บทที่ 3

ผลการวิจัย

การคัดแยก และ คัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถสร้างและสะสม PHB ได้สูง

การคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์ และชนิดของสารอาหารที่ใช้มีผลต่อการสร้างและสะสม PHB มีความจำเป็นในการผลิตเพื่ออุตสาหกรรม (Haywood และคณะ, 1989) จุลินทรีย์หลายชนิดที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติต่างๆ เช่น ดิน น้ำทะเล และ กากตะกอนบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น สามารถสร้าง และสะสม PHB (Steinbuchel และคณะ, 1993) ในปี 1992 Bourque และคณะ รายงานถึง ความสามารถในการสร้าง และสะสม PHB โดยเชื้อ *Methylobacterium extorquens* ที่แยกได้จากดิน โดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 33 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทธานอลเป็นแหล่งคาร์บอน Ree และคณะ (1993) ศึกษาการสร้าง และสะสม PHB โดยเชื้อ *Acinetobacter sp .* ที่แยกได้กากตะกอนบำบัดน้ำเสีย เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอะซิเตต เป็นแหล่งคาร์บอน โดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 11.5 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ในการนำจุลินทรีย์ 30 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ใหม่จากแหล่งธรรมชาติมาศึกษา โดยนำหัวเชื้อจากข้อ 3 หน้า 28 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM หน้า 27 โดยมีแหล่งคาร์บอนต่างๆ 3 ชนิดได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส และ ซูโครส ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง สกัดแยก PHB และวิเคราะห์ปริมาณ PHB จากผลการวิจัย (ตารางที่ 4) พบว่า จุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ BA-012 BA-014 BA-016 และ BA-019 สามารถสร้างและสะสม PHB ได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆ

ในอาหาร MSM ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-012 และ BA-016 และ BA-019 จะสร้าง และสะสม PHB สูงสุด ในปริมาณที่มากกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-014 โดยได้เท่ากับ 8.80 7.69 และ 7.91 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-014 จะสร้าง และสะสม ได้ปริมาณ PHB สูงสุด เท่ากับ 6.29 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 72 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ เมื่อพิจารณา

ปริมาณ PHB สูงสุด ซึ่งคิดเทียบเป็น กรัมต่อลิตร ของน้ำหมัก พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 จะสร้างและสะสมปริมาณ PHBได้มากกว่าแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือเท่ากับ 0.051 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนแบคทีเรียอีก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ BA-014 BA-016 และ BA-012 จะสร้างและสะสม ปริมาณ PHB ได้เท่ากับ 0.044 0.020 และ 0.007 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 24 และ 72 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ

ส่วนในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเปรียบเทียบ ปริมาณ PHB สูงสุด ที่แบคทีเรียสร้าง และสะสม พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 และ BA-016 จะสร้างและสะสม PHB ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยเท่ากับ 9.02 และ 9.00 เปอร์เซนต์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-012 และ BA-014 จะสร้างและสะสม ปริมาณ PHB ได้ปริมาณต่ำกว่า คือเท่ากับ 7 และ 3.33 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ นอกจากนี้ ปริมาณ PHB ที่แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ สร้างและสะสม เมื่อคิดเป็น หน่วยกรัมต่อลิตร พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 จะสร้างและสะสม PHB ได้มากกว่าแบคทีเรียอีก 3 สายพันธุ์ โดยได้เท่ากับ 0.037 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนแบคทีเรียอีก 3 สายพันธุ์ได้แก่ BA-012 BA-014 และ BA-016 สร้างและสะสม ปริมาณ PHB ได้เท่ากับ 0.021 0.012 และ 0.018 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 72 และ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ

ในอาหาร MSM ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 จะผลิตปริมาณ PHB ได้ปริมาณ มากกว่า แบคทีเรียอีก 3 สายพันธุ์ คือเท่ากับ 13.21 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-016 BA-012 และ BA-014 จะสร้างและสะสม PHB ได้ปริมาณต่ำกว่า คือเท่ากับ 6.40 4.38 และ 3.45 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 24 48 และ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ เมื่อหาปริมาณ PHB เป็นกรัมต่อลิตร พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 สร้างและสะสมได้ปริมาณมากกว่าสายพันธุ์อื่น คือเท่ากับ 0.049 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ส่วน แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-016 BA-012 และ BA-014 จะสร้างและสะสม PHB ได้ปริมาณต่ำกว่า ได้เท่ากับ 0.016 0.014 0.010 กรัมต่อลิตร

ที่เวลา 24 48 และ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ ดังนั้น ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 สามารถสร้างและสะสมปริมาณ PHB ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่น และ ใช้เวลาเพียง 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

จากผลการวิจัยดังกล่าว จึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 เป็นจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาต่อไป เนื่องจาก เป็นสายพันธุ์ที่สามารถใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ในการสร้างและสะสม PHB ได้ดีกว่าแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากจุลินทรีย์ 30 สายพันธุ์ และเมื่อพิจารณาตามจุดมุ่งหมายของการคัดเลือกจุลินทรีย์ในงานวิจัยนี้ นอกจากต้องการหาเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่แล้ว ยังต้องการได้จุลินทรีย์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก ได้แก่ กากน้ำตาล ซึ่งปริมาณน้ำตาลส่วนใหญ่ในกากน้ำตาลเป็นซูโครส นอกจากแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 สามารถใช้น้ำตาลซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน ในการสร้าง และสะสม PHB ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่นแล้ว ยังสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตส ในการสร้าง และสะสม PHB ได้อีกด้วย จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น จึงคัดเลือกเชื้อ BA-019 เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 4 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ที่สร้างและสะสมโดยเชื้อ BA-012 BA-014 BA-016 และ BA-019 ในอาหาร MSM ที่มี น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	แหล่งคาร์บอน								
		กลูโคส			ฟรุกโตส			ซูโครส		
		ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (% by wt)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (% by wt)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (% by wt)
BA-012	24	0.004	0.09	4.44	0.009	0.18	5.00	0.004	0.12	3.33
	48	0.005	0.25	8.80	0.021	0.30	7.00	0.014	0.32	4.38
	72	0.007	0.55	1.27	0.018	0.38	4.74	0.011	0.54	2.04
BA-014	24	0.014	0.37	3.78	0.008	0.24	3.33	0.010	0.29	3.45
	48	0.023	0.48	4.79	0.009	0.30	3.00	0.007	0.33	2.12
	72	0.044	0.70	6.29	0.012	0.39	3.08	0.003	0.46	0.65
BA-016	24	0.020	0.26	7.69	0.018	0.20	9.00	0.016	0.25	6.40
	48	0.013	0.46	2.83	0.016	0.56	2.86	0.012	0.45	2.67
	72	0.005	0.57	0.88	0.015	0.60	2.50	0.008	0.53	1.51
BA-019	24	0.020	0.28	7.14	0.011	0.18	6.11	0.037	0.28	13.21
	48	0.034	0.43	7.91	0.020	0.27	7.41	0.047	0.55	8.55
	72	0.051	0.65	7.85	0.037	0.41	9.02	0.049	0.66	7.42

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019

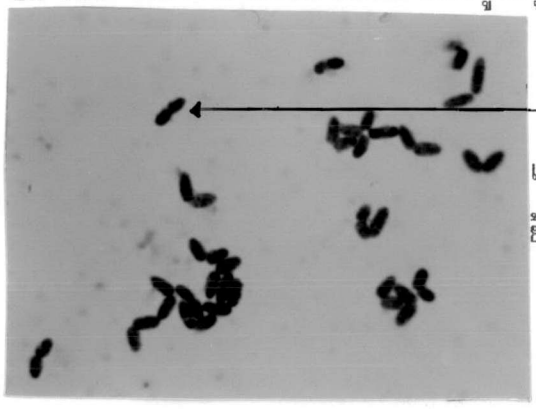
จากการศึกษาลักษณะ ทางสัณฐานวิทยา และ ทางชีวเคมีเบื้องต้น ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ผลการวิจัย แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019

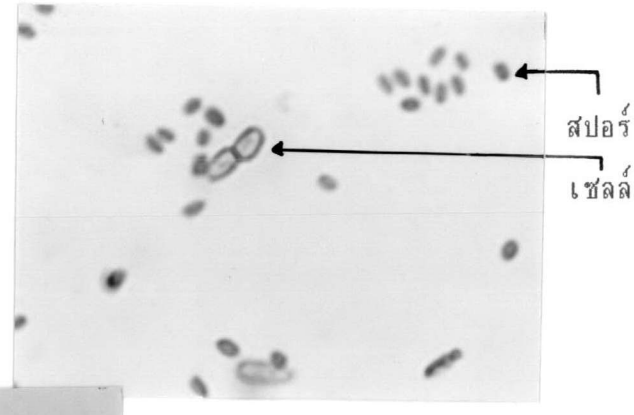
ลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019	ผลการวิจัย
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น (rod shape) เรียงตัวต่อกันเป็นสาย (chain) ขนาดเซลล์ กว้าง 2-3 ไมโครเมตร และ ยาว 5-7 ไมโครเมตร
การติดสีย้อมแกรม	เป็นแบคทีเรียแกรมบวก
การสร้างเอนโดสปอร์	พบสปอร์ บริเวณส่วนปลายของเซลล์ (terminal)
ลักษณะทางชีวเคมี การทดสอบคะตาเลส	สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลสได้

จากผลการวิจัยถึง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การติดสีแกรมบวก และการพบเอนโดสปอร์ จึงอาจเป็นไปได้ว่า เชื้อ BA-019 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อน ซึ่งสามารถสร้างสปอร์ได้ และ เมื่อตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมี เพื่อศึกษาถึงชนิดของแบคทีเรีย BA-019 โดยอาศัยปฏิกิริยาการสร้างเอนไซม์คะตาเลส ซึ่งเป็น

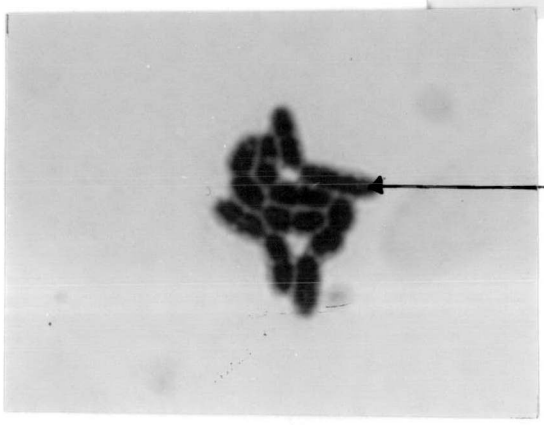
ลักษณะเฉพาะตัวของ *Bacillus* ที่ทำให้สามารถแยกชนิดของจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้ พบว่า เชื้อ BA-019 สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้เช่นเดียวกับจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 จึงอาจจะจัดเป็น แบคทีเรียที่อยู่ในจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus*



(1)



(2)



(3)

รูปที่ 9 แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 เลี้ยงบนอาหาร MSM กำลังขยาย x 1000 เท่า

(1) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ (24 ชม.)

(2) ลักษณะของการสร้างสปอร์ (42 ชม.)

(3) ลักษณะแกรนูลของ PHB (24 ชม.)

การเตรียมสารเพื่อนำไปตรวจลักษณะ (characterization) ของสารผลิตภัณฑ์

เนื่องจากเชื้อ BA-019 สามารถสร้างและสะสม PHB ได้มากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ และเป็นเชื้อที่คัดเลือกเพื่อทำการวิจัยขั้นต่อไป จึงควรต้องมีการตรวจสอบลักษณะ (characterization) ของสารผลิตภัณฑ์ที่แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 สร้างขึ้น โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ที่แสดงสูตรอาหารดังข้อ 4 หน้า 27 และ เพื่อเพิ่มปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ให้มีปริมาณมากพอที่จะตรวจลักษณะ จึงทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักหลายครั้งๆ ซึ่งภาวะในการเลี้ยงเชื้อจะควบคุมการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm อุณหภูมิ 30 °ซ พีเอชเท่ากับ 6 และอัตราการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที โดยสกัดสารผลิตภัณฑ์และทำให้บริสุทธิ์ ดังวิธีในหน้า 31 ได้สารผลิตภัณฑ์ดังรูปที่ 10 ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และทางเคมี ด้วยวิธีต่างๆ ต่อไป

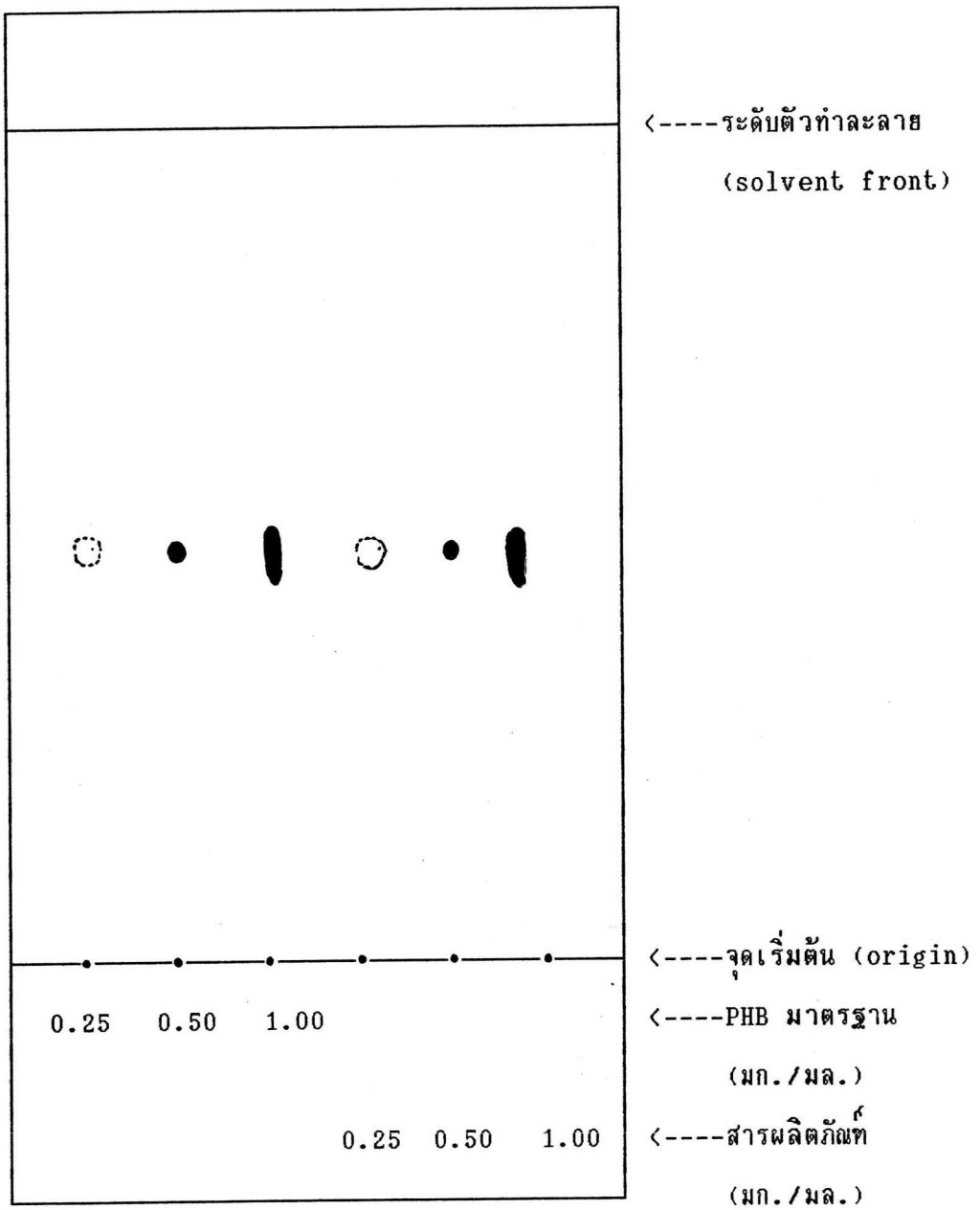
รูปที่ 10 แผ่นฟิล์ม PHB ที่สกัดแยกได้จาก เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019

การตรวจลักษณะ (Characterization) ของสารผลิตภัณฑ์ โดยวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และทางเคมี

ศึกษาลักษณะของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสกัดแยก และ ทำให้บริสุทธิ์ที่แบคทีเรีย BA-019 สร้างขึ้น โดยวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และทางเคมี ด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่

1.การตรวจสอบความบริสุทธิ์ ของสารผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC)

จากการวิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 5 ชนิด ตามวิธีในข้อ 1 หน้า 32 พบว่า ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ ระบบตัวทำละลาย ที่ประกอบด้วย เบนซีน:เฮกเซน:เมทธานอล:กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 10: 4 : 2 : 1 และความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมเท่ากับ 0.5 มก./มล. โดยที่ความเข้มข้นนี้จะปรากฏรอยสารอย่างชัดเจน ส่วนที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.50 มก./มล. คือ ความเข้มข้น 0.25 มก./มล. ความเข้มข้นน้อยเกินไป รอยสารที่ได้จึงไม่เห็นเด่นชัด และ ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.50 มก./มล. คือความเข้มข้น 1.0 มก./มล. ความเข้มข้นมากเกินไป รอยสารเกิดเป็นทางยาว (tail) ค่า R_f ของสารผลิตภัณฑ์ และ ค่า R_fของ PHB มาตรฐาน มีค่าใกล้เคียงกัน คือ 0.77 และ 0.79 ตามลำดับ และไม่พบรอยสารอื่น (รูปที่ 11) สำหรับระบบตัวทำละลาย 4 ระบบที่เหลือพบว่า ไม่สามารถหาค่า R_f ได้ เนื่องจากสารผลิตภัณฑ์ และ PHB มาตรฐาน เคลื่อนที่ได้ในอัตราเดียวกับระบบตัวทำละลาย ทำให้สารไปปรากฏอยู่ที่จุดเดียวกัน กับระดับของตัวทำละลาย

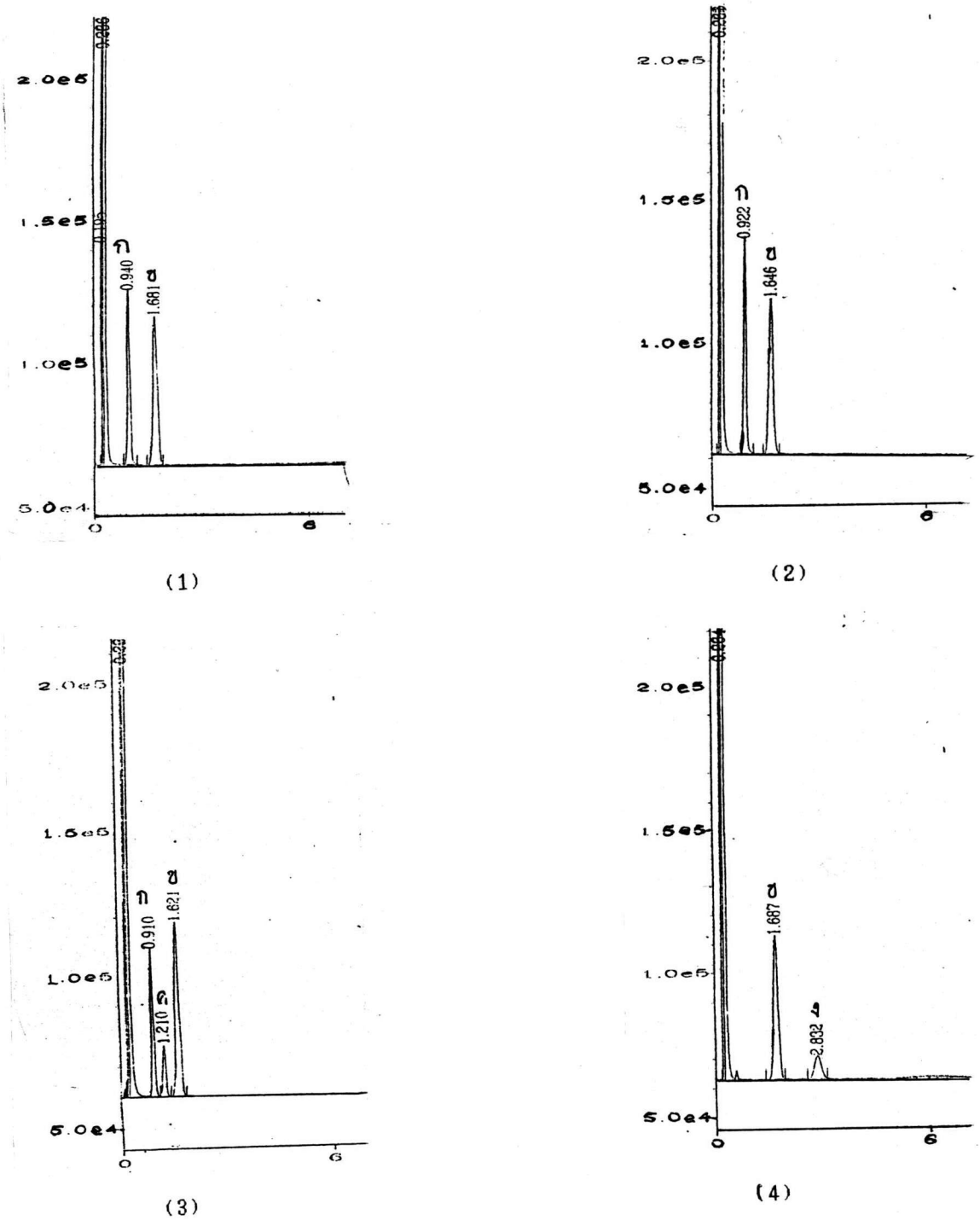


รูปที่ 11 โครมาโตแกรม เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี แบบผิวบาง ของ PHB มาตรฐาน และ สารผลิตภัณฑ์ ที่สกัดแยกได้จาก เชื้อ BA-019 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

2.การตรวจลักษณะสารผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (GC)

การตรวจลักษณะสารด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี จะเป็นการตรวจสอบถึงชนิดของหน่วยย่อยของสารผลิตภัณฑ์ การตรวจสอบสารผลิตภัณฑ์ทางคุณภาพด้วยวิธี GC จะทำโดยเปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์ (retention time) ของสารผลิตภัณฑ์ และสารมาตรฐาน ได้แก่ PHB P(3HB-co-24%3HV) และ P(4HB) ที่แสดงดังรูปที่ 12 โดยการวิเคราะห์ทำตามวิธีของ Comeau และคณะ (1988) ดังอธิบายไว้ในวิธีข้อ 2 หน้า 33

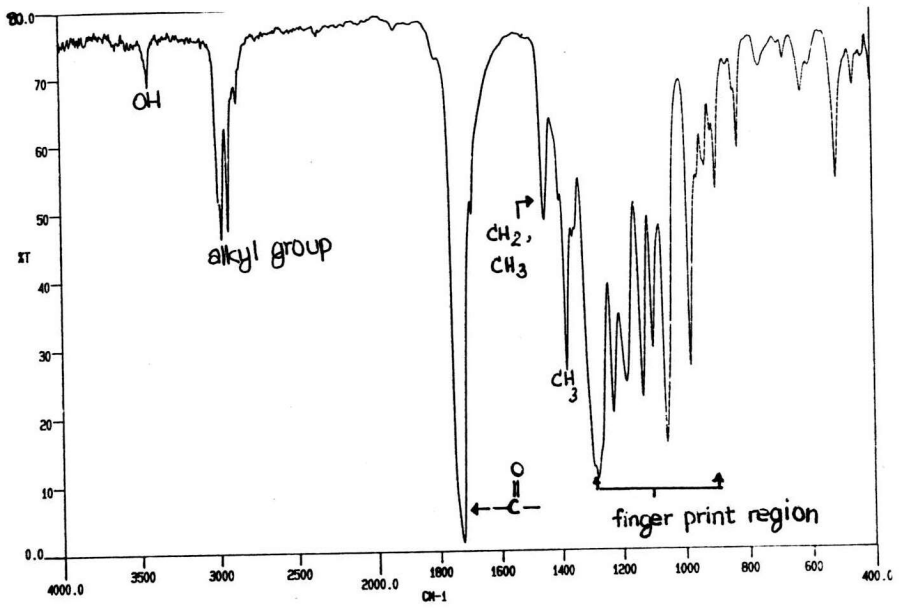
จากผลการวิจัย พบว่า โครมาโตแกรมของสารผลิตภัณฑ์ประกอบด้วย พีคของกรด 3-ไฮดรอกซีบิวทีริก(3HB)เช่นเดียวกับ PHB มาตรฐาน โดยมีค่ารีเทนชันไทม์ใกล้เคียงกัน โดยสารผลิตภัณฑ์มีค่ารีเทนชันไทม์เท่ากับ 1.681 และ PHB มาตรฐาน มีค่ารีเทนชันไทม์เท่ากับ 1.646 ส่วนโครมาโตแกรมของสาร P(3HB-co-24%3HV) และ P(4HB) แสดงค่ารีเทนชันไทม์ และ พีคของหน่วยย่อยที่แตกต่างไปจากสารผลิตภัณฑ์ โดย P(3HB-co-24%3HV) ประกอบด้วย พีคของกรด 3-ไฮดรอกซีวาเลอริก ซึ่งมีปริมาณ 24 โมลเปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (24%3HV) และ พีคของ 3HB ซึ่งมีค่ารีเทนชันไทม์ เท่ากับ 1.210 และ 1.621 ตามลำดับ สำหรับสาร P(4HB) ประกอบด้วย พีคของกรด 4-ไฮดรอกซีบิวทีริก (4HB) ซึ่งมีค่ารีเทนชันไทม์ เท่ากับ 2.832 ตามลำดับ



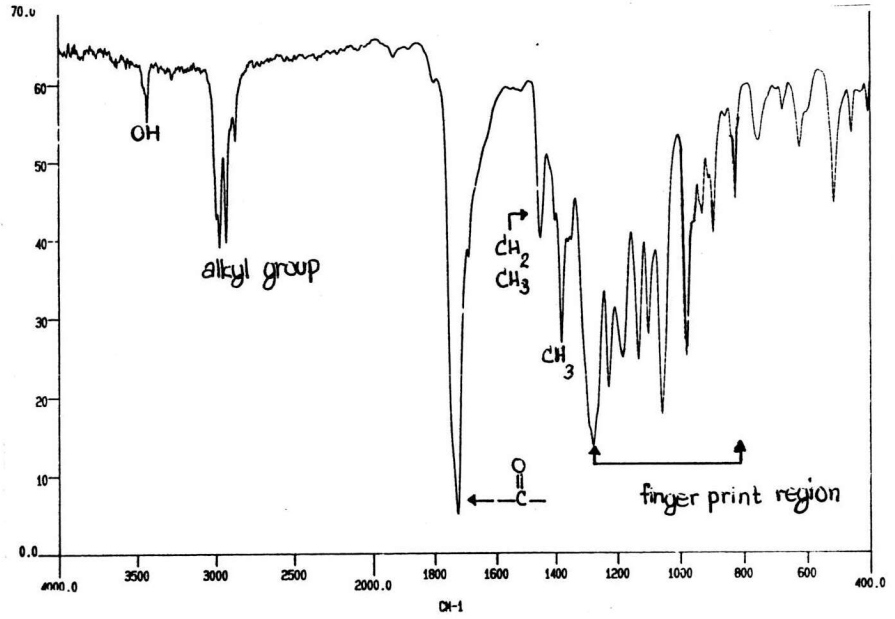
รูปที่ 12 โครมาโตแกรมที่วิเคราะห์โดยวิธี GC ของ (1)สารผลิตภัณฑ์ ที่ผลิตจากเชื้อ BA-019 (2)PHB มาตรฐาน (3)P(3HB-co-24% 3HV) (4) P(4HB) ก.พีกของ 3HB ข.พีกของกรดเบนโซอิก ค.พีกของ 3HV ง.พีกของ 4HB

3.การตรวจโครงสร้างโมเลกุลด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (IR)

การตรวจหาหมู่ฟังก์ชันของสารผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และ PHB มาตรฐาน ด้วยเครื่อง IR ตามวิธีข้อ 3 หน้า 33 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ กับ สเปกตรัมของ PHB มาตรฐาน จะประกอบด้วย พีคที่สำคัญ คือ พีคของหมู่คาร์บอนิล (c=o) ที่ความยาวคลื่น 1,724 cm^{-1} เหมือนกันทุกประการ (identical) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 13



(1)



(2)

รูปที่ 13 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี IR spectrophotometryของ (1) สารผลิตภัณฑ์จากเชื้อ BA-019 (2) PHB มาตรฐาน

4.การตรวจโครงสร้างโมเลกุลโดยเครื่อง NMR

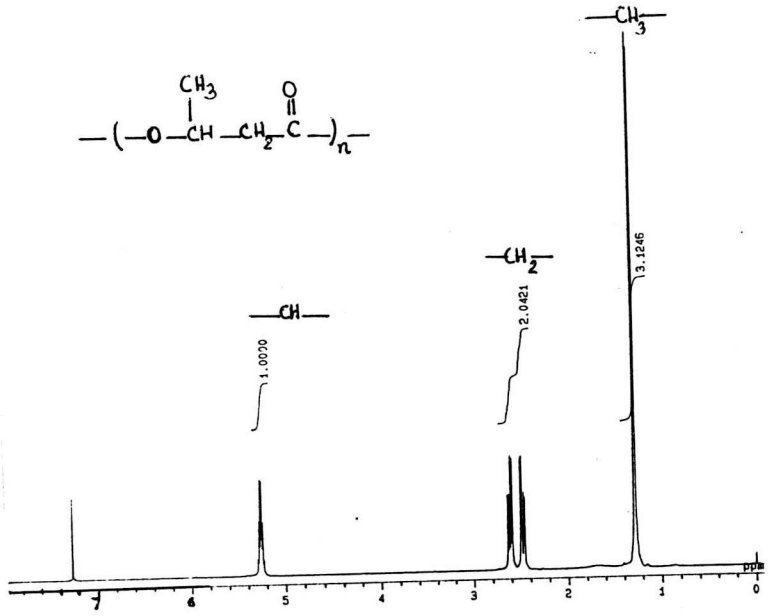
นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 และ PHB มาตรฐาน มาวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 4 หน้า 34 ได้ผลดังนี้

ก.โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรติกเรโซแนนซ์

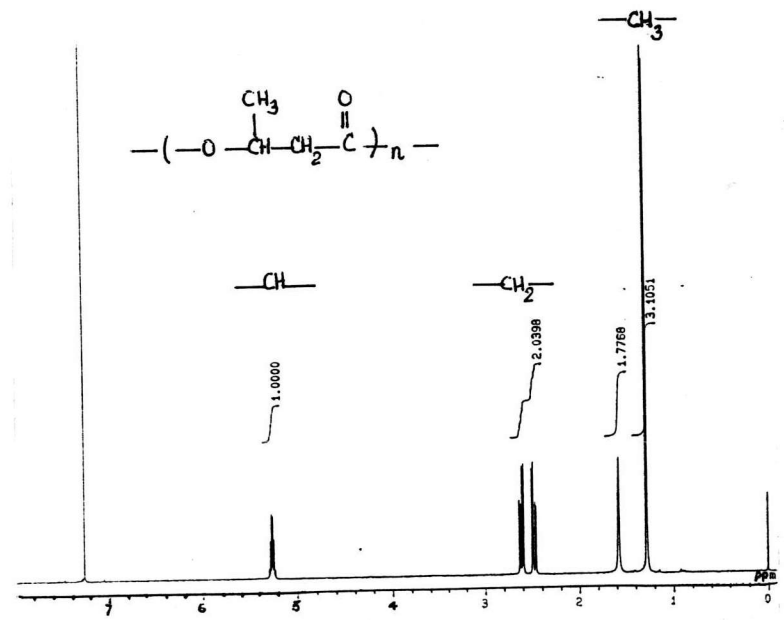
จากสเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธีโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรติกเรโซแนนซ์ ของสารผลิตภัณฑ์ (รูปที่ 14) และของ PHB มาตรฐาน พบว่า ประกอบด้วย หมู่เมทธิล ($-CH_3-$) ที่ 1.3 ppm (3H,d) หมู่เมทธีน (-CH-) ที่ 5.25 ppm (1H,m) และ หมู่เมทธีลีน ($-CH_2-$) ที่ 2.55 ppm (2H,m) ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกัน (identical)

ข.คาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

จากสเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธีคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ของสารผลิตภัณฑ์ (รูปที่ 15) พบว่า ประกอบด้วย สัญญาณ 4 สัญญาณ คือ คาร์บอนจากหมู่เมทธิลที่ 19.72 ppm หมู่เมทธิลีนที่ 40.74 ppm หมู่เมทธีนที่ 67.55 ppm และหมู่คาร์บอนิลที่ 169.11 ppm ซึ่งตรงกับสัญญาณ จากคาร์บอน-13 ของ PHB มาตรฐาน ที่ประกอบด้วย คาร์บอนจากหมู่เมทธิลที่ 19.75 ppm หมู่เมทธิลีนที่ 40.79 ppm หมู่เมทธีน ที่ 67.61 ppm และหมู่คาร์บอนิลที่ 169.13 ppm

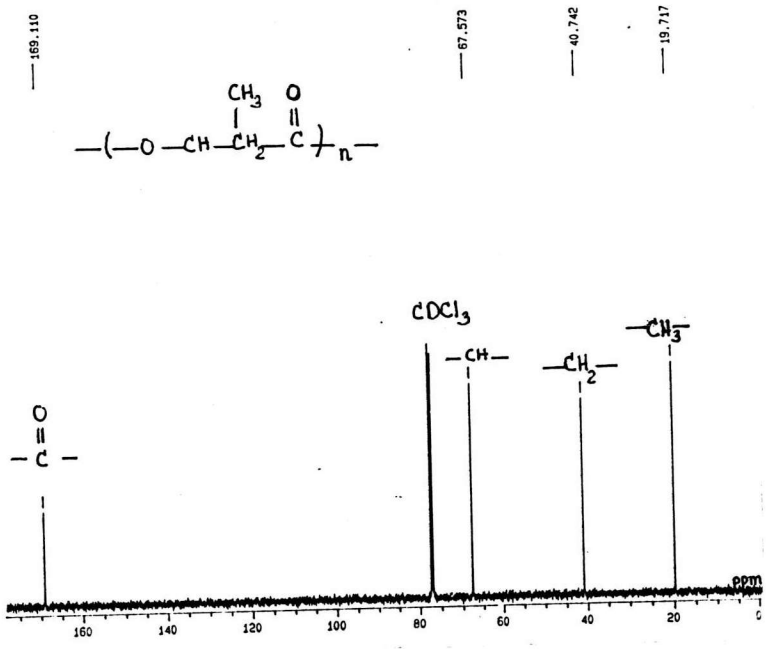


(1)

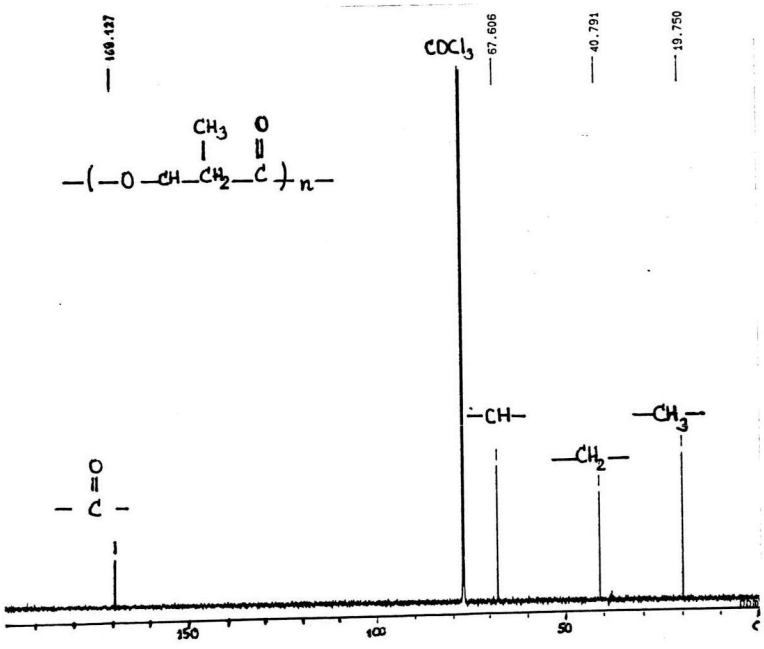


(2)

รูปที่ 14 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{1}H NMR spectroscopy ของ (1) สารผลิตภัณฑ์จากเชื้อ BA-019 (2) PHB มาตรฐาน



(1)



(2)

รูปที่ 15 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{13}C NMR spectroscopy ของ (1) สารผลิตภัณฑ์จากเชื้อ BA-019 (2) PHB มาตรฐาน

5.การวิเคราะห์ธาตุไฮโดรเจน และคาร์บอน

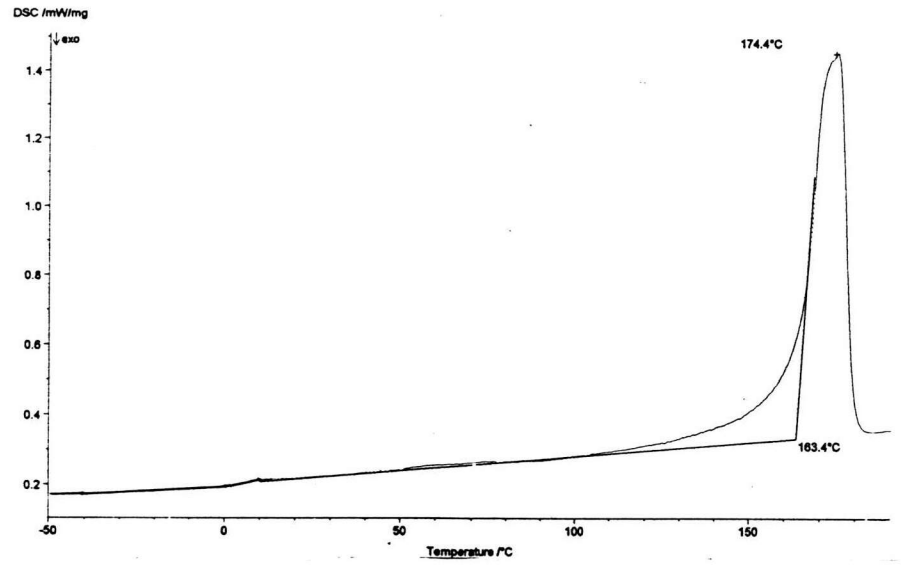
เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 และ PHB มาตรฐาน มาตรวจสอบหาปริมาณธาตุไฮโดรเจน และคาร์บอน ตามวิธีข้อ 5 หน้า 34 ผลการวิจัย ดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่า สารผลิตภัณฑ์ และสาร PHB มาตรฐาน ประกอบด้วย ธาตุไฮโดรเจนและคาร์บอน ในปริมาณใกล้เคียงกัน (ปริมาณคาร์บอน เท่ากับ 55.76 และ 55.75 ในสาร PHB มาตรฐาน และสารผลิตภัณฑ์ ตามลำดับ และ ปริมาณไฮโดรเจน เท่ากับ 6.92 และ 6.82 ในสาร PHB มาตรฐาน และสารผลิตภัณฑ์ ตามลำดับ) แต่เมื่อเปรียบเทียบ กับค่าที่คำนวณจากสูตรเคมี ($(C_4H_6O_2)_n$) พบว่า ปริมาณของธาตุคาร์บอน ใกล้เคียงกับ ในสารมาตรฐาน และในสารผลิตภัณฑ์ ส่วนปริมาณไฮโดรเจนมีค่าแตกต่าง คิดเป็นเปอร์เซนต์ เท่ากับ 0.21 และ 0.11 ตามลำดับ ซึ่งค่าความแตกต่างของ สารผลิตภัณฑ์ ต่อ PHB มาตรฐาน และค่าคำนวณถือว่า น้อยมาก

ตารางที่ 6 ปริมาณธาตุคาร์บอนและธาตุไฮโดรเจนของ PHB ในสาร PHB มาตรฐาน และในสารผลิตภัณฑ์ ที่สร้างโดยเชื้อ BA-019 และค่าที่ได้จากการคำนวณ

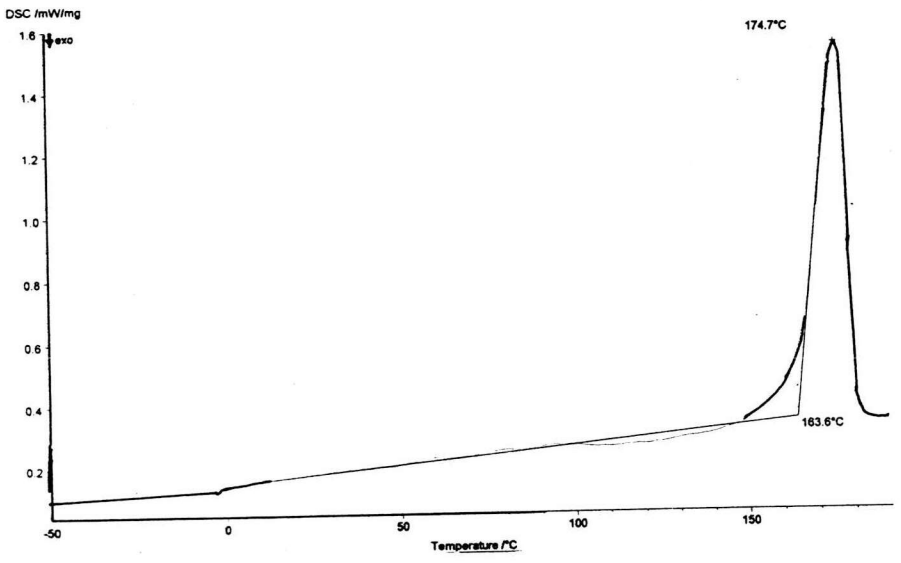
ตัวอย่าง	เปอร์เซนต์คาร์บอน	เปอร์เซนต์ไฮโดรเจน
สาร PHB มาตรฐาน	55.76	6.92
สารผลิตภัณฑ์	55.75	6.82
ค่าจากการคำนวณ	55.81	7.03

6.การวิเคราะห์หาค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) และ glass transition temperature (T_g)

สารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และ PHB มาตรฐาน ที่นำมาวิเคราะห์หาค่า T_m และ T_g โดยวิธี DSC ตามวิธีข้อ 6 หน้า 34 ดังแสดงรูปที่ 16 และ 17 ตามลำดับ พบว่า ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ของ สารผลิตภัณฑ์ และ ของ PHB มาตรฐาน มีค่าใกล้เคียงกัน คือเท่ากับ 174.4 และ 174.7 °ซ ตามลำดับ และ ค่า T_g ของสารผลิตภัณฑ์ และ ของ PHB มาตรฐาน มีค่าใกล้เคียงกัน คือ เท่ากับ 3.9 และ 3.4 °ซ ตามลำดับ

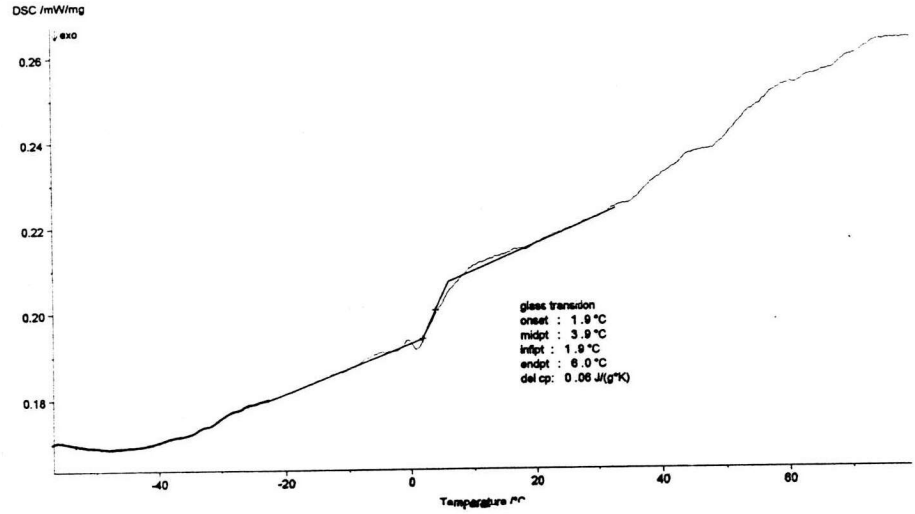


(1)

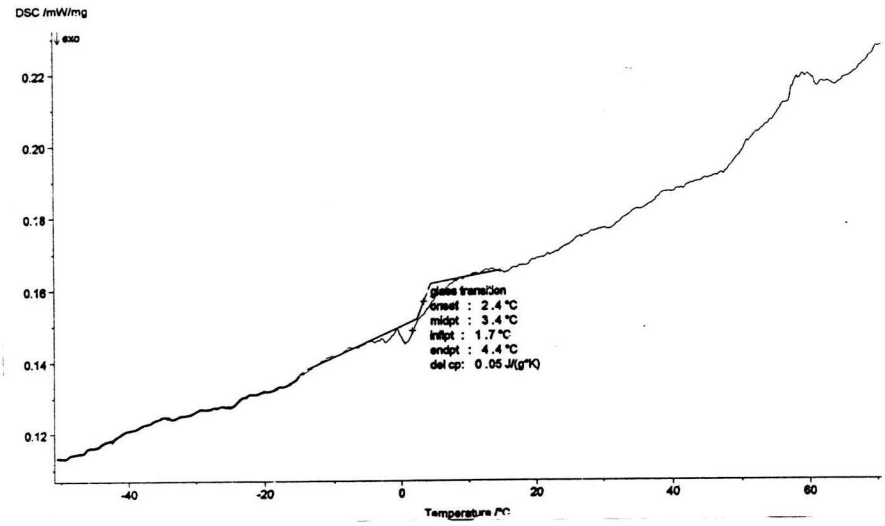


(2)

รูปที่ 16 ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว(T_m) ที่วิเคราะห์โดยเครื่อง DSC ของ (1) สารผลิตภัณฑ์จากเชื้อ BA-019 (2) PHB มาตรฐาน



(1)

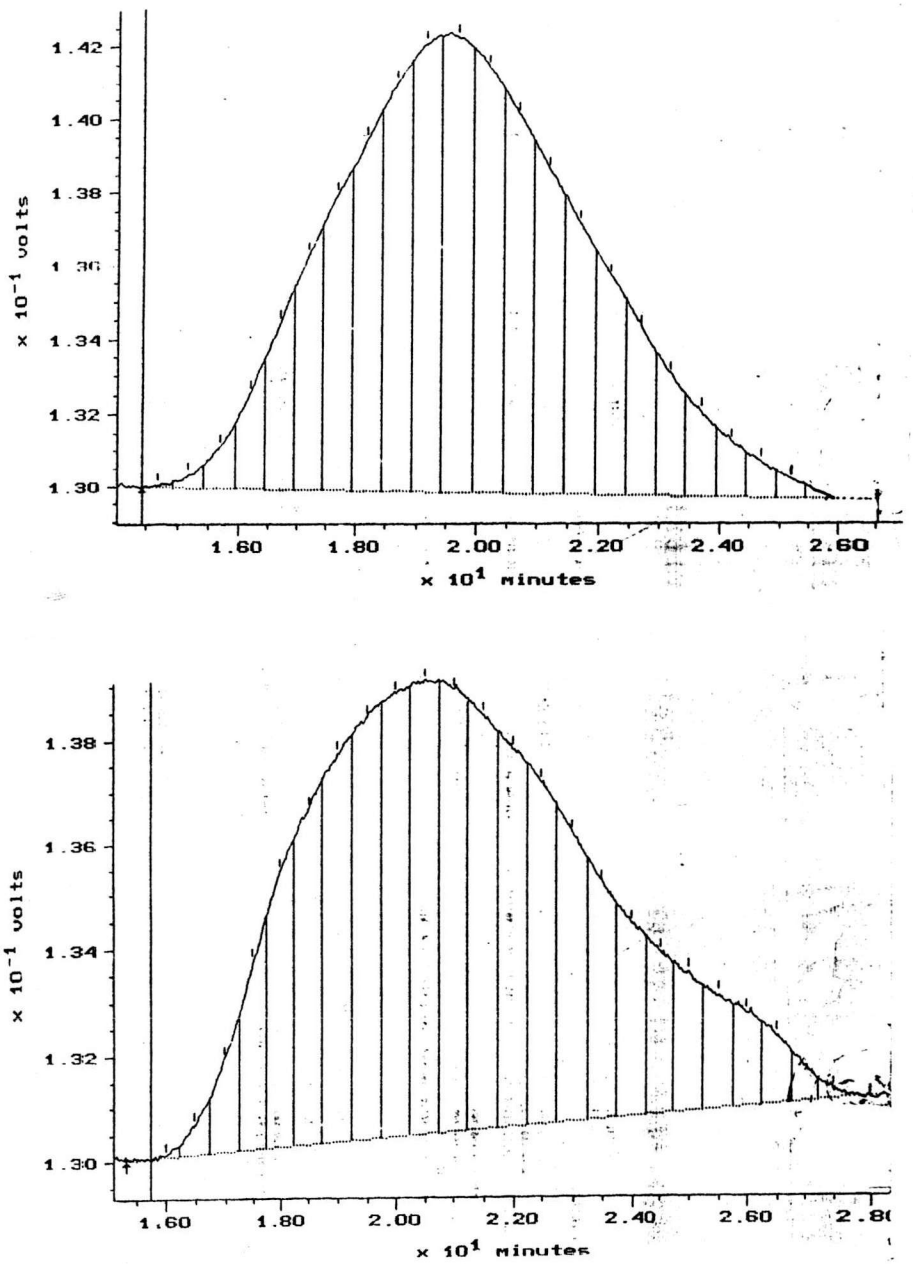


(2)

รูปที่ 17 ค่า T_g ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง DSC ของ (1) สารผลิตภัณฑ์จากเชื้อ BA-019 (2) PHB มาตรฐาน

7.การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์

นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และ PHB มาตรฐาน มาทำการวิเคราะหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (M_w) โดยเครื่อง GPC ตามวิธีในข้อ 7 หน้า 35 ผลการวิจัย ดังแสดงในรูปที่ 18 พบว่า น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (M_w) ของสารผลิตภัณฑ์ และ PHB มาตรฐาน เท่ากับ 3.9×10^6 และ 3.3×10^6 ตามลำดับ จะเห็นว่า สารผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จาก แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 จะมีค่า M_w มากกว่า ค่า M_w ที่ได้จาก PHB มาตรฐาน ที่สกัดมาจากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus*



รูปที่ 18 โครมาโตแกรม ที่วิเคราะห์โดยวิธี GPC ของ (1) สารผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเชื้อ BA-019 (2) PHB มาตรฐาน

ดังนั้น สรุปผลวิจัยที่ได้จากการเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์ คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี ของสารผลิตภัณฑ์ กับ PHB มาตรฐาน แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์ คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี ของสารผลิตภัณฑ์ กับ PHB มาตรฐาน

วิธีการวิเคราะห์	คุณสมบัติทางกายภาพ และ ทางเคมี	สารผลิตภัณฑ์	PHB มาตรฐาน
TLC	ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม	เบนซีน : เฮกเซน : เมทธานอล:กรดอะซิติก (10 : 4 : 2 : 1)	เบนซีน : เฮกเซน : เมทธานอล:กรดอะซิติก (10 : 4 : 2 :1)
	ความเข้มข้นของสารที่เหมาะสม(มก./มล.)	0.50	0.50
	ค่า R_f ของสาร	0.77	0.79
GC	หน่วยย่อยของสาร	3HB	3HB
IR	หมู่ฟังก์ชั่นที่สำคัญของสาร	หมู่คาร์บอนิล (C=O) ความยาวคลื่น 1,724 cm^{-1}	หมู่คาร์บอนิล (C=O) ความยาวคลื่น 1,724 cm^{-1}

ตารางที่ 7 (ต่อ)

วิธีการวิเคราะห์	คุณสมบัติทางกายภาพ และ ทางเคมี	สารผลิตภัณฑ์	PHB มาตรฐาน
NMR	^{1}H NMR	โปรตอนจากหมู่เมทธิล (CH_3) หมู่เมทธีน (CH) และหมู่เมทธีลีน ที่ 1.3 5.25 และ 2.55 ppm ตามลำดับ	โปรตอนจากหมู่เมทธิล (CH_3) หมู่เมทธีน (CH) และหมู่เมทธีลีน ที่ 1.3 5.25 และ 2.55 ppm ตามลำดับ
	^{13}C NMR	คาร์บอนจากหมู่เมทธิล หมู่เมทธิลีน หมู่เมทธีน และหมู่คาร์บอนิล ที่ 19.72 40.74 67.55 และ 169.11 ตามลำดับ	คาร์บอนจากหมู่เมทธิล หมู่เมทธิลีน หมู่เมทธีน และหมู่คาร์บอนิล ที่ 19.75 40.79 67.61 และ 169.13 ตามลำดับ
Elemental Analysis	ปริมาณธาตุคาร์บอน (เปอร์เซนต์)	55.75	55.76
	ปริมาณธาตุไฮโดรเจน (เปอร์เซนต์)	6.82	6.92

ตารางที่ 7 (ต่อ)

วิธีการวิเคราะห์	คุณสมบัติทางกายภาพ และ ทางเคมี	สารผลิตภัณฑ์	PHB มาตรฐาน
DSC	อุณหภูมิที่หลอมเหลว (T_m) (°ซ)	174.40	174.70
	อุณหภูมิค่า T_g (°ซ)	3.9	3.4
GPC	M_w	3.9×10^6	3.2×10^6

การหาระยะเวลาในการเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสม

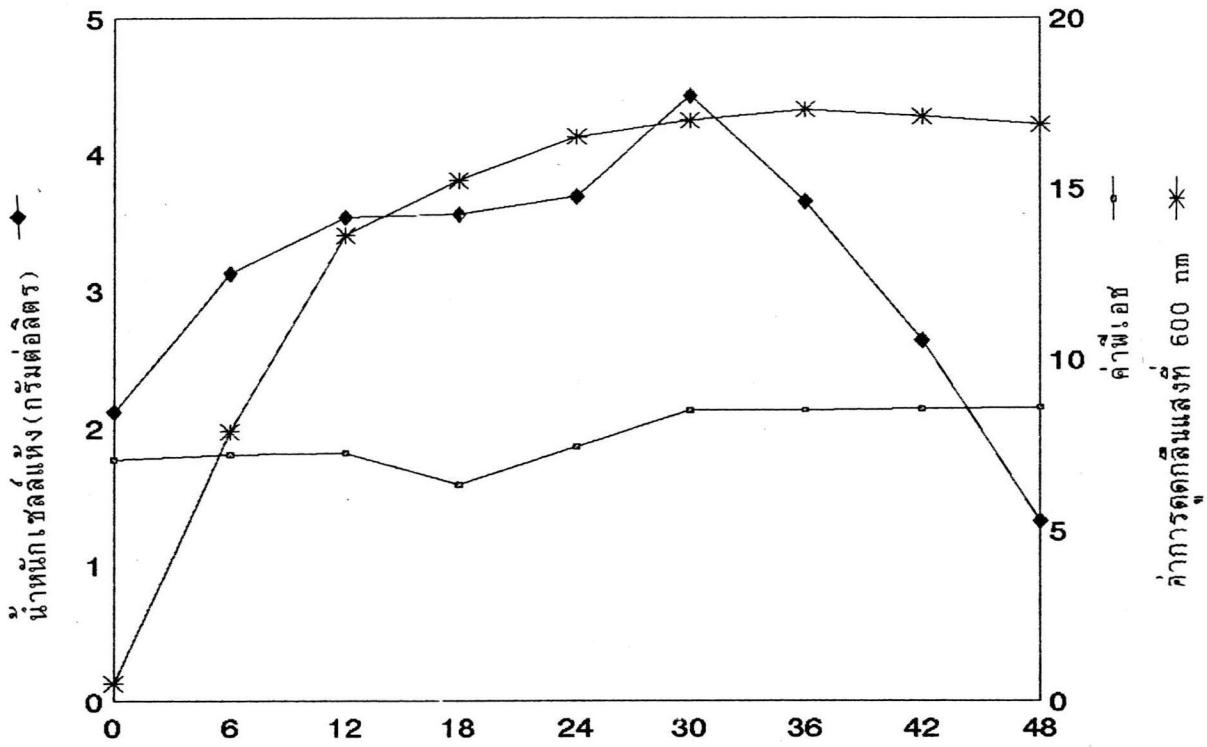
การสร้าง และสะสม PHB ที่เหมาะสมนั้น ควรเป็นกระบวนการต่อเนื่อง (serial process) ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก จุลินทรีย์จะมีการเจริญในแหล่งคาร์บอนที่ทำให้มีการผลิตเซลล์ปริมาณมาก ส่วนในขั้นตอนที่สอง มีการเติมสารอาหารเพื่อใช้ในการสร้างและสะสม PHB เซลล์ปริมาณมากที่ได้ในขั้นตอนแรกก็จะใช้สารอาหารนั้น เพื่อนำไปสร้างและสะสม PHB (Brandl และคณะ, 1990) อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp.A-04 เพื่อเพิ่มการผลิต PHB โดยขั้นตอนแรกเป็นการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มากในอาหารสูตรอุดม (Rich medium) แล้วจึงย้ายเซลล์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการสร้างและสะสม PHB (อาหาร MSM) ทำให้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้น ชนัญ ผลประไพ (2537) ศึกษาในเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน กับอรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) พบว่า ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่มีน้ำตาลฟรุกโตสเป็นองค์ประกอบ จะได้

ปริมาณเซลล์ในขั้นตอนแรกเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้ปริมาณของ PHB ที่ได้จากขั้นตอนที่สอง มีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาเพื่อหา ระยะเวลาที่เหมาะสม ในการเลี้ยงกล้าเชื้อ BA-019 ให้มีปริมาณเซลล์มากในขั้นตอนแรก ซึ่งจะทำให้ปริมาณของ PHB ที่แบคทีเรียสร้างและสะสม ในขั้นตอนที่สองมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น โดยจากการวิจัยนี้ ได้ผลว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ BA-019 เป็นสูตรเดียว กับ สูตรอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสม ซึ่งชนัญ ผลประไพ (2537) ได้ทำการวิจัยและรายงานไว้ ซึ่งสูตรอาหารแสดงไว้ในวิธีการวิจัยข้อ 3 หน้า 27

นำหัวเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ที่เตรียมได้จากข้อ 3 หน้า 29 ปลูกลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ข้อ 3 สูตรที่ 2 หน้า 27 โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาทำการวิเคราะห์โดยหาความหนาแน่นของเซลล์ ด้วยวิธีหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 8 และ รูปที่ 19 พบว่า ปริมาณของน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ความหนาแน่นของเซลล์ ในเวลา 30 และ 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงแบคทีเรีย จะมีปริมาณที่ไม่แตกต่างกันมาก คือ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 4.24 และ 4.32 กรัมต่อลิตร และ ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 12.49 และ 13.65 ตามลำดับ และความหนาแน่นของเซลล์ในชั่วโมงที่ 30 จะมีค่ามากกว่าความหนาแน่นของเซลล์ในชั่วโมงที่ 24 (10.99) มาก ดังนั้น ชั่วโมงที่ 30 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงกล้าเชื้อ BA-019

ตารางที่ 8 น้ำหนักเซลแห้ง ค่าพีเอช ค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตรของเชื้อ BA-019 ที่เลี้ยงในอาหารอุดม(Rich Medium)

ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลแห้ง (กรัม /ลิตร)
0	7.06	0.04	0.13
6	7.20	3.70	1.97
12	7.25	5.80	3.40
18	6.33	9.85	3.80
24	7.43	10.99	4.12
30	8.50	12.49	4.24
36	8.51	13.65	4.32
42	8.55	12.16	4.27
48	8.58	11.38	4.21



รูปที่ 19 การเติบโตของแบคทีเรีย และ ค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ BA-019 ในอาหารสูตรอุดม (Rich medium) นานเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณการสร้าง และสะสม PHB

1. การคัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน

ในการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่ง คือ ต้นทุนการผลิตที่มีราคาสูง การใช้จุลินทรีย์ซึ่งสามารถใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก จะเป็นการลดปัญหาได้ทางหนึ่ง (Zhang และคณะ, 1994) ผลการวิจัยที่ได้ในการคัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติ จำนวน 30 สายพันธุ์ แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 สามารถสร้าง และสะสม PHB ได้ ในปริมาณมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน และยังสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตส ในการสร้างและสะสม PHB ได้ด้วย งานวิจัยนี้มุ่งที่จะศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก ซึ่งมีซูโครสเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง และ กากน้ำตาล โดยในน้ำตาลทรายขาว มีซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก แต่มีความบริสุทธิ์ น้อยกว่า น้ำตาลซูโครส ส่วน น้ำตาลทรายแดง และกากน้ำตาล จะมีน้ำตาล 3 ชนิดเป็นองค์ประกอบ คือ ซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส (วิเคราะห์โดยวิธี HPLC)

ถ่ายกล้าเชื้อ BA-019 ซึ่งเตรียมจากกล้าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารข้อ 3 สูตรที่ 2 หน้า 27 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ปลูกในอาหาร MSM ที่แปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนดังข้อ 1 หน้า 35 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเริ่มต้นเก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า เมื่อเปรียบเทียบการใช้ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร และ กากน้ำตาล ปริมาณ 2 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 สร้าง PHB มากที่สุด ในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาล 2 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 24.07 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ รองลงมาได้แก่ ปริมาณ PHB ที่แบคทีเรียสร้าง และสะสมในอาหารที่มีน้ำตาลทรายแดง น้ำตาลทรายขาว และ น้ำตาลซูโครส เท่ากับ 22.64 12.65 และ 12.07 ตามลำดับ ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช ที่สร้าง และสะสมโดยเชื้อ BA-019 ในอาหาร MSM ซึ่งมีน้ำตาลซูโครส น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร และ กากน้ำตาล ปริมาณ 2 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

ชนิดแหล่งคาร์บอน	เวลาที่เลี้ยง (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)
[1] ซูโครส	24	7.13	0.035	0.29	12.07
	48	7.15	0.042	0.43	9.77
	72	6.86	0.048	0.62	7.74
[2] น้ำตาลทรายขาว	24	7.09	0.062	0.49	12.65
	48	6.81	0.044	0.52	8.46
	72	7.00	0.019	0.42	4.52
[3] น้ำตาลทรายแดง	24	3.62	0.60	2.65	22.64
	48	3.92	0.52	2.86	18.18
	72	3.83	0.28	2.72	10.29
[4] กากน้ำตาล 2 เปอร์เซนต์	24	4.66	1.04	4.32	24.07
	48	5.46	0.50	3.18	15.72
	72	5.79	0.37	2.57	14.40

หมายเหตุ ปริมาณขององค์ประกอบของน้ำตาลแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

1 มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบ เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร

2 มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบ เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร

3 มีน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส เท่ากับ 0.96 1.84 และ 4.08 กรัมต่อลิตร

4 มีน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส เท่ากับ 7.0 4.50 และ 17.00 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ ในการเปรียบเทียบการสร้าง และสะสม PHB ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลซูโครส น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร และ กากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการวิจัย แสดงในตารางที่ 10 พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 สร้าง และสะสม PHB ได้ปริมาณมากที่สุดในอาหารที่มีกากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) คือเท่ากับ 31.84 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ รองลงมาได้แก่ ปริมาณ PHB ที่แบคทีเรียสร้างและสะสมในอาหารที่มีน้ำตาลทรายแดง น้ำตาลทรายขาว และ น้ำตาลซูโครส เท่ากับ 19.12 15.11 และ 14.24 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่เวลา 24 48 และ 48 ชั่วโมงในการเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเปรียบเทียบ แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกัน ในปริมาณที่ต่างกัน จะเห็นว่า ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส น้ำตาลทรายขาว และกากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 จะสร้างและสะสมให้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้น ในอาหารที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้น ยกเว้นในกรณีที่มีน้ำตาลทรายแดง เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเมื่อปริมาณของน้ำตาลเพิ่มขึ้น แบคทีเรียจะสร้าง และสะสม PHB ลดลง คือจาก ปริมาณ 22.64 ลดลงเท่ากับ 19.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลแห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้อาจ เนื่องจากในน้ำตาลทรายแดง ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีความบริสุทธิ์น้อย เมื่อเทียบกับ น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทรายขาว จึงอาจมีสิ่งเจือปน (impurity) บางอย่าง ที่มีผลยับยั้งการสร้าง PHB แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ กากน้ำตาล ซึ่งอาจมีสิ่งเจือปนมากกว่าน้ำตาลทรายแดง แต่อาจเนื่องจากนอกจาก กากน้ำตาลมีน้ำตาล 3 ชนิด คือ กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส เป็นองค์ประกอบ แล้ว และ ยังมีแร่ธาตุ แหล่งไนโตรเจน ฟอสเฟต ซึ่งอาจช่วยเพิ่มปริมาณ PHB ที่สร้าง และสะสมโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ได้ดีกว่า และพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของกากน้ำตาลเป็น 6 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณ PHB ที่แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 สร้างจะมีค่าใกล้เคียงกันกับที่ผลิตได้เมื่อใช้กากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) คือเท่ากับ 29.72 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ที่เลี้ยงในอาหาร MSM คือ กากน้ำตาล ปริมาณ 4 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) และนอกจากนี้ สังเกตได้ว่า เมื่อใช้น้ำตาลทรายแดง และกากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าค่าพีเอชสุดท้ายมีค่าลดลงต่ำมากกว่าเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายแดงเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 10 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช ที่สร้างและสะสม โดยเชื้อ BA-019 ในอาหาร MSM ซึ่งมีน้ำตาลซูโครส น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร และ กากน้ำตาล ปริมาณ 4 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน

ชนิดแหล่งคาร์บอน	เวลาที่เลี้ยง (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)
[1] ซูโครส	24	6.61	0.049	0.55	8.90
	48	6.34	0.094	0.66	14.24
	72	6.02	0.080	0.64	12.50
[2] น้ำตาลทรายขาว	24	7.04	0.024	0.37	6.49
	48	6.53	0.071	0.47	15.11
	72	6.86	0.041	0.35	11.71
[3] น้ำตาลทรายแดง	24	4.15	0.61	3.19	19.12
	48	4.83	0.53	2.84	18.66
	72	3.90	0.30	2.69	11.15
[4] กากน้ำตาล 4 เปอร์เซนต์	24	5.56	1.70	5.34	31.84
	48	6.05	0.98	4.51	27.73
	72	6.17	0.83	4.08	20.34

หมายเหตุ ปริมาณขององค์ประกอบของน้ำตาลแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

1 มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบ เท่ากับ 20.00 กรัมต่อลิตร

2 มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบ เท่ากับ 19.20 กรัมต่อลิตร

3 มีน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส เท่ากับ 1.20 2.20 และ 8.80 กรัมต่อลิตร

4 มีน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส เท่ากับ 11.20 8.97 และ 31.23 กรัมต่อลิตร

2.การหาปริมาณไนโตรเจน

การสร้างและสะสม PHB เกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาพที่สารอาหารขาดความสมดุลย์ โดยมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ แต่มีสารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือ แมกนีเซียม ในปริมาณที่จำกัด (Dawes และ Senior ,1970) Repaske (1976) ศึกษาการผลิต PHB จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* พบว่า เมื่อจำกัดปริมาณไนโตรเจน ปริมาณ PHB ที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้น ได้ปริมาณเท่ากับ 65 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Suzuki และคณะ (1986) รายงานถึง การใช้ชนิดเกลือแอมโมเนียม 6 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) โซเดียมแอมโมเนียมโมโนไฮโดรเจนฟอตเฟต เตตระไฮเดรท ($NaNH_4HPO_4.4H_2O$) แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอตเฟต ($NH_4H_2PO_4$) แอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NH_4HCO_3) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$)) และ แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการผลิต PHB โดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. K ซึ่งเลี้ยงในระดับขวดเขย่า พบว่า ชนิดของเกลือแอมโมเนียมไม่มีผลต่อการผลิต PHB โดยปริมาณที่ได้มีค่าไม่แตกต่างมาก และ ในการศึกษาถึงผลการจำกัดปริมาณไนโตรเจน ในรูปแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อ การผลิต PHB ในเชื้อกลุ่มเดียวกันนี้ ซึ่งเลี้ยงแบบ fed-batch พบว่า จะให้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นจาก 52 เป็น 57 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Bitar และ Underhill (1990) ศึกษาถึง การผลิต PHB โดยเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* H16 ในการเลี้ยงแบบ fed-batch โดยใช้ NH_4Cl ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า สามารถผลิต PHB เท่ากับ 63 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Daniel และคณะ (1992) รายงานถึง ผลของการจำกัดปริมาณแอมโมเนียม ที่มีต่อการผลิต PHB ในเชื้อ *Pseudomonas* 135 ในการเลี้ยงแบบ fed-batch พบว่า ได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้น จาก 37 เป็นเท่ากับ 55 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ได้ศึกษาถึง ผลของชนิดเกลือแอมโมเนียม ได้แก่ NH_4Cl NH_4HCO_3 และ NH_4NO_3 ต่อการผลิต PHB ในเชื้อเดียวกันนี้ พบว่า ได้ปริมาณไม่แตกต่างกัน Volva และคณะ (1993) ศึกษาถึงภาวะการเจริญที่มีอิทธิพลต่อการผลิต PHB โดยเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* Z-I ในระดับถังหมัก พบว่า เมื่อจำกัดปริมาณไนโตรเจน จะได้ปริมาณ PHB ที่เพิ่มขึ้นจาก 10.9 เป็น 22 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) รายงานถึงการศึกษาการสร้าง และสะสม PHB ในเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในการเลี้ยงระดับขวดเขย่า พบว่า จำกัดปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB โดยได้ปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 19.20 เป็น 46.98 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ชนัญ ผลประไพ (2537) ได้ศึกษาถึงการผลิต PHB ในเชื้อเดียวกันนี้ ในระดับถังหมัก พบว่า ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นได้เป็น 82.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อจำกัดปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร ในปีเดียวกัน อัญชนา ศุรติชจร ศึกษาถึง การผลิต P(3HB-co_3HV) โดยเชื้อเดียวกัน พบว่า ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ จำกัดที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลีเมอร์ เท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร เช่นกัน และได้ปริมาณโคพอลีเมอร์เท่ากับ 46 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Beaulieu และคณะ (1995) รายงานถึง ชนิดของเกลือแอมโมเนียม ได้แก่ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ทำให้เชื้อ *Alcaligenes eutrophus* ผลิตเซลล์ได้มากที่สุด และได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีกากน้ำตาล ปริมาณ 0.3 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เพิ่มขึ้น ได้แก่ $(NH_4)_2SO_4$ โดยจะได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นจาก 17 เป็น 26 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร จากรายงานการวิจัยที่สรุปมา จะเห็นได้ว่า แหล่งไนโตรเจนในการผลิต PHB ควรเป็นเกลือแอมโมเนียม และ การเปรียบเทียบ การใช้เกลือแอมโมเนียมชนิดต่างๆ ได้ผลว่าปริมาณ PHB ไม่แตกต่างกันมากนัก นอกจากนั้น งานวิจัยส่วนใหญ่ในการผลิต PHB เลือกใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ไม่ว่าแบคทีเรียจะเป็นชนิดใด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และได้ศึกษาปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ในอาหาร MSM ที่เหมาะสมต่อการสร้างและสะสม PHB โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019

ถ่ายกล้าเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ที่เตรียมได้จาก อาหารสูตรที่ 2 ข้อ 3 หน้า 27 ที่เลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่ใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการศึกษาตามวิธี ข้อ 1 หน้า 35 คือ กากน้ำตาล ปริมาณ 4 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) และแปรผันความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ตามข้อ 2 หน้า 36 เลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และ น้ำหนักเซลล์แห้ง ทุกๆ 24 ชั่วโมง จากผลการวิจัย (ตารางที่ 11) พบว่า ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตรเป็นปริมาณที่น้อยไป เพราะแบคทีเรียสร้างและสะสม PHB ได้น้อยกว่า

เมื่อใช้ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ปริมาณมากกว่านี้ โดยปริมาณ PHB ที่ได้จากปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ได้เท่ากับ 23.80 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลแห้ง ที่เวลา 48 ชั่วโมง และ เมื่อใช้ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ตั้งแต่ 1.0 1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร พบว่า ได้ปริมาณ PHB ใกล้เคียงกัน คือเท่ากับ 31.73 28.94 และ 29.30 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลแห้ง ตามลำดับ เมื่อพิจารณาในด้านเศรษฐกิจแล้ว จึงควรเลือกใช้ปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร สำหรับใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไป นอกจากนี้ พบว่า เมื่อใช้ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ เพิ่มขึ้น ค่าพีเอชสุดท้ายของน้ำหมักจะลดลงมากด้วย

ตารางที่ 11 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ที่สร้าง และสะสม โดยเชื้อ BA-019 ที่มีกากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต ตั้งแต่ 0.5 ถึง 2.0 กรัมต่อลิตร

ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHB (เปอร์เซนต์ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง)
0.50	24	6.17	1.13	5.12	22.07
	48	6.33	1.24	5.20	23.85
	72	6.54	0.72	4.19	17.18
1.00	24	5.25	1.85	5.83	31.73
	48	5.47	1.11	4.82	23.03
	72	5.80	1.08	4.87	22.18
1.50	24	4.92	1.93	6.67	28.94
	48	4.73	2.18	7.08	30.79
	72	4.08	0.86	4.65	18.49
2.0	24	4.66	1.96	6.69	29.30
	48	4.36	1.65	7.66	21.54
	72	3.97	0.56	5.38	10.41

3.การหาเวลาที่เหมาะสมในการสร้างและสะสม PHB

Slepecky และ Law (1961) ได้รายงานถึง การสร้าง และสะสม PHB โดยเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ KM ที่มีการสร้างสปอร์ ซึ่งได้ปริมาณ PHB สูงสุดในช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (ที่เวลา 40 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ) ก่อนที่เชื้อจะมีการสร้างสปอร์ โดยได้เท่ากับ 10 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือ 1/5 เท่า ของปริมาณ PHB ที่สร้าง และสะสม โดยเชื้อเดียวกันนี้ ในสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสปอร์ (50 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) และหลังจากที่เชื้อมีการสร้างสปอร์ ปริมาณของ PHB จะลดลง เหลือเท่ากับ 1 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Kominek และ Halvorson (1965) ศึกษาถึงการผลิต PHB โดยเชื้อ *Bacillus cereus* T พบว่า ปริมาณ PHB ที่ผลิต เท่ากับ 10 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ผลิตในช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ เช่นเดียวกัน Heinzle และ Lafferty (1980) ศึกษาถึง รูปแบบจลน์ศาสตร์ของการเจริญ และการสังเคราะห์ PHB โดยเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* H16 โดยการเจริญของเชื้อประกอบด้วย 2 ช่วง คือ ในช่วงแรก เป็นช่วงการเจริญ (growth phase) เชื้อสังเคราะห์โปรตีน โดยใช้แอมโมเนียมที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อปริมาณของแอมโมเนียมหมด เชื้อจะผลิต PHB แทน ในช่วงที่สอง Kofrovova และคณะ (1994) รายงานถึง การสร้าง และสะสม PHB ของเชื้อ *Bacillus megaterium* โดยได้ปริมาณเท่ากับ 35 ถึง 45 เปอร์เซนต์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในระยะเริ่มต้นของช่วงที่มีการเจริญคงที่ (stationary phase) Scholz และคณะ (1995) ศึกษาถึง ลักษณะการเจริญของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* พบว่า เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว โดยไม่มีระยะพักตัว (lag time) และ ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้น จาก 10 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 16 ไปเป็น 29 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้น การเจริญของเชื้อ จนถึง ชั่วโมงที่ 72 จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่ปริมาณ PHB ที่สร้าง และสะสม จะลดลง

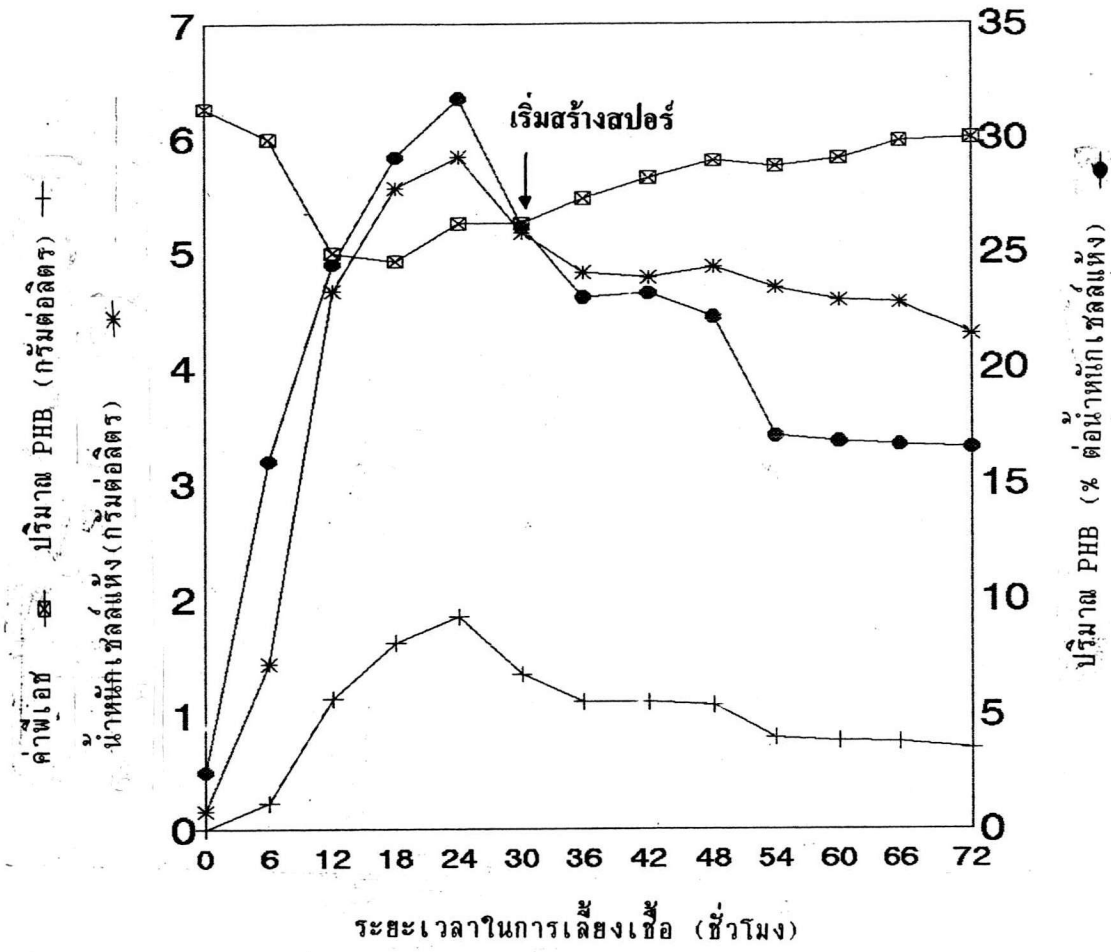
จากผลการวิจัยในข้อ 1 และ 2 หน้า 74 และ 78 ได้ปริมาณ และชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน การหาเวลาที่เหมาะสมในการสร้างและสะสม PHB โดยเชื้อ BA-019 ทำโดยถ่ายกล้าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 ข้อ 3 หน้า 27 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีกากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และ แหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณโปรตีน ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ทุกๆ 6 ชั่วโมง ผลการวิจัย ดังแสดงในตารางที่ 12 รูปที่ 20 21 22 และ 23 พบว่า ในช่วงเวลาตั้งแต่ 0 จนถึง 24 ชั่วโมง ปริมาณ PHB ที่สร้างและสะสม โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามการเจริญของแบคทีเรีย แบคทีเรียได้ใช้น้ำตาลทั้ง 3 ชนิดในกากน้ำตาลอย่างรวดเร็ว โดยใช้ซูโครสได้ดีที่สุด ใช้น้ำตาลฟรุกโตส และ น้ำตาลกลูโคส รองลงมา ตามลำดับ (รูปที่ 21) ปริมาณโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์จะค่อนข้างคงที่ คืออยู่ในช่วงเท่ากับ 2.86 ถึง 2.82 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณไนโตรเจนจะถูกใช้หมดไปในชั่วโมงที่ 24 (รูปที่ 22) ซึ่งเป็นเวลาที่เชื้อสร้าง PHB สูงสุด ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 31.73 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็น 1.85 กรัมต่อลิตร และ ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมงเช่นกัน มีปริมาณเท่ากับ 5.83 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 12) นอกจากนี้ ค่าพีเอชจะลดลงจากพีเอชเริ่มต้น (ประมาณ 6.2) โดยมีค่าเท่ากับ 5.2 หลังจากชั่วโมงที่ 24 การเจริญของเชื้อ รวมทั้ง การสร้างและสะสม PHB จะค่อยๆลดลง และสังเกตพบว่า เชื้อเริ่มมีการสร้างสปอร์ โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 30 และได้สปอร์ที่สมบูรณ์ (mature spore) ในชั่วโมงที่ 48 ดังรูปที่ 24 โปรตีนภายในเซลล์จะค่อนข้างคงที่ คือมีปริมาณลดลงเล็กน้อยจากปริมาณ เท่ากับ 2.82 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 30 ลดลงเหลือเท่ากับ 2.54 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 (รูปที่ 22) น้ำตาลซูโครสถูกใช้หมดที่ชั่วโมงที่ 66 ส่วนน้ำตาลฟรุกโตส และ น้ำตาลกลูโคส คงเหลืออยู่ในอาหาร จนถึงชั่วโมงที่ 72 โดยมีปริมาณเท่ากับ 0.38 และ 0.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 21) ค่าพีเอชสุดท้ายค่อนข้างคงที่โดยมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และ มีค่าเท่ากับ 6.0 ในชั่วโมงที่ 72 (รูปที่ 20)

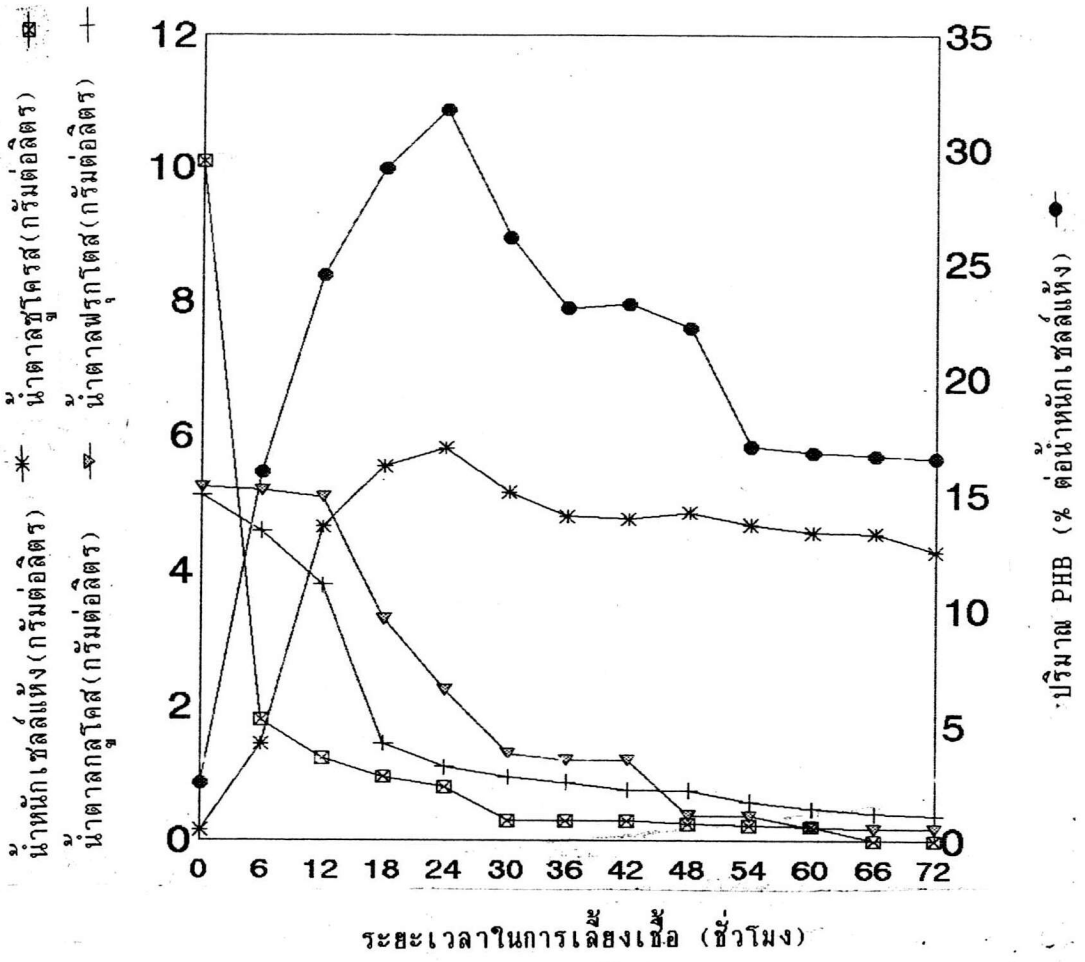
จากผลการวิจัยนี้ ซึ่งเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณ PHB ที่ผลิตโดยเชื้อ BA-019 มีค่าสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง และหลังจากชั่วโมงที่ 24 มีค่าลดลงโดยปริมาณ PHB มีค่าต่ำสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง (16.55 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) และในช่วงชั่วโมงที่ 24 ถึง 48 ปริมาณ PHB จะมีค่าลดลงในปริมาณที่น้อยกว่าชั่วโมงที่ 54 ถึง 72 ซึ่งมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 23) ดังนั้นในการวิจัยต่อไป จะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ เก็บตัวอย่าง ในชั่วโมงที่ 24 36 และ 48 ตามลำดับ

ตารางที่ 12 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีน และ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ที่สร้างและสะสมโดยเชื้อ BA-019 ในอาหาร MSM ซึ่งมีกากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

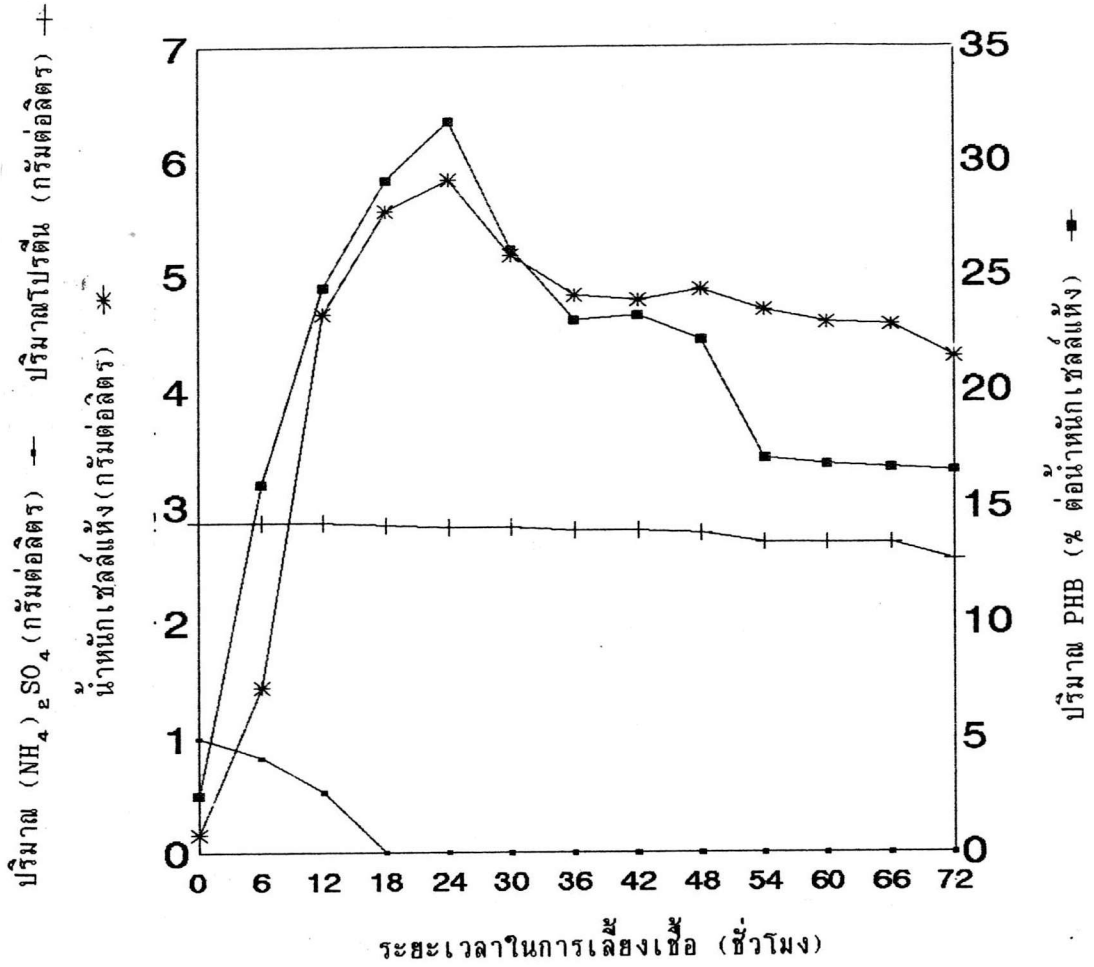
ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (% by wt)	ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโปรตีน (กรัม / ลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ(กรัม/ลิตร)		
							ซูโครส	ฟรุกโตส	กลูโคส
0	6.26	0.004	0.16	2.50	1.00	2.86	10.10	5.13	5.25
6	5.99	0.23	1.44	15.97	0.83	2.86	1.80	4.60	5.20
12	4.99	1.14	4.66	24.46	0.53	2.86	1.23	3.80	5.10
18	4.92	1.62	5.56	29.14	0.004	2.84	0.95	1.45	3.30
24	5.25	1.85	5.83	31.73	0.002	2.82	0.80	1.10	2.25
30	5.25	1.35	5.17	26.11	0.00	2.82	0.30	0.95	1.30
36	5.47	1.11	4.82	23.03	0.00	2.79	0.30	0.87	1.20
42	5.65	1.11	4.78	23.22	0.00	2.79	0.30	0.76	1.20
48	5.80	1.08	4.87	22.18	0.00	2.77	0.25	0.75	0.38
54	5.75	0.80	4.69	17.06	0.00	2.69	0.23	0.58	0.37
60	5.82	0.77	4.58	16.81	0.00	2.69	0.21	0.48	0.20
66	5.97	0.76	4.56	16.67	0.00	2.69	0.00	0.41	0.18
72	6.00	0.71	4.29	16.55	0.00	2.54	0.00	0.38	0.18



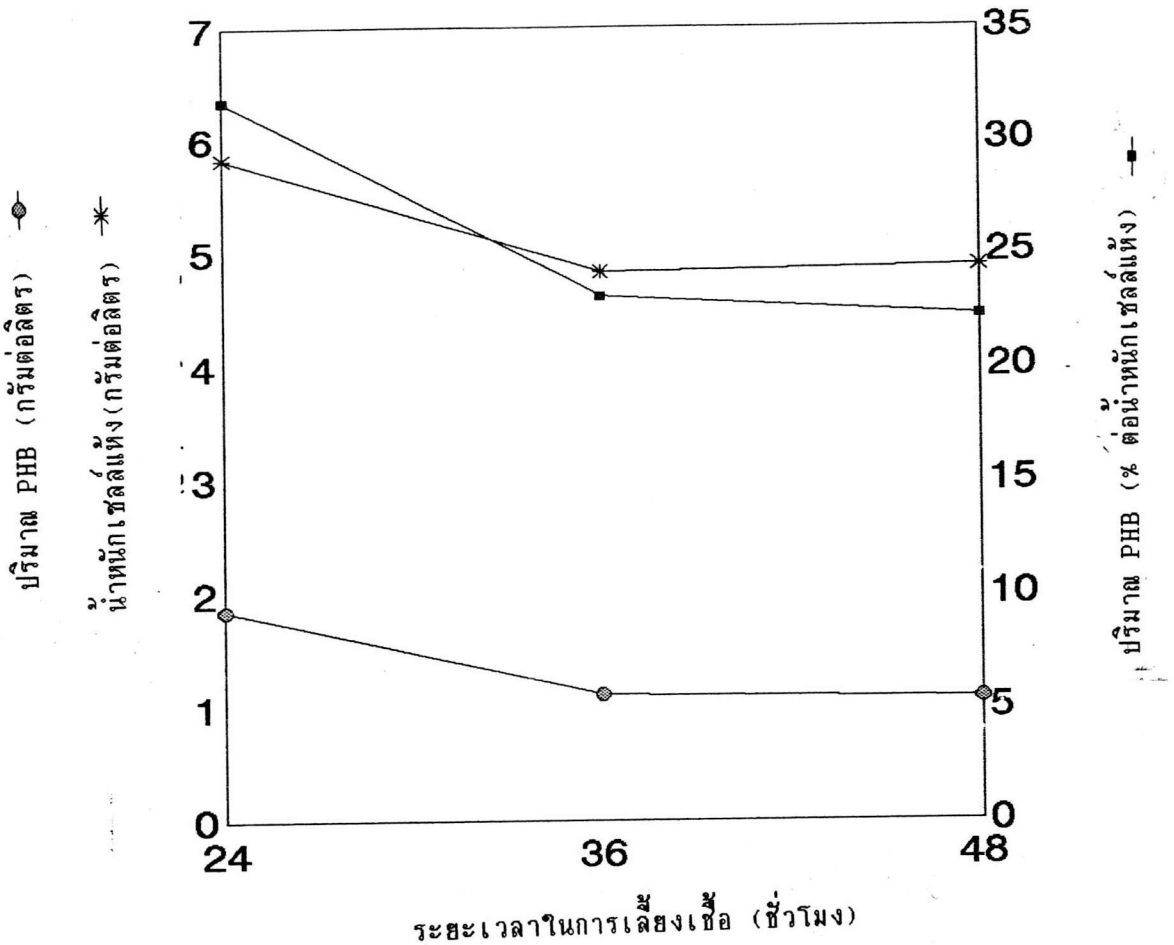
รูปที่ 20 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช ที่เวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อ BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาล 4 % เบอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ แอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ



รูปที่ 21 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ที่เวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อ BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาล 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ แอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ

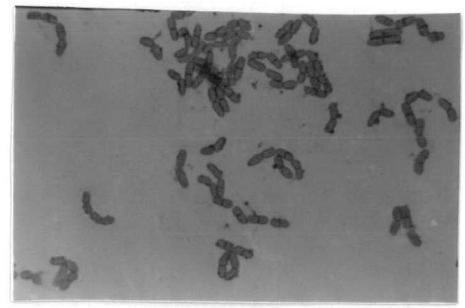


รูปที่ 22 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อ BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาล 4 % (น้ำหนัก ต่อปริมาตร) และ แอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ

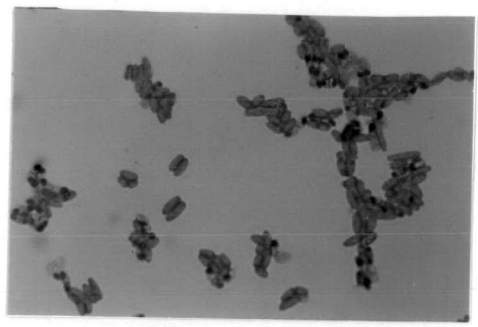


รูปที่ 23 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช ที่เวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อ BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาล 4 % เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ แอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ

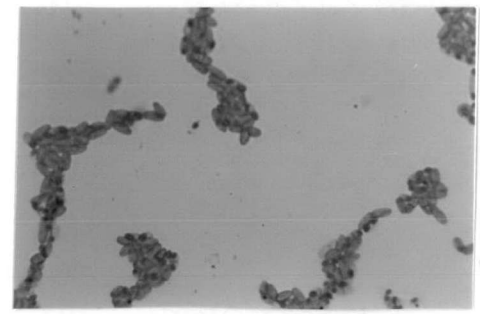
(12 ชั่วโมง)



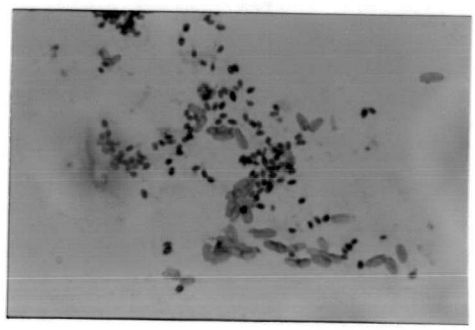
(24 ชั่วโมง)



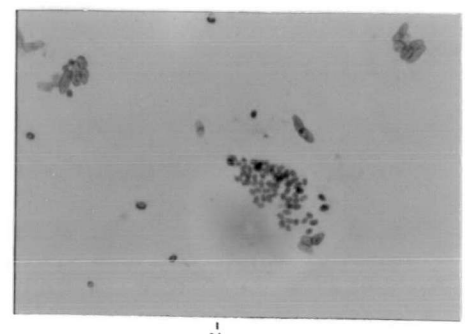
(30 ชั่วโมง)



(36 ชั่วโมง)



(42 ชั่วโมง)



(48 ชั่วโมง)

รูปที่ 24 การสร้างสปอร์ของเชื้อ BA-019 ที่เลี้ยงบนอาหาร MSM ซึ่งมีกากน้ำตาล ปริมาณ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ แอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.การหาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม

จากการตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเชื้อ BA-019 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อมีการสร้างสปอร์ ดังแสดงในรูปที่ 22 Juni และ Heym (1956) รายงานการสร้างและสะสม PHB ของเชื้อ *Bacillus cereus* T พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีพีเอชสูงจะมีการนำ PHB ไปใช้ในการสร้างสปอร์ของเชื้อ ส่วนในอาหารที่มีพีเอชต่ำ จะยับยั้งการใช้ PHB ระหว่าง การผลิตสปอร์ Repaske (1962) รายงานถึง ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB โดยเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* พบว่า พีเอชที่เหมาะสม เท่ากับ 6.9 Nakata (1963) รายงานถึงพีเอชที่มีผลต่อการสะสม PHB ในเซลล์ ระหว่างช่วงแรกของการเกิดสปอร์โดยเชื้อ *B.cereus* T โดยช่วงพีเอชที่มีการสะสมพอลีเมอร์ เท่ากับ 6.2-6.4 Suzuki และคณะ (1986) ศึกษาถึงการผลิต PHB โดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. K พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB เท่ากับ 7.0 ทั้งใน การเลี้ยงระดับขวดเขย่า และในระดับ fed-batch ในปี 1988 Suzuki และคณะ รายงานถึง ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB โดยเชื้อ *Protomonas extorquens* ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 5.3 ถึง 8.6 อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ศึกษาถึง ค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB โดยเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 พบว่า มีค่าเท่ากับ 7.0 โดยได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้น จาก 19.66 เป็นเท่ากับ 20.70 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ชนัญ ผลประไพ (2537) รายงานถึง ผลของการควบคุมค่าพีเอช และ การไม่ควบคุมค่าพีเอช ที่มีต่อปริมาณ PHB ซึ่งผลิตโดยเชื้อเดียวกันนี้ ในระดับถังหมัก พบว่า ภาวะที่ควบคุมค่าพีเอชจะให้ปริมาณ PHB สูงกว่าภาวะที่ไม่ควบคุมพีเอช และ อัญชนา ศุรติชจร (2537) รายงานถึง การเปรียบเทียบ ผลที่ได้จากการควบคุม ค่าพีเอช และไม่ควบคุมค่าพีเอช ในการผลิต P(3HB-co-3HV) พบว่า เมื่อควบคุมค่าพีเอช ในระดับถังหมัก เท่ากับ 7.0 เปรียบเทียบกับ เมื่อไม่ควบคุมค่าพีเอช ในระดับขวดเขย่า ได้ผลว่า เมื่อมีการควบคุมค่าพีเอช (ในถังหมัก) ได้ปริมาณโคพอลีเมอร์ (8.47 กรัมต่อลิตร) มากกว่า เมื่อเลี้ยงในระดับขวดเขย่าซึ่งไม่ได้ควบคุมค่าพีเอช(2.31 กรัมต่อลิตร)

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาถึง พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการสร้าง และสะสม PHB โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ในระดับขวดเขย่า (และในการทึ่งานวิจัยนี้ ได้วัดค่าพีเอชสุดท้ายทุกตัวอย่าง เนื่องจาก ต้องการเปรียบเทียบ และ ต้องการศึกษาผลของค่าพีเอช

ซึ่งอาจจะมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับ การที่ปริมาณ PHB ลดลง เพราะถูกนำไปใช้ในการสร้างสปอร์ ดังที่ได้มีผู้รายงาน (Nakata, 1963) ถึงความสัมพันธ์ดังกล่าว ในเชื้อ *B.cereus* T)

ถ่ายกล้าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ข้อ 3 หน้า 27 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีกากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และ แหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ เลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แปรผันค่าพีเอชเริ่มต้น ตามข้อ 4 หน้า 37 เริ่มต้นเก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าปริมาณ PHB ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นต่างๆ ได้แก่ 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ดังแสดงในตารางที่ 13 จะมีค่าไม่แตกต่างกันมาก คือเท่ากับ 30.82 29.79 26.29 และ 25.79 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ โดยในอาหาร MSM ซึ่งมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 แบคทีเรียสร้างและสะสม PHB ได้สูงสุด แต่เนื่องจาก ค่าพีเอชของอาหาร MSM ซึ่งมีกากน้ำตาล 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าพีเอชอยู่ในช่วงประมาณ 6.2 ถึง 6.4 และ ปริมาณ PHB ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ที่ต้องปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5.0 และ 6.0 มีค่าใกล้เคียงกัน ดังที่กล่าวมาแล้ว ในงานวิจัยนี้จึงเลือกค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เป็นพีเอชเริ่มต้นในการทำการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 13 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณกากน้ำตาลเท่ากับ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และมีแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และ แหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ โดยแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้น

ค่าพีเอช เริ่มต้น ของอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ระยะเวลาในการ เลี้ยงเชื้อ(ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	นน.เซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (เปอร์เซนต์ ต่อ นน.เซลล์แห้ง)
5.0	24	4.30	2.00	6.49	30.82
	36	4.21	1.25	5.61	22.28
	48	5.54	0.64	5.46	11.72
6.0	24	5.52	1.71	5.74	29.79
	36	6.10	1.19	5.00	23.80
	48	6.17	0.94	4.64	20.26
7.0	24	5.25	1.58	6.01	26.29
	36	5.17	0.86	4.62	18.61
	48	4.75	0.63	4.24	14.86
8.0	24	5.67	1.54	5.97	25.79
	36	5.65	1.01	5.32	18.98
	48	6.93	0.66	5.27	12.52

5.การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการผลิต PHB เช่นเดียวกันกับ ผลิตภัณฑ์อื่นๆ เชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ จะมีความเหมาะสมในการเติบโต และการสะสมผลิตภัณฑ์ ที่อุณหภูมิต่างกันไป Suzuki และคณะ (1988) ศึกษาถึง ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ การผลิต PHB โดยเชื้อ *Protomonas extorquens* ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 25 จนถึง 35 °ซ พบว่า อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB Purushothaman และ Vijila (1989) รายงานถึง การพบเชื้อ *Azospirillum* สายพันธุ์ที่สามารถทนความร้อนได้สูงถึง 50 °ซ ซึ่งสามารถสร้างและสะสม PHB ภายในเซลล์ได้ อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) รายงานถึง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เท่ากับ 30 °ซ โดยได้ปริมาณ เท่ากับ 20.65 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Kofronova และคณะ (1994) รายงานถึง การเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* เท่ากับ 43.5 °ซ มีผลยับยั้งการสร้างสปอร์ และเพิ่มปริมาณการสร้าง และสะสม PHB โดยเพิ่มขึ้นจากเดิม เท่ากับ 40.1 เป็น 53 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

งานวิจัยนี้ศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้าง และสะสม PHB โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 โดยถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรที่ 2 ข้อ 3 หน้า 27 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีกากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ โดยใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.0 ทำการแปรผันอุณหภูมิเท่ากับ 25 30 และ 37 °ซ ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เริ่มต้นเก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงแบคทีเรีย BA-019 เพื่อสร้าง และสะสม PHB โดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 31.05 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนที่อุณหภูมิ 25 °ซ และ 37 °ซ แบคทีเรียจะสร้างและสะสม PHB ได้ ในปริมาณที่ต่ำกว่า คือเท่ากับ 27.22 และ 24.89 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลแห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนค่าพีเอชสุดท้าย ไม่แตกต่างกันมากนัก นอกจากที่อุณหภูมิเท่ากับ 37 °ซ ค่าพีเอชค่อนข้างต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 °ซ และ 25 °ซ โดยเฉพาะที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ค่าพีเอชต่ำที่สุด เท่ากับ 3.84

ตารางที่ 14 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ BA-019 ในอาหาร MSM ที่ใช้ปริมาณกากน้ำตาลเท่ากับ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ โดยแปรผัน ค่าอุณหภูมิ ในการเลี้ยงเชื้อ

อุณหภูมิ (° ซ)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ(ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ปริมาณ PHB (กรัม /ลิตร)	นน.เซลล์แห้ง (กรัม /ลิตร)	ปริมาณ PHB (เปอร์เซนต์ ต่อ นน.เซลล์แห้ง)
25	24	5.98	1.53	5.62	27.22
	36	5.50	1.13	6.69	16.89
	48	5.35	0.79	6.96	11.35
30	24	5.77	1.90	6.12	31.05
	36	4.66	1.10	6.43	17.11
	48	4.67	0.71	6.46	10.99
37	24	4.67	0.97	4.03	24.89
	36	4.00	0.38	3.07	12.38
	48	3.84	0.23	2.80	8.21

6.การหาปริมาณฟอสเฟตที่เหมาะสม

Daniel และคณะ (1992) ศึกษาถึงความสำคัญของการจำกัดฟอสเฟต ต่อการสร้างและสะสม PHB ในเชื้อ *Pseudomonas* 135 โดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 34.5 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในอาหารที่ไม่มีการเติมฟอสเฟต (ซึ่งอยู่ในรูป กรดฟอสฟอริก) และ ผลิตได้ปริมาณมากขึ้น เป็น 55 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ ในระดับ fed-batch Volva และคณะ (1993) รายงานถึง ผลของการจำกัดปริมาณฟอสเฟตที่มีต่อการผลิต PHB โดยเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* Z-I ในระดับถังหมัก พบว่า เมื่อจำกัดปริมาณฟอตเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีปริมาณเพียง 45 เปอร์เซนต์ ของปริมาณฟอสเฟตในอาหารสูตรเดิม ได้พบว่า ปริมาณ PHB จะเพิ่มขึ้น จาก 9.9 เป็นเท่ากับ 23 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ศึกษาถึง ผลของการจำกัดฟอตเฟตในรูปอัตราส่วนของ KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 ในอาหาร MSM ต่อ การผลิต PHB ในเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 พบว่า อาหาร MSM ที่ไม่มี KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 จะทำให้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นจาก 22.31 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในอาหารสูตรเดิมที่มีปริมาณอัตราส่วนของ KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 เท่ากับ 2 และ 0.6 กรัมต่อลิตร เป็น 41.71 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลิตได้ปริมาณมากขึ้น เมื่อมีการจำกัดปริมาณฟอสเฟต ควบคู่ไปกับ การจำกัดปริมาณไนโตรเจน โดยพบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมของ KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 ต่อการผลิต PHB ในเชื้อนี้ มีค่าเท่ากับ.1 และ 0.3 กรัมต่อลิตร โดยได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นเท่ากับ 46.80 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง อัญชนา ศุรติขจร (2537) รายงานถึง การผลิต P(3HB-co-3HV) ในเชื้อเดียวกันนี้ พบว่า การจำกัดปริมาณฟอสเฟตไม่มีผลในการเพิ่มปริมาณโคพอลีเมอร์ โดยปริมาณโคพอลีเมอร์สูงสุดที่ได้ (47 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ได้จากปริมาณอัตราส่วนของ KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 ซึ่งมีค่าเท่ากับปริมาณฟอสเฟตที่เหมาะสม ดังที่อรุณ (2536) รายงานไว้

ในงานวิจัยนี้ ได้ศึกษาถึงผลของปริมาณฟอสเฟตในรูปอัตราส่วนของ KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 ในอาหารที่มีผลต่อการสร้าง และสะสม PHB โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 โดยถ่ายกล้าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ที่ได้จาก การเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรที่ 2 ข้อ 3 หน้า 27 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีกากน้ำตาล ปริมาณ 4

เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และ แหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ ปรับพีเอชเริ่มต้น และ ควบคุมอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6 และ 30 °ซ ตามลำดับ เมื่อทำการแปรผันอัตราส่วนแหล่งฟอสเฟตที่ใช้ระหว่าง KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 ตามวิธีข้อ 6 หน้า 37โดยมีชุดควบคุมซึ่งมีอัตราส่วนระหว่าง KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 เท่ากับ 2 และ 0.6 กรัมต่อลิตร เลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เริ่มต้นเก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงใน ตารางที่ 15 พบว่า แบคทีเรีย สร้างและสะสม ปริมาณ PHB ได้สูงสุด เท่ากับ 31.27 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลแห้ง (1.83 กรัมต่อลิตร) ในเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีปริมาณอัตราส่วนของ KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 เท่ากับ 2 และ 0.6 กรัมต่อลิตร ซึ่งเท่ากับ ปริมาณอัตราส่วนของ KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 ในชุดควบคุม และเมื่อใช้ปริมาณอัตราส่วนของ KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 ในปริมาณที่น้อยกว่า (1 และ 0.3 กรัมต่อลิตร) หรือ มากกว่านี้ (3 และ 0.9 กรัมต่อลิตร) แบคทีเรียจะสร้างและสะสม PHB ได้ปริมาณที่ต่ำกว่า โดยมีปริมาณใกล้เคียงกัน คือเท่ากับ 23.87 และ 24.44 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 36 และ 24 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ ส่วนในอาหารที่ไม่มี KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 เชื้อผลิต PHB ได้ปริมาณน้อยที่สุด คือได้เพียง 6.68 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ พบว่า ค่าพีเอชสุดท้ายที่ได้ จากอาหารที่มีปริมาณฟอสเฟตต่างๆกัน มีค่าไม่แตกต่างกันมาก ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ฟอสเฟตเป็นสารที่ช่วยปรับค่าพีเอชให้ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก (buffering agent) ก็อาจเป็นได้

ตารางที่ 15 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ที่สร้างและสะสม โดยเชื้อ BA-019 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีปริมาณกากน้ำตาลเท่ากับ 4 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) และมีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชและควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 6 และ 30 °ซ ตามลำดับ เมื่อแปรผันอัตราส่วนปริมาณ KH_2PO_4 ต่อ Na_2HPO_4

อัตราส่วนของ KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (เปอร์เซนต์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
0:0	24	4.99	0.33	4.94	6.68
	36	5.04	0.30	5.10	5.88
	48	5.46	0.28	4.73	5.92
1:0.3	24	5.05	1.48	6.50	22.77
	36	4.85	1.16	4.86	23.87
	48	4.88	0.75	3.92	19.13
2:0.6	24	5.50	1,83	5.82	31.27
	36	6.00	1.13	4.84	23.35
	48	6.15	0.82	4.76	17.23
3:0.9	24	5.03	1.52	6.22	24.44
	36	5.04	1.13	4.73	23.89
	48	5.05	0.72	4.00	18.00

7. การหาชนิดและสัดส่วนของฟอสเฟตและโพแทสเซียมจำกัดที่เหมาะสม

จากงานวิจัยของ Wakisaka และคณะ(1982)ซึ่งทำการแปรผันชนิด และปริมาณสัดส่วนของฟอสเฟตไปพร้อมกับโพแทสเซียม ในการสร้างและสะสม PHB จากเชื้อ *Bacillus thuringeinsis* พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีโพแทสเซียมและมีฟอสเฟตที่อยู่ในรูป NaH_2PO_4 หรือ $NH_4H_2PO_4$ ในปริมาณมาก จะเหมาะสมต่อการสร้างและสะสม PHB ดังนั้นการวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาถึง ชนิดและปริมาณของฟอสเฟต และโพแทสเซียม ที่มีผลต่อการสร้าง และสะสม PHB

เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM มีฟอสเฟต และ โพแทสเซียมในรูป Na_2HPO_4 และ KH_2PO_4 โดยเฉพาะ KH_2PO_4 ประกอบด้วยฟอสเฟต และโพแทสเซียม และ จากผลการวิจัยในข้อ 6 พบว่า ปริมาณอัตราส่วนระหว่าง KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 ที่เหมาะสมในอาหาร MSM สำหรับการสร้าง และสะสม PHB ของเชื้อ BA-019 เท่ากับ 2 และ 0.6 กรัมต่อลิตร การแปรผันสัดส่วนของฟอสเฟตจึงคิดจากปริมาณฟอสเฟตรวม (กรัมต่อลิตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เป็นหลัก ซึ่งได้เสนอค่าไว้ในตารางที่ 16

ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรที่ 2 ข้อ 3 หน้า 27 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีกากน้ำตาล ปริมาณ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)และ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ปรับพีเอชเริ่มต้นและควบคุมอุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 6 และ 30 °ซ ตามลำดับ โดยใช้ชนิดและสัดส่วน ปริมาณของฟอสเฟตในรูป Na_2HPO_4 และ $NH_4H_2PO_4$ และโพแทสเซียมในรูป KH_2PO_4 ดังวิธีในข้อ 7 หน้า 38 ทำการเลี้ยงแบคทีเรีย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เริ่มต้นเก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณ PHB และ น้ำหนักเซลล์แห้ง จากการวิเคราะห์ปริมาณ PHB ดังแสดงในตารางที่ 17 พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีปริมาณฟอสเฟตในรูป $NH_4H_2PO_4$ (อาหารเลี้ยงเชื้อหมายเลข 7 ถึง 12) แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 จะผลิต PHB ได้ในปริมาณที่ใกล้เคียง กับ ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้จากในอาหารที่มีปริมาณฟอสเฟต ในรูป Na_2HPO_4 (อาหารเลี้ยงเชื้อหมายเลข 1ถึง 6) ยกตัวอย่าง เช่น ปริมาณ PHB สูงสุดที่ผลิตได้ในอาหารที่มีปริมาณฟอสเฟตในรูป Na_2HPO_4 ได้แก่ ปริมาณ PHB

ที่ได้จากอาหารหมายเลข 3 ซึ่งมีปริมาณฟอสเฟตเท่ากับ 1.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีโพแทสเซียม (KH_2PO_4) (29.37 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) กับ ปริมาณ PHB สูงสุดที่ผลิตได้ในอาหารที่มีปริมาณฟอสเฟตในรูป NH_4HPO_4 ได้แก่ อาหารหมายเลข 10 ซึ่งมีปริมาณฟอสเฟตเท่ากับ 1.8 กรัมต่อลิตร และ มีโพแทสเซียม (KH_2PO_4) ปริมาณเท่ากับ 0.60 และ 2 กรัมต่อลิตร (28.43 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลแห้ง) ในเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

และจากผลการวิจัยที่ได้ เมื่อพิจารณาถึงสัดส่วนฟอสเฟตและโพแทสเซียมที่เหมาะสม พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณฟอสเฟตในรูป Na_2HPO_4 เท่ากับ 1.80 กรัมต่อลิตร และไม่มีปริมาณโพแทสเซียม (KH_2PO_4) เชื้อ BA-019 สร้าง และสะสม PHB ใกล้เคียงกับปริมาณ PHB ที่สร้าง และสะสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณฟอสเฟตในรูป Na_2HPO_4 เท่ากับ 1.80 กรัมต่อลิตร และมีโพแทสเซียม (KH_2PO_4) ในสัดส่วนเท่ากับ 0.60 และ 2 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่เท่ากับที่มีในอาหาร MSM ชุดควบคุม (อาหารหมายเลข 4) โดยมีค่าเท่ากับ 29.37 และ 29.23 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลแห้ง ตามลำดับ ในเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

ดังนั้นการไม่เติม หรือเติมโพแทสเซียม จึงไม่มีผลต่อการสร้าง และสะสม PHB ของเชื้อ BA-019 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิต PHB ที่เหมาะสม จึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากงานวิจัยขั้นก่อนหน้านี้ที่มีปริมาณฟอสเฟตในรูป Na_2HPO_4 และ โพแทสเซียม (KH_2PO_4) ในสัดส่วนเท่ากับ 0.60 ต่อ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 16 ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟอตเฟต โพแทสเซียม และปริมาณฟอตเฟตรวม (ในหน่วยกรัมต่อลิตร) ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เพื่อศึกษาผลของชนิด และสัดส่วนของฟอสเฟต และ โพแทสเซียม ที่มีต่อปริมาณ PHB ที่ผลิตโดยเชื้อ BA-019

หมายเลขสูตรอาหาร	ปริมาณฟอตเฟตรวม (กรัมต่อลิตร)	ชนิด/ปริมาณของสารประกอบฟอตเฟต (กรัมต่อลิตร)	ชนิด/ปริมาณของสารประกอบโพแทสเซียม (กรัมต่อลิตร)
1	0.90	Na_2HPO_4/1.35	KH_2PO_4/0.00
2	1.40	Na_2HPO_4/2.10	KH_2PO_4/0.00
3	1.80	Na_2HPO_4/2.70	KH_2PO_4/0.00
* 4	1.80	Na_2HPO_4/0.60	KH_2PO_4/2.00
5	2.30	Na_2HPO_4/3.45	KH_2PO_4/0.00
6	2.70	Na_2HPO_4/4.05	KH_2PO_4/0.00
7	0.90	$NH_4H_2PO_4$/1.09	KH_2PO_4/0.00
8	1.40	$NH_4H_2PO_4$/1.69	KH_2PO_4/0.00
9	1.80	$NH_4H_2PO_4$/2.17	KH_2PO_4/0.00
* 10	1.80	$NH_4H_2PO_4$/1.69	KH_2PO_4/2.00
11	2.30	$NH_4H_2PO_4$/2.78	KH_2PO_4/0.00
12	2.70	$NH_4H_2PO_4$/3.26	KH_2PO_4/0.00

* สูตรอาหารหมายเลข 4 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของสารประกอบฟอสเฟต และโพแทสเซียมที่เหมาะสม ที่ได้จากผลวิจัยจากข้อ 3.6 และใช้สูตรอาหารหมายเลข 4 เป็นอาหารชุดควบคุมด้วย

* สูตรอาหารหมายเลข 10 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เปลี่ยนชนิดของ แหล่งฟอสเฟต จาก Na_2HPO_4 และ $NH_4H_2PO_4$ โดยมีปริมาณฟอสเฟตรวม เท่ากับ ที่มีในอาหารหมายเลข 4

ตารางที่ 17 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช ที่สร้าง และสะสมจากเชื้อ BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร และกากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับค่าพีเอช และ ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 6 และ 30 องศาเซลเซียส เมื่อแปรผันชนิดและสัดส่วนของฟอตเฟต และโพแทสเซียม

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	ระยะเวลาในการเลี้ยง (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ปริมาณ PHB (กรัม /ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม /ลิตร)	ปริมาณ PHB (เปอร์เซนต์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)
1	24	5.07	1.19	6.57	18.11
	36	5.07	0.71	4.30	16.51
	48	4.90	0.65	4.35	14.94
2	24	5.05	1.65	6.34	26.02
	36	4.90	0.77	4.43	17.38
	48	4.81	0.76	4.31	17.63
3	24	5.08	1.73	5.89	29.37
	36	4.99	1.09	5.00	21.80
	48	5.08	0.74	4.78	15.48
4	24	5.19	1.71	5.85	29.23
	36	6.12	1.10	5.10	21.57
	48	6.14	0.76	4.64	16.38
5	24	5.30	1.57	5.71	27.50
	36	5.13	0.64	3.96	16.16
	48	5.29	0.56	3.83	14.62
6	24	5.34	1.58	5.77	27.38
	36	5.33	0.74	4.07	18.18
	48	5.36	0.59	3.67	16.08

ตารางที่ 17 (ต่อ)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	ระยะเวลาในการเลี้ยง (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ปริมาณ PHB (กรัม /ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม /ลิตร)	ปริมาณ PHB (เปอร์เซนต์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)
7	24	4.41	1.82	7.75	23.48
	36	4.46	1.38	5.47	25.23
	48	4.73	0.69	4.27	16.16
8	24	4.43	1.57	7.85	20.00
	36	4.58	1.09	5.75	18.96
	48	4.41	0.75	5.20	14.42
9	24	4.27	1.49	7.50	19.87
	36	4.26	1.32	6.24	21.15
	48	4.29	0.83	4.71	17.62
10	24	4.55	1.99	7.00	28.43
	36	4.62	1.40	6.53	21.44
	48	4.51	0.63	5.13	12.28
11	24	4.58	1.76	7.69	22.89
	36	4.48	1.09	6.47	16.85
	48	4.35	0.69	5.18	13.32
12	24	4.66	1.63	6.31	25.83
	36	4.73	1.57	5.86	26.79
	48	4.51	1.00	5.13	19.49

8.การหาปริมาณแมกนีเซียมที่เหมาะสม

Suzuki และคณะ (1986) ศึกษาถึง การผลิต PHB โดยเชื้อ *Pseudomonas* sp.K ในการเลี้ยงแบบ fed-batch โดยเมื่อจำกัดปริมาณแมกนีเซียมในรูป $MgSO_4.7H_2O$ จากเดิมปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือปริมาณ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ปริมาณ PHB จะเพิ่มขึ้น จากเดิม 10 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นเท่ากับ 45-50 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Daniel และคณะ (1992) รายงานถึง ความสำคัญของการจำกัดแมกนีเซียมต่อการสร้างและสะสม PHB ในเชื้อ *Pseudomonas* 135 โดยพบว่า ภาวะที่ไม่มีการเติม ปริมาณแมกนีเซียมในรูปของ $MgSO_4$ ปริมาณ PHB จะมีปริมาณมากกว่า คือเท่ากับ 42.50 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อจำกัดปริมาณ แอมโมเนียม และฟอตเฟต(37 และ 34.5 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) Volva และคณะ (1993) ศึกษาถึง ผลของการจำกัดปริมาณแมกนีเซียม ต่อการผลิต PHB ของเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* Z-I โดย เมื่อจำกัดปริมาณแมกนีเซียม ให้มีปริมาณเพียง 10 เปอร์เซนต์ ของปริมาณแมกนีเซียมในอาหารสูตรเดิม พบว่า ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้น จากเดิมเท่ากับ 2.1 เป็น 14.6 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ศึกษาถึง ผลของการจำกัดแมกนีเซียมในรูป $MgSO_4$ ต่อการผลิต PHB โดยเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 พบว่า อาหารที่ไม่มี $MgSO_4$ จะทำให้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นจาก 19.86 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเทียบกับ ในอาหารสูตรที่มีปริมาณอัตราส่วนของ $MgSO_4$ เท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็น 35.70 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลิตได้ปริมาณมากขึ้น เมื่อมีการจำกัดปริมาณแมกนีเซียม ควบคู่ไปกับ การจำกัดปริมาณสารอื่นๆ เช่น ไนโตรเจน พบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมของ $MgSO_4$ เท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตรโดยได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นเท่ากับ 46.67 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง อัญชนา ศุรติชจร (2537) รายงานถึง การผลิต P(3HB-co-3HV) ในเชื้อเดียวกันนี้ พบว่า การจำกัดปริมาณแมกนีเซียมไม่มีผล ในการเพิ่มปริมาณโคพอลีเมอร์ โดยปริมาณโคพอลีเมอร์สูงสุดที่ได้ (48 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ได้จากปริมาณ $MgSO_4$ ซึ่งมีค่าเท่ากับปริมาณแมกนีเซียมที่เหมาะสม ดังที่อรุณ (2536) รายงานไว้

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาถึง ปริมาณของแมกนีเซียม ในรูปของ $MgSO_4.7H_2O$ ในอาหาร MSM ที่มีผลต่อการผลิต PHB โดยถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรที่ 2 ข้อ 3 หน้า 27 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาล ปริมาณ 4 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) และ$(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ และ ใช้ฟอสเฟตในรูป Na_2HPO_4 และ โพแทสเซียม ในรูป KH_2PO_4 ปริมาณเท่ากับ 0.6 และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปรับพีเอชเริ่มต้น และ ควบคุมอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6 และ 30 °ซ ตามลำดับ แปรผันปริมาณ $MgSO_4.7H_2O$ ข้อ 8 หน้า 39 เลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เริ่มต้นเก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณ PHB และ น้ำหนักเซลล์แห้ง ตารางที่ 18 แสดงผลการวิจัย ได้พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 จะผลิต PHB ได้ปริมาณสูงสุด เท่ากับ 30.81 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณ $MgSO_4.7H_2O$ เท่ากับ 0.20 กรัมต่อลิตร ในเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นปริมาณที่เท่ากับ ปริมาณของ $MgSO_4.7H_2O$ ในอาหารชุดควบคุม และ ในอาหารที่มีปริมาณ $MgSO_4.7H_2O$ น้อยกว่า (0.10 กรัมต่อลิตร) และมากกว่านี้ (0.30 กรัมต่อลิตร) เชื้อจะผลิต PHB ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าเล็กน้อย คือได้ปริมาณเท่ากับ 29.82 และ 28.33 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี $MgSO_4.7H_2O$ ปริมาณ PHB จะมีปริมาณน้อยที่สุด คือเท่ากับ 15.45 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลแห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 18 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณกากน้ำตาล เท่ากับ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอช และควบคุมอุณหภูมิ เท่ากับ 6 และ 30 °ซ ตามลำดับ และแปรผันปริมาณ $MgSO_4.7H_2O$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ปริมาณ $MgSO_4.7H_2O$ (กรัมต่อลิตร)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ(ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ปริมาณ PHB (กรัม /ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม /ลิตร)	ปริมาณ PHB (เปอร์เซนต์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)
0.00	24	4.80	1.02	6.60	15.45
	36	4.96	0.83	5.77	14.38
	48	4.97	0.45	4.60	9.78
0.10	24	4.91	1.95	6.54	29.82
	36	4.75	0.68	5.46	12.45
	48	4.39	0.37	4.32	8.56
0.20	24	4.87	1.91	6.20	30.81
	36	4.94	1.14	4.71	24.20
	48	4.18	0.80	4.64	17.24
0.30	24	4.86	1.70	6.00	28.33
	36	5.19	0.99	5.31	18.64
	48	4.42	0.75	4.53	16.56

9. การหาชนิดและปริมาณของอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากงานวิจัยของ Page (1992) ที่รายงานถึง ความสำคัญของอินทรีย์ไนโตรเจนที่มีผลต่อการสร้างและสะสม PHB ในเชื้อ *Azotobacter vinelandii* UWD โดยปริมาณ PHB เพิ่มขึ้น ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลบริสุทธิ์ เช่น กลูโคส ฟรุกโตส หรือ ไม่บริสุทธิ์ เช่น corn syrup และ กากน้ำตาล เป็นต้น เมื่อมีการเติมอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ fish peptone (FP) ปริมาณ 0.05 ถึง 0.2 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โปรติโอสเปปโตน หมายเลข 3 หรือ สารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน รวมทั้งในการศึกษาองค์ประกอบของกากน้ำตาล พบว่า ประกอบด้วยอินทรีย์ และอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยอินทรีย์ไนโตรเจนในกากน้ำตาลจะมีผลกระตุ้นการสร้างและสะสม PHB (Page,1989) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงชนิดและปริมาณของอินทรีย์ไนโตรเจนที่อาจมีส่วนช่วยเพิ่มในการสร้างและสะสม PHB โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019

ชนิดของอินทรีย์ไนโตรเจนที่ทำการวิจัย 6 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ คาซิโตน กรดคาสซามิโน พอลีเปปโตน โปรติโอสเปปโตน หมายเลข 3 และ สารสกัดจากเนื้อวัว เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเป็น สารสกัดจากยีสต์ ในปริมาณ 0.10 กรัมต่อลิตร เป็นองค์ประกอบ และ จากผลการวิจัย ในข้อ 2 ปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของเชื้อ BA-019 เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร งานวิจัยในขั้นนี้จึงมุ่งศึกษาหาชนิด และปริมาณของอินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อใช้แทนสารสกัดจากยีสต์ ปริมาณ 0.10 กรัมต่อลิตร หรือ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ในการเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ทำให้เชื้อ BA-019 สร้างและสะสม PHB ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นอีกในอาหาร MSM การแปรผันชนิดของอินทรีย์ไนโตรเจนทั้ง 6 ชนิด จึงแปรผันในปริมาณ 0.10 และ 1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับเปรียบเทียบกับ อาหาร MSM สูตรเดิม ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น $(NH_4)_2SO_4$ และสารสกัดจากยีสต์ ปริมาณ 0.10 และ 1 กรัมต่อลิตร ดังวิธีในข้อ 9 หน้า 39

ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อใน อาหารสูตรที่ 2 ข้อ 3 หน้า 27 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีกากน้ำตาล ปริมาณ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีฟอสเฟตในรูป Na_2HPO_4 และโพแทสเซียมในรูป KH_2PO_4 ปริมาณเท่ากับ 0.6 และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

และมีปริมาณ $MgSO_4.7H_2O$ เท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้น และ ควบคุมอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6 และ 30 °ซ ตามลำดับ เลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เริ่มเก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณ PHB และ น้ำหนักเซลล์แห้ง

ผลการวิจัย (ตารางที่ 19 ก และ ข) พบว่า ปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจน เท่ากับ 0.10 กรัมต่อลิตร เชื้อ BA-019 ที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะสร้าง และสะสม PHB ได้สูงสุด คือเท่ากับ 28.83 เปอร์เซนต์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ และ ในปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้น คือ เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร เชื้อ BA-019 ที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีพอลีเปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจนจะสร้าง และสะสม PHB สูงสุด คือเท่ากับ 26.23 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ชั่วโมงที่ 72 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการนำอินทรีย์ไนโตรเจนมาเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร หรือ แทนสารสกัดจากยีสต์ ปริมาณ 0.10 กรัมต่อลิตรในอาหาร MSM เดิมในข้อ 4 หน้า 27 แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 0.10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนมีการสร้างและสะสม PHB ได้ดีกว่า และเหมาะในการนำมาใช้แทนมากกว่า

และเมื่อเปรียบเทียบการสร้าง และสะสม PHB ของเชื้อ BA-019 ในอาหาร MSM เดิม ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และ สารสกัดจากยีสต์ ปริมาณ 0.10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอนินทรีย์และอินทรีย์ไนโตรเจน ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่ใช้ในชุดควบคุมกับ อาหาร MSM ที่มีสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 0.10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียว พบว่า ในอาหาร MSM ชุดควบคุม ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และ สารสกัดจากยีสต์ ปริมาณ 0.10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอนินทรีย์ และ อินทรีย์ไนโตรเจน ตามลำดับ แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 จะสร้างและสะสม PHB ปริมาณมากกว่า คือเท่ากับ 32.73 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 24ของการเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่ ปริมาณ PHB ที่แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 สร้าง และสะสมได้ในอาหาร MSM ที่มีสารสกัดจากยีสต์ ปริมาณ 0.10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียว เท่ากับ 28.83 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลแห้ง ในชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ

ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ชุดควบคุมที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตร และมีสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 0.10 กรัมต่อลิตร เป็นอาหารที่มีชนิด และ ปริมาณของอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสม สำหรับการสร้างและสะสม PHB โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019

ตารางที่ 19 ก.ปริมาณของ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ BA-019 ในอาหาร MSM ซึ่งมีกากน้ำตาล ปริมาณ 4 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอช และ ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 6 และ 30 °ซ ตามลำดับ แปรผันชนิดของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ปริมาณ 0.10 กรัมต่อลิตร

ชนิดของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (กรัม /ลิตร)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ปริมาณ PHB (กรัม / ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม /ลิตร)	ปริมาณ PHB (เปอร์เซนต์ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง)
สารสกัดจากยีสต์	24	6.53	1.11	3.85	28.83
	36	6.05	1.10	4.02	27.36
	48	5.48	1.10	4.00	27.50
คาซิโตน	24	6.65	1.01	3.98	25.38
	36	5.81	0.98	4.00	24.50
	48	5.13	1.08	4.17	25.90
กรดคาสซา-มิโน	24	6.38	0.95	3.93	24.17
	36	6.00	0.96	3.93	24.43
	48	5.29	1.12	3.96	28.28
พอลี-เปปโตน	24	6.60	1.00	3.95	25.32
	36	5.86	0.98	4.11	23.84
	48	5.38	1.03	4.50	22.89

ตารางที่ 19 ก. (ต่อ)

ชนิดของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (กรัม /ลิตร)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	พีเอชสุดท้าย	ปริมาณ PHB (กรัม / ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม /ลิตร)	ปริมาณ PHB (เปอร์เซนต์ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง
โปรติโอส	24	6.48	1.03	3.77	27.32
เปปโตน	36	5.82	0.97	3.74	25.94
หมายเลข 3	48	5.14	1.05	3.91	26.85
สารสกัด	24	6.58	1.00	3.69	27.10
จาก	36	5.94	0.95	3.72	25.54
เนื้อวัว	48	5.21	1.05	4.25	24.71
*	24	5.70	1.82	5.56	32.73
ชุดควบคุม	36	5.54	0.95	4.66	20.39
	48	5.83	0.76	4.52	16.81

หมายเหตุ * ชุดควบคุม ประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และ สารสกัดจากยีสต์ ปริมาณ 0.10 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 19 ข. ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ BA-019 ในอาหาร MSM ซึ่งมีกากน้ำตาลปริมาณ 4 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอช และ ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 6 และ 30 °ซ ตามลำดับ แปรผันชนิดของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร

ชนิดของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (กรัม /ลิตร)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ปริมาณ PHB (กรัม / ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม /ลิตร)	ปริมาณ PHB (เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)
สารสกัดจากยีสต์	24	6.10	1.03	4.45	23.15
	36	5.77	1.03	4.42	23.30
	48	5.23	1.06	4.82	21.99
คาร์ซิโตน	24	6.03	0.99	4.12	24.03
	36	5.88	1.03	4.26	24.18
	48	5.27	1.06	4.82	21.99
กรดคาสซา-มิโน	24	6.08	0.93	3.85	24.16
	36	5.97	0.97	3.94	24.62
	48	5.37	1.00	4.34	23.04
พอลี - เปปโตน	24	6.34	0.99	4.28	23.13
	36	6.05	0.99	3.89	25.45
	48	5.21	1.07	4.08	26.23

ตารางที่ 19 ข. (ต่อ)

ชนิดของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (กรัม /ลิตร)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ปริมาณ PHB (กรัม / ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม /ลิตร)	ปริมาณ PHB (เปอร์เซนต์ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง
โปรติโอส	24	6.18	1.08	4.20	25.71
เปปโตน	36	5.97	0.95	3.89	24.42
หมายเลข 3	48	5.46	1.06	4.46	23.78
สารสกัด	24	6.66	1.05	4.12	25.49
จาก	36	6.03	0.99	4.26	23.24
เนื้อวัว	48	5.39	1.07	4.43	24.15
*	24	5.70	1.82	5.56	32.73
ชุดควบคุม	36	5.54	0.95	4.66	20.39
	48	5.83	0.76	4.52	16.81

หมายเหตุ * ชุดควบคุม ประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และ สารสกัดจากยีสต์ ปริมาณ 0.10 กรัมต่อลิตร

10.การหาชนิดและปริมาณสาร dissociating agents ที่เหมาะสม

จากผลวิจัยของ Vignolo และคณะ (1995) ที่รายงานถึง การใช้ Tween 80 และ SDS ซึ่งเป็นสาร dissociating agents ในการผลิตแลคโตซิน 705 โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* CRL 705 พบว่า Tween 80 สามารถกระตุ้นการผลิตแลคโตซินของเชื้อได้ การเพิ่มของแลคโตซิน เนื่องมาจาก ผลของสาร dissociating agents คือ Tween 80 ที่มีผลต่อการให้สารผ่านของผิวเซลล์ (Permeability of cell membrane) โดย Tween 80 จะไปเร่งการแพร่ (diffusion) ของแลคโตซิน ให้ออกจากเซลล์

ชนิดของสาร dissociating agents ที่เลือกมาทำการวิจัย ได้แก่ SDS และ Tween 80 ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรที่ 2 ข้อ 3 หน้า 27 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีกากน้ำตาล ปริมาณ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีฟอสเฟตในรูป Na_2HPO_4 และ โพแทสเซียม (KH_2PO_4) ปริมาณเท่ากับ 0.6 และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีปริมาณของ $MgSO_4.7H_2O$ เท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณสารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 0.10 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้น และ ควบคุมอุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 6 และ 30 °ซ ตามลำดับ แปรผันปริมาณ SDS เท่ากับ 0 จนถึง 0.50 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแปรผันปริมาณ Tween 80 เท่ากับ 0 จนถึง 4 เปอร์เซนต์(ปริมาตรต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณ PHB และ น้ำหนักเซลล์แห้ง ตารางที่ 20 แสดงผลการวิจัย พบว่า ปริมาณ PHB ที่ได้จากการสร้างและสะสมโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีปริมาณของ Tween 80 เท่ากับ 2.5 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นสาร dissociating agents จะมีปริมาณ PHB มากกว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM สูตรเดิมที่ใช้ในงานวิจัย โดยได้ปริมาณเพิ่มขึ้นสูงถึง 47.48 เปอร์เซนต์ ในชั่วโมงที่ 36 ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติม Tween 80 แบคทีเรียจะสร้างและสะสม PHB ในปริมาณเพียง 33.60 เปอร์เซนต์ ในชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนในอาหาร MSM ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของ Tween 80 มากกว่า 2.5 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) คือเท่ากับ 3.0 และ 4.0 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ได้ปริมาณ PHB ที่ผลิตรองลงมา คือเท่ากับ 44.11 และ

39.51 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลแห้ง ที่เวลา 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และในอาหารที่มีปริมาณ Tween 80 น้อยกว่า 2.5 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) คือ ปริมาณตั้งแต่ 0.50 จนถึง 2.00 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) แบคทีเรียสร้าง และสะสม PHB ได้น้อยกว่า ยกตัวอย่างเช่น ในอาหารที่มี Tween 80 ปริมาณ 1.5 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เชื้อผลิต PHB ได้เท่ากับ 30.63 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นต้น และ เมื่อเปรียบเทียบในอาหารที่มี SDS เป็นสาร dissociating agent พบว่า ปริมาณ PHB สูงสุดที่ได้ ได้จากอาหารที่มี SDS ปริมาณ 1.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 20.00 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งปริมาณ PHB สูงสุดที่สร้างและสะสมในอาหารที่มี SDS จะมีปริมาณน้อยกว่าปริมาณ PHB สูงสุดที่ผลิต ในอาหารชุดควบคุม และ อาหารที่มี Tween 80 เป็นองค์ประกอบ

ตารางที่ 20 (ต่อ)

เปอร์เซนต์ Tween 80 (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยง (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ปริมาณ PHB (กรัม /ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม /ลิตร)	ปริมาณ PHB (เปอร์เซนต์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)
Tween 80 (0.50 %)	24	4.49	1.82	6.91	26.34
	36	4.38	1.38	5.68	24.30
	48	4.21	0.71	4.32	16.44
Tween 80 (1.0 %)	24	4.51	1.91	6.83	27.96
	36	4.42	1.32	5.54	23.84
	48	4.22	0.72	4.49	16.04
Tween 80 (1.5 %)	24	4.47	2.08	6.79	30.63
	36	4.37	1.47	5.69	25.93
	48	4.21	0.87	4.50	19.33
Tween 80 (2.0 %)	24	4.46	1.88	6.84	27.48
	36	4.38	2.25	5.89	38.20
	48	4.21	1.09	4.86	22.43
Tween 80 (2.5 %)	24	4.49	2.69	6.86	39.21
	36	4.44	2.73	5.75	47.48
	48	4.23	1.34	5.01	26.75

ตารางที่ 20 (ต่อ)

เปอร์เซนต์ Tween 80 (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยง (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ปริมาณ PHB (กรัม /ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม /ลิตร)	ปริมาณ PHB (เปอร์เซนต์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)
Tween 80 (3.0 %)	24	4.49	2.59	6.98	37.11
	36	4.42	2.51	5.69	44.11
	48	4.24	1.21	5.21	23.22
Tween 80 (4.0 %)	24	4.52	2.53	7.04	35.94
	36	4.44	2.28	5.77	39.51
	48	4.24	1.30	5.23	24.86

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่เหมาะสมต่อการสร้างและสะสม PHB ของเชื้อ BA-019 ใน 1 ลิตรเป็นดังนี้

กากน้ำตาล (แหล่งคาร์บอน)	4	เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
แอมโมเนียมซัลเฟต (แหล่งไนโตรเจน)	1	กรัมต่อลิตร
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2	กรัมต่อลิตร
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	0.10	กรัมต่อลิตร
Tween 80	2.5	เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

และสารอาหารอื่น ๆ ตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เดิม ในข้อ 4 หน้า 27