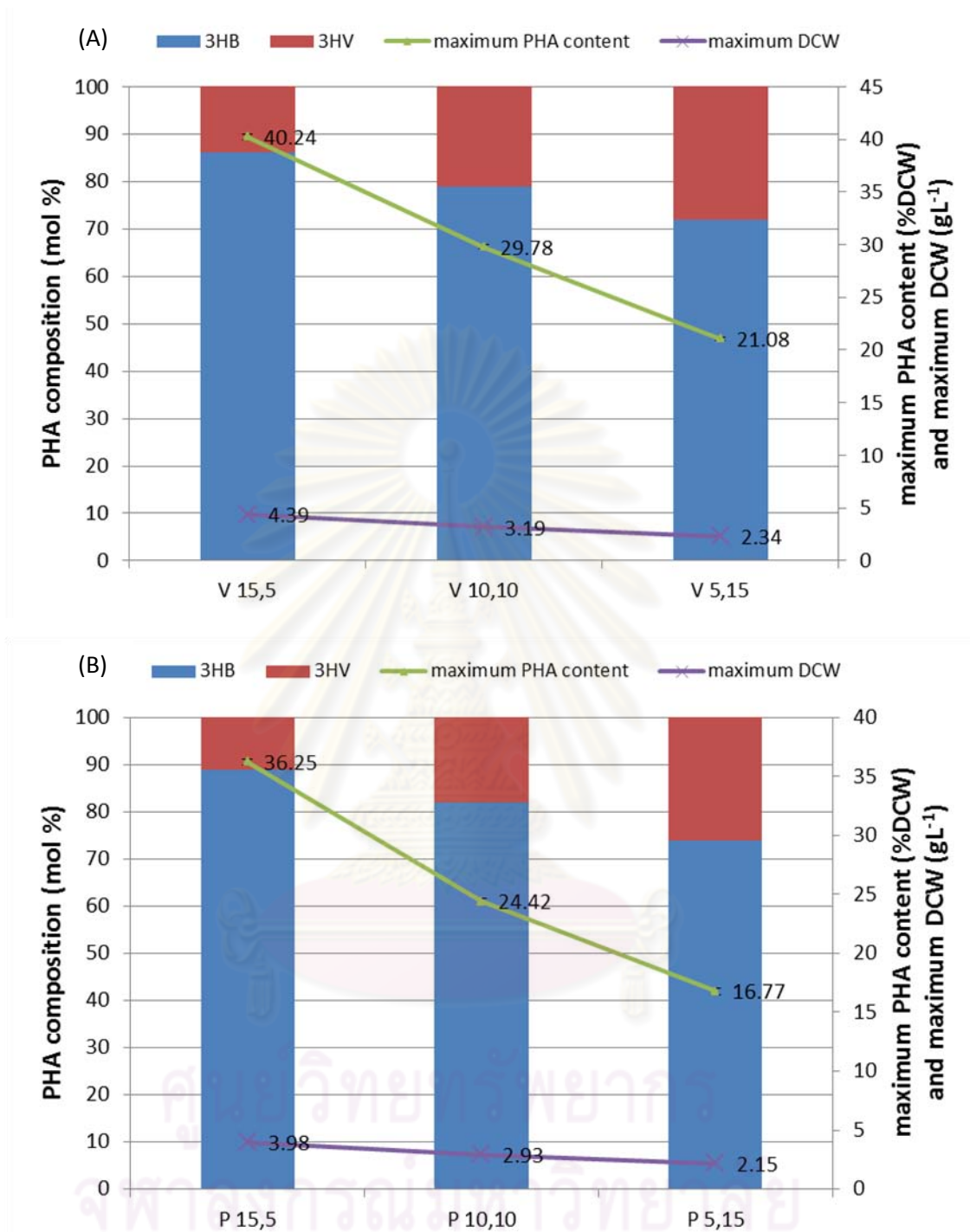
รูปที่ 4.30 (A-F) น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโซเดียมวาเลอเรตหรือโซเดียมโพรพิโอเนตและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตและน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตที่อัตราส่วน 15:5 10:10 5:15 ตามลำดับ

นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบภายในโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรต เปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตที่อัตราส่วนเท่ากับ 15:5 10:10 และ 5:15 กรัมต่อลิตรต่อกรัมต่อลิตร พบว่าในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 15.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรต 5.0 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณพอลิเมอร์ PHBV สูงสุด เท่ากับ 40.24 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 14 โมลเปอร์เซ็นต์ ขณะที่ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 5.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 15.0 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณพอลิเมอร์ PHBV ต่ำสุด เท่ากับ 16.77 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 26 โมลเปอร์เซ็นต์ แสดงในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.31

ตารางที่ 4.5 น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้สูงสุด รวมทั้งสัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ในโคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตและน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตในอัตราส่วนต่างๆ

3HB-generating carbon source (gL <sup>-1</sup> ): 3HV-generating carbon source (gL <sup>-1</sup> )	maximum DCW (gL <sup>-1</sup> )	maximum PHA content (% DCW)	PHA composition (mol%)	
			3HB	3HV
sugarcane liquor : sodium valerate = 15:5	4.39±0.04	40.24±0.27	86	14
sugarcane liquor : sodium valerate = 10:10	3.19±0.04	29.78±0.20	79	21
sugarcane liquor : sodium valerate = 5:15	2.34±0.05	21.08±0.16	72	28
sugarcane liquor : sodium propionate = 15:5	3.98±0.04	36.25±0.23	89	11
sugarcane liquor : sodium propionate = 10:10	2.93±0.04	24.42±0.24	82	18
sugarcane liquor : sodium propionate = 5:15	2.15±0.05	16.77±0.25	74	26





รูปที่ 4.31 น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุดที่ผลิตได้ รวมถึงสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ใน

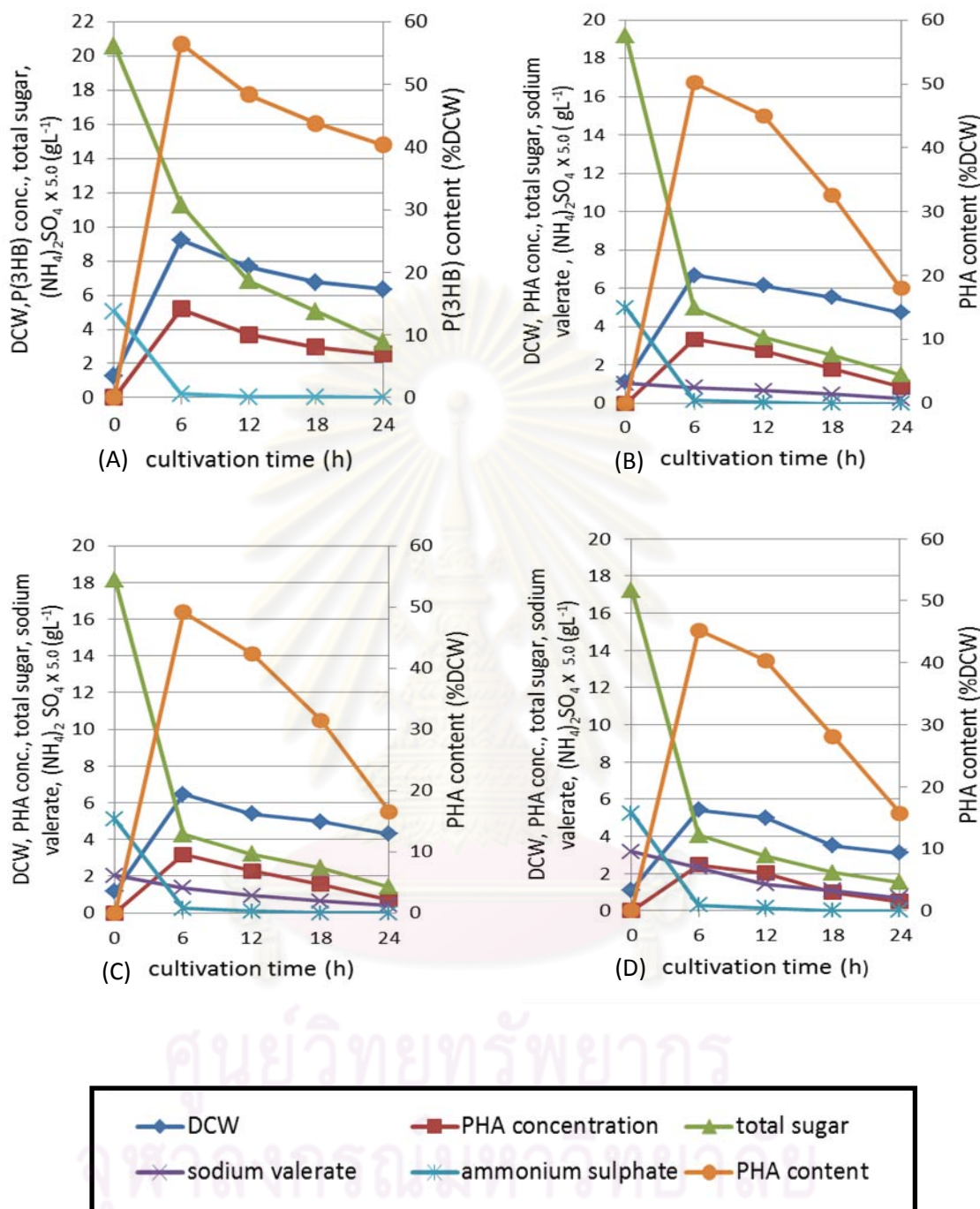
(A) แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 15:5 10:10 และ 5:15 กรัมต่อลิตรต่อกรัมต่อลิตร

(B) แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตในอัตราส่วน 15:5 10:10 และ 5:15 กรัมต่อลิตรต่อกรัมต่อลิตร

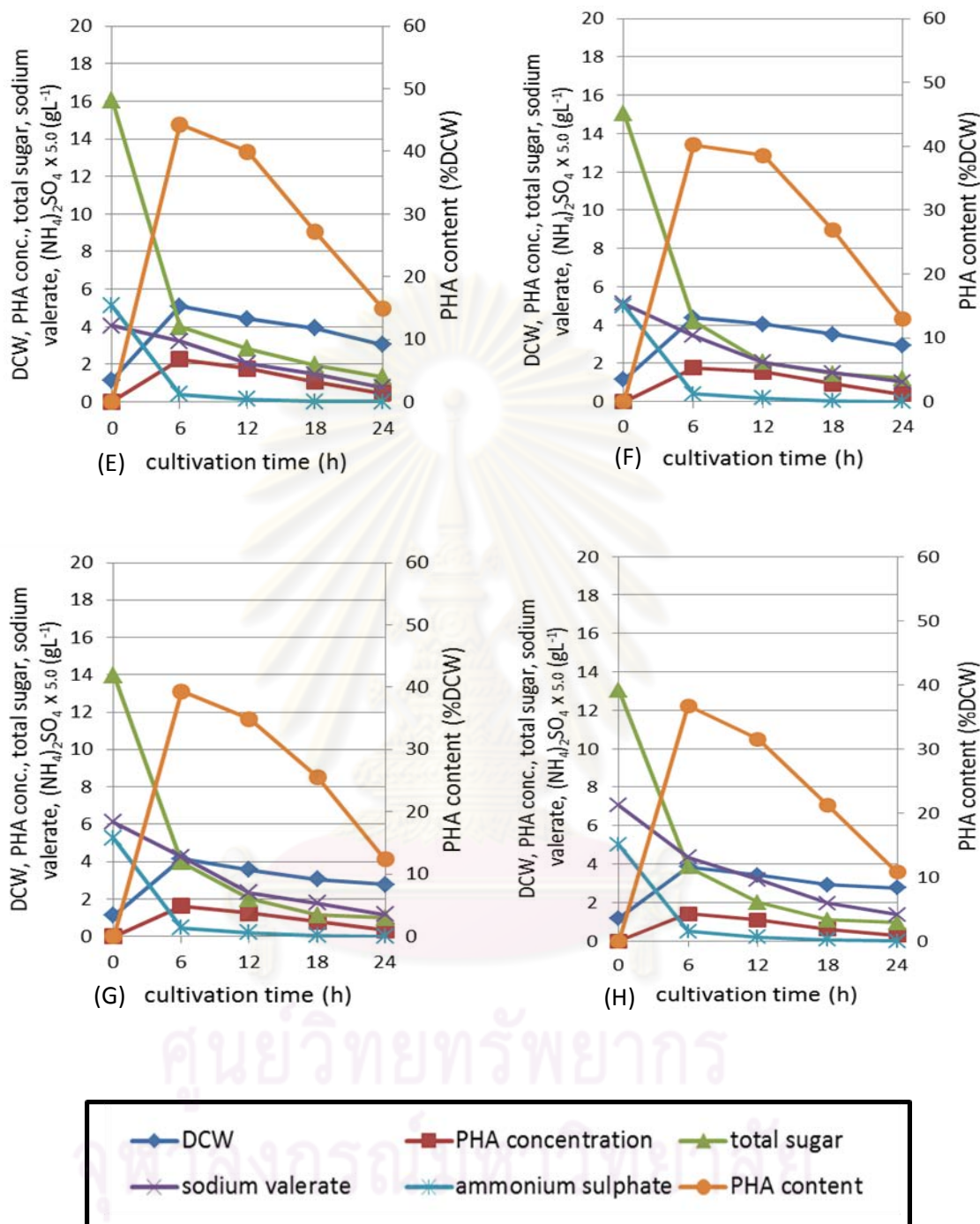
ต่อมา จึงแปรสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB กับเกลือโซเดียมวาเลอเรตซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HV โดยกำหนดให้มีความเข้มข้นรวมของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตร แปรอัตราส่วนของน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรต ดังนี้ 19:1 18:2 17:3 16:4 15:5 14:6 13:7 12:8 11:9 10:10 9:11 8:12 7:13 6:14 5:15 4:16 3:17 2:18 และ 1:19 กรัมต่อลิตรต่อกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพื่อติดตามดูการเจริญ การผลิตและสะสม PHBV รวมถึงสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ของ *B. megaterium* P-12 ดังแสดงในตารางที่ 8 ถึง 12 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.32 ถึง 4.36



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

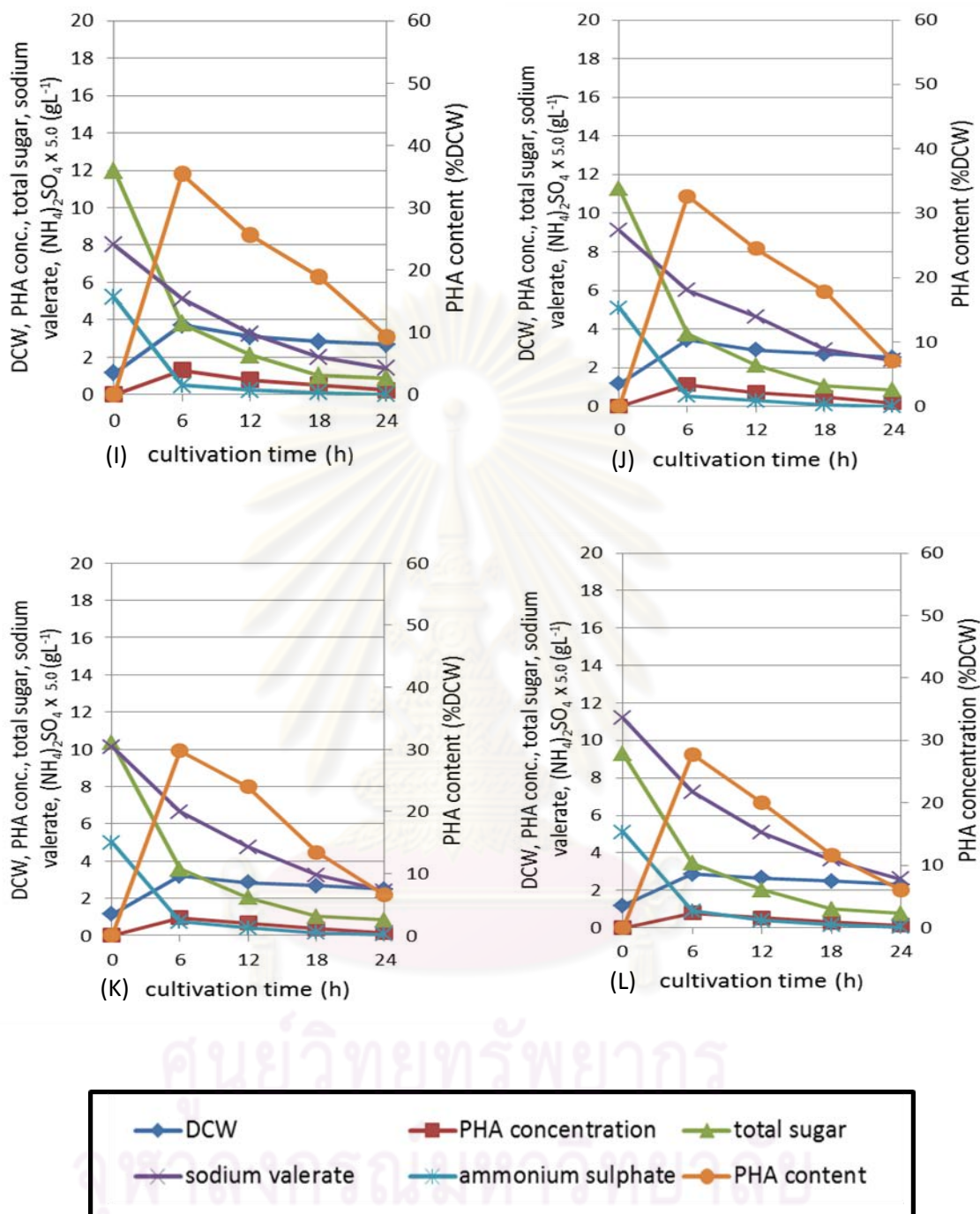


รูปที่ 4.32 (A-D) น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 20:0 ถึง 17:3 ตามลำดับ



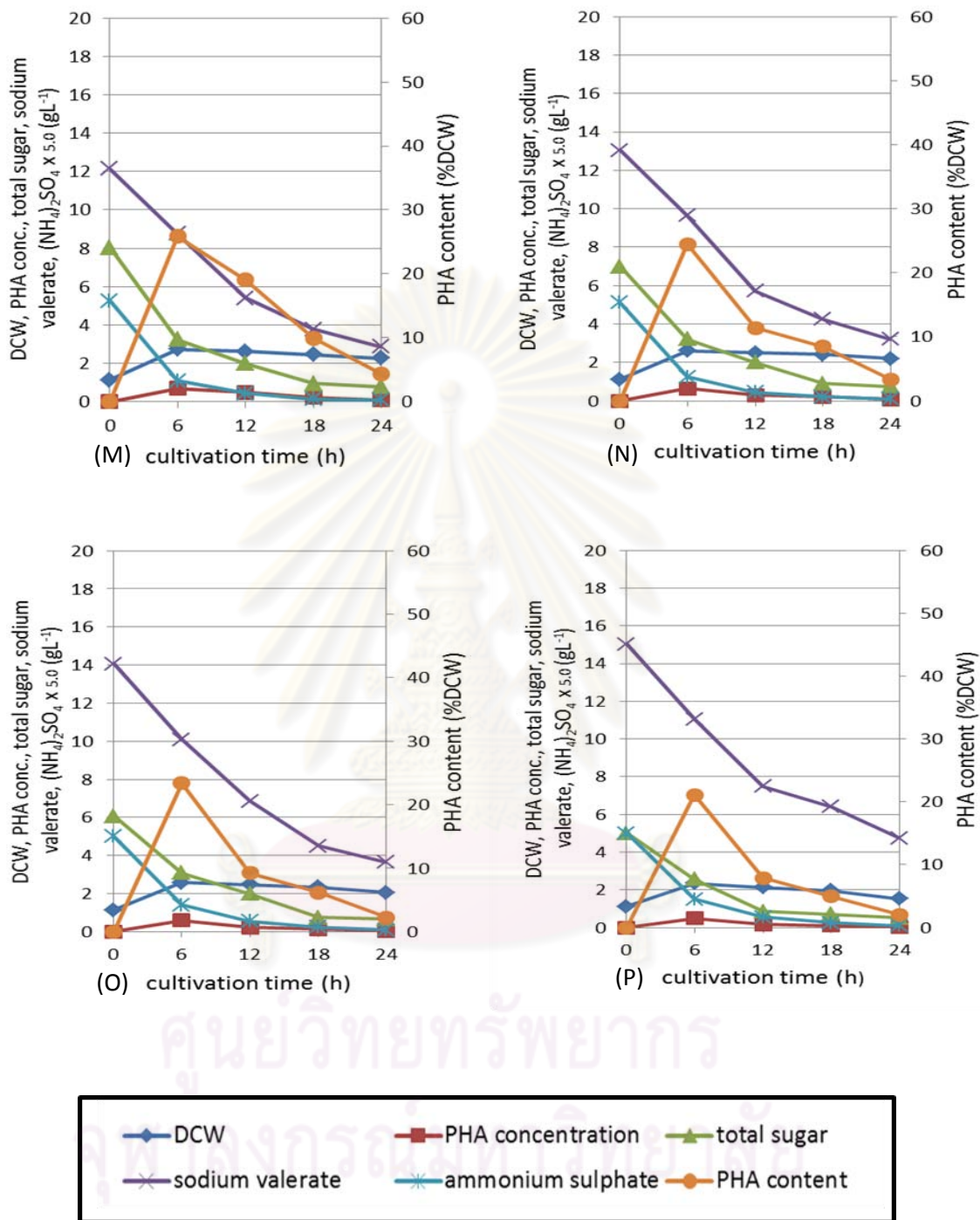
รูปที่ 4.33 (E-H) น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 16:4 ถึง 13:7 ตามลำดับ



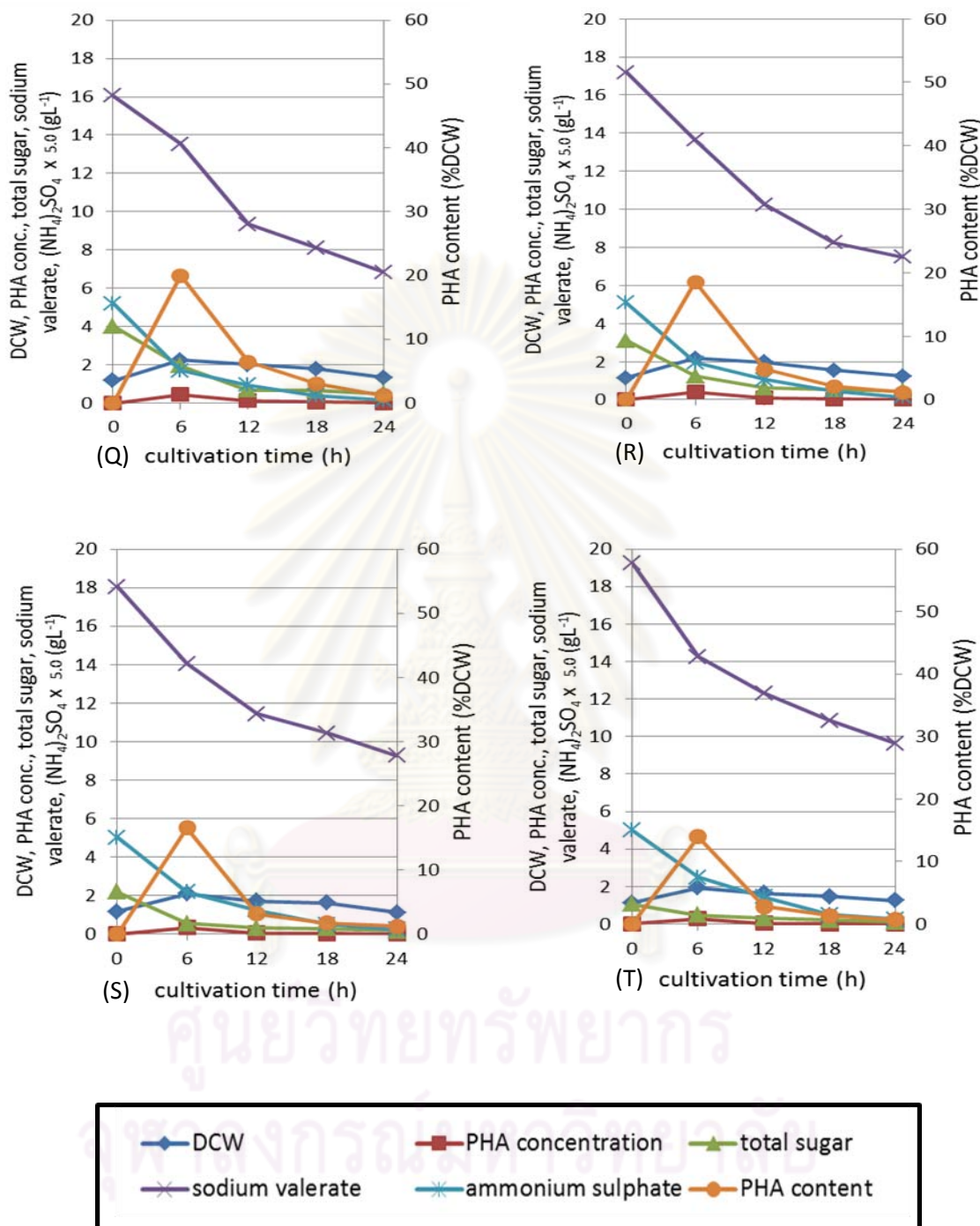


รูปที่ 4.34 (I-L) น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 12:8 ถึง 9:11 ตามลำดับ





รูปที่ 4.35 (M-P) น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 8:12 ถึง 5:15 ตามลำดับ



รูปที่ 4.36 (Q-T) น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 4:16 ถึง 1:19 ตามลำดับ

ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนมีผลโดยตรงต่อสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบภายในโคพอลิเมอร์ PHBV ซึ่งโดยทั่วไป เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคสับสเตรต 3HV ลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ เช่น กรดโพรพิโอนิกหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต กรดวาเลอริกหรือเกลือโซเดียมวาเลอเรต เป็นต้น จะมีผลทำให้โมลเปอร์เซ็นต์ของ 3HV เพิ่มขึ้น (Rhee และคณะ, 1993) สอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้ โดยพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคสับสเตรต 3HV (ในที่นี้คือ เกลือโซเดียมวาเลอเรต) สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ จะเพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.37

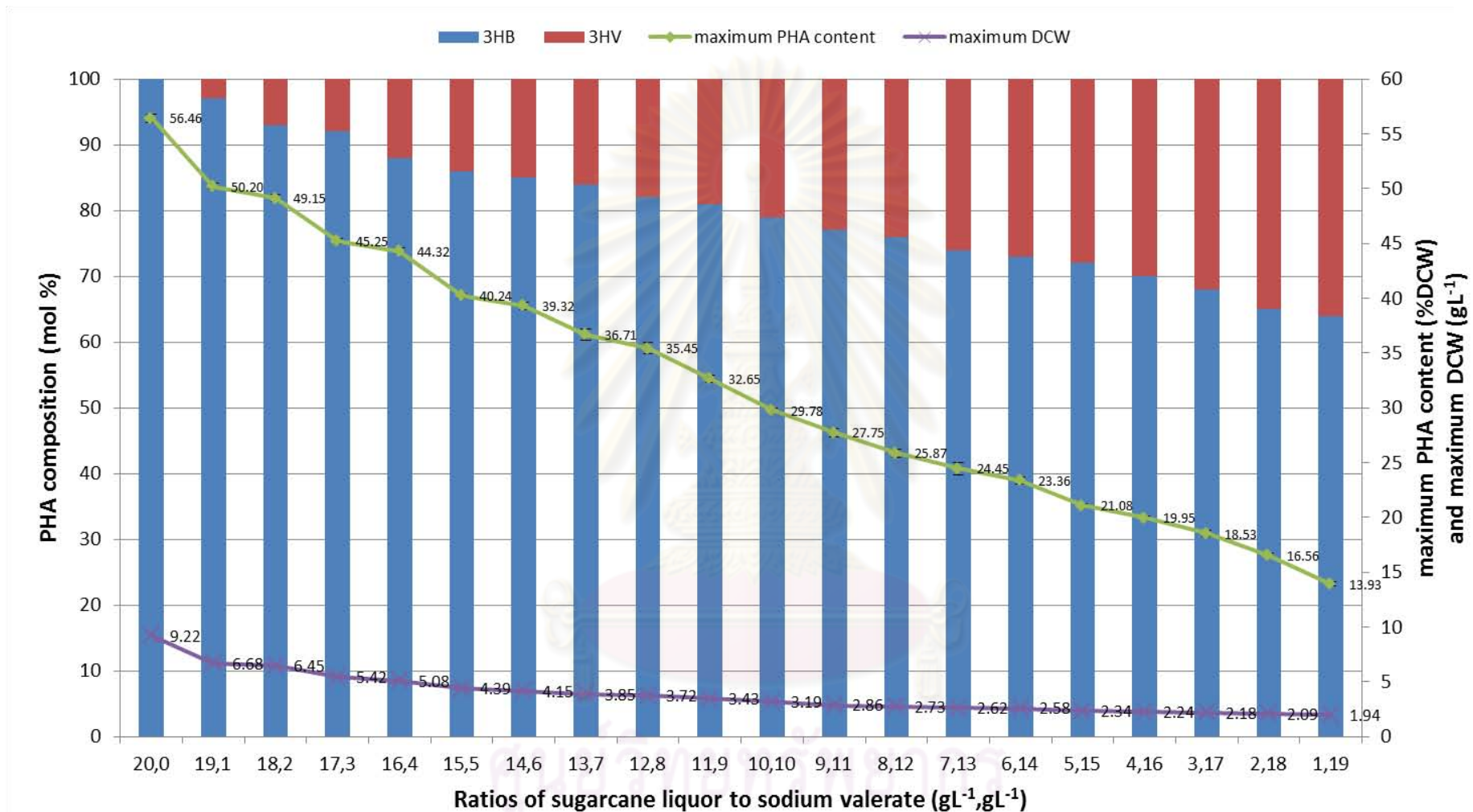
Nobes และคณะ (1994) ; Barker และคณะ (1997) ; Sudesh และคณะ (2000) ; Volova, (2004) ; Rudnik (2008) รายงานว่า โคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV อยู่ในช่วงระหว่าง 20 ถึง 30 โมลเปอร์เซ็นต์ เป็นโคพอลิเมอร์ที่มีสมบัติเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์มากที่สุด โดยพบว่า สามารถนำไปขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มที่มีความยืดหยุ่นได้ ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่า เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 10.0 กรัมต่อลิตรต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตร และมีแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถให้สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HV อยู่ในช่วงที่ต้องการ คือ มีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์

สำหรับเกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณาเลือกอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ได้แก่ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV รวมทั้งสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบภายในโคพอลิเมอร์ ซึ่งที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 10.0 กรัมต่อลิตรต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตร มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์ (ดังตารางที่ 4.6) ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในช่วงที่ต้องการ คือ มีปริมาณ 3HV ตั้งแต่ 20 ถึง 30 โมลเปอร์เซ็นต์ และขณะเดียวกันก็ยังให้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุดเมื่อเทียบกับการใช้แหล่งคาร์บอนผสมที่อัตราส่วนอื่นๆ (9:11 8:12 7:13 6:14 5:15 และ 4:16) จึงเลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตที่อัตราส่วนนี้เพื่อการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.6 น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้สูงสุด รวมทั้งสัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบในโคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วนต่างๆ

sugarcane liquor (gL <sup>-1</sup> ) : sodium valerate (gL <sup>-1</sup> )	maximum DCW (gL <sup>-1</sup> )	maximum PHA content (% DCW)	PHA composition (mol %)	
			3HB	3HV
20:0	9.22±0.03	56.46±0.38	100	0
19:1	6.68±0.03	50.20±0.29	97	3
18:2	6.45±0.05	49.15±0.34	93	7
17:3	5.42±0.03	45.25±0.23	92	8
16:4	5.08±0.04	44.32±0.28	88	12
15:5	4.39±0.04	40.24±0.27	86	14
14:6	4.15±0.03	39.32±0.31	85	15
13:7	3.85±0.05	36.71±0.52	84	16
12:8	3.72±0.03	35.45±0.51	82	18
11:9	3.43±0.03	32.65±0.31	81	19
10:10	3.19±0.04	29.78±0.20	79	21
9:11	2.86±0.04	27.75±0.39	77	23
8:12	2.73±0.03	25.87±0.39	76	24
7:13	2.62±0.03	24.45±0.58	74	26
6:14	2.58±0.05	23.36±0.35	73	27
5:15	2.34±0.05	21.08±0.16	72	28
4:16	2.24±0.05	19.95±0.19	70	30
3:17	2.18±0.03	18.53±0.31	68	32
2:18	2.09±0.06	16.56±0.22	65	35
1:19	1.94±0.05	13.93±0.16	64	36





รูปที่ 4.37 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้สูงสุด รวมทั้งสัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบในโคพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วนต่างๆ



แต่เนื่องจากที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 10.0 กรัมต่อลิตรต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตร ยังมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ต่ำอยู่ ดังนั้น จึงต้องหาแนวทางในการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น ซึ่งทางหนึ่งก็คือ การเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ ซึ่งทำได้โดยการหาแหล่งไนโตรเจนแหล่งใหม่ที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. megaterium* P-12 ทดแทนการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต

#### 4.4 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญ การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วนของโมนีเมอร์ 3HV ใน PHBV

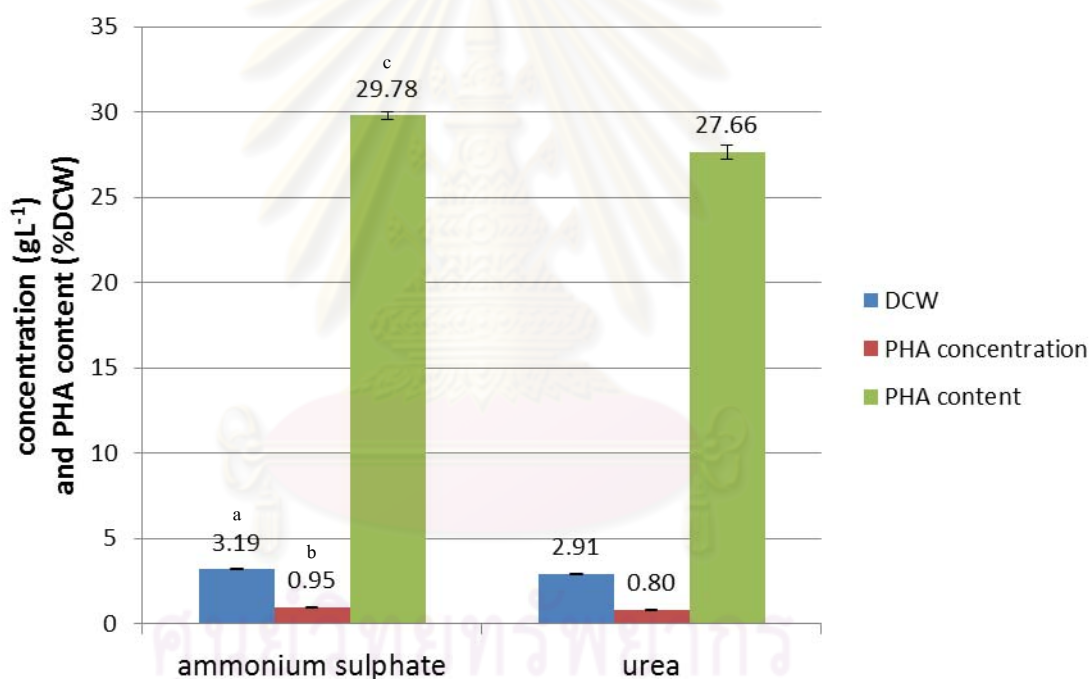
##### 4.4.1 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์สามารถใช้ไนโตรเจนทั้งที่อยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เลซีน เปปโติน ยูเรีย และอีสต์สกัด รวมถึงสามารถใช้ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ เกลือแอมโมเนียมต่างๆ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต เป็นต้น (Bormann และคณะ, 1998)

จุลินทรีย์โดยทั่วไป สามารถผลิตและสะสม PHAs ได้เมื่อมีการจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจน เป็นต้น ขณะที่แหล่งคาร์บอนมากเกินไป โดย Annuar และคณะ (2003) รายงานไว้ว่า การจำกัดปริมาณไนโตรเจนมีผลต่อการสังเคราะห์ PHAs มากกว่าการจำกัดธาตุอาหารชนิดอื่น

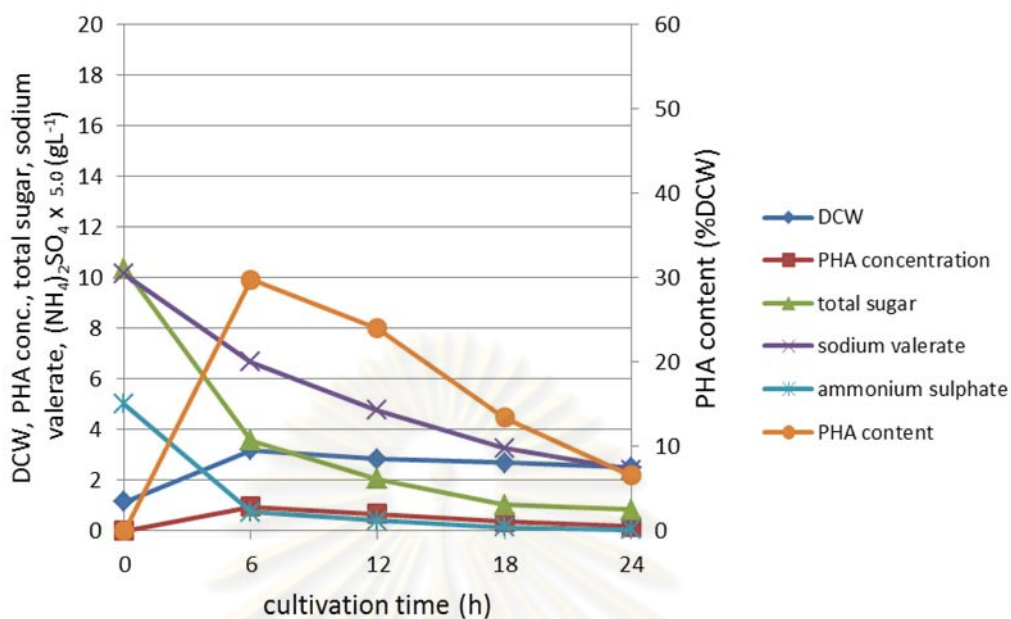
จากผลการทดลองก่อนหน้าในงานวิจัยนี้ พบว่า การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นอนินทรีย์ไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจน ยังได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ต่ำอยู่ จึงได้ศึกษาการใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนซึ่งได้แก่ ยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการผลิต PHBV แทนแอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจาก Loo และ Sudesh (2007b) พบว่า ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับการผลิต PHAs เนื่องจากช่วยส่งเสริมการสร้าง PHAs และยังมีราคาถูกเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ และในงานวิจัยของคณะผู้วิจัยเอง ก็ได้มีการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิต P(3HB) ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไป จึงเลือกใช้ยูเรียเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนแทนการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นอนินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งคาดว่าจะได้ความเข้มข้นของเซลล์และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงขึ้นได้

เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตรกับยูเรียที่มีโมลของไนโตรเจนเท่ากับแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งคิดเป็น 0.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญ ผลิตและสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยงในแอมโมเนียมซัลเฟตได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในยูเรีย เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก จ) โดยมีค่าเท่ากับ 3.19 กรัมต่อลิตร 0.95 กรัมต่อลิตร และ 29.78 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 13 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.38

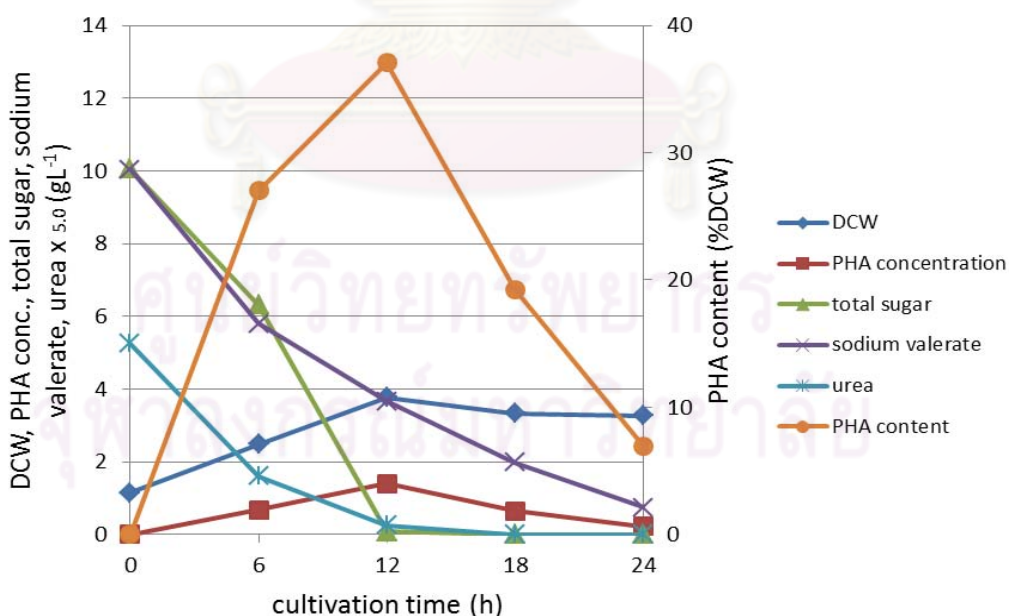


รูปที่ 4.38 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งมีความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตรกับยูเรียที่มีโมลของไนโตรเจนเท่ากับแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งคิดเป็น 0.5 กรัมต่อลิตร (สัญลักษณ์ abc แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test)

สำหรับความสามารถในการเจริญ ผลิตและสะสม PHBV ของ *B.megaterium* P-12 รวมถึงความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ (แอมโมเนียมซัลเฟต) และสารประกอบอินทรีย์ (ยูเรีย) ดังแสดงในรูปที่ 4.39 และ 4.40 ตามลำดับ

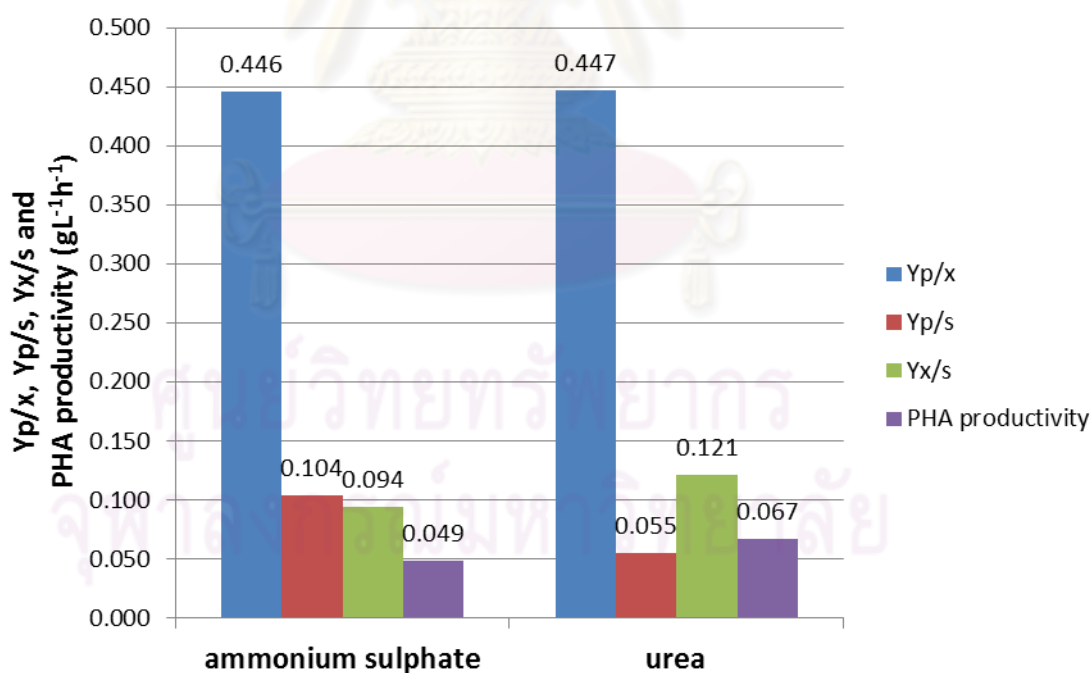


รูปที่ 4.39 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกลีโคไซด์ยิววาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 4.40 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกลีโคไซด์ยิววาเลอเรต และปริมาณยูเรีย เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียที่มีโมลของไนโตรเจนเท่ากับแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งคิดเป็น 0.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน มีค่าอัตราการผลิต PHBV และ  $Y_{x/s}$  สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในแอมโมเนียมซัลเฟต โดยมีค่าเท่ากับ 0.067 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.121 ตามลำดับ แต่ให้ค่า  $Y_{p/x}$  ใกล้เคียงกันและให้ค่า  $Y_{p/s}$  ต่ำกว่า (แสดงในรูปที่ 4.40) ทั้งนี้เนื่องจาก *B.megaterium* P-12 สามารถเจริญ ผลิตและสะสม PHBV ได้สูงเฉพาะช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่หลังจากชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อไปแล้ว พบว่า ปริมาณ PHBV และน้ำหนักเซลล์แห้งลดลงอย่างรวดเร็ว ขณะที่เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* P-12 ในยูเรีย พบว่า จุลินทรีย์ยังสามารถเจริญ ผลิตและสะสม PHBV ได้สูงตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้น และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุดที่ชั่วโมง 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.91 กรัมต่อลิตร 0.80 กรัมต่อลิตร และ 27.66 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมีค่าสูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตถึง 2 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 13 (ภาคผนวก จ) และ รูปที่ 4.41



รูปที่ 4.41 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต PHBV  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตรกับยูเรียที่มีโมลของไนโตรเจนเท่ากับแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งคิดเป็น 0.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่ายูเรียเหมาะที่จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM เพื่อใช้ในการผลิตเป็นโคพอลิเมอร์ PHBV เนื่องจากให้ค่าอัตราการผลิต PHBV และ  $Y_{x/s}$  สูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต รวมทั้งยังมีราคาถูกกว่าแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งช่วยทำให้ราคาต้นทุนการผลิต PHBV ในระดับอุตสาหกรรมต่ำลงได้

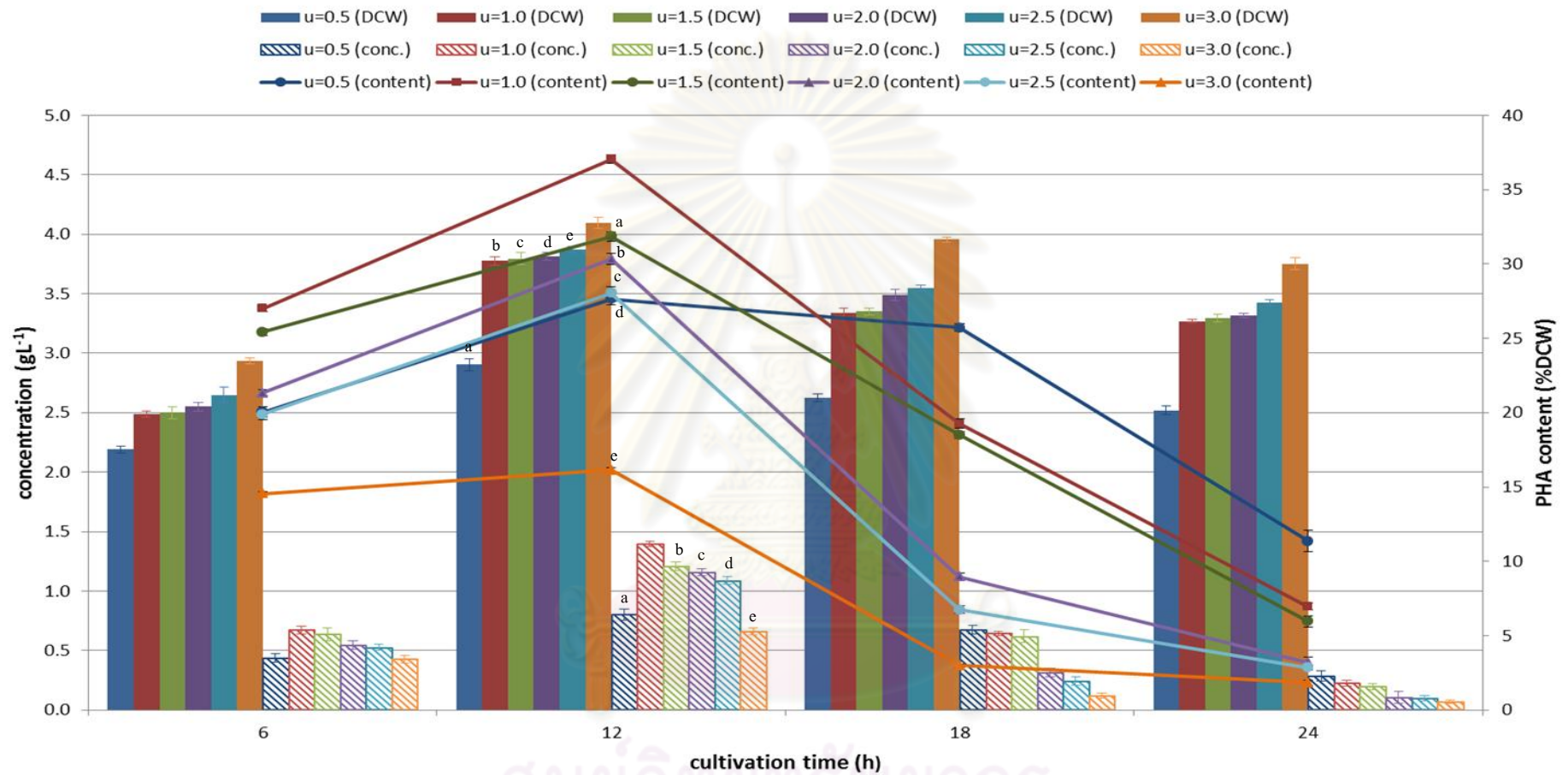
#### 4.4.2 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน

นอกจากชนิดของแหล่งไนโตรเจนแล้วปริมาณหรือความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนก็ยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญ ผลิตและสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV เนื่องจากการมีแหล่งไนโตรเจนปริมาณมากเกินไป มีผลทำให้แบคทีเรียนำไปใช้ในการเจริญมากกว่า จนไม่ผลิตหรือผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้น้อย ดังนั้น การสังเคราะห์ PHBV จะเกิดขึ้นสูงสุด ณ ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมค่าหนึ่งเท่านั้น (critical concentration) (Ramsay และคณะ, 1992 ; Beaulieu และคณะ, 1995)

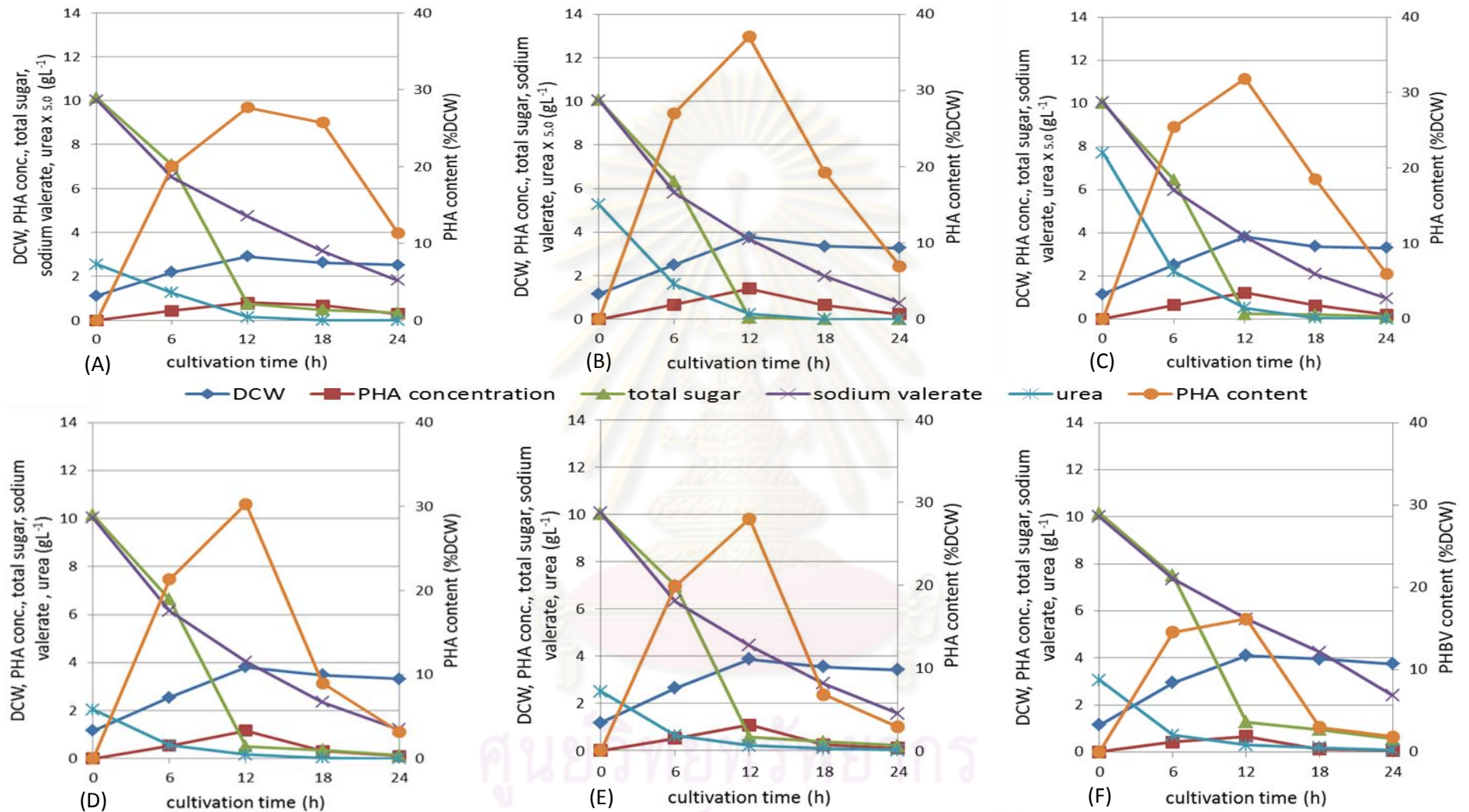
ผลการศึกษา พบว่า เมื่อมีความเข้มข้นของยูเรียเพิ่มขึ้น *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น แต่สังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ได้น้อยลง โดยเชื้อเจริญได้ดีที่สุดในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของยูเรียเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก จ) ขณะที่ได้ความเข้มข้นและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุดเมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของยูเรียเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 1.40 กรัมต่อลิตร และ 37.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในยูเรียที่ความเข้มข้นอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก จ) ดังแสดงในตารางที่ 14 ถึง 15 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.42 ถึง 4.43 ตามลำดับ

เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มียูเรีย 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า มีค่าอัตราการผลิต  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  สูงสุด เท่ากับ 0.117 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.533 0.086 และ 0.160 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงที่ยูเรียความเข้มข้นอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.44

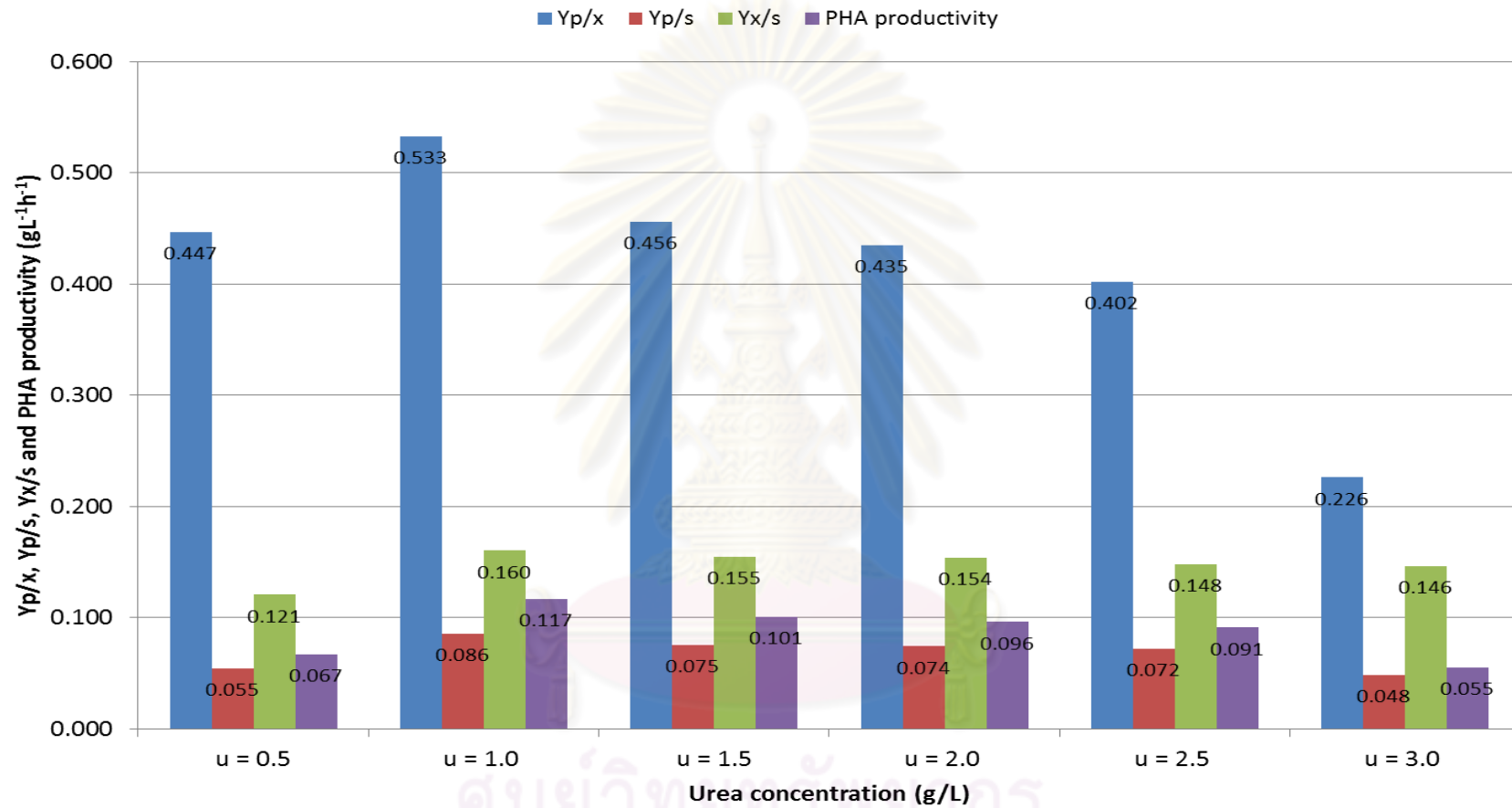




รูปที่ 4.42 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของยูเรียเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร (สัญลักษณ์ abcde แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test เมื่อกำหนดให้ยูเรียที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นชุดควบคุม) \*ยกเว้นในกรณีน้ำหนักเซลล์แห้ง กำหนดให้ยูเรียที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตรเป็นชุดควบคุม

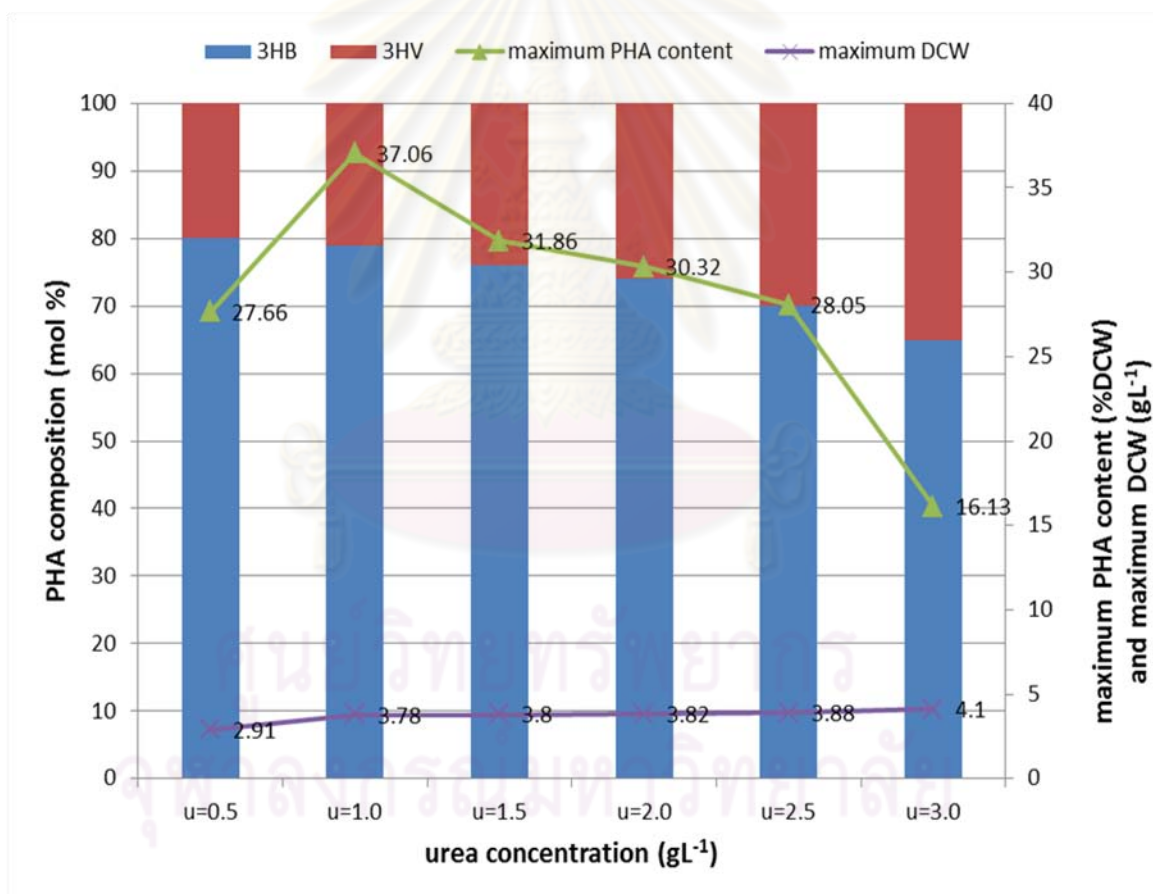


รูปที่ 4.43 (A-F) น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณยูเรีย เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมียูเรียที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 4.44 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต PHBV Yp/x Yp/s และ Yx/s เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมียูเรียที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบภายในโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า ที่ความเข้มข้นของยูเรียเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุด เท่ากับ 37.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเข้มข้นของยูเรียเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ต่ำสุด เท่ากับ 16.13 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 35 โมลเปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของยูเรียมีผลโดยตรงต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยูเรียให้สูงขึ้น จะมีผลทำให้ปริมาณโมโนเมอร์ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบภายในโคพอลิเมอร์ PHBV เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.45



รูปที่ 4.45 น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้สูงสุด รวมทั้งสัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบในโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในยูเรียที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 ถึง 3.0 กรัมต่อลิตร



จากผลการทดลองข้างต้น จึงสามารถสรุปได้ว่า ยูเรียที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญ การผลิตและสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ของ *B.megaterium* P-12

นอกจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนซึ่งถือเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญ การผลิตและสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV รวมทั้งสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV แล้ว ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารสำหรับการผลิต MSM และปริมาณอากาศ ก็ยังเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์พอลิเมอร์

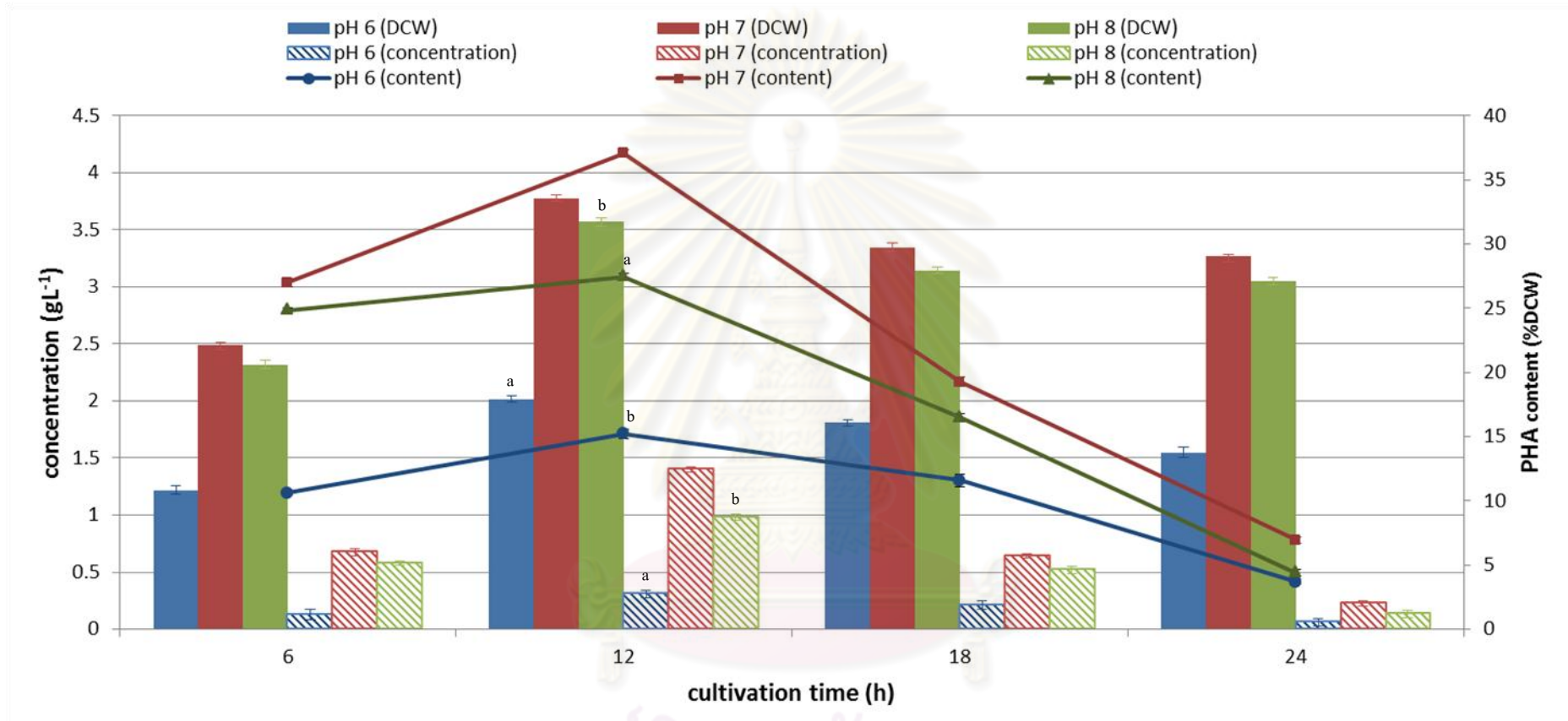
#### 4.5 ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญ การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV

##### 4.5.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวสำหรับการผลิต

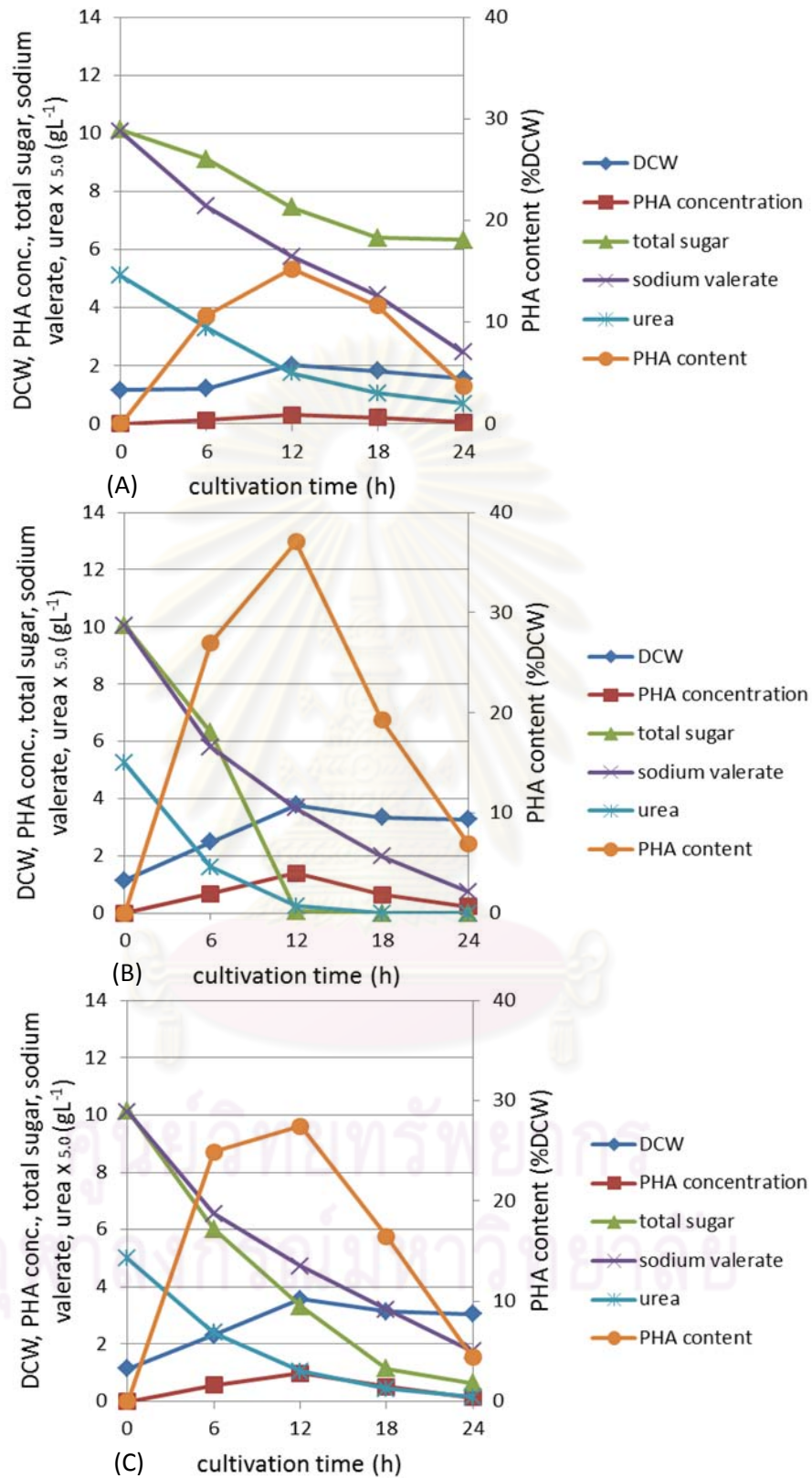
ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต PHAs Kinoshita และคณะ (1991) พบว่า หากต้องการผลิต PHAs ควรทำการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างไม่ให้ต่ำกว่า 7.0 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอยู่ในภาวะที่เป็นกรดมากเกินไป

เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 พบว่า *B. megaterium* P-12 เจริญและผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MSM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 และ 8.0 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก จ) โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ PHBV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV เท่ากับ 3.78 กรัมต่อลิตร 1.40 กรัมต่อลิตร และ 37.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ แสดงในตารางที่ 16 (ภาคผนวก จ) รูปที่ 4.46 และ 4.47



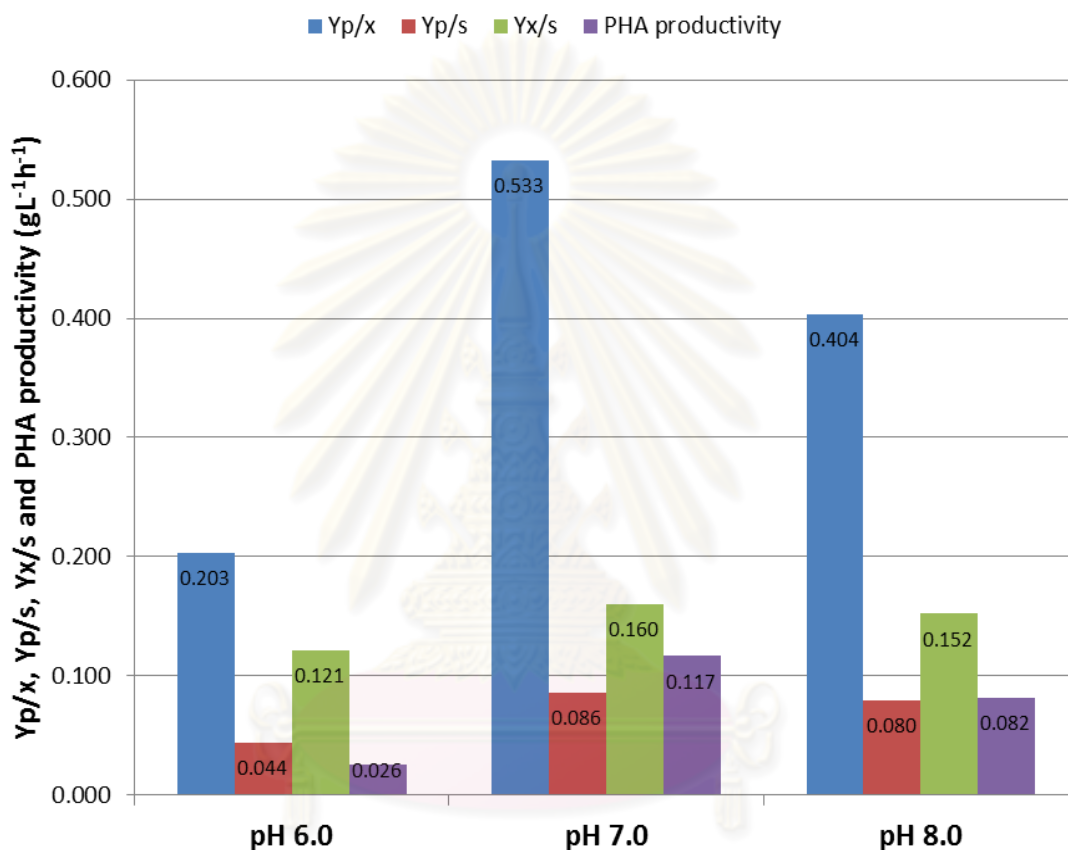


รูปที่ 4.46 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0 (สัญลักษณ์ ab แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test เมื่อกำหนดให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM เท่ากับ 7.0 เป็นชุดควบคุม)



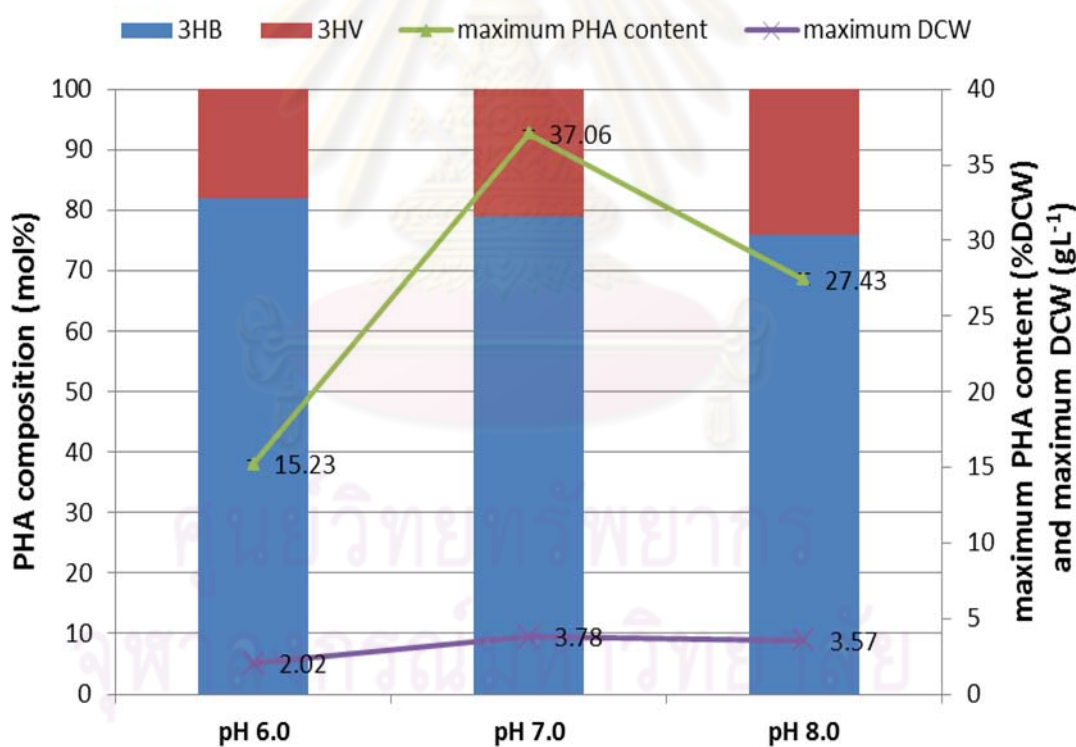
รูปที่ 4.47 (A-C) น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณยูเรีย เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ

เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 พบว่า มีค่าอัตราการผลิต  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  สูงสุดเท่ากับ 0.117 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.533 0.086 และ 0.160 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 และ 8.0 ดังแสดงในรูปที่ 4.48



รูปที่ 4.48 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต P(3HB)  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0

จากการศึกษาสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบภายในโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0 พบว่า ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 37.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์ ขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ต่ำสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 15.23 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 18 โมลเปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM มีผลโดยตรงต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบภายใน PHBV โดยพบว่า ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้น ทำให้มีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.49



รูปที่ 4.49 น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้สูงสุด รวมทั้งสัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบในโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0

จากผลการทดลองดังกล่าว สรุปได้ว่า ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว สำหรับการผลิต MSM เท่ากับ 7.0 *B.megaterium* P-12 สามารถเจริญ ผลิตและสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ได้สูงสุด โดยมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบภายในโคพอลิเมอร์

#### 4.5.2 ปริมาณอากาศ

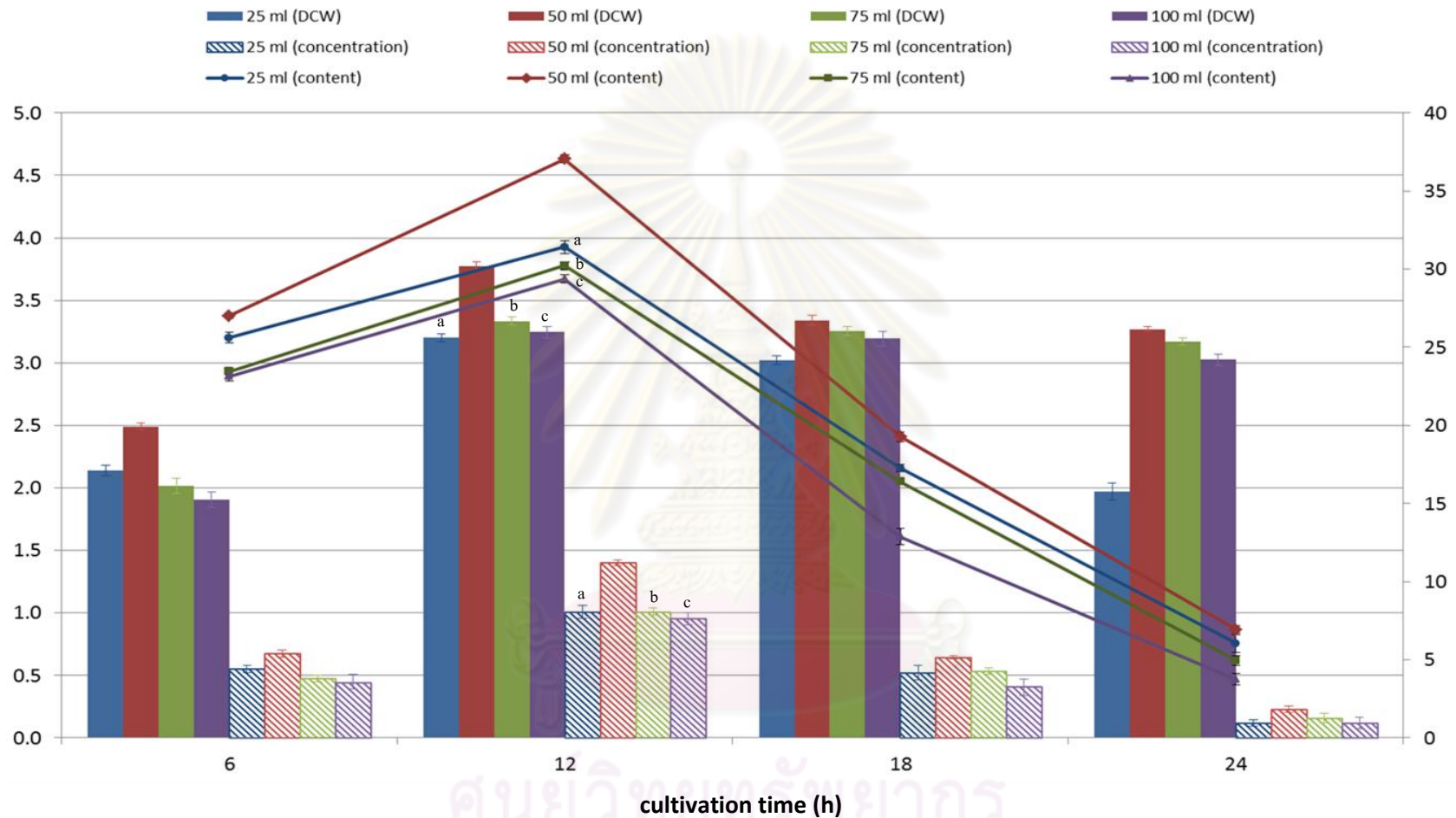
โดยทั่วไป การสังเคราะห์พอลิเมอร์ PHAs จะเกิดขึ้นได้ จะต้องมีการจำกัดปริมาณอากาศหรือออกซิเจนให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม ก็คือต้องเพียงพอสำหรับการสร้างพลังงานและการหายใจระดับเซลล์ แต่จะต้องไม่มากเกินไปจนเซลล์นำไปใช้ในการเจริญเติบโต แต่ไม่สะสม PHAs (Pozo และคณะ, 2002)

สำหรับการศึกษาปริมาณอากาศที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ได้สูงสุดในงานวิจัยนี้ ทำได้โดยการแปรปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งบรรจุในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิลิตร

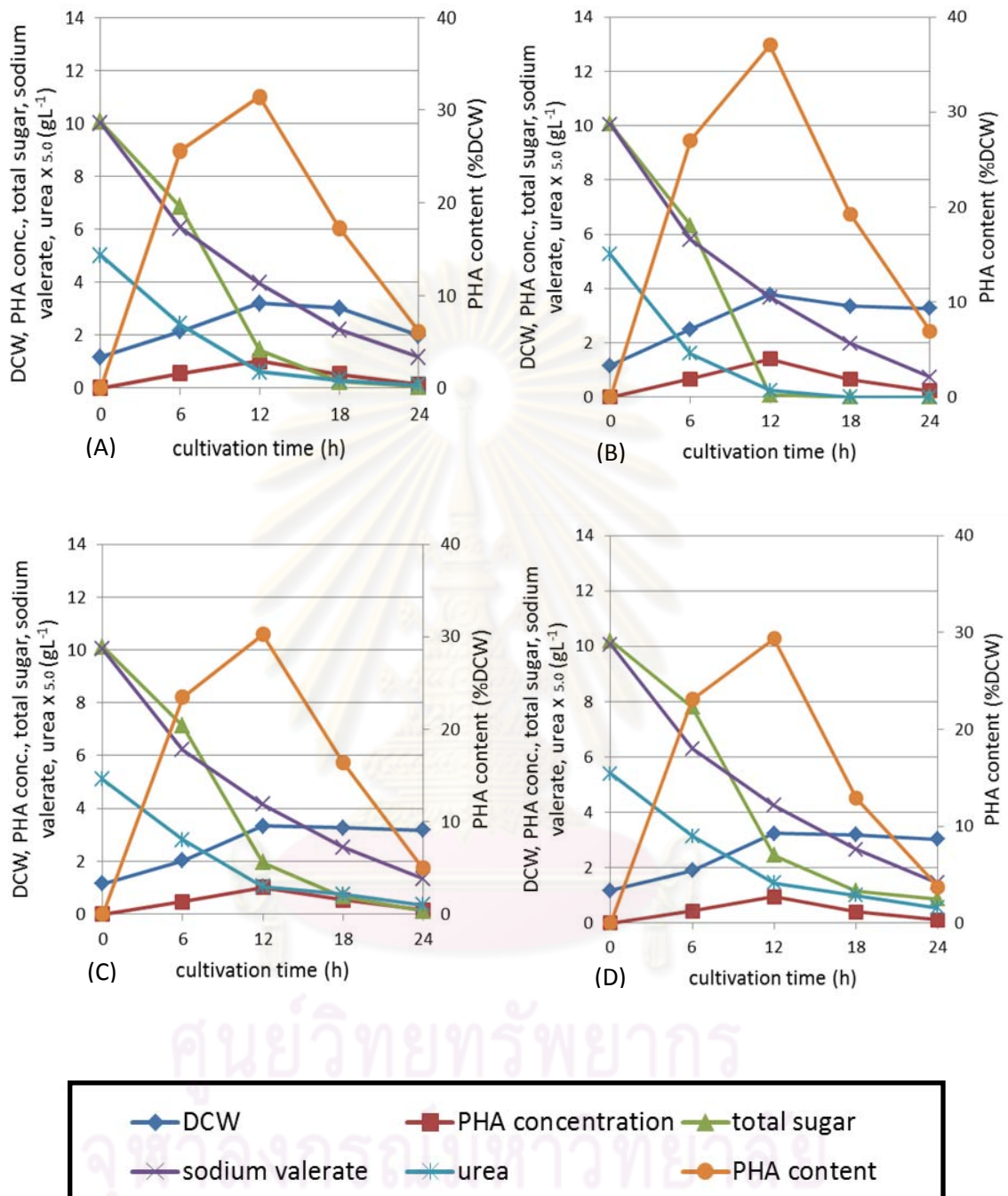
ผลการศึกษา พบว่า *B. megaterium* P-12 ที่เลี้ยงในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เท่ากับ 50 มิลลิลิตร สามารถเจริญและผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในขวดทดลองที่มีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เท่ากับ 25 75 และ 100 มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก จ) โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV เท่ากับ 3.78 กรัมต่อลิตร 1.40 กรัมต่อลิตร และ 37.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ แสดงในตารางที่ 17 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.50 ถึง 4.51

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



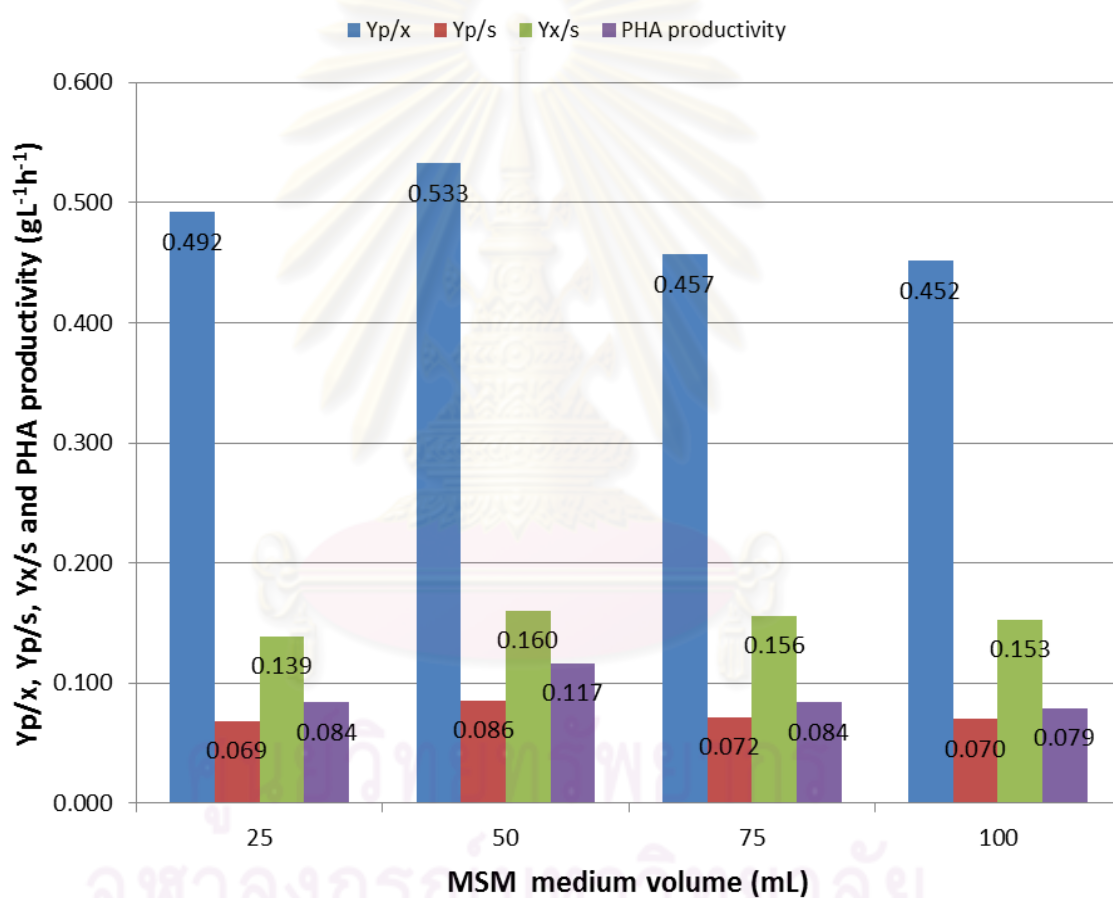


รูปที่ 4.50 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในปริมาณอาหารแตกต่างกัน ซึ่งทำได้โดยการแปรปริมาณของอาหารเหลือสำหรับการผลิต MSM เท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิลิตรในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร (สัญลักษณ์ abc แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test เมื่อกำหนดให้ขวดทดลองที่มีปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เท่ากับ 50 มิลลิลิตรเป็นชุดควบคุม)



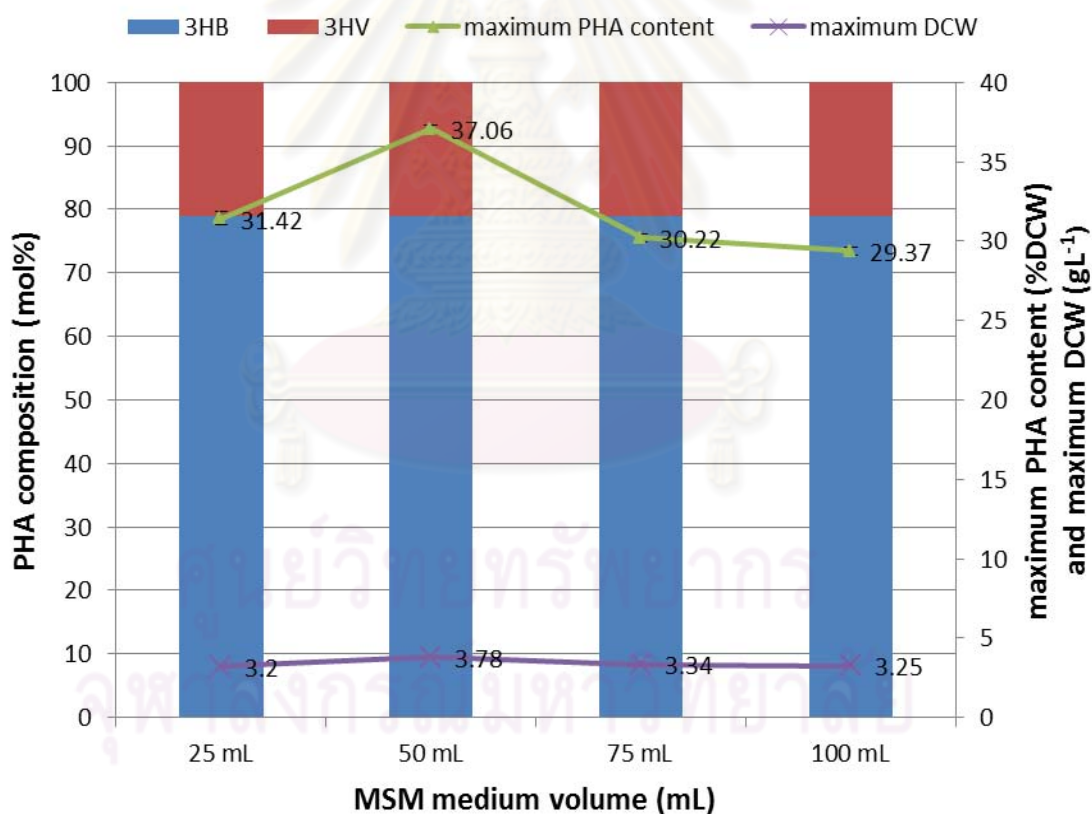
รูปที่ 4.51 (A-D) น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณยูเรีย เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในขวดทดลองที่มี ปริมาตรของอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM เท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณอากาศแตกต่างกัน โดยแปร ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งบรรจุในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิลิตร พบว่า ที่ปริมาตรของอาหารเหลือสำหรับการผลิต MSM เท่ากับ 50 มิลลิลิตร มีค่าอัตราการผลิต  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  สูงสุด เท่ากับ 0.117 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.533 0.086 และ 0.160 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าที่ปริมาตรของอาหาร MSM เท่ากับ 25 75 และ 100 มิลลิลิตร แสดงในรูปที่ 4.52



รูปที่ 4.52 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต PHBV  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตรซึ่งมีปริมาตรของอาหารเหลือสำหรับการผลิต MSM เท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิลิตร

ผลการศึกษาสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบภายในโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในปริมาณอากาศแตกต่างกัน พบว่า ที่ปริมาตรของอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM เท่ากับ 50 มิลลิลิตร ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 37.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์ ขณะที่ปริมาตรของอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ต่ำสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 15.23 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกัน ดังนั้น จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ปริมาณอากาศไม่มีผลต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ PHBV เนื่องจากในทุก ปริมาตรของอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM ได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เท่ากัน คือมีค่าเท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.53

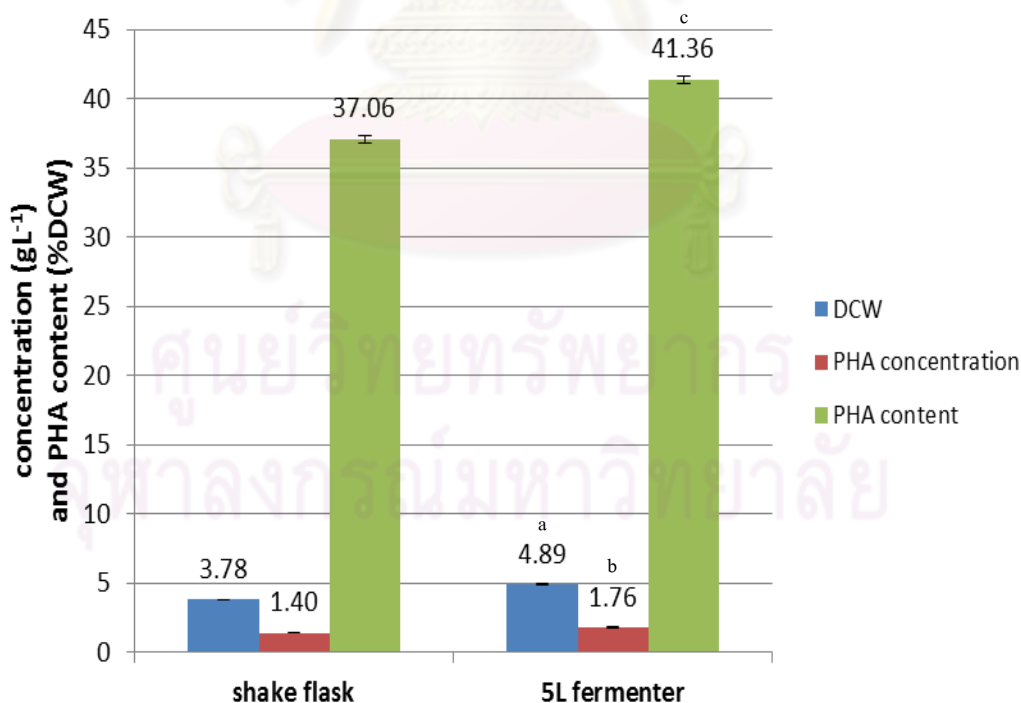


รูปที่ 4.53 น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้สูงสุด รวมทั้งสัดส่วน โมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบในโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตรที่มีปริมาตรของอาหารเหลวสำหรับการ ผลิต MSM เท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิลิตร

สรุปได้ว่า ที่ปริมาตรของอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM เท่ากับ 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญ ผลิตและสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ได้สูงสุด โดยมีปริมาณ โมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์

#### 4.6 การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จาก *Bacillus megaterium* P-12 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

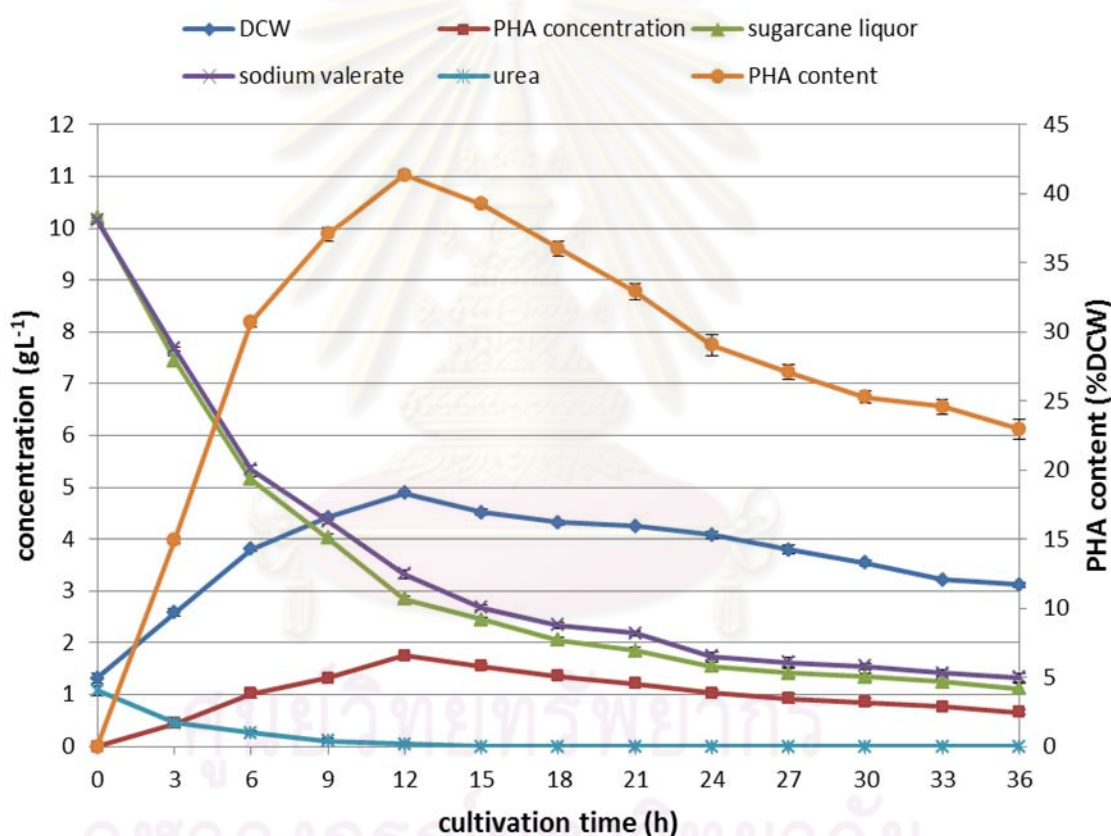
ศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จาก *B. megaterium* P-12 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตรและมียูเรียที่มีความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยควบคุมภาวะการเลี้ยงเชื้อตามที่ได้จากการศึกษา ได้แก่ ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารสำหรับการผลิต MSM เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที พบว่าเมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญ ผลิตและสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในระดับขวดเขย่าอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test ภาคผนวก ฉ) แสดงในตารางที่ 18 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.54



รูปที่ 4.54 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของและปริมาณ PHBV สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในระดับขวดเขย่าเปรียบเทียบกับเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร (สัญลักษณ์ abc แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ  $P < 0.05$  : ANOVA test)



เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตไปพร้อมกับการสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV โดยเจริญและสังเคราะห์ PHBV ได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.89 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ PHBV เท่ากับ 1.76 กรัมต่อลิตร และปริมาณ PHBV เท่ากับ 41.36 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ โดยพบว่า แหล่งคาร์บอนผสมจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อ แต่หลังจากชั่วโมง ที่ 12 ไปแล้วพบว่า อัตราการใช้แหล่งคาร์บอนจะช้าลงตามลำดับ ขณะที่ยูเรียได้ถูกใช้จนหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 4.55

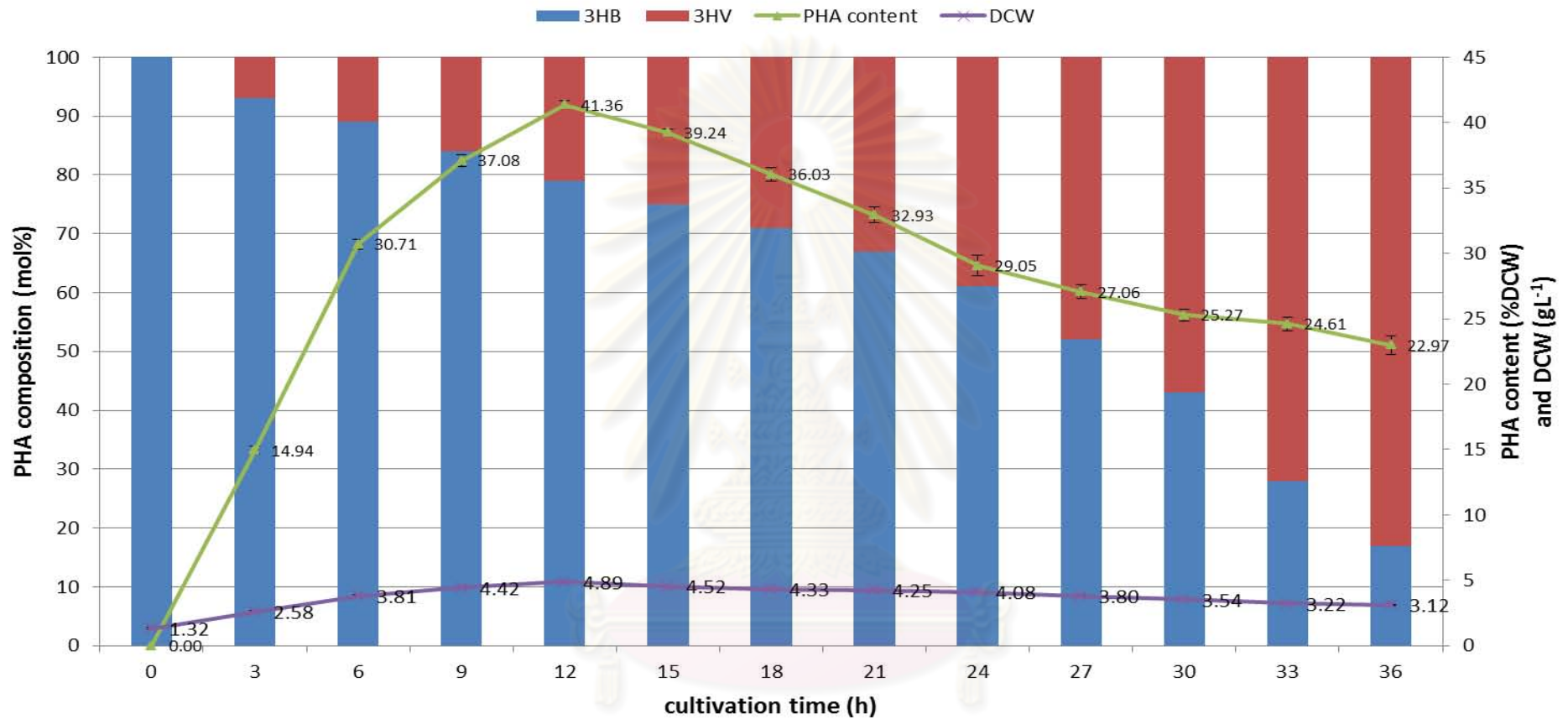


รูปที่ 4.55 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณยูเรีย เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตรและมียูเรีย 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้อัตราการกวนที่ 500 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ผลการศึกษาการเจริญ ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบภายใน PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่า *B. megaterium* P-12 จะค่อย ๆ เจริญและสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่ง *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญ และผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้สูงสุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHBV เท่ากับ 4.89 กรัมต่อลิตร และ 41.36 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์ จากนั้น เซลล์จะเจริญและสะสมโคพอลิเมอร์ลดลงตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป ขณะที่สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึง 83 โมลเปอร์เซ็นต์เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ แสดงในตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.56

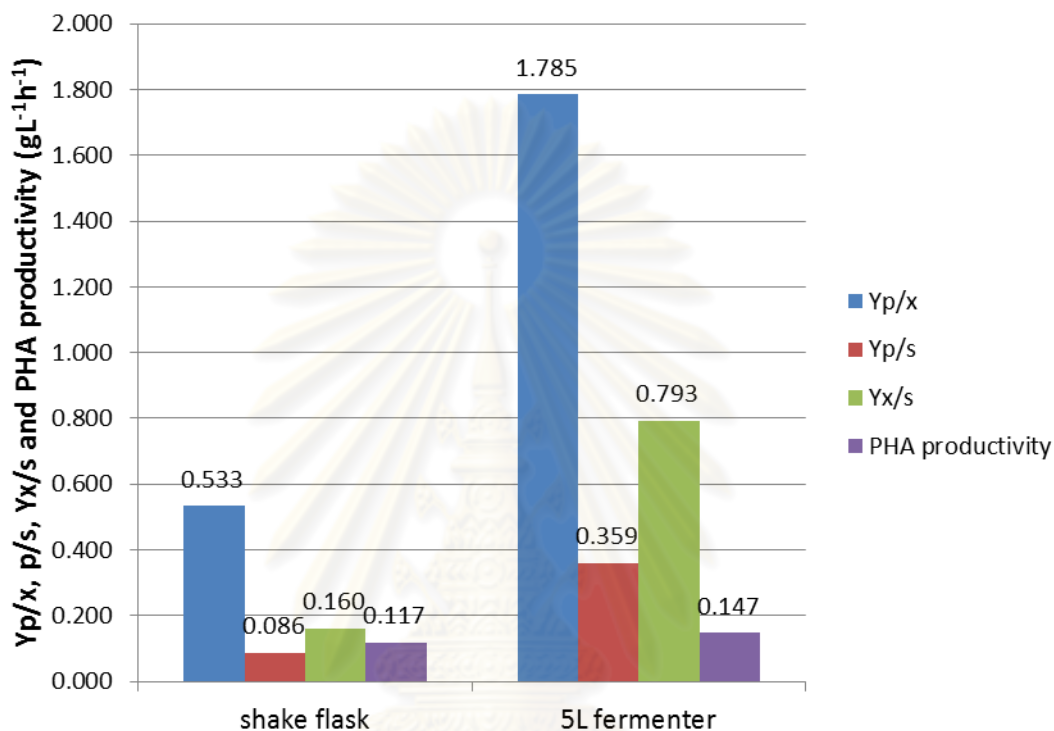
ตารางที่ 4.7 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้และสัดส่วน โมลเปอร์เซ็นต์ ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบในโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

Time (h)	DCW (gL <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA composition (mol %)	
			3HB	3HV
0	1.32±0.10	0.00±0.00	0	0
3	2.58±0.07	14.94±0.29	93	7
6	3.81±0.05	30.71±0.37	89	11
9	4.42±0.06	37.08±0.48	84	16
12	4.89±0.06	41.36±0.31	79	21
15	4.52±0.07	39.24±0.28	75	25
18	4.33±0.05	36.03±0.55	71	29
21	4.25±0.04	32.93±0.60	67	33
24	4.08±0.07	29.05±0.78	61	39
27	3.80±0.08	27.06±0.53	52	48
30	3.54±0.05	25.27±0.46	43	57
33	3.22±0.03	24.61±0.53	28	72
36	3.12±0.04	22.97±0.71	17	83



รูปที่ 4.56 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ โคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วน โมลเปอร์เซ็นต์ของ โมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบในโคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* P-12 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตรและมียูเรีย 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้อัตราการกวนที่ 500 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* P-12 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า มีค่าอัตราการผลิต PHBV  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า โดยมีค่าเท่ากับ 0.147 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 1.785 0.359 และ 0.793 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.57



รูปที่ 4.57 เปรียบเทียบค่าอัตราการผลิต PHBV  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* P-12 ในระดับขวดเขย่ากับเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่า การเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* P-12 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 29.37 25.71 และ 11.60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เนื่องจากสามารถจัดภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อได้ เช่น มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างได้ตามต้องการ มีการปั่นกววนด้วยใบกววนทำให้เกิดการผสมได้ดี เซลล์จึงสามารถเจริญและสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้ดีกว่า ซึ่งสัมพันธ์กับค่าอัตราการผลิต โดยพบว่า ค่าอัตราการผลิตเมื่อเลี้ยง *B.megaterium* P-12 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพิ่มขึ้นเป็น 0.147 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น 25.64 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า ดังสรุปไว้ในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สูงสุด รวมทั้งค่าอัตราการผลิตระหว่างการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในระดับขวดเขย่ากับการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร

Culture mode	maximum DCW (gL <sup>-1</sup> )	maximum PHA conc. (gL <sup>-1</sup> )	maximum PHA content (%DCW)	PHA productivity (gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
shake flask	3.78±0.03	1.40±0.02	37.06±0.26	0.117
5L fermenter	4.89±0.06	1.76±0.04	41.36±0.31	0.147
Increasing percentage (%)	29.37	25.71	11.60	25.64

#### 4.7 สมบัติทางเคมีกายภาพบางประการของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้จาก *B. megaterium* P-12

สมบัติทางเคมีกายภาพของโคพอลิเมอร์ PHBV ขึ้นอยู่กับปริมาณโมโนเมอร์ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบภายในโคพอลิเมอร์ PHBV (Hocking และ Marchessault, 1994) ซึ่งในงานวิจัยนี้สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีปริมาณ 3HV ได้หลากหลายขึ้นอยู่กับปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.37) แต่ผู้วิจัยได้เลือกการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นค่าที่อยู่ในช่วงที่มีรายงานว่า ส่งผลให้พลาสติกมีสมบัติเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้งาน (Nobes และคณะ, 1994 ; Barker และคณะ, 1997 ; Sudesh และคณะ, 2000 ; Volova, 2004 และ Rudnik, 2008)

เมื่อวิเคราะห์สมบัติทางอุณหภูมิ พบว่า โคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตจาก *B. megaterium* P-12 มีอุณหภูมิหลอมเหลว ( $T_m$ ) และอุณหภูมิกลาสทรานสิชัน ( $T_g$ ) เท่ากับ 143.44 และ -17.09 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และรูปที่ 1 ภาคผนวก จ) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสมบัติทางอุณหภูมิของ PHBV ที่ผลิตได้กับงานวิจัยของ Zakaria และคณะ (2010) ที่ได้ศึกษาสมบัติทางกายภาพของ PHBV ที่ผลิตได้จาก *Comamonas* sp. EB172 ซึ่งมีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์เท่ากัน พบว่า โคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้มีอุณหภูมิหลอมเหลวใกล้เคียงกัน ขณะที่อุณหภูมิกลาสทรานสิชันค่อนข้างแตกต่างกันมาก ทั้งนี้เนื่องจากมีสิ่งเจือปน (impurity) อยู่ในตัวอย่างที่ทดสอบ สังเกตได้จากมีจุดสูงสุดของกราฟมากกว่า 1 จุด (ดังรูปที่ 1 ภาคผนวก จ)



สำหรับน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย พบว่า โคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักเท่ากับ  $598 \times 10^5$  และ  $653 \times 10^5$  Da ตามลำดับ คิดเป็นค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (Polydispersity Index , PDI) เท่ากับ 1.09 (ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และรูปที่ 2 ภาคผนวก จ) จะเห็นได้ว่าโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้จาก *B.megaterium* P-12 (มีปริมาตร 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์) มีค่า PDI ใกล้เคียง 1.0 แสดงว่าโคพอลิเมอร์มีการกระจายของโมเลกุลค่อนข้างสม่ำเสมอ กล่าวคือ มีขนาดโมเลกุลของสายพอลิเมอร์ใกล้เคียงกัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Zakaria และคณะ (2010) พบว่า โคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนสูงกว่า ขณะที่ค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า จึงสามารถสรุปได้ว่า โคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้ น่าจะมีสมบัติทางเคมีกายภาพดีกว่าในงานวิจัยของ Zakaria และคณะ (2010) ทั้งนี้เนื่องจากพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า จะมีความแข็งแรงและทนความร้อนได้ดีกว่าพอลิเมอร์ชนิดเดียวกันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า และการมีค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่า ยังแสดงให้เห็นว่า ขนาดโมเลกุลในสายโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้มีความใกล้เคียงกันมากกว่า ซึ่งเป็นสมบัติที่ดีของพอลิเมอร์ (เสาวรจน์ ช่วยจุดจิตน์, 2538)

ตารางที่ 4.9 สมบัติทางเคมีกายภาพบางประการของ PHBV ที่ผลิตได้จาก *B.megaterium* P-12 เปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น

อุณหภูมิ หลอมเหลว (°C)	อุณหภูมิ ทรานสิชัน (°C)	น้ำหนักโมเลกุล (Da)		ค่าดัชนีการ กระจายของ น้ำหนัก โมเลกุล ( $M_w/M_n$ )	แหล่งอ้างอิง
		น้ำหนัก โมเลกุลเฉลี่ย โดยจำนวน ( $M_n$ )	น้ำหนัก โมเลกุลเฉลี่ย โดยน้ำหนัก ( $M_w$ )		
143.44	-17.09	598,000	653,000	1.09	งานวิจัยนี้
138.5	-0.1	174,000	NR	2.2	Zakaria <i>et.al.</i> , 2010

หมายเหตุ NR : Not Reported

### สรุปผลการทดลอง

1. เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Bacillus* sp. P-12 ที่คัดแยกได้ใหม่ทางอนุกรมวิธาน สามารถจัดจำแนกสปีชีส์ได้เป็น *Bacillus megaterium* P-12
2. *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 6.15 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ
3. อายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อการผลิต P(3HB) และ PHBV คือ กล้าเชื้อที่มีอายุ 6 ชั่วโมง เนื่องจากได้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.108 ต่อชั่วโมง
4. *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญ ผลิตและสะสม P(3HB) ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM ซึ่งมีซูโครสที่มีความเข้มข้น 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 3.26 กรัมต่อลิตร 1.85 กรัมต่อลิตรและ 56.64 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีค่าอัตราการผลิต P(3HB) Yp/x Yp/s และ Yx/s เท่ากับ 0.087 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.959 0.222 และ 0.232 ตามลำดับ
5. *B. megaterium* P-12 สามารถผลิตและสะสม P(3HB) ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM ที่มีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 5.21 กรัมต่อลิตรและ 56.46 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีค่าอัตราการผลิต P(3HB) Yp/x Yp/s และ Yx/s เท่ากับ 0.188 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.914 0.357 และ 0.364 ตามลำดับ ขณะที่ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 13.05 กรัมต่อลิตรเมื่อเลี้ยงในน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50.0 กรัมต่อลิตร
6. เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญ ผลิตและสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ของ *B. megaterium* P-12 ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตและน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมโพธิโอเนต พบว่า *B. megaterium* P-12 เจริญและสังเคราะห์ PHBV ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตได้ดีกว่าในน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมโพธิโอเนต เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สูงกว่าในทุกอัตราส่วนที่ทำการทดลอง (15:5 10:10 และ 5:15 กรัมต่อลิตรต่อกรัมต่อลิตร)
7. *B. megaterium* P-12 สามารถให้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV อยู่ในช่วงที่ต้องการ คือ มีปริมาณ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 10.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตร โดยมีแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้น

และปริมาณ PHBV เท่ากับ 3.19 กรัมต่อลิตร 0.95 กรัมต่อลิตร และ 29.78 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีค่าอัตราการผลิต PHBV  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เท่ากับ 0.049 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.446 0.104 และ 0.094 ตามลำดับ

8. เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM ที่มียูเรีย 1.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 10.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *B. megaterium* P-12 สามารถผลิตและสะสม PHBV ได้สูงกว่ายูเรียที่มีความเข้มข้นอื่นๆ โดยมีความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สูงสุดเท่ากับ 1.40 กรัมต่อลิตร และ 37.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีค่าอัตราการผลิต PHBV  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เท่ากับ 0.117 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.533 0.086 และ 0.160 ตามลำดับ ขณะที่ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.10 กรัมต่อลิตรเมื่อเลี้ยงในยูเรียที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร

9. เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50 มิลลิลิตร พบว่า *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญ ผลิตและสะสม PHBV ได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในภาวะการเลี้ยงเชื้ออื่น โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สูงสุด เท่ากับ 3.78 กรัมต่อลิตร 1.40 กรัมต่อลิตร และ 37.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีค่าอัตราการผลิต PHBV  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เท่ากับ 0.117 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.533 0.086 และ 0.160 ตามลำดับ

10. เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะที่ได้จากการศึกษาในระดับขวดเขย่า พบว่า ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สูงกว่าการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า โดยมีค่าเท่ากับ 4.89 กรัมต่อลิตร 1.76 กรัมต่อลิตร และ 41.36 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีค่าอัตราการผลิต PHBV  $Y_{p/x}$   $Y_{p/s}$  และ  $Y_{x/s}$  เท่ากับ 0.147 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 1.785 0.359 0.793 ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากระดับขวดเขย่า เท่ากับ 25.64 29.37 25.71 และ 11.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

11. เมื่อศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพบางประการ รวมทั้งน้ำหนักโมเลกุลของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้จาก *B. megaterium* P-12 ซึ่งมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์ พบว่ามีอุณหภูมิหลอมเหลวและอุณหภูมิกลาสทรานสิชันเท่ากับ 143.44 และ -17.09 องศาเซลเซียสตามลำดับ และมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน เท่ากับ  $6.53 \times 10^5$  และ  $5.98 \times 10^5$  ดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.09 แสดงว่ามีการกระจายขนาดโมเลกุลของสายพอลิเมอร์ใกล้เคียงกัน

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จาก *Bacillus megaterium* P-12 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ใหม่ในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัย โดยได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อและอายุที่เหมาะสมสำหรับเป็นกล้าเชื้อของ *B. megaterium* P-12 เพื่อใช้ในการเตรียมเป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตเป็นโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) และโคพอลิเมอร์ PHBV และได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ การสังเคราะห์และสะสม PHBV ในการเลี้ยงเชื้อระดับขวดเขย่า โดยศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และภาวะในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ ตามลำดับ พบว่า *B. megaterium* P-12 เจริญเติบโตไปพร้อมกับการสังเคราะห์ PHBV โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ PHBV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุดเมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน จากนั้น จึงได้ขยายส่วนการผลิตจากการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าไปในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยควบคุมภาวะการเลี้ยงเชื้อตามที่ได้จากการศึกษาในระดับขวดเขย่า พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ที่ผลิตได้ รวมทั้งค่าอัตราการผลิต PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมักมีค่าสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในระดับขวดเขย่า

#### 5.1 การจัดจำแนกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. P-12 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ใหม่

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมีและอาศัยเทคนิคทางอนุชีววิทยาโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA สามารถจัดจำแนก *Bacillus* sp. P-12 ได้เป็น *Bacillus megaterium* P-12

Law และคณะ (2003) รายงานว่า แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. มีข้อดีกว่าแบคทีเรียในสกุลอื่นอยู่หลายประการ ได้แก่ สามารถแบ่งตัวได้รวดเร็ว ไม่ผลิตสารเอนโดท็อกซิน (endotoxins) เจริญได้ดีในแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก และยังสามารถผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆออกมาได้ในปริมาณมาก นอกจากนี้ Omar และคณะ (2001) ยังพบว่า *Bacillus megaterium* สามารถเจริญและสังเคราะห์ PHAs ได้ในแหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย ได้แก่ ซูโครส ฟรักโตส กลูโคส แลคโตส น้ำเชื่อมจากพุทรา และ กากน้ำตาลจากหัวบีท เป็นต้น และสามารถสังเคราะห์ PHAs ได้ในปริมาณสูงเมื่อเทียบกับสปีชีส์อื่น เนื่องจากเซลล์มีขนาดใหญ่ ทำให้มีพื้นที่ในการเก็บสะสม PHAs ที่ผลิตได้มาก



## 5.2 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อและอายุที่เหมาะสมสำหรับเป็นกล้าเชื้อของ *Bacillus megaterium* P-12

Grothe และคณะ (1999) ; Du และคณะ (2001) ; Rocha และคณะ (2008) ; Keshavarz และ Roy (2010) รายงานว่า การสังเคราะห์และสะสม PHAs ควรเป็นกระบวนการสองขั้นตอน (two-phase process) ขั้นตอนแรก จุลินทรีย์จะมีการเจริญในแหล่งคาร์บอน โดยจุลินทรีย์จะนำสารอาหารนั้นไปสร้างองค์ประกอบของเซลล์และผลิตเซลล์ปริมาณมาก แต่ผลิตพอลิเมอร์ได้ต่ำ เรียกว่าระยะการเจริญของเซลล์ (growth phase) ส่วนในขั้นตอนที่สอง มีการจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือออกซิเจน ขณะที่แหล่งคาร์บอนมากเกินไป เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์และสะสม PHAs เรียกว่า ระยะสะสมผลิตภัณฑ์ (accumulation phase) ซึ่งเซลล์ปริมาณมากที่ได้ในขั้นตอนแรกก็จะใช้สารอาหารนั้นเพื่อนำไปผลิตเป็น PHAs โดยอาจมีการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรืออาจไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้น แต่ขนาดของเซลล์ จะใหญ่ขึ้นเนื่องมาจากการสังเคราะห์และสะสม PHAs ภายในเซลล์ ดังนั้น การผลิตกล้าเชื้อให้ได้ปริมาณมากในขั้นตอนแรกจะส่งผลทำให้ได้ปริมาณ PHAs เพิ่มขึ้น

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ ซึ่งได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของกล้าเชื้อ เพื่อผลิตเซลล์ให้ได้ปริมาณมากในขั้นตอนแรก พบว่า *B. megaterium* P-12 เจริญในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ดีที่สุด โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 6.15 กรัมต่อลิตรและ 0.0893 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนอายุที่เหมาะสมสำหรับเป็นกล้าเชื้อของ *B. megaterium* P-12 เพื่อใช้ในการเตรียมเป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตโพลิเมอร์ P(3HB) และโคพอลิเมอร์ PHBV คือ กล้าเชื้อที่มีอายุ 6 ชั่วโมง เนื่องจากมีค่าอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.108 ต่อชั่วโมง

## 5.3 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการเจริญ การผลิตโพลิเมอร์ P(3HB) และโคพอลิเมอร์ PHBV รวมถึงสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV

### 5.3.1 ผลของชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB

#### 5.3.1.1 ผลของชนิดแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB

*B. megaterium* P-12 เจริญเติบโต ผลิตและสะสมพอลิเมอร์ P(3HB) ได้ดีที่สุดในซูโครส โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) ปริมาณพอลิเมอร์ P(3HB) และค่าอัตราการผลิตสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 3.26 กรัมต่อลิตร 1.85 กรัมต่อลิตร 56.64 เปอร์เซ็นต์โดย



น้ำหนักเซลล์แห้ง และ 0.087 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับงานวิจัยของ รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ที่พบว่า *B.megaterium* BA-019 สามารถเจริญและผลิต P(3HB) ได้ดีเมื่อเลี้ยงในซูโครส โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 2.65 กรัมต่อลิตรและ 47 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

จากการที่ *B.megaterium* P-12 เจริญและสะสมพอลิเมอร์ P(3HB) ได้ดีในซูโครส จึงมีความสนใจในการนำแหล่งคาร์บอนที่มีราคาไม่แพงมาใช้ทดแทนการใช้ซูโครส ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HB แทนการใช้ซูโครส เนื่องจากในน้ำอ้อยมีซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก (วิเคราะห์โดย HPLC ภาคผนวก ก) เพื่อเป็นการช่วยลดราคาต้นทุนของแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHAs

### 5.3.1.2 ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB

เมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเพิ่มขึ้น *B.megaterium* P-12 สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น แต่มีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ลดลง โดยในน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50.0 กรัมต่อลิตร *B.megaterium* P-12 สามารถเจริญได้ดีที่สุดโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 13.05 กรัมต่อลิตร ขณะที่เมื่อเลี้ยงในน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 5.21 กรัมต่อลิตร และ 56.64 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เนื่องมาจากการมีสารอาหารที่สมบูรณ์มากกว่า ส่งผลให้จุลินทรีย์นำสารอาหารที่มีอยู่อย่างสมบูรณ์ไปใช้ในการสร้างเซลล์และเพิ่มจำนวนมากกว่าจะนำไปสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่เก็บไว้ใช้ในยามขาดแคลนสารอาหารที่จำเป็น (Evan และ Sikdar, 1990) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของศรีบุญญา แก้วประดับ (2553) ที่ได้รายงานไว้ว่า *Bacillus megaterium* BA-019 สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุดในน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30.0 กรัมต่อลิตร โดยมีความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 3.85 กรัมต่อลิตร และ 43.16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 12.44 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50.0 กรัมต่อลิตร และยังสนับสนุนได้ด้วยงานวิจัยของ Sirisansaneeyakul และคณะ (2003) ที่ได้รายงานไว้ว่า *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 ผลิตและสะสม P(3HB) ได้ปริมาณมากเมื่อเลี้ยงในซูโครสที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตร โดยพบว่า สังเคราะห์ P(3HB) ได้สูงสุดเท่ากับ 69 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใกล้จะสิ้นสุดระยะเวลาการเจริญแบบทวีคูณ ขณะที่ความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 40.0 กรัมต่อลิตร พบว่า จะไปมีผลยับยั้งการผลิต P(3HB) ดังนั้น ปริมาณหรือความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสำหรับ

ผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HB จะมีค่าที่เหมาะสมอยู่ค่าหนึ่งเท่านั้น (critical concentration) ถ้าหากมีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินไป จะไปมีผลยับยั้งการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB) ของจุลินทรีย์ (Ahmed และ Holland , 1995)

เมื่อพิจารณาความสามารถในการเจริญและสังเคราะห์ P(3HB) ระหว่าง *B. megaterium* P-12 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ใหม่ในงานวิจัยนี้กับ *B. megaterium* BA-019 สายพันธุ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการปัจจุบัน พบว่า *B. megaterium* P-12 มีความสามารถในการผลิต P(3HB) ได้ดีกว่าใน *B. megaterium* BA-019 เนื่องจากได้ค่าอัตราการผลิตสูงกว่าโดยมีค่าเท่ากับ 0.188 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ขณะที่ *B. megaterium* BA-019 มีค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.145 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ศรีัญญา แก้วประดับ, 2553) เมื่อทำการทดลองภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อเดียวกัน

### 5.3.2 ผลของชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนผสมเพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV

#### 5.3.2.1 ผลของชนิดแหล่งคาร์บอนผสมเพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV

*B. megaterium* P-12 สามารถเจริญ ผลิตและสะสม PHBV ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตได้ดีกว่าในน้ำอ้อยกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต เนื่องจากมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงกว่าในทุกอัตราส่วน (15:5 10:10 และ 5:15 กรัมต่อลิตรต่อกรัมต่อลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Loo และ Sudesh (2007a) ที่รายงานว่า กรดวาเลอริกหรือเกลือโซเดียมวาเลอเรตเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ใน *Delftia acidovorans* ได้ดีกว่ากรดโพรพิโอเนตหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต โดยได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ทั้งนี้เนื่องจากกรดโพรพิโอเนตเป็นกรดคาร์บอกซิลิกที่มีสายโซ่ของหมู่อัลคิล (n-alkyl chain) สั้นและมีค่า pKa เท่ากับ 4.87 ซึ่งสูงกว่ากรดวาเลอริกที่มีค่า pKa เท่ากับ 4.75 ซึ่งจากการที่กรดโพรพิโอเนตมีค่า pKa สูงกว่านี้ จะมีความสามารถในการแตกตัวได้ดีกว่า จึงแสดงความเป็นกรดได้มากกว่า และเพื่อตอบสนองต่อการสะสมของโปรตอน ( $H^+$ ) เซลล์จึงต้องปล่อยพลังงานอิสระ (free energy) ออกมาเพื่อขับ  $H^+$  ที่มีมากเกินไปออกจากเซลล์เพื่อรักษาระดับ  $H^+$  gradient ภายในเซลล์ให้คงที่ ซึ่งจากการที่ต้องดึงพลังงานออกมาใช้มากขึ้นเอง จะมีผลไปลดกิจกรรมของเซลล์ อันจะส่งผลให้ผลผลิต PHAs น้อยลงตามไปด้วย โดยผลของการยับยั้ง (Inhibitory effect) ของสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HV เรียงลำดับจากน้อยไปมากได้ดังนี้ เกลือโซเดียมวาเลอเรต < กรดวาเลอริก < เกลือโซเดียมโพรพิโอเนต < กรดโพรพิโอเนต และจากงานวิจัยของ Sheu และคณะ (2009) ที่ได้เปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างเกลือโซเดียมกลูโคเนตกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตกับแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างเกลือโซเดียมกลูโคเนตกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตเพื่อผลิตเป็นโคพอลิเมอร์ PHBV ใน *Caldimonas taiwannensis* ผลการศึกษา พบว่า *C. taiwannensis* สะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ได้

สูงสุดเท่ากับ 74 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างเกลือโซเดียมกลูโคเนตกับเกลือโซเดียมวาเลอเรต โดยได้ปริมาณ 3HV ตั้งแต่ 10 ถึง 95 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมวาเลอเรตตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.6 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างเกลือโซเดียมกลูโคเนตกับเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต พบว่า เซลล์หยุดการเจริญและการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV เมื่อมีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตมากกว่า 0.2 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า *C. taiwannensis* สามารถใช้เกลือโซเดียมวาเลอเรตเพื่อผลิตเป็นโคพอลิเมอร์ PHBV ได้ดีกว่าการใช้เกลือโซเดียมโพรพิโอเนตและเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ 3HV ที่ผลิตได้ระหว่างการใช้เกลือโซเดียมวาเลอเรตและเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต พบว่า เมื่อใช้เกลือโซเดียมวาเลอเรตกับน้ำอ้อย ได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV สูงกว่าการใช้เกลือโซเดียมโพรพิโอเนต ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ramsay และคณะ (1990) ที่ได้รายงานไว้ว่า เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes latus* ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างซูโครสกับกรดโพรพิโอนิกที่มีความเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร พบว่า ได้ปริมาณ PHBV ที่มีสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 15 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างซูโครสกับกรดวาเลอริก (ที่ความเข้มข้นเท่ากัน) ที่ได้ปริมาณ 3HV สูงถึง 38 โมลเปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็นโมโนเมอร์ 3HV ได้ทั้งหมด โดยส่วนหนึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติลโคเอ ซึ่งเป็นสารตัวกลางสำหรับการผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HB เห็นได้จากเมื่อใช้เกลือโซเดียมโพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว จะสามารถสังเคราะห์ได้เป็นโมโนเมอร์ทั้ง 3HB และ 3HV ขณะที่เมื่อใช้เกลือโซเดียมวาเลอเรตเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า จะได้โพรพิโอนิลโคเอ (propionyl-CoA) ซึ่งเป็นสารตัวกลางของกระบวนการสังเคราะห์โมโนเมอร์ 3HV เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการ  $\beta$ -oxidation แทนที่จะเป็นอะซิติลโคเอ (Doi และคณะ, 1987)

### 5.3.2.2 ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอนผสมเพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV

เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตร กับเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตร (ซึ่งมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน) พบว่า สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของ 3HV อยู่ในช่วงที่ต้องการ คือ มีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์ แต่ยังมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ต่ำ โดยมีค่าเท่ากับ 3.19 กรัมต่อลิตร 0.95 กรัมต่อลิตร และ 29.78 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HV ให้สูงขึ้น มีผลไปลดน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHBV ให้ต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจากการเติมกรดอินทรีย์หรือเกลือของกรดอินทรีย์ ซึ่งในการทดลองนี้ได้แก่ เกลือโซเดียมวาเลอเรต ที่มีความเข้มข้นสูงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจมีผลไป

เพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ไม่ดีและสะสมโคพอลิเมอร์ได้น้อย (Ramsay และคณะ, 1990 ; Rhee และคณะ, 1993 ; Yu และคณะ, 2005) ดังนั้น จึงต้องหาแนวทางในการเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และปริมาณโคพอลิเมอร์ให้สูงขึ้น ซึ่งวิธีการหนึ่งก็คือการหาแหล่งไนโตรเจนแหล่งใหม่มาทดแทนการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิต

สรุปได้ว่า ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV สามารถถูกควบคุมได้ด้วยชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนหลักและโคสับสเตรตที่ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเป็นโมโนเมอร์ 3HV (Ramasy และคณะ, 1990 ; Yu และคณะ, 2005)

#### 5.4 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญ การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV

##### 5.4.1 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจน

เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ค่าอัตราการผลิต PHBV และ  $Y_{x/s}$  สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในแอมโมเนียมซัลเฟต โดยมีค่าเท่ากับ 0.067 และ 0.121 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ แม้ว่าจะมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในแอมโมเนียมซัลเฟต ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแอมโมเนียมซัลเฟตสามารถแตกตัวและละลายน้ำได้เร็วกว่า (Sakami และ Harrington, 1963) เซลล์จึงนำไปใช้ในการเจริญและสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ได้เร็วกว่ายูเรียในช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อพิจารณาโดยตลอดการเลี้ยงเชื้อ พบว่า การใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ได้ดีกว่า นอกจากนี้ ยูเรียยังมีข้อได้เปรียบกว่าแอมโมเนียมซัลเฟตในด้านของราคา โดย Loo และ Sudesh (2007b) รายงานว่า ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิต PHAs เนื่องจากมีราคาถูกและช่วยส่งเสริมการผลิตพอลิเมอร์ PHAs ได้

สุดา สุภาวินสวัสดิ์ (2542) รายงานว่า *B.megaterium* BA-019 สามารถใช้ยูเรียเป็นสับสเตรตได้และให้ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์และสารสกัดจากยีสต์ โดยได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณ PHBV สูงสุดเท่ากับ 24 โมลเปอร์เซ็นต์และ 50.44 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีปริมาณยูเรียต่ำคือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 500 โมลต่อโมล

Lee และคณะ (2008) เปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของ *Cupriavidus necator* H16 ระหว่างแอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต โซเดียมไนเตรตและยูเรีย พบว่า เมื่อใช้ยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟต *C. necator* H16 สามารถเจริญและสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ได้ใกล้เคียงกัน โดยพบว่า มีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHBV เท่ากับ 6.8 กรัมต่อลิตร และ 90 เปอร์เซ็นต์



โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในแอมโมเนียมซัลเฟต ขณะที่เมื่อเลี้ยงใน ยูเรีย พบว่า มีน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHBV ต่ำกว่าเล็กน้อย คือมีค่าเท่ากับ เท่ากับ 6.3 กรัมต่อลิตร และ 89 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้เลือกใช้ยูเรียเป็นแหล่ง ไนโตรเจนเนื่องจากมีราคาถูกกว่าแอมโมเนียมซัลเฟต

#### 5.4.2 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน

เมื่อมีความเข้มข้นของยูเรียเพิ่มขึ้น *B. megaterium* P-12 เจริญได้ดีขึ้น แต่ผลิตและสะสม โคพอลิเมอร์ PHBV ลดลง โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.10 กรัมต่อลิตรเมื่อเลี้ยงเชื้อ ในอาหาร MSM ซึ่งมียูเรียที่มีความเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ขณะที่ได้ความเข้มข้นและปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในยูเรียที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 1.40 กรัมต่อลิตร และ 37.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV เท่ากับ 21 โมล เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rhee และคณะ (1993) ที่ได้รายงานไว้ว่า อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนระหว่างกลูโคสกับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 23.1 ได้ปริมาณ PHBV สูงสุด เท่ากับ 57 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 62 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4.3 พบว่า ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่า คือมีค่าเท่ากับ 77 กรัมต่อลิตร แต่มีปริมาณ PHBV เพียง 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งต่ำกว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23.1 เกือบ 2 เท่า แสดงให้เห็นว่า เมื่อมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนน้อยลง กล่าวคือ มีความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเพิ่มขึ้น จุลินทรีย์จะเจริญเติบโตได้ดีขึ้น แต่มีการสะสมโคพอลิเมอร์ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และคณะ (2008) ที่มีรายงานว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยูเรียให้สูงขึ้น มีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม PHBV ของ *Cupriavidus necator* H16 โดยพบว่า ที่ความเข้มข้นของยูเรียเท่ากับ 30 mM *C. necator* H16 สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ได้เพียง 29 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ขณะที่ความเข้มข้นของยูเรียเท่ากับ 10 mM เชื้อสามารถผลิต PHBV ได้สูงถึง 79 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ทั้งนี้เนื่องมาจากการมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนมากเกินไป มีผลทำให้ acetyl-CoA เปลี่ยนวิถีไปเข้าวัฏจักร TCA เพื่อสร้างพลังงานและกรดอะมิโนแทนที่จะสังเคราะห์เป็น PHAs จึงทำให้มี CoA อิสระมากขึ้น แต่ acetoacetyl-CoA ลดลง ขณะที่ถ้ามีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน จะมีการใช้ NADPH น้อยลง ซึ่งจะมีผลไปยังวัฏจักรสังเคราะห์กรดอะมิโน โดยเฉพาะปฏิกิริยาการเปลี่ยนอัลฟา-คีโตกลูตาเรต ( $\alpha$ -ketoglutarate) ไปเป็นกลูตามัต (glutamate) ทำให้เกิดการสะสม NADPH ภายในเซลล์มากขึ้น ซึ่ง NADPH นี้เองจะไปกระตุ้นการสังเคราะห์ PHAs ให้เกิดขึ้นได้ (Lee และคณะ, 1999 ; Sankhla และคณะ, 2010) ดังนั้น การ



จำกัดแหล่งไนโตรเจนจึงมีค่าที่เหมาะสมอยู่ค่าหนึ่ง (critical concentration) ซึ่งหากมีปริมาณไนโตรเจนมากเกินไป เซลล์จะเจริญเติบโตมากกว่าที่จะเกิดการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ แต่หากมีปริมาณไนโตรเจนน้อยเกินไป จะทำให้เซลล์ไม่เจริญหรือเจริญได้น้อยอันจะส่งผลให้มีปริมาณโคพอลิเมอร์น้อยลงตามไปด้วย (Annuar และคณะ, 2003)

นอกจากนี้ ยังพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยูเรียให้สูงขึ้น สัดส่วน โมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HV จะสูงขึ้นตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นของยูเรียเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร จะมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 20 โมลเปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเข้มข้นของยูเรียเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร จะมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 35 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และคณะ (2008) ที่ได้รายงานไว้ว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยูเรียตั้งแต่ 10 จนถึง 30 mM จะไปมีผลต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ของเชื้อ *C. necator* H16 โดยพบว่า สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV จะมีค่าตั้งแต่ 5 ถึง 23 โมลเปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยูเรียที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Rhee และคณะ (1993) ที่ได้รายงานไว้ว่า อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีผลโดยตรงต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ PHBV พบว่าเมื่ออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนลดลง จะมีโมโนเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 5.1 ถึง 6.3 โมลเปอร์เซ็นต์ สรุปได้ว่า ปริมาณ PHBV และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ PHBV สามารถถูกควบคุมได้ด้วยปริมาณของแหล่งไนโตรเจน (Kim และคณะ, 1992)

## 5.5 การเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญ การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV

### 5.5.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

*B. megaterium* P-12 ที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีค่าความเป็น กรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 สามารถเจริญและผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้สูงสุดโดยมีค่าเท่ากับ 3.78 กรัมต่อลิตร 1.40 กรัมต่อลิตร และ 37.06 ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 และ 8.0 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kinoshita และคณะ (1991) ที่ได้รายงานไว้ว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต PHAs พบว่า ควรทำการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างไม่ให้ต่ำกว่า 7.0 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดมากเกินไป เนื่องจากเอนไซม์สำคัญที่ใช้ในการสังเคราะห์ PHAs สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0

Loo และ Sudesh (2007a) รายงานว่า *Delftia acidovorans* ผลิตและสะสมโพลีเมอร์ PHBV ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 โดยได้ปริมาณโพลีเมอร์เท่ากับ 37 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสนับสนุนได้ด้วยงานวิจัยของ Lee และคณะ (2008) ที่ได้ศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวสำหรับการผลิตโพลีเมอร์ที่มีต่อปริมาณ PHBV พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นสำหรับการสังเคราะห์ PHBV ของ *Cupriavidus necator* H16 ที่เหมาะสมที่สุด มีค่าเท่ากับ 7.0 โดยสามารถสะสมโพลีเมอร์ได้สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งหากเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้สูงกว่านี้ จะไปมีผลทำให้มีการสะสม PHBV ลดลงเหลือเพียง 63 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *C. necator* H16 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5 ขณะที่เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เป็นกรด คือมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0-5.5 เซลล์สะสมแต่ไฮโมโพลีเมอร์ P(3HB) แต่ไม่สะสมโพลีเมอร์ PHBV เช่นเดียวกับในงานวิจัยของ Zakaria และคณะ (2010) ที่ได้รายงานว่ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญของ *Comamonas sp.* EB172 พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.1 กรัมต่อลิตร ขณะที่ได้ปริมาณโพลีเมอร์ PHBV สูงสุดเท่ากับ 59 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ทั้งนี้เนื่องมาจากในภาวะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ จะขาดความสมดุลระหว่างปริมาณไอออนของไฮโดรเจนและไฮดรอกไซด์ ส่งผลต่อการผ่านเข้าออกของสารอาหารและเซลล์ไม่สามารถนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ นอกจากนี้ ยังทำให้เกิดความเป็นพิษเนื่องจากมีปริมาณกรดในระบบมากเกินไป (Luli and Strohl, 1990) โดยการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 เป็นการปรับปริมาณไฮโดรเจนอิสระที่แสดงประจุเป็นบวกให้ลดลงด้วยไฮดรอกไซด์ซึ่งมีประจุเป็นลบ ทำให้ไฮโดรเจนไอออนไม่สามารถส่งผลกระทบต่อเซลล์ (Du และคณะ, 2001) นอกจากนี้ ยังพบว่า เมื่อเพิ่มมีค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น ทำให้สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HV สูงขึ้นตามลำดับ โดยที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวสำหรับการผลิตเท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0 จะมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 18 21 และ 24 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และคณะ (2008) ที่ได้ศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวสำหรับการผลิตโพลีเมอร์ที่มีต่อองค์ประกอบของโมโนเมอร์ 3HV ภายในโพลีเมอร์ PHBV ใน *C. necator* H16 พบว่า ปริมาณโมโนเมอร์ 3HV ในโพลีเมอร์ PHBV จะสูงขึ้นเมื่อมีค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 12 ถึง 14 โมลเปอร์เซ็นต์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 7.5-8.5 เช่นเดียวกับในงานวิจัยของ Zakaria และคณะ (2010) ที่ได้รายงานว่ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารสำหรับการผลิต มีผลต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ใน *Comamonas sp.* EB172 โดยเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 6.5 จนถึง 8.0 จะส่งผลให้มี

ปริมาณ 3HV เพิ่มขึ้นจาก 45 ไปจนถึง 86 โมลเปอร์เซ็นต์ สรุปได้ว่า ทั้งภาวะที่เป็นกรดและค่าที่ไม่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตและสะสมโคพอลิเมอร์คือสภาวะที่เป็นกลาง ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0

### 5.5.2 ออกซิเจน

เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในขวดทดลองที่มีปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เท่ากับ 50 มิลลิลิตร สามารถเจริญและสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ได้สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 3.78 กรัมต่อลิตร 1.40 กรัมต่อลิตร และ 37.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในขวดทดลองที่มีปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เท่ากับ 25 75 และ 100 มิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rhee และคณะ (1993) ที่ได้รายงานไว้ว่าเมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. SH-69 ที่ค่า dissolved oxygen (DO) มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีผลไปเพิ่มน้ำหนักเซลล์แห้งจาก 35 กรัมต่อลิตรเป็น 66 กรัมต่อลิตร แต่สะสม PHBV ได้ลดลงเหลือเพียง 45 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกรณี DO ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์พบว่า ได้ปริมาณ PHBV สูงกว่าโดยมีค่าเท่ากับ 56 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณออกซิเจนมีผลโดยตรงต่อการผลิต PHAs โดยในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ citrate synthase และเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase จะถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้ acetyl-CoA ไม่เข้าสู่วัฏจักร TCA แต่จะเปลี่ยนไปเป็น acetoacetyl-CoA เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์และสะสม PHAs โดยเอนไซม์  $\beta$ -ketothiolase (Luengo และคณะ, 2003) ขณะที่การมีปริมาณออกซิเจนมากเกินไป จะไปมีผลไปเพิ่ม NAD(P)H<sub>2</sub> ในปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งทำให้เกิดการสังเคราะห์ PHBV ลดลง (Anderson และ Dawes, 1990) นอกจากนี้ ยังพบว่าปริมาณออกซิเจน ไม่มีผลต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ PHBV เนื่องจากโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ยังมีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV คงที่ คือมีค่าเท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์เท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rhee และคณะ (1993) ที่พบว่า การเพิ่มขึ้นของออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen, DO) ตั้งแต่ 2 จนถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ไม่ได้ทำให้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เปลี่ยนแปลง โดยยังมีปริมาณ 3HV คงที่อยู่ที่ประมาณ 2 ถึง 3 โมลเปอร์เซ็นต์ สรุปได้ว่า ปริมาณ PHBV และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ PHBV ขึ้นอยู่กับภาวะที่ใช้ในการหมัก (Rhee และคณะ, 1993)

### 5.6 ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จาก *Bacillus megaterium* P-12 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร พบว่า เชื้อสามารถเจริญ ผลิต และสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในระดับขวดเขย่า โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ความ

เข้มข้นและปริมาณ PHBV สูงสุดเท่ากับ 4.89 กรัมต่อลิตร 1.76 กรัมต่อลิตร และ 41.36 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีสัดส่วนของ โมโนเมอร์ 3HV เป็นองค์ประกอบภายใน PHBV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV ที่เพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า เท่ากับ 29.37 25.71 และ 11.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่าอัตราการผลิต PHBV เพิ่มขึ้นจากเดิม 25.64 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักสามารถจัดสภาวะต่างๆ ได้ดีกว่าในระดับขวดเขย่า เช่น สามารถควบคุมอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างได้ตลอดการเลี้ยง เชื้อ มีการกวนและการให้อากาศซึ่งจะช่วยให้เกิดการผสมได้ดีขึ้น เซลล์จึงสามารถนำสารอาหาร ไปใช้ได้ดี และยังสามารถควบคุมปริมาณอากาศที่จะเข้าสู่ถังหมักได้ตามต้องการ เป็นต้น

### 5.7 สมบัติทางเคมีกายภาพบางประการของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้จาก *B. megaterium* P-12

สมบัติทางเคมีกายภาพของโคพอลิเมอร์ PHBV ขึ้นอยู่กับปริมาณโมโนเมอร์ 3HV ใน PHBV (Hocking และ Marchessault, 1994) และน้ำหนักโมเลกุลของโคพอลิเมอร์ (เสาวรจน์ ช่วย จุลจิตน์, 2538) ซึ่งในการวิจัยนี้ สามารถผลิต PHBV ที่มีปริมาณ 3HV หลากหลายขึ้นกับปริมาณ ของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ผลิตเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV แต่ผู้วิจัยได้เลือกศึกษา สมบัติทางเคมีกายภาพของ PHBV ที่มีปริมาณโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน ซึ่งเมื่อวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพบาง ประการ พบว่า PHBV ที่ผลิตได้จาก *B. megaterium* P-12 มีอุณหภูมิหลอมเหลวและอุณหภูมิ กลาสทรานสิชันเท่ากับ 143.44 และ -17.09 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ งานวิจัยของ Zakaria และคณะ (2010) ที่ได้ศึกษาสมบัติทางกายภาพของ PHBV ที่ผลิตได้จาก *Comamonas* sp. EB 172 ซึ่งมีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เท่ากับ 21 โมลเปอร์เซ็นต์เท่ากัน พบว่า PHBV ที่ผลิตได้มีอุณหภูมิหลอมเหลวใกล้เคียงกัน ขณะที่อุณหภูมิกลาสทรานสิชันค่อนข้าง แตกต่างกันมาก ทั้งนี้อาจเนื่องจากการมีสิ่งเจือปน (impurity) อยู่ในตัวอย่างพอลิเมอร์ที่ทดสอบ

สำหรับน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ย พบว่า PHBV ที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้มีน้ำหนักโมเลกุล เฉลี่ยโดยจำนวนและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักเท่ากับ  $598 \times 10^5$  Da และ  $653 \times 10^5$  Da ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าในงานวิจัยของ Zakaria และคณะ แสดงว่าโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้จาก *B. megaterium* P-12 มีความแข็งแรงและทนความร้อนได้ดีกว่า นอกจากนี้ ยังมีค่าดัชนีการ กระจายของน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียง 1.0 คือมีค่าเท่ากับ 1.09 แสดงว่ามีการกระจายขนาดโมเลกุล สม่าเสมอและมีขนาดโมเลกุลในสายโคพอลิเมอร์ PHBV ใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นสมบัติของพอลิเมอร์ ที่ดี (เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตน์, 2538)

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยใช้จุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอนและเทคนิคการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน

Strains	3HB / 3HV-generating carbon sources	Culture mode	DCW (gL <sup>-1</sup> )	PHA conc. (gL <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA productivity (gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	References
<i>Bacillus megaterium</i> P-12	sugarcane liquor /sodium valerate	batch	4.89	1.76	41.36	0.15	This research
<i>Alcaligenes</i> sp. A-04	fructose/valeric acid	batch	10.91	5.94	54	0.17	พิศิษฐ คงกำเนิด, 2540
<i>Ralstonia eutropha</i>	whey and inverted sugar/propionic acid	fed-batch	4.75	0.98	37.00	0.17	Marangoni <i>et.al.</i> , 2002
<i>Ralstonia eutropha</i>	glucose/propionic acid	fed-batch	52.10	40.80	78.30	0.74	Du <i>et.al.</i> , 2001
<i>Ralstonia eutropha</i>	glucose /sodium propionate	continuous (pH -stat)	3.45	2.71	78.00	0.25	Yu <i>et.al.</i> , 2005
recombinant <i>E.coli</i>	glucose/propionic acid	fed-batch	141.90	88.10	62.10	1.73	Choi and Lee , 1999
<i>Azotobacter vinelandii</i> UWD	swine wastewater	batch	5.80	3.73	64.00	0.08	Cho <i>et.al.</i> , 2001



งานวิจัยนี้ ถือว่าเป็นงานวิจัยแรกที่ได้ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยใช้น้ำอ้อยซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาไม่แพงเป็นแหล่งคาร์บอนหลักร่วมกับการเติมโคสับสเตรต 3HV ซึ่งในที่นี้คือเกลือโซเดียมวาเลอเรตและมีแหล่งไนโตรเจนเป็นยูเรียจาก *B. megaterium* P-12 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ใหม่ พบว่า *B. megaterium* P-12 สามารถเจริญเติบโต สังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV อยู่ในเกณฑ์ปานกลางเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่น (แสดงในตารางที่ 5.1) ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ (batch cultivation) มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญและสะสมพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์เบื้องต้นเท่านั้น จึงไม่สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ปริมาณมากได้ (Ramasy และคณะ, 1990 ; Zinn และคณะ, 2001) ดังนั้น ในอนาคตอันใกล้ อาจจะต้องทำการศึกษาการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในการหมักแบบเฟดแบตช์ (Fed-batch cultivation) เพื่อให้สามารถควบคุมเวลาและปริมาณในการเติมสารอาหาร โดยเฉพาะกรดอินทรีย์หรือเกลือของกรดอินทรีย์ เช่น กรดวาเลอริกหรือเกลือโซเดียมวาเลอเรต กรดโพรพิโอนิกหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อใช้ที่ความเข้มข้นสูง เพื่อช่วยให้มีความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้น (high cell density) ซึ่งจะทำได้ผลผลิตและอัตราการผลิตสูงขึ้นได้ (Lee, 1996 ; Khanna และ Srivastava, 2005) อย่างไรก็ตาม ข้อได้เปรียบของงานวิจัยนี้คือ มีการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนราคาถูกในการผลิตโคพอลิเมอร์ ได้แก่ น้ำอ้อยและยูเรีย ซึ่งถือเป็นต้นทุนหลักในการผลิต PHBV ช่วยให้ราคา PHBV ต่ำลงและสามารถแข่งขันกับพลาสติกสังเคราะห์ได้ นอกจากนี้ ยังพบว่า พลาสติกที่ผลิตได้จาก *B. megaterium* P-12 ในงานวิจัยนี้ มีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพบางประการที่ดี เนื่องจากมีส่วนของโมโนเมอร์ 3HV อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้งานและมีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างสูง ทำให้พลาสติกที่ผลิตได้มีความแข็งแรงและทนต่อความร้อนได้ดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- พิสิษฐ คงกำเนิด. 2540. ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการเติบโตของ *Bacillus sp.* BA-019 และการผลิตพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลเอเรต). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัตนศิริ มุกิตากุล. 2538. การผลิตพอลิบีต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ที่แยกได้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศันสนีย์ สันติอรอดพันธุ์. 2550. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิบีต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตซึ่งเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากแหล่งดินและบ่อน้ำบาดน้ำเสีย. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศรีัญญา แก้วประดับ. 2553. การผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) จากน้ำอ้อยโดย *Bacillus megaterium* BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุดา สุภาขวินสวัสดิ์. 2542. ผลของขั้วสเตรทต่อสัดส่วนของของ 3-ไฮดรอกซีวาลเอเรตในพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลเอเรต) ซึ่งผลิตจาก *Bacillus sp.* BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตน์. 2538. พอลิเมอร์ชาแนล เล่ม 1. ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อดิพล บุญเรืองถาวร. 2543. การผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดยการเพาะเลี้ยง *Bacillus sp.* BA-019 แบบป้อนเป็นงวดภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

## ภาษาอังกฤษ

- Abate, R., Ballistreri, A., and Montaudo, O. 1995. Separation and Structural Characterization of Cycle and operon Chain Oligomers Products in the Partial of Microbial Poly(hydroxybutyrates). Macromolecules. **28**:791-796.
- Abe, H., and Doi, Y. 1999. Crystalline morphology, thermal properties, and enzymatic degradability of (*R*)-3-hydroxybutyric acid-based copolyesters. Focused on Ecomolecular Science Research. RIKEN Rev.42.
- Ahmad, M.N., and Holland, C.R. 1995. Growth kinetics of single-cell protein in batch fermenters. J.Food.Eng. **26**:443-452.
- Akmal, D., Azizanc, M.N., and Majida, M.I.A. 2003. Biodegradation of microbial polyesters P(3HB) and P(3HB-co-3HV) under the tropical climate environment . Polym. Degrad. Stabil. **80**:513–518.
- Alderete, J.E., Karl, D.W., and Park, C.H. 1993. Production of poly(hydroxybutyrate) homopolymer and copolymer from ethanol and propanol in fed-batch culture. Biotechnol.Progr. **9**:520-525.
- Anderson, A.J., and Dawes, E.A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol. Rev.**54**:450-472.
- Anderson, A.J. and Wynn, J.P. 1995. Microbial polyhydroxyalkanoates, polysaccharides and lipids. In Basic Biotechnology . 2<sup>nd</sup> (ed), pp.325-333. Cambridge University Press. Cambridge.
- Annur, M.S.M., Ramachandran, K.B., and Irene, K.P.T. 2003. Effect of simple and complex nitrogen supplementation on the growth of *Pseudomonas putida* and production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHA). Seminar Penyelidikan Jangka Pendek (Vot F) 11 dan 12 Mac.
- Annur, M.S.M., Irene, K.P.T., and Ramachandran, K.B. 2008. Evaluation of nitrogen sources for growth and production of medium-chain-length poly-(3-hydroxyalkanoates) from palm kernel oil by *Pseudomonas putida* PGA1 .AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.**16 (1)**:11-15.
- Aslim, A., Caliskan, F., Beyath, Y., and Gunduz, U. 1998. Poly-β-hydroxybutyrate production by

- lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **159**:293-297.
- Ballard, D.G., Holmes, P.A., and Senior, P.J. 1987. Formation of polymers of  $\beta$ -hydroxybutyric acid in bacterial cells and a comparison of the morphology of growth with the formation of polyethylene in the solid state. Recent Adv.Mech.Synth.Aspects Pol. **215**:293-314.
- Barker, P.A., Barham, P.J., and Salazar, J.M. 1997. Effect of crystallization temperature on the cocrystallization of hydroxybutyrate/hydroxyvalerate copolymers. Polymer. **38(4)**:913-919.
- Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S., and Goulet, J. 1995. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. Appl. Environ. Microb. **61**:165-169.
- Bernfeld, F. 1955. Amylase alpha and beta. In Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.(eds.) Method in Enzymology, pp.149-150. Academic Press. New York.
- Bloembergen, S., Holden, D.A., Bluhm, T.L., Hamer, G.K., and Marchessault, R.H. 1986. Study of composition and crystallinity of bacterial poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate). Macromolecules. **19**:2868-2871.
- Boopathy, R. 2000. Factor limiting bioremediation technologies. Bioresour.Technol. **74**:63-67.
- Bormann, E.J., Leibner, M., and Beer, B. 1998. Growth-associated production of poly(hydroxybutyric acid) by *Azotobacter beijerckii* from organic nitrogen substrates. Appl.Microbiol.Biot. **49**:84-88.
- Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W., and Fuller, R.C. 1990. Plastic from bacterial: Poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural biocompatible and biodegradable polymers. Adv.Biochem.Eng.Biot. **41**: 77-93.
- Champagne, P., and Li, C. 2009. Enzymatic hydrolysis of cellulosic municipal wastewater treatment process residuals as feedstocks for the recovery of simple sugars. Bioresour.Technol. **100**:5700-5706.
- Chen, G.Q., Konig, K.H., and Lafferty, M. 1991. Occurrence of poly-D-(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus Bacillus. FEMS Microbiol. Lett. **84**:173-176.
- Chen, L. J., and Wang, M. 2002. Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer. Biomaterials. **23**:2631-2639.
- Chen, G.Q., and Wu, Q. 2005. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering

- materials. Biomaterials. **26**:6565-6578.
- Cho, K.S., Ryu, H.W., Park, C.H., and Goodrich, P.R. 2001. Utilization of Swine Wastewater as a Feedstock for the Production of Polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD. J.Biosci.Bioeng. **91**(2):129-133.
- Choi, J., and Lee, S.Y. 1997. Process analysis and economic evaluation for poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation. Bioprocess.Eng. **17**:335-342.
- Choi, J., Lee, S.Y., and Han, K. 1998. Cloning of *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli* Appl. Environ Microb.**64**:4897-4903.
- Choi, J., and Lee, S.Y. 1999. High-Level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. Appl. Environ Microb. **65** (10): 4363-4368.
- Comeau, Y., Hall, K.J., and Oldham, W.K. 1998. Determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and poly- $\beta$ -hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography. Appl. Environ. Microb. **54** : 2325-2327.
- Cox, M.K. 1994. Properties and applications of polyhydroxyalkanoates. Doi, Y. and Fukada, K. (eds.), Biodegradable Plastics and Polymers , pp.120-135. Elsevier Science B.V.
- Dai, Y., Lambert, L., Yuan, Z., and Keller, J. 2008. Characterisation of polyhydroxyalkanoate copolymers with controllable four-monomer composition. J. Biotechnol. **134**:137-145.
- Dai, Y., Yuan, Z., Jack, K., and Keller, J. 2007. Production of targeted poly(3-hydroxyalkanoates) copolymers by glycogen accumulating organisms using acetate as sole carbon source. J. Biotechnol. **129** : 489-497.
- Doi, Y., and Kunioka, M., Nakamura, Y., and Soga, k. 1986. Nuclear Magnetic Resonance studies on poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) and copolyester of  $\beta$ -hydroxybutyrate and  $\beta$ -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16 . Macromolecules.**19**:2860-2864.
- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., and Soga, K. 1987. Biosynthesis of copolymer in *Alcaligenes eutrophus* H16 from <sup>13</sup>C-labelled acetate and propionate. Macromolecules.**20**: 2988-2991.
- Doi, Y. 1990. Microbial polyesters. VCH. New York.



- Doi, Y., Kitamanea, S., and Kideki, A. 1995. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Macromolecules. **28**:4822-4828.
- Du, G. C., Chen, J., Yu, J., and Lun, S. 2001. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*. Biochem.Eng.J. **8**:103-110.
- Eggink, G., DeWaard, P., and Huijberts, G.N. 1995. Formation of novel poly(hydroxyalkanoates) from long-chain fatty acids. Can.J.Microbiol. **41**: 14-21.
- Eschenlauer, A. C., Stoup, S. K., Srienc, F., and Somers, D. A. 1996. Production of heteropolymeric polyhydroxyalkanoate in *Escherichia coli* from a single carbon source. Int. J. Biol. Macromol. **19** :121-130.
- Evan, D.J., and Sikdar, K.S. 1990. Biodegradable Plastic. Chemtech. **5** : 38-42.
- Fernández, D., Rodríguez, E., Bassas, M., Viñas, M., Solanas, A.M., Llorens, J., Marqués, A.M., and Manresa, A. 2005. Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. Biochem.Eng.J. **26** : 159-167.
- Gagnon, K.D., Lenz, R.W., Farris, R.J., and Fuller, R.C. 1992. Rubber. Chem. Technol. **65**:761-77.
- Galego, N., Rozsa, C., Sanchez, R., Fung, J., Vazquez, A., and Tomas, J.S. 2000. Characterization and application of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. Polymer Test. **19**:485-492.
- Genzeveld, K.J., Hagen, A.V., Agteren, M.H.V., Koning, W.D., and Uiterkamp, A.J.M.S. 1999. Upgrading of organic waste : production of copolymer poly-3-hydroxybutyrate-co-valerate by *Ralstonia eutropha* with organic waste as sole carbon source. J.Clean.Prod. **7** : 413-419.
- Gouda, M.K., Swellam, A.E., and Omar, S.H. 2001. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. Microbiol.Res. **156**:201-207.
- Grothe, E., Young, M.M., and Chisti, Y. 1999. Fermentation optimization for the production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. Enzyme.Microb.Technol. **25**:132-141.

- Groom, C.A., Luong, J.H.T., and Mulchandani, A. 1998. On-line culture fluorescence measurement during the batch cultivation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate producing *Alcaligenes eutrophus*. J. Biotechnol. **8**:271-278.
- Haywood, G.W., Anderson, A.J., and Dawes, E.A. 1989. A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria. Biotechnol.Lett. **11**:471-476.
- Hocking, P.J., and Marchessault, R.H. 1994. Chemical and Technology of Biodegradable Polymers. Chapman and Hill. London.
- Holmes, P.A., Wright, L.F., and Colins, S.H. 1985.  $\beta$ -Hydroxybutyrate polymer. Eur.Pat.Appl. **5**:3459.
- Hori, K., Abe, M., and Unno, H. 2009. Production of triacylglycerol and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by the toluene-degrading bacterium *Rhodococcus aetherivorans* IAR1. J.Biosci.Bioeng. **108 (4)**:319–324.
- Hu, W.F., Chua, H., and Yu, H.F. 1997. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from activated sludge. Biotechnol.Lett. **19**:695-698.
- Jendrossek, D. 2001. Microbial degradation of polyesters. Adv Biochem Eng.Biot. **71**:293–325.
- Jendrossek, D., and Handrick, R. 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. Annu. Rev. Microbiol. **56**: 403-432.
- Kemper, A. J. 1974. Determination of sub-microquantities of ammonium and nitrates in soils with phenol, sodium nitroprusside and hypochlorite. Geoderma. **12**:201-206.
- Keshavarz, T., and Roy, I. 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. Curr. Opin. Microbiol. **13**:1-6.
- Khanna, S., and Srivastava, A.K. 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates Process Biochem. **40**: 607–619.
- Khatipov, E., Miyakea, M., Miyakec, J., and Asadaa, Y. 1998. Accumulation of poly- $\beta$  hydroxybutyrate by *Rhodobacter sphaeroides* on various carbon and nitrogen substrates. FEMS Microbiol. Lett. **162(1)**:39-45.
- Kim, J.H., Kim, B.G., and Choi, C.Y. 1992. Effect of propionic acid on poly ( $\beta$ -hydroxybutyric-co- $\beta$ -hydroxyvaleric) acid production by *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnol.Lett. **14**: 903-906.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through

- comparative studies of nucleotide sequences. J.Mol.Evol. **16**:11-120.
- Kinoshita, S., Kulprecha, K., and Choa, A. 1991. Microbial production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. In Annual Report of IC Biotech.Osaka University, Osaka , pp.347-349.
- Klinke, S., Ren, Q.,Witholt, .B and Kessler, B.1999. Production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from gluconate by recombinant *Escherichia coli*. Appl. Environ.Microb. **65**:540-548.
- Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., Femandes, E.G., Horvat, P., Kutschera, C., Hesse, P., and Braunegg, G. 2008. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. Bioresour. Technol. **99**:4854-4863.
- Koning, G.J.M., Lemastra, P.J., Hill, D.J.T., Carswell, T.G., and O'Donell, J.H. 1992. Aging phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]. Polymer.**33**: 3295-3297.
- Kosior, E., Braganca, R. M., and Fowler, P. 2006. Lightweight compostable packaging: literature review, The Waste & Resource Action Program, INN003/26, pp. 1–48.
- Krishna, C., and Loosdrecht, M.C.M. 1999.Effect of temperature on storage polymers and settleability of activated sludge. Water Res. **33**: 2374–82.
- Kulprecha, S. 2006. Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Production, optimization and factors affecting PHA accumulation. Abstract of the international conference and exhibition on bioplastics 21-24 September 2006 Siam Paragon, Bangkok, Thailand.
- Kulprecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., and Thongchul, N. 2009. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. J. Biosci. Bioeng. **107**:240-245.
- Kumar, N., Ravikumar, M.N.V., and Domb, A.J. 2001. Biodegradable block copolymers Adv.Drug Deliver. Rev. **53**:23–44.
- Law, K.H. , Cheng, Y.C., Leung ,Y.C. , Lo, W.H. , Chua, H. , and Yu, H.F. 2003. Construction of recombinant *Bacillus subtilis* strains for polyhydroxyalkanoates synthesis. Biochem. Eng. J. **16**:203–208.
- Lin, S.K.C., Du, C., Koutinas, A., Wang, R., and Webb, C. 2008. Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. Biochem. Eng. J. **41**:128–135.
- Lee , K.T., Kim, J.Y., Rhee, Y.H., Bae, K.S., and Kim, Y.B. 1995. Biosynthesis poly- $\beta$ -

- hydroxyalkanoates by *Bacillus thuringiensis* R-510. J.Microbiol. **23**:59-65.
- Lee, S.Y. 1996. Plastic bacteria? progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Trends Biotechnol. **14**:431-438.
- Lee, S., and Yu, J. 1997. Production of biodegradable thermoplastics from municipal sludge by two-stage bioprocess. Resour.Conserv.Recy. **19**:51-64.
- Lee, S.Y., Choi, J.I., and Wong, H. H. 1999. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. Int. J. Biol. Macromol. **25** : 31-36.
- Lee, W. H., Loo, C.Y., Nomura, C. T. and Sudesh, K. 2008. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. Bioresour.Technol. **99**:6844-6851.
- Logan, N.A., and Berkeley, R.C.W. 1984. Identification of *Bacillus* Strains Using the API System. J.Gen. Microbiol. **130**:1871-1882.
- Loo, C.Y., and Sudesh, K. 2007a. Biosynthesis and native granule characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Delftia acidovorans*. Int.J.Biol.Macromol. **40**:466-471.
- Loo, C.Y., and Sudesh, K. 2007b. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. Malays. Polym. J. **2**:31-57.
- López-Cortés, A., Lanz-Landázuri, A., and García-Maldonado, J.Q. 2008. Screening and isolation of PHB-producing bacteria in a polluted marine microbial mat. Microbial Ecol. **56**:112-120.
- Luengo, J.M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharo, G., and Olivera, E.R. 2003. Bioplastics from microorganisms. Curr. Opin. Microbiol. **6**:251-260.
- Luli, G.W., and Strohl, W.R. 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. Appl.Environ.Microbiol. **56**:1004-1011.
- Madison LL, Huisman GW. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiol Mol Biol Rev. **63**:21-53.
- Mallick, N., Gupta, S., Panda, B., and Sen, R. 2007. Process optimization for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)co-polymer production by *Nostoc muscorum*. Biochem. Eng. J. **37**:125-130.

- Manna, A., and Paul, A.K., 2000. Degradation of microbial polyester poly(3-hydroxybutyrate) in environmental samples and in culture. Biodegradation. **11**: 323–329.
- Marangoni, C., Furigo, A., and Aragão, G. M. F. 2002. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. Process Biochem. **38**:137-141.
- Matsusaki, H., Abe, H., and Doi, Y. 2000. Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. Biomacromolecules. **1**:17-22.
- McCool, G. J., Fernandez, T., Li, N., and Cannon, M.C. 1996. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium* . FEMS. Microbiol Lett. **138**:41-48.
- Mitsui, H., Grolach, K., Lee, H., Hattori, R., and Hattori, T. 1997. Incubation time and media requirements of culturable bacteria from different phylogenetic groups. J. Microbiol. Meth. **30**:103–110.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. 2005. Principle of biochemistry. 4<sup>th</sup>(ed). W.H.Freeman and Company. New York.
- Nobes, G.A.R., Holden, D.A., and Marchessault, R.H.1994. Spreading of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) at the air-water interface a model system for the nascent hydrotropic state to bacterial polyester. Polymer. **35**: 435-437.
- Omar, S., Rayes, A., Eqaab, A., Viss, I., and Steinbuechel, A. 2001. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. Biotechnol Lett. **23**:1119–1123.
- Poirier, Y., Nawrath, C., and Somerville, C. 1995. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. J.Biotechnol. **13**: 142–50.
- Pouton, C.W., and Akhtar, S. 1996. Biosynthesis polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. Advan.Drug.Deliver.Rev. **18**:133-162.
- Pozo, C., Martinez-Toledo, M.V., Rodelas, B., and Gonzalez-Lopez, J. 2002. Effects of culture



- Conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechin (wastewater from olive oil mills). J. Biotechnol. **97**:125-131.
- Quillaguamán, J., Doan-Van, T., Guzmán, H., Guzmán, D., Martín, J., Everest, A., and Hatti-Kaul, R. 2008. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch culture. Appl. Environ. Biotechnol. **78**:227-232.
- Ramsay, B. A., Ramsay, J. A., Lomaliza, K., Chavarie, C., and Bataille, P. 1990. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids copolymers. Appl. Environ. Microbiol. **56**:2093–2098.
- Ramsay, B. A., Saracovan, I., Ramsay, J. A. and Marchessault, R. H. 1992. Effect of nitrogen limitation on long-side chain poly-*b*hydroxyalkanoate synthesis by *Pseudomonas resinovorans*. Appl. Environ. Microbiol. **58**:744-746.
- Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi, and Kalia, V.C. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresour. Technol. **87**:137-146.
- Rhee, Y.H., Jang, J.H., and Rogers, P.L. 1993. Production of copolymer consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by fed-batch culture of *Alcaligenes* sp. SH-69. Biotechnol. Lett. **15(4)**: 377-382.
- Rocha, R.C.S., Silva, L.F., Taciro, M.K. and Pradella, J.G.C. 2008. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. J. Microbiol. Biotechnol. **24**:427-431.
- Rudnik, E. 2008. Compostable Polymer Materials. Elsevier. New York.
- Ryu, H.W., Hahn, S.K., Chang, Y.K., and Chang, H.N. 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutropha* with phosphate limitation. Biotechnol. Bioeng. **55**:28-32.
- Sakami, W., and Harrington, H. 1963. Amino acid metabolism. Annu Rev Biochem. **32**: 355–98.
- Salehizadeh, H., and Van Loosdrecht, M.C.M. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. Biotechnol. Adv. **22**:261–279.
- Sang, B.I., Hori, K., Tanji, Y., and Unno, H., 2000. Analysis of microbial community in the

- degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soil. In: Proceedings of Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology, Kyoto, Japan, pp. 981–984.
- Sankhla, I.S., Bhati, R., Singh, A.K., and Mallick, N. 2010. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer production from a local isolate, *Brevibacillus invocatus* MTCC 9039. Bioresour. Technol. **101**:1947-1953.
- Satoh, H., Iwamoto, Y., Mino, T., and Matsuo, T. 1998. Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic. Water Sci. Technol. **38**:103-109.
- Savenkova, L., Gercberga, Z., Biber, I., and Kalnin, M. 2000. Effect of 3-hydroxy valerate content on some physical and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates produced by *Azotobacter chroococcum*. Process Biochem. **36**:445-450.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., and Ahmed, S. 2007. Isolation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) degrading bacteria and purification of PHBV depolymerase from newly isolated *Bacillus* sp. AF3. Int. Biodeter. Biodegr. **60**:109-115.
- Shahhosseini, S. 2004. Simulation and optimisation of PHB production in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*. Process Biochem. **39**:963-969
- Sharma, L., and Mallick, N. 2005. Accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation by pH, light-dark cycles, N and P status and carbon sources. Bioresour. Technol. **96**: 1304-1310.
- Sheu, D. S., Chen, W. M., Yang, J. Y., and Chang, R. C. 2009. Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. Enzyme Microb. Technol. **44**:289–294.
- Shi, H., Kyuwa, K., Takasu, M., and Shimizu, K. 2001. Temperature-induced expression of *phb* genes in *Escherichia coli* and the effect of temperature patterns on the production of poly-3-hydroxybutyrate. J. Biosci. Bioeng. **91(1)**:21-26.
- Sirisansaneeyakul, S. and Mahasubpaiboon, Y. 2003. Kinetic modeling of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production by *Alcaligenes eutrophus* DSM 545. The 41<sup>st</sup> Kasetsart University Annual Conference. 3 – 5 February 2003. Kasetsart University, Bangkok.
- Steinbüchel, A., and Schlegel, H.G. 1989. Excretion of pyruvate by mutants of *Alcaligenes*

- eutrophus* , which are impaired in the accumulation of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate acid) (PHB), under conditions permitting synthesis of PHB. Appl.Microbiol.Biotechnol. **31**: 168-175.
- Steinbüchel, A., and Fuchtenbusch, B. 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. Tibtech. 16:419-427.
- Steinbüchel, A., and Eversloh, T. L. 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. Biochem. Eng. J. **16**: 81–96.
- Sudesh, K., Abe, H., and Doi, Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Prog. Polym. Sci. **25**:1503-1555.
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., and Shah, S. 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants. Biotechnol.Adv. **25**:148-175.
- Tian ,P.Y., Shang,L. Ren, H., Mi,Y., Fan,D.D., and Jiang,M. 2009. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates : Current research and development. Afr. J. Biotechnol. **8(5)**: 709-714.
- Verlinden, R.A., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D., and Radecka, I. 2007 . Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. J. Appl Microbiol. **102**: 1437-1449.
- Volova, T.G. 2004. Polyhydroxyalkanoates-Plastic materials of the 21<sup>st</sup> century : production, properties, and application. Nova Science Publisher. Inc. New York.
- Volova, T.G., Kalacheva, G.S., Kozhevnikov, I.V., and Steinbüchel, A. 2007. Biosynthesis of multicomponent polyhydroxyalkanoates by *Wautersia eutopha*. J.Microbiol. **76(6)**:704-711.
- Williamson, D.H., and Wilkinson, J.F. 1958. The isolation and estimation of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. J.Gen.Microbiol. **19**:198-209.
- Yu, S.T., Lin, C.C., and Too, J. R. 2005. PHBV production by *Ralstonia eutropha* in a continuous stirred tank reactor. Process Biochem. **40**:2729-2734.
- Zakaria, M.R., Ariffin.H., Johar.N.A.M., Aziz, S.A. , Nishida.H., Shirai, Y., and Hassan , M.A.

2010. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer from wild-type *Comamonas* sp. EB172. Polym. Degrad. Stabil. **95**:1382-1386.

Zinn, M., Witholt, B., and Egli, T. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. Adv. Drug Deliver. Rev. **53**:5-21.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก ก

## สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Culture Medium (BCM) (Kulprecha และคณะ, 2009)

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

เบคโตทริปโตส (Bacto tryptose)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	5.0	กรัม
น้ำตาลทราย	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายน้ำตาลนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ BYPcng (Mitsui และคณะ, 1997)

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	5.0	กรัม
เบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
Casamino acids	2.0	กรัม
กลูโคส (Glucose)	4.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.0	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายน้ำตาลนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 3. อาหารเหลว Nutrient Broth (NB)

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
เบคโตทริปโตส (Bacto tryptose)	5.0	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

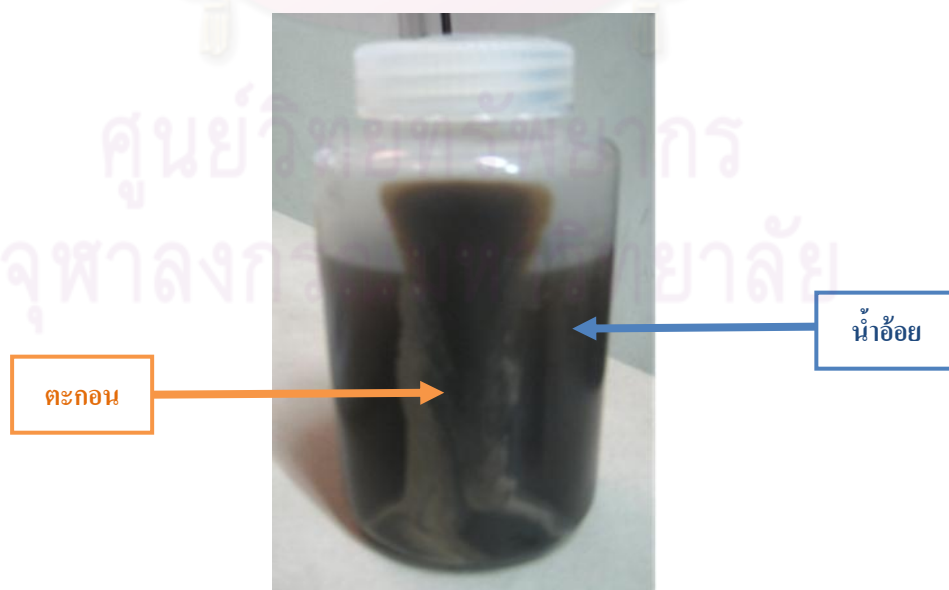
#### การเตรียมวัตถุดิบและสารที่ใช้ในการวิจัย

##### 1. การเตรียมน้ำอ้อย

1.1 นำน้ำอ้อยมากรองผ่านตะแกรงกรองแบบละเอียด (fine sieve) เพื่อกำจัดเศษดินและเศษขานอ้อยที่มาจากกระบวนการหีบอ้อย

1.2 นำน้ำอ้อยที่ผ่านการกรองแล้ว ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์และปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (ทำซ้ำ จำนวน 2 รอบ)

1.3 นำน้ำอ้อยที่ผ่านการปั่นแยกตะกอนออกแล้วมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม



## 2. การเตรียมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)

### 2.1 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์

เตรียมจากการละลายโซเดียมอะซิเตต 9.10 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก 1.9 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 4.5 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

### 2.2 สารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส

เตรียมจากการละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส 0.15 กรัม ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

## 3. การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก เตรียมจากการละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมโปแตสเซียมโซเดียมคาร์เตรต 30 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

## 4. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย

### 4.1 สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์

เตรียมจากการละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ปริมาณ 150 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

### 4.2 สารละลายฟีนอลไนโตรพัชชาด

เตรียมจากการละลายฟีนอล 7 กรัม และโซเดียมไนโตรพัชชาดปริมาณ 34 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 4.3 สารละลายบัฟเฟอร์ไฮเปอร์คลอไรด์

เตรียมจากการละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.48 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ ปริมาตร 70 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.98 กรัม และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (คลอโรกซ์ 5-5.25 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 11.4-12.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

### 4.4 สารละลาย EDTA

เตรียมจากการละลาย EDTA ไดโซเดียมซอลต์ปริมาณ 6 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

## ภาคผนวก ข

### สูตรคำนวณ

#### 1. การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) = น้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์ - น้ำหนักถ้วยเปล่า x 1000

10

#### 2. การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ (กรัมต่อลิตร) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี

การคำนวณปริมาณ โมโนเมอร์ของ 3HB และ 3HV (กรัมต่อลิตรต่อ เซลล์แห้ง 0.02 กรัม) ทำการประมวลผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Star chromatogram : version 4.02 ซึ่งจะทำให้การคำนวณปริมาณ โมโนเมอร์ (กรัมต่อลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน

การคำนวณปริมาณ โมโนเมอร์แต่ละชนิด (กรัมต่อลิตร)

สูตร ปริมาณโมโนเมอร์ = ค่าจากการวิเคราะห์(กรัมต่อลิตร) x น้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร)

20

#### 3. การคำนวณสัดส่วน (โมลเปอร์เซ็นต์) ของแต่ละโมโนเมอร์ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี

การคำนวณสัดส่วนองค์ประกอบของ โมโนเมอร์ใน โคพอลิเมอร์ (mole fraction)

3.1 คำนวณหาปริมาณของแต่ละโมโนเมอร์ (กรัมต่อลิตร)

3.2 คำนวณหาจำนวนโมลของแต่ละโมโนเมอร์ โดยการหารด้วยน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละโมโนเมอร์ (น้ำหนักโมเลกุลของ 3HB และ 3HV = 86 และ 100 ตามลำดับ)

3.3 คำนวณหาสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)

สูตร โมลเปอร์เซ็นต์ของแต่ละโมโนเมอร์ = 
$$\frac{\text{จำนวนโมลของโมโนเมอร์} \times 100}{\text{ผลรวมของจำนวนโมลของโมโนเมอร์ทั้งหมด}}$$

#### 4. การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก (กรัมต่อลิตร)

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) =  $OD_{540} \times \text{ความชัน}^{-1} \times \text{ค่าการเจือจาง}$

#### 5. การหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรียในน้ำหมัก (กรัมต่อลิตร)

ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร) =  $OD_{636} \times \text{ความชัน}^{-1} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times (132/28)$

ปริมาณยูเรีย (กรัมต่อลิตร) =  $OD_{636} \times \text{ความชัน}^{-1} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times (60/28)$

หมายเหตุ 132 คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอม โมเนียมซัลเฟต  
 60 คือ น้ำหนักโมเลกุลของยูเรีย  
 28 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุไนโตรเจนในแอม โมเนียมซัลเฟตและยูเรีย

#### 6. การคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t}$$

$$Y_{p/x} = \frac{P_t - P_0}{X_t - X_0}$$

$$Y_{p/s} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S_t}$$

$$Y_{x/s} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$$

$$\text{Productivity} = \frac{P_t - P_0}{t}$$

เมื่อ	$\mu$	คือ	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
	$Y_{p/x}$	คือ	สัมประสิทธิ์ผลผลิตพอลิเมอร์ต่อปริมาณเซลล์
	$Y_{p/s}$	คือ	สัมประสิทธิ์ผลผลิตพอลิเมอร์ต่อสับสเตรดที่ถูกใช้ไป
	$Y_{x/s}$	คือ	สัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรดที่ถูกใช้ไป
	Productivity	คือ	ค่าอัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)



กำหนดให้	$X_0$	=	น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	$X_t$	=	น้ำหนักเซลล์แห้ง ณ เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร)
	$P_0$	=	ปริมาณพอลิเมอร์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	$P_t$	=	ปริมาณพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ ณ เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร)
	$S_0$	=	ปริมาณสับสเตรตเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	$S_t$	=	ปริมาณสับสเตรตที่ถูกใช้ไป ณ เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร)
	$t$	=	เวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)

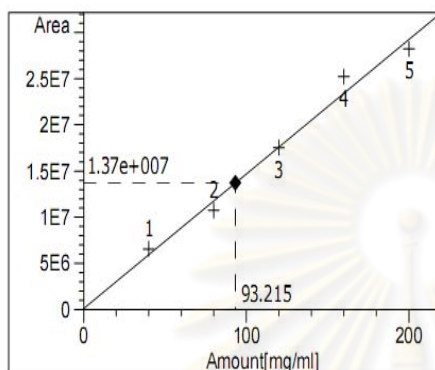


ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ค

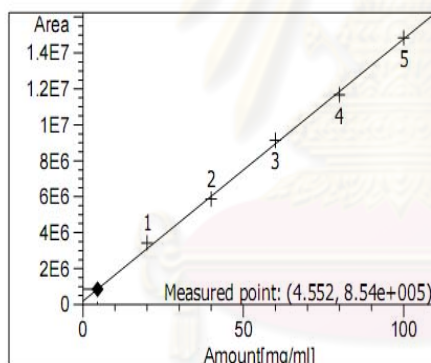
## กราฟมาตรฐาน

## 1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส ในน้ำอ้อย วิเคราะห์โดย HPLC



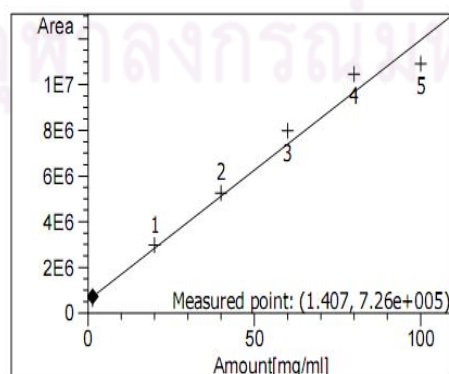
Sucrose at exp. RT: 17.791  
 RID1 A, Refractive Index Signal  
 Correlation: 0.99510  
 Residual Std. Dev.: 1210798.39108  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m: 145649.38893  
 b: 143564.52381  
 x: Amount [mg/ml]  
 y: Area

## 2. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ในน้ำอ้อย วิเคราะห์โดย HPLC



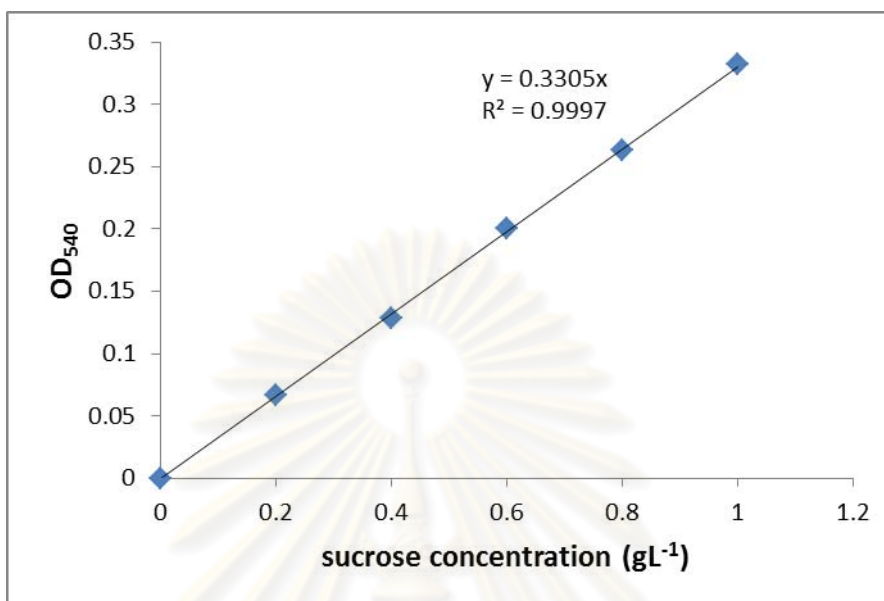
Glucose at exp. RT: 12.154  
 RID1 A, Refractive Index Signal  
 Correlation: 0.99920  
 Residual Std. Dev.: 245213.90447  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m: 146083.79357  
 b: 189322.90476  
 x: Amount [mg/ml]  
 y: Area

## 3. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลฟรุคโตสในน้ำอ้อย วิเคราะห์โดย HPLC

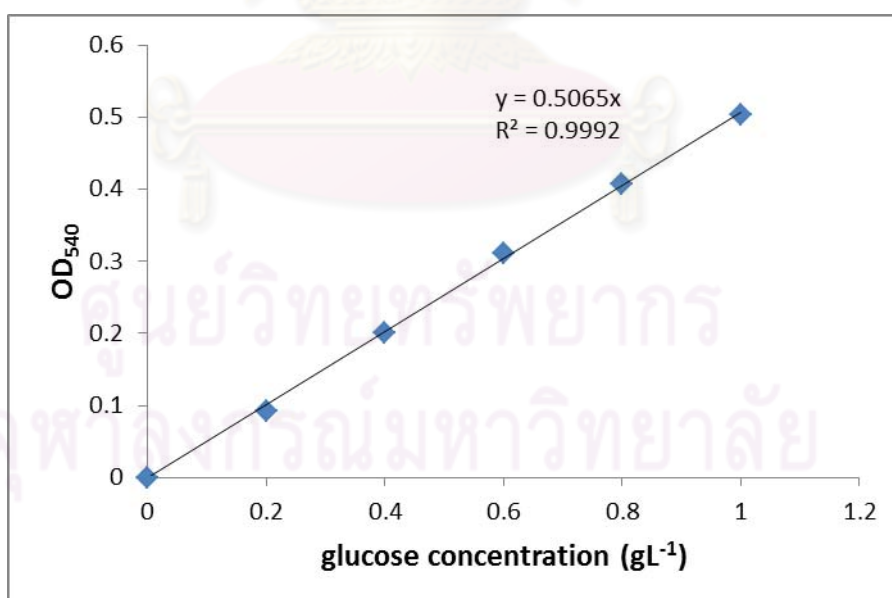


Fructose at exp. RT: 9.052  
 RID1 A, Refractive Index Signal  
 Correlation: 0.98706  
 Residual Std. Dev.: 774927.41736  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m: 114025.78714  
 b: 565078.14286  
 x: Amount [mg/ml]  
 y: Area

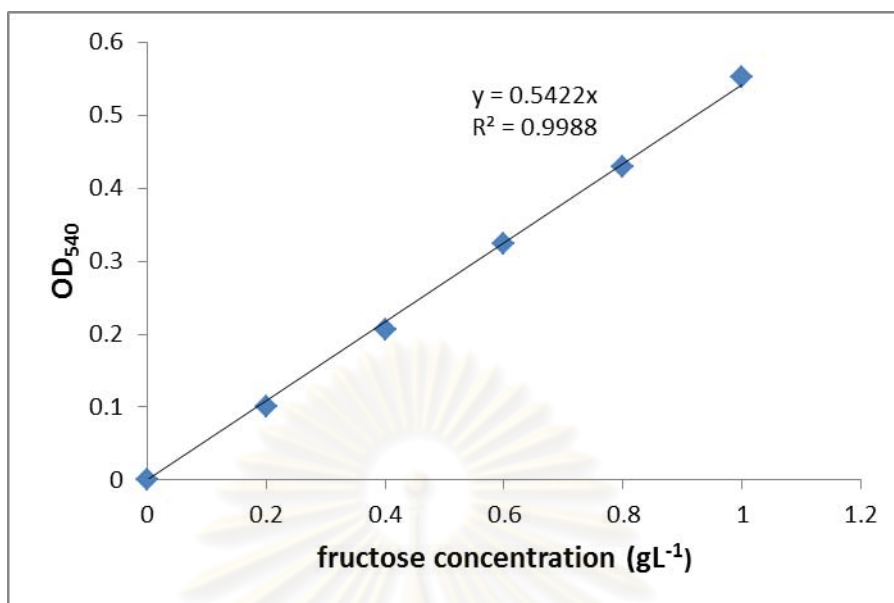
#### 4. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวิซ์



กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสในช่วง 0-1.0 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.3305

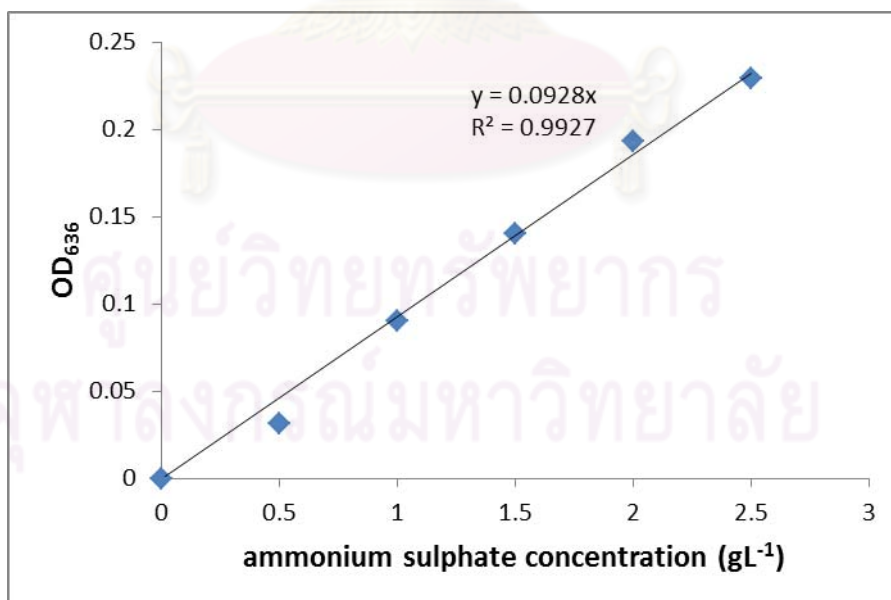


กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสในช่วง 0-1.0 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.5065



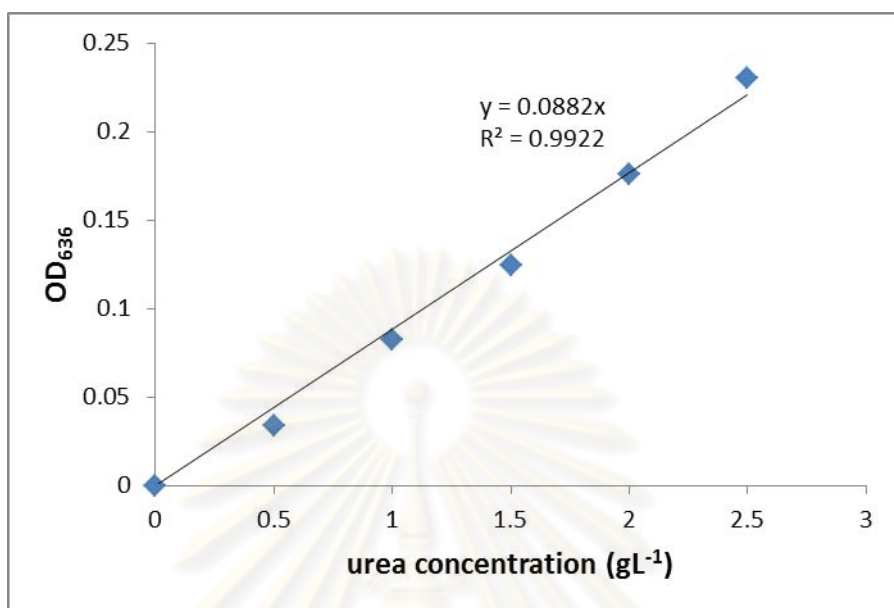
กราฟมาตรฐานของน้ำตาลฟรุคโตสในช่วง 0-1.0 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.5422

#### 5. กราฟมาตรฐานของแอมโมเนียมซัลเฟต



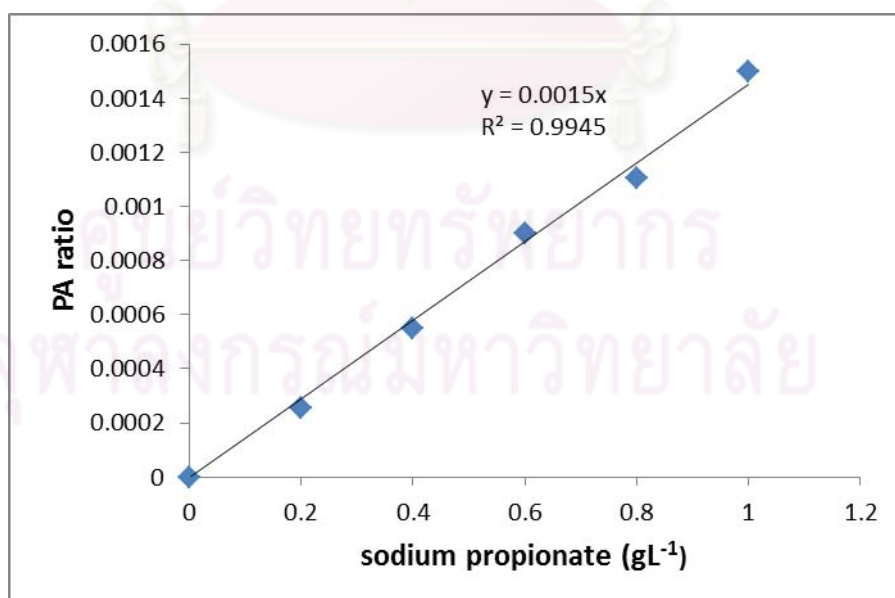
กราฟมาตรฐานของแอมโมเนียมซัลเฟต ในช่วง 0-2.5 กรัมต่อลิตร  
มีค่าความชันเท่ากับ 0.0928

## 6. กราฟมาตรฐานของยูเรีย



กราฟมาตรฐานของยูเรีย ในช่วง 0-2.5 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.0882

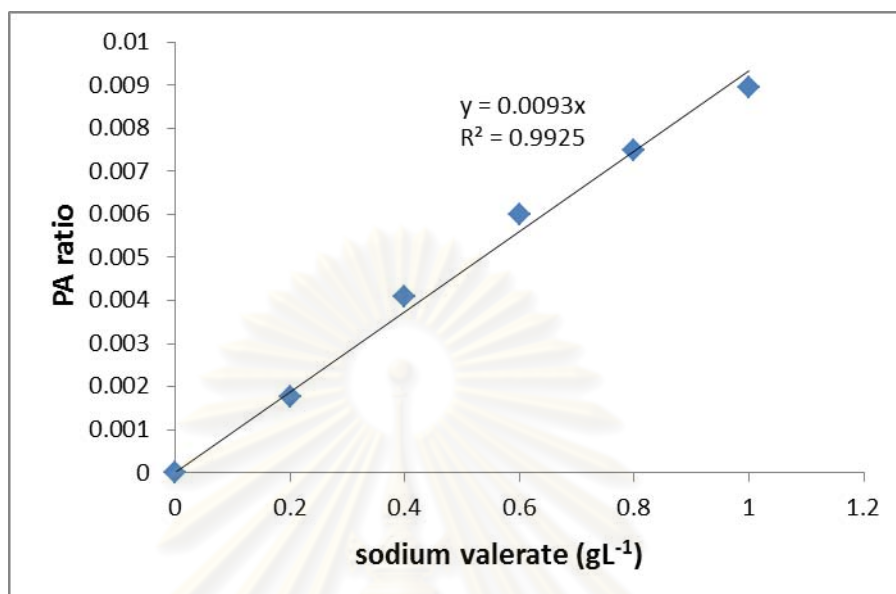
## 7. กราฟมาตรฐานของโซเดียมโพรพิโอเนต



กราฟมาตรฐานของโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้น 0-1.0 กรัมต่อลิตร  
มีค่าความชันเท่ากับ 0.0015

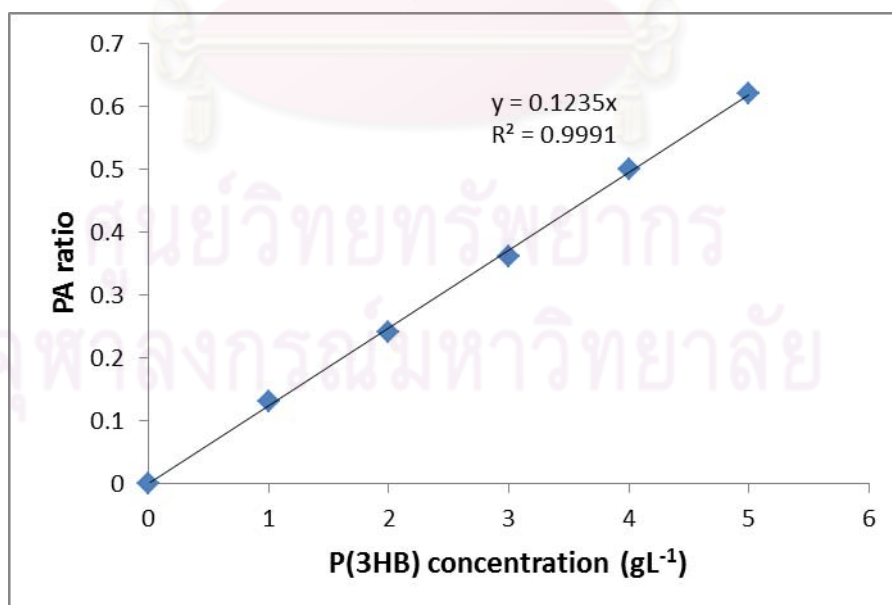


### 8. กราฟมาตรฐานของโซเดียมวาเลอเรต



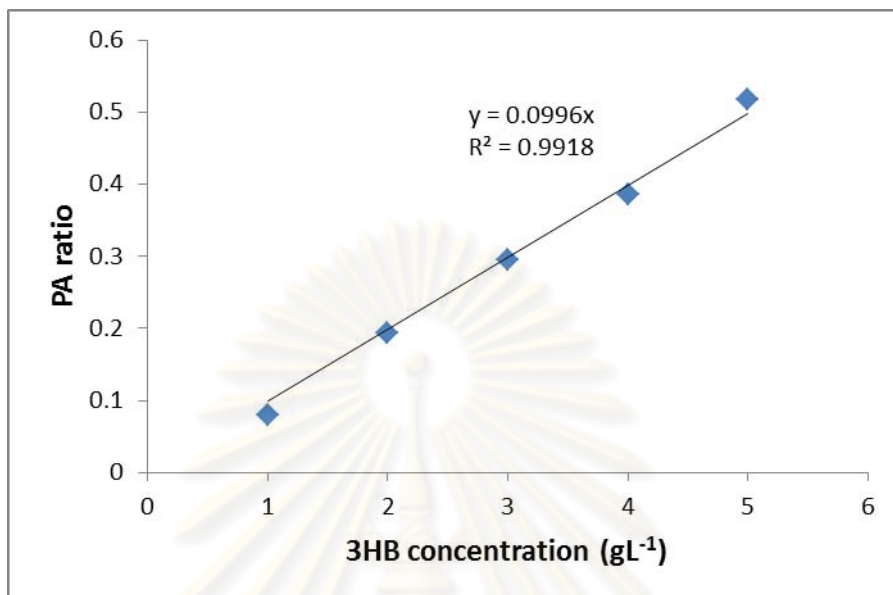
กราฟมาตรฐานของโซเดียมวาเลอเรต ความเข้มข้น 0-1.0 กรัมต่อลิตร  
มีค่าความชันเท่ากับ 0.0093

### 9. กราฟมาตรฐานของโพลิเมอร์ P(3HB) วิเคราะห์ด้วยวิธี GC

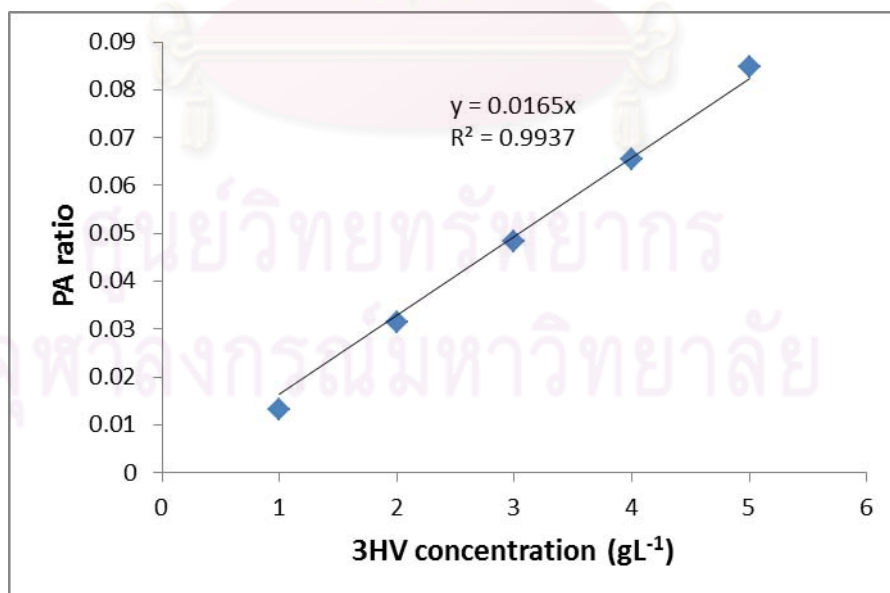


กราฟมาตรฐานของ P(3HB) ความเข้มข้น 0-5 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.1235

### 10. กราฟมาตรฐานของโคพอลิเมอร์ PHBV วิเคราะห์ด้วยวิธี GC



กราฟมาตรฐานของโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ความเข้มข้น 0-5 กรัมต่อลิตร  
มีค่าความชันเท่ากับ 0.0996

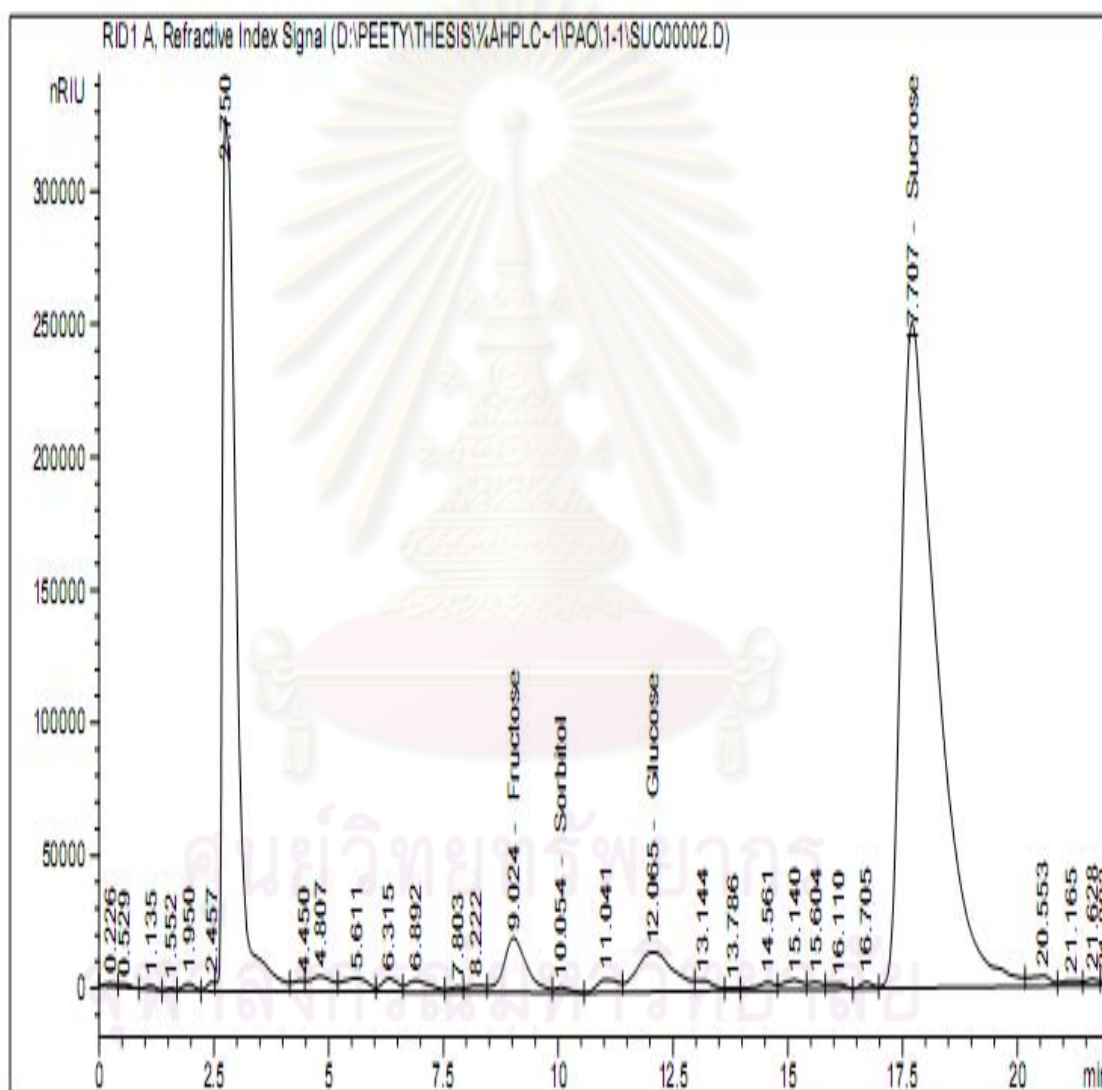


กราฟมาตรฐานของโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต ความเข้มข้น 0-5 กรัมต่อลิตร  
มีค่าความชันเท่ากับ 0.0165

## ภาคผนวก ง

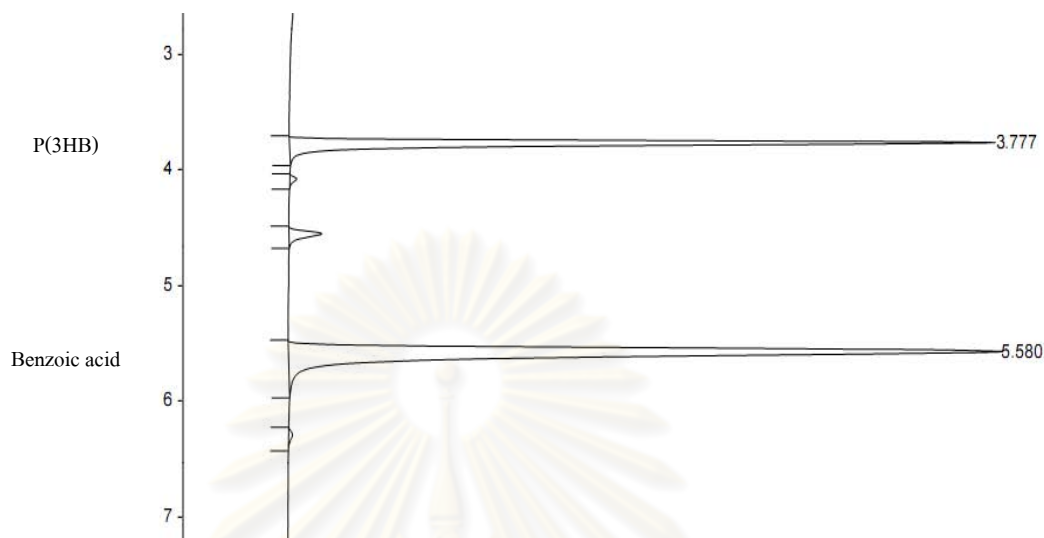
## โครมาโตแกรม

1. โครมาโตแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำอ้อยด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิดโครมาโตกราฟี

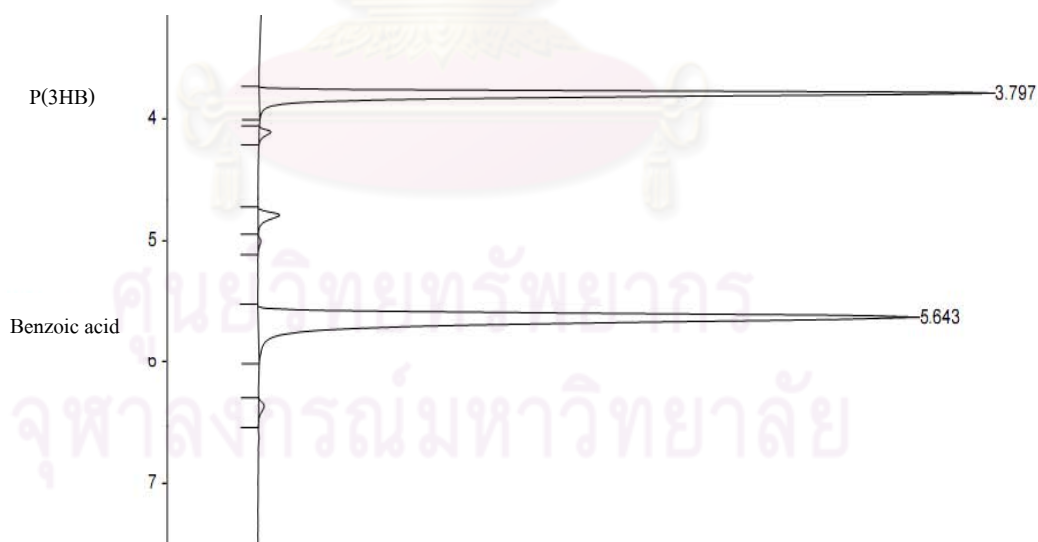


น้ำอ้อย มีซูโครสเป็นองค์ประกอบหลักเฉลี่ยประมาณ 95.39 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสเฉลี่ยประมาณ 4.27 เปอร์เซ็นต์ และฟรักโทสเฉลี่ยประมาณ 0.84 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณได้จากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำอ้อยซึ่งมีค่าเท่ากับ 198.86 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยซูโครส 188.69 กรัมต่อลิตร กลูโคส 8.50 กรัมต่อลิตรและฟรักโทส 1.67 กรัมต่อลิตร)

## 2. โครมาโตแกรมวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี

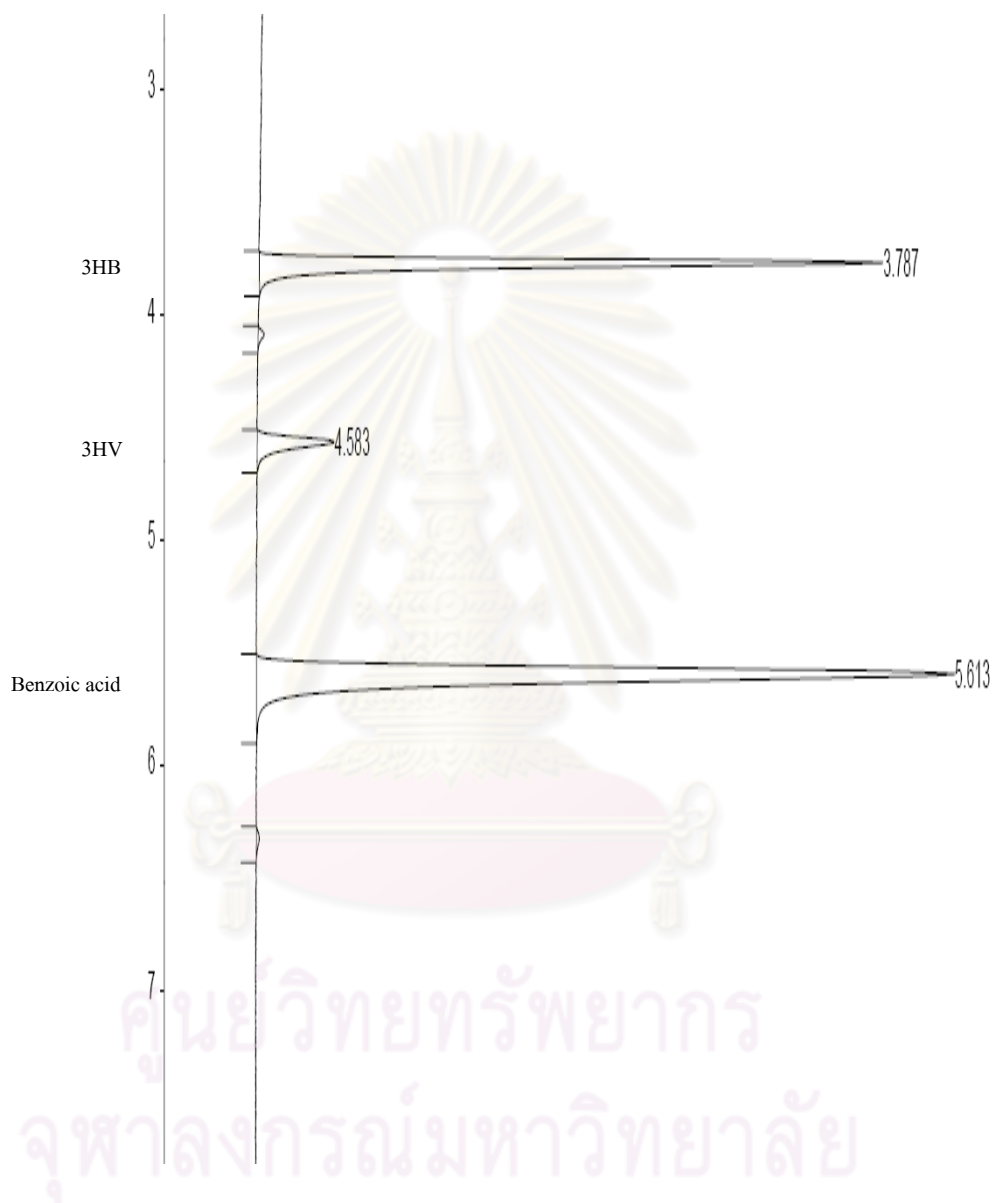


โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต [P(3HB)] ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน



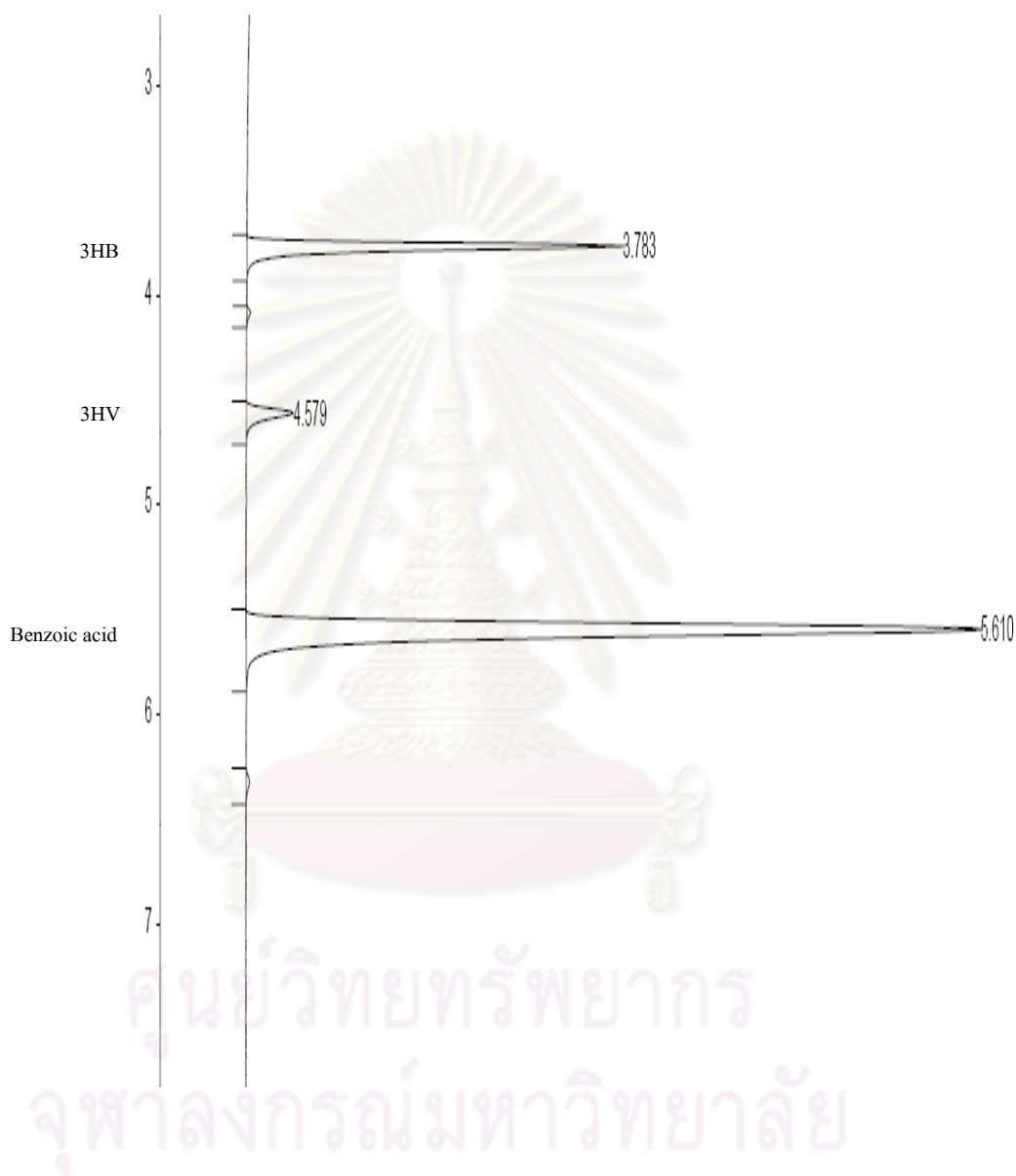
ตัวอย่างโครมาโตแกรมของโพลิเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต [P(3HB)] ซึ่งผลิตได้จาก *Bacillus megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน (วิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน)

### 3. โครมาโตแกรมวิเคราะห์ปริมาณ PHBV โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี



โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-12% 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต [P(3HB-co-12% 3HV)] ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน





ตัวอย่างโครมาโตแกรมของโคพอลิเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (PHBV) ซึ่งผลิตได้จาก *Bacillus megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและมียูเรีย 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน (วิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน)

## ภาคผนวก จ

## ผลการทดลอง

ผลการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P-12 กับ  
ฐานข้อมูลใน GenBank

```
>lcl|60189 Bacillus megaterium strain IAM 13418 16S ribosomal RNA gene
Length=683

Score = 1245 bits (674), Expect = 0.0
Identities = 680/683 (99%), Gaps = 0/683 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1
GTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA 60
|||||
Sbjct 1
GTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA 60

Query 61
CGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATA 120
|||||
Sbjct 61
CGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAGGCTAATACCGGATA 120

Query 121
GGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGG 180
|||||
Sbjct 121
GGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGG 180

Query 181
CCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCG 240
|||||
Sbjct 181
CCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCG 240

Query 241
ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC 300
|||||
Sbjct 241
ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC 300

Query 301
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT 360
|||||
```

Sbjct 301  
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT 360

Query 361  
GAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCT 420

|||||  
Sbjct 361  
GAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCT 420

Query 421  
TGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA 480

|||||  
Sbjct 421  
TGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA 480

Query 481  
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTC 540

|||||  
Sbjct 481  
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTC 540

Query 541  
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAC 600

|||||  
Sbjct 541  
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAC 600

Query 601  
TGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGA 660

|||||  
Sbjct 601  
TGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGA 660

Query 661 GGAACACTAGTGGCGAAGGCGGC 683  
|||||  
Sbjct 661 GGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC 683

Growth conditions		DCW (gL <sup>-1</sup> )								
		0	3	6	9	12	15	18	21	24
Seed culture medium	Time (h)									
	BCM	2.10±0.10	2.54±0.09	3.69±0.04	4.97±0.03	5.39±0.04	4.85±0.09	4.64±0.05	4.25±0.05	3.98±0.04
	BYPcng	1.95±0.09	2.09±0.08	2.24±0.07	3.20±0.05	3.43±0.06	3.63±0.03	3.00±0.05	2.45±0.09	2.10±0.05
	NB	1.89±0.10	0.49±0.04	0.54±0.09	0.58±0.08	0.73±0.09	0.92±0.06	0.88±0.08	0.83±0.11	0.70±0.07
Initial pH	6.0	1.98±0.08	2.13±0.06	3.30±0.10	3.71±0.07	4.24±0.09	4.09±0.08	3.77±0.11	3.52±0.05	3.38±0.06
	7.0	2.10±0.10	2.54±0.09	3.69±0.04	4.97±0.03	5.39±0.04	4.85±0.09	4.64±0.05	4.25±0.05	3.98±0.04
	8.0	1.99±0.11	2.31±0.08	3.44±0.05	3.91±0.08	4.59±0.09	4.28±0.08	4.15±0.10	3.71±0.09	3.62±0.11
Temperature (°C)	25	1.96±0.04	2.23±0.08	2.67±0.07	3.40±0.05	4.13±0.08	4.03±0.10	3.88±0.03	3.73±0.07	3.57±0.11
	30	2.10±0.10	2.54±0.09	3.69±0.04	4.97±0.03	5.39±0.04	4.85±0.09	4.64±0.05	4.25±0.05	3.98±0.04
	37	2.15±0.05	3.00±0.08	4.11±0.10	5.35±0.05	6.15±0.05	5.63±0.07	5.49±0.04	5.13±0.08	4.78±0.03
	45	2.00±0.05	2.15±0.06	2.48±0.08	3.02±0.11	3.90±0.09	3.75±0.04	3.56±0.07	3.48±0.06	3.11±0.10
	55	1.88±0.11	2.09±0.07	2.32±0.04	2.75±0.06	3.51±0.04	3.47±0.03	3.24±0.07	3.13±0.10	2.90±0.09

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะการเลี้ยงเชื้อต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3HB-generating carbon source (sugar)	Time (h)	DCW (gL <sup>-1</sup> )	P(3HB) concentration (gL <sup>-1</sup> )	P(3HB) content (% DCW)	total sugar concentration (gL <sup>-1</sup> )	ammonium sulphate concentration (gL <sup>-1</sup> )
sucrose	0	1.35±0.09	0.00±0.00	0.00±0.00	20.11±0.10	1.10±0.05
	6	2.34±0.07	0.80±0.11	35.36±0.31	16.27±0.03	0.79±0.04
	12	2.71±0.05	1.23±0.09	45.25±0.90	13.42±0.09	0.39±0.03
	18	3.26±0.04	1.85±0.06	56.64±0.45	12.58±0.03	0.05±0.01
	24	2.91±0.05	1.42±0.08	48.93±0.81	11.89±0.02	0.02±0.01
	36	2.43±0.06	0.90±0.05	36.96±0.56	10.24±0.08	0.00±0.00
	48	2.11±0.03	0.69±0.06	32.72±0.75	8.42±0.10	0.00±0.00
glucose	0	1.27±0.06	0.00±0.00	0.00±0.00	20.50±0.02	1.07±0.10
	6	2.30±0.08	0.79±0.04	34.49±0.82	16.58±0.08	0.88±0.05
	12	2.61±0.08	0.98±0.06	37.75±0.66	15.40±0.05	0.52±0.04
	18	3.01±0.04	1.42±0.05	47.13±0.78	13.92±0.06	0.08±0.05
	24	2.72±0.11	1.17±0.05	43.02±0.53	12.17±0.07	0.03±0.02
	36	2.28±0.03	0.79±0.04	36.14±0.43	11.32±0.06	0.00±0.00
	48	2.02±0.08	0.62±0.09	30.54±0.83	9.33±0.08	0.00±0.00
fructose	0	1.10±0.09	0.00±0.00	0.00±0.00	20.29±0.10	1.05±0.04
	6	2.20±0.10	0.72±0.09	32.85±0.96	17.34±0.08	0.90±0.03
	12	2.49±0.05	0.87±0.08	34.83±0.75	15.70±0.09	0.66±0.03
	18	2.96±0.06	1.25±0.06	42.18±0.50	14.91±0.07	0.09±0.04
	24	2.33±0.05	0.85±0.10	36.37±0.97	13.13±0.06	0.05±0.02
	36	2.14±0.08	0.56±0.09	26.22±0.88	12.24±0.07	0.01±0.01
	48	1.75±0.09	0.40±0.05	23.08±0.38	10.64±0.09	0.00±0.00

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส 20.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB



3HB-generating carbon source (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	Time (h)	DCW (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	P(3HB) concentration (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	P(3HB) content (% DCW)	total sugar concentration (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	ammonium sulphate concentration (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )
sucrose 20 g <sup>L</sup> <sup>-1</sup>	0	1.35±0.09	0.00±0.00	0.00±0.00	20.11±0.10	1.10±0.05
	6	2.34±0.07	0.80±0.11	35.36±0.31	16.27±0.03	0.79±0.04
	12	2.71±0.05	1.23±0.09	45.25±0.90	13.42±0.09	0.39±0.03
	18	3.26±0.04	1.85±0.06	56.64±0.45	12.58±0.03	0.05±0.01
	24	2.91±0.05	1.42±0.08	48.93±0.81	11.89±0.02	0.02±0.01
	36	2.43±0.06	0.90±0.05	36.96±0.56	10.24±0.08	0.00±0.00
	48	2.11±0.03	0.69±0.06	32.72±0.75	8.42±0.10	0.00±0.00
sugarcane liquor 20 g <sup>L</sup> <sup>-1</sup>	0	1.25±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	20.59±0.06	1.01±0.02
	6	9.22±0.03	5.21±0.04	56.46±0.38	11.28±0.03	0.05±0.01
	12	7.66±0.05	3.70±0.06	48.38±0.44	6.83±0.08	0.01±0.01
	18	6.74±0.08	2.95±0.05	43.78±0.63	5.05±0.09	0.01±0.01
	24	6.33±0.07	2.55±0.04	40.31±0.43	3.27±0.06	0.00±0.00
	36	5.86±0.04	1.70±0.08	28.93±0.24	2.26±0.04	0.00±0.00
	48	5.58±0.07	1.09±0.06	19.48±0.52	1.11±0.07	0.00±0.00

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบน้ำหมักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลซูโครส 20.0 กรัมต่อลิตรและน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตรเท่ากันเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้สำหรับการผลิตสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB

sugarcane liquor concentration (g/L <sup>-1</sup> )	Time (h)	DCW (g/L <sup>-1</sup> )	P(3HB) conc. (g/L <sup>-1</sup> )	P(3HB) content (%DCW)	total sugar conc. (g/L <sup>-1</sup> )	ammonium sulphate conc. (g/L <sup>-1</sup> )
20.0	0	1.25±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	20.59±0.06	1.01±0.02
	6	9.22±0.06	5.21±0.04	56.46±0.38	11.28±0.03	0.05±0.01
	12	7.66±0.05	3.70±0.06	48.38±0.44	6.83±0.08	0.01±0.01
	18	6.74±0.08	2.95±0.05	43.78±0.63	5.05±0.09	0.01±0.01
	24	6.33±0.07	2.55±0.04	40.31±0.43	3.27±0.06	0.00±0.00
	36	5.86±0.04	1.70±0.08	28.93±0.24	2.26±0.04	0.00±0.00
	48	5.58±0.07	1.09±0.06	19.48±0.52	1.11±0.07	0.00±0.00
30.0	0	1.32±0.08	0.00±0.00	0.00±0.00	30.12±0.08	1.02±0.02
	6	10.64±0.05	4.03±0.06	48.94±0.34	19.44±0.06	0.05±0.01
	12	9.49±0.06	3.32±0.03	45.90±0.58	18.15±0.07	0.03±0.01
	18	8.04±0.05	2.68±0.06	41.90±0.46	14.25±0.09	0.02±0.01
	24	7.64±0.05	2.32±0.09	38.10±0.66	11.13±0.04	0.01±0.00
	36	6.35±0.09	1.36±0.05	26.48±0.53	7.85±0.05	0.00±0.00
	48	5.86±0.04	0.84±0.04	17.20±0.61	6.22±0.03	0.00±0.00
40.0	0	1.44±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	39.92±0.08	1.03±0.05
	6	12.15±0.05	2.97±0.03	41.03±0.51	28.64±0.05	0.05±0.01
	12	10.85±0.07	2.60±0.06	40.53±0.46	26.71±0.03	0.03±0.01
	18	9.15±0.04	2.15±0.05	38.58±0.65	24.49±0.07	0.03±0.01
	24	8.32±0.05	1.76±0.07	33.30±0.26	20.18±0.08	0.01±0.01
	36	7.24±0.04	1.03±0.09	24.49±0.63	13.73±0.10	0.00±0.00
	48	6.68±0.08	0.60±0.05	15.11±0.54	13.05±0.05	0.00±0.00
50.0	0	1.52±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	50.68±0.07	0.98±0.03
	6	13.05±0.08	1.98±0.05	32.54±0.57	37.25±0.05	0.08±0.01
	12	11.42±0.06	1.88±0.03	31.26±0.72	33.24±0.06	0.06±0.01
	18	10.20±0.05	1.50±0.07	28.84±0.37	29.98±0.04	0.05±0.01
	24	8.96±0.06	1.12±0.08	22.39±0.55	27.90±0.10	0.02±0.01
	36	7.51±0.08	0.58±0.08	17.20±0.66	19.81±0.03	0.01±0.00
	48	6.93±0.04	0.38±0.04	13.49±0.62	16.31±0.08	0.00±0.00

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมีน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 30.0 40.0 และ 50.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB

3HB-generating carbon source (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> ) : 3HV-generating carbon source (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	Time (h)	DCW (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	PHA concentration (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA composition (mol %)		3HB-generating carbon source concentration (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	3HV-generating carbon source concentration (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	ammonium sulphate concentration (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )
					3HB	3HV			
sugarcane liquor : sodium valerate = 15 : 5	0	1.15±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	15.05±0.03	5.12±0.05	1.00±0.02
	6	4.39±0.04	1.77±0.03	40.24±0.27	86	14	4.18±0.05	3.44±0.04	0.08±0.02
	12	4.05±0.05	1.56±0.07	38.59±0.52	86	14	2.07±0.04	2.05±0.04	0.04±0.01
	18	3.51±0.07	0.94±0.04	26.87±0.41	85	15	1.45±0.05	1.50±0.06	0.01±0.01
	24	2.93±0.04	0.38±0.05	12.98±0.74	83	17	1.22±0.07	1.02±0.03	0.00±0.00
	36	2.78±0.04	0.26±0.04	9.33±0.36	83	17	1.02±0.04	0.69±0.04	0.00±0.00
	48	2.65±0.05	0.20±0.03	7.43±0.48	79	21	0.08±0.05	0.03±0.01	0.00±0.00
sugarcane liquor : sodium propionate = 15 : 5	0	1.14±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	15.01±0.06	5.08±0.04	1.00±0.02
	6	3.98±0.04	1.44±0.05	36.25±0.23	89	11	5.53±0.04	4.03±0.03	0.17±0.02
	12	3.71±0.06	1.25±0.04	33.65±0.50	88	12	3.47±0.05	2.14±0.06	0.10±0.01
	18	3.15±0.04	0.74±0.03	23.34±0.58	86	14	2.75±0.04	1.75±0.05	0.07±0.01
	24	2.75±0.08	0.28±0.05	10.01±0.20	84	16	1.94±0.04	1.20±0.05	0.02±0.01
	36	2.50±0.05	0.18±0.06	7.02±0.52	83	17	1.18±0.05	0.95±0.04	0.00±0.00
	48	2.31±0.04	0.13±0.04	5.59±0.73	80	20	0.11±0.03	0.04±0.03	0.00±0.00

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบน้ำหมักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 15.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือ โซเดียมวาเลอเรตหรือเกลือ โซเดียมโพรพิโอเนต 5.0 กรัมต่อลิตร

3HB-generating carbon source (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> ) : 3HV-generating carbon source (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	Time (h)	DCW (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	PHA concentration (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA composition (mol %)		3HB-generating carbon source concentration (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	3HV-generating carbon source concentration (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	ammonium sulphate concentration (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )
					3HB	3HV			
sugarcane liquor : sodium valerate = 10 : 10	0	1.15±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.35±0.03	10.14±0.04	1.00±0.02
	6	3.19±0.04	0.95±0.04	29.78±0.20	79	21	3.58±0.05	6.65±0.08	0.15±0.02
	12	2.84±0.07	0.68±0.03	23.99±0.36	78	22	2.05±0.04	4.75±0.03	0.08±0.02
	18	2.68±0.08	0.36±0.07	13.39±0.55	77	23	1.02±0.03	3.25±0.04	0.03±0.01
	24	2.49±0.06	0.16±0.02	6.57±0.40	76	24	0.84±0.06	2.40±0.05	0.01±0.01
	36	2.39±0.04	0.11±0.03	4.65±0.33	74	26	0.52±0.06	1.05±0.04	0.00±0.00
	48	2.12±0.05	0.08±0.05	3.78±0.25	70	30	0.02±0.02	0.01±0.01	0.00±0.00
sugarcane liquor : sodium propionate = 10 : 10	0	1.15±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.21±0.05	10.06±0.04	1.02±0.02
	6	2.93±0.04	0.71±0.04	24.42±0.24	82	18	4.74±0.05	7.24±0.04	0.24±0.02
	12	2.65±0.04	0.57±0.06	21.35±0.15	81	19	2.95±0.04	5.05±0.03	0.16±0.02
	18	2.42±0.03	0.27±0.03	11.06±0.44	78	22	1.92±0.06	3.96±0.05	0.09±0.02
	24	2.25±0.06	0.09±0.02	4.17±0.19	76	24	0.98±0.05	2.82±0.03	0.05±0.01
	36	1.75±0.05	0.06±0.02	3.41±0.32	73	27	0.64±0.03	1.15±0.03	0.01±0.01
	48	1.51±0.08	0.04±0.02	2.91±0.21	70	30	0.05±0.03	0.01±0.01	0.00±0.00

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบน้ำหมักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 10.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 10.0 กรัมต่อลิตร

3HB-generating carbon source (gL <sup>-1</sup> ) : 3HV-generating carbon source (gL <sup>-1</sup> )	Time (h)	DCW (gL <sup>-1</sup> )	PHA concentration (gL <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA composition (mol %)		3HB-generating carbon source concentration (gL <sup>-1</sup> )	3HV-generating carbon source concentration (gL <sup>-1</sup> )	ammonium sulphate concentration (gL <sup>-1</sup> )
					3HB	3HV			
sugarcane liquor : sodium valerate = 5: 15	0	1.12±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	5.00±0.06	15.02±0.05	1.00±0.03
	6	2.34±0.05	0.49±0.04	21.08±0.16	72	28	2.56±0.04	11.05±0.06	0.30±0.02
	12	2.12±0.08	0.17±0.04	7.88±0.20	70	30	0.85±0.04	7.48±0.05	0.11±0.02
	18	1.95±0.06	0.10±0.05	4.98±0.19	68	32	0.71±0.05	6.40±0.06	0.05±0.01
	24	1.53±0.09	0.03±0.02	2.03±0.26	63	37	0.52±0.07	4.74±0.04	0.02±0.01
	36	1.41±0.05	0.03±0.02	1.86±0.20	61	39	0.33±0.04	3.06±0.05	0.01±0.01
	48	1.30±0.06	0.02±0.01	1.45±0.12	60	40	0.02±0.01	1.12±0.04	0.00±0.00
sugarcane liquor : sodium propionate = 5 : 15	0	1.13±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	5.03±0.04	15.04±0.05	1.05±0.02
	6	2.15±0.05	0.36±0.02	16.77±0.25	74	26	3.22±0.03	12.38±0.04	0.41±0.02
	12	1.93±0.04	0.10±0.04	5.32±0.28	71	29	1.41±0.04	8.12±0.03	0.22±0.02
	18	1.72±0.03	0.07±0.03	3.98±0.22	70	30	0.89±0.06	7.05±0.04	0.10±0.02
	24	1.51±0.06	0.02±0.01	1.64±0.20	69	31	0.65±0.03	4.98±0.05	0.06±0.01
	36	1.35±0.04	0.02±0.01	1.42±0.33	61	39	0.48±0.05	3.72±0.05	0.03±0.01
	48	1.12±0.05	0.01±0.01	1.09±0.30	60	40	0.03±0.02	1.40±0.06	0.01±0.01

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 5.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรตหรือเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 15.0 กรัมต่อลิตร



sugarcane liquor (gL <sup>-1</sup> ) : sodium valerate (gL <sup>-1</sup> )	Time (h)	DCW (gL <sup>-1</sup> )	PHA concentration (gL <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA composition (mol %)		total sugar conc. (gL <sup>-1</sup> )	sodium valerate conc.(gL <sup>-1</sup> )	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. (gL <sup>-1</sup> )
					3HB	3HV			
20:0	0	1.25±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	20.59±0.06	0.00±0.00	1.01±0.02
	6	9.22±0.03	5.21±0.04	56.46±0.38	0	0	11.28±0.03	0.00±0.00	0.05±0.01
	12	7.66±0.05	3.70±0.06	48.38±0.44	0	0	6.83±0.08	0.00±0.00	0.01±0.01
	18	6.74±0.08	2.95±0.05	43.78±0.63	0	0	5.05±0.09	0.00±0.00	0.01±0.01
	24	6.33±0.07	2.55±0.04	40.31±0.43	0	0	3.27±0.06	0.00±0.00	0.00±0.00
19:1	0	1.15±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	19.20±0.04	1.05±0.03	1.00±0.02
	6	6.68±0.03	3.35±0.05	50.20±0.29	97	3	4.97±0.03	0.84±0.05	0.03±0.01
	12	6.15±0.05	2.77±0.07	45.04±0.64	96	4	3.44±0.05	0.66±0.04	0.01±0.01
	18	5.54±0.04	1.80±0.06	32.57±0.50	95	5	2.53±0.03	0.49±0.03	0.00±0.00
	24	4.73±0.08	0.85±0.05	17.99±0.71	94	6	1.50±0.05	0.25±0.05	0.00±0.00
18:2	0	1.15±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	18.14±0.06	2.04±0.03	1.02±0.02
	6	6.45±0.05	3.17±0.03	49.15±0.34	93	7	4.28±0.03	1.36±0.02	0.05±0.02
	12	5.38±0.03	2.28±0.04	42.38±0.41	93	7	3.20±0.05	0.93±0.03	0.02±0.01
	18	4.97±0.07	1.56±0.03	31.47±0.65	92	8	2.46±0.04	0.65±0.05	0.00±0.00
	24	4.30±0.04	0.71±0.08	16.58±0.20	92	8	1.42±0.03	0.42±0.04	0.00±0.00
17:3	0	1.11±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	17.25±0.05	3.18±0.05	1.05±0.02
	6	5.42±0.03	2.45±0.05	45.25±0.23	92	8	4.05±0.05	2.32±0.03	0.06±0.02
	12	4.99±0.04	2.01±0.04	40.38±0.64	92	8	2.95±0.06	1.42±0.05	0.03±0.02
	18	3.50±0.05	0.98±0.09	28.14±0.53	90	10	2.04±0.04	1.09±0.04	0.00±0.00
	24	3.09±0.04	0.49±0.06	15.71±0.34	86	14	1.52±0.05	0.68±0.06	0.00±0.00

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ในโคพอลิเมอร์ ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 20:0 ถึง 17:3 ตามลำดับ

sugarcane liquor (gL <sup>-1</sup> ) : sodium valerate (gL <sup>-1</sup> )	Time (h)	DCW (gL <sup>-1</sup> )	PHA concentration (gL <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA composition (mol %)		total sugar conc. (gL <sup>-1</sup> )	sodium valerate conc. (gL <sup>-1</sup> )	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. (gL <sup>-1</sup> )
					3HB	3HV			
16:4	0	1.16±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	16.06±0.06	4.05±0.03	1.02±0.02
	6	5.08±0.04	2.25±0.05	44.32±0.28	88	12	4.00±0.05	3.23±0.03	0.05±0.02
	12	4.41±0.08	1.76±0.03	39.94±0.48	88	12	2.84±0.03	2.02±0.04	0.02±0.01
	18	3.91±0.05	1.06±0.05	27.13±0.33	87	13	1.95±0.04	1.46±0.06	0.00±0.00
	24	3.05±0.09	0.45±0.04	14.85±0.54	83	17	1.34±0.08	0.75±0.05	0.00±0.00
15:5	0	1.15±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	15.05±0.03	5.12±0.05	1.00±0.02
	6	4.39±0.04	1.77±0.03	40.24±0.27	86	14	4.18±0.05	3.44±0.04	0.08±0.02
	12	4.05±0.05	1.56±0.07	38.59±0.52	86	14	2.07±0.04	2.05±0.04	0.04±0.01
	18	3.51±0.07	0.94±0.04	26.87±0.41	85	15	1.45±0.05	1.50±0.06	0.01±0.01
	24	2.93±0.04	0.38±0.05	12.98±0.74	83	17	1.22±0.07	1.02±0.03	0.00±0.00
14:6	0	1.12±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	13.98±0.06	6.10±0.04	1.05±0.02
	6	4.15±0.03	1.63±0.04	39.32±0.31	85	15	3.96±0.03	4.24±0.05	0.09±0.02
	12	3.57±0.07	1.25±0.05	34.92±0.65	85	15	2.02±0.05	2.35±0.05	0.04±0.01
	18	3.06±0.05	0.78±0.03	25.63±0.48	83	17	1.14±0.04	1.78±0.03	0.01±0.01
	24	2.77±0.08	0.34±0.04	12.37±0.71	82	18	0.98±0.05	1.18±0.08	0.00±0.00
13:7	0	1.18±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	13.02±0.08	7.04±0.04	1.00±0.02
	6	3.85±0.05	1.41±0.04	36.71±0.52	84	16	3.84±0.07	4.35±0.06	0.10±0.01
	12	3.43±0.07	1.08±0.08	31.49±0.28	84	16	2.00±0.05	3.18±0.05	0.04±0.02
	18	2.91±0.05	0.61±0.07	21.11±0.67	83	17	1.08±0.05	1.95±0.04	0.01±0.01
	24	2.76±0.04	0.30±0.05	10.73±0.86	82	18	0.95±0.06	1.36±0.05	0.00±0.00

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ในโคพอลิเมอร์ ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 16:4 และ 13:7 ตามลำดับ

sugarcane liquor (gL <sup>-1</sup> ) : sodium valerate (gL <sup>-1</sup> )	Time (h)	DCW (gL <sup>-1</sup> )	PHA concentration (gL <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA composition (mol %)		total sugar conc. (gL <sup>-1</sup> )	sodium valerate conc. (gL <sup>-1</sup> )	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. (gL <sup>-1</sup> )
					3HB	3HV			
12:8	0	1.14±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	12.00±0.05	8.02±0.03	1.04±0.02
	6	3.72±0.03	1.32±0.04	35.45±0.51	82	18	3.80±0.03	5.14±0.04	0.10±0.02
	12	3.10±0.04	0.79±0.05	25.63±0.36	82	18	2.12±0.06	3.25±0.05	0.05±0.01
	18	2.84±0.04	0.54±0.07	18.96±0.74	82	18	1.02±0.04	2.00±0.05	0.02±0.01
	24	2.68±0.09	0.25±0.05	9.32±0.49	81	19	0.88±0.06	1.42±0.08	0.00±0.00
11:9	0	1.16±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	11.26±0.04	9.11±0.04	1.02±0.02
	6	3.43±0.03	1.12±0.03	32.65±0.31	81	19	3.75±0.08	6.02±0.03	0.11±0.02
	12	2.93±0.08	0.72±0.03	24.48±0.53	81	19	2.14±0.05	4.64±0.04	0.06±0.02
	18	2.72±0.04	0.49±0.07	17.87±0.63	80	20	1.05±0.06	2.95±0.07	0.02±0.01
	24	2.55±0.05	0.18±0.02	7.11±0.35	80	20	0.85±0.05	2.38±0.06	0.00±0.00
10:10	0	1.15±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.35±0.03	10.14±0.04	1.00±0.02
	6	3.19±0.04	0.95±0.04	29.78±0.20	79	21	3.58±0.05	6.65±0.08	0.15±0.02
	12	2.84±0.07	0.68±0.03	23.99±0.36	78	22	2.05±0.04	4.75±0.03	0.08±0.02
	18	2.68±0.08	0.36±0.07	13.39±0.55	77	23	1.02±0.03	3.25±0.04	0.03±0.01
	24	2.49±0.06	0.16±0.02	6.57±0.40	76	24	0.84±0.06	2.40±0.05	0.01±0.01
9:11	0	1.18±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	9.28±0.05	11.20±0.04	1.01±0.02
	6	2.86±0.04	0.79±0.03	27.75±0.39	77	23	3.45±0.04	7.25±0.03	0.18±0.02
	12	2.66±0.04	0.53±0.06	20.01±0.55	77	23	2.02±0.06	5.08±0.05	0.08±0.02
	18	2.50±0.05	0.29±0.04	11.71±0.46	75	25	1.00±0.03	3.64±0.07	0.03±0.01
	24	2.31±0.08	0.14±0.05	6.06±0.60	74	26	0.76±0.05	2.62±0.05	0.01±0.01

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ในโคพอลิเมอร์ ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 12:8 ถึง 9:11 ตามลำดับ

sugarcane liquor (gL <sup>-1</sup> ) : sodium valerate (gL <sup>-1</sup> )	Time (h)	DCW (gL <sup>-1</sup> )	PHA concentration (gL <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA composition (mol %)		total sugar conc. (gL <sup>-1</sup> )	sodium valerate conc. (gL <sup>-1</sup> )	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. (gL <sup>-1</sup> )
					3HB	3HV			
8:12	0	1.14±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	8.05±0.05	12.15±0.04	1.05±0.02
	6	2.73±0.03	0.71±0.04	25.87±0.44	76	24	3.24±0.03	8.75±0.04	0.22±0.02
	12	2.61±0.06	0.50±0.04	19.06±0.65	76	24	2.00±0.04	5.40±0.05	0.09±0.02
	18	2.46±0.04	0.24±0.06	9.93±0.72	75	25	0.96±0.05	3.78±0.09	0.03±0.01
	24	2.27±0.08	0.10±0.05	4.38±0.39	73	27	0.78±0.06	2.88±0.05	0.02±0.01
7:13	0	1.12±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	6.98±0.03	13.01±0.04	1.02±0.03
	6	2.62±0.03	0.64±0.05	24.45±0.58	74	26	3.20±0.06	9.70±0.05	0.25±0.03
	12	2.51±0.09	0.28±0.07	11.36±0.66	74	26	2.00±0.04	5.66±0.06	0.09±0.02
	18	2.41±0.04	0.20±0.06	8.46±0.47	73	27	0.89±0.07	4.27±0.04	0.04±0.01
	24	2.20±0.10	0.07±0.05	3.33±0.29	71	29	0.75±0.05	3.21±0.03	0.02±0.01
6:14	0	1.15±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	6.08±0.05	14.05±0.03	1.00±0.03
	6	2.58±0.05	0.60±0.04	23.36±0.35	73	27	3.09±0.04	10.08±0.04	0.28±0.03
	12	2.48±0.07	0.23±0.03	9.23±0.22	72	28	1.99±0.05	6.85±0.03	0.11±0.02
	18	2.34±0.06	0.14±0.05	6.15±0.42	70	30	0.74±0.03	4.50±0.06	0.05±0.01
	24	2.05±0.08	0.05±0.04	2.26±0.16	68	32	0.67±0.08	3.65±0.05	0.02±0.01
5:15	0	1.12±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	5.00±0.06	15.02±0.05	1.00±0.03
	6	2.34±0.05	0.49±0.04	21.08±0.16	72	28	2.56±0.04	11.05±0.06	0.30±0.02
	12	2.12±0.08	0.17±0.04	7.88±0.20	70	30	0.85±0.04	7.48±0.05	0.11±0.02
	18	1.95±0.06	0.10±0.05	4.98±0.19	68	32	0.71±0.05	6.40±0.06	0.05±0.01
	24	1.53±0.09	0.03±0.02	2.03±0.26	63	37	0.52±0.07	4.74±0.04	0.02±0.01

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ในโคพอลิเมอร์ ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 8:12 ถึง 5:15 ตามลำดับ

sugarcane liquor (gL <sup>-1</sup> ) : sodium valerate (gL <sup>-1</sup> )	Time (h)	DCW (gL <sup>-1</sup> )	PHA concentration (gL <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA composition (mol %)		total sugar conc. (gL <sup>-1</sup> )	sodium valerate conc. (gL <sup>-1</sup> )	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. (gL <sup>-1</sup> )
					3HB	3HV			
4:16	0	1.18±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	4.02±0.05	16.05±0.04	1.04±0.03
	6	2.24±0.05	0.45±0.03	19.95±0.19	70	30	1.96±0.04	13.54±0.05	0.34±0.03
	12	2.02±0.04	0.13±0.02	6.43±0.30	69	31	0.68±0.03	9.35±0.06	0.19±0.02
	18	1.79±0.04	0.05±0.02	3.05±0.25	68	32	0.64±0.04	8.12±0.05	0.08±0.01
	24	1.33±0.06	0.02±0.02	1.20±0.28	67	33	0.50±0.05	6.85±0.05	0.03±0.01
3:17	0	1.15±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	3.10±0.04	17.18±0.05	1.02±0.02
	6	2.18±0.03	0.40±0.02	18.53±0.31	68	32	1.25±0.05	13.65±0.08	0.39±0.02
	12	1.96±0.04	0.09±0.02	4.80±0.39	65	35	0.60±0.04	10.23±0.04	0.21±0.02
	18	1.54±0.04	0.03±0.02	2.11±0.45	64	36	0.52±0.03	8.25±0.03	0.09±0.01
	24	1.23±0.03	0.01±0.01	1.17±0.36	62	38	0.46±0.03	7.50±0.04	0.03±0.01
2:18	0	1.16±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	2.20±0.06	18.04±0.05	1.01±0.02
	6	2.09±0.06	0.35±0.05	16.56±0.22	65	35	0.54±0.04	14.05±0.04	0.44±0.02
	12	1.73±0.05	0.05±0.03	3.16±0.34	63	37	0.32±0.03	11.44±0.07	0.25±0.01
	18	1.61±0.03	0.03±0.01	1.70±0.29	59	41	0.29±0.03	10.45±0.03	0.10±0.01
	24	1.12±0.05	0.01±0.01	1.25±0.30	58	42	0.18±0.03	9.28±0.05	0.05±0.01
1:19	0	1.12±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	1.05±0.03	19.25±0.05	1.00±0.02
	6	1.94±0.05	0.27±0.05	13.93±0.16	64	36	0.48±0.02	14.25±0.04	0.50±0.02
	12	1.65±0.03	0.05±0.02	2.77±0.19	60	40	0.30±0.03	12.30±0.05	0.29±0.01
	18	1.46±0.05	0.02±0.01	1.34±0.20	56	44	0.20±0.03	10.85±0.06	0.10±0.01
	24	1.25±0.05	0.01±0.01	0.70±0.24	53	47	0.12±0.02	9.64±0.04	0.05±0.01

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ในโคพอลิเมอร์ ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 4:16 ถึง 1:19 ตามลำดับ



Nitrogen source	Time (h)	DCW (gL <sup>-1</sup> )	PHA concentration (gL <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA composition (mol %)		total sugar concentration (gL <sup>-1</sup> )	sodium valerate concentration (gL <sup>-1</sup> )	nitrogen concentration (gL <sup>-1</sup> )
					3HB	3HV			
ammonium sulphate 1.0 gL <sup>-1</sup>	0	1.15±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.35±0.03	10.14±0.04	1.00±0.02
	6	3.19±0.04	0.95±0.04	29.78±0.20	79	21	3.58±0.05	6.65±0.08	0.15±0.02
	12	2.84±0.07	0.68±0.03	23.99±0.36	78	22	2.05±0.04	4.75±0.03	0.08±0.02
	18	2.68±0.08	0.36±0.07	13.39±0.55	77	23	1.02±0.03	3.25±0.04	0.03±0.01
	24	2.49±0.06	0.16±0.02	6.57±0.40	76	24	0.84±0.06	2.40±0.05	0.01±0.01
urea 0.5 gL <sup>-1</sup>	0	1.12±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.12±0.05	10.02±0.06	0.51±0.02
	6	2.19±0.03	0.44±0.04	20.05±0.35	82	18	7.08±0.06	6.52±0.04	0.25±0.02
	12	2.91±0.05	0.80±0.05	27.66±0.43	80	20	0.75±0.03	4.74±0.03	0.03±0.01
	18	2.63±0.04	0.67±0.03	25.71±0.26	70	30	0.48±0.04	3.15±0.05	0.00±0.00
	24	2.52±0.03	0.29±0.04	11.36±0.72	66	34	0.34±0.05	1.82±0.08	0.00±0.00

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ในโคพอลิเมอร์ ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณเกลือ โซเดียมวาเลอเรต และปริมาณไนโตรเจน เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตรกับยูเรียที่โมลของไนโตรเจนเท่ากับแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งคิดเป็น 0.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำย่อยต่อเกลือ โซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 10:10 เป็นแหล่งคาร์บอน

Urea conc. (gL <sup>-1</sup> )	Time (h)	DCW (gL <sup>-1</sup> )	PHA concentration (gL <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA composition (mol %)		total sugar concentration (gL <sup>-1</sup> )	sodium valerate concentration (gL <sup>-1</sup> )	urea concentration (gL <sup>-1</sup> )
					3HB	3HV			
0.5	0	1.12±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.12±0.05	10.02±0.06	0.51±0.02
	6	2.19±0.03	0.44±0.04	20.05±0.35	82	18	7.08±0.06	6.52±0.04	0.25±0.02
	12	2.91±0.05	0.80±0.05	27.66±0.43	80	20	0.75±0.03	4.74±0.03	0.03±0.01
	18	2.63±0.04	0.67±0.03	25.71±0.26	70	30	0.48±0.04	3.15±0.05	0.00±0.00
	24	2.52±0.03	0.29±0.04	11.36±0.72	66	34	0.34±0.05	1.82±0.08	0.00±0.00
1.0	0	1.15±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.06±0.04	10.04±0.03	1.05±0.02
	6	2.49±0.03	0.67±0.03	27.02±0.20	79	21	6.32±0.03	5.80±0.02	0.32±0.01
	12	3.78±0.03	1.40±0.02	37.06±0.26	79	21	0.08±0.03	3.67±0.04	0.05±0.01
	18	3.34±0.04	0.64±0.02	19.27±0.32	67	33	0.00±0.00	1.98±0.06	0.00±0.00
	24	3.27±0.02	0.23±0.03	6.94±0.23	64	36	0.00±0.00	0.74±0.05	0.00±0.00
1.5	0	1.14±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.02±0.04	10.06±0.03	1.54±0.03
	6	2.50±0.05	0.64±0.05	25.43±0.22	79	21	6.45±0.05	5.96±0.04	0.44±0.03
	12	3.80±0.05	1.21±0.04	31.86±0.31	76	24	0.23±0.03	3.82±0.05	0.10±0.01
	18	3.35±0.03	0.62±0.05	18.50±0.24	65	35	0.19±0.02	2.08±0.04	0.01±0.01
	24	3.30±0.03	0.20±0.03	5.96±0.36	63	37	0.09±0.03	0.95±0.03	0.00±0.00

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ในโคพอลิเมอร์ ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณเกลือ โซเดียมวาเลอเรต และปริมาณยูเรีย เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยต่อเกลือ โซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 10:10 เป็นแหล่งคาร์บอนและมียูเรีย 0.5 ถึง 1.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจน

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Urea conc. (gL <sup>-1</sup> )	Time (h)	DCW (gL <sup>-1</sup> )	PHA concentration (gL <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA composition (mol %)		total sugar concentration (gL <sup>-1</sup> )	sodium valerate concentration (gL <sup>-1</sup> )	urea concentration (gL <sup>-1</sup> )
					3HB	3HV			
2.0	0	1.16±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.15±0.05	10.02±0.04	2.04±0.02
	6	2.55±0.04	0.54±0.04	21.34±0.20	75	25	6.63±0.03	6.15±0.03	0.56±0.02
	12	3.82±0.03	1.16±0.03	30.32±0.37	74	26	0.51±0.05	4.04±0.05	0.17±0.01
	18	3.49±0.04	0.31±0.04	8.97±0.22	63	37	0.36±0.03	2.36±0.03	0.04±0.01
	24	3.32±0.02	0.11±0.05	3.20±0.33	61	39	0.14±0.03	1.22±0.04	0.01±0.01
2.5	0	1.18±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.03 ±0.05	10.05±0.04	2.50±0.02
	6	2.65±0.06	0.53±0.03	19.89±0.35	72	28	6.98±0.04	6.32±0.05	0.64±0.02
	12	3.88±0.02	1.09±0.03	28.05±0.43	70	30	0.57±0.03	4.45±0.03	0.22±0.02
	18	3.55±0.03	0.24±0.04	6.76±0.25	61	39	0.38±0.06	2.84±0.04	0.10±0.01
	24	3.43±0.03	0.10±0.02	2.86±0.15	60	40	0.21±0.04	1.56±0.03	0.02±0.01
3.0	0	1.15±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.15±0.05	10.00±0.05	3.05±0.03
	6	2.94±0.03	0.43±0.03	14.57±0.12	70	30	7.50±0.05	7.35±0.04	0.72±0.03
	12	4.10±0.05	0.66±0.03	16.13±0.15	65	35	1.28±0.03	5.65±0.07	0.30±0.02
	18	3.96±0.02	0.12±0.02	2.98±0.12	60	40	0.96±0.04	4.24±0.03	0.19±0.04
	24	3.75±0.03	0.07±0.02	1.84±0.16	58	42	0.55±0.03	2.39±0.05	0.09±0.03

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ในโคพอลิเมอร์ ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณเกลือ โซเดียมวาเลอเรต และปริมาณยูเรีย เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยต่อเกลือ โซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 10:10 เป็นแหล่งคาร์บอนและมียูเรีย 2.0 ถึง 3.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจน

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Initial pH	Time (h)	DCW (gL <sup>-1</sup> )	PHA concentration (gL <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA composition (mol %)		total sugar concentration (gL <sup>-1</sup> )	sodium valerate concentration (gL <sup>-1</sup> )	urea concentration (gL <sup>-1</sup> )
					3HB	3HV			
6.0	0	1.16±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.12±0.05	10.01±0.04	1.02±0.03
	6	1.22±0.04	0.13±0.05	10.64±0.32	84	16	9.12±0.04	7.48±0.04	0.66±0.03
	12	2.02±0.03	0.31±0.03	15.23±0.28	82	18	7.45±0.03	5.75±0.03	0.35±0.02
	18	1.81±0.03	0.21±0.04	11.59±0.36	76	24	6.40±0.02	4.42±0.03	0.21±0.02
	24	1.55±0.05	0.06±0.03	3.70±0.23	69	31	6.32±0.03	2.46±0.06	0.14±0.02
7.0	0	1.15±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.06±0.04	10.04±0.03	1.05±0.02
	6	2.49±0.03	0.67±0.03	27.02±0.20	79	21	6.32±0.03	5.80±0.02	0.32±0.01
	12	3.78±0.03	1.40±0.02	37.06±0.26	79	21	0.08±0.03	3.67±0.04	0.05±0.01
	18	3.34±0.04	0.64±0.02	19.27±0.32	67	33	0.00±0.00	1.98±0.06	0.00±0.00
	24	3.27±0.02	0.23±0.03	6.94±0.23	64	36	0.00±0.00	0.74±0.05	0.00±0.00
8.0	0	1.15±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.15±0.04	10.12±0.03	1.00±0.03
	6	2.32±0.03	0.58±0.02	24.86±0.22	79	21	6.01±0.05	6.56±0.05	0.48±0.02
	12	3.57±0.04	0.98±0.03	27.43±0.35	76	24	3.32±0.04	4.72±0.03	0.21±0.02
	18	3.15±0.03	0.52±0.03	16.47±0.50	64	36	1.14±0.03	3.21±0.03	0.09±0.01
	24	3.05±0.03	0.13±0.03	4.39±0.20	62	38	0.65±0.06	1.75±0.08	0.03±0.01

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของ 3HB และ 3HV ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณยูเรีย เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหาร MSM เท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ โดยมีน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 10:10 เป็นแหล่งคาร์บอนและมียูเรีย 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

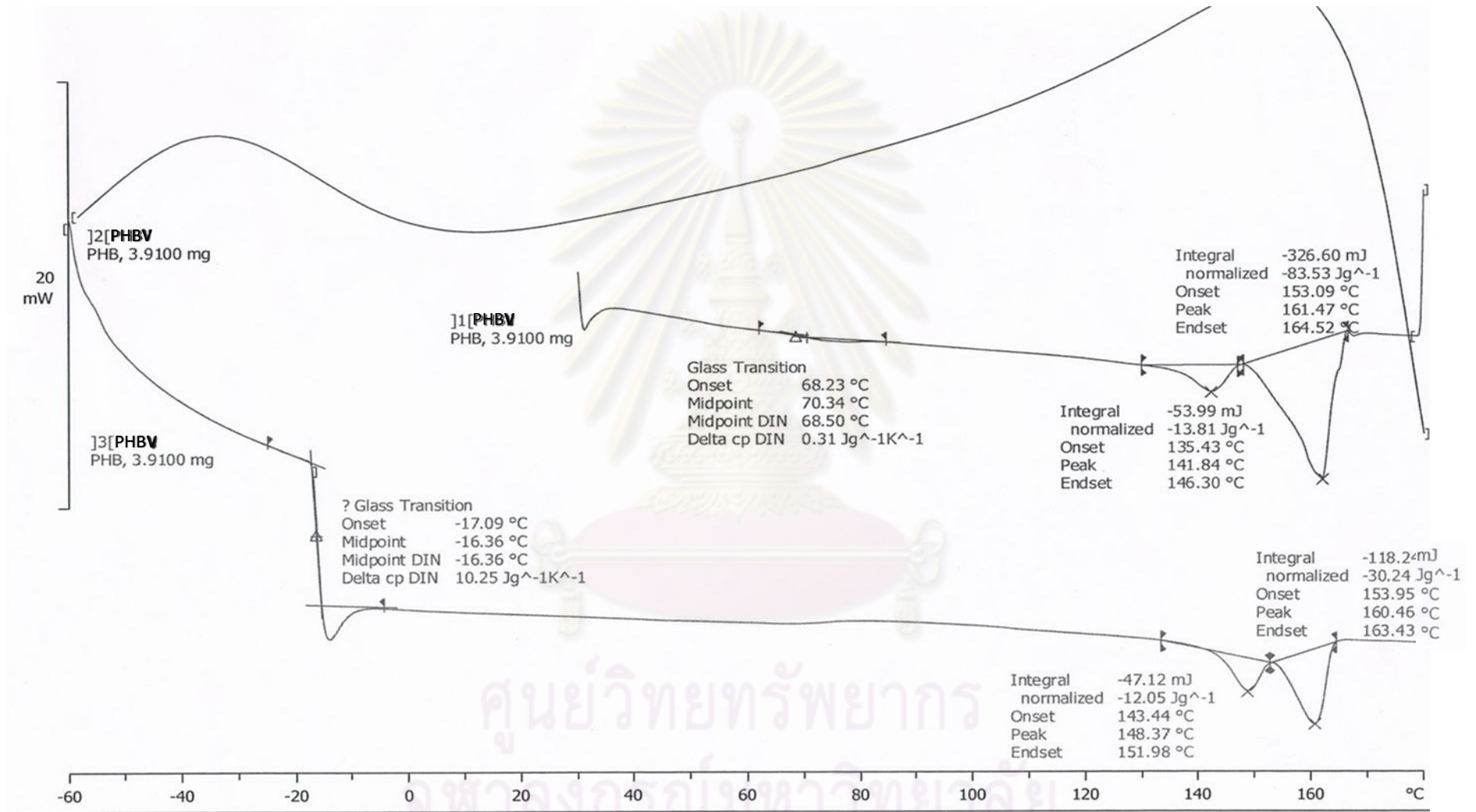
MSM medium volume (mL)	Time (h)	DCW (gL <sup>-1</sup> )	PHA concentration (gL <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA composition (mol %)		total sugar conc. (gL <sup>-1</sup> )	sodium valerate conc. (gL <sup>-1</sup> )	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. (gL <sup>-1</sup> )
					3HB	3HV			
25	0	1.16±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.05±0.06	10.00±0.05	1.00±0.02
	6	2.14±0.04	0.55±0.03	25.61±0.35	80	20	6.84±0.04	6.05±0.05	0.48±0.02
	12	3.20±0.03	1.01±0.05	31.42±0.42	79	21	1.43±0.05	3.96±0.04	0.12±0.02
	18	3.02±0.03	0.52±0.06	17.26±0.23	74	26	0.24±0.05	2.20±0.06	0.06±0.01
	24	1.97±0.07	0.12±0.03	6.05±0.58	70	30	0.05±0.04	1.16±0.03	0.02±0.01
50	0	1.15±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.06±0.04	10.04±0.03	1.05±0.02
	6	2.49±0.03	0.67±0.03	27.02±0.20	79	21	6.32±0.03	5.80±0.02	0.32±0.01
	12	3.78±0.03	1.40±0.02	37.06±0.26	79	21	0.08±0.03	3.67±0.04	0.05±0.01
	18	3.34±0.04	0.64±0.02	19.27±0.32	67	33	0.00±0.00	1.98±0.06	0.00±0.00
	24	3.27±0.02	0.23±0.03	6.94±0.23	64	36	0.00±0.00	0.74±0.05	0.00±0.00
75	0	1.15±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.12±0.05	10.02±0.04	1.02±0.03
	6	2.02±0.06	0.47±0.03	23.45±0.22	80	20	7.12±0.08	6.22±0.04	0.56±0.03
	12	3.34±0.04	1.01±0.03	30.22±0.25	79	21	1.95±0.04	4.15±0.05	0.21±0.02
	18	3.26±0.03	0.53±0.03	16.39±0.15	70	30	0.66±0.05	2.53±0.08	0.15±0.02
	24	3.17±0.03	0.16±0.04	4.95±0.30	66	34	0.12±0.04	1.34±0.05	0.07±0.01
100	0	1.18±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.20±0.05	10.06±0.08	1.08±0.03
	6	1.91±0.06	0.44±0.05	23.13±0.28	81	19	7.80±0.04	6.30±0.06	0.63±0.03
	12	3.25±0.04	0.95±0.05	29.37±0.25	79	21	2.45±0.05	4.25±0.05	0.29±0.03
	18	3.20±0.06	0.41±0.07	12.87±0.51	72	28	1.16±0.04	2.66±0.04	0.20±0.02
	24	3.03±0.05	0.11±0.04	3.73±0.36	67	33	0.88±0.06	1.45±0.05	0.11±0.01

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของ 3HB และ 3HV ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรต และปริมาณยูเรีย เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยต่อเกลือโซเดียมวาเลอเรตในอัตราส่วน 10:10 เป็นแหล่งคาร์บอน มียูเรีย 1.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 โดยบรรจุปริมาตรของอาหาร MSM เท่ากับ 25 ถึง 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

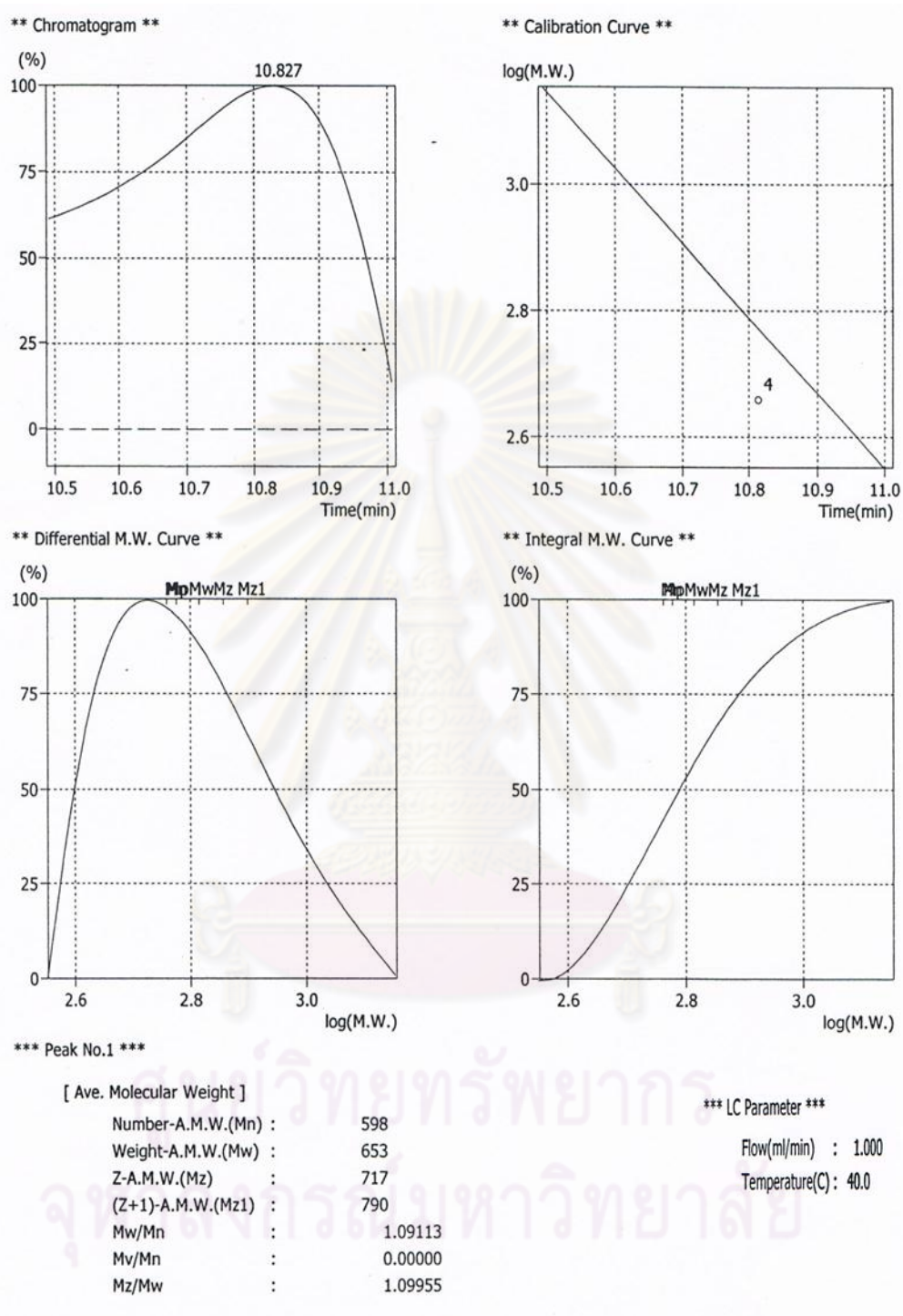


Time (h)	DCW (gL <sup>-1</sup> )	PHA conc. (gL <sup>-1</sup> )	PHA content (%DCW)	PHA composition (mol %)		total sugar conc.(gL <sup>-1</sup> )	sodium valerate conc. (gL <sup>-1</sup> )	urea conc. (gL <sup>-1</sup> )
				3HB	3HV			
0	1.32±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0	10.20±0.04	10.15±0.05	1.08±0.10
3	2.58±0.07	0.44±0.05	14.94±0.29	93	7	7.45±0.10	7.68±0.04	0.45±0.09
6	3.81±0.05	1.02±0.08	30.71±0.37	89	11	5.15±0.05	5.35±0.07	0.26±0.04
9	4.42±0.06	1.32±0.03	37.08±0.48	84	16	4.02±0.08	4.35±0.05	0.11±0.05
12	4.89±0.06	1.76±0.04	41.36±0.31	79	21	2.85±0.05	3.32±0.08	0.05±0.04
15	4.52±0.07	1.54±0.06	39.24±0.28	75	25	2.45±0.05	2.68±0.05	0.00±0.00
18	4.33±0.05	1.36±0.04	36.03±0.55	71	29	2.05±0.06	2.34±0.07	0.00±0.00
21	4.25±0.04	1.21±0.08	32.93±0.60	67	33	1.85±0.07	2.18±0.05	0.00±0.00
24	4.08±0.07	1.03±0.06	29.05±0.78	61	39	1.55±0.09	1.74±0.07	0.00±0.00
27	3.80±0.08	0.93±0.09	27.06±0.53	52	48	1.42±0.09	1.62±0.10	0.00±0.00
30	3.54±0.05	0.85±0.07	25.27±0.46	43	57	1.34±0.07	1.55±0.06	0.00±0.00
33	3.22±0.03	0.77±0.06	24.61±0.53	28	72	1.25±0.10	1.42±0.06	0.00±0.00
36	3.12±0.04	0.66±0.05	22.97±0.71	17	83	1.12±0.09	1.33±0.08	0.00±0.00

ตารางที่ 18 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHBV สัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของ 3HB และ 3HV ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณเกลือโซเดียมวาเลอเรตและปริมาณยูเรีย เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



รูปที่ 1 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลวและอุณหภูมิกลาสรานลิซันของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้จาก *B.megaterium* P-12



รูปที่ 2 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก ( $M_w$ ) และน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน ( $M_n$ ) ของโคพอลิเมอร์ PHBV รวมทั้งค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (PDI) ของโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จาก *B.megaterium* P-12

## ภาคผนวก จ

## ผลการทดสอบทางสถิติ

1. เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดระหว่างอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM BYPcng และ NB

## One way

## Test of Homogeneity of Variances

DCW

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.609	2	6	.575

## ANOVA

DCW	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	30.423	2	15.211	8.149E3	.000
Within Groups	.011	6	.002		
Total	30.434	8			

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Tukey

HSD

(I) seed medium	(J) seed medium	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	1.76000*	.03528	.000	1.6518	1.8682
	3	4.47000*	.03528	.000	4.3618	4.5782
2	1	-1.76000*	.03528	.000	-1.8682	-1.6518
	3	2.71000*	.03528	.000	2.6018	2.8182
3	1	-4.47000*	.03528	.000	-4.5782	-4.3618
	2	-2.71000*	.03528	.000	-2.8182	-2.6018

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(เมื่อ 1: อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM/2: BYPcng และ /3: NB)

2. เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ เท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0

**One way****Test of Homogeneity of Variances**

DCW

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.016	2	5	.426

**ANOVA**

DCW	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.089	2	1.045	235.258	.000
Within Groups	.022	5	.004		
Total	2.111	7			

**Post Hoc Tests****Multiple Comparisons**

Tukey HSD

(I) pH	(J) pH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-1.15000 <sup>*</sup>	.05441	.000	-1.3270	-.9730
	3	-.31000 <sup>*</sup>	.06083	.009	-.5079	-.1121
2	1	1.15000 <sup>*</sup>	.05441	.000	.9730	1.3270
	3	.84000 <sup>*</sup>	.06083	.000	.6421	1.0379
3	1	.31000 <sup>*</sup>	.06083	.009	.1121	.5079
	2	-.84000 <sup>*</sup>	.06083	.000	-1.0379	-.6421

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(เมื่อ 1: ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเท่ากับ 6.0 /2: 7.0 และ /3: 8.0)

3. เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดระหว่างอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 30 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส

**One way****Test of Homogeneity of Variances**

DCW

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.612	4	10	.246



## ANOVA

DCW	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14.773	4	3.693	956.798	.000
Within Groups	.039	10	.004		
Total	14.812	14			

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Tukey

HSD

(I) Temp	(J) Temp	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-1.26000*	.05073	.000	-1.4270	-1.0930
	3	-2.02000*	.05073	.000	-2.1870	-1.8530
	4	.23000	.05073	.007	.0630	.3970
	5	.62000	.05073	.000	.4530	.7870
2	1	1.26000*	.05073	.000	1.0930	1.4270
	3	-.76000*	.05073	.000	-.9270	-.5930
	4	1.49000*	.05073	.000	1.3230	1.6570
	5	1.88000*	.05073	.000	1.7130	2.0470
3	1	2.02000*	.05073	.000	1.8530	2.1870
	2	.76000*	.05073	.000	.5930	.9270
	4	2.25000*	.05073	.000	2.0830	2.4170
	5	2.64000*	.05073	.000	2.4730	2.8070
4	1	-.23000	.05073	.007	-.3970	-.0630
	2	-1.49000*	.05073	.000	-1.6570	-1.3230
	3	-2.25000*	.05073	.000	-2.4170	-2.0830
	5	.39000	.05073	.000	.2230	.5570
5	1	-.62000*	.05073	.000	-.7870	-.4530
	2	-1.88000*	.05073	.000	-2.0470	-1.7130
	3	-2.64000*	.05073	.000	-2.8070	-2.4730
	4	-.39000	.05073	.000	-.5570	-.2230

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(เมื่อ 1: อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงกล้าเชื้อเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส /2: 30 องศาเซลเซียส /3: 37 องศาเซลเซียส /4: 45 องศาเซลเซียส และ /5: 55 องศาเซลเซียส)

4. เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHA สูงสุดระหว่างซูโครส กลูโคส และฟรักโทส

One way

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
DCW	.509	2	6	.625
PHAconc	.148	2	6	.865
PHAcontent	.937	2	5	.451

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DCW	Between Groups	.157	2	.079	37.866	.000
	Within Groups	.012	6	.002		
	Total	.170	8			
PHAconc	Between Groups	.572	2	.286	99.015	.000
	Within Groups	.017	6	.003		
	Total	.589	8			
PHAcontent	Between Groups	271.178	2	135.589	357.242	.000
	Within Groups	1.898	5	.380		
	Total	273.075	7			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) pure sugar	(J) pure sugar	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
DCW	1	2	.25000 <sup>*</sup>	.03722	.001	.1358	.3642
		3	.30333 <sup>*</sup>	.03722	.000	.1891	.4175
	2	1	-.25000 <sup>*</sup>	.03722	.001	-.3642	-.1358
		3	.05333	.03722	.384	-.0609	.1675
	3	1	-.30333 <sup>*</sup>	.03722	.000	-.4175	-.1891
		2	-.05333	.03722	.384	-.1675	.0609
PHAconc	1	2	.42667 <sup>*</sup>	.04389	.000	.2920	.5613
		3	.60000 <sup>*</sup>	.04389	.000	.4653	.7347
	2	1	-.42667 <sup>*</sup>	.04389	.000	-.5613	-.2920
		3	.17333 <sup>*</sup>	.04389	.018	.0387	.3080
	3	1	-.60000 <sup>*</sup>	.04389	.000	-.7347	-.4653
		2	-.17333 <sup>*</sup>	.04389	.018	-.3080	-.0387

PHAcontent	1	2	9.50667	.50302	.000	7.8699	11.1434
		3	14.26167	.56239	.000	12.4317	16.0916
	2	1	-9.50667	.50302	.000	-11.1434	-7.8699
		3	4.75500	.56239	.001	2.9250	6.5850
	3	1	-14.26167	.56239	.000	-16.0916	-12.4317
		2	-4.75500	.56239	.001	-6.5850	-2.9250

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(เมื่อ 1: ชูโครส/2: กลูโคส และ/3: ฟรักโตส)

5. เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHA สูงสุดระหว่างชูโครสกับน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตรเท่ากัน

One way

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
DCW	.400	1	4	.561
PHAconc	.630	1	4	.472
PHAcontent	2.349	1	3	.223

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DCW	Between Groups	53.282	1	53.282	5.328E4	.000
	Within Groups	.004	4	.001		
	Total	53.286	5			
PHAconc	Between Groups	16.934	1	16.934	6.311E3	.000
	Within Groups	.011	4	.003		
	Total	16.945	5			
PHAcontent	Between Groups	.000	1	.000	.003	.962
	Within Groups	.453	3	.151		
	Total	.454	4			

6. เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHA สูงสุดระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20.0 30.0 40.0 และ 50.0 กรัมต่อลิตร

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
DCW	.815	3	8	.521
PHAconc	1.172	3	8	.379
PHAcontent	1.319	3	7	.342

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DCW	Between Groups	25.626	3	8.542	2.373E3	.000
	Within Groups	.029	8	.004		
	Total	25.655	11			
PHAconc	Between Groups	17.339	3	5.780	2.989E3	.000
	Within Groups	.015	8	.002		
	Total	17.354	11			
PHAcontent	Between Groups	794.963	3	264.988	1.122E3	.000
	Within Groups	1.654	7	.236		
	Total	796.617	10			

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

## Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Sugar conc	(J) Sugar conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
DCW	1	2	-1.42000*	.04899	.000	-1.5769	-1.2631
		3	-2.93000*	.04899	.000	-3.0869	-2.7731
		4	-3.83000*	.04899	.000	-3.9869	-3.6731
	2	1	1.42000*	.04899	.000	1.2631	1.5769
		3	-1.51000*	.04899	.000	-1.6669	-1.3531
		4	-2.41000*	.04899	.000	-2.5669	-2.2531
	3	1	2.93000*	.04899	.000	2.7731	3.0869
		2	1.51000*	.04899	.000	1.3531	1.6669
		4	-.90000*	.04899	.000	-1.0569	-.7431
	4	1	3.83000*	.04899	.000	3.6731	3.9869
		2	2.41000*	.04899	.000	2.2531	2.5669
		3	.90000*	.04899	.000	.7431	1.0569

PHAconc	1	2	1.18000*	.03590	.000	1.0650	1.2950
		3	2.23333*	.03590	.000	2.1184	2.3483
		4	3.23000*	.03590	.000	3.1150	3.3450
	2	1	-1.18000*	.03590	.000	-1.2950	-1.0650
		3	1.05333*	.03590	.000	.9384	1.1683
		4	2.05000*	.03590	.000	1.9350	2.1650
	3	1	-2.23333*	.03590	.000	-2.3483	-2.1184
		2	-1.05333*	.03590	.000	-1.1683	-.9384
		4	.99667*	.03590	.000	.8817	1.1116
	4	1	-3.23000*	.03590	.000	-3.3450	-3.1150
		2	-2.05000*	.03590	.000	-2.1650	-1.9350
		3	-.99667*	.03590	.000	-1.1116	-.8817
PHAcontent	1	2	7.51667*	.39688	.000	6.2029	8.8304
		3	15.42667*	.39688	.000	14.1129	16.7404
		4	24.00667*	.44372	.000	22.5379	25.4755
	2	1	-7.51667*	.39688	.000	-8.8304	-6.2029
		3	7.91000*	.39688	.000	6.5963	9.2237
		4	16.49000*	.44372	.000	15.0212	17.9588
	3	1	-15.42667*	.39688	.000	-16.7404	-14.1129
		2	-7.91000*	.39688	.000	-9.2237	-6.5963
		4	8.58000*	.44372	.000	7.1112	10.0488
	4	1	-24.00667*	.44372	.000	-25.4755	-22.5379
		2	-16.49000*	.44372	.000	-17.9588	-15.0212
		3	-8.58000*	.44372	.000	-10.0488	-7.1112

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(เมื่อ 1: น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร/2: 30 กรัมต่อลิตร/3: 40 กรัมต่อลิตร และ/4: 50 กรัมต่อลิตร)



7. เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHA สูงสุดระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 15.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรต 5.0 กรัมต่อลิตรกับน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 15.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมโพรฟิไอเนต 5.0 กรัมต่อลิตร

One way

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
DCW	.036	1	4	.859
PHAconc	2.415	1	4	.195
PHAcontent	.022	1	4	.890

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DCW	Between Groups	.256	1	.256	187.512	.000
	Within Groups	.005	4	.001		
	Total	.262	5			
PHAconc	Between Groups	.160	1	.160	90.604	.001
	Within Groups	.007	4	.002		
	Total	.167	5			
PHAcontent	Between Groups	23.840	1	23.840	389.759	.000
	Within Groups	.245	4	.061		
	Total	24.085	5			

8. เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHA สูงสุดระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 10.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรต 10.0 กรัมต่อลิตรกับน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 10.0 กรัมต่อลิตรเกลือโซเดียมโพรฟิไอเนต 10.0 กรัมต่อลิตร

One way

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
DCW	.036	1	4	.859
PHAconc	.029	1	4	.874
PHAcontent	.186	1	4	.689

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DCW	Between Groups	.104	1	.104	76.110	.001
	Within Groups	.005	4	.001		
	Total	.109	5			
PHAconc	Between Groups	.084	1	.084	46.248	.002
	Within Groups	.007	4	.002		
	Total	.091	5			
PHAcontent	Between Groups	43.202	1	43.202	893.828	.000
	Within Groups	.193	4	.048		
	Total	43.395	5			

9. เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHA สูงสุดระหว่างน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 5.0 กรัมต่อลิตรกับเกลือโซเดียมวาเลอเรต 15.0 กรัมต่อลิตรกับน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 5.0 กรัมต่อลิตรเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต 15.0 กรัมต่อลิตร

## One way

## Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
DCW	.000	1	4	1.000
PHAconc	1.410	1	4	.301
PHAcontent	.684	1	3	.469

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DCW	Between Groups	.054	1	.054	23.543	.008
	Within Groups	.009	4	.002		
	Total	.063	5			
PHAconc	Between Groups	.027	1	.027	26.230	.007
	Within Groups	.004	4	.001		
	Total	.031	5			
PHAcontent	Between Groups	23.056	1	23.056	471.607	.000
	Within Groups	.147	3	.049		
	Total	23.203	4			

10. เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHA สูงสุดระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตรกับยูเรียที่มีโมลของธาตุไนโตรเจนเท่ากับแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งคิดเป็น 0.5 กรัมต่อลิตร

## One way

## Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
DCW	.352	1	4	.585
PHAconc	3.150	1	4	.151
PHAcontent	1.166	1	4	.341

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DCW	Between Groups	1.135	1	1.135	558.369	.000
	Within Groups	.008	4	.002		
	Total	1.143	5			
PHAconc	Between Groups	.534	1	.534	405.582	.000
	Within Groups	.005	4	.001		
	Total	.539	5			
PHAcontent	Between Groups	132.540	1	132.540	1.054E3	.000
	Within Groups	.503	4	.126		
	Total	133.043	5			

11. เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHA สูงสุดระหว่างความเข้มข้นของ ยูเรียเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร

## One way

## Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
DCW	.606	5	12	.697
PHAconc	.952	5	12	.483
PHAcontent	.606	5	11	.697

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DCW	Between Groups	2.538	5	.508	281.983	.000
	Within Groups	.022	12	.002		
	Total	2.559	17			
PHAconc	Between Groups	1.121	5	.224	206.984	.000
	Within Groups	.013	12	.001		
	Total	1.134	17			
PHAcontent	Between Groups	559.132	5	111.826	900.296	.000
	Within Groups	1.366	11	.124		
	Total	560.498	16			

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) urea	(J) urea	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
DCW	1	2	-.87000 <sup>*</sup>	.03464	.000	-.9864	-.7536
		3	-.89000 <sup>*</sup>	.03464	.000	-1.0064	-.7736
		4	-.91000 <sup>*</sup>	.03464	.000	-1.0264	-.7936
		5	-.97000 <sup>*</sup>	.03464	.000	-1.0864	-.8536
		6	-1.19000 <sup>*</sup>	.03464	.000	-1.3064	-1.0736
	2	1	.87000 <sup>*</sup>	.03464	.000	.7536	.9864
		3	-.02000	.03464	.991	-.1364	.0964
		4	-.04000	.03464	.849	-.1564	.0764
		5	-.10000	.03464	.109	-.2164	.0164
		6	-.32000 <sup>*</sup>	.03464	.000	-.4364	-.2036
	3	1	.89000 <sup>*</sup>	.03464	.000	.7736	1.0064
		2	.02000	.03464	.991	-.0964	.1364
		4	-.02000	.03464	.991	-.1364	.0964
		5	-.08000	.03464	.262	-.1964	.0364
		6	-.30000 <sup>*</sup>	.03464	.000	-.4164	-.1836
	4	1	.91000 <sup>*</sup>	.03464	.000	.7936	1.0264
		2	.04000	.03464	.849	-.0764	.1564
		3	.02000	.03464	.991	-.0964	.1364
		5	-.06000	.03464	.538	-.1764	.0564
		6	-.28000 <sup>*</sup>	.03464	.000	-.3964	-.1636
	5	1	.97000 <sup>*</sup>	.03464	.000	.8536	1.0864
		2	.10000	.03464	.109	-.0164	.2164
		3	.08000	.03464	.262	-.0364	.1964
		4	.06000	.03464	.538	-.0564	.1764
		6	-.22000 <sup>*</sup>	.03464	.000	-.3364	-.1036
	6	1	1.19000 <sup>*</sup>	.03464	.000	1.0736	1.3064
		2	.32000 <sup>*</sup>	.03464	.000	.2036	.4364
		3	.30000 <sup>*</sup>	.03464	.000	.1836	.4164
		4	.28000 <sup>*</sup>	.03464	.000	.1636	.3964
		5	.22000 <sup>*</sup>	.03464	.000	.1036	.3364
PHAconc	1	2	-.59667 <sup>*</sup>	.02687	.000	-.6869	-.5064
		3	-.40667 <sup>*</sup>	.02687	.000	-.4969	-.3164
		4	-.35333 <sup>*</sup>	.02687	.000	-.4436	-.2631
		5	-.28333 <sup>*</sup>	.02687	.000	-.3736	-.1931
		6	.14333 <sup>*</sup>	.02687	.002	.0531	.2336
	2	1	.59667 <sup>*</sup>	.02687	.000	.5064	.6869
		3	.19000 <sup>*</sup>	.02687	.000	.0997	.2803
		4	.24333 <sup>*</sup>	.02687	.000	.1531	.3336
		5	.31333 <sup>*</sup>	.02687	.000	.2231	.4036
		6	.74000 <sup>*</sup>	.02687	.000	.6497	.8303

	3	1	.40667	.02687	.000	.3164	.4969
		2	-.19000	.02687	.000	-.2803	-.0997
		4	.05333	.02687	.403	-.0369	.1436
		5	.12333	.02687	.006	.0331	.2136
		6	.55000	.02687	.000	.4597	.6403
	4	1	.35333	.02687	.000	.2631	.4436
		2	-.24333	.02687	.000	-.3336	-.1531
		3	-.05333	.02687	.403	-.1436	.0369
		5	.07000	.02687	.169	-.0203	.1603
		6	.49667	.02687	.000	.4064	.5869
	5	1	.28333	.02687	.000	.1931	.3736
		2	-.31333	.02687	.000	-.4036	-.2231
		3	-.12333	.02687	.006	-.2136	-.0331
		4	-.07000	.02687	.169	-.1603	.0203
		6	.42667	.02687	.000	.3364	.5169
	6	1	-.14333	.02687	.002	-.2336	-.0531
		2	-.74000	.02687	.000	-.8303	-.6497
		3	-.55000	.02687	.000	-.6403	-.4597
		4	-.49667	.02687	.000	-.5869	-.4064
		5	-.42667	.02687	.000	-.5169	-.3364
PHAcontent	1	2	-9.40000	.27860	.000	-10.3358	-8.4642
		3	-4.20000	.27860	.000	-5.1358	-3.2642
		4	-2.66000	.27860	.000	-3.5958	-1.7242
		5	-.38667	.27860	.733	-1.3225	.5491
		6	11.52667	.27860	.000	10.5909	12.4625
	2	1	9.40000	.27860	.000	8.4642	10.3358
		3	5.20000	.27860	.000	4.2642	6.1358
		4	6.74000	.27860	.000	5.8042	7.6758
		5	9.01333	.27860	.000	8.0775	9.9491
		6	20.92667	.27860	.000	19.9909	21.8625
	3	1	4.20000	.27860	.000	3.2642	5.1358
		2	-5.20000	.27860	.000	-6.1358	-4.2642
		4	1.54000	.27860	.001	.6042	2.4758
		5	3.81333	.27860	.000	2.8775	4.7491
		6	15.72667	.27860	.000	14.7909	16.6625
	4	1	2.66000	.27860	.000	1.7242	3.5958
		2	-6.74000	.27860	.000	-7.6758	-5.8042
		3	-1.54000	.27860	.001	-2.4758	-.6042
		5	2.27333	.27860	.000	1.3375	3.2091
		6	14.18667	.27860	.000	13.2509	15.1225
	5	1	.38667	.27860	.733	-.5491	1.3225
		2	-9.01333	.27860	.000	-9.9491	-8.0775
		3	-3.81333	.27860	.000	-4.7491	-2.8775
		4	-2.27333	.27860	.000	-3.2091	-1.3375
		6	11.91333	.27860	.000	10.9775	12.8491



	1	-11.52667*	.27860	.000	-12.4625	-10.5909
6	2	-20.92667*	.27860	.000	-21.8625	-19.9909
	3	-15.72667*	.27860	.000	-16.6625	-14.7909
	4	-14.18667*	.27860	.000	-15.1225	-13.2509
	5	-11.91333*	.27860	.000	-12.8491	-10.9775
	6					

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(เมื่อ 1: ยูเรียที่มีความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร/2: 1.0 กรัมต่อลิตร/3: 1.5 กรัมต่อลิตร/4: 2.0 กรัมต่อลิตร/5: 2.5 กรัมต่อลิตร และ/6: 3.0 กรัมต่อลิตร)

12. เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHA สูงสุดระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM เท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0

One way

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
DCW	.542	2	6	.608
PHAconc	.760	2	6	.508
PHHAcontent	.220	2	5	.810

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DCW	Between Groups	5.553	2	2.777	2.474E3	.000
	Within Groups	.007	6	.001		
	Total	5.560	8			
PHAconc	Between Groups	1.825	2	.913	1.283E3	.000
	Within Groups	.004	6	.001		
	Total	1.829	8			
PHAcontent	Between Groups	718.335	2	359.167	5.407E3	.000
	Within Groups	.332	5	.066		
	Total	718.667	7			

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) pH	(J) pH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
DCW	1	2	-1.76000 <sup>*</sup>	.02735	.000	-1.8439	-1.6761
		3	-1.55333 <sup>*</sup>	.02735	.000	-1.6373	-1.4694
	2	1	1.76000 <sup>*</sup>	.02735	.000	1.6761	1.8439
		3	.20667 <sup>*</sup>	.02735	.001	.1227	.2906
	3	1	1.55333 <sup>*</sup>	.02735	.000	1.4694	1.6373
		2	-.20667 <sup>*</sup>	.02735	.001	-.2906	-.1227
PHAconc	1	2	-1.09333 <sup>*</sup>	.02177	.000	-1.1601	-1.0265
		3	-.67333 <sup>*</sup>	.02177	.000	-.7401	-.6065
	2	1	1.09333 <sup>*</sup>	.02177	.000	1.0265	1.1601
		3	.42000 <sup>*</sup>	.02177	.000	.3532	.4868
	3	1	.67333 <sup>*</sup>	.02177	.000	.6065	.7401
		2	-.42000 <sup>*</sup>	.02177	.000	-.4868	-.3532
PHHcontent	1	2	-21.83333 <sup>*</sup>	.21043	.000	-22.5181	-21.1486
		3	-12.39833 <sup>*</sup>	.23527	.000	-13.1639	-11.6328
	2	1	21.83333 <sup>*</sup>	.21043	.000	21.1486	22.5181
		3	9.43500 <sup>*</sup>	.23527	.000	8.6694	10.2006
	3	1	12.39833 <sup>*</sup>	.23527	.000	11.6328	13.1639
		2	-9.43500 <sup>*</sup>	.23527	.000	-10.2006	-8.6694

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(เมื่อ 1: ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวสำหรับการผลิต MSM เท่ากับ 6.0 6/2: 7.0 และ/3: 8.0)

13. เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHA สูงสุดระหว่างการให้ปริมาณอากาศแตกต่างกันโดยแปรปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิลิตร

#### One way

##### Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
DCW	.324	3	8	.808
PHAconc	1.521	3	8	.282
PHAcontent	.879	3	7	.496

##### ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DCW	Between Groups	.627	3	.209	163.922	.000
	Within Groups	.010	8	.001		
	Total	.637	11			
PHAconc	Between Groups	.386	3	.129	83.004	.000
	Within Groups	.012	8	.002		
	Total	.398	11			
PHAcontent	Between Groups	98.893	3	32.964	360.473	.000
	Within Groups	.640	7	.091		
	Total	99.533	10			

#### Post Hoc Tests

##### Multiple Comparisons

##### Tukey HSD

Dependent Variable	(I) mediumv column	(J) mediumv column	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
DCW	1	2	-.57667*	.02915	.000	-.6700	-.4833
		3	-.13667	.02915	.007	-.2300	-.0433
		4	-.04667	.02915	.430	-.1400	.0467
	2	1	.57667*	.02915	.000	.4833	.6700
		3	.44000*	.02915	.000	.3466	.5334
		4	.53000*	.02915	.000	.4366	.6234

	3	1	.13667*	.02915	.007	.0433	.2300
		2	-.44000*	.02915	.000	-.5334	-.3466
		4	.09000	.02915	.059	-.0034	.1834
	4	1	.04667	.02915	.430	-.0467	.1400
		2	-.53000*	.02915	.000	-.6234	-.4366
		3	-.09000	.02915	.059	-.1834	.0034
PHAconc	1	2	-.39333*	.03215	.000	-.4963	-.2904
		3	.00000	.03215	1.000	-.1029	.1029
		4	.05333	.03215	.402	-.0496	.1563
	2	1	.39333*	.03215	.000	.2904	.4963
		3	.39333*	.03215	.000	.2904	.4963
		4	.44667*	.03215	.000	.3437	.5496
	3	1	.00000	.03215	1.000	-.1029	.1029
		2	-.39333*	.03215	.000	-.4963	-.2904
		4	.05333	.03215	.402	-.0496	.1563
	4	1	-.05333	.03215	.402	-.1563	.0496
		2	-.44667*	.03215	.000	-.5496	-.3437
		3	-.05333	.03215	.402	-.1563	.0496
PHAcontent	1	2	-5.63667*	.24691	.000	-6.4540	-4.8194
		3	1.20000*	.24691	.008	.3827	2.0173
		4	1.92333*	.27605	.001	1.0095	2.8371
	2	1	5.63667*	.24691	.000	4.8194	6.4540
		3	6.83667*	.24691	.000	6.0194	7.6540
		4	7.56000*	.27605	.000	6.6462	8.4738
	3	1	-1.20000*	.24691	.008	-2.0173	-.3827
		2	-6.83667*	.24691	.000	-7.6540	-6.0194
		4	.72333	.27605	.123	-.1905	1.6371
	4	1	-1.92333*	.27605	.001	-2.8371	-1.0095
		2	-7.56000*	.27605	.000	-8.4738	-6.6462
		3	-.72333	.27605	.123	-1.6371	.1905

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(เมื่อ 1: ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 25 มิลลิลิตร /2: 50 มิลลิลิตร /3: 75 มิลลิลิตร และ/4: 100 มิลลิลิตร)

14. เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นและปริมาณ PHA สูงสุดระหว่างการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในระดับขวดเขย่ากับการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร

**One way**

**Test of Homogeneity of Variances**

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
DCW	1.542	1	4	.282
PHAconc	1.410	1	4	.301
PHAcontent	.437	1	3	.556

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DCW	Between Groups	1.859	1	1.859	724.390	.000
	Within Groups	.010	4	.003		
	Total	1.870	5			
PHAconc	Between Groups	.191	1	.191	187.689	.000
	Within Groups	.004	4	.001		
	Total	.195	5			
PHAcontent	Between Groups	21.067	1	21.067	240.678	.001
	Within Groups	.263	3	.088		
	Total	21.330	4			

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววันกุศล ชนะสิทธิ์ เกิดวันที่ 11 สิงหาคม 2527 ที่จังหวัดสงขลา สำเร็จการศึกษา ระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปี การศึกษา 2549 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550

ในระหว่างการศึกษาได้เข้าร่วมเสนอผลงานบางส่วนในงาน The 22<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB 2010) ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตตรัง ระหว่างวันที่ 20-22 ตุลาคม 2553 ในหัวข้อ Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by the newly isolated *Bacillus megaterium* P-12 from sugarcane liquor โดยได้รับรางวัล Outstanding Poster Presentation ในงานประชุมครั้งนี้ด้วย



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย