บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1. การเปรียบเทียบการเจริญของ *P. oleovorans* ในอาหารเหลวเพื่อการผลิต PHA ที่มีแหล่งคาร์บอน มาจากน้ำมันปาล์มดิบรูปแบบต่าง ๆ

เลี้ยง *P. oleovorans* ในอาหารเพื่อการผลิต ที่มีแหล่งคาร์บอนจากน้ำมันปาล์มดิบ 5 รูปแบบ เพื่อเลือกรูปแบบที่ทำให้เชื้อเจริญดีที่สุด โดยใส่หัวเชื้อตั้งต้นร้อยละ 1 เท่ากัน แล้วเลี้ยงเป็นเวลา 52 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เลี้ยงเปรียบเทียบ 3 ซ้ำ

4.1.1. เมื่อใช้ CPO เป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียจะเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ที่ชั่วโมงที่ 12 มีจำนวนเซลล์สูงสุด 1.8×10^8 CFU/ml ไม่มีระยะพัก

4.1.2. เมื่อใช้ SCPO แบคทีเรียเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ชั่วโมงที่ 24 มีจำนวนเซลล์สูงสุด 2.2×10^9 CFU/ml

4.1.3. เมื่อใช้ SCPO ที่ปรับค่า พี เอช เป็น 8 แบคทีเรียจะลดจำนวนลงก่อน แล้วจึงเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 12 เข้าสู่ระยะคงที่ชั่วโมงที่ 32 มีจำนวนเซลล์สูงสุด 7.2×10^8 CFU/ml

4.1.4. เมื่อใช้ CPO ร่วมกับ SCPO ในอัตราส่วน 1 : 1 ปั่นเป็นเนื้อเดียว แบคทีเรียจะเข้าสู่ระยะคงที่ ในชั่วโมงที่ 32 มีจำนวนเซลล์สูงสุด 7.4×10^8 CFU/ml

4.1.5. เมื่อใช้ CPO ร่วมกับ SCPO ในอัตราส่วน 1 : 1 ปั่นเป็นเนื้อเดียว และปรับค่า พี เอช เป็น 8 แบคทีเรียจะลดจำนวนลงก่อน แล้วจึงเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 19 เข้าสู่ระยะคงที่ในชั่วโมงที่ 32 จำนวนเซลล์สูงสุด 3.0×10^8 CFU/ml

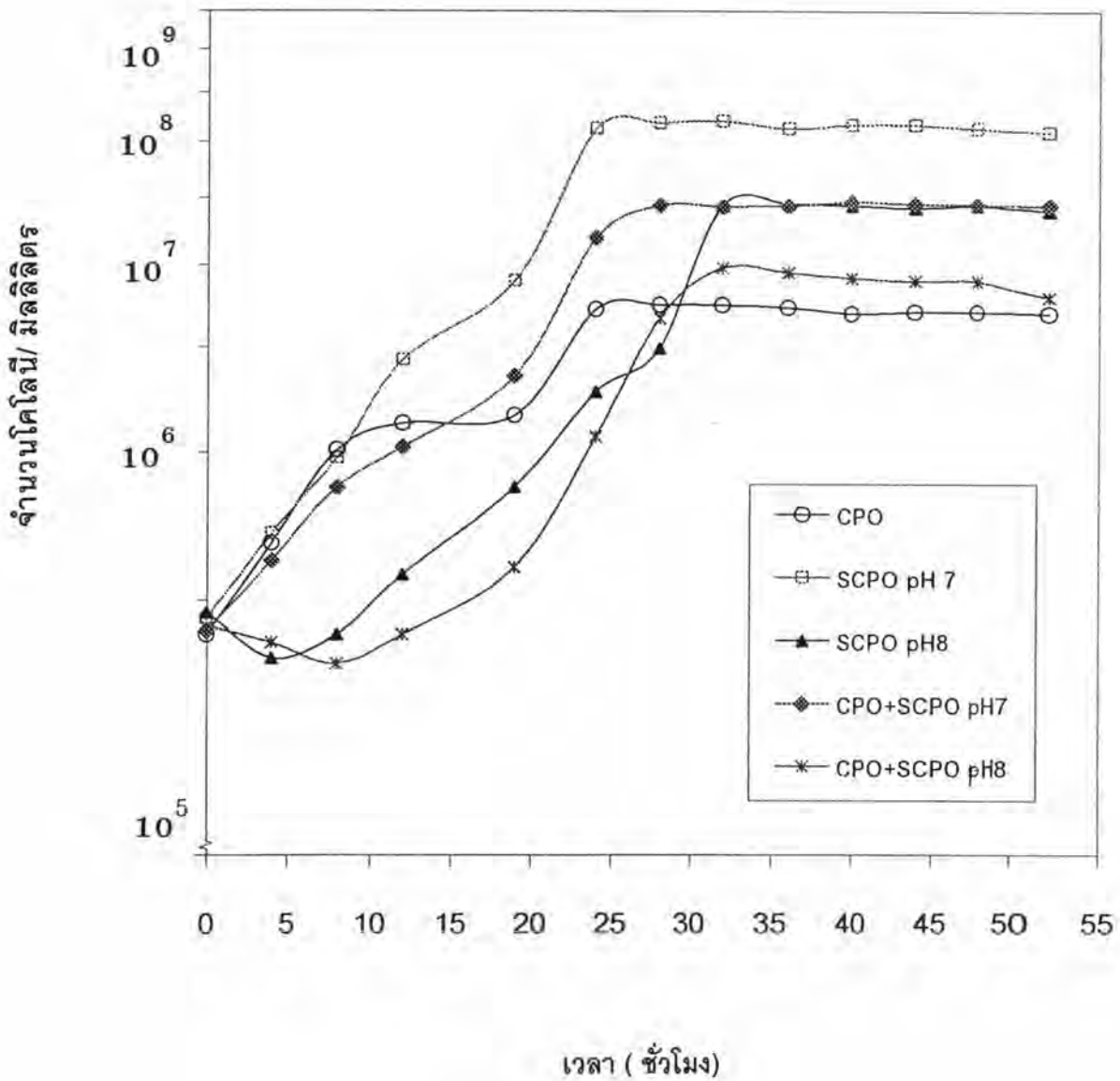
ตารางที่ 4-1 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของ *P. oleovorans* ในแหล่งคาร์บอนจากน้ำมันปาล์มดิบรูปแบบต่าง ๆ

แหล่งคาร์บอน	ชั่วโมงที่เข้าสู่ระยะคงที่	จำนวนเซลล์สูงสุด ($X10^6$ CFU/ml)
CPO pH7	12	180
SCPO pH7	24	2,200
SCPO pH8	32	720
CPO + SCPO pH7	32	735
CPO + SCPO pH8	32	300

ค่าพีเอช

ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนรูปแบบต่าง ๆ จากค่าพี เอช เริ่มต้น จะลดลงไม่ต่ำกว่า 0.1 ตลอดระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ

จากการทดลองใช้น้ำมันปาล์มดิบในรูปแบบต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าน้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการสะพอนิฟาย (SCPO) พี เอช 7 ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีที่สุด มากกว่าการใช้น้ำมันปาล์มดิบประมาณ 10 เท่า และมากกว่าการใช้ทั้งสองรูปแบบร่วมกัน ประมาณ 3 เท่า จึงเลือกใช้น้ำมันปาล์มดิบในรูปที่ผ่านการสะพอนิฟาย ในการผลิต PHA เพื่อศึกษาต่อไป

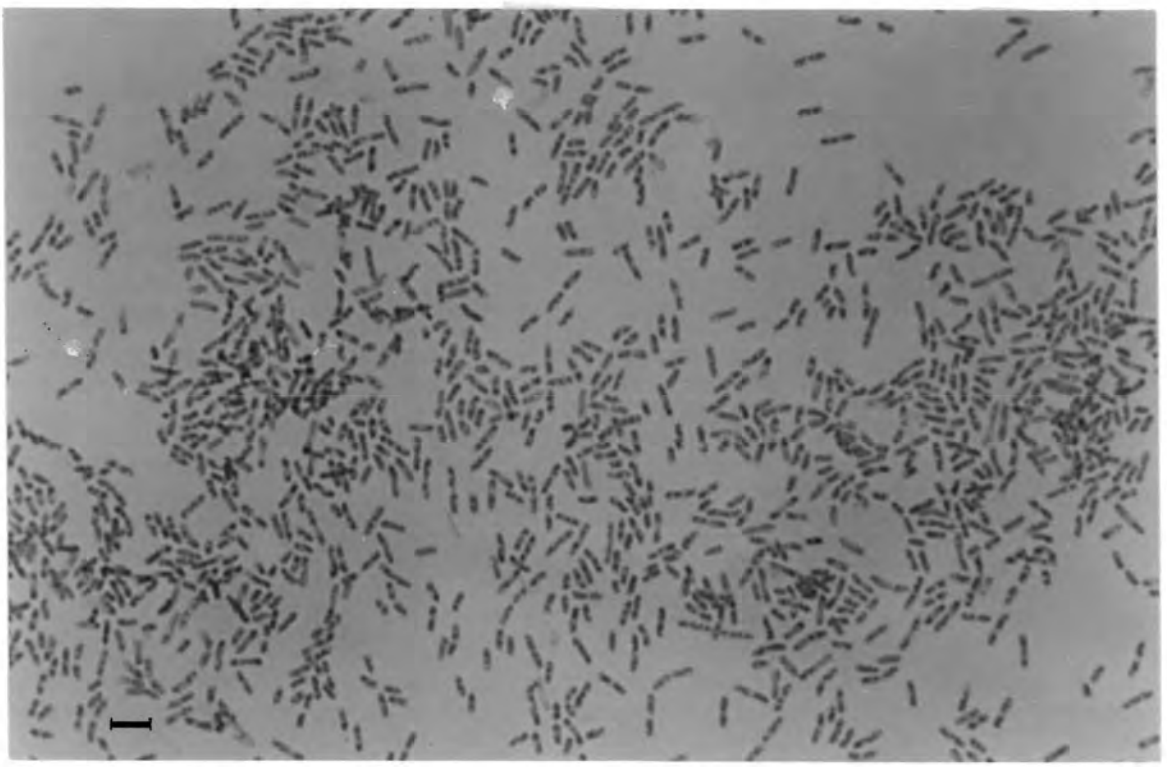


รูปที่ 4-1 การเจริญของ *P. oleovorans* ในอาหารเพื่อการผลิต PHA เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน จากน้ำมันปาล์มรูปแบบต่าง ๆ

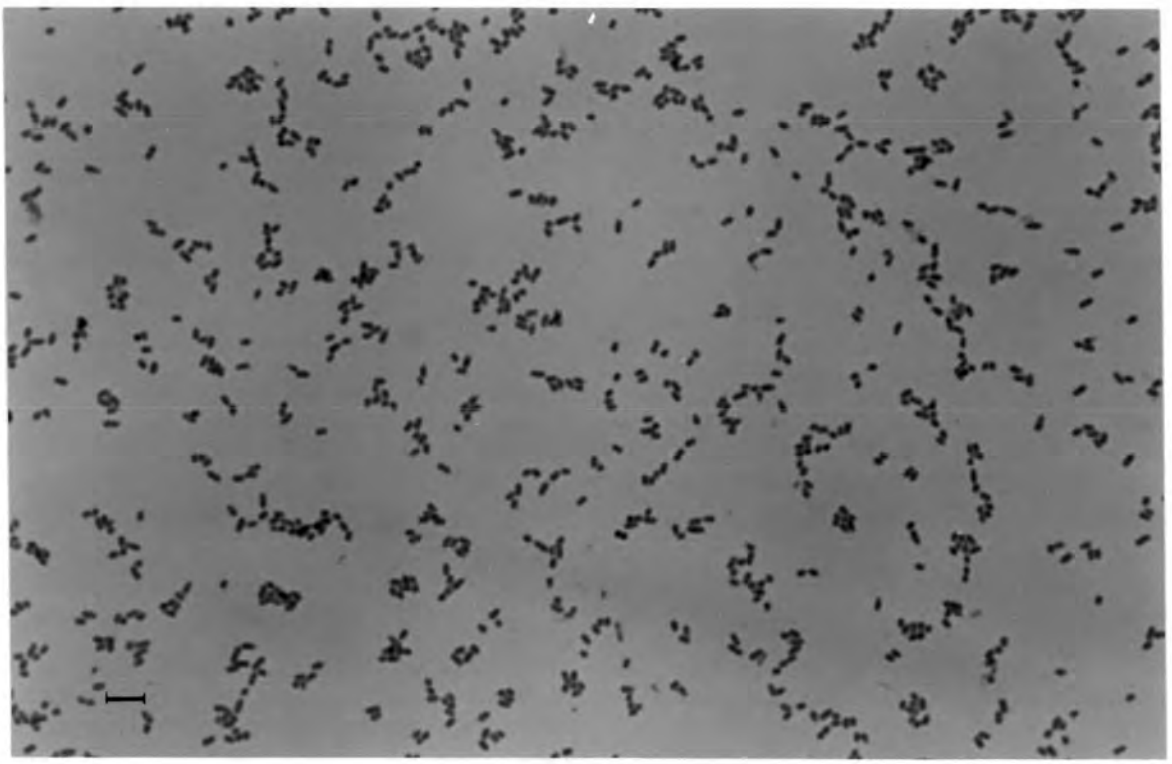
4.2. ผลการศึกษาลักษณะเซลล์แบคทีเรียจากการย้อมสีแกรม

ศึกษาเซลล์แบคทีเรียจากกล้องจุลทรรศน์ ในระยะเริ่มต้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA พบว่าแบคทีเรียจะติดสีแดง (แกรมลบ) สม่ำเสมอทั้งเซลล์ เป็นรูปแท่ง ขนาดค่อนข้างเท่ากัน เมื่อเลี้ยงไว้มากกว่า 10 ชั่วโมง เซลล์แบคทีเรียจะติดสีไม่สม่ำเสมอ เพราะมีกรานูลของ PHA อยู่ในเซลล์ จำนวน 1 - 4 เม็ดในแต่ละเซลล์ จะเห็นเป็นจุดใสไม่ติดสี ทำให้เซลล์มีขนาดไม่สม่ำเสมอด้วย บางเซลล์มีความยาวมากขึ้น บางเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเลี้ยงไปจนถึง 40 ชั่วโมงจะไม่เห็นกรานูลของ PHA ในเซลล์ แบคทีเรียมีขนาดเล็กลงมาก แต่มีจำนวนเพิ่มขึ้น แสดงถึงภาวะที่แหล่งคาร์บอนหมดและแบคทีเรียใช้ PHA ไปในการเพิ่มจำนวน ดังรูปที่ 4-2 ถึง 4-4

รูปที่ 4-2 **แสดงลักษณะเซลล์แบคทีเรีย *P. oleovorans* จากการย้อมสีแกรม เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA โดยใช้ SCPO 2 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เส้นที่แสดงมีความยาว เท่ากับ 5 ไมครอน**



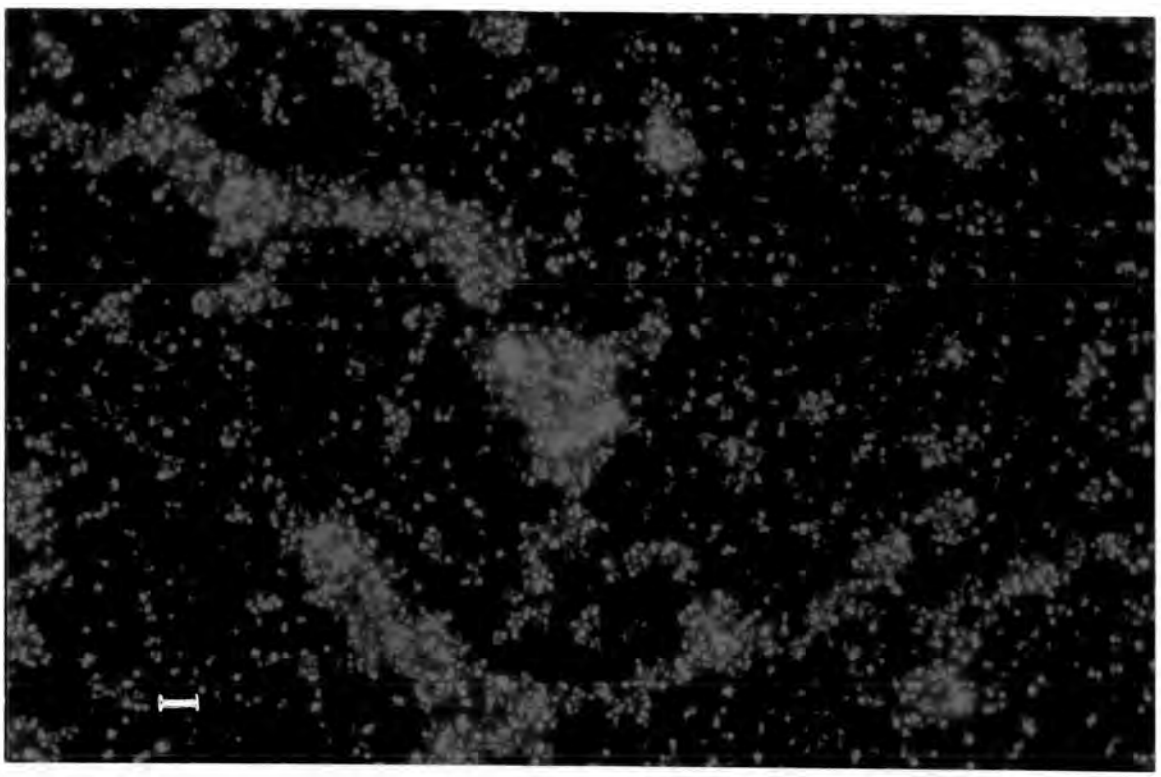
รูปที่ 4-3 แสดงลักษณะเซลล์แบคทีเรีย *P. oleovorans* จากการย้อมสีแกรม เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA โดยใช้ SCPO 2 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 14 ชั่วโมง เส้นที่แสดงมีความยาว เท่ากับ 5 ไมครอน



รูปที่ 4-4 แสดงลักษณะเซลล์แบคทีเรีย *P. oleovorans* จากการย้อมสีแกรม เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA โดยใช้ SCPO 2 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 40 ชั่วโมง เส้นที่แสดงมีความยาว เท่ากับ 5 ไมครอน

4.3. ผลการตรวจดูการสะสมของ PHA ในเซลล์แบคทีเรีย

ในระยะที่ *P. oleovorans* สร้าง PHA เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนต์ จะเห็น PHA ที่อยู่ในเซลล์มีลักษณะเป็นเม็ดกลมเรืองแสงสีส้ม ดังรูปที่ 4-5 ซึ่งการเรืองแสงจะลดลงอย่างรวดเร็ว และไม่สามารถเก็บ สไลด์ที่ย้อมสีไนล์ บลู เอ แล้ว ไว้ดูได้อีก



รูปที่ 4-5 **แสดงลักษณะกรานูลของ PHA ในเซลล์ของ *P. oleovorans* จากการย้อมสี ไนล์ บลู เอ เมื่อใช้ SCPO 2 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเป็นเวลา 14 ชั่วโมง เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนต์ เมื่อใช้แผ่นกรองแสงสีน้ำเงิน กำลังขยาย 1,000 เท่า เส้นที่แสดงมีความยาวเท่ากับ 5 ไมครอน**

4.4. ผลการหาปริมาณ PHA ที่แบคทีเรียผลิตระหว่างการเจริญ

เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียแห้ง ที่ทราบน้ำหนักมาสกัด PHA เพื่อหาปริมาณ พบว่า *P. oleovorans* สามารถผลิต PHA ได้สูงสุด 23 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 4.97 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นระยะการเจริญแบบทวีคูณ ที่เป็นช่วงที่มีอัตราการเจริญลดลง ก่อนที่จะเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 20 หลังจากนั้นปริมาณ PHA จะลดลงเรื่อยๆ ดังแสดงในรูปที่ 4-6

4.5. ผลการวิเคราะห์โพลีเมอร์จาก *P. oleovorans*

4.5.1. ผลการวิเคราะห์โพลีเมอร์โดยวิธีนิวเคลียร์ แมกเนติค เรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี

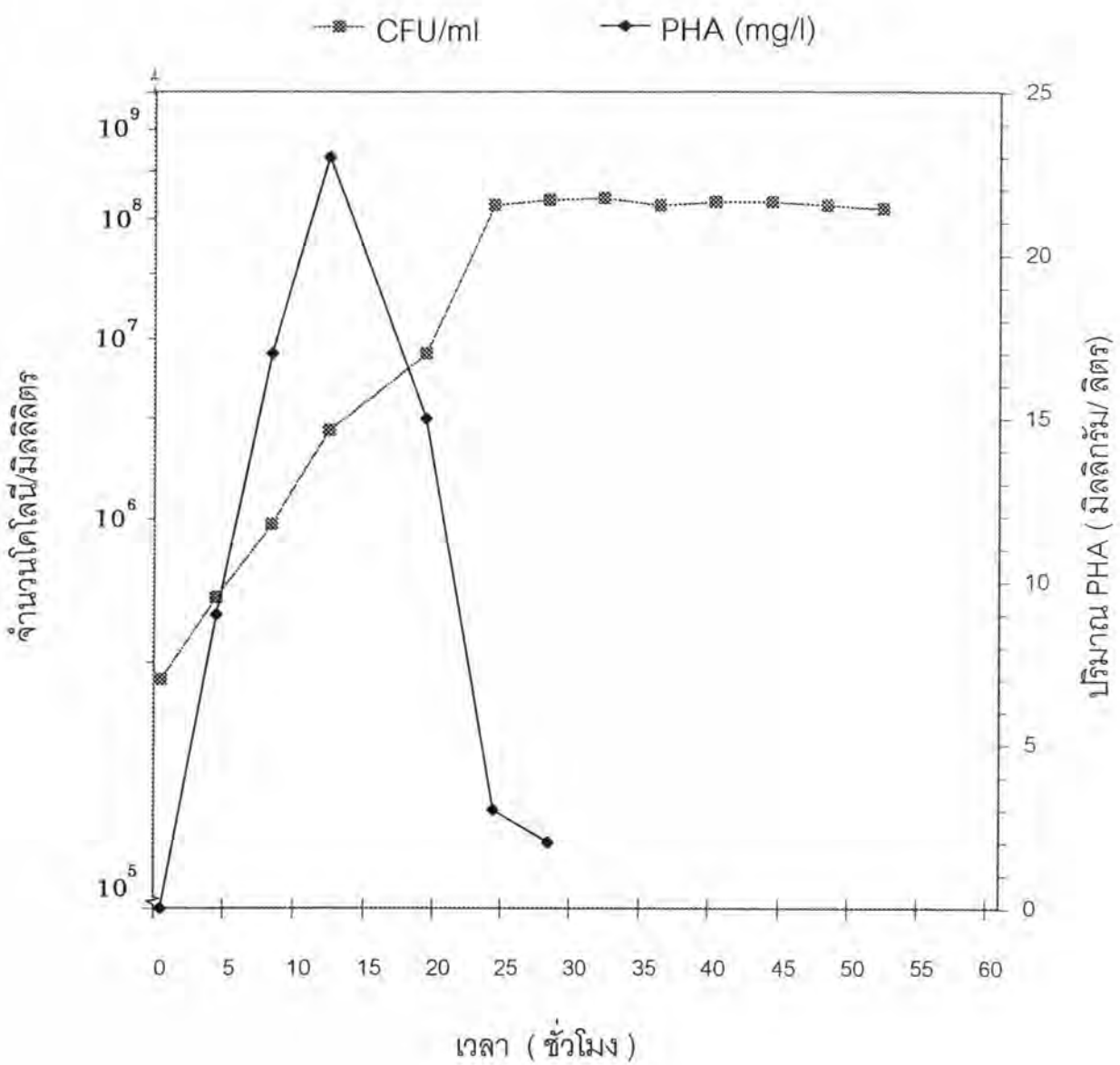
ลักษณะสเปกตรัม NMR ของโพลีเมอร์ที่สกัดจาก *P. oleovorans* เมื่อเลี้ยงโดยใช้น้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการสะพอนิฟาย เป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4-8 ถึง 4-12 รูปแบบของสารคาร์บอนตำแหน่งต่างๆ ในโครงสร้าง ที่เห็นได้ชัดเจนจะมี 2 ชุด โดยเฉพาะที่ตำแหน่งบีตา (β) และ แอลฟา (α) หน่วยโครงสร้างของโพลีเมอร์จากน้ำมันปาล์มดิบ เหมือนกับ PHA ทั่วไป แต่จะแตกต่างตรงหมู่ R ดูจากสูตรโครงสร้างในรูปที่ 1-1

<u>สเปกตรัมโปรตอน</u>

เริ่มจากสัญญาณที่ 0.85 ppm คือหมู่เมธิล (CH_3) สัญญาณที่ 1.30 ppm คือหมู่เมธิลีน (CH_2) สัญญาณที่ 1.55 ถึง 2.30 ppm คือหมู่เมธิลีน (CH_2) อยู่ในหมู่ R สัญญาณที่ 2.50 ppm คือหมู่เมธิลีน (CH_2) ตำแหน่งแอลฟา สัญญาณที่ 5.20 ppm เป็นโปรตอนที่ตำแหน่งบีตา ดังแสดงในรูปที่ 4-8

<u>สเปกตรัมคาร์บอน-13</u>

สัญญาณที่ 14 ppm คือหมู่เมธิล (CH_3) สัญญาณที่ 19 ถึง 34 ppm คือหมู่เมธิลีน (CH_2)ที่อยู่ในหมู่ R ต่อกับคาร์บอนที่ตำแหน่งบีตา สัญญาณที่ 39 และ 41 ppm คือหมู่เมธิลีน (CH_2) ตำแหน่งแอลฟา คือต่อกับหมู่คาร์บอนิล สัญญาณที่ 67.6 และ 71 ppm คือ คาร์บอนที่ตำแหน่งบีตา สัญญาณที่ 169 ppm คือหมู่คาร์บอนิล ดังแสดงในรูปที่ 4-11



รูปที่ 4-6 แสดงปริมาณ PHA ที่ *P. oleovorans* ผลิตในระหว่างการเจริญเมื่อใช้ SCPO 2 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งคาร์บอน

ดังนั้นหน่วยโครงสร้างของโพลีเมอร์ส่วนใหญ่ ที่ได้จาก *P. oleovorans* จะมีลักษณะดังรูปที่ 4-7

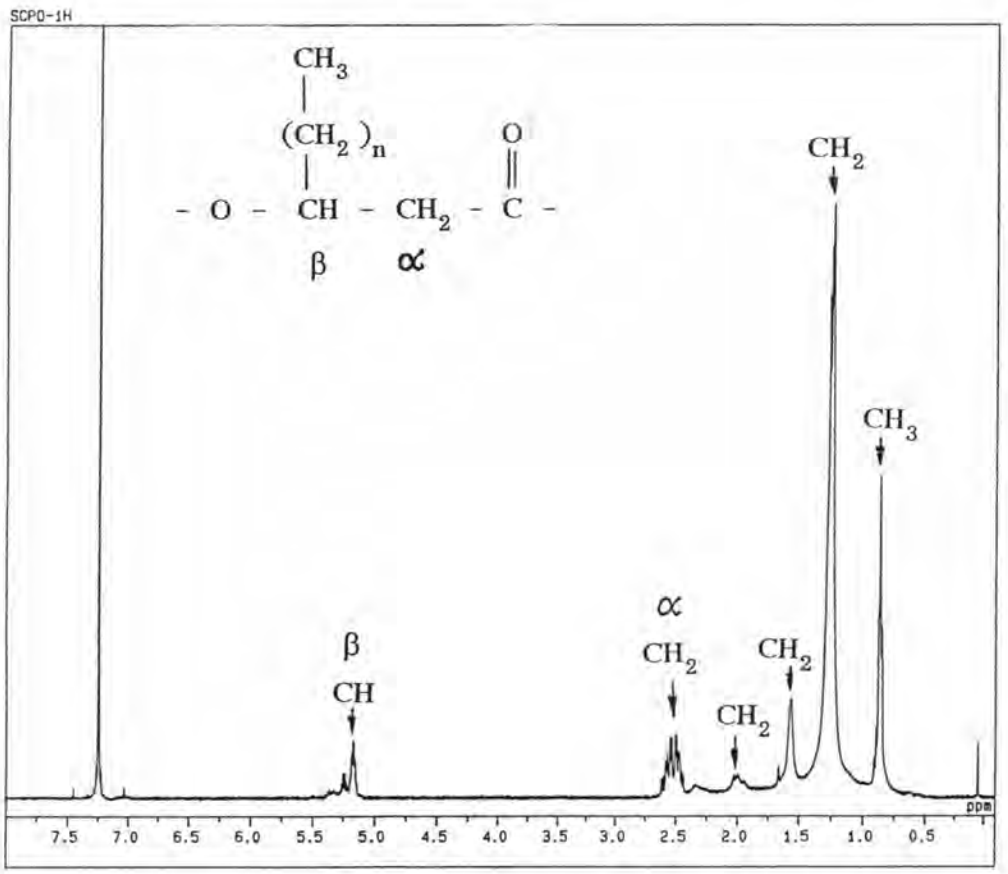
รูปที่ 4-7 แสดงสูตรโครงสร้างของ PHA จาก *P. oleovorans* เมื่อเลี้ยงโดยใช้ SCPO เป็นแหล่งคาร์บอน

4.5.2. ผลการวิเคราะห์โพลีเมอร์ โดยวิธีฟูริเออร์ ทรานสฟอร์ม อินฟราเรด สเปกโตรสโคปี

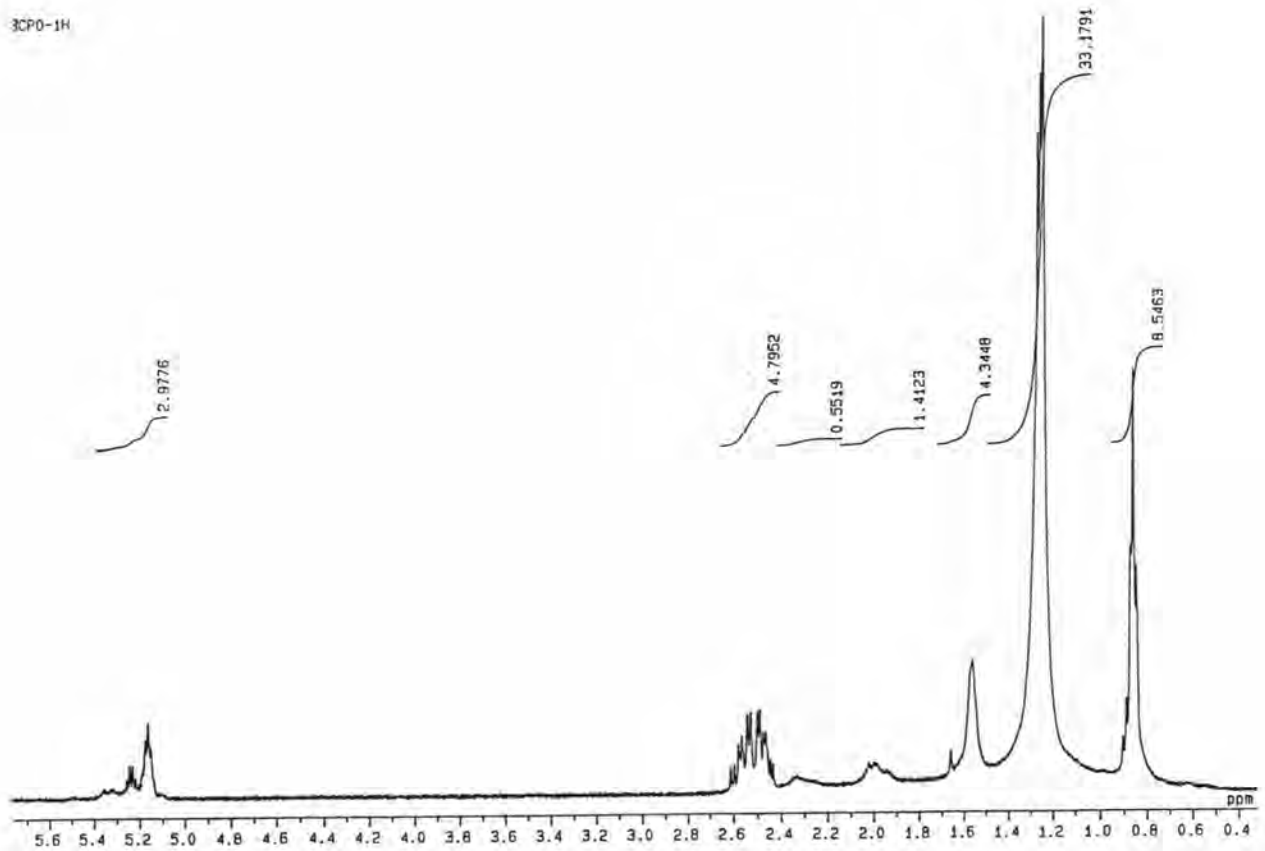
อินฟราเรด สเปกตรัม ของโพลีเมอร์ที่ได้จาก *P. oleovorans* เมื่อใช้ SCPO เป็นแหล่งคาร์บอน จะประกอบด้วยหมู่อัลคิล (CH- strenghing) ซึ่งประกอบด้วยหมู่เมธิลีน (CH_2) และเมธิล (CH_3) ในส่วนของไฮโดรคาร์บอน คือที่ 2850 - 2900 cm^{-1} หมู่คาร์บอกซิเลท-เอสเทอร์ (C=O strenghing) ที่ 1735 cm^{-1} แสดงถึงลักษณะสารประกอบเอสเทอร์ที่รวมเป็น PHA ดังแสดงในรูปที่ 4-13

4.5.3. ผลการวิเคราะห์สัดส่วนโพลีเมอร์

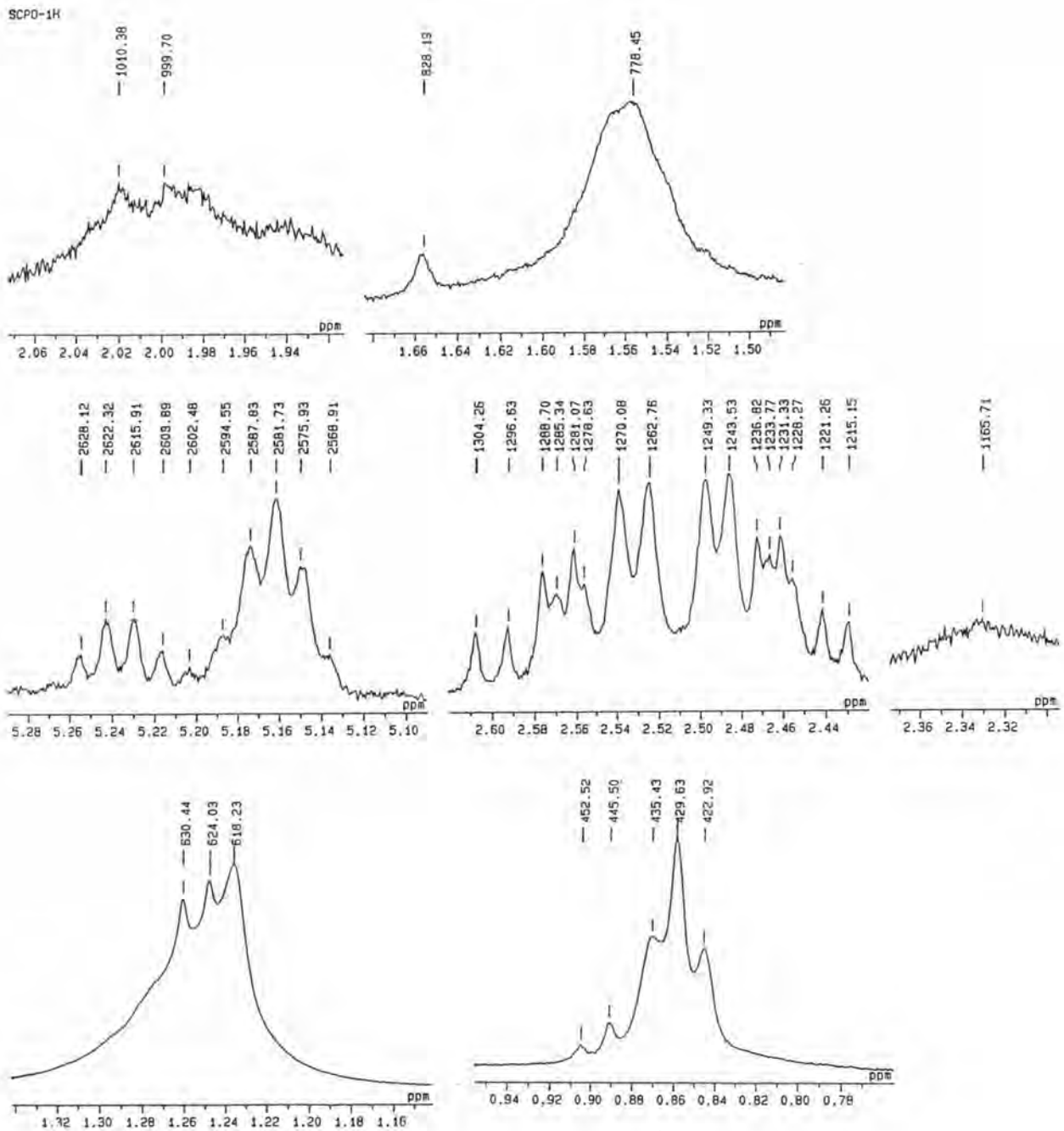
เมื่อนำ PHA ที่ถูกเมทาโนไลซ์ (methanolyse) ให้อยู่ในรูปเมธิล เอสเทอร์ (methyl ester) ของหน่วยย่อยในโพลีเมอร์ มาวิเคราะห์หาสัดส่วน โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี- แมส สเปกโตรเมทรี จะได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4-2



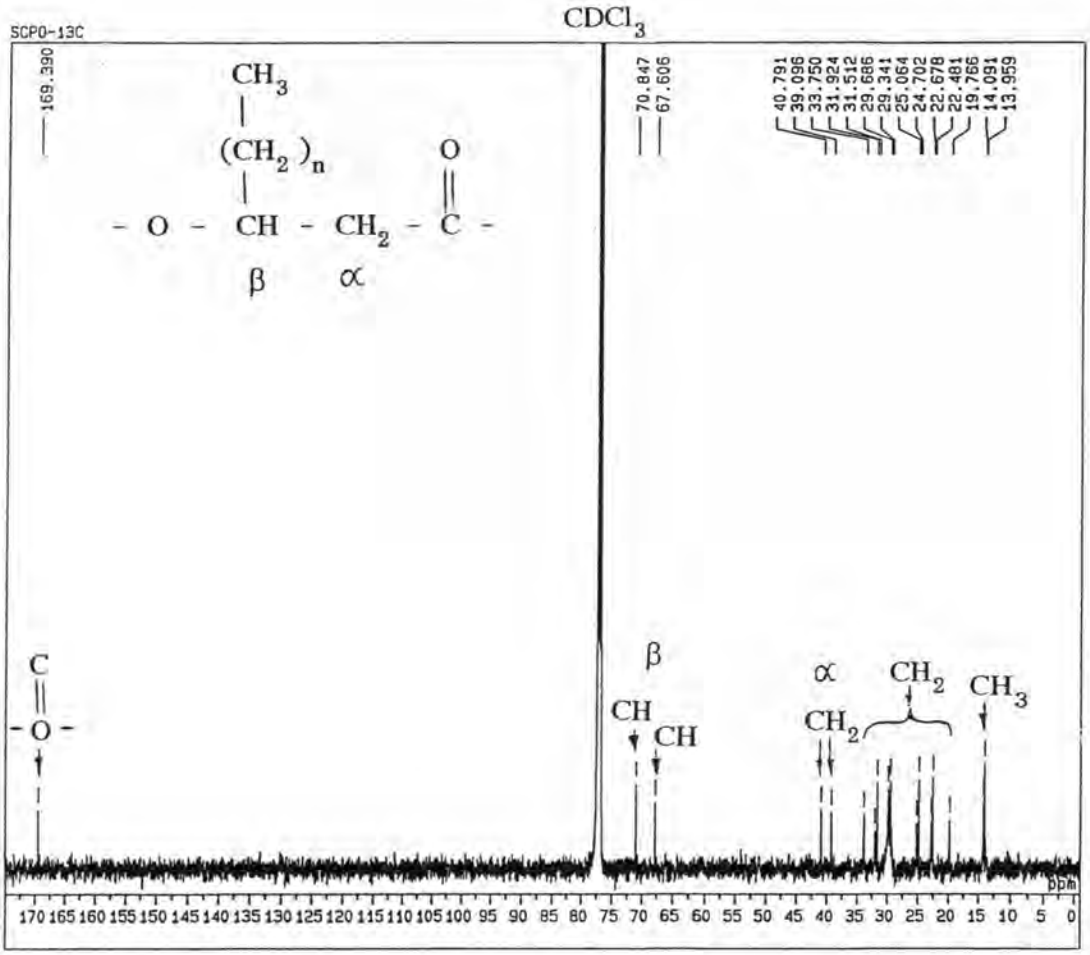
รูปที่ 4-8 แสดง ^{1}H - NMR สเปกตรัมของโพลีเมอร์ จากการเลี้ยง *P. oleovorans* โดยใช้ SCPO เป็นแหล่งคาร์บอน



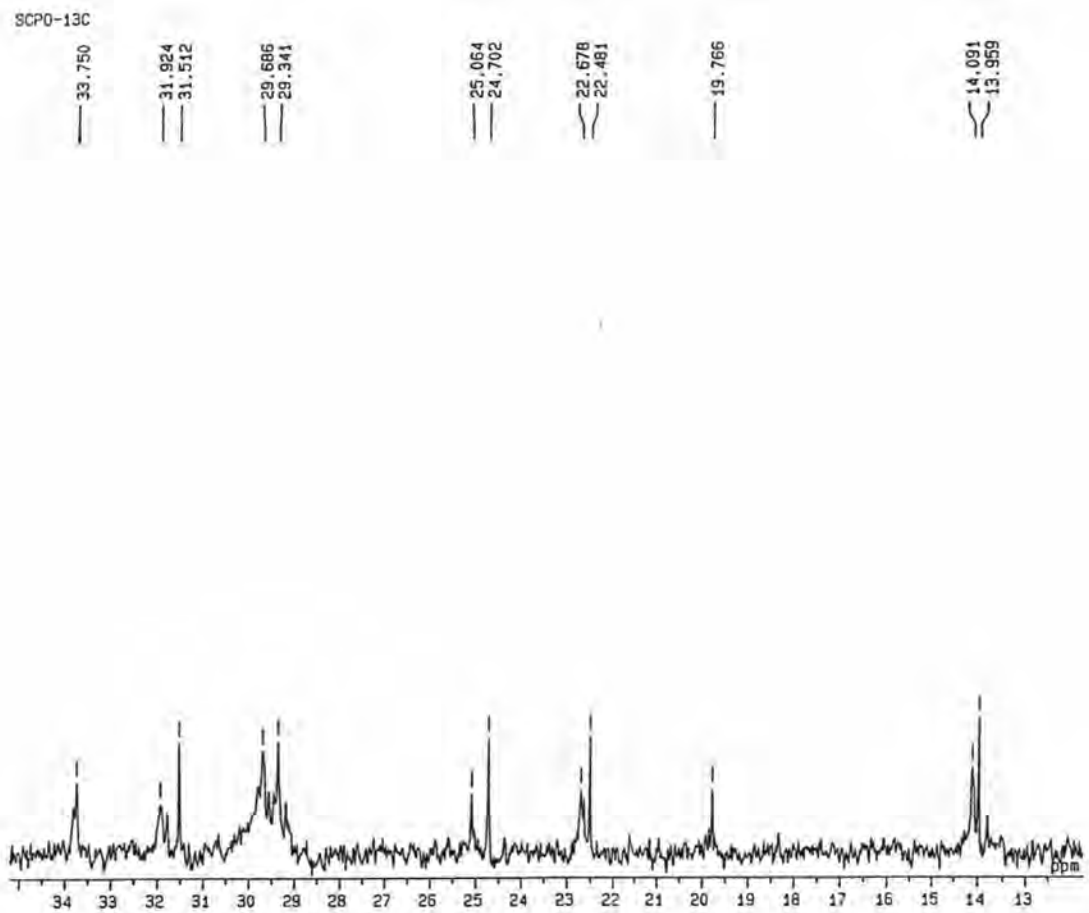
รูปที่ 4-9 แสดง ^{1}H - NMR สเปกตรัมของโพลีเมอร์ จากการเลี้ยง *P. oleovorans* โดยใช้ SCPO เป็นแหล่งคาร์บอน (ต่อ)



รูปที่ 4-10 แสดง ^{1}H - NMR สเปกตรัมของโพลีเมอร์ จากการเลี้ยง *P. oleovorans* โดยใช้ SCPO เป็นแหล่งคาร์บอน (ต่อ)



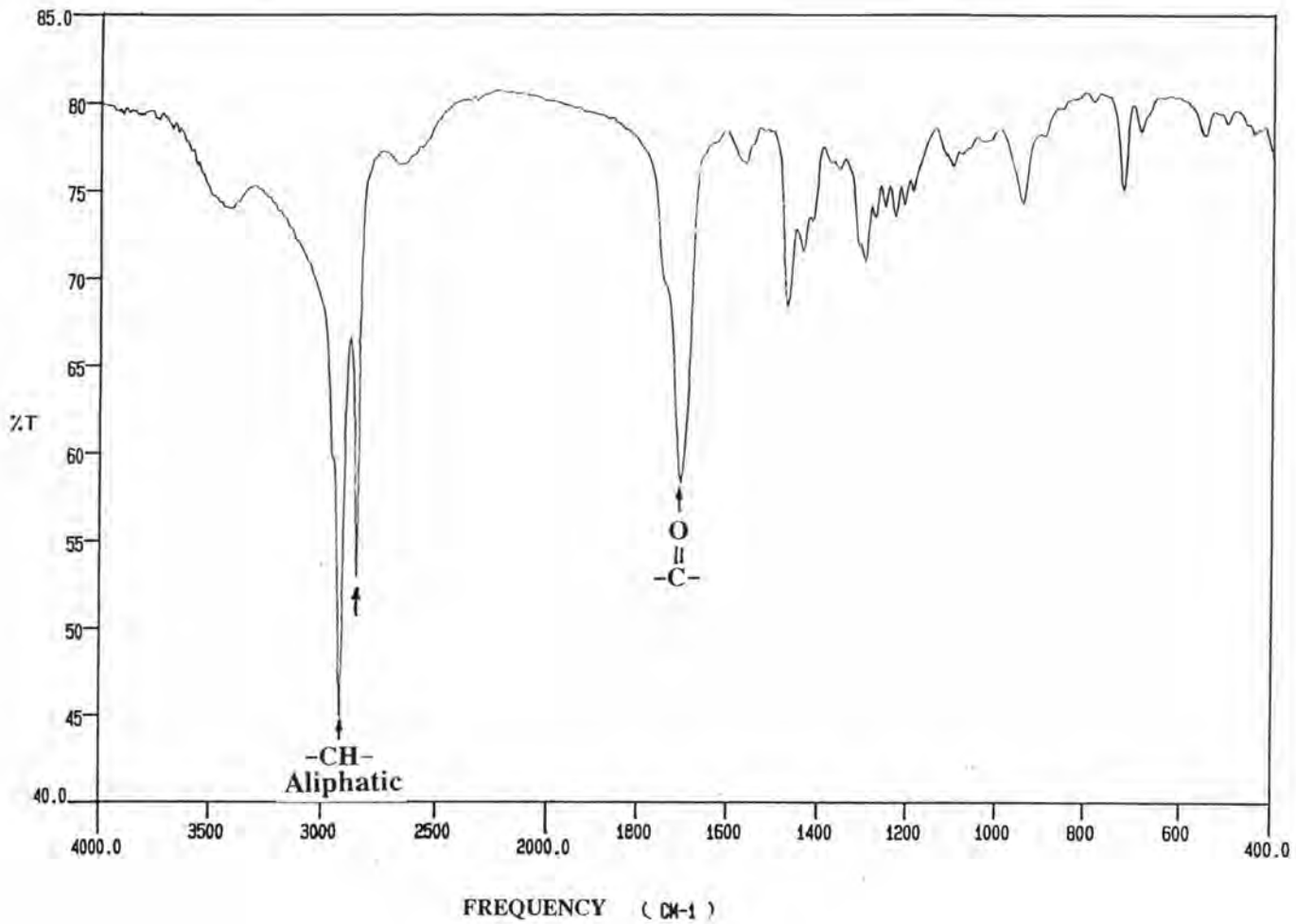
รูปที่ 4-11 แสดง ^{13}C-NMR สเปกตรัมของโพลีเมอร์จากการเลี้ยง *P. oleovorans* โดยใช้ SCPO เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4-12 แสดง ^{13}C - NMR สเปกตรัมของโพลีเมอร์จากการเลี้ยง *P. oleovorans* โดยใช้ SCPO เป็นแหล่งคาร์บอน (ต่อ)

ตารางที่ 4-2 **แสดงผลการวิเคราะห์สัดส่วนโพลีเมอร์ โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี-แมส สเปกโทรเมตรี**

กรดไขมัน	สัดส่วนโพลีเมอร์ (% กรดไขมัน)
เฮกซาดีคาโนอิค (hydroxyhexadecanoic): $C_{16:0}$	67
ออกตะดีคาโนอิค (hydroxyoctadecanoic): $C_{18:0}$	20
9-ออกตะดีซีโนอิค (9-hydroxyoctadecenoic): $C_{18:1}$	8
11-ออกตะดีซีโนอิค (11-hydroxyoctadecenoic): $C_{18:1}$	2
11-เฮกซาดีซีโนอิค (11-hydroxyhexadecanoic): $C_{16:1}$	2
อื่นๆ	1



รูปที่ 4-13 อินฟราเรด สเปกตรัม ของโพลีเมอร์ที่ได้จาก *P. oleovorans* เมื่อใช้ SCPO ปริมาณ 2 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน